SARA ISABEL BORGES CARDOSO

**Desenvolvimento e avaliação de adsorventes para purificação de
DNA plasmidial por meio de cromatografia baseada em ligantes de
arginina**

São Paulo
2018

SARA ISABEL BORGES CARDOSO

**Desenvolvimento e avaliação de adsorventes para purificação de
DNA plasmidial por meio de cromatografia baseada em ligantes de
arginina**

São Paulo
2018

SARA ISABEL BORGES CARDOSO

**Desenvolvimento e avaliação de adsorventes para purificação de
DNA plasmidial por meio de cromatografia baseada em ligantes de
arginina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues
Azzoni

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Fani Pereira de
Sousa

São Paulo
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Adriano Rodrigues Azzoni pela amizade e apoio científico durante o período do doutorado. Foi um grande privilégio para mim trabalhar e aprender com ele.

Gostaria também de reconhecer a oportunidade de desenvolver este estudo no Centro de Pesquisa da Universidade da Beira Interior com a excelente co-orientação da Professora Doutora Fani Sousa, que me recebeu de braços abertos no seu laboratório para a realização da fase final deste trabalho.

Agradeço todo o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (444412/2014-0 and 307739/2015-5), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2013/23780-1).

Além disso, gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas envolvidas da Faculdade de Engenharia Química e do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (Portugal), em especial ao Prof. Pedro Pessôa e Ângela Sousa, pela constante disposição em ajudar, bem como à Andreia Silva e Orlinda Azevedo, pela ajuda e amizade. Agradeço a todos os colegas do bloco 20, do departamento de Engenharia Química e do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, com um carinho especial ao Rafael da Gama, Rafael Risnik, Luís Franco, Maria Robustillo, Joana Valente e Margarida Almeida pelas exemplares pessoas que representam e que tive a sorte de conhecer.

Eu também estou grata aos meus amigos e família, especialmente aos meus pais, por todo o seu amor, apoio e cooperação frutuosa durante a minha formação académica e estudos de pós-graduação.

Agradeço profundamente ao Cristiano, pelo seu carinho, presença, paciência e suporte durante os últimos anos. Obrigado por ficar comigo durante os momentos difíceis, pelos conselhos e encorajamento para acreditar que é possível superar todos os desafios.

RESUMO

CARDOSO, S. I. B. **Desenvolvimento e avaliação de adsorventes para purificação de DNA plasmidial por meio de cromatografia baseada em ligantes de arginina.**

Defesa (Doutorado Direto) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O uso de DNA plasmidial (pDNA) visando a aplicações terapêuticas tem aumentado nos últimos anos. A cromatografia aparece como a técnica de purificação mais comum para obtenção de amostras de pDNA com o elevado grau de pureza exigido. Porém, as resinas cromatográficas disponíveis apresentam ainda uma série de desafios, nomeadamente no desenvolvimento de ligantes específicos e matrizes capazes de acomodar este tipo de molécula. Relativamente à apuração de novos ligantes, alguns estudos têm mostrado o potencial do aminoácido arginina para estabelecer interações específicas e preferenciais com o pDNA. Por outro lado, resinas monolíticas surgem como suportes interessantes devido às suas excelentes propriedades de transferência de massa e altas capacidades de adsorção. Neste estudo, diferentes ligantes baseados em arginina (arginina, di-arginina e tri-arginina) foram imobilizados em resinas de agarose previamente ativadas. Um primeiro estudo de adsorção em batelada foi realizado a fim de avaliar e compreender os mecanismos envolvidos no processo de adsorção dos ácidos nucleicos pDNA e RNA em resina com o aminoácido arginina. Na sequência, apresentamos uma proposta inovadora para o uso de ligantes de arginina em resinas de agarose, em um único passo de purificação em modo negativo a seguir ao passo de concentração por isopropanol. A capacidade da resina para o pDNA foi substancialmente maior do que a obtida para o mesmo tipo de resina no modo positivo, com notória vantagem de capacidade no uso de di-arginina face a arginina com rendimentos próximos de 100% do plasmídeo carregado. Os ligantes di-arginina e tri-arginina foram também imobilizados em resinas monolíticas. Em comparação com o aminoácido arginina, a imobilização dos homopeptídeos nas resinas monolíticas levou ao aumento da capacidade de adsorção (cerca de 2,5 vezes superior) e especificidade de interações, mostrando-se como uma estratégia promissora para processos de purificação de pDNA.

Palavras-chave: Cromatografia de afinidade. Vetores não virais DNA plasmidial. Resinas de agarose Monolitos. Peptídeos de arginina.

ABSTRACT

CARDOSO, S. I. B. **Development and evaluation of adsorbents for the purification of plasmid DNA by chromatography based on arginine ligands.** 2018. Defense (Direct PhD) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The use of plasmid DNA (pDNA) for therapeutic applications has increased in recent years. Chromatography appears as the most common purification technique to obtain samples of pDNA with the high degree of purity required. However, the available chromatographic resins still present a series of challenges, namely in the development of specific ligands and matrices capable of accommodating this type of molecule. Regarding the determination of new ligands, several studies have shown the potential of the arginine amino acid to establish specific and preferential interactions with the pDNA. On the other hand, monolithic resins appear as interesting approaches due to their excellent mass transfer properties and high adsorption capacities. In this study, different arginine based ligands (arginine and di-arginine) were firstly immobilized on activated agarose resins. The first part of the work describes the adsorption equilibrium of plasmid DNA adsorption process, as well as the interaction with its main impurity (RNA) on arginine supports in a *batch* format, in order to compare and gather crucial information about adsorption mechanisms involved in this type of affinity system. Then, a new use for chromatographic bead matrixes based on arginine ligands was proposed, working as an adsorption matrix pDNA purification in negative mode after isopropanol concentration of the sample. The arginine based supports capacity for pDNA under negative mode for pDNA was substantially higher than that obtained with the same type of resin in the conventional positive mode, with a notable advantage of using di-arginine with recovery yields near 100%. The homopeptides (di-arginine and tri-arginine) were also immobilized on functionalized monolithic resins (BIA Separations, Slovenia). Effectively, the immobilization of the arginine homopeptides made the monolithic resins more functional compared to the (mono)arginine based resin, exhibiting greater binding capacities (around 2,5 times higher) and interaction intensities, proving to be a promising strategy for purification processes of pDNA.

Keywords: Affinity chromatography. Non-viral vectors. Plasmid DNA. Agarose resins. Monoliths. Arginine peptides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - NÚMEROS DE ENSAIOS CLÍNICOS COM TERAPIA BASEADA EM GENES TERAPÊUTICOS APROVADOS GLOBALMENTE ENTRE 1989 E 2017 (ADAPTADO DE (GENE THERAPY CLINICAL, TRIALS WORLDWIDE)....	4
FIGURA 2 – VETORES UTILIZADOS NOS ENSAIOS CLÍNICOS DE PRODUTOS BASEADOS EM GENES (ADAPTADO DE (GENE THERAPY CLINICAL, TRIALS WORLDWIDE).	5
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ENSAIOS CLÍNICOS DE PRODUTOS BASEADOS EM GENES ORGANIZADOS POR TIPO DE DOENÇA (ADAPTADO DE (GENE THERAPY CLINICAL, TRIALS WORLDWIDE).....	12
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ENSAIOS CLÍNICOS DE PRODUTOS BASEADOS EM GENES ORGANIZADOS POR FASE CLÍNICA EM EXPERIMENTAÇÃO (ADAPTADO DE (GENE THERAPY CLINICAL, TRIALS WORLDWIDE).	12
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS SEQUÊNCIAS QUE COMPÕEM O VETOR PLASMIDIAL PVAX1-GFP (AZZONI ET AL., 2007).	50
FIGURA 6 - DADOS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO AOS QUAIS FORAM AJUSTADOS OS MODELOS DE LANGMUIR (- -) E FREUNDLICH (.....) DO SISTEMA PDNA-ARGININA IMOBILIZADA EM AGAROSE, PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS EM 20 MMOL/L TRIS-HCL, 10 MMOL/L EDTA: A (PH 6,0), B (PH 7,0), C (PH 8,0) E D (PH 9,0).....	68
FIGURA 7 – DADOS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO AOS QUAIS FORAM AJUSTADOS OS MODELOS DE LANGMUIR (- -) E FREUNDLICH (.....) DO SISTEMA RNA-ARGININA IMOBILIZADA EM AGAROSE, PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS EM 20 MMOL/L TRIS-HCL, 10 MMOL/L EDTA: A (PH 6,0), B (PH 7,0), C (PH 8,0) E D (PH 9,0).....	69
FIGURA 8 – VARIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO (NM) DAS MOLÉCULAS DE PDNA E RNA DETERMINADO POR SOLUÇÕES DE DE CONCENTRAÇÃO 100 µG/ML E 200 µG/ML, RESPETIVAMENTE EM TAMPÃO 20 MMOL/L TRIS 10 MMOL/L EDTA PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS (PH 6,0; PH 7,0; PH 8,0; E PH 9,0), COM OS RESPETIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO, ASSIM COMO OS VALORES DO ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI) DAS AMOSTRAS FORNECIDOS PELO SOFTWARE UTILIZADO.	76
FIGURA 9 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS AMOSTRAS DE SOBRENADANTE PROVENIENTES DA ADSORÇÃO ENTRE O PDNA E O RNA COM OS LIGANTES DE ARGININA-AGAROSE, EM TAMPÃO 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0). POÇO 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1Kb; POÇO 2: 0,05 MG/ML DE PVAX1-GFP (CONTROLE); POÇO 3: 0,10 MG/ML DE RNA (CONTROLE); POÇO 4: 0,05 MG/ML DE PVAX1-GFP + 0,10 MG/ML DE RNA (CONTROLE); POÇO 5: SOBRENADANTE DE 0,05 MG/ML DE PVAX1-GFP + 25 µL ARGININA-AGAROSE (APÓS 1 H); POÇO 6: SOBRENADANTE DE 0,10 MG/ML OF RNA + 25 µL ARGININA-AGAROSE (APÓS 1 H); POÇO 7: SOBRENADANTE DE 0,05 MG/ML DE PVAX1-GFP + 0,10 MG/ML DE RNA + 25 µL ARGININA-AGAROSE (APÓS 1 H)).	79
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM MODO POSITIVO (PROCESSO I, À ESQUERDA) EM COMPARAÇÃO COM O MODO NEGATIVO PROPOSTO NESTE TRABALHO (PROCESSO II, À DIREITA). PROCESSO I: FERMENTAÇÃO, RECOLHA CELULAR, CENTRIFUGAÇÃO, CONCENTRAÇÃO POR ISOPROPANOL, PRECIPITAÇÃO POR SULFATO DE AMÔNIO, CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR, CROMATOGRAFIA EM MODO POSITIVO (EM QUE O PDNA SAI DA COLUNA NO PASSO DE ELUIÇÃO) (SOARES ET AL., 2013; SOUSA; QUEIROZ, 2011).	

PROCESSO II: FERMENTAÇÃO, RECOLHA CELULAR, CENTRIFUGAÇÃO, CONCENTRAÇÃO POR ISOPROPANOL, CROMATOGRAFIA EM MODO NEGATIVO (EM QUE O PDNA SAI DA COLUNA NO PASSO DE *FLOW-THROUGH*).

..... 84

FIGURA 11 - EXEMPLIFICAÇÃO DE UMA CORRIDA CROMATOGRÁFICA NO MODO NEGATIVO UTILIZANDO A RESINA DE ARGININA-AGAROSE (PH 7,0), A 0,25 ML/MIN, CONSISTINDO EM TRÊS ETAPAS: CARREGAMENTO DA AMOSTRA (FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE FLOW-THROUGH RECUPERADAS AO LONGO DA CORRIDA), LAVAGEM E ELUIÇÃO. 85

FIGURA 12 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO A PARTIR DE UMA MISTURA PDNA/RNA EM UMA RAZÃO MÁSSICA DE 1:3, CORRESPONDENDO APROXIMADAMENTE A 30 µG/ML E 90 µG/ML DE PDNA E RNA (AMOSTRA DE INJEÇÃO, À ESQUERDA), UTILIZANDO AS RESINAS DE ARGININA (A) E DI-ARGININA (B) IMOBILIZADAS EM AGAROSE. FASE MÓVEL A: 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 7,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 7,0), A CORRIDA FOI REALIZADA A 0,25 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA PELA SATURAÇÃO DA COLUNA, CAUSADA PELA CONTINUA INJEÇÃO DE 4,5 ML DE AMOSTRA INICIAL NA FASE MÓVEL A. AS AMOSTRAS DOS PASSOS DE FLOW-THROUGH, LAVAGEM AND ELUIÇÃO ESTÃO REPRESENTADAS EM A EM B. POÇO 1: FLOW-THROUGH 2-5 MIN, POÇO 2: FLOW-THROUGH 5-8 MIN, POÇO 3: FLOW-THROUGH 8-11 MIN, POÇO 4: FLOW-THROUGH 11-14 MIN), POÇO 5: FLOW-THROUGH 14-17 MIN, POÇO 6: FLOW-THROUGH 17-20 MIN, POÇO 7: LAVAGEM COM FASE MÓVEL, POÇO 8: ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL B..... 86

FIGURA 13 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO A PARTIR DE LISADO DE E. COLI RESULTANTE DO ISOLAMENTO PRIMÁRIO SEGUIDO DE PRECIPITAÇÃO COM ISOPROPANOL (À ESQUERDA), INJETADO DIRETAMENTE NAS COLUNAS EMPACOTADAS COM AS RESINAS CROMATOGRÁFICAS DE ARGININA (A E C) E DI-ARGININA (B E D), A VALORES DE PH DE 7,0 (A E B) E 8,0 (C E D). FASE MÓVEL A: 10 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 7,0 OU 8,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 10 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 7,0 OU 8,0). A CORRIDA FOI REALIZADA A 0,25 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA PELA SATURAÇÃO DA COLUNA, CAUSADA PELA CONTINUA INJEÇÃO DE 4,5 ML DE AMOSTRA INICIAL (40 X DILUÍDA NA RESPECTIVA NA FASE MÓVEL A). POÇO 1: FLOW-THROUGH 2-5 MIN, POÇO 2: FLOW-THROUGH 5-8 MIN, POÇO 3: FLOW-THROUGH 8-11 MIN, POÇO 4: FLOW-THROUGH 11-14 MIN), POÇO 5: FLOW-THROUGH 14-17 MIN, POÇO 6: FLOW-THROUGH 17-20 MIN, POÇO 7: LAVAGEM COM FASE MÓVEL A, POÇO 8: ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL B..... 88

FIGURA 14 – ENSAIOS DE RUPTURA DAS RESINAS MONOLÍTICAS IMOBILIZADAS COM ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA. VAZÃO: 1 ML/MIN; AMOSTRA: PVAX1-GFP PRÉ-PURIFICADA (0,05 MG/ML) COM O KIT NZYMAXIPREP EM TAMPÃO 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0). 97

FIGURA 15 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DA ISOFORMA SC DO PDNA DE UMA AMOSTRA DE LISADO DE E. COLI CLARIFICADO, UTILIZANDO A RESINA MONOLÍTICA COM **ARGININA** IMOBILIZADA. FASE MÓVEL A: 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0). A CORRIDA FOI REALIZADA A 1 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA POR PASSOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl NO ELUENTE (EIXO SECUNDÁRIO). DETECÇÃO DE UV A 260 NM. O VOLUME DE INJEÇÃO FOI DE 1 ML. RESPECTIVA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS EM CADA PICO DO ENSAIO CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO. POÇO M: MARCADOR MOLECULAR; POÇO F: AMOSTRA DE INJEÇÃO (AMOSTRA DE LISADO DE LISADO E.

COLI CLARIFICADO); AS FRAÇÕES CORRESPONDENTES AOS PICOS 1-5 ESTÃO REPRESENTADAS NOS POÇOS 1-5 DO GEL, RESPETIVAMENTE. 101

FIGURA 16 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DA ISOFORMA SC DO PDNA DE UMA AMOSTRA DE LISADO DE E. COLI CLARIFICADO, UTILIZANDO A RESINA MONOLÍTICA COM **DI-ARGININA** IMOBILIZADA. FASE MÓVEL A: 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0). A CORRIDA FOI REALIZADA A 1 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA POR PASSOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl NO ELUENTE (EIXO SECUNDÁRIO). DETECÇÃO DE UV A 260 NM. O VOLUME DE INJEÇÃO FOI DE 1 ML. RESPECTIVA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS EM CADA PICO DO ENSAIO CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO. POÇO M: MARCADOR MOLECULAR; POÇO F: AMOSTRA DE INJEÇÃO (AMOSTRA DE LISADO DE LISADO E. COLI CLARIFICADO); AS FRAÇÕES CORRESPONDENTES AOS PICOS 1-4 ESTÃO REPRESENTADAS NOS POÇOS 1-4 DO GEL, RESPETIVAMENTE. 102

FIGURA 17 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DA ISOFORMA SC DO PDNA DE UMA AMOSTRA DE LISADO DE E. COLI CLARIFICADO, UTILIZANDO A RESINA MONOLÍTICA COM **TRI-ARGININA** IMOBILIZADA. FASE MÓVEL A: 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0). A CORRIDA FOI REALIZADA A 1 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA POR PASSOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl NO ELUENTE (EIXO SECUNDÁRIO). DETECÇÃO DE UV A 260 NM. O VOLUME DE INJEÇÃO FOI DE 1 ML. RESPECTIVA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS EM CADA PICO DO ENSAIO CROMATOGRÁFICO DE PURIFICAÇÃO. POÇO M: MARCADOR MOLECULAR; POÇO F: AMOSTRA DE INJEÇÃO (AMOSTRA DE LISADO DE LISADO E. COLI CLARIFICADO); AS FRAÇÕES CORRESPONDENTES AOS PICOS 1-4 ESTÃO REPRESENTADAS NOS POÇOS 1-4 DO GEL, RESPETIVAMENTE. 103

FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO A PARTIR DE UMA MISTURA PDNA/RNA EM UMA RAZÃO MÁSSICA DE 1:3, CORRESPONDENDO APROXIMADAMENTE A 30 µG/ML E 90 µG/ML DE PDNA E RNA (AMOSTRA DE INJEÇÃO, À ESQUERDA), UTILIZANDO AS RESINAS DE ARGININA (A) E DI-ARGININA (B) IMOBILIZADAS EM AGAROSE. FASE MÓVEL A: 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0); FASE MÓVEL B: 1 MOL/L DE NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0), A CORRIDA FOI REALIZADA A 0,25 ML/MIN E A ELUIÇÃO FOI PROMOVIDA PELA SATURAÇÃO DA COLUMA, CAUSADA PELA CONTINUA INJEÇÃO DE 4,5 ML DE AMOSTRA INICIAL NA FASE MÓVEL A. AS AMOSTRAS DOS PASSOS DE FLOW-THROUGH, LAVAGEM AND ELUIÇÃO ESTÃO REPRESENTADAS EM A EM B. POÇO 1: FLOW-THROUGH 2-5 MIN, POÇO 2: FLOW-THROUGH 5-8 MIN, POÇO 3: FLOW-THROUGH 8-11 MIN, POÇO 4: FLOW-THROUGH 11-14 MIN), POÇO 5: FLOW-THROUGH 14-17 MIN, POÇO 6: FLOW-THROUGH 17-20 MIN, POÇO 7: LAVAGEM COM FASE MÓVEL, POÇO 8: ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL B..... 129

FIGURA 19 - ENSAIOS DE RUPTURA DAS COLUNAS MONOLÍTICAS FUNCIONALIZADAS COM ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA. VAZÃO: 1 ML/MIN; AMOSTRA: PVAX1-GFP PRÉ-PURIFICADA (0,05 MG/ML) COM O KIT NZYMAXIPREP EM TAMPÃO 2 MOL/L NaCl EM 20 MMOL/L TRIS-HCL E 10 MMOL/L EDTA (PH 8,0)... 130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPECIFICAÇÕES E ANÁLISES RECOMENDADAS PARA PUREZA DE PREPARAÇÕES DE PDNA PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA (ADAPTADO DE (FERREIRA, 2005; FERREIRA ET AL., 2000)).	17
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO TÍPICA DO LISADO CELULAR E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS COMPONENTES (CONSIDERANDO-SE UM PLASMÍDEO COM 6000PB) (ADAPTADO DE (BONTURI ET AL., 2013; DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005)).	22
TABELA 3 – CICLOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR.	64
TABELA 4 – PARÂMETROS DE LANGMUIR E FREUNDLICH DO SISTEMA PDNA-ARGININA IMOBILIZADA EM AGAROSE AJUSTADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS EM 20 MMOL/L TRIS-HCL, 10 MMOL/L EDTA: A (PH 6,0), B (PH 7,0), C (PH 8,0) E D (PH 9,0).	71
TABELA 5 – PARÂMETROS DE LANGMUIR E FREUNDLICH DO SISTEMA RNA-ARGININA IMOBILIZADA EM AGAROSE AJUSTADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS EM 20 MMOL/L TRIS-HCL, 10 MMOL/L EDTA: A (PH 6,0), B (PH 7,0), C (PH 8,0) E D (PH 9,0).	72
TABELA 6 – DIÂMETRO MÉDIO (NM) DAS MOLÉCULAS DE PDNA E RNA DETERMINADO POR SOLUÇÕES DE DE CONCENTRAÇÃO 100 µG/ML E 200 µG/ML, RESPETIVAMENTE EM TAMPÃO 20 MMOL/L TRIS 10 MMOL/L EDTA PARA AS VÁRIAS CONDIÇÕES DE PH TESTADAS (PH 6,0; PH 7,0; PH 8,0; E PH 9,0), COM OS RESPETIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO, ASSIM COMO OS VALORES DO ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI) DAS AMOSTRAS FORNECIDOS PELO SOFTWARE UTILIZADO.	75
TABELA 7 – VALORES DE CAPACIDADE DINÂMICA DE ADSORÇÃO (CLD) OBTIDOS PELOS DE RESINAS DE AGAROSE IMOBILIZADOS COM AS RESINAS DE ARGININA DE DI-ARGININA PARA AS MOLÉCULAS DE PDNA E RNA (PH 7,0 E 8,0), COM OS RESPECTIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO. AS CURVAS DE RUPTURA FORAM REALIZADAS A 0,25 ML/MIN, COM SOLUÇÕES PRÉ-PURIFICADAS DE PDNA E RNA DE CONCENTRAÇÕES 0,05 MG/ML E 0,10 MG/ML, RESPECTIVAMENTE.	81
TABELA 8 – ANÁLISE POR HPLC DA MASSA E RENDIMENTO (%) DAS AMOSTRAS DE <i>FLOW-THROUGH</i> E ELUIÇÃO RESULTANTES DE UMA ESTRATÉGIA DE CROMATOGRAFIA EM MODO NEGATIVO, COM RESINAS DE ARGININA E DI-ARGININA IMOBILIZADAS EM AGAROSE, A PARTIR DE LISADO DE <i>E. COLI</i> APÓS ISOLAMENTO PRIMÁRIO E PRECIPITAÇÃO COM ISOPROPANOL.	89
TABELA 9 –QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ENDOTOXINAS E GDNA NAS AMOSTRAS DE <i>FLOW-THROUGH</i> ISOLADAS PELAS RESINAS DE AGAROSE DE ARGININA E DI-ARGININA, DE UMA AMOSTRA DE LISADO PRÉ-PURIFICADO (APÓS PRECIPITAÇÃO COM ISOPROPANOL) DE <i>E. COLI</i> .	90
TABELA 10 – TEMPOS DE RETENÇÃO (MIN) OBTIDOS PARA AS MOLÉCULAS DE PDNA COM AS RESINAS COM ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA IMOBILIZADAS, E QUANTIDADE DE SAL (NaCl) [MMOL/L] NECESSÁRIA PARA ELUIR ESSAS ESPÉCIES. O TEMPO DO GRADIENTE FOI DE 5 MIN.	94
TABELA 11 - CAPACIDADES DE LIGAÇÃO DINÂMICAS DAS RESINAS MONOLÍTICAS COM ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA IMOBILIZADAS, DETERMINADAS COM UMA SOLUÇÃO DE 0,05 MG/ML DO PLASMÍDEO pVAX1-GFP.	97

TABELA 12 - ANÁLISE HPLC DA CONCENTRAÇÃO, PUREZA E RENDIMENTO DA AMOSTRA DA ISOFORMA SC DO PLASMÍDEO PVAX1-GFP ISOLADO PELAS COLUNAS MONOLÍTICAS FUNCIONALIZADAS COM ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA.	108
TABELA 13 – TEOR DE PROTEÍNAS, ENDOTOXINAS E gDNA QUANTIFICADO NAS AMOSTRAS DE LISADO CLARIFICADO DE <i>E. COLI</i> E RESULTANTES DO ISOLAMENTO PELAS RESINAS MONOLÍTICAS DE ARGININA, DI-ARGININA E TRI-ARGININA.	109

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – EQUAÇÃO REFERENTE AO MODELO DE LANGMUIR.	57
EQUAÇÃO 2 – EQUAÇÃO REFERENTE AO MODELO DE FREUNDLICH.	57

LISTA DE ABREVIações

AGE	Eletroforese em gel de agarose
Batch	Batelada
CDI	Carbonildiimidazol
CV	Volumes de coluna
CLD	Capacidade de ligação dinâmica
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMA	Agência europeia de medicamentos
FDA	Food and drug administration
FPLC	Cromatografia líquida da proteína rápida
GCP	Boas práticas de laboratório
gDNA	DNA genômico
GLP	Boas práticas clínicas
GMP	Boas práticas de fabrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ln pDNA	Isoforma linear
LAL	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i>
Loop	Laço
LPS	Lipopolissacarídeos
oc pDNA	Isoforma aberta linear
PDI	Polidispersividade
pDNA	DNA plasmidial
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal

sc pDNA

SEM-EDX

tRNA

Isoforma superenovelada

Microscopia eletrônica de varredura e
análise dispersiva de energia da
radiação X

RNA de transferência

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Concentração de equilíbrio ($\mu\text{g/mL}$)
D	Diâmetro (nm)
h	Hora
K_A	Constante de afinidade de Langmuir ($\text{mL}/\mu\text{g}$)
K_f	Constante de Freundlich
L	Comprimento (nm)
min	Minuto
n	Constante de Freundlich
q	Capacidade de adsorção na monocamada (mg/mL resina)
$q_{\text{máx}}$	Capacidade máxima de adsorção na monocamada (mg/mL resina)
R_G	Raio de giro (nm)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
	2.1 TERAPIA BASEADA EM GENES TERAPÊUTICOS.....	3
	2.1.1 TERAPIA GÊNICA.....	5
	2.1.2 VACINAS DE DNA.....	7
	2.1.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS.....	10
	2.2 DNA PLASMIDIAL.....	13
	2.2.1 DESIGN DO VECTOR	13
	2.2.2 ESTRUTURA.....	14
	2.3 PRODUÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	16
	2.3.1 CONTROLE DE QUALIDADE.....	16
	2.3.2 VISÃO GERAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO	18
	2.3.3 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	21
	2.3.3.1 Isolamento Primário.....	21
	2.3.3.2 Recuperação Intermediária	23
	2.3.3.3 Purificação Final.....	23
	2.4 DESENVOLVIMENTO DE RESINAS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	25
	2.4.1 REQUISITOS DOS RESINAS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS EM PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	26
	2.4.2 CLASSIFICAÇÃO DAS RESINAS CROMATOGRÁFICAS	27
	2.4.2.1 Partículas dispersas não-porosas	28
	2.4.2.2 Partículas dispersas porosas.....	29
	2.4.2.3 Membranas	31
	2.4.2.4 Monólitos.....	33
	2.4.3 PRINCÍPIOS DE CROMATOGRAFIA UTILIZADOS EM PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	34
	2.4.3.1 Cromatografia de troca aniônica.....	36
	2.4.3.2 Cromatografia de interação hidrofóbica	37
	2.4.3.3 Cromatografia de afinidade	39
	<u>Aminoácidos como ligantes de afinidade</u>	<u>40</u>
	<u>Arginina como ligante de afinidade</u>	<u>41</u>
3.	COLOCAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	44
4.	OBJETIVOS.....	46

4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	MATERIAIS	48
4.2	MÉTODOS.....	50
4.2.1	DNA PLASMIDIAL	50
4.2.2	CULTIVO DAS CÉLULAS DE <i>E. coli</i> CONTENDO O DNA PLASMIDIAL	51
4.2.3	PREPARAÇÃO DO LISADO CELULAR.....	52
4.2.4	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	53
4.2.5	PURIFICAÇÃO DE RNA.....	53
4.2.6	IMOBILIZAÇÃO DOS LIGANTES EM RESINAS DE AGAROSE.....	55
4.2.7	IMOBILIZAÇÃO DOS LIGANTES EM COLUNAS MONOLÍTICAS.....	56
4.2.8	ESTUDOS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO	57
4.2.9	CROMATOGRAFIA EM RESINAS DE AGAROSE	58
4.2.10	CROMATOGRAFIA EM RESINAS MONOLÍTICAS.....	58
4.2.11	DETERMINAÇÃO DAS CAPACIDADES DE LIGAÇÃO DINÂMICA	59
4.2.11	DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DO DNA PLASMIDIAL E RNA.....	61
4.2.13	QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E PUREZA DE DNA PLASMIDIAL E RNA EM FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	61
4.2.14	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	62
4.2.15	QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	62
4.2.16	QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINAS	63
4.2.17	QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	ESTUDOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA.....	67
5.2	ESTUDOS EM RESINAS DE AGAROSE.....	78
5.2.1	INTERAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E RNA COM OS LIGANTES DE ARGININA	78
5.2.2	CAPACIDADES DINÂMICAS DE ADSORÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E RNA: LIGANTES DE ARGININA E DI-ARGININA.....	80
5.2.3	CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS EM MODO NEGATIVO.....	82
5.2.4	ESTUDOS DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO LISADO DE <i>E. COLI</i>	88
5.2.5	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS FINAIS DE DNA PLASMIDIAL.....	90
5.3	ESTUDOS EM RESINAS MONOLÍTICAS	93
5.3.1	LIGANTES DE ARGININA IMOBILIZADOS EM RESINAS MONOLÍTICAS	93
5.3.2	CAPACIDADES DE ADSORÇÃO DINÂMICA.....	96
5.3.3	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DIRETAMENTE DE LISADO DE <i>E. COLI</i>	100
5.3.4	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE QUALIDADE DE DNA PLASMIDIAL.....	107
6.	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	111
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

8. APÊNDICES	129
<i>APÊNDICE I.....</i>	<i>129</i>
<i>APÊNDICE II.....</i>	<i>130</i>

1. INTRODUÇÃO

A purificação de DNA plasmidial (pDNA) ainda apresenta uma série de desafios, principalmente no caso de produção em larga escala, de modo a que o produto final esteja em conformidade com os requisitos exigidos para moléculas terapêuticas (SILVA-SANTOS et al., 2017). O pDNA representa, geralmente, menos de 3% das macromoléculas presentes em lisados celulares de *E. coli*, microrganismos onde são produzidos. Além disso, algumas das principais impurezas possuem características físico-químicas semelhantes ao pDNA, como é o caso do RNA, DNA genômico (gDNA) e até mesmo endotoxinas. O DNA plasmidial é também uma molécula grande (600 - 1500 nm) e razoavelmente sensível a forças de cisalhamento (FREITAS et al. 2007). A grande maioria dos estudos de purificação de pDNA por cromatografia descritos na literatura utiliza resinas cromatográficas baseadas em partículas de agarose reticulada, apropriadas para adsorção de proteínas, mas não para adsorção de pDNA. As limitações dessas resinas para operar moléculas de pDNA surgem da baixa acessibilidade destas moléculas aos pequenos poros das resinas, levando conseqüentemente a baixas capacidades de adsorção (GADGIL; OAK; JARRETT, 2001; LOWE; LOWE; GUPTA, 2001). Além disso, a falta de compreensão dos mecanismos e processos de adsorção de plasmídeos em resinas cromatográficas leva, muitas vezes, ao uso das resinas referidas acima de forma não otimizada, resultando na maioria das vezes nas baixas capacidades de adsorção e falta de especificidade (FERREIRA et al., 2000). A falta do conhecimento de parâmetros tais como capacidades máximas de adsorção, constantes de dissociação (ou associação), não apenas de pDNA mas também de RNA e outras impurezas, dificultam o desenvolvimento de processos adequados. Com a realização de estudos básicos de adsorção em batelada, faz-se possível determinar os parâmetros característicos dos sistemas biomolécula-adsorvente que são essenciais em qualquer desenvolvimento de processo de adsorção (FERREIRA et al., 2000; PADMAVATHY; MADHU; HASEENA, 2016).

Algumas estratégias têm sido propostas e exploradas para superar as limitações de transferência de massa e de capacidade de adsorção mostradas pelas

resinas convencionais, nomeadamente tendo em conta a sua estrutura. Esses avanços têm passado pela alteração tanto do tamanho das partículas quanto do tamanho dos poros das mesmas (TIAINEN et al., 2007), ou mesmo pela exploração de diferentes materiais e geometrias incomuns, a fim de aumentar a área disponível para a interação de pDNA (SARAJI; YOUSEFI; TALEBI, 2017; SMREKAR et al., 2010; TEETERS et al., 2003). Uma outra alternativa reportada para superar tais limitações é o uso dos sistemas cromatográficos convencionais em modo negativo, onde as impurezas da alimentação (especialmente RNA de baixa massa molecular) são capturadas e retidas pela coluna, sendo eficientemente separadas do pDNA, que não deve sofrer qualquer retenção pelos efeitos de exclusão molecular devido às suas dimensões (PRAZERES, 2011).

Na busca de soluções para os problemas relativos à purificação de pDNA, as resinas monolíticas aparecem como adsorventes potencialmente interessantes para processos de separação de biomoléculas como o pDNA, podendo ser facilmente modificadas e funcionalizadas com os ligantes pretendidos, ao mesmo tempo assegurando as características necessárias de estabilidade química e mecânica. Por outro lado, faz-se necessário o desenvolvimento e caracterização de novos adsorventes capazes de recuperar seletivamente DNA plasmidial de uma forma semelhante àquela que se desenvolveu para purificação de proteínas mantendo, entretanto, altas capacidades de adsorção (BAI et al., 2014). Nesse sentido, a cromatografia de afinidade usando aminoácidos como ligantes representa uma abordagem particularmente promissora, por combinar a seletividade de uma interação biológica que ocorre naturalmente com o DNA, com a simplicidade de uma molécula razoavelmente pequena e barata. Apesar de todo o potencial dos aminoácidos, os desafios relacionados com o aumento de capacidade das resinas permanecem sem solução.

Este trabalho se propõe a aprofundar o conhecimento disponível atualmente sobre as interações de pDNA com ligantes seletivos baseados no aminoácido arginina em resinas cromatográficas convencionais e monolíticas, além da definição das condições que favorecem tais interações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TERAPIA BASEADA EM GENES TERAPÊUTICOS

Nas últimas décadas, o sequenciamento completo do genoma humano combinado com a crescente compreensão das propriedades e características de vários genes relacionados com determinadas doenças, tem vindo a posicionar estratégias como a terapia gênica somática ou vacinação com DNA, entre os mais emocionantes e promissores avanços biotecnológicos (MANTHORPE et al., 2005; ROLLAND, 2005). Ambas as estratégias se baseiam na introdução no paciente de um ou mais genes funcionais, carregado por vetores, tais como vírus ou plasmídeos, modificando o repertório genético das células alvo com finalidade terapêutica (GINN et al., 2013). Geralmente, os genes introduzidos codificam para uma proteína ausente ou com mau funcionamento (no caso da terapia gênica) ou para uma proteína antigênica (no caso da vacinação com DNA) (JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012). De acordo com dados atualizados até Novembro de 2017 apresentados pelo *The Journal of Gene Medicine*, desde o início do primeiro ensaio clínico de terapia gênica em 1989, foram aprovados globalmente 2597 novos ensaios clínicos com terapia baseada em genes terapêuticos (Gene Therapy Clinical, *Trials Worldwide*).

Na Figura 1 encontram-se representados os números de ensaios clínicos com terapia baseada em genes terapêuticos aprovados globalmente entre os anos de 1989 e 2017.

Figura 1 - Números de ensaios clínicos com terapia baseada em genes terapêuticos aprovados globalmente entre 1989 e 2017 (adaptado de *(Gene Therapy Clinical, Trials Worldwide)*).

Apesar de promissoras, as técnicas de terapia baseadas em genes ainda carecem de abordagens seguras e adequadas para entregar o material genético às células alvo. O sucesso desta terapia depende criticamente de vetores de transfecção adequados, por um lado, capazes de proteger os ácidos nucleicos contra a degradação por sangue e nucleases intersticiais; e por outro, de promover internalização do material genético em células alvo e liberar os ácidos nucleicos uma vez dentro da célula no local correto (VILLATE-BEITIA et al., 2015). Além disso, um sistema ideal de entrega de genes deve ser efetivo, específico, duradouro, seguro, fácil de usar e tão barato quanto possível (YIN et al., 2014).

Os vetores de entrega de genes são classificados principalmente em duas categorias: vetores virais e vetores não-virais. Vetores virais, na sua maioria retrovírus e adenovírus, têm sido predominantemente utilizados para entrega dos genes nos ensaios clínicos já realizados ou ainda em andamento. Apesar da alta eficiência na entrega, a utilização de vetores virais apresenta inconvenientes, nomeadamente a possível integração ao DNA cromossômico de

células germinais, a ativação de oncogenes e a promoção de fortes respostas inflamatórias e imunes, que representam uma grande preocupação com a segurança no uso de tais vetores (MALI, 2013). Por isso, a utilização de vetores não-virais, por exemplo DNA plasmidial, aumentou nos últimos anos devido ao seu comprovado perfil de segurança e qualidade nos tratamentos (LARA; RAMÍREZ, 2012). Para além de questões relacionadas com segurança, as vacinas de pDNA são relativamente fáceis de fabricar. Porém a sua baixa eficiência de entrega às células alvo afirma-se muitas vezes como desvantagem principal. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para superar essa deficiência. De acordo com os dados atualizados em novembro de 2017 e apresentados pelo The Journal of Gene Medicine, é possível observar na Figura 2 que cerca de 17% dos testes clínicos em genes foram realizados com vetores de DNA plasmidial (Gene Therapy Clinical, *Trials Worldwide*).

Figura 2 – Vetores utilizados nos ensaios clínicos de produtos baseados em genes (adaptado de (Gene Therapy Clinical, *Trials Worldwide*)).

2.1.1 TERAPIA GÊNICA

Como referido, a terapia gênica consiste na introdução de material genético em células para um propósito terapêutico. O objetivo inicial do campo de terapia gênica seria a correção “hereditária” de doenças gênicas, fornecendo às células alvo uma reposição do gene deficiente responsável pela doença (GINN et al., 2013). Porém, a terapia gênica também tem sido aplicada no tratamento de doenças adquiridas, em particular do câncer (TOUCHEFEU et al., 2010). A terapia gênica é assim considerada uma revolução com alto potencial na medicina, visando o tratamento ou eliminação da causa das doenças, enquanto que a maioria das estratégias atualmente disponíveis apenas trata os sintomas (MOUNTAIN, 2000).

Neste tipo de estratégia, os genes podem ser introduzidos no paciente de duas formas: por terapia *in vivo* ou via terapia *ex vivo* (MOUNTAIN, 2000). No primeiro caso o vetor é injetado ou administrado intravenosamente diretamente em um tecido específico do organismo. Alternativamente, uma amostra das células do paciente pode ser removida e exposta ao vetor em uma configuração de laboratório. As células que contêm o vetor são então isoladas do paciente, modificadas geneticamente e reintroduzidas no organismo. Em ambas as estratégias, se o tratamento for bem sucedido, o novo gene fornecido pelo vetor levará a síntese de uma proteína funcional (GIACCA, 2010; MOUNTAIN, 2000).

O primeiro ensaio em terapia gênica humana foi realizado em 1989 por Rosenberg e seus colegas de trabalho. Estes utilizaram um retrovírus para introduzir o gene que codifica a resistência à neomicina na filtração de linfócitos de tumoração humana antes de infundí-los em cinco pacientes com melanoma avançado. Este estudo pioneiro demonstrou a viabilidade do uso de retrovirus na transdução de genes em seres humanos estabelecendo uma série de pré-requisitos importantes para estudos clínicos futuros envolvendo transferência de genes (EDELSTEIN et al., 2004). Nesse momento, o investimento por parte de empresas cresceu consideravelmente, e o número de ensaios de terapia gênica começou a subir devido ao potencial demonstrado em solucionar distúrbios

genéticos como a imunodeficiência combinada grave, fibrose cística, doença de Parkinson, distrofias musculares, distúrbios de armazenamento lisossômico, hemofilia bem como de outros milhares de diferentes condições (GIACCA, 2010; LEE; MATTHEWS; BLAIR, 2005; MANTHORPE et al., 2005).

Dentre 2409 testes clínicos já concluídos ou em andamento, cerca de 65% estão direcionados para o tratamento do câncer (The Journal of Gene Medicine 2018). No tratamento desta doença, o objetivo dos genes terapêuticos passa por corrigir ou eliminar lesões cancerígenas (EDELSTEIN et al., 2004). Os oncogenes e os genes supressores de tumores desempenham um papel crucial no desenvolvimento do câncer, contrabalançando-se mutuamente. Os oncogenes aumentam a proliferação celular enquanto que os genes supressores de tumor induzem apoptose (morte celular programada). Por essa razão, anti-oncogenes e genes apoptóticos são considerados ferramentas potenciais para o tratamento do câncer (EL-ANEED, 2004). Em 2003, a China aprovou o primeiro produto baseado em genes, a Gendicine™, consistindo em um vetor de adenovírus projetado para expressar um gene supressor de tumor (denominado p53), induzindo a apoptose de células malignas para o tratamento de pacientes com carcinoma de células escamosas na cabeça e pescoço (MANTHORPE et al., 2005). No entanto, a maioria dos estudos clínicos baseados em genes para terapia do câncer envolve a adição de genes ao invés da correção ou substituição de genes defeituosos (CROSS; BURMESTER, 2006).

2.1.2 VACINAS DE DNA

O progresso e uso generalizado de vacinas para imunização de seres humanos e animais contra doenças infecciosas é uma das aplicações mais vitoriosas nas ciências médicas. O conceito de vacinação clássica baseia-se na administração de agentes infecciosos modificados para indivíduo saudável apenas para prevenir uma doença específica, promovendo respostas de anticorpos de longa duração, que são os principais agentes imunológicos de proteção contra a maioria agentes causais (LIU, 2003). As vacinas atualmente licenciadas são predominantemente compostas de vírus atenuados, vírus inativados, vacinas

recombinantes, bem como partículas pseudo-virais ou de vírus produzidas em leveduras, vectores híbridos ou peptídeos sintéticos (SCHLEEF; SCHMIDT, 2004). Apesar dos grandes sucessos comprovado nas últimas décadas pelas vacinas clássicas, questões como o fato de não fornecerem imunidade vitalícia, a ausência de vacinas eficazes para doenças que ainda matam milhares de pessoas, bem como questões relacionadas com segurança, continuam a gerar a necessidade de desenvolver novas plataformas de vacinas que ofereçam uma maior imunogenicidade (LIU, 2003).

O interesse por vacinas de DNA surgiu na década de 1990 quando foi relatado que o DNA plasmidial, quando entregue na pele ou nos músculos, induz respostas de anticorpos para antígenos virais e não-virais, notícia que posteriormente inspirou inúmeros estudos pré-clínicos adicionais (WOLFF; BUDKER, 2005). Neste momento percebeu-se que as vacinas de DNA poderiam gerar respostas imunes amplas, semelhantes à plataforma de vírus atenuados, porém neste caso, sem a necessidade de um agente patogênico replicante. As vacinas de DNA consistem em um anel de DNA contendo um gene que codifica o antígeno alvo e um promotor/terminador que promove a expressão desse gene em células de mamíferos (SCHLEEF; SCHMIDT, 2004). Vacinas de DNA são distinguidas em duas categorias, as vacinas profiláticas e as terapêuticas. No primeiro caso, as vacinas são administradas em organismos saudáveis com o objetivo de prevenir futuros episódios da doença alvo carregando um antígeno específico do agente infeccioso causador. São exemplos a vacina para a AIDS, malária, tuberculose ou gripe. A segunda categoria foi desenvolvida com base em genes que codificam produtos que aumentam a imunogenicidade tumoral e, assim, mobilizam células do sistema imunológico para controlar o câncer (FERRARO et al., 2011). Uma das principais diferenças de vacinas de DNA quando comparado com as vacinas tradicionais tem que ver com o fato que os antígenos de vacinação são sintetizados endogenamente, podendo “imitar” uma infecção natural (WEIDE et al., 2008). O gene codificado pela vacinas de DNA normalmente expressa um porção antigênica do vírus, como uma proteína do envelope, que é posteriormente expressa pelas células alvo. A principal vantagem das vacinas de DNA é então a capacidade de gerar todos os tipos de imunidade desejada, nomeadamente linfócitos T citolíticos, células T auxiliares

e anticorpos, enquanto as vacinas convencionais apenas provocam respostas de anticorpos (FERRARO et al., 2011; WEIDE et al., 2008).

Existem uma série de características específicas associadas à tecnologia das vacinas de DNA que facilitarão a sua disseminação como vacinas de nova geração para prevenção de doenças infecciosas tanto de humanos como de animais (MANTHORPE et al., 2005). Por um lado, as metodologias utilizadas para construir e produzir vacinas de DNA são muito mais simples e baratas quando comparadas, por exemplo, com vacinas clássicas. A maior estabilidade inerente ao DNA quando comparado a proteínas é outra característica de interesse, particularmente se o seu uso estiver previsto em países tropicais (ROTTINGHAUS et al., 2003). Porém, mesmo que grandes passos tenham sido dados na vacinação com ácidos nucleicos, ainda existem pontos a serem resolvidos para garantir a sua implementação prática e saudável. As principais áreas de preocupação são a administração das vacinas, a concepção de vetores e respostas de células T citotóxicas adequadas. No entanto, várias estratégias têm sido desenvolvidas para superar essa deficiência. Por exemplo, estão sendo feitos esforços para modular e prolongar a vida ativa das células dendríticas, a fim de tornar a apresentação do antígeno mais eficiente (NGUYEN et al., 2009).

Apesar dos prominentes avanços neste novo campo de vacinação, a aceitação oficial desta tecnologia para a terapia humana depende do sucesso e demonstração da sua segurança e eficácia em ensaios clínicos avançados (ANDERSON; SCHNEIDER, 2007). Vários ensaios clínicos com vacinas de DNA estão em andamento para combater doenças como é o caso da AIDS, gripe, malária, tuberculose, febre aftose, doença de Aujeszky, peste suína, raiva, inomose canina e brucelose em animais (DHAMA et al., 2008). Atualmente, vacinas de DNA já são uma realidade em medicina veterinária, com quatro produtos comerciais disponíveis no mercado (FINDIK; ÇIFTCI, 2012).

2.1.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS

O objetivo final do desenvolvimento de um produto é obter aprovação para a sua comercialização. Este desenvolvimento passa obrigatoriamente por uma sequência de passos envolvendo estudos em animais (ensaios pré-clínicos) e em humanos (ensaios clínicos) (PRAZERES, 2011). O objetivo dos ensaios pré-clínicos é avaliar antecipadamente a segurança do produto prevendo potenciais riscos futuros que podem ser enfrentados pelos pacientes humanos. Nesta fase pré-clínica, todas as precauções devem ser exploradas para antecipar uma toxicidade que eventualmente possa prejudicar voluntários humanos. Estes primeiros estudos são realizados através de testes laboratoriais *in vitro* (culturas celulares ou tecidos), e recorrendo a modelos animais adequados da doença (por exemplo, ratos) (TECHNOLOGIES, 1999). Se no fim dos estudos pré-clínicos for possível concluir que um certo produto terapêutico tem um perfil de segurança aceitável, pode então seguir para os ensaios clínicos.

Os ensaios clínicos são realizados em três fases distintas. A fase I envolve o teste em uma população (10-100) de pacientes ou voluntários saudáveis, sendo o objetivo neste estágio determinar a farmacocinética do composto candidato (por exemplo, avaliar a eficiência da entrega do vetor, os níveis de expressão terapêutica, ou a duração do efeito) e avaliar a segurança deste, ou pelo menos, mostrar uma toxicidade tolerável com relação ao benefício terapêutico previsto. A fase II consiste na administração de uma dosagem definida em um pequeno número de pacientes, para analisar a sua eficácia, podendo envolver de 50 a 500 pacientes durante 1 a 2 anos. No final da fase II, deve ser possível avaliar se o produto terapêutico é potencialmente eficaz e se os riscos associados ao seu uso aceitável face à gravidade da doença (PRAZERES, 2011). Devido ao número relativamente reduzido de pacientes que são necessários, os ensaios clínicos das fases I ou I/II são os mais realizados para as diferentes doenças (cerca de 80%) (EDELSTEIN et al., 2004; GIACCA, 2010). Quando os ensaios da fase II fornecem resultados promissores, é organizado um ensaio da fase III, envolvendo um maior número de pacientes (geralmente de 1000-3000), para confirmar os dados anteriores quanto à sua eficácia, identificação da dosagem

mais adequada e monitorar a aparência de efeitos adversos em uma amostra estatisticamente significativa. No final, se o tratamento/produto superar a fase III, este torna-se comercialmente disponível (GIACCA, 2010). Porém, o controle de segurança e eficácia de um medicamento não termina após a sua aprovação e comercialização no mercado. Apesar do grau substancial de certeza de que um produto é seguro e eficaz por meio do controle providenciado pelas fases I, II e III, a verdade é que o número dos voluntários envolvidos nesses estudos pode ser muito pequeno para permitir a detecção de efeitos adversos raros, porém importantes. Somente após a comercialização e ampla distribuição é que esses eventos se podem tornar de fato evidentes. Por estas razões, as empresas costumam projetar os ensaios da fase IV para manter um histórico do seu produto, coletando informações de problemas como eventos adversos, mas também acerca da eficácia do produto em comparação com produtos concorrentes, benefício econômico e seu impacto na qualidade de vida dos destinatários (PRAZERES, 2011).

Na Figura 3 encontra-se representada a distribuição dos ensaios clínicos de produtos baseados em genes organizados por tipo de doença. Verifica-se que os ensaios de terapia baseada em genes que foram aprovados globalmente abordam as doenças mais desafiadoras de hoje, ou seja, o câncer (como referido anteriormente, representando cerca de 65% dos ensaios), as doenças monogênicas (com 11,1%), como é o caso da fibrose cística, as doenças infecciosas (com 7%) e as doenças cardiovasculares (com 6,9%). Embora em menor grau, as doenças neurológicas (com 1,8%) e as doenças oculares (com 1,3%) também estão neste momento sujeitas a ensaios clínicos com terapia gênica. No entanto, por meio da Figura 4, verifica-se que apesar do estudo intensivo nos últimos anos, apenas 0,1% dos produtos aprovados para ensaios clínicos chegaram à fase IV (Gene Therapy Clinical, *Trials Worldwide*).

Figura 3 - Distribuição dos ensaios clínicos de produtos baseados em genes organizados por tipo de doença (adaptado de (*Gene Therapy Clinical, Trials Worldwide*)).

Figura 4 - Distribuição dos ensaios clínicos de produtos baseados em genes organizados por fase clínica em experimentação (adaptado de (*Gene Therapy Clinical, Trials Worldwide*)).

2.2 DNA PLASMIDIAL

A estrutura de uma molécula biológica determina sua função. Consequentemente, o desenvolvimento racional de um produto biofarmacêutico deve sempre albergar um conhecimento profundo acerca das características estruturais da biomolécula em questão. Algumas das principais preocupações envolvidas estão no desenvolvimento de plasmídeos biofarmacêuticos estando, portanto, inerentemente associados aos seus aspectos estruturais.

O processo de produção do pDNA farmacêutico começa com a inserção das sequências de interesse no vector plasmidial. O componente central será o vetor, que é responsável pelo transporte do gene desejado para a célula hospedeira e sua replicação (VOS et al., 2003). Este deve ser capaz de inserir-se eficientemente na célula e produzir muitas outras células por replicação, passando a informação para as células filhas, sem afetar as células alvo. Para atuar eficientemente, o vetor deve evitar a sua degradação ou eliminação pelas nucleases do organismo alvo, de modo a proporcionar a produção máxima da proteína ou determinado medicamento.

2.2.1 DESIGN DO VECTOR

A estabilidade estrutural do plasmídeo bem como o seu processo de manutenção em bactérias é necessária para uma produção eficiente, que é geralmente conseguida escolhendo cuidadosamente uma combinação das sequências de DNA terapêuticas que se encontram no nesse vetor. Os plasmídeos mais utilizados na tecnologia do DNA recombinante fazem a sua replicação em *E. coli*, e já foram anteriormente projetados para otimizar seu uso como vetores na clonagem de DNA. Por exemplo, de modo a facilitar todo o processo de desenho e produção, o seu comprimento é normalmente reduzido. Muitos vetores plasmidiais têm apenas $\approx 3\text{kb}$ de comprimento, apresentando-se mais curtos do que aqueles que ocorrem naturalmente em *E. coli* (CARNES; WILLIAMS, 2007). A maioria destes vetores contém pouco mais do que as sequências de

nucleotídeos essenciais para sua utilização na clonagem de DNA. Geralmente, este pode ser dividido em duas regiões distintas, em que uma parte tem um papel importante na maquinaria de fabricação utilizada pela bactéria, que codifica para uma origem de replicação bacteriana (sendo responsável pelo controle do número de cópias de plasmídeo por bactéria), e uma marca de seleção (que providencia resistência a um antibiótico à bactéria transformada). A outra parte do vetor consiste em um cassete de expressão de células eucariotas, composta pelo domínio da região transcrita, incluindo a sequência que codifica a proteína). Essa sequência de interesse é limitada por dois domínios: um promotor e um terminador (KASLOW, 2004).

2.2.2 ESTRUTURA

Os plasmídeos são moléculas de DNA extra cromossômico, circulares de dupla hélice, naturalmente encontrados no espaço citoplasmático das bactérias (PRAZERES et al., 2001). Cada hélice é formada por um polímero linear de moléculas de desoxinucleotídeos ligadas por ligações fosfodiéster. Nesta estrutura, as bases aromáticas são agrupadas no centro do eixo da hélice (que confere características altamente hidrofóbicas ao interior da molécula), enquanto que a superfície externa é composta pelos grupos fosfato (carregados negativamente acima de pH 4) ligados ao açúcares, resultando em um esqueleto hidrofóbico. A estabilidade da molécula de DNA é dada por essas forças hidrofóbicas, bem como as interações van der Waals entre as bases da molécula (SINDEN et al., 1998).

No caso do pDNA, devido à sua natureza enrolada, a sua estrutura geométrica não é homogênea. Como estrutura topológica, o DNA plasmidial apresenta-se, em geral, em três diferentes conformações topológicas que são denominadas de pDNA superenovelado (sc), circular aberto (oc) e linear (ln). A ocorrência de diferentes estruturas de pDNA depende, para além de características da sua sequência de DNA, do estresse ou de condições ambientais desfavoráveis, como valores extremos de pH ou altas temperaturas. O superenovelamento é geralmente perdido por quebras de ligação simples ou duplas na sua estrutura,

resultando em estruturas circulares ou lineares abertas, respetivamente. Esses cortes são geralmente resultantes de efeito de nucleases (enzimas de restrição). No caso da temperatura, o seu aumento irá promover um movimento térmico prolongado, que por sua vez provoca um desenrolamento progressivo da hélice do DNA, resultando em um abaixamento do grau de superenovelamento (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2008). Além disso, podem ocorrer isoformas com formas oligoméricas com tamanho de duplicação, comumente chamadas concatémeros. Essas formas multiméricas são frequentemente o resultado da recombinação homóloga ou ciclo de replicação contínua na célula hospedeira. Por isso, o pDNA superenovelado representa a única isoforma naturalmente intacta e sem danos, sendo considerado o mais estável e efetivo em transfecção de células que as outras isoformas. Isto leva a um aumento do interesse no desenvolvimento de métodos eficientes para recuperar esta isoforma com elevados graus de pureza. As preparações com finalidade terapêutica devem apresentar, pelo menos, 90% de superenovelado com relação ao total (FDA - *Guidance for Industry*, 2007).

2.3 PRODUÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

2.3.1 CONTROLE DE QUALIDADE

A descoberta, desenvolvimento e comercialização de qualquer medicamento destinado a ser usado como agente terapêutico em seres humanos é um processo longo que passa por várias etapas. Uma vez que a decisão de prosseguir com o desenvolvimento de um produto específico é feita geralmente com base em evidências científicas sólidas de resultados de pesquisa básica, seguem-se uma série de atividades que incluem: a conceituação do produto, o desenvolvimento de processos, testes pré-clínicos, ensaios clínicos e fabricação em larga escala (PRAZERES, 2011). Esses estágios de desenvolvimento e comercialização estão sujeitos a controles legislativos que foram implementados pelos governos e suas agências reguladoras, a fim de garantir que esses produtos vendidos e utilizados pelo público em geral são seguros e eficazes. A qualidade que é inerente a esses dois atributos (isto é, segurança e eficácia) deve ser presente durante todos os testes pré-clínicos, ensaios clínicos e todos os estágios de produção. Cada uma dessas três etapas é controlada por um conjunto de regras ou regulamentos que têm o poder da lei por trás deles e juntos formam um "tripé de qualidade" (DOBLHOFF-DIER; BLIEM, 1999). O primeiro desses regulamentos, mais conhecido por boas práticas de laboratório (GLP), contém os requisitos mínimos para o planejamento, conduta e relatório de segurança e eficiência não-clínica. O objetivo principal das GLPs é garantir a qualidade, integridade e confiabilidade dos dados do estudo, ao mesmo tempo em que reduz a probabilidade de experiências terem de ser repetidas mais tarde. Os ensaios clínicos de medicamentos para uso humano também são controlados por um conjunto de regras conhecidas como boas práticas clínicas (GCP). Estas providenciam os requisitos de qualidade ética e científica internacionalmente reconhecidos que devem ser observados para projetar, conduzir, registrar e relatar ensaios clínicos que envolvem a participação de seres humanos. Por último, o regulamento que regulamenta as boas práticas de fabricação (GMPs) assegura que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados com os padrões de qualidade adequados aos seus usos, consistindo em uma

estrita lista de regras que as empresas devem obedecer cegamente (DOBLHOFF-DIER; BLIEM, 1999; MEAGER; VOCKE; ZIMMERMANN, 2001). Por outro lado, a validação é uma das disposições fundamentais das GMPs. Este tópico foi introduzido como um requisito extra para assegurar a produção consistente de produtos com a qualidade requerida ao menor custo possível. O processo de validação visa assegurar que são estabelecidas provas documentais que proporcionem um alto grau de garantia de que todos os pontos envolvidos na produção do produto são executados consistentemente ou atendam a especificações pré-determinadas. Esses pontos sujeitos a validação incluem instalações, equipamentos, computadores, limpeza, esterilização, medição, distribuição, pesagem, enchimento, rotulagem e embalagem, além dos passos de operação da unidade e métodos analíticos associados (DOBLHOFF-DIER; BLIEM, 1999; MEAGER; VOCKE; ZIMMERMANN, 2001).

Ao longo dos anos várias técnicas de fabricação de pDNA foram desenvolvidas com vista à produção de grandes quantidades de pDNA na sua forma mais efetiva (sc) de forma escalável e econômica. As impurezas remanescentes da célula hospedeira devem ser removidas de modo a obter um produto final, cujos parâmetros de pureza devem estar de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pelas agências reguladoras, FDA (“Food and Drug Administration”) e EMEA (“European Medicines Evaluation Agency”), considerando a finalidade do produto (Tabela 1). A importância de purificar o pDNA rigorosamente e remover as impurezas da célula hospedeira estão relacionadas com a possibilidade de esses componentes originarem efeitos adversos e respostas inflamatórias aos pacientes, se presentes em quantidades superiores às recomendadas (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000).

Tabela 1 - Especificações e análises recomendadas para pureza de preparações de pDNA para aplicação em terapia gênica (adaptado de (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000).

Parâmetro e método de detecção	Critério de aceitação
Aparência	Claro, solução incolor
Identidade (sequenciamento, PCR)	Mapa de restrição esperado
Homogeneidade (AGE, HPLC)	> 90% de pDNA sc
Proteínas (BCA)	Não detectável
RNA (HPLC, AGE 0.8%)	< 0.2 µg/mg pDNA, não detectável
gDNA (Hibridização, PCR, fluorescência)	< 0.01 µg/µg pDNA
Endotoxinas (LAL)	< 0.1 EU/µg pDNA

Os métodos de quantificação utilizados devem ser submetidos à avaliação prévia, testando quantidades conhecidas de materiais de referência ou amostras, para garantir a consistência destes na avaliação da eficiência e segurança do produto. Os testes de estabilidade incluem testes para a aparência visual e concentração de plasmídeo. É recomendado que a fração de plasmídeo na forma superenovelada seja medida, e que seja estabelecida uma especificação mínima para conteúdo de plasmídeo superenovelado nestes critérios. Também o teor de macromoléculas da célula hospedeira bacteriana deve ser quantificado por métodos adequados e reprodutíveis, incluindo DNA, RNA e proteínas, comparando com os limites preliminares máximos estabelecidos. Deve também ser incluído nesta informação, o resultado de um teste para substâncias pirogênicas. Neste caso, o teste de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) é um indicador sensível da presença de endotoxinas bacterianas e a contaminação com endotoxinas. Por último, torna-se bastante importante incluir um teste para determinar a identidade do produto a granel. Por exemplo, a técnica de PCR ou electroforese em gel de agarose do DNA do plasmídeo, após digestão com enzima de restrição, são testes que podem ser usados para identificar e distinguir plasmídeos de forma individual (FDA, 2007).

2.3.2 VISÃO GERAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO

O desenvolvimento do processo de produção de pDNA consiste em uma série de atividades que são estabelecidas e executadas com o objetivo de produzir uma quantidade definida do produto (que pode ser medida em atividade biológica ou massa), de forma segura e eficaz. Este processo é uma tarefa que deve ocorrer em paralelo com o desenvolvimento do produto, não só por ser necessário gerar material para estudos pré-clínicos e clínicos, como também porque a metodologia que acabará por produzir o plasmídeo biofarmacêutico deve ser estabelecida antes da aprovação da entrada do produto no mercado (PRAZERES; MONTEIRO, 2014). Questões como a preparação de bancos de células contendo o plasmídeo de interesse bem como a seleção e teste das matérias primas utilizadas na produção, estão na vanguarda destas atividades. As operações unitárias de processamento a jusante deverão ser igualmente

selecionadas, arrançadas, projetadas e operadas para fabricar DNA plasmidial em massa para ser adequadamente formulado, e posteriormente enviado para testes clínicos ou comercialização.

A produção de pDNA é normalmente promovida por replicação em *Escherichia coli*, cujas cepas são cuidadosamente selecionadas (por ex. DH5a, DH10b ou JM109) ou desenvolvidas (por ex. GALG20), com vista à maximização de produção de plasmídeos. Essencialmente, a variação destas cepas foca-se na minimização de eventos de recombinação ou degradação do DNA plasmidial, bem como alteração nos traços genéticos relacionados com o próprio fluxo metabólico (GONÇALVES et al., 2013). A cepa selecionada é então transformada com o plasmídeo alvo, cujos clones são criteriosamente isolados e usados para estabelecer bancos de células para posterior uso no cultivo celular. Nesta fase, fatores como meios de cultura, variáveis de operação e estratégias de cultivo, tornam-se essenciais na maximização da produção de plasmídeos (CARNES; WILLIAMS, 2007). Estudos do efeito das condições de crescimento bacteriano na produção de plasmídeo mostrou que o rendimento deste pode ser melhorado através de meios suplementados com aminoácidos e temperaturas entre 37 e 40°C (SILVA et al., 2009). De fato, manipulando as condições de crescimento, alterando parâmetros como oxigênio dissolvido, temperatura, seletividade com um antibiótico específico, concentração de nutrientes e pH, é possível melhorar o crescimento celular que se reflete no número de cópias do plasmídeo (GASPAR et al., 2011).

No desenvolvimento de métodos de purificação de plasmídeo para aplicações terapêuticas, é essencial considerar o material de partida. Uma das primeiras limitações no processo de recuperação de pDNA é o fato deste estar presente em quantidades muito baixas, representando, quanto muito, cerca de 3% em peso seco. Por outro lado, as semelhanças físico-químicas como a carga negativa associada (RNA, gDNA e endotoxinas), a massa molecular (gDNA e endotoxinas) e o caráter hidrofóbico (endotoxinas), restringem significativamente os processos de separação que explorem diferenças entre a molécula alvo e as impurezas (BONTURI et al., 2013). Outras questões como o tamanho elevado do pDNA e a sua estrutura não usual comparativamente a proteínas comuns,

traduzem-se em limitações de transferência de massa e capacidade, particularmente nas operações unitárias baseadas em processos adsorptivos (como as membranas ou a cromatografia tradicional). Ademais, a sua estrutura torcida, típica da sua forma mais efetiva superenovelada, é facilmente convertida na sua isoforma aberta, linear ou desnaturada, resultado direto da ação de nucleases da célula hospedeira ou de estresse extremo sofrido durante o processo de produção (PRAZERES, 2011).

Por conseguinte, vários esforços têm sido realizados para minimizar a quantidade de impurezas (e ao mesmo tempo manter as moléculas de pDNA em uma estrutura biologicamente ativa) nos passos finais do processo de purificação (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005; EON-DUVAL; GUMBS; ELLETT, 2003a; SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2008). Por exemplo, o conteúdo de gDNA pode ser reduzido com um passo de desnaturação durante a lise alcalina, e o RNA por adição de enzimas de digestão, tal como a RNase. No entanto, o uso de derivados de animais como as RNases disponíveis comercialmente é proibido para purificação de agentes terapêuticos (STADLER; LEMMENS; NYHAMMAR, 2004). Uma estratégia eficiente normalmente utilizada, passa por reduzir a presença de RNA e outras impurezas em um processo de isolamento do pDNA por etapas de precipitação, recorrendo a sais como o sulfato de amônio. Porém, esta opção acaba por acrescentar impacto ambiental significativo ao processo (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 1999). Por outro lado, o uso de sulfato de amônio nos processos de purificação de pDNA estão sempre associados a perdas de rendimento devido à co-precipitação do plasmídeo juntamente com o RNA e proteínas, e também por alguma modificação estrutural irreversível causada pelo efeito cosmotrópico do sal nas moléculas de plasmídeo. Estratégias alternativas como extração líquido-líquido e processos de adsorção têm sido testados com o objetivo específico de remover grande parte das impurezas do lisado clarificado (PRAZERES, 2011).

2.3.3 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

Os principais pontos de partida para o desenvolvimento de um processo de purificação de produtos biofarmacêuticos baseados em plasmídeos baseiam-se assim em um conhecimento adequado das propriedades da molécula alvo e das impurezas associadas de *E. coli*. Por conveniência, o conjunto de operações unitárias comumente utilizadas no processo de purificação de pDNA podem ser agrupadas em três grupos: isolamento primário (coleta das células e ruptura celular), recuperação intermediária (concentração e remoção de grande parte das impurezas) e purificação final (purificação/polimento do produto).

2.3.3.1 Isolamento Primário

A primeira etapa de isolamento primário consiste na recuperação das células de *Escherichia coli* do caldo fermentativo, recorrendo usualmente a operações de centrifugação ou microfiltração. Sendo a centrifugação o método mais utilizado, a microfiltração oferece a vantagem de retirar os componentes do meio utilizados bem como as impurezas extracelulares antes do início da purificação, embora o número de vezes que uma membrana pode de fato ser usada seja reduzido (MANTHORPE et al., 2005).

O pDNA é um produto intracelular e, portanto, após o cultivo celular e a recolha das células, torna-se necessária uma etapa de ruptura celular que é usualmente realizada por lise alcalina. Esse processo de lise é constituído por três etapas: ressuspensão das células, ruptura da parede celular utilizando normalmente um tampão alcalino, seguido de neutralização com tampão ácido. Esse método químico mais comumente utilizado baseia-se no princípio de lise alcalina, onde as células são rompidas por aumento do pH com NaOH na presença de SDS, seguido por uma libertação e desnaturação de gDNA, do material de parede celular e da maioria das proteínas celulares (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). Nesta fase, torna-se extremamente importante controlar o pH uma vez que a aplicação de pH superior a 12,5 causa uma desnaturação irreversível do

pDNA. A solução neutralizante sucessiva à lise alcalina é normalmente à base de acetato de potássio, que provoca a precipitação do gDNA desnaturado assim como dos detritos celulares (DIOGO et al., 1999; SCHLEEF; SCHMIDT, 2004). Apesar dos seus problemas, a lise alcalina tradicional ainda domina a indústria de produção de plasmídeo em grande escala. Métodos mecânicos, como a moagem, microfluidização e homogeneização poderão ser uma opção futura, desde que acompanhados por algum tipo de método que vise proteger as moléculas de plasmídeo da alta degradação proporcionada pelas forças de cisalhamento típicas destas operações (PRAZERES, 2011).

Após o isolamento primário, o produto obtido denominado de lisado clarificado, apresenta tipicamente não mais que 3% (w/w) (~50-250 µg/mL), com uma alta concentração de impurezas, principalmente proteínas, endotoxinas e ácidos nucleicos do hospedeiro (gDNA e RNA) (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005; PRAZERES, 2011). Como referido, tais impurezas apresentam uma ou mais características físico-químicas semelhantes ao pDNA (Tabela 2) tornando o isolamento desta molécula um desafio, principalmente para estratégias de purificação em uma única etapa a partir do lisado (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005).

Tabela 2 - Composição típica do lisado celular e características físico-químicas dos principais componentes (considerando-se um plasmídeo com 6000pb) (adaptado de (BONTURI et al., 2013; DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005)).

Molécula	Conteúdo (w/w)	Tamanho (kDa)	Observações
Plasmídeo	< 3%	~3,9 x 10 ³	Polianiónico, fita dupla
Proteínas	55%	< 200	Aniónico, catiónico, neutro, Hidrofóbico, hidrofílico
gDNA	3%	~2,9 x 10 ⁶	Polianiónico, fita simples/dupla, Altamente fragmentado
Endotoxinas	3%	10 a 20	Aniónico, hidrofóbico (lípidos A)
RNA	21%	28 a 1000	Polianiónico, fita simples
Outros	15%	-	-

2.3.3.2 Recuperação Intermediária

A etapa de recuperação intermediária foi projetada para processar o plasmídeo a partir de lisados clarificados obtidos após a conclusão da etapa de isolamento primário. Aqui, uma série de operações unitárias são implementadas e deverão então aumentar o teor e a concentração de plasmídeo até valores compatíveis com as operações de alta resolução da fase final de purificação. Embora uma fração significativa de gDNA tenha sido removido durante o isolamento primário, grandes quantidades de RNA e proteínas, que juntos compõem mais de 90% da massa total de solutos nesta fase, ainda permanecem nos lisados clarificados (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 1999).

Os lisados clarificados com o plasmídeo que entram na etapa de recuperação intermediária podem ser processados através de uma vasta gama de operações unitárias. Técnicas de filtração tangencial, precipitação, sistemas aquosos e adsorção são provavelmente as mais importantes desta etapa. Embora todas essas operações tenham características específicas que são interessantes de diferentes pontos de vista (que podem ser por exemplo, a concentração de plasmídeo, a remoção de endotoxinas, a eliminação de RNA e a separação de isoformas de plasmídeo), os melhores resultados são geralmente obtidos utilizando duas ou mais dessas operações de forma combinada (FREITAS et al., 2009). A escolha da combinação exata dessas operações unitárias utilizadas na recuperação intermediária depende de um grande número de objetivos e fatores subjetivos. Além disso, é claro a partir da literatura que não há uma única solução para o desafio em questão.

2.3.3.3 Purificação Final

As soluções geradas na etapa de recuperação intermediária e que entram para a fase de purificação são substancialmente enriquecidas em DNA plasmidial. No entanto, pequenas quantidades de impurezas derivadas de *Escherichia coli* podem persistir, e devem ser removidas para obter um produto a granel que

cumpra as especificações finais. Além de eliminar o teor de impurezas recalitrantes vindas do processo da recolha intermediária (traços de gDNA, RNA, lipopolissacarídeos (LPS)), o passo de purificação final pretende remover as variantes de pDNA (nomeadamente as isoformas abertas, lineares e desnaturadas), de modo a garantir a homogeneidade da amostra final exigida (superior a 90%) (FDA, 2007). De forma a cumprir os níveis de separação exigidos, um número significativo de processos de produção publicados debruça-se sobre operações como cromatografia e filtração por membrana, cujos modos de operação exigem que a solução contendo o plasmídeo atravessasse algum tipo de suporte sólido poroso (PRAZERES, 2011).

No final, e após redução das impurezas para níveis abaixo das especificações das agências reguladoras, possíveis correções à concentração de plasmídeo poderão ser realizadas por operações como ultrafiltração ou precipitação com álcool, seguido normalmente por uma filtração em condições estéreis, por de filtros de 0,22 μm (Urthaler, Buchinger, and Necina 2005). Embora esta operação seja viável e escalável, cuidados devem ser tomados especialmente no caso dos plasmídeos de maiores dimensões, de modo a evitar perdas por possíveis incrustações na membrana e que podem comprometer todo o processo a jusante.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE RESINAS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A cromatografia líquida aparece como um método de eleição, bem caracterizado e bem estabelecido na indústria biofarmacêutica. Assim, os processos de purificação de pDNA apresentam, em geral, pelo menos uma etapa cromatográfica. Embora dominante nos processos de purificação de DNA plasmidial, as técnicas cromatográficas enfrentam algumas limitações. A semelhança de características do pDNA e das impurezas resultam muitas vezes em baixas seletividades, co-eluição e baixas capacidades. Outro problema que surge nestes métodos cromatográficos tem que ver com os baixos valores de difusão associados à natureza estrutural desadequada das fases estacionárias para tratar o plasmídeo de uma forma eficiente (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). O transporte de massa de moléculas ramificadas, de elevadas massas moleculares (massa molecular $> 10^6$ g/mol) com grandes tamanhos ($L > 500$ nm, $R_G > 50$ nm), e consequentes baixos valores de difusividade dos plasmídeos ($D = 10^{-7}$ - 10^{-8} cm²/s), torna-se muito ineficiente, comprometendo seriamente o uso de resinas de adsorção tradicionais no processo de purificação (PRAZERES, 2011).

Desta forma, surge a necessidade de melhorar as resinas cromatográficas e ligantes a fim de alcançar maior resolução e capacidade, bem como para desenvolver um bioreconhecimento da conformação desejada do plasmídeo, permitindo uma purificação eficiente por meio de uma operação unitária simples. Várias resinas para aplicação em purificação de DNA plasmidial têm sido desenvolvidas e exploradas para fins terapêuticos, em que vários ligantes têm sido utilizados em vários formatos de suporte, estruturalmente diferentes, em uma tentativa de aumentar a acessibilidade e especificidade para a molécula alvo.

2.4.1 REQUISITOS DOS RESINAS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS EM PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Devido à sua versatilidade e resolução, separações cromatográficas de misturas complexas de produtos biológicos são usadas para vários propósitos em pesquisa e biotecnologia industrial (LYDDIATT, 2002). Na purificação de pDNA para aplicações farmacêuticas, o principal desafio das diferentes estratégias biotecnológicas desenvolvidas é eliminar as impurezas do hospedeiro *E. coli*, mantendo o maior grau de enovelamento possível (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2008). A eficiência da purificação de plasmídeo advém diretamente de uma seleção adequada da resina cromatográfica. Por um lado, esta deverá ser idealmente macroscópica e estável, altamente seletiva para capturar os plasmídeos, com baixas adsorções não específicas e altas capacidades de ligação e transferência de massa associadas (MIYABE; GUIOCHON, 2002). Da mesma forma, esta deverá ser preferencialmente incompressível, barata, simples de usar, reutilizável em várias corridas cromatográficas e sanitizada por condições alcalinas (JUNGBAUER, 2005).

Para a separação de plasmídeos, as resinas sólidas devem ser adaptadas às exigências físico-químicas dos plasmídeos alvo. O grande tamanho dos plasmídeos implica o uso de matrizes com geometria de poros definida, enquanto que as características químicas dessas biomoléculas requerem propriedades de superfície adequadas do suporte sólido (MIYABE; GUIOCHON, 2002). Por exemplo, a dimensão do poro é correlacionada com o limite de exclusão das moléculas de plasmídeo, sendo inversamente proporcional à área superficial disponível para ligação, que por sua vez, afeta diretamente a quantidade de ligante imobilizado e, portanto, a capacidade de ligação. Assim, poros excessivamente grandes irão traduzir-se em um acesso irrestrito de grandes moléculas aos ligantes imobilizados, porém implicam redução da área de superfície e, conseqüentemente, menor densidade de ligantes e menor capacidade. Poros extremamente pequenos dificultam o acesso das moléculas aos poros a purificação depende apenas da especificidade da área de superfície (JUNGBAUER, 2005; MIYABE; GUIOCHON, 2002). De outra forma, também a

natureza química dos grupos funcionais irá determinar as interações preferenciais estabelecidas com a molécula alvo e impurezas, determinando os princípios cromatográficos nos quais se baseará a purificação (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). Por conseguinte, a eficiência do processo de purificação resultará diretamente de uma escolha adequada da combinação das características químicas e físicas destas resinas cromatográficas.

2.4.2 CLASSIFICAÇÃO DAS RESINAS CROMATOGRÁFICAS

Primeiramente, o material constituinte das resinas cromatográficas pode ser classificado quanto às suas propriedades químicas. Estas poderão ser polímeros naturais, polímeros sintéticos, material inorgânico e material compósito (JUNGBAUER, 2005). São exemplos de polímeros naturais a agarose, o dextrano e a quitosana, que são frequentemente utilizados devido aos seus baixos valores de adsorção inespecífica. Também a celulose se encontra na classificação de polímero natural, porém, aparece como a menos vantajosa devido à sua estrutura limitativa da taxa de fluxo (JUNGBAUER, 2005). Como polímeros sintéticos aparecem os derivados de poliacrilamida, os polímeros de polimetacrilato e poliestireno. Estes são caracterizados por possuírem propriedades altamente estáveis por conta da sua resistência a condições extremas de pH e oxidação ambiental. Contudo, por apresentarem um caráter mais hidrofóbico que os polímeros naturais, torna-se necessário um revestimento adicional da sua superfície para evitar perdas de rendimento (BOSCHETTI et al., 1995; JUNGBAUER, 2005). Na classificação de material inorgânico encontram-se as resinas de hidroxiapatita, sílica e vidro (GIOVANNINI; FREITAG, 2002). Se por um lado, a hidroxiapatita apresenta normalmente boas seletividades para moléculas alvo, por outro esta apresenta propriedades de fluxo menos vantajosas quando comparada por exemplo, ao vidro, devido à sua estrutura rígida e porosa (HAHN; SCHLEGEL; JUNGBAUER, 2003). Em contrapartida, o vidro exibe menor seletividade que a hidroxiapatita. Já no caso do polímero de sílica, este encontra-se frequentemente revestido com polímeros naturais ou sintéticos obtendo-se também uma boa seletividade com o seu uso (SCHIEL et al., 2006). No entanto, se esse apoio for constituído por

um hidrogel polimerizado em uma casca de sílica macroporosa, este é considerado um material compósito. Nestes casos, o material é geralmente adaptado para revestir uma superfície (seja de celulose, dextrano, agarose ou vidro) com outros materiais para atingir a finalidade pretendida (NECINA; AMATSCHEK; JUNGBAUER, 1998).

Identicamente, também o formato do material tem sido amplamente explorado para atingir os requisitos de pureza de moléculas complexas, mantendo rendimentos satisfatórios. Por isso, várias resinas cromatográficas com diferentes propriedades estruturais e físicas têm sido utilizadas para purificação de DNA plasmidial, sendo os mais comuns divididos em partículas dispersas porosas ou não porosas, ou outros formatos alternativos como as membranas e monólitos.

2.4.2.1 Partículas dispersas não-porosas

Sabe-se que a cinética da transferência de massa dentro dos poros das resinas pode ser lenta, devido à difusão limitada intrapartícula e, além disso, os locais de superfície ativa remanescentes podem dar origem a interações indesejadas. Isso poderá levar a perdas consideráveis de resolução e de recuperação do produto de interesse, ou mesmo a perdas da sua atividade biológica. Uma maneira clara de contornar esse dilema é atingida eliminando a porosidade por meio de partículas dispersas não porosas. Devido à total ausência de poros, os efeitos de resistência à transferência de massa e difusão são eliminados, sendo possível obter uma rápida separação e análise com alta resolução. Da mesma forma, esta característica permite uma boa recuperação, evitando as alterações conformacionais das biomoléculas que podem levar à perda de sua atividade biológica (LI, 1997). No entanto, as capacidades apresentadas são relativamente baixas devido à superfície simples e de área reduzida apresentada por estas partículas. Por este motivo, o uso destas resinas para efeitos preparativos não é recomendado, apresentando mais utilidade para fins de controle de qualidade, monitoramento e avaliação de pureza de biomoléculas (THEODOSSIOU; THOMAS, 2002). Relativamente à purificação de DNA plasmidial, vários estudos

têm sido descritos utilizando partículas não porosas para fins de estratégias analíticas de quantificação de pDNA (IULIANO et al., 2002; SOUSA; QUEIROZ, 2011).

2.4.2.2 Partículas dispersas porosas

Ao contrário das partículas não porosas, partículas porosas surgem da implementação de materiais sólidos com porosidade definida na superfície das partículas. Devido ao aumento considerável da área superficial exposta, que é consequência direta da porosidade, estas resinas apresentam teoricamente maiores capacidade de ligação e seletividade, cujo limite de exclusão é definido pelo tamanho do poro (RODRIGUES et al., 2007). Desse modo, e com fim em uma implementação bem sucedida de fases estacionárias baseadas em partículas porosas, o compromisso entre o tamanho dos poros do suporte sólido e o diâmetro das moléculas alvo deve ser levado em conta.

A aplicação de partículas porosas poderá ser vantajosa no sentido que conseguirá fornecer uma separação parcial das moléculas grandes que são eluídas diretamente através das partículas, das moléculas de menores dimensões, que são retardadas passando pelos canais dos poros, com base no princípio de exclusão molecular. Na realidade, foi anteriormente relatada a retenção de impurezas de baixa massa molecular, entre as quais o RNA, proteínas e endotoxinas, obtida por meio das resinas Superose 6 and Sephacryl S1000 SF, enquanto o gDNA e o pDNA foram excluídos juntos por apresentarem massas moleculares mais elevadas (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 1997). Por outro lado, o aumento da resistência de massa associado à penetração intraporo pela difusão molecular lenta de moléculas de maiores dimensões, poderá resultar em degradação ou perda de atividade biológica, normalmente associada a biomoléculas com fins terapêuticos como os plasmídeos (NECINA; AMATSCHEK; JUNGBAUER, 1998). Uma outra consequência importante será a inacessibilidade das moléculas de plasmídeo ao interior das partículas, acabando por mostrar capacidades limitadas para este tipo de moléculas na maior parte dos casos (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). Estudos da

literatura mostram que capacidades de ligação superiores a 1,5 mg/mL são difíceis de obter utilizando, por exemplo, este tipo de partículas porosas em modo de troca aniônica, como é o caso de Q- e DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose XL e Toyopearl DEAE- 650 (PRAZERES, 2011). Nestes casos, as moléculas de plasmídeos de grandes dimensões, não se ligam e são incapazes de entrar nos poros, acabando por não conseguir entrar em contato com a resina carregada positivamente nas partes internas das partículas. Dados experimentais recorrendo, por exemplo, a microscopia confocal a laser, também mostram que nesta situação, o interior das partículas permanece em grande parte inacessível, e que as moléculas de plasmídeo se ligam essencialmente ao invólucro exterior das partículas (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). Desta forma, quando o principal objetivo é purificar o pDNA, o número de poros e canais convectivos introduzidos através dos poros neste tipo de suporte não é normalmente suficiente para superar as limitações de difusão e volumes mortos entre as partículas, ou para melhorar a própria capacidade de ligação da resina, que também é considerado um fator limitante na cromatografia de pDNA (TARMANN; JUNGBAUER, 2008).

Outro grupo de resinas que foi desenvolvido nos últimos anos combina partículas com poros de difusão normais (cerca de 300 Å) com poros de maiores dimensões, com diâmetros na faixa de 0,2 a 30 µm, foram as resinas denominadas de superporosas. Um dos principais objetivos subjacentes a este tipo de suporte seria permitir que o fluxo de convecção intraporos ocorresse dentro dos superporos para que a distribuição de solutos de maiores dimensões para a rede de poros difusivos (de menor tamanho) fosse acelerada, resultando em separações mais rápidas (RODRIGUES; CHENOU; RENDUELES DE LA VEGA, 1996). Um exemplo prático dessas matrizes “superporosas” é a POROS®, que é um suporte à base de poliestireno (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). Embora não tenham sido desenvolvidos explicitamente para o uso em cromatografia de plasmídeos, a resina aniônica POROS 50 HQ apresenta um aumento considerável na capacidade destas moléculas. A excelente capacidade associada pode ser diretamente atribuível ao fato de que as moléculas de plasmídeo são capazes de fluir mesmo dentro dos grandes

poros e ligar-se às suas paredes (MCCOY et al., 1996; THEODOSSIOU; SØNDERGAARD; THOMAS, 2001).

Enquanto as partículas de agarose homogêneas (A e B) não apresentam qualquer característica de ampliação de capacidade ou melhoramento de transporte de massa, as partículas superporosas de agarose (C e D) são altamente estruturadas exibindo uma rede de superporos direcionada para fomentar o transporte convectivo por entre os poros (TIAINEN et al. 2007). Nestas estruturas, os superporos encontram-se interconectados e aproximadamente igualmente espaçados. Também é evidente que o diâmetro dos superporos varia dentro de cada esfera, sendo a escolha desse diâmetro do superporo e do diâmetro das partículas baseada em um compromisso entre vários fatores. Por exemplo, mesmo os poros de menor diâmetro fornecem uma área superficial interna suficientemente grande para acomodar moléculas como o plasmídeo. No entanto, poros demasiado estreitos levarão a baixas taxas de fluxo que podem excluir plasmídeos de maiores dimensões. Relativamente ao tamanho de partícula, um grande diâmetro de partícula é certamente atraente de um ponto de vista de queda de pressão, porém exige também uma grande quantidade de diâmetro de superporo para que o fluxo dentro do poro seja razoavelmente alto, que, por sua vez, diminui a capacidade de ligação do plasmídeo (TIAINEN et al. 2007).

2.4.2.3 Membranas

A tecnologia de membranas tem sido largamente utilizada para operações de filtração ou ultrafiltração, como também para passos de polimento de processos biotecnológicos (PRZYBYCIEN; PUJAR; STEELE, 2004). A cromatografia baseada em membranas difere da cromatografia em coluna com base em partículas dispersas devido à sua geometria e estrutura da fase estacionária. Uma membrana consiste em um disco com um grande número de orifícios de diâmetro similar e otimizado, sendo que o seu diâmetro encontra-se na faixa de centímetro e a sua espessura na faixa de micro a milímetro (TENNIKOVA; SVEC, 1993). As membranas são preparadas como camadas muito finas e, portanto, o

aumento de escala é limitado. No entanto, eles podem ser empilhados para fornecer um volume adicional e, conseqüentemente, melhorar a capacidade. Além disso, a imobilização de ligantes específicos com afinidade, troca iônica, hidrofóbica ou de fase reversa para a superfície da membrana pode aumentar a seletividade destes materiais (ZENG; RUCKENSTEIN, 1999). Estas poderão ter na sua constituição diferentes materiais como nitrocelulose, derivados de sílica, polipropileno, náilon, quitina ou quitosana (KENDALL; LYE; LEVY, 2002; LEVY et al., 2000).

Enquanto que o transporte de massa em colunas convencionais apresenta sérias limitações devido ao seu fluxo por entre os volumes mortos por transporte majoritariamente difusivo, neste caso as moléculas alvo são transportadas por convecção através dos poros da membrana, permitindo processos mais rápidos (HABER et al., 2004). Por este motivo, a escolha do tamanho do poro é um processo essencial durante o desenho destas, podendo estas ser classificadas em microporosas e macroporosas (BOI, 2007). Não obstante, o uso de membranas cromatográficas tem sido limitado pela menor capacidade de adsorção relativamente às colunas convencionais. Além disso, não é incomum o fenômeno de colapso das membranas pelo uso de moléculas de maiores dimensões, sendo por este motivo a utilização de membranas macroporosas mais adequada para aplicações de purificação de DNA plasmidial (ZENG; RUCKENSTEIN, 1999).

Levy e colaboradores propuseram o uso de membranas de nitrocelulose para purificação de DNA plasmidial partindo de lisados clarificados complexos de *E.coli*. Neste trabalho, foi possível diminuir a contaminação por DNA cromossômico e RNA, que foram retidos pela membrana, enquanto que a maioria da isoforma superenovelada do DNA plasmidial foi seletivamente recuperada no filtrado (LEVY et al., 2000). Um outro estudo foi descrito envolvendo o desenvolvimento e otimização de um processo alternativo de cromatografia de membrana por interação hidrofóbica. Nesse caso, resinas de membrana foram funcionalizados com um ligante de cadeia alquílica linear, o que permitiu uma separação eficiente do plasmídeo modelo pVAX1-LacZ (6050

pb) de moléculas de RNA presentes no lisado de *E. coli* (PEREIRA; PRAZERES; MATEUS, 2010).

2.4.2.4 Monolitos

Monolitos são polímeros porosos com uma estrutura que aparenta uma série de membranas empilhadas, porém sendo polimerizados diretamente em um único bloco de material poroso (PODGORNIK; TENNIKOVA, 2002), geralmente constituídos de poliacrilamida ou polimetacrilato (JUNGBAUER, 2005; PETERS; ERICSON, 2003). Uma característica importante que distingue a tecnologia monolítica dos resinas convencionais de partículas e a inovadora tecnologia monolítica é a ausência de volumes mortos, devido à estrutura altamente porosa que proporciona uma acessibilidade superficial elevada (JUNGBAUER, 2005), que por sua vez, se traduz em elevados valores de capacidade para moléculas de grande dimensão como os plasmídeos (SOUSA et al., 2011). Deste modo, as moléculas a serem separadas são transportadas por entre os poros, por convecção, ao invés de difusão. Este fluxo convectivo interno associado à rede de poros altamente conectada, acelera grandemente a taxa de transferência de massa do monolito, o que permite um aumento substancial da velocidade de separação. Este mecanismo de transporte resulta em tempos de corrida curtos, sem interferir com parâmetros de rendimento, resolução da separação ou a capacidade de ligação dinâmica (STRANCAR et al., 1996). Além disso, ao evitar uma mistura turbulenta caracterizada por um fluxo de desordem dentro dos volumes mortos, os monolitos diminuem perdas de resolução, normalmente associadas às colunas convencionais, em que misturas de transporte difusivo e convectivo ocorrem simultaneamente (PODGORNIK; TENNIKOVA, 2002).

Existem outras vantagens associadas a estas resinas como a facilidade em funcionalizar ou imobilizar os ligantes de afinidade, fácil controle do tamanho dos poros pelas condições de síntese, e a simplicidade do *scale-up* associado a processos industriais. Colunas monolíticas de metacrilato têm sido utilizadas com sucesso no processo de purificação do pDNA de grau farmacêutico em escala industrial (SMREKAR et al., 2010, 2013). Estudos feitos anteriormente,

demonstram o sucesso do uso de resinas monolíticas macroporosas para imobilização de ligantes peptídicos, pela sua melhor transferência de massa, alto teor em grupos de ativação, bem como a alta compatibilidade com o meio biológico (VLAKH et al., 2004). Recentemente, em uma técnica de cromatografia monolítica baseada em arginina, foi possível separar seletivamente isoformas de plasmídeo, com boa capacidade de ligação para o plasmídeo de conformação sc (SOUSA et al., 2011), tornando-se um suporte potencial a ser aplicado na captura direta de sc pDNA a partir de um extrato de lisado de *E. coli*. Outro trabalho, foi publicado descrevendo uma modificação no suporte monolítico com um derivado de arginina, a agmatina, que combinou igualmente a especificidade do ligante com as altas taxas de transferência de massa e capacidades oferecidas pelos monolitos (SOUSA et al., 2014).

2.4.3 PRINCÍPIOS DE CROMATOGRAFIA UTILIZADOS EM PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Sabendo que a aplicação das resinas sob sua estrutura básica não é suficiente para a purificação do pDNA, a necessidade de empregar outros princípios cromatográficos surge como uma alternativa para superar essas limitações. A preparação de resinas apropriadas para cromatografia específica requer a imobilização de ligantes com características restritas e desejadas, independentemente das características estruturais do suporte utilizado. A associação de ligantes adequados ao suporte sólido aproveita uma maior seletividade e especificidade para a biomolécula alvo, proporcionando uma variedade de matrizes que podem ser utilizadas em diferentes princípios cromatográficos.

De entre os diferentes tipos de interações físico-químicas exploradas na tentativa de separar plasmídeos das impurezas usuais de *E. coli*, para além da cromatografia de exclusão molecular, de fase reversa, ou tiofílica, as mais comuns são as aniônicas, hidrofóbicas e de afinidade (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). No caso da cromatografia de exclusão molecular, apesar das suas deficiências bem conhecidas, esta técnica é particularmente útil para

executar tarefas específicas de purificação do plasmídeo, como dessalinização, troca de tampão e remoção de impurezas como o RNA. A técnica leva vantagem do fato de, com exceção dos fragmentos de gDNA, os plasmídeos são essencialmente as moléculas de maior dimensão no seio das soluções. Em vista deste fato, as separações podem ser projetadas em tal maneira que os plasmídeos sejam totalmente excluídos do interior das resinas cromatográficas, enquanto que as impurezas de menores dimensões devem ser capazes de obter acesso à rede de poros intraparticulados (LIMONTA et al., 2008).

Por outro lado, apesar das descrições do uso preparativo de cromatografia de fase reversa para purificação de plasmídeos não sejam abundantes na literatura, alguns casos de sucesso foram relatados utilizando este tipo de cromatografia para purificação de DNA plasmidial (TUMANOVA et al., 2005). As matrizes utilizadas neste modo de cromatografia são caracterizadas por superfícies envolvendo ligantes como cadeias alquílicas, por exemplo, butila e octila. Estes ligantes hidrofóbicos não polares conseguem estabelecer interações hidrofóbicas com os anéis aromáticos das bases dos ácidos nucleicos, como seria em uma cromatografia de interação hidrofóbica usual. Uma diferença importante aqui, porém, é que solutos que estão ligados a colunas de fase reversa em soluções aquosas são eluídas com quantidades crescentes de solventes orgânicos como álcoois, como o etanol ou isopropanol, ou acetonitrilo. Na verdade, esta característica distintiva é também responsável por uma das desvantagens da técnica que é o uso de solventes orgânicos em um ambiente de processo que apresenta uma série de riscos importantes para a saúde, segurança e a geração de resíduos.

Já a cromatografia de interação tiofílica baseia-se no uso ligantes aromáticos de tiol que são acoplados às matrizes cromatográficas como tioéteres (PORATH; BELEW, 1987). Nesta técnica, o carregamento dos lisados é feito em condições de altas concentrações de sais cosmotrópicos (como o sulfato de amônio) e a eluição é normalmente realizada com um gradiente crescente de NaCl. Assim, a seletividade entre as espécies é atingida de acordo com a força de interação resultante das interações hidrofóbicas ($\pi - \pi$) com o anel aromático assim como das interações eletrostáticas do átomo de enxofre, que aparece como um doador

de elétrons. Nestas condições, o padrão de eluição tem um primeiro pico de material não-nucleico não ligado, enquanto que as isoformas circulares abertas eluem no início do gradiente de NaCl seguido pela isoforma super-enovelada. Relativamente ao RNA, proteínas e endotoxinas fortemente ligados, estes eluem da coluna quando a concentração de sal cosmotrópico se aproxima de zero (SANDBERG et al., 2004).

2.4.3.1 Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca iônica torna-se uma escolha naturalmente comum considerando a natureza polianiônica do DNA e das principais impurezas de gDNA e RNA, cujas interações eletrostáticas são prevalentes devido à atração entre os ácidos nucleicos e as matrizes que devem apresentar cargas opostas. Neste âmbito, a imobilização mais comum e simples nas diferentes resinas disponíveis é baseada em uma reação reticulada com polímeros carregados específicos, nomeadamente aminas terciárias ou quaternárias. As moléculas de fita dupla do pDNA são facilmente capturadas, devido à interação preferencial entre os grupos fosfato do pDNA com os grupos funcionais carregados dessas resinas cromatográficas (EON-DUVAL; BURKE, 2004). Posteriormente, a eluição dos ácidos nucleicos retidos na resina é estabelecida pelo aumento da concentração de sal, que favorece deslocamento das moléculas com menor densidade de carga (PRAZERES; SCHLUEP; COONEY, 1998). As diferenças de tamanho entre as diferentes moléculas são especialmente importantes neste contexto, uma vez que a interação eletrostática entre as moléculas e os grupos carregados positivamente é aproximadamente proporcional ao número de grupos fosfato na molécula, ou seja, densidade de carga das moléculas. Em outras palavras, quanto maior é a molécula, mais forte é a sua ligação à matriz carregada, e, portanto, mais tarde eluirá da coluna (PRAZERES, 2011). O que acontece em alguns estudos, é que a solução oriunda de etapas de recuperação intermediárias contendo o plasmídeo, é carregada na coluna em uma força iônica suficientemente alta para evitar ligações desnecessárias das impurezas com menor densidade de carga em comparação com o pDNA. Após o carregamento, e após lavar a coluna com um tampão de força iônica similar, um gradiente de

sal (geralmente de NaCl) é usado para deslocar seletivamente o pDNA das impurezas restantes ligadas à matriz por conta das diferenças nas suas cargas líquidas.

É notável todo o potencial do princípio de cromatografia de troca aniônica quando associado a resinas adequadas, como as monolíticas, podendo apresentar altos valores de capacidade na ordem de 8,0 - 15,0 mg/mL (DANQUAH; FORDE, 2007; KRAJNC et al., 2011; URTHALER et al., 2005). Devido às altas capacidades demonstradas para o DNA plasmidial, a maioria das estratégias de purificação do plasmídeo descritas usando monolitos, exploram as interações de troca aniônica, usando aminas quaternárias e terciárias como ligantes (KRAJNC et al., 2011; ZÖCHLING et al., 2004). No entanto, também é importante mencionar e considerar a falta de seletividade desses adsorventes químicos, que podem ser responsáveis pela co-eluição do DNA plasmidial com as outras impurezas, como endotoxinas, RNA de alta massa molecular, gDNA e isoformas plasmidiais não superenoveladas (FERREIRA, 2005; STADLER; LEMMENS; NYHAMMAR, 2004). Essa baixa seletividade de separação resulta do fato de que a força de ligação do DNA plasmidial e impurezas é muito semelhante, independentemente de isso resultar de semelhanças de tamanho ou de mudanças conformacionais. No caso específico gDNA, esta é uma das razões pelas quais é muito importante ao realizar o rompimento de células de *E. coli*, garantindo que o gDNA não seja quebrado em fragmentos similares ao plasmídeo, quando se trata de sua relação carga/tamanho. Por consequência, esta limitação na seletividade torna a purificação do pDNA muito difícil de alcançar em um único passo cromatográfico de troca aniônica, sendo frequentemente combinada com outras técnicas de purificação, tais como cromatografia de interação hidrofóbica ou cromatografia por exclusão de tamanho (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005; PRAZERES, 2011).

2.4.3.2 Cromatografia de interação hidrofóbica

Uma das propriedades que diferenciam as moléculas de plasmídeo das impurezas como os ácidos nucleicos de fita única (gDNA e RNA), que é

usualmente explorada na purificação de pDNA, é a hidrofobicidade. O princípio da cromatografia hidrofóbica baseia-se na exigência de altas concentrações salinas, pois neste caso a força iônica é responsável pela remoção de moléculas de água ao redor dos grupos hidrofóbicos das biomoléculas e dos ligantes favorecendo sua atração (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). Este princípio cromatográfico faz uso de ligantes contendo cadeias alquílicas longas ou anéis aromáticos com propriedades hidrofóbicas acoplados às resinas, como fenila, butila ou octila. Embora esta estratégia esteja comumente associada a impactos ambientais e econômicos em escala industrial devido às altas concentrações de sal requeridas, a cromatografia hidrofóbica tem sido utilizada em escalas preparativa, analítica e industrial. Neste cenário, o processo de eluição é atingido diminuindo a concentração de sal da fase móvel, o que enfraquece as interações hidrofóbicas previamente estabelecidas (PRAZERES, 2011).

No caso do pDNA, a maioria das bases hidrofóbicas é emparelhada ao longo do seu esqueleto, encontrado-se protegida dentro da dupla hélice, enquanto que as cadeias de açúcar e fosfato estão caracteristicamente posicionadas para a parte externa da molécula. Como resultado, os plasmídeos são essencialmente moléculas hidrofílicas que tendem a se afastar das superfícies hidrofóbicas. Em ácidos nucleicos de fita simples, por outro lado, as bases aromáticas são menos restritas devido à falta de emparelhamento e empacotamento e, portanto, encontram-se amplamente expostas ao ambiente circundante, estando disponíveis para interagir com superfícies hidrofóbicas. Normalmente, a maior exposição das bases do RNA e na isoforma sc pDNA mais compacta permite uma retenção mais forte do que para as moléculas maiores de gDNA ou pDNA oc, sendo possível isolar todas essas impurezas. Outro grupo de impurezas que possui um forte caráter hidrofóbico é o LPS, devido à presença do lipídio A em sua estrutura (IULIANO et al., 2002).

Neste modo cromatográfico, a ordem de eluição das moléculas ligadas é então dependente do grau de hidrofobicidade de cada molécula, cuja retenção é afetada principalmente pelo seu tamanho, estrutura, composição e exposição às bases hidrofóbicas. Como ponto de partida, as resinas são normalmente equilibradas com um tampão que contém grandes quantidades de sal (como o

sulfato de amônio ou citrato de sódio), e a hidratação preferencial dos íons salinos garante que as interações hidrofóbicas entre os solutos hidrofóbicos sejam maximizadas quando a solução contendo o plasmídeo é carregada na coluna (JUNGBAUER, 2005).

2.4.3.3 Cromatografia de afinidade

As interações específicas que ocorrem na cromatografia de afinidade são usualmente resultado de variadas interações que incluem as interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou ligações de hidrogênio (GADGIL; OAK; JARRETT, 2001). A natureza específica do ligante neste caso é a grande vantagem da cromatografia por afinidade por permitir altos valores de seletividade e resolução. Neste ponto, embora o desenho de ligantes seletivos para a purificação de biomoléculas seja complexo, demorado e caro, a sua implementação traria vantagens econômicas importantes para um processo de purificação de pDNA. Para além da redução de passos no processo de purificação, esta permitiria uma melhoria da qualidade do produto, justificando os elevados investimentos iniciais (HAN; FORDE, 2008).

Um aspeto importante neste campo foca-se assim no desenvolvimento de ligantes adequados, fator crucial para ir ao encontro dos rigores e exigências associadas a um processo industrial (LABROU, 2003). É importante salientar que o conceito que está subjacente à cromatografia de afinidade não se relaciona somente com a cromatografia, mas com outras abordagens deveras interessantes como a biomimética e a bioengenharia. Vários ligantes para a purificação de pDNA por afinidade têm sido investigados à escala laboratorial, sendo que uma das técnicas que tem sido utilizada baseia-se na formação de hélices triplas entre oligonucleotídeos ligados a um suporte cromatográfico e as fitas duplas presentes no plasmídeo, com rendimentos associados acima de 60% com uma redução significativa de impurezas como RNA e gDNA (WILS et al., 1997). No entanto, essas resinas exibiram cinéticas demasiado lentas, proibitivas para um processo viável em grande escala (SCHLUEP; COONEY, 1998; WILS et al., 1997). Estudos utilizando proteínas como ligantes de afinidade

também têm sido descritos, como a zinc finger-glutathione S-transferase (WOODGATE et al., 2002), ou a Lac repressor protein (DARBY; HINE, 2005). Nestes casos, a grande limitação baseia-se na escala e mais uma vez, na economia, uma vez que estes ligantes são grandes, frágeis, e muitas vezes difíceis de purificar (HAN et al., 2010).

Aminoácidos como ligantes de afinidade

A seleção dos aminoácidos como ligantes de afinidade foi baseada na ocorrência natural de várias interações diferentes entre proteínas e ácidos nucleicos em organismos biológicos, que envolvem principalmente aminoácidos básicos como histidina (SOUSA et al., 2006) e arginina (SOUSA; CRUZ; QUEIROZ, 2010). Além disso, vários estudos atômicos têm descrito interações preferenciais que ocorrem entre aminoácidos carregados positivamente e as bases dos ácidos nucleicos (LUSCOMBE; LASKOWSKI; THORNTON, 2001). Embora alguns autores se refiram à cromatografia recorrendo a aminoácidos como cromatografia de pseudo-afinidade (DELATTRE et al., 2008) ou cromatografia multimodal (PRAZERES, 2011), por não ser possível identificar um único tipo de interação como sendo responsável pela ligação de plasmídeos e outros ácidos nucleicos aos ligandos específicos utilizados. Neste trabalho, assim como na maior parte dos estudos disponibilizados na literatura, considerou-se que a interação envolvida como afinidade.

Os aminoácidos histidina (SOUSA et al., 2006) e arginina (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2008) foram utilizados como ligantes de afinidade no processo de purificação de pDNA, revelando a presença de interações específicas com esta molécula, porém mostrando um comportamento de eluição diferente. As interações de histidina com as bases de pDNA incluem ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio mediadas por água (LUSCOMBE; LASKOWSKI; THORNTON, 2001). Em Sousa et al. (2006), foi notável o potencial do aminoácido histidina na separação das impurezas hospedeiras associadas à molécula de pDNA, em que o ligante mostrou uma forte especificidade para a isoforma sc, com relação à isoforma oc e gDNA. Em

consequência da própria estrutura da isoforma sc, as bases desta tornam-se mais expostas do que as da isoforma oc, bem como as do gDNA. Por outro lado, o RNA foi fortemente retido pela coluna devido à sua alta exposição das bases aromáticas, permitindo a eluição com um gradiente decrescente de sulfato de amônio. Após o carregamento de um lisado clarificado em sulfato de amônio 2,3 M em uma coluna histidina-agarose, uma série de passos cromatográficos foram promovidos para eluição da isoforma circular aberta do plasmídeo bem como do gDNA (~ 2,3 M), da isoforma superenovelada do plasmídeo (~ 2,0 M), e por fim, do RNA (<1,5 M). Apesar da qualidade dos resultados obtidos por cromatografia de afinidade pelos aminoácidos de histidina, quer com relação a contaminações das principais impurezas, quer em pós-estudos de transfeção utilizando o produto purificado (SOUSA et al., 2006), o baixo rendimento (42%) e a elevada concentração de sal requerida para o passo de eluição, tornam este ligante proibitivo em escala industrial.

A implantação da cromatografia de afinidade de arginina surge como boa alternativa para superar tais limitações, pois a retenção total é estabelecida com baixas concentrações de sal (nomeadamente cloreto de sódio), e as espécies são eluídas por de um ligeiro aumento de força iônica (SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2009; SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2008). Alguns estudos demonstraram que a técnica utilizando estes ligantes resulta em uma abordagem bastante promissora (SOUSA et al., 2008). Recentemente, surgiram também trabalhos utilizando e mostrando o poder do aminoácido lisina no processo de purificação desta biomolécula (SOUSA; QUEIROZ, 2011), porém, a arginina continuou a ser o ligante mais promissor.

Arginina como ligante de afinidade

As interações arginina-base de DNA têm sido reconhecidas como as predominantes nas estruturas proteína-DNA. A diversidade de interações que envolvem ligantes de arginina são fundamentalmente eletrostáticas, hidrofóbicas e de afinidade, envolvendo múltiplos contatos com as bases do DNA ou com a sua própria estrutura (BAI et al., 2014; SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2009).

Como referido anteriormente, esta revela igualmente capacidade de interatuar diferenciadamente com as diferentes isoformas de pDNA, devido à maior exposição das bases de DNA que está implícito muito provavelmente na consequência das deformações induzidas pelo superenovelamento da isoforma sc (SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2009).

Uma série de características da arginina que são adequadas para suportar esses mecanismos de reconhecimento específico têm sido descritas, como o comprimento suficiente da cadeia lateral deste aminoácido, a habilidade para interagir com diferentes conformações e a capacidade para produzir geometrias de ligação estratégicas (SOARES et al., 2013). Estudos revelaram um favorecimento da interação da arginina com a base guanina do DNA devido essencialmente à capacidade de interações simultâneas, tanto por interações bidentadas, como na formação de complexos por de pontes de hidrogênio da estrutura enovelada com as bases de arginina que é favorecido pelo superenovelamento da isoforma alvo (SOUSA et al., 2008).

A cromatografia com o aminoácido de arginina foi utilizada para purificar a isoforma superenovelada do DNA das outras isoformas e impurezas de *E. coli*, presentes em uma solução obtida por pré-purificação de um lisado alcalino com isopropanol, precipitação com sulfato de amônio e posteriormente dessalinizada recorrendo à cromatografia de exclusão molecular (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2009). Como referido, as condições utilizadas para a separação ideal foram substancialmente diferentes das utilizadas no caso dos ligantes de histidina. Neste caso, o processo compreendeu o carregamento do lisado pré-purificado para uma coluna de arginina-agarose a 0,24 mol/L NaCl, e a eluição de espécies ligadas foi promovida com um passo cromatográfico com um gradiente crescente de sal para 0,30 mol/L NaCl. O cromatograma exibiu dois picos referentes às moléculas de plasmídeo circular aberto não ligado e de RNA fracamente ligado, a 0,24 mol/L NaCl, seguido por um terceiro pico contendo moléculas de plasmídeo superenovelado a 0,30 mol/L NaCl. Os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) mostraram ainda que o gDNA eluiu a uma força iônica inferior. A seletividade observada para as diferentes espécies é explicada como o resultado da combinação de interações eletrostáticas com a cadeia de

fosfatos do pDNA, com interações específicas envolvendo o reconhecimento das bases pela arginina via ligações de hidrogênio. O fato das espécies de plasmídeo (e do RNA) se ligarem mesmo a baixas forças iônicas sugerem que poderão estar presentes fortes interações entre o íon guanidínio da arginina com os grupos aniônicos inerentes ao esqueleto do DNA. Tais interações são comuns em vários complexos proteína-DNA proporcionando estabilidade. Além disso, uma série de características da separação sugerem que existe algum tipo de envolvimento de interação específica responsável por esse reconhecimento. Em particular, contatos múltiplos, complexos de ligações de hidrogênio da arginina com as bases expostas das fitas simples de RNA e duplas do plasmídeo sc (como resultado do superenovelamento), poderão explicar as interações diferenciais com a isoforma circular aberta e a superenovelada, assim como a forte interação com o RNA, quando comparado com a isoforma circular aberta. Enquanto que anteriormente a interação do aminoácido histidina se dava principalmente pela exposição das bases azotadas da molécula de DNA, foi verificado que no caso da molécula de arginina esta interação é muito específica mesmo a forças iônicas baixas, indicando grande interação com os fosfatos carregados do pDNA (SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2009; SOUSA et al., 2008). De fato, isto é uma prova do potencial de seletividade associado a este aminoácido relativamente à histidina, permitindo a utilização de menores concentrações de sal nos solventes utilizados.

Em Sousa *et al.* (2009), encontra-se evidenciada a habilidade das interações de arginina no processo de purificação de pDNA, mostrando valores de rendimento que rondam os 80% e remoção das principais impurezas acima de 90%, com eficiências de transfeção do produto purificado para células eucariotas acima de 60%. Apesar do notável potencial deste aminoácido, a baixa capacidade associada às resinas disponíveis para aplicação de pDNA é um problema que ainda não foi resolvido, assim como as baixas difusividades associadas (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2009).

3. COLOCAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Várias técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas para obter grandes quantidades de DNA plasmidial superenovelada, isolando esta isoforma das topologias não efectivas do plasmídeo, permitindo simultaneamente a eliminação das impurezas do hospedeiro, por forma que o produto final se encontre de acordo com os critérios impostos pelas agências reguladoras. No entanto, o grande desafio para o sucesso destas etapas passa pela dificuldade em diferenciar a isoforma sc das outras topologias do plasmídeo (ao nível estrutural) e das impurezas do hospedeiro que apresentam características comuns, tais como carga negativa, tamanho e hidrofobicidade.

Como referido, estudos anteriores avaliando o reconhecimento atômico e molecular dos ácidos nucleicos por aminoácidos, permitiram identificar interações preferenciais entre aminoácidos particulares e as bases dos ácidos nucleicos. No caso da arginina, estas interações aparecem especialmente fortes, em que o grupo de guanidínio deste aminoácido é conhecido por desempenhar um papel importante no reconhecimento de sequências específicas dos ácidos nucleicos. O aminoácido arginina consegue assim proporcionar um ambiente eletrostático favorável para a interação, formando simultaneamente ligações de hidrogênio, bem como múltiplos contatos eletrostáticos com o esqueleto de fosfatos dos ácidos nucleicos. Por outro lado, foi também relatado na literatura o uso de homopeptídeos baseados no aminoácido de arginina para fins de entrega gênica. Foi descrito que o alongamento do peptídeo de arginina permite interações mais fortes com as moléculas de plasmídeo, resultado direto do maior número e diversidade de interações. Neste ponto, o desenvolvimento de novos ligantes engenheirados associados pode passar por “biomimetizações” de interações biológicas observadas em organismos ou em outros estudos que envolvam interação de moléculas biológicas com ácidos nucleicos, nas resinas cromatográficas, com vista ao aumento da eficiência destas em termos de capacidades de adsorção e seletividade.

Além disso, embora as matrizes de afinidade baseada em aminoácidos consigam atingir um reconhecimento específico e selectivo pela molécula de interesse, as limitações associadas às resinas convencionais disponíveis permanecem por resolver. As moléculas de pDNA, pela sua estrutura ramificada e grandes dimensões encontra-se, na maioria das vezes, impossibilitada de entrar nos poros de resinas de partículas, resultando em corridas cromatográficas ineficientes com baixas capacidades de adsorção. De entre várias estratégias exploradas para superar tais limitações, o uso desses sistemas cromatográficos convencionais em modo negativo pode solucionar os efeitos de exclusão molecular e capacidade sofridos pelas moléculas de pDNA quando operadas nestas resinas. Resinas monolíticas aparecem também como ótimos adsorventes cromatográficos para a purificação de pDNA, revelando boas propriedades de selectividade e transferência de massa, assim como elevada capacidade de ligação para o pDNA, permitindo uma rápida e eficiente separação das isoformas e impurezas de processo. Consequentemente, a combinação das vantagens proporcionadas pelas resinas monolíticas associadas ao uso vantajoso de ligantes altamente seletivos baseados em arginina, aparecem como uma estratégia promissora para fins de purificação de DNA plasmidial.

Portanto, o conhecimento das propriedades físico-químicas do pDNA e suas similaridades com as impurezas do hospedeiro de *E. Coli*, em associação com as interações preferenciais dos ligantes baseados em arginina, nas diferentes resinas cromatográficas, com estas moléculas, podem ser a chave para alcançar eficientemente um pDNA final produto adequado para aplicações clínicas. Uma consequência natural destes estudos é o desenvolvimento de um sistema (adsorvente e protocolo) de purificação de pDNA em pequena escala com ênfase no grau de pureza exigido para a aplicação em estudos de terapia gênica e vacinação com DNA. Até onde se sabe, esta foi a primeira vez na literatura em que ligantes de di-arginina e tri-arginina foram estudados para fins de purificação de pDNA. Além disso, esse trabalho se propôs a continuar no Brasil a linha de pesquisa relacionada à purificação de DNA plasmidial, tema de relevância na qual o país se encontra carente.

4. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de estratégias adequadas por meio de cromatografia de afinidade baseada em diferentes ligantes baseados no aminoácido e homopeptídeos de arginina (mono-, di- e tri-peptídeos de arginina), seletivas para pDNA, e que possam ser utilizadas em processos de purificação desta molécula para fins terapêuticos. De modo desenvolver uma estratégia eficiente para purificação destas moléculas que cumpra com os requisitos impostos pelas regulações farmacêuticas, em primeiro lugar, é importante entender a especificidade subjacente nas interações com as moléculas de arginina. Esta informação torna-se extremamente útil para ajustar e aplicar as melhores condições cromatográficas quando novas resinas de afinidade são exploradas para isolar moléculas de pDNA na sua forma biologicamente mais ativa (sc), a partir de extratos de *Escherichia coli* (*E. coli*) impuros e complexos. Da mesma forma, é importante o estudo, caracterização e implementação de resinas cromatográficas modernas para melhorar o desempenho dos ensaios cromatográficos, nomeadamente em termos de velocidade e resolução, aumentando a capacidade de ligação para o pDNA (sc).

De acordo com os objetivos globais, o trabalho foi desenvolvido respeitando as seguintes etapas:

1. Foram desenvolvidos estudos de equilíbrio de adsorção do DNA plasmidial, bem como da principal impureza de processo (RNA), por meio da interação com ligantes de arginina imobilizados em agarose, variando-se as condições de pH. Por meio de estudos de equilíbrio em batelada, pretendeu-se comparar e obter informações importantes acerca dos mecanismos de adsorção envolvidos em cada conjunto de condições para ambas as moléculas, pDNA e RNA, levantando-se parâmetros como capacidades de adsorção e constantes de associação adsorbato-adsorvente.
2. Avaliação do potencial de uso das resinas de agarose funcionalizadas com os ligantes de arginina e di-arginina para fins de cromatografia preparativa em modo

negativo. Estudos de caracterização foram conduzidos no sentido de se determinar as suas eficiências em termos de capacidades de adsorção e seletividade das novas resinas. Especificamente, foram realizados estudos de avaliação das capacidades de adsorção dinâmica das resinas para ambas as moléculas com os ligantes arginina e di-arginina, utilizando-se soluções purificadas. Posteriormente, averigou-se e foi comparado o potencial das duas resinas para capturar seletivamente o pDNA a partir lisados de *E.coli*.

3. Investigação do potencial de emprego de homopeptídeos de arginina imobilizados em resinas monolíticas para capturar e purificar a isoforma superenovelada de DNA plasmidial a partir de lisados de *E.coli*. Em partícular, pretendeu-se a caracterizar os monolitos funcionalizados após imobilização dos ligantes, e avaliar a habilidade para interagir com o pDNA. As capacidades de adsorção dinâmica foram determinadas e comparadas com o monolito funcionalizado com o aminoácido (mono)arginina. Também a seletividade destas resinas foi avaliada pelo monitoramento das impurezas remanescentes após a purificação, provenientes de extratos celulares de *E. coli*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Sigma Aldrich, EUA, Mw 372,24; 99%), acetato de sódio (CH_3COONa , Mw 82,03, Sigma Aldrich, EUA, 99%), ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, Mw 60,05, Sigma Aldrich, EUA, 99,7%), ácido clorídrico 37% (Sigma Aldrich, EUA), acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, Sigma Aldrich, EUA, Mw 98,14; 99%), agarose (Sigma Aldrich, EUA), albumina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich, EUA, Mw 66 kDa, $\geq 95\%$), álcool isoamílico, bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich, EUA, Mw 84,007), cloreto de sódio (NaCl , Sigma Aldrich, EUA, Mw 58,44; 99,8%), clorofórmio 99,8% (Sigma Aldrich, EUA), cloreto de cálcio (CaCl_2 , Sigma Aldrich, EUA, Mw 110,98; 99,9%), dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma life science, EUA, Mw 288,38; 98%), etanol (96% EtOH) (Sigma Aldrich, EUA, 99,5%), extrato de levedura (Synth, Brasil), fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, EUA, Mw 141,96; 99%), fosfato de sódio dibásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, EUA, Mw 156,01; 99%), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Sigma Aldrich, EUA, Mw 180,16; 99,5%), hidróxido de sódio (NaOH , Chem lab, EUA, Mw 40, 99%), mass ruler DNA Ladder 1 kbp (Sigma Aldrich, EUA), mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, Merck Millipore, Alemanha, Mw, 78,13; 99%), ROX qPCR Master Mix, sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Merck, Alemanha, Mw 132,14; 99,5%), SYBR Safe DNA gel stain 10000x (Invitrogen, EUA), tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Sigma Aldrich, EUA, Mw 121,14, 99,9%), triptona (Synth, Brasil), 6x orange DNA loading dye (Fermenta, EUA).

Todas as soluções e reações foram preparadas utilizando água Milli-Q, purificada por meio de um sistema Milli-Q Super-Q® Plus Water Purification (Merck Millipore, EUA). O pH das soluções foi ajustado pelo medidor de pH de bancada modelo Q400AS Quimis (Hexasystems, Brasil). Após preparadas, as soluções foram filtradas por meio de um filtro de membrana 0,22 μm (TPP, Suíça). Para determinação da massa dos reagentes, foram utilizados dois tipos de balança: Analytica XS205 e Tehtnica PL6001-L/00 balance (Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA). A temperatura e a agitação durante o processo de

fermentação para produção de plasmídeo pVAX1-GFP (3697 pb), por de *E. coli* DH10b e DH5 α , foram controladas por meio da incubadora modelo INNOVA 4430 (New Brunswick Scientific, EUA). As operações de centrifugação foram realizadas por centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha). As absorbâncias foram controladas pela medição no espectrofotômetro OD600nm SmartSpec 3000 (Bio-Rad, EUA). Para a agitação leve e constante requerida para imobilizar os ligantes às resinas de agarose, recorreu-se a um homogeneizador de sangue modelo ap-22 (CasaLab, Brasil). Para os ensaios cromatográficos em escala preparativa, com as resinas previamente imobilizadas e ativadas, procedeu-se ao seu empacotamento em uma coluna Tricorn HR 5/50 (GE Healthcare, EUA). Os ensaios de SEM/EDX foram realizados utilizando-se o equipamento QUANTAX EDS para SEM (Bruker Nano, Alemanha). As medidas de tamanho das moléculas de pDNA foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, EUA). Os ensaios cromatográficos foram realizados por da coluna HR 5/10 (0,5 x 10 cm) acoplada ao sistema FPLC ("Fast Liquid Chromatography System") ÄKTA Purifier provido do "software" Unicorn 5.1 e coletor de frações Frac-920, todos obtidos da GE Healthcare (Suécia). Nas corridas cromatográficas à escala preparativa, a amostra foi injetada recorrendo ao Superloop, 1/16" fittings, 10 ml (GE Healthcare, EUA), acoplado ao sistema. A quantificação de pDNA e RNA foi realizada no sistema ÄKTA acoplado a coluna HIC (coluna de interação hidrofóbica) 15 Source PHE (0,46 x 10 cm) (GE Healthcare, Suécia), composta por uma suporte de poliestireno acoplada com ligante fenil. A quantificação pDNA em termos de rendimento e pureza nos ensaios com as colunas monolíticas foi realizada em uma coluna AEX (coluna de interação aniônica) CIMac™ pDNA-0.3 analytical column (poros de 1.4 μ m). As corridas de eletroforese em gel de agarose foram realizadas em uma unidade de eletroforese horizontal com um comprimento de 15 cm (Hoefer, San Francisco, EUA). Os géis foram analisados por de luz UV em um sistema Gel Logic 212 PRO (DL Naturegene Life Sciences, EUA). As medidas de absorbância do ensaio de quantificação de endotoxinas foram realizadas fotômetro para microplacas, modelo ELx 808 (Bio-Tek Instruments, EUA). Para medição do gDNA contaminante foi utilizado equipamento de PCR em tempo real iQS Multicolor Real Time PCR Detection (BioRad, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 DNA PLASMIDIAL

O plasmídeo modelo pVAX1-GFP, gentilmente doado pelo Professor Miguel Prazeres (Instituto Superior Técnico, Portugal), foi construído a partir do plasmídeo comercial pVAX1LacZ, e concebido para especial utilização no desenvolvimento de vacinas de DNA como sistema modelo (FREITAS et al., 2007). Dentre os constituintes, o plasmídeo possui um promotor do citomegalovírus humano (CMV), o gene da proteína repórter GFP (proteína verde fluorescente), sequência de poliadenilação da BGH (hormônio de crescimento bovino), um gene de resistência à kanamicina para selecção em *E. coli*, e uma origem de replicação pMB1 (derivada de pUC) de alto número de cópias (Figura 5) (AZZONI et al., 2007).

Figura 5 - Esquema ilustrativo das seqüências que compõem o vetor plasmidial pVAX1-GFP (AZZONI et al., 2007).

Primeiramente, os plasmídeos foram inseridos em células competentes da linhagem *E. coli* DH10b (utilizada na primeira e segunda parte do trabalho) e DH5 α (utilizada na terceira parte do trabalho), cujo protocolo foi baseado no método descrito por Sambrook & Russell (2001) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Ambas as cepas DH10b e DH5 α são usualmente utilizadas pois possuem características interessantes como a ausência de sistemas de restrição/modificação que poderiam impedir a propagação do plasmídeo ou a falta de atividade das endonucleases que poderia levar à clivagem de certas sequências plasmidiais. Além disso, ambas as cepas são recA-, o que as torna defeituosas no processo de recombinação homóloga evitando potenciais problemas de integração desses plasmídeos no genoma da bactéria.

Após transformação, as colônias formadas em placa foram selecionadas e crescidas posteriormente em meio líquido Luria-Bertani (LB). Para confirmação da presença do plasmídeo, foi realizada a extração e purificação do pDNA das células pelo kit comercial Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit (GE Healthcare, EUA), e amostra final analisada por eletroforese em gel de agarose 8%. No final, as células foram conservadas em 15% glicerol, e armazenadas a -80°C.

4.2.2 CULTIVO DAS CÉLULAS DE *E. coli* CONTENDO O DNA PLASMIDIAL

Células transformadas com o pDNA foram descongeladas e incubadas *overnight* em placa de ágar LB (suplementada com 30 μ g/mL de kanamicina) em estufa a 37° C. As colônias selecionadas foram cultivadas em tubos de falcon de 50 mL de volume contendo 10 mL de meio LB suplementado até atingir a fase exponencial, em *shaker* a 37° C e 250 rpm de 6 a 8 h, cujo crescimento foi acompanhado pela densidade óptica a 600 nm (D.O.). Após este período de crescimento, cerca de 100 μ L de volume desta cultura celular foi cultivado durante a noite (cerca de 16 h) em frascos Erlenmeyer com 1000 mL de volume contendo 250 mL de meio LB suplementado com 30 μ g/mL de kanamicina. Todos os frascos, pipetas e o meio LB foram previamente esterilizados por autoclave, durante 20 min a 121°C. Ao final da fermentação, o meio com

biomassa foi centrifugado (4000 g, 4°C) durante 10 min, e o sedimento contendo a biomassa foi congelado a -20°C até à utilização posterior.

4.2.3 PREPARAÇÃO DO LISADO CELULAR

As células congeladas, e anteriormente isoladas do meio de cultura por centrifugação, foram submetidas a uma lise alcalina, seguindo o protocolo desenvolvido por Diogo e colaboradores (2000). Deste modo, o pellet resultante da centrifugação de 250 mL de cultura foi ressuspenso em 8 mL da solução I (20 mM Tris-HCl 50 mM glicose 10 mM EDTA (pH 8,0)). Em seguida, a lise foi feita pela adição de 8 mL da solução II (200 mM de NaOH e SDS 1% (m/v)), agitada cuidadosamente e deixada à temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, para a neutralização do lisado, adicionou-se 8 mL da solução III (3 mol/L de acetato de potássio pH 5,5 ajustado pela adição de ácido acético glacial), previamente gelada. O lisado neutralizado foi mantido em gelo por 10 min. A remoção dos fragmentos celulares, proteínas e gDNA originados pela precipitação aquando da neutralização, foi feita por centrifugação (12000 g, 4°C) por 30 min, seguido de uma segunda centrifugação (sob as mesmas condições), de modo a clarificar ainda mais o sobrenadante, durante 15 min. No final, ao lisado neutralizado, adicionaram-se 0,7 volumes de isopropanol para promover a precipitação do plasmídeo presente. Após 30 min de centrifugação (15.000 g, 4°C) e lavagem com etanol 70%, o precipitado foi seco sob ar e ressuspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM e 10 mM EDTA (pH 8,0). No caso do lisado preparado para os experimentos envolvendo os monolitos, as proteínas e o RNA foram adicionalmente precipitados adicionando sulfato de amônio até uma concentração teórica final de 2,5 mol/L. Após 15 min de repouso em gelo, as impurezas foram removidas por centrifugação durante 20 min (16.000 g, 4°C). O sobrenadante foi dessalinizado utilizando uma coluna PD-10, seguindo as instruções do fabricante, com 20 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8) como tampão de eluição. Em ambos os casos, o lisado foi armazenado em alíquotas a -20°C de modo a garantir a estabilidade do pDNA durante o armazenamento (FREITAS et al., 2007).

4.2.4 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

As soluções de plasmídeo purificado utilizadas nesse trabalho foram obtidas utilizando os kits comerciais Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit (GE Healthcare, EUA), na primeira e segunda parte do trabalho, e NZYMaxiprep (Nzytech, Portugal), na terceira parte do trabalho, seguindo-se o protocolo dos fabricantes. Em resumo, ambos os procedimentos se baseiam em um protocolo de lise alcalina modificado, seguido de uma centrifugação para a remoção dos debris celulares e clarificação do lisado. Após lise e clarificação, é promovida a ligação do plasmídeo às colunas de troca aniônica fornecidas pelo kit, sob condições apropriadas de força iônica (baixa) e pH. As impurezas do lisado celular como RNA residual, proteínas e impurezas de baixa massa molecular foram removidas por um passo de lavagem (com uma solução de média concentração de sal), enquanto que o plasmídeo foi posteriormente eluído por meio de uma solução de alta concentração de sal. O pDNA foi posteriormente concentrado por precipitação adicionando 0,7 volumes de isopropanol. A concentração final de pDNA foi determinada por absorbância a 260nm e a pureza foi expressa pela razão de absorbância a 260nm e 280nm. A integridade da amostra de pDNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.2.5 PURIFICAÇÃO DE RNA

O método de extração de RNA utilizado para a realização dos estudos de adsorção foi realizado seguindo o protocolo desenvolvido por Georges Mikhael Nammoura Neto na Tese de doutorado “Desenvolvimento e Validação de Método para a Identificação de Micro-Organismos Metabolicamente Ativos em Biofilmes de Amostras Ambientais Através da Análise de rRNA 16S” (por Georges Mikhael Nammoura Neto, documento ainda não disponibilizado). O lisado celular de *E. coli* não transformada com plasmídeo foi ressuspenso em 30 µL água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), 797 µL de solução contendo espermidina (5 mmol/L de espermidina em 20 mmol/L de Bis-Tris propano em pH 6,9) e 206 µL de solução 500 mmol/L de EDTA. O homogeneizado foi

transferido para tubos de polipropileno com rosca Savant FP120 (Thermo Fischer Scientific, EUA), contendo 0,5 gramas de esferas de vidro com 0,2 mm de diâmetro tratadas com água DEPC 0,1%. A amostra foi lisada no equipamento de “bead beater” por três ciclos de 45 segundos na potência 4,5 (equivalente a uma rotação de 4500 rpm). Imediatamente após a lise o tubo foi resfriado no gelo por 1 min. A amostra foi concentrada por centrifugação (10000 g, 4°C, 10 min). O sobrenadante foi coletado e dividido em porções iguais para tubos de polipropileno de 2 mL. Foram adicionados 1 mL de Trizol (TRI Reagente, Invitrogen Life Technologies, EUA). Os tubos foram agitados em vórtex vigorosamente por 2 min e aquecidos a 65 °C por 10 min. Posteriormente adicionou-se 400 µL de clorofórmio a cada tubo, agitou-se vigorosamente e os tubos foram centrifugados (18000 g, 4°C, 5 min). Em seguida, a fase aquosa (contendo o RNA) foi retirada cuidadosamente para preservar a fase intermediária e a do fundo. Adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e os tubos foram invertidos manualmente por algumas vezes para a completa homogeneização. A mistura foi mantida sobre a bancada por cerca de 10 min. Após esse período a amostra foi centrifugada (18000 g, 4°C, 5 min). O sobrenadante foi descartado com o auxílio da pipeta. Adicionou-se ao precipitado 500 µL de etanol 70% para a retirada de sais. Homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 18000 g, 4°C por 5 min. O tubo contendo o precipitado foi emborcado em lenço de papel por aproximadamente 3 min para secagem. O precipitado foi ressuspenso em água ultrapura e armazenado a -20 °C.

Para a produção das soluções de RNA utilizadas na segunda parte do trabalho, com resinas de agarose, foi seguido o mesmo protocolo descrito na seção de preparação do lisado celular (seção 4.2.3), porém a partir de células *E. coli* DH10b crescidas sem plasmídeo. No final, para além da observação da absorbância a 260 nm, assim como da razão de absorbância a 260 nm/280 nm (aproximadamente 2,0), a pureza da solução de RNA foi ainda confirmada pelo método de Bradford, tendo em conta a avaliação da presença ou não de proteínas como contaminantes (HARLOW; LANE, 2006).

4.2.6 IMOBILIZAÇÃO DOS LIGANTES EM RESINAS DE AGAROSE

Os aminoácidos de arginina (Sigma Aldrich, EUA), bem como os peptídeos de di-arginina sintetizados comercialmente (FastBio, Brasil) foram imobilizados em agarose (Epoxy-activated Sepharose 6B, GE Healthcare, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da resina. A resina comercial Epoxy Activated Sepharose-6B encontra-se caracterizada pelo fabricante como sendo uma matriz de agarose reticulada 4%, com um espaçador de átomos de 12 carbonos, densidade de ligantes entre 14 e 20 $\mu\text{mol/mL}$, diâmetro médio de partícula de 90 μm , com o tamanho das partículas variando entre 45 e 165 μm . Tanto os aminoácidos de arginina, quanto os peptídeos de di-arginina sintetizados apresentaram cerca de 99% de pureza, valor certificado pelos fabricantes. A imobilização dos ligantes ocorreu via ligação covalente entre os grupos epóxi da resina e grupos amina dos ligantes. Para isso, a resina Sepharose-6B ativada foi primeiramente ressuspensa e lavada utilizando água. Em seguida, uma solução de 100 μM do respectivo ligante a imobilizar, em solução 0,5 M NaHCO_3 (pH 9,5), foi exposta à resina em uma razão de 1:0,75 (razão molar epóxi ligantes). Após 16 h de reação a temperatura ambiente, a resina foi lavada com o tampão de ligação para remover o excesso de ligantes. Os grupos ativos remanescentes (que não reagiram com o ligante) foram bloqueados por meio de uma solução 0,1 mol/L Tris-HCl (pH 9,5), a 45°C durante 4 horas. No final, a resina foi lavada com ciclos alternados de pH. Cada ciclo consistiu em lavagens com 0,1 mol/L CH_3COONa (pH 4,0), contendo 0,5 mol/L NaCl seguido de 0,1 mol/L Tris-HCl (pH 8,0), contendo 0,5 mol/L NaCl. No final, as resinas foram lavadas com água e mantidas em etanol 20% de modo a evitar contaminações por agentes microbiológicos.

A técnica de SEM-EDX (microscopia eletrônica de varredura e análise dispersiva de energia da radiação X) foi usada para fornecer informações elementares de identificação e composição qualitativa da resina original (antes da imobilização do ligante) e das resinas após a imobilização do ligante. Antes da análise, as amostras de resina de agarose ativada, com os ligantes de arginina e di-arginina imobilizados, foram deixadas secar ao ar para desidratação completa por 48h. Para obter amostras homogêneas, estas foram trituradas com um pilão e coladas

com fita adesiva em resinas de microanálise EDX. Os cálculos foram feitos a partir das áreas obtidas dos elementos, nomeadamente do elemento nitrogênio, obtido em resinas com os ligantes imobilizados comparativamente a resinas sem os ligantes imobilizados. Os dados da contagem de N permitem uma avaliação qualitativa do procedimento de imobilização (por comparação com a resina inicial), bem como a avaliação quantitativa da razão da densidade do ligante nas resinas de arginina e di-arginina. No entanto, como é um ensaio destrutivo, a densidade real do ligante não pode ser obtida através desta técnica.

4.2.7 IMOBILIZAÇÃO DOS LIGANTES EM COLUNAS MONOLÍTICAS

Os aminoácidos de arginina (Sigma Aldrich), bem como os peptídeos de di-arginina e tri-arginina sintetizados comercialmente (FastBio, Brasil) foram imobilizados em monolitos CIM® Epóxi (1 mL, poros de 1,3 μm , 33 mm de espessura e 12 mm de diâmetro) (BIA Separations, Eslovênia), de acordo com o protocolo de imobilização fornecido pelo fabricante. A imobilização ocorreu via ligação covalente entre os grupos epóxi das resinas e grupos amina dos ligantes. Para isso, preparou-se uma solução de cerca de 400 μM do respectivo ligante a imobilizar, em 0,5 M NaHCO_3 (pH 8,0), ajustou-se o pH para 11,5 por de uma solução de 5 M NaOH, e adicionou-se 1,5 mL de etanol. Cada monolito foi lavado com esta solução (cerca de 0,1 mL por mL de coluna), e mantido em solução por 48 horas a 65°C. Após modificação, para desativação dos grupos epoxi remanescentes, a coluna foi lavada com 20 volumes de coluna (CV) de etanol 20%, seguida de uma lavagem com 10 CV de água e posteriormente com uma solução 0,1 M de mercaptoetanol, em que foi mantida por 12 horas a 30°C. No final, os monolitos foram lavados com água e mantidos em etanol 20% de modo a evitar contaminações por agentes microbiológicos.

4.2.8 ESTUDOS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

Soluções de plasmídeo e RNA pré-purificadas e de concentrações conhecidas foram preparadas em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA, a diferentes valores de Ph (6,0; 7,0; 8,0 e 9,0). Volumes de 0,5 mL das soluções purificadas de pDNA e RNA foram então colocadas em contato com 25 µL de resina agarose-arginina ou agarose-(di-arginina) em tubos eppendorf de 2 mL. A suspensão foi incubada e agitada por 5 horas a 25°C a velocidade branda e constante em um homogeneizador de sangue, tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido. As concentrações de equilíbrio do pDNA e RNA foram determinadas por absorbância a 260 nm (1 unidade de absorbância sendo equivalente a 50 µg/mL pDNA ou 40 µg/mL RNA, para um caminho ótico de 1 cm). A quantidade de pDNA e RNA adsorvidas foi calculada por de um balanço de massa à solução, antes e depois do equilíbrio. Os parâmetros dos modelos de Langmuir (Equação 1) e Freundlich (Equação 2) foram ajustados aos dados experimentais. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A capacidade máxima de adsorção ($q_{máx}$) e a constante de associação (K_A), bem como as constantes de Freundlich (K_f e n), para cada conjunto de condições testadas, foram obtidas a partir do melhor ajuste dos parâmetros a partir dos dados experimentais. Este ajuste foi realizado utilizando os algoritmos Levenberg Marquard e Distância Ortogonal, para os modelos de Langmuir (Equação 1) e Freundlich (Equação 2), respectivamente, implementadas no programa OriginPro versão 8.0 (OriginLab, EUA).

$$q = q_{máx} K_A \frac{C}{1 + K_A C} \quad \text{Equação 1 – Equação referente ao modelo de Langmuir.}$$

$$q = K_f C^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 2 – Equação referente ao modelo de Freundlich.}$$

4.2.9 CROMATOGRAFIA EM RESINAS DE AGAROSE

Para os estudos de adsorção em coluna, a coluna Tricorn de 5 mm de diâmetro interno e 5 cm de altura (GE Healthcare, Suécia), foi separadamente empacotada com 0,75 mL de resina de agarose em que foram imobilizados os ligantes de arginina ou di-arginina. As colunas foram então conectadas ao sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Suécia). Em cada corrida, as colunas foram primeiramente equilibradas com o tampão de adsorção (20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA pH 7,0 ou 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA pH 8,0), utilizando uma vazão de 0,25 mL/min. Posteriormente, foram injetados na coluna 4,5 mL de amostra (de soluções purificadas de pDNA/RNA ou lisado clarificado após concentração com isopropanol, previamente diluídas no tampão de adsorção). Após eluição das espécies não adsorvidas, por meio de um passo de lavagem com o respetivo tampão de adsorção (20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA pH 7,0 ou 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA pH 8,0), as espécies adsorvidas foram eluídas com a utilização de solução 1 mol/L NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA no valor de pH correspondente ao valor da corrida (7,0 ou 8,0). Frações de 0,75 mL foram coletadas ao longo das corridas. Todas as corridas foram realizadas a temperatura ambiente e a absorbância foi monitorada a 260 nm. Após cada corrida cromatográfica, as colunas foram regeneradas com 0,1 M NaOH e o sistema cromatográfico foi lavado com água.

4.2.10 CROMATOGRAFIA EM RESINAS MONOLÍTICAS

As corridas cromatográficas em resinas monolíticas foram realizadas utilizando um sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Suécia) com o sistema de controle Unicorn versão 5.11. Para os estudos de adsorção, cada coluna monolítica contendo arginina, di-arginina ou tri-arginina imobilizada foi primeiro equilibrada cinco volumes de coluna com o tampão de adsorção 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0), a um vazão de 1,0 mL/min. Após isso, foram injetados 200 µL de uma amostra purificada de pVAX1-GFP (0,05 mg/mL) diluída

no tampão de adsorção. Após a lavagem com cinco volumes de coluna do tampão de adsorção, foi realizado um gradiente linear (10 volumes de coluna) com 1 mol/L NaCl em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). Para a separação de pVAX1-GFP do lisado celular, injectou-se 1,0 mL de amostra de lisado clarificado dessalinizado, utilizando o tampão nas condições de adsorção adequadas. Após lavagem das espécies não retidas com 10 volumes de coluna do tampão de adsorção, as biomoléculas adsorvidas foram eluídas por meio de um gradiente de concentrações crescentes de NaCl em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0) a 1 mL/min até uma concentração final de 1 mol/L NaCl. No final de cada operação cromatográfica, foi realizado um último passo de eluição com 1 mol/L de NaCl para garantir a eluição completa de todas as espécies ligadas. As frações correspondentes a cada pico foram coletadas para posterior análise e quantificação em termos de pDNA, bem como as respectivas impurezas (RNA, proteínas, endotoxinas e gDNA). Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e a absorbância foi continuamente monitorada a 260 nm. Após as corridas cromatográficas, as colunas foram regeneradas com NaOH 0,1 M e o sistema cromatográfico foi lavado com água.

4.2.11 DETERMINAÇÃO DAS CAPACIDADES DE LIGAÇÃO DINÂMICA

Para avaliar e comparar a capacidade de ligação dinâmica das resinas de agarose-arginina e di-arginina para as moléculas de DNA plasmidial e RNA, as colunas contendo as resinas foram primeiramente acopladas ao sistema AKTA Purifier. Os ensaios foram realizados a um vazão de 0,25 mL/min, com soluções de pDNA e RNA pré-purificadas com concentrações de 0,05 e 0,10 mg/mL, respectivamente (seção 4.2.4 e 4.2.5). Cada coluna com o respectiva resina foi equilibrada com 20 mmol/L de Tris-HCl e 10mmol/L de EDTA (pH 7,0 ou 8,0) e, posteriormente, as colunas foram carregadas com as soluções de pDNA ou RNA sob as mesmas condições de equilíbrio, de modo a favorecer a adsorção destes ácidos nucleicos. A determinação de capacidade de ligação dinâmica foi realizada pela monitoração do ponto de rompimento das curvas (via absorbância a 260 nm), calculando-se então a quantidade de pDNA ou RNA ligado por mililitro

de suporte a 10% da curva ruptura. As corridas cromatográficas para a análise da capacidade de adsorção dinâmica foram realizadas em duplicata (independentes), e esses valores foram calculados subtraindo-se o valor obtido em condições de não adsorção. A condição de não adsorção foi definida como um experimento controle utilizado para buscar quantificar a interação entre a resina (sem os ligantes) com os ácidos nucleicos. Para isso, foi preparada uma resina controle em que os grupos epóxi iniciais da resina foram diretamente desativados (bloqueados) com uma solução de Tris-HCl. Esta resina controle foi então utilizada no cálculo das capacidades de adsorção dinâmica, cujos valores de capacidade encontrados neste caso foram subtraídos aos valores encontrados para as resinas com arginina e di-arginina imobilizadas. Os valores obtidos usando estas “condições de não adsorção” foram consistentemente muito baixos, provando que a resina em si, apresenta uma capacidade quase nula para a adsorção de ácidos nucleicos. No final, a eluição de pDNA e RNA foi realizada aumentando-se a força iônica através da aplicação de uma solução de 1 mol/L NaCl em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 7,0 ou 8,0).

As capacidades de adsorção dinâmica das três colunas monolíticas funcionalizadas foram obtidas realizando-se as experiências no sistema AKTA. Os ensaios foram realizados utilizando-se amostras pré-purificadas de pVAX1-GFP (0,05 mg/mL) solubilizadas em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e EDTA 10 mmol/L (pH 8,0), a um vazão de 1 mL/min. Em todos os casos, o valor da capacidade de adsorção dinâmica foi avaliado por meio das curvas de *breakthrough* a 10% e 50% do valor da capacidade total, valores esses que foram calculados subtraindo-se o valor obtido através de condições de não ligação na mesma percentagem de ruptura. A eluição das espécies ligadas aos resinas foi realizada através de 1 mol/L NaCl em tampão 20 mmol/L e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). Em ambos os casos, ao final, as resinas foram limpas e regeneradas com uma solução de 0,1 mol/L NaOH e o sistema cromatográfico foi lavado com água.

4.2.11 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DO DNA PLASMIDIAL E RNA

As distribuições de tamanhos do pDNA e RNA foi medida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) em amostras diluídas no respectivo tampão de análise a 25°C. As medições foram feitas em duplicata a partir de concentrações finais de amostras de 100 e 200 µg/mL, respetivamente, para o pDNA e RNA. O equipamento utilizado foi o Zeta Plus - Zeta Potential Analyzer, (Brookhaven Instruments Co. EUA). Utilizou-se uma cubeta padrão de poliestireno, de secção transversal quadrada de 1 cm x 1 cm. O volume de amostra necessário para medida foi de 1,5 ml. O tempo de equilíbrio foi o padrão dado pelo método de medida da máquina, que registra uma medida após um número estável de medidas.

4.2.13 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E PUREZA DE DNA PLASMIDIAL E RNA EM FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Soluções e amostras de pDNA e RNA utilizadas e resultantes dos ensaios com as resinas cromatográficas foram analisadas utilizando-se o método descrito por Gomes e colaboradores (2009). Uma coluna HIC 15 Source PHE PE foi conectada a um sistema ÄKTA Purifier e equilibrada com 1,5 M (NH₄)₂SO₄ em 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0), em que 20 µL de amostra, devidamente diluída no tampão de equilíbrio, foi injetada e eluída a 1 mL/min. Depois de 4 min, o tampão de eluição foi instantaneamente trocado para 20 Mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), sem sulfato de amônio. A condição de eluição foi mantida por 6 min para que as espécies retidas fossem eluídas completamente. As amostras foram analisadas em duplicata e, ao final, a coluna foi reequilibrada por 10 min com o tampão de equilíbrio para a preparação da coluna para a próxima corrida cromatográfica (GOMES et al., 2009). A absorbância foi monitorada a 260nm e as concentrações de pDNA e RNA foram calculadas utilizando-se a curva de calibração construída utilizando as amostras padrão (purificadas segundo a seção 4.2.4 e seção 4.2.5).

Para avaliação da pureza, homogeneidade e rendimento de pDNA, nos ensaios com as corridas monolíticas, foi realizada recorrendo-se a um método de quantificação modificado utilizando a coluna CIMac™ pDNA analytical column, conectada a um sistema ÄKTA Purifier e equilibrada com 0,3 mol/L NaCl em 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0), em que 20 µL de amostra, devidamente diluída no tampão de equilíbrio, foi injetada e eluída a 1 mL/min (SOUSA et al. 2014).

Em ambos os casos, pela área dos picos de solução injetada purificada foi possível construir uma curva de calibração de concentrações na faixa de 2,5 a 100 µg/mL, relacionando a concentração de plasmídeo com a sua área. O rendimento foi calculado pela razão entre a concentração do pDNA da amostra purificada e na amostra de lisado, enquanto que a pureza foi calculada pela razão entre a área do pico de sc pDNA e a soma das áreas dos restantes picos presentes no cromatograma analítico. O fator de purificação foi calculado pela razão da concentração da amostra inicial e final.

4.2.14 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As frações coletadas em cada corrida cromatográfica foram analisadas em uma unidade de eletroforese horizontal utilizando um gel de agarose 0,8%, corado pelo reagente “green safe”. A corrida de eletroforese foi realizada a 100 V, durante 50 min com o tampão TAE (40 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L CH₃COOH e 1 mmol/L EDTA (pH 8,0)). O gel foi analisado por luz ultravioleta (transiluminador) e o marcador molecular utilizado foi de 1 Kb.

4.2.15 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada utilizando-se o kit micro-BCA (ácido bicinonínico) da Pierce (Rockford, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Nesta técnica, 50 µL de cada amostra foram adicionados a 200 µL de reagente BCA (fornecido pelo fabricante) em uma microplaca. Após 30 min de incubação a 60°C, a absorbância foi medida a 595

nm em um leitor de microplacas. As amostras foram analisadas em duplicata e uma curva de calibração foi construída na faixa de concentrações de 0,01 a 0,1 mg/mL, utilizando albumina de soro bovino como padrão proteico. A concentração de proteínas nas amostras foi também realizada utilizando-se o protocolo de micro ensaio de Bradford (Pierce, EUA).

4.2.16 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINAS

A concentração de endotoxinas presente em amostras foi realizada usando o kit ToxinSensor™ Chromogenic Limulus Ameobocyte Lysate (GenScript, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Duas curvas de calibração foram construídas a partir da solução padrão de concentração de 10 EU/mL fornecida pelo kit, fazendo diluições sucessivas de modo a atingir a faixa de concentrações de 0,01 a 0,1 EU/mL e 0,1 a 1 EU/mL.

4.2.17 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As medições de concentração de DNA genômico (gDNA) foram realizadas por meio da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real, como descrito por Martins e colaboradores (2003) (MARTINS et al., 2003). Sequências iniciadoras (“primers”) senso (5’ACACGGTCCAGAACTCCTACG3’) e anti-senso (5’GCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCA 3’) foram usadas para amplificar um fragmento de 181 pb do gene de rRNA 16S presente no genoma bacteriano. A amplificação gênica foi quantificada pela diferença de fluorescência apresentada a cada ciclo (Tabela 3) pelo fluorocromo “Syber Green” contido no “Master mix”. A curva de calibração foi construída utilizando-se diferentes concentrações (0,005-50 ng/μL) de DNA genômico de *E. coli* DH10b ou DH5α, previamente purificadas por meio do kit de purificação gDNA (Wizard; Promega).

Tabela 3 – Ciclos utilizados na reação de PCR.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Número de repetições do ciclo
50	120	1
95	600	1
95	10	35
65	30	
72	10	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo encontram-se descritos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como discussões objetivando explicar os fenômenos ocorridos e, quando possível, comparar tais resultados com os descritos na literatura.

Este trabalho encontra-se dividido em três etapas: a primeira pretendeu estudar o equilíbrio do fenômeno de adsorção de DNA plasmidial, bem como da interação da sua principal impureza de processo (RNA) em ligantes baseados no aminoácido arginina imobilizados em resinas de agarose previamente ativada (Epoxy-activated Sepharose 6B, GE Healthcare, EUA). Este estudo permitiu comparar e reunir informações preliminares sobre os mecanismos de adsorção de pDNA e RNA para um conjunto de condições testadas.

A segunda parte do trabalho foi baseada no trabalho recentemente publicado pela esta autora no jornal *“Separation and Purification Technology”*, intitulado *“Arginine and di-arginine ligands for plasmid DNA purification using negative chromatography”* (CARDOSO et al., 2018a). O trabalho foi desenvolvido com as mesmas resinas utilizadas nos estudos de equilíbrio de adsorção, porém em condições de empacotamento, e foi comparado o desempenho destas resinas em termos de capacidade e seletividade para o pDNA. Desta forma, foi proposto o uso destas resinas para um passo purificação de pDNA por uma estratégia de cromatografia em modo negativo, a partir de um lisado clarificado, após concentração com isopropanol.

A terceira parte do trabalho fundamentou-se na recente publicação da autora no *“Journal of Chromatography B”* com o título *“Arginine homopeptides for plasmid DNA purification using monolithic supports”* (CARDOSO et al., 2018b). Este estudo pretendeu verificar o potencial da variação do tamanho dos homopeptídeos baseados no aminoácido de arginina e imobilizados em resinas monolíticas, na captura e purificação da isoforma superenovelada de plasmídeo a partir de lisados de *E. coli*. Particularmente, as colunas monolíticas modificadas com arginina, di-arginina e tri-arginina foram caracterizadas com

relação à funcionalização, habilidade de interagir com o pDNA e capacidades de ligação dinâmica. A seletividade obtida por estas resinas também foi avaliada pelo monitoramento das impurezas remanescentes contidas na amostra purificada diretamente de um lisado celular.

5.1 ESTUDOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA

A adsorção isotérmica aparece como uma relação empírica utilizada para prever a quantidade de adsorbato que pode ser adsorvido por camada de adsorvente, mostrando a distribuição do adsorbato entre as fases líquida e sólida nas várias concentrações de equilíbrio (CHEN, 2015). Neste sentido, estudos em batelada conseguem fornecer informações termodinâmicas sobre a interação da biomolécula com a respectiva resina, permitindo a triagem de uma gama ampla de condições com pequenas quantidades de produto. Para isso, equações isotérmicas analíticas, como os modelos de Langmuir e Freundlich, são amplamente utilizadas para modelar dados de adsorção de biomoléculas (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000; MAVROPOULOS et al., 2011). As regressões de isotermas não-lineares são frequentemente realizadas uma vez que fornecem uma estimativa de parâmetros, sem que para isso seja necessário transformar o conjunto de dados experimentais. Desta forma, as distorções observadas resultam diretamente da distribuição original do erro (BELHACHEMI; ADDOUN, 2011).

O pH é um dos parâmetros principais a se ter em conta no controle de processos de adsorção, podendo induzir grandes variações na capacidade de bioadsorção das resinas cromatográficas (BICHO et al., 2014). Neste trabalho, o efeito da variação do pH na adsorção de moléculas de pDNA e RNA em ligantes de arginina foi estudado. As isotermas de adsorção foram analisadas de acordo com as expressões não lineares das isotermas de Langmuir e Freundlich. Desta forma, quatro conjuntos de dados de isotermas obtidas a diferentes valores de pH (6,0; 7,0; 8,0 e 9,0) foram ajustados aos modelos de Langmuir e Freundlich, apresentadas neste trabalho como Equações 1 e 2 (seção 4.2.8). Os resultados obtidos pelo ajuste dos modelos de dois parâmetros para as moléculas de pDNA e RNA encontram-se representados na Figura 6 e na Figura 7, respectivamente.

Figura 6 - Dados de equilíbrio de adsorção aos quais foram ajustados os modelos de Langmuir (- - -) e Freundlich (.....) do sistema pDNA-arginina imobilizada em agarose, para as várias condições de pH testadas em 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA: A (pH 6,0), B (pH 7,0), C (pH 8,0) e D (pH 9,0).

Figura 7 – Dados de equilíbrio de adsorção aos quais foram ajustados os modelos de Langmuir (- -) e Freundlich (.....) do sistema RNA-arginina imobilizada em agarose, para as várias condições de pH testadas em 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA: A (pH 6,0), B (pH 7,0), C (pH 8,0) e D (pH 9,0).

Como pode ser observado para as curvas ajustadas para a adsorção de pDNA ou RNA em arginina imobilizada em agarose, verifica-se um ajuste suficientemente próximo dos modelos aos pontos experimentais que podem ser representados por isothermas do mesmo tipo. Nota-se neste caso que as variações dos valores de capacidade máxima ($q_{\text{máx}}$), evidenciados pelas barras de erro verticais (Figura 6 e 7), tornam-se mais significativas para o caso do DNA plasmidial, que apresenta valores de capacidade mais baixos, e portanto, uma escala menor no eixo das ordenadas. Em geral, as curvas são caracterizadas por um grande aumento na quantidade adsorvida (em baixas concentrações), seguido por um patamar constante quando as concentrações são maiores, especialmente no caso de pDNA. Essas isothermas são consideradas favoráveis, ou seja, apresentam um acento não linear e côncavo com relação ao eixo das abscissas. As isothermas favoráveis geralmente indicam capacidades de adsorção mais altas em concentrações de adsorbatos mais baixas em comparação com as lineares (representadas tendencialmente por uma linha constante). Além disso, quando em condições de empacotamento, as resinas que apresentam isothermas desfavoráveis ou lineares tendem a ser associadas à maior dispersão axial, levando a efeitos de ampliação das curvas de ruptura (CUSSLER, 1997).

O modelo de Langmuir assume um processo de adsorção monocamada em uma superfície, que contém um número finito de locais de adsorção, admitindo que não há adsorção de "migração" ao longo da superfície. O modelo prevê um valor máximo para a capacidade de adsorção por unidade de massa ou de volume de adsorvente, $q_{\text{máx}}$, e a constante de Langmuir, K_A , indica a afinidade entre o soluto e o adsorvente (SPOSITO, 2008). Em contrapartida, o modelo de Freundlich é um modelo empírico que admite um processo multicamada no qual a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa adsorvente aumenta gradualmente em uma superfície não homogênea. A isoterma de Freundlich é função de dois parâmetros, K_f e o expoente $1/n$ (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000). Segundo Sposito (1989), o parâmetro K_f é chamado de coeficiente de adsorção de Freundlich, que está relacionado à adsorção da molécula na resina, e o valor de n é qualitativamente relacionado à distribuição de locais energéticos nos poros da resina (SPOSITO, 2008).

Os valores dos parâmetros das isotermas ajustadas para cada conjunto de dados de intervalo de pH estão representados nas Tabelas 4 e 5 para moléculas de pDNA e RNA, respectivamente. O ajuste de cada modelo foi testado determinando-se o respectivo coeficiente de correlação (R^2) como medida da precisão dos dados, e o desvio médio ponderado quadrático (ou estatística qui-quadrado (χ^2)) foi utilizado para predizer a exatidão do ajuste.

Tabela 4 – Parâmetros de Langmuir e Freundlich do sistema pDNA-arginina imobilizada em agarose ajustados por regressão não linear para as várias condições de pH testadas em 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA: A (pH 6,0), B (pH 7,0), C (pH 8,0) e D (pH 9,0).

Modelo	Parâmetros	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
Langmuir	$q_{\text{máx}}$ (mg/mL resina)	$0,509 \pm 4,71\text{E-}02$	$0,519 \pm 3,53\text{E-}02$	$0,565 \pm 3,31\text{E-}02$	$0,326 \pm 3,24\text{E-}02$
	K_A (mL/ μ g)	$1,15 \pm 1,44$	$6,23 \pm 4,98$	$0,408 \pm 0,150$	$9,68\text{E-}02 \pm 3,77\text{E-}02$
	R^2	0,924	0,836	0,939	0,975
	χ^2	$1,03\text{E-}02$	$8,83\text{E-}03$	$4,74\text{E-}03$	$9,60\text{E-}04$
Freundlich	K_f	$0,356 \pm 1,28\text{E-}02$	$0,368 \pm 1,93\text{E-}02$	$0,243 \pm 2,16\text{E-}02$	$7,55\text{E-}02 \pm 9,31\text{E-}03$
	n	$11,3 \pm 1,24$	$9,76 \pm 1,40$	$4,93 \pm 0,564$	$3,25 \pm 0,319$
	R^2	0,983	0,944	0,980	0,996
	χ^2	$3,91\text{E-}04$	$1,13\text{E-}03$	$1,56\text{E-}03$	$2,89\text{E-}04$

No caso da adsorção de DNA plasmidial (Figura 6), o comportamento das isotermas indica uma aproximação para o valor máximo da capacidade de adsorção para valores de concentração de equilíbrio mais altos, típicos do modelo de Langmuir. Assumindo plasmídeos como moléculas de grandes dimensões e ramificadas, podemos esperar a sua exclusão dos poros das partículas por um lado, e pelo outro, pelas próprias moléculas de plasmídeo já adsorvidas (PRAZERES, 2011), saturando mais rapidamente a coluna, acabando por adiantar esse patamar máximo de capacidade típico.

Tabela 5 – Parâmetros de Langmuir e Freundlich do sistema RNA-arginina imobilizada em agarose ajustados por regressão não linear para as várias condições de pH testadas em 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA: A (pH 6,0), B (pH 7,0), C (pH 8,0) e D (pH 9,0).

Modelo	Parâmetros	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
Langmuir	$q_{\max}$ (mg/mL resina)	8,88 ± 1,12	9,50 ± 0,781	10,9 ± 0,720	134 ± 1510
	K_A (mL/μg)	2,40E-02 ± 7,46E-03	3,79E-02 ± 7,96E-03	3,95E-02 ± 5,85E-03	4,23E-05 ± 4,78E-04
	R^2	0,959	0,982	0,988	0,996
	χ^2	0,479	0,292	0,184	2,19E-03
	K_f	0,861 ± 9,62E-02	0,890 ± 9,77E-02	0,956 ± 0,110	0,00475 ± 0,00168
Freundlich	n	2,42 ± 0,165	2,11 ± 0,120	2,00 ± 0,122	0,968 ± 0,062
	R^2	0,985	0,988	0,982	0,996
	χ^2	9,18E-02	0,134	0,197	2,12E-03

Como inconveniente, o modelo de Langmuir assume os solutos como objetos pontuais, em que cada molécula se liga a um ligante (CHEN, 2015). Na verdade, a distribuição de cargas no pDNA, ao contrário das proteínas que às vezes têm suas cargas localizadas em domínios espaciais da molécula de acesso desigual, é uniformemente distribuída por toda a molécula, podendo promover a interação entre as próprias moléculas de pDNA adsorvidas (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000). Na Tabela 4, podemos concluir que esse desvio da idealidade é superado pela isoterma de Freundlich, cujo ajuste apresentou valores de R^2 mais elevados, e valores de χ^2 menores, apresentando-se como um modelo mais preciso e exato para representar o conjunto de dados do pDNA.

Por outro lado, olhando para o ajuste do conjunto de dados obtidos para o RNA, e apesar dos elevados valores de R^2 obtidos por meio de ambos os modelos ajustados, o erro associado ao ajuste de Langmuir, sinalizado pelos altos valores de χ^2 , mostra que o modelo não é suficientemente eficaz em representar os dados para moléculas de RNA (Tabela 5). As maiores variações estruturais manifestadas no RNA e heterogeneidade desta amostra, comparadas ao DNA, tornam a análise do mecanismo de adsorção dessas moléculas mais complexa. O RNA pode apresentar superfícies altamente variáveis, estruturas variáveis e

tamanhos diferentes no mesmo microrganismo, que adicionam uma possível diversidade de interações (LUSTIG; ARORA; JERNIGAN, 1997), promovendo uma adsorção irregular. A heterogeneidade de RNA que é encontrada em *E. coli* é consideravelmente alta, podendo existir o mRNA (RNA mensageiro), os três componentes de RNA dos ribossomos (rRNA 5S, 16S e 23S), e o tRNA (RNA de transferência). Moléculas como mRNA, 23S rRNA e 16rRNA são especialmente maiores, mostrando massas na faixa de 500-1000 pb, enquanto que o tRNA (o mais abundante) tem um tamanho médio comparável com proteínas de *E. coli*. O lisado, após purificação primária e intermediária, é majoritariamente composto por esse RNA de baixa massa molecular, ainda assim apresentando-se como uma mistura heterogênea de moléculas de variados tamanhos (PRAZERES, 2011).

Na realidade, o pDNA, pelas grandes dimensões, interage com mais de um ligante, interferindo no acesso a muitos outros ligantes ao redor, que não podem mais ser usados no processo de ligação. Consequentemente, a capacidade máxima de ligação deve ser altamente dependente dos locais de ligação finitos na área de superfície externa do meio (MÜLLER, 2005). Em vez disso, o RNA é uma molécula de cadeia simples e a ligação também ocorre dentro dos poros e, ao contrário da molécula de pDNA, não deve depender apenas da superfície externa (PRAZERES, 2011). Os dados referentes às moléculas de RNA apresentam, portanto, desvios mais elevados com relação ao modelo de Langmuir, não assumindo monocamada nem um valor máximo de capacidade típico na faixa de concentração estudada. Por último, o comportamento da isoterma de RNA a um valor de pH 9,0, no qual a adsorção está diretamente dependente (de forma linear) da concentração de adsorbato em solução, indica que o processo de adsorção é dependente de um processo químico, e os parâmetros ajustados pelas isotermas não têm sentido físico nesse caso (ROUQUEROL; ROUQUEROL, 2013). Pensa-se que a justificativa passe pela perda de ionização dos ions em solução fornecidos pelo tampão Tris, que teriam um efeito estabilizador na molécula de ácido nucleico, mais notório no RNA. O valor do pKa do Tris é aproximadamente 8,1, o que significa que a partir deste valor, estas moléculas não se encontram mais positivamente carregadas em solução, deixando de ter um papel estabilizador no efeito de repulsão entre

cargas, intra e inter moléculas, nomeadamente na sua estrutura conformacional. No final, e além de tudo, é importante considerar também que algumas das dispersões observadas em ambos os casos poderão ser atribuídas a erros experimentais durante a quantificação de soluções por espectroscopia a 260 nm, principalmente na medição de baixas concentrações.

Com relação aos parâmetros ajustados $q_{\text{máx}}$ e K_f , ambos diretamente relacionados com a capacidade de adsorção das resinas, os ligantes de arginina imobilizados em agarose apresentaram valores de capacidade de adsorção notavelmente superiores para o RNA, comparado aos valores para o pDNA como podemos observar na Tabela 4 e 5. Como mencionado anteriormente, o caráter de fita simples do RNA comparado à estrutura de fita dupla do DNA plasmidial, em princípio requer um volume menor para sua ligação à matriz em comparação com as moléculas de pDNA. Por outro lado, alguns estudos revelaram que as moléculas de RNA podem apresentar características adicionais que facilitam seu reconhecimento por proteínas e aminoácidos, como o maior conteúdo de pares de bases G.U. o que permite uma vasta diversidade de interações. O RNA também pode estar presente em várias estruturas possíveis, podendo inclusive apresentar alças que podem interagir com aminoácidos (LUSTIG; ARORA; JERNIGAN, 1997).

Em geral, olhando para o parâmetro resultante do ajuste de Freundlich, que melhor descreve os dados de adsorção para o pDNA, com os menores erros associados, podemos observar uma capacidade semelhante na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, seguido por uma queda no pH 9,0 (Tabela 4). Em uma primeira análise, poderia pensar-se no efeito direto do pH sobre o próprio aminoácido, em que maiores retenções de pDNA seriam esperadas a valores pH mais baixos, uma vez que o valor de pKa do grupo guanidínio do aminoácido arginina é 12 (KIM et al., 2013). Por essa razão, um pH de adsorção menor poderia aumentar a eficácia das cargas positivas de arginina, permitindo uma interação mais forte com o pDNA, enquanto um pH mais alto poderia levar a uma interação deficiente (como é o caso de pH 9,0). Coincidentemente, para ambas as moléculas observamos uma diminuição na “afinidade” mostrada pelo decréscimo do parâmetro de Freundlich n quando o pH é elevado, que poderia resultar desse efeito. A equação de Henderson-Hasselbalch pode ser usada para calcular como

as cargas de aminoácidos de uma determinada proteína respondem a mudanças no pH em uma solução (MOORE, 1985). Na verdade, se calcularmos o número real de cargas da molécula a um determinado valor da matriz, na faixa de pH testada, há uma perda de apenas 1% das cargas quando alteramos o pH de 6,0 para 9,0. Por isso, será razoável pensar que alguma mudança conformacional nas moléculas possa estar mais relacionada com essa mudança nos valores de capacidade do que a efetividade das cargas em si. De fato, verifica-se a tendência inversa de variação do valor da capacidade máxima, mostrada principalmente pelo parâmetro de Freundlich K_f com o aumento do valor de pH para as moléculas de RNA (Tabela 5), provando que o processo de adsorção também pode depender das grandes diferenças estruturais manifestadas pelo RNA, tornando este estudo mais complexo.

Por forma a verificar as mudanças estruturais manifestadas pelas moléculas de pDNA e RNA, as respectivas variações do diâmetro hidrodinâmico médio foram medidas pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Essas medições foram realizadas para cada valor de pH estudado, com o objetivo de quantificar o impacto do pH em suas estruturas individuais. Os valores do diâmetro médio medidos em cada valor de pH para cada molécula, estão representados na Tabela 6. Essas tendências resultantes também se encontram evidenciadas graficamente na Figura 8.

Tabela 6 – Diâmetro médio (nm) das moléculas de pDNA e RNA determinado por soluções de de concentração 100 µg/mL e 200 µg/mL, respetivamente em tampão 20 mmol/L Tris 10 Mmol/L EDTA para as várias condições de pH testadas (pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; e pH 9,0), com os respetivos valores de desvio padrão, assim como os valores do índice de polidispersividade (PDI) das amostras fornecidos pelo software utilizado.

pH	pDNA		RNA	
	Diâmetro médio (nm)	Polidispersividade (PDI)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersividade (PDI)
6,0	93,6 ± 2,83	0,302	311 ± 25,7	0,445
7,0	103 ± 3,61	0,258	248 ± 16,5	0,351
8,0	111 ± 2,97	0,276	195 ± 7,80	0,368
9,0	118 ± 6,43	0,245	177 ± 18,5	0,384

Figura 8 – Variação do diâmetro médio (nm) das moléculas de pDNA e RNA determinado por soluções de de concentração 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente em tampão 20 mmol/L Tris 10 Mmol/L EDTA para as várias condições de pH testadas (pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; e pH 9,0), com os respectivos valores de desvio padrão, assim como os valores do índice de polidispersividade (PDI) das amostras fornecidos pelo software utilizado.

Se olharmos para as resinas convencionais de agarose, a limitação da capacidade de ligação dos ácidos nucleicos é normalmente associada ao tamanho do poro ou a área da superfície (MÜLLER, 2005). Consequentemente, a capacidade de ligação para pDNA e RNA é altamente dependente de seu arranjo estérico individual. Como podemos observar (Tabela 6 e Figura 8), ambas as moléculas sofrem grandes impactos em sua estrutura individual com a variação de pH. Neste caso, observamos tendências opostas deste efeito para as moléculas de plasmídeo e RNA.

No caso de moléculas de pDNA, alguns estudos mostraram como o superenovelamento afeta a sua acessibilidade pelo adsorbato (IROBALIEVA et al., 2015; LAMARR et al., 1998). Desta forma, com algumas modificações nos parâmetros de força iônica ou pH do solvente, as moléculas podem ter uma estrutura mais ou menos aberta, resultando em alterações na disponibilidade das moléculas para formação de ligações com o adsorbato, como eletrostáticas ou resultantes de pontes de hidrogênio (ONGKUDON; DANQUAH, 2011). Além disso, as interações intermoleculares, ou seja, interações entre as macromoléculas de pDNA adsorvidas, também poderão ser afetadas por essa alteração na conformação. De novo, à medida que o valor de pH aumenta, o

maior tamanho evidenciado pelas moléculas de pDNA pode diminuir essas possíveis interações, na medida em que possuem uma estrutura mais fechada, que é menos disponível para interações entre moléculas adsorvidas (KRAJNC et al., 2011).

Embora a tendência de tamanho manifestada pelo RNA seja oposta à apresentada para os plasmídeos, a propensão de aumentar o efeito da capacidade com estruturas maiores e mais abertas é mantida. O efeito do pH no tamanho e na estrutura do RNA é mais delicado, devido à maior polidispersividade demonstrada por esse tipo de amostra (Tabela 6). Além disso, a amostra mostrou ser altamente heterogênea, portanto, o valor do diâmetro médio apresentado resulta da média ponderada de três populações distintas que seguem uma variação de tendência similar (dados não mostrados). A flexibilidade evidenciada pelas estruturas de pDNA e RNA parece ser também uma consequência da interação com o solvente, isto é, água e contra-íons. A distribuição desigual das ranhuras manifestadas pelo RNA bem como a presença de grupo hidroxila extra em cada molécula, comparativamente às moléculas de pDNA, aumenta o número de moléculas de água que circundam as moléculas de RNA que apresentam diferentes mapas de solvatação (NOY et al., 2004). Alguns estudos demonstraram que o diferente potencial eletrostático em torno do DNA e RNA gera uma diferente distribuição de íons ao redor das duas moléculas, tornando as moléculas de RNA melhores sítios de ligação catiônica preferenciais relativamente às moléculas de pDNA, com menores ranhuras apresentadas (AUFFINGER; WESTHOF, 2000). Esses fatos também sustentariam a teoria dos maiores efeitos sofridos pelas moléculas de RNA relativamente ao pDNA, quando os íons Tris não se encontram mais carregados positivamente em solução a pH 9,0.

5.2 ESTUDOS EM RESINAS DE AGAROSE

5.2.1 INTERAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E RNA COM OS LIGANTES DE ARGININA

Ainda que a imobilização do aminoácido arginina em resina comercial Sepharose-4B tenha sido reportada na literatura, para fins de purificação de DNA plasmidial por cromatografia em modo positivo (SOUSA et al., 2008), muitas questões a respeito de sua aplicação continuam em aberto. Por esta razão, no presente trabalho os ligantes arginina e di-arginina foram imobilizados em resinas pré ativadas Epoxy Sepharose-6B, e os seus desempenhos foram avaliados para fins de purificação de pDNA por meio de cromatografia negativa.

A primeira parte deste tópico consistiu em verificar a eficácia da interação entre o resina de arginina-agarose com os ácidos nucleicos. Os ensaios de adsorção em batelada foram realizados utilizando soluções purificadas de pDNA e RNA com concentrações iniciais de 0,05mg / mL e 0,10mg /mL, respectivamente.

A análise por eletroforese em gel de agarose do sobrenadante das amostras recuperadas da adsorção de pDNA e RNA em resinas de arginina-agarose (Figura 9) destaca uma interação efetiva entre ambos os ácidos nucleicos e a arginina quando imobilizada em resinas de agarose. Quando as moléculas de pDNA e RNA são expostas à resina imobilizada com o aminoácido (poços 5 e 6, respetivamente), verifica-se uma redução da quantidade de moléculas no sobrenadante, quando comparado com as soluções controle (poços 2, 3 e 4), contendo as mesmas soluções na ausência de resina. Além disso, constata-se diferentes “afinidades de adsorção” da arginina para as diferentes moléculas. O estudo indica que a arginina apresenta maior afinidade para a adsorção de RNA (poço 6), em que quase nenhum RNA é observado no sobrenadante, comparando com o caso do pDNA (poço 5). O maior volume das fitas com a consequente inacessibilidade aos poros da resina tende a dificultar a interação entre pDNA e a arginina, quando comparado ao RNA. Como mencionado anteriormente, a maior exposição de bases de RNA, resultado direto da sua estrutura em fita simples, poderá também facilitar contactos múltiplos, seja

interações eletrostática com a cadeia de fosfatos, seja via formação de pontes de hidrogênio (MARTINS; QUEIROZ; SOUSA, 2013). Ademais, é interessante notar que quando colocados em conjunto, o RNA inibe a interação do pDNA à resina de arginina (poço 7). O efeito de impedimento estereoquímico provavelmente dita que moléculas como RNA (de menor volume), tenham um maior e mais rápido acesso aos aminoácidos imobilizados que moléculas de maior dimensão, dificultando o acesso do pDNA à resina.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose das amostras de sobrenadante provenientes da adsorção entre o pDNA e o RNA com os ligantes de arginina-agarose, em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). Poço 1: marcador de massa molecular 1Kb; Poço 2: 0,05 mg/mL de pVAX1-GFP (controle); Poço 3: 0,10 mg/mL de RNA (controle); Poço 4: 0,05 mg/mL de pVAX1-GFP + 0,10 mg/mL de RNA (controle); Poço 5: sobrenadante de 0,05 mg/mL de pVAX1-GFP + 25 μ L arginina-agarose (após 1 h); Poço 6: sobrenadante de 0,10 mg/mL of RNA + 25 μ L arginina-agarose (após 1 h); Poço 7: sobrenadante de 0,05 mg/mL de pVAX1-GFP + 0,10 mg/mL de RNA + 25 μ L arginina-agarose (após 1 h)).

De fato, as moléculas de DNA plasmidial, quando confrontadas com este tipo de resinas de adsorção, sofrem limitações de transferência de massa e de acessibilidade, sendo fisicamente impedidas de entrar na maioria dos poros (PRAZERES, 2011). Contrariamente, a fita simples associada às moléculas de

RNA facilita a entrada por entre os poros das resinas. Além do mais, as moléculas de RNA que surgem durante o processamento são essencialmente as de menor massa molecular, que se mantiveram intactas após a desnaturação promovida pela lise alcalina (PRAZERES, 2011).

Finalmente, a seletividade evidenciada pela adsorção diferencial entre pDNA e RNA demonstrada pelo ligante de arginina imobilizado, mostra potencial para estender o uso de resinas de arginina, tipicamente estudadas em "modo positivo", para uma nova estratégia cromatográfica em "modo negativo", como um possível passo intermediário de purificação de pDNA a partir de lisados bacterianos clarificados.

5.2.2 CAPACIDADES DINÂMICAS DE ADSORÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E RNA: LIGANTES DE ARGININA E DI-ARGININA

A capacidade dinâmica de adsorção de um soluto em uma fase estacionária é um fator crítico na fase de avaliação do desempenho de uma resina cromatográfica. Apesar da alta especificidade da arginina em ácidos nucleicos, a baixa capacidade de adsorção associada às resinas baseadas em partículas comuns de agarose é um desafio que ainda não foi solucionado. Nesse sentido, estudos envolvendo o efeito do comprimento de peptídeos de arginina sobre a afinidade de interação entre proteínas e DNA indicam que o número de argininas disponíveis para interação pode influenciar a interação desses ligantes com os grupos fosfato de ácidos nucleicos. As maiores razões N/P (nitrogênio/fosfato) poderão assim resultar em complexos mais condensados de menor tamanho (KIM et al., 2013), podendo, eventualmente, resultar em aumentos de capacidade e especificidade das resinas com ligantes de peptídeos imobilizados.

Neste contexto, foi avaliado o efeito do número de resíduos de arginina na sua ligação com os ácidos nucleicos utilizando um peptídeo de di-arginina ligado à resina de agarose. A capacidade de ligação dinâmica do suporte de di-arginina-agarose foi avaliada e comparada com a resina de arginina-agarose convencional. As curvas de ruptura foram realizadas a 0,25 mL/min, com

soluções pré-purificadas de pDNA e RNA de concentrações 0,05 mg/mL e 0,10 mg/mL, respectivamente, a valores de pH de 7,0 e 8,0. Os valores de capacidade dinâmica de adsorção encontram-se representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de capacidade dinâmica de adsorção (CLD) obtidos pelos de resinas de agarose imobilizados com as resinas de arginina de di-arginina para as moléculas de pDNA e RNA (pH 7,0 e 8,0), com os respectivos valores de desvio padrão. As curvas de ruptura foram realizadas a 0,25 mL/min, com soluções pré-purificadas de pDNA e RNA de concentrações 0,05 mg/mL e 0,10 mg/mL, respectivamente.

pH	CLD _{10%} (mg/mL)			
	pDNA		RNA	
	arginina	di-arginina	arginina	di-arginina
7,0	0,22 ± 2,83E-02	0,14 ± 4,24E-02	0,27 ± 4,24E-02	0,68 ± 2,83E-02
8,0	0,18 ± 5,66E-02	0,08 ± 4,24E-02	0,13 ± 1,4 E-02	0,19 ± 1,4 E-02

Como já referido no capítulo anterior, uma vez que os ácidos nucleicos são polímeros altamente carregados negativamente, o pH da adsorção tem um efeito significativo sobre a capacidade de adsorção, uma vez que a capacidade é altamente dependente do tamanho individual e da disposição estérica do adsorbato (ARKHANGELSKY et al., 2008; GOH; KNIGHT; BROOKS, 2013). A capacidade dinâmica de adsorção obtida para o pDNA com suporte de arginina (Tabela 7), apresentou valores semelhantes para pH 7,0 e 8,0. Esta tendência apresenta-se semelhante aos resultados obtidos anteriormente (seção 5.1), em que os ligantes de arginina-agarose mostraram valores de capacidades máximas, $q_{máx}$, muito semelhantes nesses valores de pH (7,0-8,0). Por outro lado, não se verificou qualquer vantagem na utilização de ligantes de di-arginina para adsorção de pDNA. Pelo contrário, o uso de ligantes de di-arginina causou uma redução considerável nos valores de capacidades dinâmicas apresentadas para o pDNA, para os valores de pH 7,0 e 8,0. Os valores inferiores de CLD observados quando comparados com o ligante de arginina poderão ser devidos a efeitos de impedimento estéreoquímico dentro dos poros da resina pelo aumento do tamanho do ligante causando inacessibilidade do pDNA aos poros. Segundo os resultados mostrados anteriormente (seção 5.1), o plasmídeo sofre aumento de tamanho da sua estrutura quando o pH varia de 7,0 para 8,0, sugerindo que esse impedimento estereoquímico possa ser mais significativo no caso de pH 8,0. Além disso, a resina de di-arginina apresentou uma menor

densidade de ligantes em comparação com a resina de arginina. A técnica SEM-EDX foi utilizada para fornecer a identificação elementar de cada resina antes e após a imobilização dos ligantes, como evidência da imobilização efetiva dos ligantes nas resinas pré-ativadas. A resina de arginina apresentou aproximadamente 2,3 vezes mais contagens de N por amostra analisada do que a resina de di-arginina. Este resultado mostra que o grau de imobilização das moléculas de di-arginina atingiu apenas 22% do grau de imobilização de argininas, indicando um menor número de locais de ligação disponíveis para adsorção de ácidos nucleicos.

Os resultados também indicaram que o valor de pH superior também tende a reduzir a capacidade de adsorção dinâmica das resinas quando em condição de empacotamento para a adsorção de RNA, efeito inverso ao verificado quando em solução (seção 5.1). Anteriormente, foi verificado que mudanças estruturais consideráveis (nomeadamente redução no tamanho) são verificadas com o aumento de pH para o RNA. Nessa lógica, as moléculas de RNA de menores dimensões conseguem acesso a regiões cada vez mais restritas da resina, ao contrário das moléculas de plasmídeo que encontram restrições de acessibilidade na maioria das condições. Assim, enquanto que em condições de equilíbrio as moléculas de RNA têm o tempo necessário para acessar esses sítios de ligação de mais difícil acesso na resina, em um ensaio de adsorção dinâmica essas limitações de transferência de massa poderão tornar-se mais explícitas.

Os altos valores de capacidade dinâmica de adsorção encontrados para o RNA usando-se ligantes de di-arginina (pH 7,0) indicam que a adsorção de RNA, em vez de pDNA, usando uma estratégia de cromatografia negativa, pode ser uma escolha interessante para o um processo de purificação de DNA plasmidial.

5.2.3 CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS EM MODO NEGATIVO

A ligação preferencial e as maiores capacidades apresentadas para as moléculas de RNA, encorajou o uso de ligantes de arginina em uma estratégia

de cromatografia em modo negativo. Ao contrário do modo positivo tradicional, em que a molécula alvo se liga à resina por uma interação específica e as impurezas são eluídas nos primeiros instantes da corrida cromatográfica, no modo negativo a molécula de interesse simplesmente se desloca com o fluxo sem adsorver e sem entrar nos poros, enquanto que as impurezas alvo devem difundir-se por entre os poros e ligarem-se às superfícies destes (CAMELO-NUNES et al., 2014). Neste cenário, os problemas estereoquímicos e de difusão sofridos no modo positivo tornam-se menos significativos, não importando se os plasmídeos entram ou não nos poros (PRAZERES, 2011). Na Figura 10 encontra-se esquematizado o processo de purificação de DNA plasmidial usual, utilizando cromatografia em modo positivo, em comparação com o processo utilizando o modo negativo alternativo apresentado neste trabalho.

Com o intuito de investigar melhor os fenômenos por trás deste conceito no âmbito da purificação de pDNA, foram realizados alguns estudos em coluna empacotada. O comportamento das interações em modo negativo foi avaliado através da análise do perfil de *flow-through* de corridas cromatográficas a partir de alimentações contendo misturas de pDNA e RNA (na proporção mássica de 1: 3). As eficiências das resinas de arginina e di-arginina foram comparadas. Esse procedimento de execução cromatográfica no modo negativo foi exemplificado na Figura 11, consistindo em três etapas: carregamento da amostra (fracionamento das amostras de *flow-through* recuperadas ao longo da corrida), lavagem e eluição.

Figura 10 – Representação esquemática do processo de purificação de DNA plasmidial utilizando cromatografia em modo positivo (Processo I, à esquerda) em comparação com o modo negativo proposto neste trabalho (Processo II, à direita). Processo I: fermentação, recolha celular, centrifugação, concentração por isopropanol, precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia em modo positivo (em que o pDNA sai da coluna no passo de eluição) (SOARES et al., 2013; SOUSA; QUEIROZ, 2011). Processo II: fermentação, recolha celular, centrifugação, concentração por isopropanol, cromatografia em modo negativo (em que o pDNA sai da coluna no passo de *flow-through*).

Figura 11 - Exemplificação de uma corrida cromatográfica no modo negativo utilizando a resina de arginina-agarose (pH 7,0), a 0,25 mL/min, consistindo em três etapas: carregamento da amostra (fracionamento das amostras de *flow-through* recuperadas ao longo da corrida), lavagem e eluição.

Para avaliar cuidadosamente e comparar as possíveis diferenças e fenômenos de processos de deslocamento que poderiam ocorrer ao carregar as colunas com resinas de arginina ou di-arginina, as frações recolhidas ao longo das corridas foram agrupadas e analisadas separadamente. Na Figura 12 encontra-se esquematizada a eletroforese em gel de agarose referente ao perfil cromatográfico utilizando ambas as resinas em modo negativo, a partir da injeção das amostras contendo misturas de pDNA e RNA.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose do perfil cromatográfico da purificação a partir de uma mistura pDNA/RNA em uma razão mássica de 1:3, correspondendo aproximadamente a 30 $\mu\text{g/mL}$ e 90 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA e RNA (amostra de injeção, à esquerda), utilizando as resinas de arginina (A) e di-arginina (B) imobilizadas em agarose. Fase móvel A: 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 7,0); Fase móvel B: 1 M de NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 7,0). A corrida foi realizada a 0,25 mL/min e a eluição foi promovida pela saturação da coluna, causada pela contínua injeção de 4,5 mL de amostra inicial na fase móvel A. As amostras dos passos de flow-through, lavagem and eluição estão representadas em A em B. Poço 1: *flow-through* 2-5 min, Poço 2: *flow-through* 5-8 min, Poço 3: *flow-through* 8-11 min, Poço 4: *flow-through* 11-14 min), Poço 5: *flow-through* 14-17 min, Poço 6: *flow-through* 17-20 min, Poço 7: lavagem com fase móvel, Poço 8: eluição com fase móvel B.

Pela análise do perfil cromatográfico utilizando eletroforese em gel de agarose das corridas em modo negativo a partir da injeção de misturas de pDNA/RNA em ambas as resinas (Figura 12), podemos concluir que os ligantes de di-arginina (Figura 12, B) promovem uma adsorção mais baixa das moléculas de pDNA em comparação com a resina de arginina (Figura 12, A). Este resultado pode ser explicado pelo efeito mais rápido de saturação das resinas para a adsorção de pDNA, enquanto a capacidade para adsorção de RNA é muito maior por conta do acesso a sítios no interior/poros da resina. Apesar das isotermas de adsorção terem indicado anteriormente que o pDNA tem maior afinidade pela resina que o RNA, como as moléculas de plasmídeo não competem pela maioria dos sítios (acessíveis apenas ao RNA), não existe deslocamento do RNA pelo pDNA. Deste modo, a adsorção verificada para o RNA, nomeadamente a pH 7,0, provoca a substituição do pDNA inicialmente adsorvido pelo RNA à medida que a amostra é carregada, melhorando a seletividade e o desempenho da corrida cromatográfica. Por outro lado, ambas as resinas de arginina e di-arginina apresentaram menor eficiência na purificação de pDNA em um valor de pH 8,0 (ver apêndice I). Esses efeitos refletiram-se diretamente no rendimento de

recuperação de pDNA utilizando-se as resinas de arginina e di-arginina, onde a arginina pôde recuperar aproximadamente 55% (0,24mg/mL de resina), enquanto a resina de di-arginina permitiu uma recuperação de aproximadamente 90% (0,40mg / mL de resina) do plasmídeo nas amostras de *flow-through*. Em geral, estes valores de capacidade obtidos para moléculas de DNA plasmidial em modo negativo estão na gama de outros valores da literatura proporcionados por resinas de troca aniônica convencionais em modo positivo, tais como a Q-, DEAE-Sepharose Fast Flow ou a Toyopearl DEAE-650 (URTHALER; BUCHINGER; NECINA, 2005). Como mencionado, valores de capacidade de adsorção elevados são normalmente difíceis de obter utilizando resinas de troca iônica convencionais devido à incapacidade de acomodar as moléculas grandes como plasmídeos (PRAZERES, 2011). Até onde se sabe, o único estudo demonstrando altos valores de CLD usando arginina-agarose convencional foi apresentado por Bai e colaboradores (2014) (BAI et al., 2014), que investigaram o desempenho cromatográfico de resinas de agarose baseadas em arginina sintetizadas em laboratório, alterando e otimizando as características da resina, como o comprimento do braço espaçador e, especialmente, a densidade dos ligantes. Os resultados indicaram que a otimização da densidade dos ligantes de arginina leva a valores surpreendentemente altos de CLD para adsorção de pDNA a partir de lisados celulares clarificados (6,32mg/mL de resina). Este estudo indica que os valores encontrados aqui poderiam ser ainda mais otimizados aumentando as densidades dos ligantes de arginina ou di-arginina. Finalmente, também é importante realçar que as resinas de arginina são consideradas mais do que simples trocadores aniônicos. Além das fortes interações entre o íon guanidínio da arginina e os grupos fosfato no esqueleto do DNA, alguns estudos sugerem o envolvimento do reconhecimento específico pelas moléculas de arginina, que pode levar a um aumento na resolução entre o pDNA e o RNA durante a purificação (BAI et al., 2014; SOUSA et al., 2008).

5.2.4 ESTUDOS DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO LISADO DE *E. COLI*

Para avaliar o desempenho das novas resinas sob as condições propostas para o processo de purificação de pDNA, foi realizada a purificação de pDNA a partir de amostras de lisado clarificadas de *E. coli*. As amostras obtidas a partir do isolamento primário seguida de concentração com isopropanol foram carregadas diretamente nas colunas contendo os ligantes de arginina e di-arginina imobilizados em agarose. O perfil cromatográfico das corridas resultantes encontra-se apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose do perfil cromatográfico da purificação a partir de lisado de *E. coli* resultante do isolamento primário seguido de precipitação com isopropanol (à esquerda), injetado diretamente nas colunas empacotadas com as resinas cromatográficas de arginina (A e C) e di-arginina (B e D), a valores de pH de 7,0 (A e B) e 8,0 (C e D). Fase móvel A: 10 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 7,0 ou 8,0); Fase móvel B: 1 M de NaCl em 10 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 7,0 ou 8,0). A corrida foi realizada a 0,25 mL/min e a eluição foi promovida pela saturação da coluna, causada pela continua injeção de 4,5 mL de amostra inicial (40 x diluída na respetiva na fase móvel A). Poço 1: *flow-through* 2-5 min, Poço 2: *flow-through* 5-8 min, Poço 3: *flow-through* 8-11 min, Poço 4: *flow-through* 11-14 min), Poço 5: *flow-through* 14-17 min, Poço 6: *flow-through* 17-20 min, Poço 7: lavagem com fase móvel A, Poço 8: eluição com fase móvel B.

Novamente, o perfil cromatográfico analisado por eletroforese em gel de agarose das amostras de lisado (Figura 13, A e B) indicou que, em condições de pH 7,0, o RNA presente no lisado foi retido nas resinas até o passo de eluição, para as resinas de arginina e di-arginina. No entanto, a pH 8,0, foi possível observar traços de RNA nas amostras de *flow-through* (Figura 13, C e D) para ambas as resinas. Foi possível obter também maior rendimento em termos de recuperação para a resina de di-arginina, onde o DNA plasmidial foi praticamente coletado na sua totalidade nas amostras de *flow-through*, com apenas alguns vestígios na amostra de eluição.

A quantificação e a avaliação da pureza das amostras coletadas nessas corridas cromatográficas (a pH 7,0) foram realizadas por análise de HPLC, sendo os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise por HPLC da massa e rendimento (%) das amostras de *flow-through* e eluição resultantes de uma estratégia de cromatografia em modo negativo, com resinas de arginina e di-arginina imobilizadas em agarose, a partir de lisado de *E. coli* após isolamento primário e precipitação com isopropanol.

Amostra	Volume	pDNA		Rendimento (%)
	(mL)	($\mu\text{g/mL}$)	(μg)	
Injeção	4,50	16,3	73,5	
Arginina				
<i>Flow-through</i>	4,50	15,3	68,7	93,5
Eluição	1,25	3,84	4,79	-
Di-arginina				
<i>Flow-through</i>	4,50	16,3	73,3	99,8
Eluição	1,25	0,134	0,167	-

Os coeficiente de correlação obtido da curva de calibração para o pDNA foi de 0,994.

Foram obtidos valores de recuperação de 93,5% e 99,8%, em termos de recuperação de pDNA, usando-se as resinas de arginina e di-arginina, respectivamente, evidenciando novamente o papel da di-arginina na retenção de RNA durante o passo de carregamento e lavagem da amostra (Tabela 8). O lisado tem uma quantidade substancialmente maior de RNA comparado ao pDNA, indicando um melhor rendimento de recuperação do que poderíamos encontrar usando amostras purificadas (seção 5.2.3), provavelmente devido à maior adsorção de RNA e deslocamento de pDNA para o *flow-through*. Estes valores tornam-se bastante promissores quando comparados com processos

cromatográficos de modo positivo usando ligantes de arginina. Nesses casos, menores valores de rendimento de plasmídeo são normalmente observados devido às ligações mais fortes entre o aminoácido e as moléculas de plasmídeo, em comparação com as formadas entre as moléculas de arginina e RNA (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2009).

5.2.5 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS FINAIS DE DNA PLASMIDIAL

No desenvolvimento de processos de purificação de plasmídeos para aplicações terapêuticas, é também essencial eliminar impurezas para além do RNA do hospedeiro, como proteínas, endotoxinas e DNA genômico. A capacidade de ambas as resinas para remover estas impurezas do pDNA, por cromatografia negativa, foi também avaliada nas amostras recolhidas no *flow-through* da corrida cromatográfica anterior, utilizando o lisado de *E. coli* a pH 7,0 (Tabela 9). Desta forma, o conteúdo de impurezas dessas amostras em termos de RNA, proteínas, endotoxinas e DNA genômico é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 –Quantificação de proteínas, endotoxinas e gDNA nas amostras de *flow-through* isoladas pelas resinas de agarose de arginina e di-arginina, de uma amostra de lisado pré-purificado (após precipitação com isopropanol) de *E.coli*.

Amostra	RNA	Proteínas	Endotoxinas	DNA genômico
	0,8% AGE	(mg/mL)	(EU/μg pDNA)	(μg/μg pDNA)
Injeção	116 μg/mL	$1,11 \times 10^{-2}$	2,77	$8,94 \times 10^{-1}$
<i>Flow-through</i> arginina	Indetetável	Indetetável*	$3,28 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^{-2}$
<i>Flow-through</i> di-arginina	Indetetável	Indetetável*	$2,52 \times 10^{-1}$	$2,21 \times 10^{-2}$

*A concentração de proteína também foi encontrada abaixo dos níveis detectáveis usando o protocolo do teste de micro-Bradford.

Os coeficientes de variação máximos para os métodos de quantificação de RNA, proteína, endotoxinas e gDNA foram, respectivamente, 2,5%, 9,6%, 19% e 7,0%. Os coeficientes de correlação para as curvas de calibração de RNA, proteína, endotoxinas e gDNA foram 0,997, 0,999, 0,989 e 0,992, respectivamente.

Na Tabela 9, observa-se que o lisado celular, inicialmente, contém alto teor de impurezas, principalmente de RNA, que representa cerca de 60% da amostra, pelo que o plasmídeo representa apenas 8,5% da massa total da amostra. Como verificado anteriormente (Figura 13), grande parte do RNA presente no lisado foi eficientemente separado do plasmídeo, tornando-se indetectável em gel de agarose, o que significa que atinge o limite imposto pelas agências reguladoras,

sendo indetectável em eletroforese em gel de agarose a 0,8% (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000; FERREIRA, 2005). Utilizando um passo cromatográfico em modo negativo, foi também possível reduzir o conteúdo das impurezas remanescentes do hospedeiro. Não foram detectadas proteínas nas amostras resultantes de ambas as resinas. Neste caso, o limite imposto é a não detecção pelo ensaio de proteína micro-BCA. Com relação às endotoxinas, o limite imposto pelas agências reguladoras para essa impureza é ser menor que 0,1EU/ μ g pDNA (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000; FERREIRA, 2005), pelo que as resinas de arginina e di-arginina foram eficientes na remoção de endotoxinas. Neste cenário, as endotoxinas tendem a se adsorver fortemente nos ligantes da resina, uma vez que se apresentam altamente carregadas negativamente (ONGKUDON et al., 2012). Finalmente, o conteúdo de DNA genômico foi reduzido em cerca de 98% em ambos os casos, porém encontrando-se ainda acima do limite imposto pela regulamentação de $<0,01\mu$ g/ μ g pDNA (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000; FERREIRA, 2005). No entanto, é certo que um processo de larga escala para produção de pDNA de grau farmacêutico teria etapas adicionais para o polimento do produto.

A capacidade de separar o pDNA das impurezas do hospedeiro diferentes do RNA reforça o uso vantajoso desta estratégia para a purificação de pDNA diretamente a partir de lisados celulares de *E. coli*. Quando comparado a outras opções de purificação intermediárias, este método é capaz de levar a uma qualidade similar das amostras de pDNA, com maiores rendimentos. Por descartar o uso de altas concentrações de sal, como o sulfato de amônio, que eventualmente precisará ser removido usando operações unitárias adicionais (FREITAS; SANTOS; PRAZERES, 2006), a etapa cromatográfica apresentada aqui tende a reduzir o impacto ambiental e aumentar a viabilidade econômica do processo. Como exemplo para comparação, a cromatografia de interação hidrofóbica apresenta geralmente valores de recuperação de plasmídeo superiores a 95% (associada a redução similar do teor de impurezas) que só é alcançada com a adição de grandes quantidades de sulfato de amônio (BONTURI et al., 2013; EON-DUVAL; GUMBS; ELLETT, 2003). Neste caso, as perdas de DNA plasmidial durante a etapa de adição de sal são comuns, devido à co-precipitação do pDNA com impurezas, muito provavelmente como resultado

da exposição das bases promovida pelo sal nas moléculas de pDNA, favorecendo interações. Além disso, no caso de cromatografia utilizando aminoácidos, a implementação da cromatografia de afinidade com o aminoácido de arginina surge como uma boa alternativa quando comparada com a cromatografia com histidinas imobilizadas, onde são igualmente necessárias altas concentrações de sal cosmotrópico para promover a separação do pDNA. Nesses estudos, apesar do potencial demonstrado em produzir amostras altamente puras, foram obtidos valores de rendimento menores em termos de recuperação de pDNA (cerca de 45%) (SOUZA et al., 2006). Em geral, a estratégia apresentada aqui é susceptível de reduzir os custos e, ao mesmo tempo, representa uma alternativa mais interessante do ponto de vista da robustez e do meio ambiente.

5.3 ESTUDOS EM RESINAS MONOLÍTICAS

Como referido anteriormente, os métodos de purificação de DNA plasmidial com finalidade de aplicações terapêuticas ainda apresentam uma série de desafios, nomeadamente no desenvolvimento de resinas capazes de eliminar as impurezas, selecionar as isoformas, e com capacidades de adsorção mais elevadas. Por isso, como desafio principal, esta parte do trabalho pretendeu combinar a seletividade de ligantes baseados no aminoácido de arginina com as vantagens dos monolitos, analisando o impacto do aumento do uso de homopeptídeos (di- e tri-arginina) com relação ao aminoácido de arginina na capacidade dinâmica de adsorção e seletividade dos monolitos, para purificação da isoforma superenovelada diretamente de lisados celulares.

5.3.1 LIGANTES DE ARGININA IMOBILIZADOS EM RESINAS MONOLÍTICAS

Após imobilização dos ligantes (aminoácidos e homopeptídeos de arginina) nas resinas monolíticas previamente ativadas, realizou-se um primeiro procedimento de forma a confirmar a efetividade da imobilização com relação a uma coluna não modificada. Para isso, uma coluna não modificada foi equilibrada com tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A seguir à injeção de 200 μ L de uma amostra pré-purificada de pVAX1-GFP, um pico simples apareceu imediatamente no *flow-through*, mostrando a pouca afinidade das espécies eluídas com o suporte monolítico não modificado. Depois de uma lavagem com o tampão de adsorção, procedeu-se a um gradiente linear de NaCl durante 5 min com tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0) em que nenhuma espécie foi eluída, sugerindo que o monolito não modificado não interage com as moléculas de pDNA nas condições utilizadas (dados não apresentados).

A mesma experiência foi feita para as resinas monolíticas modificadas com ligantes de arginina, di-arginina e tri-arginina. Neste caso, foi verificada uma

retenção total do pDNA a 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0) e a eluição total foi obtida durante o gradiente linear a diferentes tempos de retenção. Esses tempos de retenção obtidos para as moléculas de pDNA com as resinas de arginina, di-arginina e tri-arginina, assim como a quantidade de sal (NaCl) necessária para eluir essas espécies em cada caso, encontram-se representados na Tabela 10.

Tabela 10 – Tempos de retenção (min) obtidos para as moléculas de pDNA com as resinas com arginina, di-arginina e tri-arginina imobilizadas, e quantidade de sal (NaCl) [mmol/L] necessária para eluir essas espécies. O tempo do gradiente foi de 5 min.

Coluna monolítica	Tempo de retenção (min)	NaCl [mmol/L]
pDNA arginina	1,4	280
pDNA di-arginina	1,7	340
pDNA tri-arginina	2,6	520

Pela Tabela 10, observamos tempos de retenção diferentes durante o gradiente linear aplicado, correspondendo a concentrações específicas de NaCl de 280 mmol/L para as resinas monolíticas de arginina, e 340 mmol/L e 520 mmol/L para as de di-arginina e tri-arginina, respetivamente. Primeiramente, este resultado confirma que os ligantes de arginina, di-arginina e tri-arginina, foram eficientemente imobilizados na coluna monolítica e são os responsáveis pela adsorção da amostra de pDNA às colunas. Além disso, a maior concentração de sal necessária para eluir a amostra requerida pelos homopeptídeos de arginina (di-arginina e tri-arginina) comparativamente ao monolito funcionalizado com (mono)arginina, sugere um aumento de pontos de contato, que resulta em maiores forças de interação entre as moléculas de pDNA e os ligantes. De fato, essa comparação traz evidência de que o mecanismo de adsorção inerente ao bio-reconhecimento entre a arginina e o pDNA é o resultado da combinação de várias interações não covalentes (como interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligação de hidrogênio) (SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2010), que são mais favoráveis e evidentes quando se usam homopeptídeos catiônicos de arginina mais longos.

A densidade iônica de cada coluna monolítica também foi determinada após imobilização e desativação das resinas, como indicador do número total de

grupos iônicos disponíveis para possíveis interações, utilizando o método desenvolvido anteriormente por Lendero e colaboradores (2005) (LENDERO et al., 2005). O transiente de pH foi medido utilizando suas soluções com o mesmo valor de pH, diferindo na sua concentração (500 mmol/L e 20 mmol/L de fosfato, pH 6,8). As colunas foram primeiro equilibradas com a solução de alta força iônica até pré-saturar a coluna. A fase móvel foi então alterada para a solução de baixa força iônica com o mesmo valor de pH, de modo a verificar o transiente de pH. A capacidade iônica foi então determinada medindo o instante da troca de fases móveis e o instante em que foi atingido 50% da absorbância a 260 nm na curva de ruptura (ruptura). A capacidade iônica total medida para a coluna funcionalizada com o aminoácido de arginina foi de 224 mmol/L fosfato/mL de coluna, enquanto que as colunas de di-arginina e tri-arginina mostraram um valor de 304 e 324 mmol/L fosfato/mL de coluna, respectivamente. Olhando este valor de densidade iônica após imobilização (e desativação) das colunas, tem-se uma medida aproximada dos grupos iônicos disponíveis, que na verdade resulta de uma coexistência de grupos amina positivos e grupos carboxil negativos nos ligantes baseados em arginina. Uma vez que os grupos desativados não apresentam teoricamente carga na sua estrutura, este valor de capacidade iônica total poderá ser assumido como uma medida da quantidade de ligantes imobilizados em cada suporte. Portanto, levando em consideração que cada molécula de di-arginina ou tri-arginina tem duas ou três vezes mais “moléculas de arginina” por ligante imobilizado, respectivamente, conclui-se que o rendimento de imobilização das colunas monolíticas foi menor no caso dos homopeptídeos quando comparados com o rendimento obtido para o monolito de arginina. Este resultado sugere que a eficiência de imobilização do adsorvente está diretamente relacionada com o tamanho ou a forma do ligante. Na verdade, alguns estudos de desenvolvimento de protocolos de imobilização revelam que ligantes de maiores dimensões podem resultar em baixos rendimentos devido aos locais reativos da resina se encontrarem estericamente inacessíveis, e estes ligantes apresentarem mobilidades reduzidas devido ao impedimento estereoquímico (HAGE, 2006).

5.3.2 CAPACIDADES DE ADSORÇÃO DINÂMICA

Como referido anteriormente, a determinação da capacidade de adsorção dinâmica (CLD) de uma fase estacionária é um passo fundamental para a otimização de um processo de purificação, apresentando-se como um fator crítico para o desempenho de uma coluna (SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2007).

Os ensaios de ruptura foram realizados a 1 mL/min, com uma solução pré-purificada de pVAX1-GFP (0,05 mg/mL) a pH 8,0. A Figura 14 mostra as curvas de ruptura obtidas para as colunas monolíticas de arginina, di-arginina e tri-arginina nessas condições cromatográficas. Neste ponto, é importante referir que a escolha do valor de pH baseou-se na vantagem de capacidade verificada anteriormente em estudos na literatura em resinas monolíticas, em termos de capacidade e seletividade do pDNA, face principalmente à impureza de RNA (ALMEIDA et al., 2015). As capacidades foram calculadas a 10% e 50% da absorbância das curvas de ruptura, cujos valores estão representados na Tabela 11.

Figura 14 – Ensaios de ruptura das resinas monolíticas imobilizadas com arginina, di-arginina e tri-arginina. Vazão: 1 mL/min; amostra: pVAX1-GFP pré-purificada (0,05 mg/mL) com o kit NZYMaxiPrep em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0).

Tabela 11 - Capacidades de ligação dinâmicas das resinas monolíticas com arginina, di-arginina e tri-arginina imobilizadas, determinadas com uma solução de 0,05 mg/mL do plasmídeo pVAX1-GFP.

Resina monolítica	CLD (mg/mL)		
	10%	50%	Total
Arginina	1,02	1,10	1,54
Di-arginina	2,64	2,85	3,49
Tri-arginina	2,62	2,78	3,60

Os dados da Tabela 11 indicam que a CLD depende efetivamente do comprimento da cadeia do ligante de arginina. Observou-se um aumento significativo de capacidade no caso das colunas monolíticas baseadas em homopeptídeos de arginina, que mostraram capacidades aproximadamente 2,5 vezes superiores com relação à coluna monolítica imobilizada com o aminoácido de arginina. Uma explicação para esta diferença pode estar relacionada ao fenômeno de condensação que ocorre entre o peptídeo de arginina e as moléculas de pDNA. De fato, os homopeptídeos catiônicos de arginina foram

estudados anteriormente, em solução, para procedimentos de administração de genes, apresentando boas habilidades de transfeção em comparação com outros aminoácidos. Os homopeptídeos de arginina têm mostrado alto potencial para condensar o DNA por interações eletrostáticas combinadas com pontes de hidrogênio entre a cadeia lateral de íon guanidínio da arginina e as bases nitrogenadas do plasmídeo (BALHORN; BREWER; CORZETT, 2000; MANN et al., 2011). Por analogia, levando-se em conta a possibilidade de neste caso os peptídeos poderem mostrar um comportamento diferente do que teriam livres em solução devido ao impedimento estérico da superfície sólida e à perda de grupos amino funcionalizados, esta comparação sugere que a imobilização de homopeptídeos de arginina aumenta a intensidade de interação dos ligantes com o pDNA. Consequentemente, a capacidade de adsorção dinâmica das resinas monolíticas melhora relativamente à coluna monolítica de arginina, mesmo com as menores densidades iônicas apresentadas. A possibilidade de formar complexos mais condensados entre as moléculas de pDNA com o ligante, resultantes do número crescente de interações eletrostáticas e séries de pontes de hidrogênio com o íon guanidínio (MANN et al., 2011), podem ter igualado a quantidade de plasmídeo confinado no interior da coluna de tri-arginina, mesmo com o menor rendimento de imobilização apresentado. Estes resultados mostram a vantagem do aumento do comprimento do peptídeo de arginina na eficácia de ligação de pDNA, que se traduz diretamente em maiores capacidades de adsorção dinâmica.

De acordo com resultados anteriores, de fato a imobilização de ligantes de arginina na resina monolítica torna o suporte mais funcional, permitindo aumentar a sua capacidade de adsorção em comparação com resinas cromatográficas convencionais (ALMEIDA et al., 2015). Estes resultados também sugerem que a implementação da cromatografia de afinidade recorrendo ao aminoácido de arginina combinada com as vantagens das resinas monolíticas, surge como uma boa alternativa com relação, à resina histidina-agarose, que apresenta uma capacidade consideravelmente menor para o pDNA, exigindo maiores concentrações de sal para promover a total retenção desta molécula (SOUSA et al., 2008).

Analisando os perfis de curvas de ruptura (Figura 14), todas estas apresentaram um formato em “S”, geralmente descritas por um avanço íngreme seguido de uma plataforma plana, quando as resinas atingem a saturação. No entanto, é notável como o formato da curva se modifica à medida que o comprimento do ligante é alterado, especialmente no caso da resina monolítica de tri-arginina. Essas diferenças das curvas de ruptura estão de acordo com o trabalho de Gebauer e colaboradores, que descreveram o formato das curvas de ruptura como sendo dependentes de vários fatores. Esses fatores podem incluir a cinética de adsorção das interações ligante-soluto, mecanismos de transferência de massa difusional ou o impedimento estérico dos ligantes (LUSTIG; ARORA; JERNIGAN, 1997).

A fim de compreender melhor se o diferente formato das curvas estava diretamente relacionada com esses fenômenos ou se seria o resultado das diferentes características físico-dinâmicas apresentadas pelas resinas após imobilização, foram analisadas as curvas de ruptura sob condições de não adsorção para os três resinas. Para a realização desse ensaio, foi feito o carregamento da amostra de pDNA diluída em um tampão de alta concentração de sal (2 mol/L NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl EDTA 10 mmol/L, pH 8,0), para assegurar que nenhuma interação ocorreria entre o ligante e o pDNA. De fato, nessa condição de força iônica, nenhuma interação foi encontrada, e as curvas de ruptura apresentaram a mesma forma, independentemente do ligante (ver apêndice II). Estes fatos corroboram no sentido de que o formato das curvas de ruptura pode ser altamente influenciado pelo comprimento da cadeia de argininas, como de outros fatores, como a densidade de ligantes na coluna, que pode resultar em uma mudança do espaço disponível para interação com o pDNA, ou pelo próprio grau de compactação do plasmídeo quando em interação com o ligante. Esses fatores podem causar alterações nos mecanismos de transferência de massa dentro da coluna monolítica, resultando em variações na extensão do tempo necessário para atingir o platô de saturação. Estes resultados indicam que esse formato das curvas pode ser altamente influenciado pelo comprimento da cadeia arginina, que podem ser responsáveis pela alteração da sua interação com DNA plasmidial, bem como da sua compatibilidade de interação. Por sua vez, essas alterações podem causar mudanças de mecanismos de

transferência de massa dentro da coluna monolítica, resultando em variações na extensão do tempo necessário para atingir o patamar de saturação.

5.3.3 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DIRETAMENTE DE LISADO DE *E. COLI*

Os estudos de purificação de pDNA (sc) (superenovelado) foram realizados a partir de uma amostra de lisado pré-purificado carregado nas três resinas monolíticas previamente imobilizadas. Inicialmente, várias condições de retenção/eluição foram testadas para determinar os diferentes comportamentos das impurezas presentes no lisado (dados não mostrados). As corridas cromatográficas com as condições finais otimizadas encontram-se representadas nas Figura 15, 16 e 17.

Figura 15 – Perfil cromatográfico da purificação da isoforma sc do pDNA de uma amostra de lisado de *E. coli* clarificado, utilizando a resina monolítica com **arginina** imobilizada. Fase móvel A: 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0); Fase móvel B: 1 M de NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A corrida foi realizada a 1 mL/min e a eluição foi promovida por passos de concentrações crescentes de NaCl no eluente (eixo secundário). Detecção de UV a 260 nm. O volume de injeção foi de 1 mL. Respetiva eletroforese em gel de agarose das amostras recolhidas em cada pico do ensaio cromatográfico de purificação. Poço M: marcador molecular; Poço F: amostra de injeção (amostra de lisado de lisado *E. coli* clarificado); as frações correspondentes aos picos 1-5 estão representadas nos poços 1-5 do gel, respetivamente.

Figura 16 - Perfil cromatográfico da purificação da isoforma sc do pDNA de uma amostra de lisado de *E. coli* clarificado, utilizando a resina monolítica com **di-arginina** imobilizada. Fase móvel A: 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0); Fase móvel B: 1 M de NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A corrida foi realizada a 1 mL/min e a eluição foi promovida por passos de concentrações crescentes de NaCl no eluente (eixo secundário). Detecção de UV a 260 nm. O volume de injeção foi de 1 mL. Respetiva eletroforese em gel de agarose das amostras recolhidas em cada pico do ensaio cromatográfico de purificação. Poço M: marcador molecular; Poço F: amostra de injeção (amostra de lisado de lisado *E. coli* clarificado); as frações correspondentes aos picos 1-4 estão representadas nos poços 1-4 do gel, respetivamente.

Figura 17 - Perfil cromatográfico da purificação da isoforma sc do pDNA de uma amostra de lisado de *E. coli* clarificado, utilizando a resina monolítica com **tri-arginina** imobilizada. Fase móvel A: 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0); Fase móvel B: 1 M de NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A corrida foi realizada a 1 mL/min e a eluição foi promovida por passos de concentrações crescentes de NaCl no eluente (eixo secundário). Detecção de UV a 260 nm. O volume de injeção foi de 1 mL. Respetiva eletroforese em gel de agarose das amostras recolhidas em cada pico do ensaio cromatográfico de purificação. Poço M: marcador molecular; Poço F: amostra de injeção (amostra de lisado de lisado *E. coli* clarificado); as frações correspondentes aos picos 1-4 estão representadas nos poços 1-4 do gel, respetivamente.

Todas as corridas cromatográficas foram realizadas a 1 mL/min e o volume de injeção de lisado clarificado foi de 1 mL. No primeiro caso da Figura 15, a resina monolítica de arginina foi equilibrada com o tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). Após injeção da amostra de lisado, obteve-se um primeiro pico correspondente à amostra de *flow-through* de espécies não ligadas. Em seguida, a força iônica foi aumentada com 35 mmol/L NaCl, seguido de um aumento para 50 mmol/L e depois para 80 mmol/L, em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0), de modo a eluir as várias moléculas ligadas de acordo com a afinidade e força de ligação. Ao final, realizou-se um passo de eluição com 1 M de NaCl a fim de remover todas as demais espécies fortemente ligadas. O cromatograma da Figura 16 corresponde ao ensaio realizado com a resina monolítica de di-arginina. Neste caso, a coluna foi equilibrada com 210 mmol/L NaCl em tampão Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). Novamente, após injeção, promoveu-se o aumento da força iônica com 242 mmol/L NaCl e depois com 300 mmol/L em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0), de modo a obter uma retenção diferencial e um padrão de eluição das diferentes espécies anteriormente ligadas. No final, realizou-se um passo com 1 M de NaCl de modo a terminar a corrida cromatográfica, eliminando as espécies mais retidas da coluna. O cromatograma da Figura 17 corresponde à resina monolítica de tri-arginina, que foi equilibrada com 400 mmol/L NaCl em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A eluição das diversas espécies foi promovida aumentando consecutivamente a força iônica do eluente com 447 mmol/L e 565 mmol/L de NaCl em tampão 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A corrida foi também concluída aplicando um último passo de eluição com 1 M de NaCl.

Todos os cromatogramas apresentam diferentes picos que correspondem à eluição das diferentes espécies da amostra de lisado, e que interagem de forma diferente com as resinas monolíticas. As espécies presentes em cada pico foram identificadas pela respectiva eletroforese em gel de agarose. No primeiro caso da resina de arginina, a análise do gel de agarose mostra que o aumento da força iônica permite coletar e isolar a isoforma sc no pico 4, livre das restantes impurezas (Figura 15). Nestas condições, as espécies de RNA foram coletadas nos picos 1, 2, 3 e 5. Na verdade, o RNA consiste em uma mistura heterogênea,

que pode incluir superfícies variáveis, diferentes conformações e tamanhos, porém, cujas estruturas são indistinguíveis em uma eletroforese em gel de agarose. A diversidade das espécies de RNA presentes em um lisado deste tipo também induz uma variedade de interações com os ligantes cromatográficos imobilizados, o que explica os diferentes perfis de eluição, em vários picos e em diferentes forças iônicas (LUSTIG; ARORA; JERNIGAN, 1997). Além disso, verificou-se uma separação notável das diferentes isoformas, em que a isoforma circular aberta (oc) sofre eluição após a isoforma sc. Estes resultados sugerem que a interação da resina de arginina com o DNA plasmidial é influenciada pelo grau de superenovelamento da isoforma. Este fenômeno pode explicar o fato de que o ligante arginina consegue distinguir e interagir diferentemente com ambas as isoformas do plasmídeo, reforçando o reconhecimento específico da isoforma sc pDNA. A proximidade da força iônica requerida para a recuperação das várias espécies do lisado requer alguns pequenos passos de eluição para eluir todo o RNA evitando, ao mesmo tempo, a eluição do pDNA nesta fase. Este controle das condições é particularmente relevante para garantir um compromisso entre o rendimento e a seletividade do ensaio cromatográfico. A resina monolítica de di-arginina também mostrou a separação das diferentes espécies em diferentes picos, como se pode concluir pela análise do gel de eletroforese em agarose (Figura 16). Verifica-se uma separação eficiente da isoforma sc do pDNA, no pico 2, das várias impurezas de lisado, sendo o RNA eluído nos picos 1, 3 e 4. As maiores concentrações necessárias para eluir os diversos ácidos nucleicos, e a maior diferença apresentada entre a concentração dos vários passos de gradiente de NaCl, possibilita a exploração das diferenças de força de ligação e a diversidade de interações entre o ligante e os dois ácidos nucleicos, de uma forma mais eficaz. Além disso, como ocorreu no caso resina de arginina, o perfil de eluição de isoformas abertas revelou que essas espécies são eluídas posteriormente à isoforma superenovelada. Por fim, a coluna monolítica de tri-arginina foi capaz de capturar e eluir seletivamente a isoforma sc do pDNA no pico 3, ao passo que as espécies de RNA apareceram nos picos 1 e 2 (Figura 17). Para além do RNA eluído na amostra de *flow-through*, também nesta resina foi necessário um passo de eluição adicional para eluir RNA antes da eluição do pDNA. As maiores concentrações de sal requeridas para recuperar as diversas espécies da resina de tri-arginina, em comparação com as resinas monolíticas

de arginina e di-arginina, são provavelmente resultado direto do aumento da natureza e da força das diferentes interações estabelecidas entre o ligante e os ácidos nucleicos.

De fato, a tendência verificada da necessidade da utilização de maiores forças de ligação para recuperar os diversos ácidos nucleicos quando se utilizam monolitos modificados com cadeias de arginina mais longas, pode ser um resultado de vários fatores. Uma possível explicação para as maiores concentrações de sal requeridas, com maiores diferenças entre as etapas de gradiente com NaCl, poderá passar pelo número crescente de pontos de contacto entre cada ligante com as espécies de RNA e isoformas de pDNA. Além disso, essas maiores concentrações de sal requeridas nas resinas monolíticas funcionalizados com homopeptídeos mais longos também sugerem que algumas interações adicionais possam ser estabelecidas, aumentando a força da ligação. Além das interações eletrostáticas, e pontes de hidrogênio envolvendo o íon guanidínio da arginina (MARTINS; QUEIROZ; SOUSA, 2013; SOUSA; PRAZERES; QUEIROZ, 2009), estudos anteriores também revelaram algum tipo de interação adicional, envolvendo forças de Van der Waals e ligações mediadas por água (ELROD-ERICKSON; BENSON; PABO, 1998; SOUSA; SOUSA; QUEIROZ, 2009). Por último, o aumento do valor de pKa com o aumento do comprimento do homopeptídeo poderá tornar a carga do ligante (e consequentemente da associação do complexo) mais efetiva para um mesmo valor de pH (Biosynthesis - Peptide Property Calculator). Deste modo, um valor de pKa mais elevado pode resultar diretamente em um aumento do valor absoluto das cargas do ligante para adsorver os ácidos nucleicos, aumentando a sua força de atração para a parede monolítica funcionalizada, atrasando assim o processo de eluição. Da mesma forma, a possibilidade de eliminar mais impurezas no *flow-through* (como é o caso do RNA), providencia mais capacidades da coluna para a molécula de pDNA, devido à maior liberação de sítios de adsorção. Por exemplo, a resina monolítica de di-arginina permite a eluição de uma enorme quantidade de RNA já na amostra *de flow-through*, sem comprometer os sítios de adsorção de pDNA à coluna. Desta forma, a retenção mais forte verificada na resina monolítica de tri-arginina representa um desafio a ser resolvido, uma vez que evita a remoção de uma grande quantidade de RNA,

que é retida durante o ensaio cromatográfico, diminuindo a capacidade dinâmica real de que o suporte poderia oferecer para o pDNA. Finalmente, o menor número de etapas de eluição necessárias para realizar o ensaio cromatográfico torna a resina monolítica de di-arginina mais robusta para sua utilização em processos de purificação de pDNA. Neste caso, a vantagem da di-arginina é explícita, sendo possível isolar o pDNA sc no segundo pico (Figura 16). O gradiente usado neste trabalho para a estratégia de purificação foi substancialmente similar àquele usado em outro estudo usando uma resina monolítica imobilizada com arginina. Após o carregamento do lisado pré-purificado, o processo compreendeu a eluição de espécies ligadas com um gradiente crescente de NaCl. De fato, verificou-se que os primeiros picos correspondem à eluição de RNA, que se encontrava mais fracamente ligado, seguido da eluição da isoforma de plasmídeo superenovelada ligado com maior concentração de NaCl (SOARES et al., 2013). Com os monolitos de di-arginina e tri-arginina foi possível obter a purificação da isoforma superenovelada de pDNA com um gradiente mais simples, baseado em um número menor de etapas de eluição, similarmente ao que ocorre em outros trabalhos envolvendo o aminoácido de histidina que utilizam uma série de passos de gradientes descendentes de sulfato de amônio (SOUSA et al., 2006).

5.3.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE QUALIDADE DE DNA PLASMIDIAL

Os processos de purificação de DNA plasmidial devem produzir um produto final que obedeça aos critérios impostos pelas agências reguladoras farmacêuticas, que fornecem critérios específicos de controle de qualidade e segurança para cada produto de ingrediente farmacêutico ativo (API) (FDA, 2007), estabelecendo limites para a concentração de diferentes impurezas tais como RNA, proteínas, endotoxinas, gDNA e diferentes isoformas de pDNA (FDA, 2007; FERREIRA, 2005). Primeiro, foram avaliados o rendimento e a pureza da amostra final, em comparação com a amostra inicial de lisado clarificado por HPLC. Esta análise foi efetuada recorrendo à coluna analítica CIMac™ DEAE,

de acordo com o método descrito acima. Os resultados encontram-se representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise HPLC da concentração, pureza e rendimento da amostra da isoforma sc do plasmídeo pVAX1-GFP isolado pelas colunas monolíticas funcionalizadas com arginina, di-arginina e tri-arginina.

Amostra	Volume (mL)	pDNA		HPLC pureza (%)	Fator purificação	Rendimento (%)
		(µg/mL)	(µg)			
Injeção	1	42,5	42,5	12,4		
pico-sc 4 - arginina	1,90	19,7	37,4	>97	7,82	88,0
pico-sc 2 - di-arginina	2,60	10,8	28,1	>97	7,82	66,1
pico-sc 3 -tri-arginina	3,80	5,89	22,4	>99	7,98	52,7

O coeficiente de correlação da curva de calibração do pDNA foi de 0,9904.

Os resultados apresentados na Tabela 12 revelam um incremento do volume de eluição, com o consequente decréscimo na concentração de DNA plasmidial, para homopeptídeos mais longos. Esses resultados mostram que, à medida que esse comprimento da cadeia de arginina aumenta, mesmo com as maiores concentrações de sal associadas, é necessário mais tempo para que ocorra a eluição do pDNA da matriz, sugerindo novamente uma eficácia crescente nas interações.

A análise pela técnica de HPLC da amostra inicial de lisado clarificado de *E. coli* revelou vários picos correspondentes a diferentes impurezas, nomeadamente proteínas e RNA, que eluíram antes do DNA plasmidial. Para avaliar a pureza de cada amostra analisada, determinou-se a relação entre a área do pico do plasmídeo e as áreas dos picos totais do cromatograma analítico. Assim, o plasmídeo representou aproximadamente 12,4% da amostra total de lisado clarificado de *E. coli* (Tabela 12). A análise por HPLC das amostras de pDNA recolhidas nos picos 4, 2 e 3, obtidas nos ensaios de purificação recorrendo às resinas monolíticas imobilizadas com arginina, di-arginina e tri-arginina, respectivamente, revelaram um pico único expressando moléculas de pDNA isentas de impurezas. Assim, é possível provar-se que a amostra de pDNA não se encontra contaminada por outras impurezas de *E. coli*, tais como RNA ou proteínas. Foi possível atingir assim um grau de pureza maior que 97% no caso da resina de arginina e di-arginina (correspondente a um fator de purificação de 7,82 para arginina e di-arginina), e maior que 99% para a resina monolítica tri-

arginina (correspondente a um maior fator de purificação de 7,98) (Tabela 12). Em todos os casos, as resinas monolíticas permitiram a recuperação de uma amostra homogênea que se enquadra nos limites dos regulamentos impostos pela FDA e EMEA, que exige um valor maior que 90% na homogeneidade da isoforma sc (FERREIRA et al., 2000).

Quanto ao rendimento relativo à recuperação do DNA plasmidial, foi possível obter valores de 88,0% para as resinas monolíticas de arginina, 66,1% de di-arginina e 52,7% de tri-arginina (Tabela 12). Embora a evidência emergente da criação de complexos mais fortes de DNA com mais pontos de contato à medida que se aumenta o comprimento do peptídeo, este efeito pode também resultar em etapas de eluição menos eficientes, com picos mais longos, levando consequentemente a menores rendimentos de recuperação de pDNA (Tabela 12). Para superar este efeito de retenção e tirar proveito das propriedades melhoradas fornecidas pelas resinas monolíticas com base em homeopeptídeos de arginina, outras condições de adsorção/dessorção podem ser exploradas. As diferentes interações estabelecidas entre os peptídeos e as moléculas de plasmídeo devem ser estudadas e caracterizadas para superar os menores valores de recuperação de plasmídeo obtidos.

A qualidade das amostras de pDNA purificado pelas três resinas monolíticas foi também avaliada por uma série de testes como micro-BCA, LAL e PCR-RT, para quantificação de proteínas, endotoxinas e DNA genômico, respectivamente. O conteúdo de impurezas encontra-se representado na Tabela 13.

Tabela 13 – Teor de proteínas, endotoxinas e gDNA quantificado nas amostras de lisado clarificado de *E. coli* e resultantes do isolamento pelas resinas monolíticas de arginina, di-arginina e tri-arginina.

Amostra	Proteínas	Endotoxinas		DNA genômico	
	(mg/mL)	(EU/mL)	(EU/μg pDNA)	(μg/mL)	(ng/μg pDNA)
Injeção	Indetectável	10,7	2,51E-01	7,67E-03	1,81E-01
pico-sc 4 arginina	Indetectável	0,128	7,82E-03	5,43E-04	3,31E-02
pico-sc 2 di-arginina	Indetectável	0,508	3,46E-02	7,91E-04	5,39E-02
pico-sc 3 tri-arginina	Indetectável	0,232	3,93E-02	1,81E-04	2,80E-02

Os coeficientes de variação máximos para os métodos de quantificação de proteínas, endotoxinas e gDNA foram, respectivamente, 6,9%, 15% e 8,4%. O coeficiente de correlação da curva de calibração das proteínas foi de 0,999, o coeficiente de correlação da curva de calibração do gDNA foi de 0,998, o coeficiente de correlação da curva de calibração das endotoxinas foi de 0,999.

A Tabela 13 mostra uma percentagem de remoção considerável de RNA, proteínas, endotoxinas e gDNA nas amostras finais purificadas pelas colunas monolíticas funcionalizadas. A eliminação dessas impurezas é importante pelo seu efeito tóxico em células de mamíferos e seus impactos biológicos indesejáveis, tanto *in vivo* como *ex vivo* (FERREIRA, 2005). Com relação ao RNA, este não foi detetado na eletroforese final em gel de agarose, o que significa que este obedece aos critérios dos regulamentos farmacêuticos (cujo limite exige que este não seja detetado em uma eletroforese em 0,8% de gel de agarose (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000)). A contaminação por proteínas, em que o limite imposto é ser indetectável pelo teste de BCA (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000), também não representa um problema neste caso, uma vez que as amostras finais encontram-se isentas de proteínas mesmo antes do passo final de purificação, cujas concentrações foram indetectáveis pelo método de micro-BCA. Com relação às endotoxinas, o limite imposto pelos regulamentos para o conteúdo desta impureza é ser menor que 0,1 EU/ μ g pDNA (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000). Nos três casos, foi possível obter concentrações de endotoxinas inferiores a 0,1 EU/ μ g de pDNA (com uma remoção de pelo menos 95%, considerando a amostra de alimentação inicial). Finalmente, as resinas monolíticas de arginina, di-arginina e tri-arginina revelaram-se bastante eficientes na remoção de gDNA (na faixa de 70-80% de remoção), estando em conformidade com o limite imposto pelos regulamentos ($<0,01 \mu$ g/ μ g pDNA) (FERREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2000).

6. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho estudou o equilíbrio da adsorção de pDNA e RNA em resinas de agarose com o aminoácido de arginina imobilizado. Concluiu-se que a escolha do pH é fundamental para controlar a interação entre o aminoácido de arginina com os ácidos nucleicos, fenômeno que está relacionado com o impacto desse parâmetro sobre as estruturas das biomoléculas. No caso, observou-se que as capacidades de ligação obtidas nos estudos de equilíbrio em batelada nem sempre seguem as mesmas tendências que as capacidades de ligação dinâmica obtidas com as resinas de agarose para as moléculas de pDNA e RNA. Com isso, foi possível averiguar quais as implicações das variações estruturais das próprias moléculas no processo de adsorção, relacionando esses efeitos com fatores como impedimento estereoquímicos e coeficientes de difusão apresentados pelas moléculas quando operadas com este tipo de resinas. Perante a carência de dados na literatura de adsorção de ácidos nucleicos, os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações valiosas para o desenvolvimento futuro e implementação de ligantes baseados em arginina, nomeadamente em termos de capacidade e seletividade, de um processo direcionado para a purificação de ácidos nucleicos. Futuramente, estudos semelhantes poderão ser realizados envolvendo os homopeptídeos de arginina utilizados neste trabalho (di- e tri-arginina) a fim de fazer uma ponte de conhecimento entre o comportamento destes ligantes imobilizados em agarose quando em solução, em condição de empacotamento ou mesmo imobilizados em resinas monolíticas.

Foi também descrita uma nova abordagem para o processo de purificação de pDNA utilizando uma estratégia cromatográfica em modo negativo como passo intermediário do processo de purificação, recorrendo aos ligantes de arginina e di-arginina imobilizados em resinas de agarose. Devido ao elevado tamanho do pDNA e a sua forma complexa, o uso de resinas cromatográficas comerciais baseadas em esferas de agarose resulta geralmente em baixos rendimentos, bem como baixas capacidades de adsorção, quando operados em modo positivo. Uma alternativa para superar essa limitação será projetar esses

sistemas cromatográficos de ligante-resina para sua operação em modo negativo, onde as impurezas do hospedeiro (especialmente o RNA de baixo massa molecular) são capturadas e eficientemente separadas do pDNA alvo. Neste trabalho, os ligantes baseados em arginina foram imobilizados em resinas de agarose e o seu potencial de purificação cromatográfica em modo negativo do pDNA a partir de lisados de células bacterianas foi avaliado e comparado. Os resultados mostraram que o RNA se manteve preferencialmente ligado aos ligantes. O processo de purificação global utilizando resinas à base de di-arginina permitiu também maior recuperação de pDNA em comparação com as resinas de argina-agarose convencionais, onde aproximadamente 99% do pDNA carregado foi recuperado com uma redução considerável de impurezas. Este trabalho representa uma alternativa interessante e promissora aos métodos de purificação de pDNA previamente desenvolvidos, com tempos e custos de operação potencialmente mais baixos, e representando um processo comparativamente mais amigável ao meio ambiente. Posteriormente, estudos envolvendo a mesma resina de agarose imobilizada com o ligante de tri-arginina poderá ser testado em termos da possível vantagem de capacidade para as moléculas de RNA, e conseqüentemente, para melhoria do rendimento de recuperação do DNA plasmidial.

As interações específicas envolvidas entre os ligandos baseados em arginina em resinas monolíticas com os ácidos nucleicos presentes em lisado de *E. coli* mostraram bom potencial para purificação de pDNA na forma superenovelada. Utilizando homopeptídeos de arginina, as resinas monolíticas tornaram-se ainda mais funcionais, permitindo maiores capacidades de adsorção dinâmica comparando com a resina monolítica baseada no aminoácido de (mono)arginina. O uso dos homopeptídeos de arginina resultou em maiores forças de interação com o pDNA, demonstrando a possibilidade de promover interações adicionais. A eficiência das resinas monolíticas para remover a isoforma circular aberta, bem como as impurezas remanescentes na amostra de pDNA superenovelado, tais como RNA, endotoxinas e gDNA, cujo conteúdo se apresenta de acordo com as recomendações das agências reguladoras. Tais realizações são subjacentes a todo o potencial mostrado pelos homopeptídeos imobilizados em resinas monolíticas para purificação de DNA plasmidial com grau farmacêutico. É

sugerindo, assim, que diferentes condições de adsorção/dessorção possam ser testadas a fim de avaliar as condições ótimas para operá-las para fins práticos de purificação de DNA plasmidial, especialmente com vista à otimização da recuperação de pDNA.

Globalmente, este trabalho permitiu observar diferenças de interação entre os ácidos nucleicos e os ligantes imobilizados nas diferentes resinas, como é o caso das resinas de agarose (tanto em batelada como em coluna), com as resinas monolíticas. Verificou-se que a tendência dos valores de capacidades para as moléculas de pDNA e RNA em resinas de agarose foi altamente afetada por alterações de tamanho evidenciadas por ambas as moléculas nas várias condições de processo testadas. Com isso, indagou-se que nesse tipo de resinas, essas alterações estruturais verificadas tanto na molécula alvo, como nas impurezas, são responsáveis fatores estéricos sofridos por estas moléculas, que por sua vez, se relacionam diretamente com diferenças nas capacidades de ligação. Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho mostram que esses impedimentos estéricos podem dominar os efeitos de afinidade entre os ligantes e os adsorbatos. Apesar dos maiores valores de afinidade apresentados pelos ligantes de arginina para as moléculas de pDNA com relação às moléculas de RNA, as resinas de agarose mostraram ligações preferenciais com as moléculas de RNA. Já no caso das resinas monolíticas, em que essa limitação espacial é quase inexistente quando operadas com ácidos nucleicos (por conta dos seus poros de grande acessibilidade), estas mostraram uma adsorção preferencial para as moléculas de pDNA. Pensa-se portanto, que as interações preferenciais nas resinas monolíticas serão atribuídas à afinidade entre o ligante e o adsorbato, não estando diretamente relacionadas com fatores estéricos sofridos pelas moléculas.

Em suma, além de contribuir com novos conhecimentos sobre processos de adsorção de pDNA em resinas de agarose e monolíticas, este estudo traz novos conhecimentos no campo do desenvolvimento e otimização de novos ligantes, resinas e protocolos de purificação de pDNA em pequena escala, com potencial para ser ampliado para larga escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. et al. Optimization of supercoiled HPV-16 E6/E7 plasmid DNA purification with arginine monolith using design of experiments. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 978-979, p. 145–150, 2015. za

ANDERSON, R. J.; SCHNEIDER, J. Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. **Vaccine**, v. 25, n. 2, p. 24-34, 2007.

ARKHANGELSKY, E. et al. Influence of pH and ionic strength on transmission of plasmid DNA through ultrafiltration membranes. **Desalination**, v. 227, n. 1-3, p. 111–119, 2008.

AUFFINGER, P.; WESTHOF, E. Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers. **Journal of molecular biology**, v. 300, p. 1113–1131, 2000.

AZZONI, A. R. et al. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. **Journal of Gene Medicine**, v. 9, n. 5, p. 392–402, 2007.

BAI, J.-S. et al. Purification of supercoiled plasmid DNA from clarified bacterial lysate by arginine-affinity chromatography: effects of spacer arms and ligand density. **Journal of separation science**, v. 37, n. 12, p. 1386–95, 2014.

BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Molecular reproduction and development**, v. 56, n. 2 Suppl, p. 230–234, 2000.

BELHACHEMI, M.; ADDOUN, F. Comparative adsorption isotherms and modeling of methylene blue onto activated carbons. **Applied Water Science**, v. 1, n. 3-4, p. 111–117, 2011.

BICHO, D. et al. Effect of chromatographic conditions and plasmid DNA size on the dynamic binding capacity of a monolithic support. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 17, p. 2284–2292, 2014.

BOI, C. Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 848, p. 19-27, 2007.

BONTURI, N. et al. Sodium citrate and potassium phosphate as alternative adsorption buffers in hydrophobic and aromatic thiophilic chromatographic purification of plasmid DNA from neutralized lysate. **Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 919-920, p. 67–74, 2013.

BOSCHETTI, E. et al. Preparative high-performance liquid chromatographic separation of proteins with HyperD ion-exchange supports. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 664, n. 1, p. 225–231, 1995.

CARAMELO-NUNES, C. et al. Negative pseudo-affinity chromatography for plasmid DNA purification using berenil as ligand. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 944, p. 39–42, 2014.

CARDOSO, S. et al. Arginine and di-arginine ligands for plasmid DNA purification using negative chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 202, n. March, p. 281–289, 2018a.

CARDOSO, S. et al. Arginine homopeptides for plasmid DNA purification using monolithic supports. **Journal of Chromatography B**, p. 149-157, 2018b.

CARNES, A. E.; WILLIAMS, J. A. Plasmid DNA manufacturing technology. **Recent patents on biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 151–166, 2007.

CHEN, X. Modeling of experimental adsorption isotherm data. **Information (Switzerland)**, v. 6, n. 1, p. 14–22, 2015.

CROSS, D.; BURMESTER, J. K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. **Clinical medicine & research**, v. 4, n. 3, p. 218–27, 2006.

CUSSLER, E. L. **Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems Engineering**, New York, Cambridge University Press, 1997.

DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. The suitability of DEAE-Cl active groups on customized poly(GMA-co-EDMA) continuous stationary phase for fast enzyme-free isolation of plasmid DNA. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1-2, p. 38–46, 2007.

DARBY, R. A J.; HINE, A. V. LacI-mediated sequence-specific affinity purification of plasmid DNA for therapeutic applications. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 7, p. 801–

803, 2005.

DELATTRE, C. et al. Purification of oligouronides by immobilized l-histidine pseudoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 861, n. 2, p. 181–185, 2008.

DHAMA, K. et al. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: Current perspectives. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 341-356, 2008.

DIOGO, M. M. et al. Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 275, n. 1, p. 122–124, 1999.

DIOGO, M. M.; QUEIROZ, J. A.; PRAZERES, D. M. F. Chromatography of plasmid DNA. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 1, p. 3–22, 2005.

DOBLHOFF-DIER, O.; BLIEM, R. Quality control and assurance from the development to the production of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v.17, p. 266-270 1999.

EDELSTEIN, M. L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. **J Gene Med**, v. 6, n. 6, p. 597–602, 2004.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 1-14, 2004.

ELROD-ERICKSON, M.; BENSON, T. E.; PABO, C. O. High-resolution structures of variant Zif268–DNA complexes: implications for understanding zinc finger–DNA recognition. **Structure**, v. 6, n. 4, p. 451–464, 1998.

EON-DUVAL, A.; BURKE, G. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 2, p. 327–335, 2004.

EON-DUVAL, A.; GUMBS, K.; ELLETT, C. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: use of experimental design to determine reaction conditions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 544–53, 2003a.

EON-DUVAL, A.; GUMBS, K.; ELLETT, C. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction

conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 544–553, 2003b.

FDA. Guidance for Industry and FDA Staff Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests. **Fda**, p. 1–39, 2007.

FERRARO, B. et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 53, n. 3, p. 296–302, 2011.

FERREIRA, G. N. et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 380–388, 2000.

FERREIRA, G. N.; CABRAL, J. M.; PRAZERES, D. M. Development of process flow sheets for the purification of supercoiled plasmids for gene therapy applications. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 4, p. 725–31, 1999.

FERREIRA, G. N. M. Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination. **Chemical Engineering and Technology**, v. 28, p. 1285–1294, 2005.

FERREIRA, G. N. M.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F. A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification. **Biotech. Techniques**, v. 11, n. 6, p. 417–420, 1997.

FERREIRA, G. N. M.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion-exchange chromatographic supports. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 3, p. 416–424, 2000.

FINDIK, A.; ÇİFTÇİ, A. Bacterial DNA Vaccines in Veterinary Medicine : a Review Bacterial DNA Vaccines in Veterinary Medicine : a Review. **Journal of Veterinary Advances**, v. 2, p. 139–148, 2012.

FREITAS, S. et al. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 2, p. 265–278, 2009.

FREITAS, S. S. et al. On the stability of plasmid DNA vectors during cell culture and purification. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 151–158, 2007.

FREITAS, S. S.; SANTOS, J. A. L.; PRAZERES, D. M. F. Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA.

Biotechnology Progress, v. 22, n. 4, p. 1179–1186, 2006.

GADGIL, H.; OAK, S. A; JARRETT, H. W. Affinity purification of DNA-binding proteins. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 49, n. 1-3, p. 607–624, 2001.

GASPAR, V. M. et al. Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 212–222, 2011.

GIACCA, M.; Zacchigna, S. Therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. **Gene Therapy**, v. 19, p. 622-629, 2012.

GINN, S. L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. **The Journal of Gene Medicine**, v. 15, n. 2, p. 65–77, 2013.

GIOVANNINI, R.; FREITAG, R. Continuous isolation of plasmid DNA by annular chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 445–454, 2002.

GOH, G. B.; KNIGHT, J. L.; BROOKS, C. L. PH-dependent dynamics of complex RNA macromolecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 2, p. 935–943, 2013.

GOMES, G. A. et al. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 22–30, 2009.

GONÇALVES, G. A. L. et al. De novo creation of MG1655-derived E. coli strains specifically designed for plasmid DNA production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 611–620, 2013.

HABER, C. et al. Membrane chromatography of DNA: Conformation-induced capacity and selectivity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 26–34, 2004.

HAGE, D. S. . Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition. **Taylor & Francis Group**, p. 1–1002, 2006.

HAHN, R.; SCHLEGEL, R.; JUNGBAUER, A. Comparison of protein A affinity sorbents. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 790, n. 1-2, p. 35–51, 2003.

HAN, Y. et al. The harnessing of peptide-monolith constructs for single step plasmid DNA purification. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 203–209, 2010.

HAN, Y.; FORDE, G. M. Single step purification of plasmid DNA using peptide ligand affinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 874, n. 1-2, p. 21–26, 2008.

HARLOW, E.; LANE, D. Bradford Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, p. 4644-4644, 2006.

IROBALIEVA, R. N. et al. Structural diversity of supercoiled DNA. **Nature Communications**, v. 6, p. 8440, 2015.

IULIANO, S. et al. Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. **Journal of Chromatography A**, v. 972, n. 1, p. 77–86, 2002.

JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. Vaccine process technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, 2012.

JUNGBAUER, A. Chromatographic media for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 3-12, 2005.

KASLOW, D. C. A potential disruptive technology in vaccine development: Gene-based vaccines and their application to infectious diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 10, p. 593–601, 2004.

KENDALL, D.; LYE, G. J.; LEVY, M. S. Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 7, p. 816–822, 2002.

KIM, M. et al. Effect of arginine-rich peptide length on the structure and binding strength of siRNA-peptide complexes. **The journal of physical chemistry B**, v. 117, n. 23, p. 6917–26, 2013.

KRAJNC, N. L. et al. Adsorption behavior of large plasmids on the anion-exchange methacrylate monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 17, p. 2413–2424, 2011.

LABROU, N. E. Design and selection of ligands for affinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 790, n. 1-2, p. 67–78, 2003.

LAMARR, W. A et al. Supercoiling affects the accessibility of glutathione to DNA-bound

molecules: positive supercoiling inhibits calicheamicin-induced DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 1, p. 102–7, 1998.

LARA, A. R.; RAMÍREZ, O. T. Plasmid DNA production for therapeutic applications. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 824, p. 271–303, 2012.

LEE, T. W. R.; MATTHEWS, D. A.; BLAIR, G. E. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. **Biochem. J**, v. 387, p. 1–15, 2005.

LENDERO, N. et al. Simple method for determining the amount of ion-exchange groups on chromatographic supports. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 1, p. 29–38, 2005.

LEVY, M. S. et al. Removal of contaminant nucleic acids by nitrocellulose filtration during pharmaceutical-grade plasmid DNA processing. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 197–205, 2000.

LI, W. C. Protein separation using non-porous sorbents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 699, p. 29-45, 1997.

LIMONTA, M. et al. Plasmid DNA recovery using size-exclusion and perfusion chromatography. **BioPharm International**, v. 21, n. 9, p. 38–48, 2008.

LIU, M. A. DNA vaccines: A review. **Journal of Internal Medicine**, v. 253, p. 402-410, 2003.

LOWE, C. R.; LOWE, A. R.; GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 49, p. 561–574, 2001.

LUSCOMBE, N. M.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 13, p. 2860–2874, 2001.

LUSTIG, B.; ARORA, S.; JERNIGAN, R. L. RNA base-amino acid interaction strengths derived from structures and sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 13, p. 2562–2565, 1997.

LYDDIATT, A. Process chromatography: Current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 95-

103, 2002.

MALI, S. Delivery systems for gene therapy. **Indian journal of human genetics**, v. 19, n. 1, p. 3–8, 2013.

MANN, A. et al. Differences in DNA condensation and release by lysine and arginine homopeptides govern their DNA delivery efficiencies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 5, p. 1729–1741, 2011.

MANTHORPE, M. et al. Plasmid vaccines and therapeutics: From design to applications. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 99, p. 41-92, 2005.

MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. New approach in RNA quantification using arginine-affinity chromatography: Potential application in eukaryotic and chemically synthesized RNA. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 27, p. 8849–8858, 2013.

MARTINS, S. A. M. et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and hybridization assays for the detection of Escherichia coli genomic DNA in process samples and pharmaceutical-grade plasmid DNA products. **Analytical Biochemistry**, v. 322, n. 1, p. 127–129, 2003.

MAVROPOULOS, E. et al. Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 1–9, 2011.

MCCOY, M. et al. Perfusion chromatography - Characterization of column packings for chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 743, p. 221-229, 1996

MEAGER, A; VOCKE, T.; ZIMMERMANN, G. The development of the regulatory process in Europe for biological medicines: How it affects gene therapy products. **Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations: From Laboratory to Clinic**, 2001.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. The moment equations of chromatography for monolithic stationary phases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 34, p. 8898–8909, 2002.

MOORE, D. S. Amino acid and peptide net charges: A simple calculational procedure. **Biochemical Education**, v. 13, n. 1, p. 10–11, 1985.

MOUNTAIN, A. Gene therapy: The first decade. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p.

119-128, 2000.

MÜLLER, E. Properties and Characterization of High Capacity Resins for Biochromatography. **Chemical Engineering & Technology**, v. 28, n. 11, p. 1295–1305, 2005.

NECINA, R.; AMATSCHEK, K.; JUNGBAUER, A. Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, p. 689-698, 1998.

NGUYEN, D. N. et al. Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination. **Advanced Materials**, v. 21, n. 8, p. 847–867, 2009.

NOY, A. et al. Relative flexibility of DNA and RNA: A molecular dynamics study. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 3, p. 627–638, 2004.

ONGKUDON, C. M. et al. Removal of endotoxins from plasmid DNA: Analysis of aggregative interaction of mobile divalent metal cations with endotoxins and plasmid DNA. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 22, p. 3208–3216, 2012.

ONGKUDON, C. M.; DANQUAH, M. K. Anion exchange chromatography of 4.2 kbp plasmid based vaccine (pcDNA3F) from alkaline lysed E. coli lysate using amino functionalised polymethacrylate conical monolith. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, p. 303–310, 2011.

PADMAVATHY, K. S.; MADHU, G.; HASEENA, P. V. A study on Effects of pH, Adsorbent Dosage, Time, Initial Concentration and Adsorption Isotherm Study for the Removal of Hexavalent Chromium (Cr (VI)) from Wastewater by Magnetite Nanoparticles. **Procedia Technology**, v. 24, p. 585–594, 2016.

PEREIRA, L. R.; PRAZERES, D. M. F.; MATEUS, M. Hydrophobic interaction membrane chromatography for plasmid DNA purification: Design and optimization. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 9, p. 1175–1184, 2010.

PETERS, E. C.; ERICSON, C. Monolithic Materials - Preparation, Properties and Applications. **Journal of Chromatography Library**, v. 67, 2003.

PODGORNIK, A.; TENNIKOVA, T. B. Chromatographic reactors based on biological activity. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 76, p. 165–210, 2002.

PORATH, J.; BELEW, M. "Thiophilic" interaction and the selective adsorption of proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 8, p. 225-229, 1987.

PRAZERES, D. M. F. et al. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. **Biotechnology Annual Review**, v. 7, p. 1-30, 2001.

PRAZERES, D. M. F. **Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications, and Manufacturing**, Lisbon, John Wiley & Sons, 2011.

PRAZERES, D. M. F.; MONTEIRO, G. A. Plasmid Biopharmaceuticals. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–16, 2014.

PRAZERES, D. M. F.; SCHLUEP, T.; COONEY, C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 806, p. 31–45, 1998.

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: Life beyond packed-bed chromatography. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 469–478, 2004.

RODRIGUES, A. E.; CHENOU, C.; RENDUELES DE LA VEGA, M. Protein separation by liquid chromatography using permeable POROS Q/M particles. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 61, n. 3, p. 191–201, 1996.

RODRIGUES, T. et al. Purification of retroviral vectors for clinical application: Biological implications and technological challenges. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 520–541, 2007.

ROLLAND, A. Gene medicines: The end of the beginning. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 669-673, 2005.

ROTTINGHAUS, S. T. et al. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. **Vaccine**, v. 21, n. 31, p. 4604–4608, 2003.

ROUQUEROL, J.; ROUQUEROL, F. **Adsorption at the Liquid-Solid Interface: Thermodynamics and Methodology**, San Diego, Academic Press, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - Sambrook & Russel**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDBERG, L. M. et al. Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 1-2, p. 193–199, 2004.

SARAJI, M.; YOUSEFI, S.; TALEBI, M. Plasmid DNA purification by zirconia magnetic nanocomposite. **Analytical Biochemistry**, v. 539, 2017.

SCHIEL, J. E. et al. Applications of silica supports in affinity chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 6, p. 719–737, 2006.

SCHLEEF, M.; SCHMIDT, T. Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. **The journal of gene medicine**, v. 6 Suppl 1, p. S45–53, 2004.

SCHLUEP, T.; COONEY, C. L. Purification of plasmids by triplex affinity interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 19, p. 4524–4528, 1998.

SILVA, F. et al. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, p. 1408-1414, 2009.

SILVA-SANTOS, A. R. et al. A process for supercoiled plasmid DNA purification based on multimodal chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 182, p. 94–100, 2017.

SINDEN, R. R. et al. DNA: structure and function. **Adv. Genome Biol.**, v. 5A, n. Genes and Genomes, p. 1–141, 1998.

SMREKAR, F. et al. Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns. **Vaccine**, v. 28, n. 8, p. 2039–2045, 2010.

SMREKAR, V. et al. Single step plasmid DNA purification using methacrylate monolith bearing combination of ion-exchange and hydrophobic groups. **Journal of Chromatography A**, v. 1276, p. 58–64, 2013.

SOARES, A. et al. Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support. **Journal of Chromatography A**, v. 1320, p. 72–79, 2013.

SOUSA, A. et al. Performance of a non-grafted monolithic support for purification of supercoiled plasmid DNA. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 13, p. 1701–1706, 2011.

SOUSA, Â. et al. Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications. **Journal of chromatography. A**, v. 1366, p. 110–9, 2014.

SOUSA, A.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A. Selectivity of arginine chromatography in promoting different interactions using synthetic oligonucleotides as model. **Journal of separation science**, v. 32, n. 10, p. 1665–72, 2009.

SOUSA, A.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A. Differential interactions of plasmid DNA, RNA and genomic DNA with amino acid-based affinity matrices. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17-18, p. 2610–2618, 2010.

SOUSA, F. et al. Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 131–40, 2006.

SOUSA, F. et al. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 374, n. 2, p. 432–434, 2008.

SOUSA, F.; CRUZ, C.; QUEIROZ, J. A. Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: From biological occurrence to affinity chromatography. **Journal of Molecular Recognition**, v. 23, p. 505-518, 2010.

SOUSA, F.; PRAZERES, D. M. F.; QUEIROZ, J. A. Dynamic binding capacity of plasmid DNA in histidine-agarose chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 993–998, 2007.

SOUSA, F.; PRAZERES, D. M. F.; QUEIROZ, J. A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. July, p. 518–525, 2008.

SOUSA, F.; PRAZERES, D. M. F.; QUEIROZ, J. A. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. **Journal of Gene Medicine**, v. 11, n. 1, p. 79–88, 2009a.

SOUSA, F.; PRAZERES, D. M. F.; QUEIROZ, J. A. Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 2, p. 160–165, 2009b.

SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A. Supercoiled plasmid quality assessment by analytical

arginine-affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 124–129, 2011.

SPOSITO, G. *The Chemistry of Soils*, Oxford, Oxford University Press, 1989.

STADLER, J.; LEMMENS, R.; NYHAMMAR, T. Plasmid DNA purification. **The journal of gene medicine**, v. 6, p. 54–66, 2004.

STRANCAR, A. et al. Application of Compact Porous Disks for Fast Separations of Biopolymers and In-Process Control in Biotechnology. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 19, p. 3483–3488, 1996.

TARMANN, C.; JUNGBAUER, A. Adsorption of plasmid DNA on anion exchange chromatography media. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 14, p. 2605–2618, 2008.

TECHNOLOGIES, G. T. **Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations**, UK, Wiley, 1999.

TEETERS, M. A. et al. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. **Journal of Chromatography A**, v. 989, n. 1, p. 165–173, 2003.

TENNIKOVA, T. B.; SVEC, F. High-performance membrane chromatography: Highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. **Journal of Chromatography A**, v. 646, n. 2, p. 279–288, 1993.

THEODOSSIOU, I.; SØNDERGAARD, M.; THOMAS, O. R. T. Design of expanded bed supports for the recovery of plasmid DNA by anion exchange adsorption. **Bioseparation**, v. 10, n. 1-3, p. 31–44, 2001.

THEODOSSIOU, I.; THOMAS, O. R. T. DNA-induced inter-particle cross-linking during expanded bed adsorption chromatography: Impact on future support design. **Journal of Chromatography A**, v. 971, n. 1-2, p. 73–86, 2002.

TIAINEN, P. et al. Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1-2, p. 84–94, 2007.

TOUCHEFEU, Y. et al. Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 32, n. 8, p. 953–68, 2010.

TUMANOVA, I. et al. Analytical and biological characterization of supercoiled plasmids purified by various chromatographic techniques. **DNA and Cell Biology**, v. 24, n. 12, p. 819–831, 2005.

URTHALER, J. et al. Application of monoliths for plasmid DNA purification: Development and transfer to production. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 1, p. 93–106, 2005.

URTHALER, J.; BUCHINGER, W.; NECINA, R. Industrial scale cGMP purification of pharmaceutical grade plasmid-DNA. **Chemical Engineering and Technology**, v. 28, n. 11, p. 1408–1420, 2005.

VILLATE-BEITIA, I. et al. First Insights into Non-invasive Administration Routes for Non-viral Gene Therapy. *Gene Therapy - Principles and Challenges*, Mexico, InTech, 2015.

VLAKH, E. et al. Use of monolithic sorbents modified by directly synthesized peptides for affinity separation of recombinant tissue plasminogen activator (t-PA). **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 3, p. 275–284, 2004.

VOS, C. et al. Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application. **Journal of Biotechnology**, v. 105, n. 3, p. 205–213, 2003.

WEIDE, B. et al. Plasmid DNA and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. **Immunology Letters**, v. 115, p. 33-42, 2008.

WILS, P. et al. Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. **Gene therapy**, v. 4, n. 4, p. 323–30, 1997.

WOLFF, J. A.; BUDKER, V. The Mechanism of Naked DNA Uptake and Expression. **Advances in Genetics**, v. 54, p.3-20, 2005.

WOODGATE, J. et al. Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 450–456, 2002.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 8, p. 541–555, 2014.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Membrane chromatography: Preparation and applications to protein separation. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1003-1019, 1999.

ZÖCHLING, A. et al. Mass transfer characteristics of plasmids in monoliths. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 819–827, 2004.

8. APÊNDICES

APÊNDICE I

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose do perfil cromatográfico da purificação a partir de uma mistura pDNA/RNA em uma razão mássica de 1:3, correspondendo aproximadamente a 30 $\mu\text{g/mL}$ e 90 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA e RNA (amostra de injeção, à esquerda), utilizando as resinas de arginina (A) e di-arginina (B) imobilizadas em agarose. Fase móvel A: 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0); Fase móvel B: 1 mol/L de NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0). A corrida foi realizada a 0,25 mL/min e a eluição foi promovida pela saturação da coluna, causada pela continua injeção de 4,5 mL de amostra inicial na fase móvel A. As amostras dos passos de flow-through, lavagem and eluição estão representadas em A em B. Poço 1: flow-through 2-5 min, Poço 2: flow-through 5-8 min, Poço 3: flow-through 8-11 min, Poço 4: flow-through 11-14 min), Poço 5: flow-through 14-17 min, Poço 6: flow-through 17-20 min, Poço 7: lavagem com fase móvel, Poço 8: eluição com fase móvel B.

APÊNDICE II

Figura 19 - Ensaios de ruptura das colunas monolíticas funcionalizadas com arginina, di-arginina e tri-arginina. Vazão: 1 mL/min; amostra: pVAX1-GFP pré-purificada (0,05 mg/mL) com o kit NZYMaxiPrep em tampão 2 mol/L NaCl em 20 mmol/L Tris-HCl e 10 mmol/L EDTA (pH 8,0).

Plasmid vaccines and therapeutics: From design to applications