

**Guilherme
Lobo e Sousa**

**Bioseparação cromatográfica do
interferon α -2b utilizando sílica
funcionalizada com líquidos iónicos**

**Chromatographic bioseparation of
interferon α -2b using ionic-liquid-
functionalized silicas**

**Guilherme
Lobo e Sousa**

**Biosseparação cromatográfica do
interferon α -2b utilizando sílica
funcionalizada com líquidos iónicos**

**Chromatographic bioseparation of
interferon α -2b using ionic-liquid-
functionalized silicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Márcia Carvalho Neves investigadora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e coorientação do Doutor Augusto Pedro, investigador doutorado de nível inicial.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “Il2BioPro – PTDC/BII-BBF/30840/2017”, financiado pelo FEDER através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI), e por fundos nacionais (OE), através da FCT/MCTES.

Para ti, que partiste tão cedo

o júri

presidente

Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Márcia Carvalho Neves

Investigadora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Patrícia Alexandra Nunes Pereira

Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra

agradecimentos

Em primeiro lugar, um reconhecimento especial à minha orientadora, a Doutora Márcia Neves, por ter acreditado nas minhas capacidades, pelas mensagens de coragem e incentivo, por me levar mais longe, por me ensinar tanto e por me ter acompanhado durante este trabalho.

Ao meu Co-orientador, o Doutor Augusto Pedro, por me ter ajudado a adquirir novas competências, pela paciência e ajuda no esclarecimento das minhas questões.

Aos meus colegas de laboratório do grupo Path, em particular, à aluna de doutoramento Leonor Castro por toda a ajuda, apoio, paciência e, por estar sempre disponível para me ouvir e esclarecer dúvidas independentemente da hora ou dia da semana.

Como seria de esperar, um gigante obrigado à minha família mais chegada pelo apoio incondicional, durante estes 5 anos, foi graças a eles que cheguei até aqui.

Por último e não menos importante, um agradecimento especial à minha namorada Amália, que esteve sempre ao meu lado nos momentos bons e menos bons e que sempre foi o meu porto de abrigo nesta aventura universitária.

Palavras-chave

Proteínas recombinantes; Interferão alfa-2b; Purificação; Cromatografia; Líquidos iônicos suportados

Resumo

A utilização de biofármacos tem aumentado ao longo dos anos. Em particular, o interferão alfa-2b apresenta atividades antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, encontrando-se indicado para o tratamento de diversas neoplasias e infecções virais. Não obstante a importância clínica do interferão alfa-2b, o seu custo é ainda relativamente elevado devido essencialmente à falta de estratégias *downstream* económicas, pelo que se torna necessário o desenvolvimento de processos de fabrico capazes de fornecer biofármacos com alta pureza e atividade biológica que atendam os requisitos das agências reguladoras. Face ao exposto, o principal objetivo deste trabalho consiste na preparação de líquidos iônicos suportados em sílica e posterior aplicação para a extração e purificação seletivas do interferão alfa-2b a partir de extratos recombinantes de *E. coli*. Desta forma, foram sintetizados líquidos iônicos suportados em partículas de sílica esférica, nomeadamente, [Sil][C₃C₁Im]Cl, [Sil][N₃₁₁₄]Cl, [Sil][N₃₁₁₆]Cl, [Sil][N₃₁₁₈]Cl, [Sil][N₃₂₂₂]Cl, [Sil][N₃₄₄₄]Cl, [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl. A caracterização destes materiais demonstrou que os líquidos iônicos se encontravam corretamente imobilizados no suporte, mas com diferentes graus de imobilização. Após produção e recuperação do interferão alfa-2b a partir de corpos de inclusão, foi delineada uma estratégia cromatográfica para a sua purificação através da otimização da composição da fase móvel (força iónica e pH), visando explorar maioritariamente a presença de interações iónicas ou hidrofóbicas entre a proteína alvo e os *SILs* sintetizados. Após várias otimizações em *batch*, os resultados mais promissores foram obtidos com o [Sil][C₃C₁Im]Cl, permitindo a eluição do interferão alfa-2b com uma pureza aceitável com 0,35 M de NaCl (injeção da amostra com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,35 e 1,5 M de NaCl) e com 1,0 M de sulfato de amónio (injeção da amostra com 1,8 M de sulfato de amónio, seguida de eluição com 1,0 e 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM), em condições que favoreciam principalmente interações iónica e hidrofóbicas, respetivamente. As condições referidas foram aplicadas em coluna, sendo de realçar o resultado promissor na purificação do interferão alvo no *SIL* já referido, bem como ao nível da reprodutibilidade dos resultados e regeneração do suporte. Além disso, deve ser mencionado, que outros *SILs* também exibiram um desempenho de purificação melhorado, não se comportando apenas como trocadores de aniões e ligantes hidrofóbicos, mas também exibindo um comportamento multimodal. Em conclusão, este trabalho demonstrou o alto potencial apresentado pelos *SILs* para serem aplicados como fases estacionárias na cromatografia líquida preparativa de proteínas terapêuticas. Contudo, para fortalecer esta possibilidade, esforços futuros devem incluir a avaliação da citotoxicidade, da estabilidade e atividade proteica, entre outros aspetos.

Keywords

Recombinant proteins; Interferon alpha-2b; Purification; Chromatography; Supported ionic liquids.

Abstract

The use of biopharmaceuticals has increased over the years. In particular, interferon alfa-2b has antiviral, antiproliferative, and immunomodulating activities, and is indicated for the treatment of several neoplasms and viral infections. Despite the clinical importance of interferon alfa-2b, its cost is still relatively high due to the lack of cost-effective downstream strategies, being therefore necessary to develop less expensive manufacturing processes able to provide biopharmaceuticals with high purity and biological activity that meet the requirements of regulatory agencies. In view of the above, the main objective of this work is the preparation of ionic liquids supported on silica and their subsequent application for the selective extraction and purification of interferon alfa-2b from recombinant *E. coli* extracts. In this way, ionic liquids supported on spherical silica particles were synthesized, namely, [Sil][C₃C₁Im]Cl, [Sil][N₃₁₁₄]Cl, [Sil][N₃₁₁₆]Cl, [Sil][N₃₁₁₈]Cl, [Sil][N₃₂₂₂]Cl, [Sil][N₃₄₄₄]Cl, [Sil][N₃₆₆₆]Cl and [Sil][N₃₈₈₈]Cl. The characterization of these materials demonstrated that the ionic liquids were correctly immobilized on the support, but with different degrees of immobilization. After production and recovery of interferon alfa-2b from inclusion bodies, a chromatographic strategy for its purification was outlined by optimizing the mobile phase composition (ionic strength and pH), envisaging to explore mostly the presence of ionic or hydrophobic interactions between the target protein and the synthesized materials. After several optimizations in a batch mode, the most promising results were obtained with [Sil][C₃C₁Im]Cl, allowing the recovery of interferon α -2b with acceptable purity with 0.35 M NaCl (sample injection with Tris 10 mM pH 8, followed by elution with 0.35 and 1.5 M NaCl) and 1.0 M ammonium sulfate (sample injection with 1.8 M ammonium sulfate, followed by elution with 1.0 and 0.5 M ammonium sulfate, and Tris 10 mM), respectively in conditions that mainly favour the establishment of ionic and hydrophobic interactions. The referred conditions were applied in column tests, highlighting the promising result for the purification of interferon alfa-2b in the referred material, as well as in terms of the reproducibility of the results and regeneration of the support. It should be additionally remarked that along with [Sil][C₃C₁Im]Cl, other SILs also display an improved purification performance, behaving not only as anion-exchangers and hydrophobic ligands, but also displaying a multimodal chromatographic behaviour. In conclusion, this work demonstrates the high potential displayed by SILs to be applied as stationary phases in preparative liquid chromatography of therapeutic proteins. However, to strengthen this possibility, future endeavours should comprise the assessment of cytotoxicity, stability, and protein activity, among other aspects.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Âmbito da Investigação	2
1.2 O mercado dos biofármacos.....	5
1.3 Interferão alfa-2b	7
1.3.1 Classificação e mecanismo de ação.....	7
1.3.2 Estrutura e propriedades físico-químicas	9
1.3.3 Aplicabilidade terapêutica	11
1.3.4 Condicionamentos farmacocinéticos	15
1.4 Proteínas terapêuticas recombinantes	17
1.4.1 Processo geral para obtenção de proteínas recombinantes.....	17
1.4.2 Produção de proteínas terapêuticas recombinantes (etapa de <i>upstream</i>)	19
1.4.3 Recuperação e purificação de proteínas terapêuticas recombinantes (etapa de <i>downstream</i>).....	26
1.5 Líquidos Iônicos	33
1.5.1 Estrutura química e características gerais.....	33
1.5.2 Imobilização de líquidos iônicos em suportes sólidos e potenciais aplicações	36
1.6 Motivação e objetivos da dissertação	41
2. Parte experimental.....	43
2.1 Materiais utilizados.....	44
2.2 Síntese dos líquidos iônicos suportados (<i>SILs</i>).....	46
2.3 Caracterização dos líquidos iônicos suportados (<i>SILs</i>)	49
2.3.1 Análise Elementar.....	49
2.3.2 Determinação da área de superfície (<i>SBET</i>)	49
2.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (<i>FTIR</i>)	49
2.3.4 Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ¹³ C (RMN ¹³ C).....	50
2.3.5 Determinação do ponto de carga zero (PCZ)	50
2.3.6 Microscopia eletrônica de varrimento (<i>SEM</i>).....	50
2.4 Produção recombinante do IFN α -2b na bactéria <i>E. coli</i>	50
2.5 Recuperação (lise bacteriana e solubilização) do IFN α -2b	51
2.6 Ensaio de purificação	52

2.6.1	Ensaio em <i>batch</i>	52
2.6.2	Ensaio em coluna	53
2.6.3	Regeneração da coluna	54
2.6.4	Concentração das frações cromatográficas: ultrafiltração vs precipitação....	54
2.7	Avaliação qualitativa do fator de purificação de IFN α -2b por eletroforese desnaturante e redutora de acrilamida.....	54
3.	Resultados e discussão	55
3.1	Síntese e caracterização dos <i>SILs</i>	56
3.1.1	Análise elementar e área de superfície	56
3.1.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (<i>FTIR</i>)	59
3.1.3	Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C (RMN ^{13}C).....	60
3.1.4	Ponto de carga zero (PCZ).....	63
3.1.5	Microscopia eletrônica de varrimento (<i>SEM</i>).....	65
3.2	Produção e recuperação do IFN α -2b	68
3.3	Ensaio cromatográfico em <i>batch</i>	70
3.3.1	Ensaio em condições que promovem maioritariamente interações iônicas .	71
3.3.2	Ensaio em condições que promovem maioritariamente interações hidrofóbicas.....	80
3.3.3	Avaliação do potencial do ligando na purificação do IFN α -2b.....	89
3.4	Ensaio cromatográfico em coluna	91
4.	Conclusão e perspectivas futuras	95
5.	Bibliografia	99
6.	Anexos.....	113

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resposta ao tratamento de diversas patologias com o IFN α -2b, em função do desaparecimento da sintomatologia, em percentagem.	12
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes.....	21
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da utilização de corpos de inclusão.	27
Tabela 4 - Comparação entre diferentes métodos de purificação para o IFN α -2b reportados na literatura.	32
Tabela 5 - Reagentes utilizados na síntese e caracterização dos SILs, com o respetivo grau de pureza e fornecedor.....	44
Tabela 6 - Reagentes, estirpe bacteriana e plasmídeo utilizados na produção e recuperação do IFN α -2b, com o respetivo grau de pureza e fornecedor.	45
Tabela 7 - Reagentes utilizados nos ensaios cromatográficos e respetiva análise das frações obtidas, com o grau de pureza e fornecedor.	46
Tabela 8 - Estrutura química de todos os SILs sintetizados, bem como as respetivas abreviaturas, “fonte de catião” e volume utilizado correspondente a 0,05 moles.	48
Tabela 9 - Percentagem mássica de carbono, hidrogénio e nitrogénio do material intermediário e de cada SIL.....	56
Tabela 10 - Quantidade de LI ligada à sílica esférica ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$).....	58
Tabela 11 - PCZ da sílica ativada, do $[\text{Si}][\text{C}_3]\text{Cl}$ e de cada SIL sintetizado, bem como a respetiva carga de superfície para um determinado intervalo de valores de pH.	64
Tabela 12 - Cargas superficiais da proteína alvo e de cada material sintetizado, em função do pH da solução.	76
Tabela S1 - Valores tabelados da densidade, massa molar e percentagem massa/massa de cada SIL sintetizado.....	114
Tabela S2 - Valores de absorvância obtidos a 280 nm, após um ensaio em batch com o material $[\text{Si}][\text{C}_3\text{C1Im}]\text{Cl}$, utilizando um gradiente ascendente de NaCl dissolvido em solução tampão Tris 10 mM pH 8(Tris 10 mM pH 8; 0,4 e 1,5 M de NaCl).....	114
Tabela S3 - Valores de absorvância obtidos a 280 nm, após um ensaio em batch com o material $[\text{Si}][\text{C}_3\text{C1Im}]\text{Cl}$, utilizando um gradiente ascendente de NaCl dissolvido em solução fosfato 200 mM pH 8 (fosfato 200 mM pH 8; 0,4 e 1,5 M de NaCl).	115

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição, por classe, de proteínas terapêuticas aprovadas como biofármacos e aceites pela Food and Drug Administration no período compreendido entre 2011 e 2016. . 2	
Figura 2- Distribuição de proteínas terapêuticas aprovadas como biofármacos e aceites pela FDA no período compreendido entre 2011 e 2016, (A) Por área terapêutica (B) Na área oncológica..... 3	
Figura 3- Número de biofármacos aprovados nos EUA e na UE desde 1989 até 2018, em intervalos de 5 anos. 6	
Figura 4- Diferenças entre as vias de sinalização celulares dos IFNs dos tipos I e II..... 8	
Figura 5- (A) Estrutura molecular do IFN α -2b; (B) Isoformas do IFN α -2b e respetivas ligações dissulfureto. 10	
Figura 6- Esquema resumo da ação antiviral desencadeada pelos IFNs. A célula à esquerda representa uma ação autócrina e a célula à direita uma ação parácrina. 14	
Figura 7- Tecnologia de ADN recombinante que compreende cinco etapas principais: (1) cortar o ADN desejado por enzimas de restrição, (2) amplificar as cópias dos genes por PCR, (3) inserir os genes nos vetores, (4) transferir os vetores para o organismo hospedeiro e (5) obter os produtos de genes recombinantes.. 18	
Figura 8- Fluxograma geral do processo de fabrico de biofármacos.. 19	
Figura 9- Anatomia de um vetor de expressão..... 23	
Figura 10- O sistema pET (DE3/T7). 24	
Figura 11- Tipos de cromatografia líquida utilizados na purificação de biomoléculas, de acordo com o mecanismo de separação..... 28	
Figura 12- Diferentes métodos de preparação de uma coluna multimodal. 31	
Figura 13- Estrutura química dos catiões e aniões mais comuns utilizados na formação de LIs..... 34	
Figura 14- Incorporação de LIs na estrutura de um poro (material de suporte) por duas estratégias diferentes: (A) quimiosorção e (B) fisiosorção. 37	
Figura 15- Imobilização de LIs num suporte por quimiosorção. Em A e B apenas o catião ou anião é imobilizado no suporte, enquanto os contra iões estão livres. Em C e D são LIs zwitteriônicos imobilizados, onde o catião e o anião estão ligados através de uma ligação covalente. Em E, o catião e o anião são co-imobilizados no suporte. 38	
Figura 16- Processo global de síntese de SILs. 47	

Figura 17- Espetro FTIR da sílica ativada, do material intermediário e de todos os SILs sintetizados.	59
Figura 18- Espetros de RMN ¹³ C para os diferentes materiais sintetizados.....	60
Figura 19- Espetro de RMN ¹³ C do [Sil][C ₃]Cl.	61
Figura 20- Espetro de RMN ¹³ C do [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl.....	61
Figura 21- Espetro de RMN ¹³ C do [Sil][N ₃₁₁₄]Cl.	62
Figura 22- Espetro de RMN ¹³ C do [Sil][N ₃₁₁₆]Cl.	62
Figura 23- Espetro de RMN ¹³ C do [Sil][N ₃₁₁₈]Cl.	62
Figura 24- Análise, com recurso a SEM, da superfície da sílica ativada e de cada SIL sintetizado. Imagens realizadas com uma ampliação de 250 x e 1000 x, à esquerda e direita, respetivamente.	67
Figura 25- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas após a lise celular, incluindo as que resultam do processo de lavagem e solubilização de corpos de inclusão de E. coli BL21 (DE3) recombinante contendo pET-3a_IFN α -2b.	69
Figura 26- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8 ou fosfato 200 mM pH 8, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8 ou em fosfato 200 mM pH 8).	72
Figura 27- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).	74
Figura 28- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 0,05 M de NaCl em Tris 10 mM pH 8 ou Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M ou 0,35 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).	75
Figura 29- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][N ₃₁₁₆]Cl. O ensaio foi	

realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,35 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).....	77
Figura 30- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N ₃₁₁₄]Cl, [Sil][N ₃₁₁₆]Cl e [Sil][N ₃₁₁₈]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 6,5, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 6,5).	79
Figura 31- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][N ₃₁₁₆]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 2,0 M de sulfato de amónio em Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com Tris 10 mM pH 8 e 1,5 M de NaCl em Tris 10 mM pH 8.	81
Figura 32- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N ₃₁₁₆]Cl e [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 2,0 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.	82
Figura 33- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N ₃₂₂₂]Cl, [Sil][N ₃₄₄₄]Cl, [Sil][N ₃₆₆₆]Cl e [Sil][N ₃₈₈₈]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.	84
Figura 34- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N ₃₁₁₄]Cl, [Sil][N ₃₁₁₆]Cl e [Sil][N ₃₁₁₈]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.	86
Figura 35- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.....	88

Figura 36- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas após ensaios em batch com o material [Sil][C3]Cl, explorando maioritariamente a presença de interações iônicas (em A) e interações hidrofóbicas (em B).	90
Figura 37- Perfil cromatográfico obtido após ensaio em coluna com o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl, explorando o estabelecimento de interações iônicas, e eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações selecionadas.....	91
Figura 38- Perfil cromatográfico obtido após ensaio em coluna com o material [Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl, explorando o estabelecimento de interações hidrofóbicas, e eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações selecionadas.....	92
Figura S1- Potencial zeta em função do pH para a sílica ativada, material intermediário e todos os SILs sintetizados.	116

Lista de Abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ARN- Ácido ribonucleico

ARN_pT7- Ácido ribonucleico polimerase T7

BA- Quantidade de ligação do inglês (*Bounding amount*)

CA- Cromatografia de afinidade

CFR- Cromatografia de fase reversa

CFG- Cromatografia de filtração em gel

CIH- Cromatografia de interação hidrofóbica

CTI- Cromatografia de troca iônica

EMA- Agência europeia do medicamento do inglês (*European Medicines Agency*)

FDA- *Food and Drug Administration*

IFNs- Interferões

IFN α -2b- Interferão alfa-2b

IPTG- Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosida

ISGs- Genes estimulados por IFNs do inglês (*Interferons Stimulated Genes*)

LIs- Líquidos Iônicos

SILs- Líquidos Iônicos Suportados do inglês (*Supported ionic liquids*)

SEM- Microscopia eletrônica de varrimento do inglês (*Scanning Electron Microscope*)

PMADs- Padrões moleculares associados a danos

PMAPs- Padrões moleculares associados a patógenos

PMAVs- Padrões moleculares associados a venenos

PEG- Polietilenoglicol

PCZ- Ponto de carga zero

pI- Ponto isoelétrico

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase do inglês (*Polymerase chain reaction*)

SAB- Sistema aquoso bifásico

1. Introdução

1.1 Âmbito da Investigação

Ao longo dos últimos anos tem-se verificado um aumento da ineficácia de diversas terapias convencionais, traduzida por exemplo num aumento da resistência a antibióticos, e que tem criado problemas ao nível da saúde em diversos países¹. Como tal, o desenvolvimento de terapias alternativas, entre as quais constam a utilização de biofármacos, apresenta-se como a principal solução para enfrentar este tipo de problemas, permitindo desta forma não só uma melhoria da qualidade de vida como também uma diminuição da taxa de mortalidade associada a diversas doenças, tais como cancro, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras².

Os biofármacos são produtos de origem biológica e de elevado peso molecular que são produzidos a partir de organismos vivos, células, animais ou plantas, e são geralmente obtidos por engenharia genética². Existem diferentes tipos de biofármacos, nomeadamente, proteínas recombinantes, anticorpos, ácidos nucleicos ou produtos derivados destes, sendo que as proteínas e os anticorpos predominam no mercado biofarmacêutico. No período compreendido entre 2011 e 2016, uma grande variedade de proteínas terapêuticas foram aprovadas para terapia em humanos, sendo apresentadas como novas soluções terapêuticas no combate a diversas indicações clínicas. A Figura 1 representa as principais classes de proteínas terapêuticas aprovadas durante este período³.

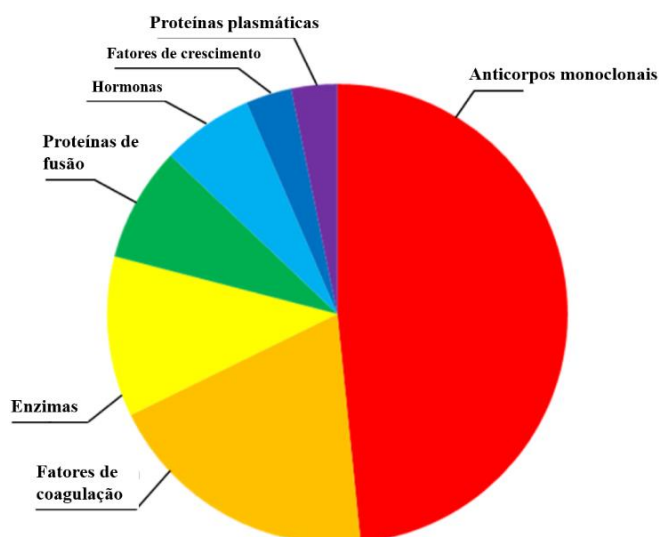


Figura 1- Distribuição, por classe, de proteínas terapêuticas aprovadas como biofármacos e aceites pela Food and Drug Administration no período compreendido entre 2011 e 2016³.

Estes produtos de base biológica possuem várias aplicações em áreas de interesse para a medicina, como retratado na Figura 2A, sendo de realçar a sua vasta aplicabilidade nas áreas da hematologia e da oncologia³. Atualmente, a área das neoplasias hematológicas é a que apresenta o maior número de medicamentos aprovados para tratamento (Figura 2B)³. Através de uma análise mais detalhada das estatísticas globais do cancro, estima-se que em todo o mundo durante o ano de 2018 ocorreram cerca de 18,1 milhões de novos casos de cancro e que 9,6 milhões de mortes ocorreram devido a esta doença⁴. Além disso, prevê-se um aumento tanto da mortalidade como da prevalência de novos casos durante os próximos anos, sendo previsto 22,2 milhões de novos casos em 2030. Desta forma, é de realçar a importância do desenvolvimento e aparecimento de proteínas recombinantes terapêuticas aprovadas pelas agências reguladoras - *Food and Drug Administration (FDA)* e *European Medicines Agency (EMA)*, respetivamente, nos Estados Unidos da América (EUA) e na União Europeia (UE)- , entre os quais se destacam vários tipos de interferões (IFNs), que são amplamente utilizados no tratamento de patologias do foro oncológico^{3,5}.

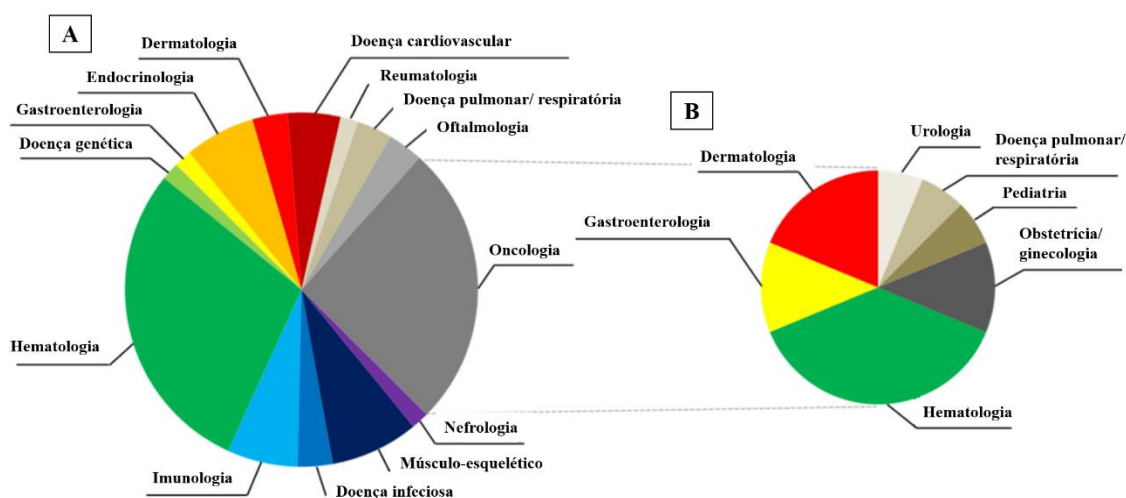


Figura 2- Distribuição de proteínas terapêuticas aprovadas como biofármacos e aceites pela FDA no período compreendido entre 2011 e 2016, (A) Por área terapêutica (B) Na área oncológica³.

No entanto, e apesar de em certas patologias o recurso a biofármacos ser a única terapia disponível, o custo de produção de proteínas terapêuticas recombinantes de elevada qualidade e elevado grau de pureza é bastante elevado⁶. Tal facto, deve-se essencialmente à inexistência de métodos de purificação eficazes e economicamente

viáveis, uma vez que a etapa de purificação é a responsável pela maioria dos custos de produção dos biofármacos⁶.

Os IFNs são glicoproteínas naturais de sinalização celular que pertencem à classe das citocinas⁷. A maioria destas glicoproteínas possui um peso molecular na ordem dos 20 kDa, e são produzidas por células do sistema imunitário em resposta a agentes patogénicos, fazendo parte da primeira linha de componentes de defesa dos vertebrados contra agentes infecciosos⁸. Estas glicoproteínas participam no controlo da replicação celular, e são modificadores da resposta imunológica, apresentando efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores⁹. Adicionalmente, são utilizados há aproximadamente três décadas como agentes terapêuticos em diversas doenças, nomeadamente infeções víricas e mais recentemente no cancro^{6,7}.

Em particular, o interferão alfa-2b (IFN α -2b) é aplicado em diversas neoplasias e doenças virais, sendo aprovado para o tratamento de diversas patologias como sarcoma de Kaposi, leucemia de células pilosas, vírus da hepatite B e C, entre outras⁷. Face à vasta aplicabilidade terapêutica do IFN α -2b, o mercado cresceu a um ritmo elevado desde a sua descoberta, sendo atualmente um dos IFNs mais utilizados, comercializados e considerado, desde 2015, uma opção terapêutica essencial para a Organização Mundial da Saúde (OMS)^{10,11}. Pelo referido, é do superior interesse o desenvolvimento de processos de produção, recuperação e purificação mais eficientes e económicos¹¹.

De uma forma geral, o processo de fabrico de proteínas terapêuticas recombinantes compreende duas etapas principais: a etapa de produção propriamente dita (*upstream*), que está associada à escolha de um determinado hospedeiro e respetiva cultura e manutenção das células, seguido de otimizações de modo a maximizar a produção da mesma; e a etapa de recuperação e purificação da biomolécula alvo a partir de uma matriz heterogénea e altamente complexa (*downstream*) que geralmente engloba técnicas cromatográficas e corresponde à parte mais dispendiosa do processo¹². Esta última apresenta-se como o passo limitante no fabrico de biofármacos, levando a que a investigação se tenha intensificado com o intuito de desenvolver novos métodos para se obter rendimentos de recuperação e percentagens de purificação superiores¹³. Todavia, a maioria dos métodos utilizados apresentam como principais desvantagens o facto de serem dispendiosos, morosos ou de difícil escalonamento para escalas industriais.

Pelo referido, torna-se assim evidente, a necessidade de desenvolver um método de purificação que permita: 1) originar melhores rendimentos; 2) efetuar a purificação numa única operação unitária, permitindo desta forma uma redução dos custos associados ao processo; e 3) apresentar capacidade para ser posteriormente ajustado a uma escala grande para produção industrial^{6,11,14}. Nesse sentido, os líquidos iónicos suportados (*SILs*) podem constituir uma potencial e valiosa alternativa¹⁵. De facto, tendo por base a utilização de técnicas cromatográficas com recurso a *SILs* como fase estacionária, vários trabalhos de investigação têm vindo a ser reportados para a extração, concentração e purificação de produtos de valor acrescentado, nomeadamente enzimas, compostos aromáticos, ácidos nucleicos, entre outros¹⁵⁻¹⁸. Este tipo de material apresenta a vantagem adicional de conseguir conciliar diversas características vantajosas dos líquidos iónicos (LIs) utilizados, com outras do material de suporte escolhido¹⁵. Para além disso, os *SILs* possuem uma elevada resistência química, facilidade de aplicação à escala industrial com baixo custo, e grupos funcionais à superfície que podem ser adaptados para uma excelente seletividade e biocompatibilidade para a biomolécula em estudo^{19,20}.

Face ao exposto, esta dissertação compreende o desenvolvimento de uma nova estratégia para a extração seletiva e consequente purificação do IFN α -2b, produzido como proteína recombinante num hospedeiro procariota, mais concretamente *Escherichia coli* (*E. coli*), e purificado com auxílio de *SILs* em sílica. O desenvolvimento desta nova tecnologia visa a obtenção de biofármacos menos dispendiosos e com os padrões de pureza que cumpram os requisitos da indústria biofarmacêutica.

1.2 O mercado dos biofármacos

Decorria o ano de 1982, quando a insulina recombinante humana *Humulin*, produzida a partir de *E. coli*, foi aceite para o tratamento da diabetes, tendo sido o primeiro biofármaco recombinante oficialmente aprovado pela *FDA* nos EUA²¹. A partir desta data, o mercado biofarmacêutico tem vindo a crescer a um ritmo elevado. Em 1986, a proteína humana ativadora de plasminogénio tecidual tornou-se a primeira proteína terapêutica proveniente de células de mamíferos a obter a aprovação do mercado. Ainda durante esse ano, a *FDA* aprovou o primeiro anticorpo monoclonal terapêutico (Orticlone OKT3) e o primeiro IFN α -2b, comercializado sob a denominação de Intron A (Schering Corporation)²²⁻²⁴.

De acordo com a literatura, de 2015 a 2018, cerca de 112 biofármacos foram aprovados nos EUA e na UE, demonstrando a enorme procura destes produtos para o tratamento de diversas patologias²⁵. A Figura 3 demonstra a evolução, em termos do número de aprovações, dos biofármacos desde o ano de 1989, em intervalos de 5 em 5 anos, onde se verifica que nos últimos 5 anos o número de aprovações quase duplicou em relação a períodos anteriores²⁵. Isto, acontece devido essencialmente a dois fatores, o primeiro é a exigência por parte do próprio mercado farmacêutico, que cada vez mais recorre a este tipo de produtos e, o segundo é o aparecimento dos produtos biossimilares^{3,26}.

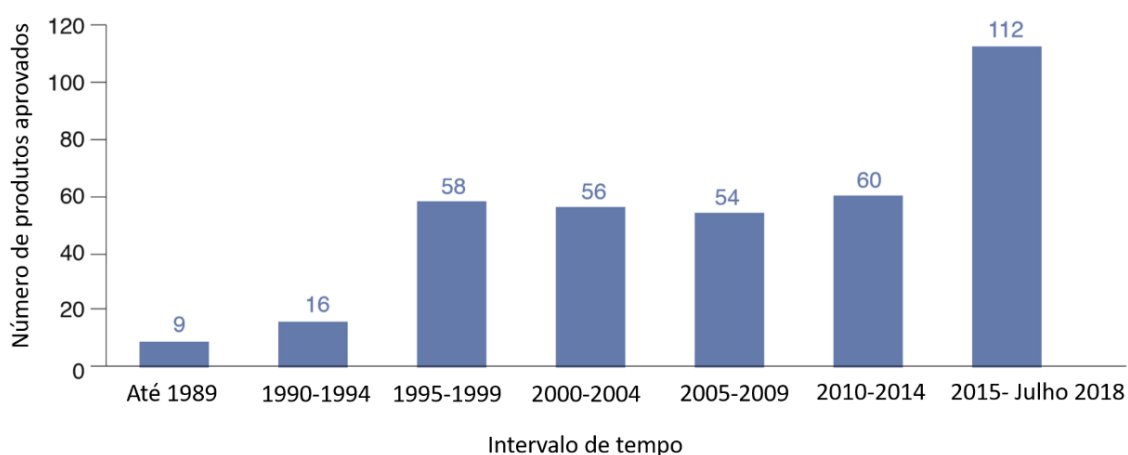


Figura 3- Número de biofármacos aprovados nos EUA e na UE desde 1989 até 2018, em intervalos de 5 anos²⁵.

Os biossimilares são, como o próprio nome indica, produtos biológicos semelhantes a medicamentos já existentes cuja patente já expirou³. Desta forma, este tipo de produtos acaba por entrar no mercado com os mesmos efeitos que um medicamento patenteado, mas com um custo claramente inferior. Tal facto, leva a que a população opte por este tipo de produto mais económico, e como tal, a sua aprovação é cada vez maior^{25,26}.

Atualmente, mais de 550 proteínas com potencial como biofármacos estão a ser avaliadas em ensaios clínicos, sendo que os avanços biotecnológicos em áreas como a genómica e proteómica apresentam enorme relevância na descoberta desses novos candidatos²⁵. Além disso, uma estimativa referente ao período compreendido entre 2014 e 2017 sugere que o mercado global de produtos biofarmacêuticos atingiu valores na ordem dos 651 biliões de dólares, sendo projetado o dobro deste valor para o ano de 2021^{2,25}.

No que diz respeito ao mercado das proteínas terapêuticas, o número total de vendas tem vindo a aumentar, e projeta-se que nos próximos anos exista um aumento na aprovação deste tipo de biomoléculas terapêuticas^{3,25}. Entre as proteínas terapêuticas, é importante realçar o papel do IFN que é comercializado há mais de 30 anos com um impacto considerável no mercado global de vendas das proteínas terapêuticas^{3,7,25}. As vendas de IFNs atingiram um pico entre as décadas de 1980 e 2000, uma vez que, foram abundantemente comercializados e classificados com uma “droga múltipla”, com uma gama crescente de efeitos terapêuticos. Como os IFNs podem ser aplicados em diferentes tipos de doenças, espera-se que estes continuem a ocupar quotas importantes do mercado biofarmacêutico em todo o mundo. Assim, o desenvolvimento de métodos de produção e, essencialmente de purificação são uma necessidade para que o IFN apareça no mercado com o mesmo nível de eficácia, mas economicamente mais viável²⁵.

1.3 Interferão alfa-2b

1.3.1 Classificação e mecanismo de ação

Decorria o ano de 1957, quando Isaacs e Lindemann²⁷ verificaram pela primeira vez um efeito de interferência viral causado por um material bioativo isolado de células infetadas. Estes dois investigadores, atribuíram o termo interferão para este agente interferente. Nas décadas seguintes, a comunidade científica realizou várias tentativas de produção em larga escala e purificação do IFN, tendo todas elas pouco sucesso²⁸. Apenas em 1978, com o desenvolvimento da tecnologia de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante e o aparecimento de ferramentas de biologia molecular adequadas, foi possível obter uma quantidade de IFN suficiente para se realizar uma caracterização física e química apropriada desta biomolécula^{29,30}.

A análise mais pormenorizada deste agente bioativo, veio confirmar que o IFN não era uma única proteína^{29,30}. Devido ao facto de existirem diversas moléculas de IFN, surgiu a necessidade de estabelecer um sistema de classificação das diferentes classes de IFN, no qual as letras α , β e γ correspondem, a IFNs produzidos por leucócitos, fibroblastos e linfócitos, respetivamente^{29,30}. Posteriormente, foi ainda descoberta a classe ω em 1985³¹, que possui uma sequência de aminoácidos que apresenta uma homologia de 60-70% com os IFNs da classe α , e a classe τ , descoberta em células de ovino³².

A investigação em torno das propriedades do IFN continuou, o que proporcionou a classificação de 2 tipos principais, consoante a sua capacidade para se ligarem a determinados recetores celulares³³. O tipo I engloba as classes α , β , ω , τ . Por outro lado, a classe γ , inicialmente relatada por Wheelock³⁴ em 1965, é a única que faz parte do tipo II³⁵. A Figura 4, resume as diferenças existentes ao nível da sinalização intracelular entre os IFNs dos tipos I e II³³.

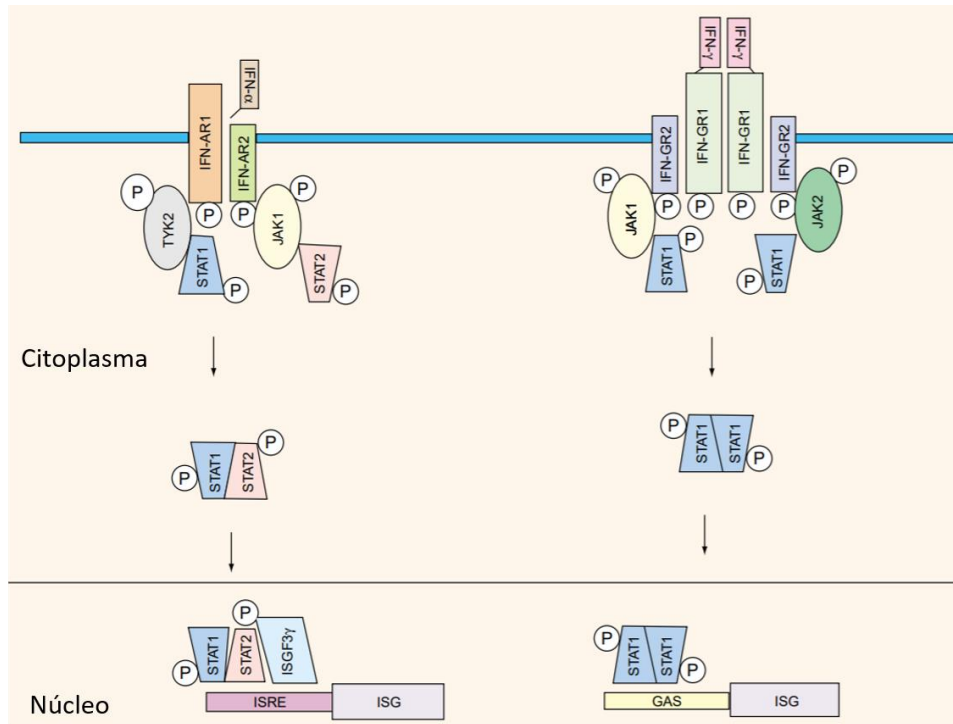


Figura 4- Diferenças entre as vias de sinalização celulares dos IFNs dos tipos I e II³³.

Para os IFNs do tipo I existem duas subunidades de recetores conhecidas por *IFN-AR1* e *IFN-AR2* que estão ligados a proteínas cinase, mais concretamente *Tyk2* e *JAK1*, respetivamente³³. Relativamente ao IFN γ (tipo II), existem duas subunidades de recetores, *IFN-GR1*, associado a *JAK1*, e *IFN-GR2*, associado a *JAK2*³⁶. Após ligação do IFN ao recetor, este sofre oligomerização, com transfosforilação das *JAK*, seguido de fosforilação das caudas citoplasmáticas das moléculas recetoras^{33,36,37}. Este fenómeno, fornece um local de acoplamento para as *Stats*, que são fosforiladas, juntamente com o fator regulador de interferão 9 (*IRF9* ou p48), pelos *JAK*. Após fosforilação, as *Stats* dimerizam e são libertadas das moléculas recetoras e translocadas em simultâneo com o *IRF9* para o núcleo, enquanto constituem um complexo trimétrico conhecido como

ISGF3, onde ativam a transcrição de genes estimulados por IFNs (*ISGs*). No caso de IFN do tipo I, os *ISGs* podem ser identificados pela presença de um elemento de resposta estimulado por IFN (*ISRE*) em regiões promotoras^{33,37}. Os IFNs do tipo II possuem a presença de um elemento único chamado local de ativação do IFN γ (*GAS*)^{33,36}.

A família de IFNs da classe α , pertencentes ao tipo I, é expressa por 18 genes humanos, codificando um total de 12 subtipos de proteínas IFN α diferentes (IFN α 1; IFN α 2... IFN α 21- as lacunas na sequência são devidas a sequências publicadas que atualmente sabe-se serem errôneas), com cerca de 80 % de homologia em termos de cadeias de aminoácidos^{30,38,39}. Para além disso, alguns desses subtipos têm variantes alélicas designadas α -2a, α -2b e α -2c, que diferem ao nível estrutural na sequência de aminoácidos. Especificamente, o IFN α -2b possui na posição 23 o aminoácido arginina, enquanto o IFN α -2a possui o aminoácido lisina^{29,38,39}.

O gene IFN α , localizado no cromossoma humano 9p22, codifica uma família de proteínas pertencentes à classe das citocinas³³. Esta classe de IFN possui diversas atividades biológicas diretas e indiretas, tais como antiviral⁴⁰, antiproliferativa⁴¹ e imunomoduladora^{23,33}. Estas atividades biológicas possuem efeitos sinérgicos ou aditivos entre elas, o que dificulta um total conhecimento sobre os seus papéis fisiológicos específicos e individuais. Todavia, é do conhecimento científico que o IFN α é um agente promissor no tratamento de variadas patologias, sendo as ações de todos os seus subtipos classificadas como pleiotrópicas e redundantes^{23,40-42}.

Apesar da forma natural do IFN α ter sido utilizada e comercializada em abundância, com a descoberta da técnica do ADN recombinante, foi possível adicionar uma maior diversidade de espécies do IFN α através da combinação de segmentos das sequências parentais das diferentes classes de IFN⁴³. Assim, foi possível obter diversos híbridos de IFN com ainda mais potencialidades terapêuticas quando comparados com a forma natural⁴⁴.

1.3.2 Estrutura e propriedades físico-químicas

A primeira forma recombinante a ser caracterizada corresponde ao IFN α -2a⁴⁵, sendo que posteriormente se caracterizaram outras, nomeadamente, a do IFN α -2b, que é a espécie de interferão alvo neste trabalho⁴⁵.

A caracterização do IFN α -2b, permitiu chegar à conclusão de que esta glicoproteína possui um ponto isoelétrico (pI) de 5,9¹², um peso molecular que varia entre 19 e 20 kDa, principalmente devido a alterações no processamento de aminoácidos no terminal C e modificações pós-tradução⁴⁶, e é constituída por 165-166 aminoácidos, com 2 ligações dissulfureto formadas por cisteínas nas posições 1 e 98, bem como nas posições 29 e 138 (Figura 5A)^{23,47}. Sendo esta última de extrema importância para a atividade biológica característica deste IFN²³.

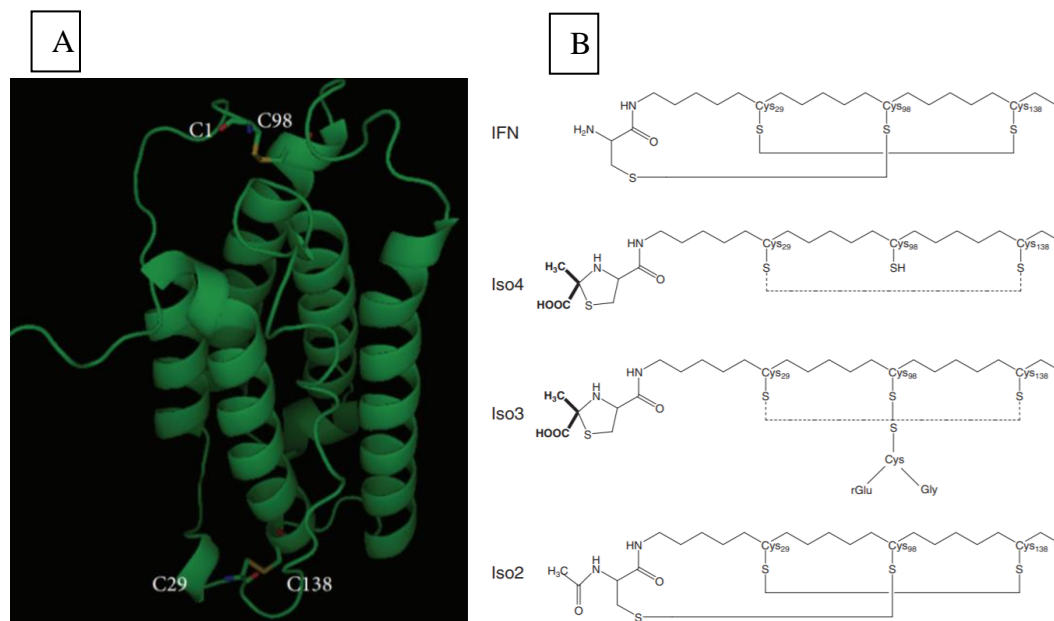


Figura 5- (A) Estrutura molecular do IFN α -2b²³; (B) Isoformas do IFN α -2b e respectivas ligações dissulfureto⁴⁸.

Para além disso, estruturalmente é classificada como um dímero não covalente com interação mediada por dedos de zinco. Cada monómero é constituído por 5 hélices α classificadas de A a E, que estão conectadas por um loop AB, BC, CD e DE. A ligação dissulfureto Cisteína 29 – Cisteína 138 conecta a hélice E ao loop AB e a hélice C à extremidade do N-terminal. O loop AB e as hélices B, C, D e E possuem determinados resíduos de aminoácidos com extrema importância para a ligação ao recetor celular e integridade estrutural^{23,45}.

O IFN α -2b ao ser produzido por células geneticamente modificadas, pode existir na forma de diferentes isómeros descritos na Figura 5B. Estes isómeros foram caracterizados por espectrometria de massa e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo designados pelas isoformas 2, 3 e 4⁴⁸.

A glicosilação é também um aspeto a ter em conta, nomeadamente para a escolha o hospedeiro apropriado²³. Neste aspeto, apenas dois subtipos de IFN α são glicosilados: o IFN α -2b, O-glicosilado na posição 106 num resíduo de treonina e a espécie IFN α -14c, N-glicosilada na posição 72 num resíduo de asparagina⁴⁹. Todavia, o facto de ser produzida em *E. coli* não acarreta nenhum tipo de desvantagem relativamente ao padrão de glicosilação, visto que, as atividades antivírica, antiproliferativa e imunomoduladora do IFN α -2b se mantêm^{23,49}.

1.3.3 Aplicabilidade terapêutica

As diversas atividades biológicas do IFN α -2b, mais concretamente, o seu efeito antiviral e antiproliferativo, desencadearam a produção deste tipo de IFN para ensaios clínicos e subsequente avaliação do potencial terapêutico para várias doenças virais e neoplasias^{23,33,41}.

Em termos históricos, a *FDA* aprovou para comercialização uma formulação contendo este IFN como molécula terapêutica pela primeira vez em 1986, com indicação clínica para o tratamento de leucemias, linfomas, hepatites virais, carcinomas, sarcoma de Kaposi entre outros, e desde então diversas formulações contendo versões nativas e peguiladas do IFN α -2b têm vindo a ser comercializadas^{23,24}. A Tabela 1 referencia a percentagem de pessoas em que os sintomas das doenças em questão desapareceram, em resposta ao tratamento, o qual em certos casos permite atingir elevados níveis de eficácia no combate às patologias referidas⁵⁰⁻⁵². Contudo, é útil referenciar que em algumas situações o IFN α -2b é utilizado em simultâneo com outro tipo de medicamentos ou procedimentos clínicos, como por exemplo, quimioterapia⁵².

Tabela 1 – Resposta ao tratamento de diversas patologias com o IFN α -2b, em função do desaparecimento da sintomatologia, em percentagem⁵⁰⁻⁵².

Doenças	Resposta ao tratamento (em função do desaparecimento da sintomatologia)
Leucemia de células pilosas	90%
Sarcoma de Kaposi	40%
Linfomas	65%
Hepatite B	40%
Hepatite C	20%

A atividade antiproliferativa do IFN α -2b pode ser classificada como direta ou indireta^{23,33,41}. A forma direta ocorre através da inibição do crescimento de células cancerígenas por paragem do ciclo celular, apoptose ou diferenciação^{23,41}. A forma indireta baseia-se na ativação de células imunes, como as células T e células NK, inibição da vascularização (angiogénese) e indução de citocinas. Em suma, a forma indireta atua contra o cancro, através do estímulo do sistema imunitário contra a oncogénese e no controlo das características imunológicas do desenvolvimento de tumores^{33,41}.

A Figura 4, ajuda na compreensão da parte inicial do mecanismo antiproliferativo proporcionado pelo IFN α -2b, uma vez que, a regulação da expressão génica através da indução da transcrição e tradução de centenas de *ISGs* proporcionam o desenvolvimento de certas proteínas que estão envolvidas na atividade antiproliferativa^{23,33}. A via *JAK Stat* (Figura 4) está relacionada com a via *MAPK* ao nível da proliferação celular^{33,53,54}. A via das cinases é responsável por ativar o processo da divisão celular⁵⁵. No entanto, o IFN α -2b possui a capacidade de produzir enzimas que inativam a fosfatase *PP2A*, e regula proteínas de acoplamento que inibem a interação das cinases reguladas por sinais extracelulares (*ERKs*), também conhecidas como *MAPK* clássicas^{33,53-55}. Para além disso, leva também à diminuição de proteínas cinase dependentes de ciclinas que são essenciais para o ciclo celular³³. Estes aspetos não permitem o normal desenvolvimento da via de sinalização em questão, o que previne a passagem da fase G0/G1 para a fase S do ciclo celular e, como resultado, as células não conseguem replicar o ADN e a proliferação não ocorre^{23,33,55}.

O mecanismo de antiproliferação não ocorre apenas pela regulação da síntese proteica e translocação seletiva de proteínas que inibem a proliferação, mas também pela apoptose⁵⁶. Há duas vias apoptóticas principais relacionadas com o IFN em estudo: a tradução do sinal do recetor da família IFN α -2b através do fator de necrose tumoral alfa e a libertação do citocromo c pelas mitocôndrias⁵⁷. Ambas as vias vão desencadear a ativação de cascatas de caspases resultando na fragmentação do ADN e morte celular. O IFN em estudo contribui ainda para um aumento nos níveis da proteína p53 em resposta ao stress celular, e ativação da proteína p38 que desempenha um papel chave na diferenciação celular e apoptose^{23,33,58}.

De uma forma geral, os mecanismos moleculares envolvidos no processo antiproliferativo, descritos de forma breve anteriormente, estão relacionados com a regulação da tradução de proteínas, que controlam uma variedade de processos no interior da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose²³.

Os agentes patogénicos induzem a produção de citocinas pro-inflamatórias e IFNs nas células hospedeiras, visando a sua proteção. Os padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs), os padrões moleculares associados a danos (PMADs) e os padrões moleculares associados a venenos (PMAVs) influenciam a resposta da célula hospedeira, levando a alterações na expressão genética, causando o início de mecanismos efetores imunes infecciosos ou não infecciosos⁵⁹. Mais concretamente, os PMAPs ácidos nucleicos (ADN ou ácido ribonucleico - ARN), lipopolissacárideos bacterianos, endotoxinas, ácidos lipoteicóicos, peptidoglicanos e glicoproteínas⁶⁰ são reconhecidos por várias classes de recetores de reconhecimento de padrões situados nas células hospedeiras, tais como recetores do tipo *TOLL*, recetores do tipo *RIG*, recetores do tipo *NOD* e recetores lectina tipo C⁵⁹.

Entre os recetores já mencionados, os recetores do tipo *TOLL* são os que se encontram melhor caracterizados⁶¹. Existem 13 recetores desse tipo, sendo que uns reconhecem PMAPs virais e outros reconhecem PMAPs bacterianos. O reconhecimento por um recetor do tipo *TOLL*, intra- ou extracelularmente, leva à ativação das vias de sinalização *MyD88* ou *TRIFF*. As vias de sinalização mediadas por *TRIFF*, levam à indução de citocinas inflamatórias, como *TNF- α* , *IL6*, *IFN γ* e à ativação de fatores de transcrição como, *NK-KB*, e *IRF-3*, que levam à expressão de outros genes⁶². Após ativação, esses fatores de transcrição são translocados para o núcleo, levando à expressão dos genes IFN β

e IFN α 4. Estes são considerados os genes IFN “primários”, uma vez que, sua expressão é necessária para a produção subsequente de outros IFN, incluindo o IFN α -2b^{63,64}. Os IFN β e IFN α 4 ligam-se ao *IFN-AR-1 e 2* através de uma via autócrina e induzem a expressão de *IRF7*, que por sua vez leva à expressão de outros genes de IFN α , incluindo IFN α -2 e outros *ISGs*⁶³. Este mecanismo traduz-se de seguida no envio de um loop de feedback positivo que amplia a resposta e liberta rapidamente um grande número de fatores imunológicos^{62,63}.

O mecanismo antiviral do IFN α -2b tem, assim como o mecanismo antiproliferativo, a regulação da expressão genética como base para todo o processo^{7,23,42}. A resposta antiviral depende significativamente do vírus, da célula hospedeira e do tipo de IFN. Por exemplo, vírus de ARN induzem níveis mais elevados de transcrição de IFNs do tipo I, comparativamente a vírus de ADN⁶⁵. Quando a célula está infetada por um determinado vírus, este induz a produção de IFNs, como por exemplo o IFN α -2b⁶⁶. O IFN α -2b pode exercer uma ação autócrina ou parácrina, nas células circundantes, levando ainda à expressão de proteínas reguladas por este IFN, que coletivamente constituem, de uma forma bastante generalizada, a resposta antiviral responsável pela inibição da multiplicação viral (Figura 6)⁶⁷.

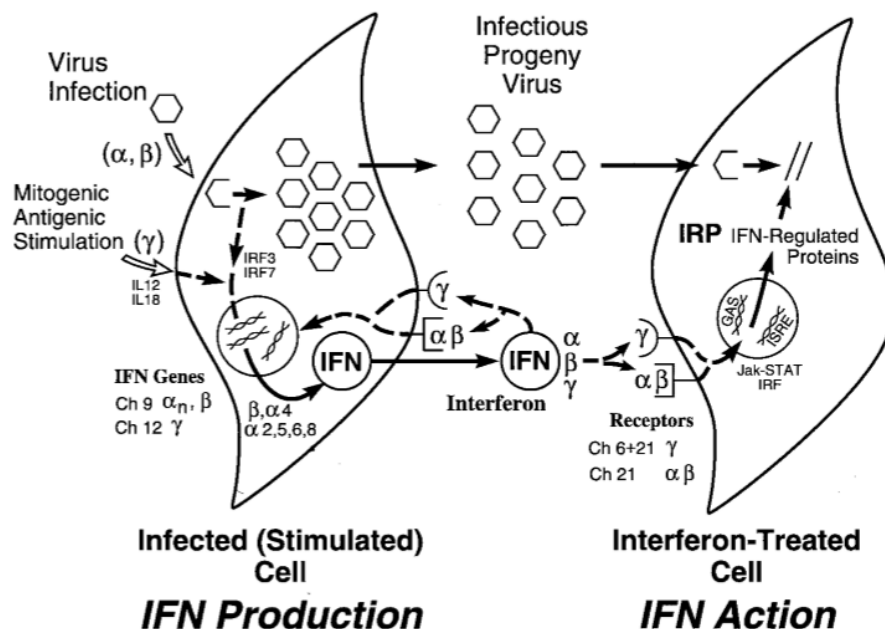


Figura 6- Esquema resumo da ação antiviral desencadeada pelos IFNs. A célula à esquerda representa uma ação autócrina e a célula à direita uma ação parácrina⁶⁷.

Uma das proteínas melhor caracterizada envolvida nas ações antivirais desencadeadas pelo IFN α -2b é a enzima proteína cinase R, que pode desencadear a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica *eIF2 α* ^{7,23,40}. Esta fosforilação inibe a tradução de ARNm celular, impedindo a síntese de proteínas virais^{7,66}. Por outro lado, a enzima mencionada pode levar à produção de outra enzima denominada ribonuclease L, capaz de destruir o ARN celular e viral^{7,23,66}. Esta via é normalmente precursora de processos de autofagia e apoptose realizados pela célula infetada^{7,66}.

Além disso, este IFN pode, como mencionado anteriormente, tornar o sistema imunitário mais predisposto para a defesa de certas moléculas, como compostos virais⁷. Assim sendo, o IFN α -2b tem a capacidade de aumentar a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (*MHC*), mais concretamente do *MHC* de classe I (*MHCI*) e do classe II (*MHCII*)⁷. O *MHCI* aumenta a apresentação de péptidos virais a células T citotóxicas, aumentando o reconhecimento e morte das células infetadas. O *MHCII* aumenta a apresentação de péptidos virais a células T auxiliares (CD4+), que interagem com mais proteínas do sistema imune, proporcionando mecanismos de defesa contra estas moléculas infecciosas^{7,68}.

Em suma, tanto o mecanismo antiviral como antiproliferativo, têm como premissa a regulação da expressão génica, nomeadamente de *ISGs*²³. As proteínas produzidas em resposta à transcrição e tradução destes genes podem atuar de uma forma direta ou indireta levando, neste último caso, ao trabalho conjunto de vários aspetos do sistema imunitário^{23,33,41}. Dado o papel preponderante do IFN α -2b na defesa do nosso organismo, este tem sido aplicado como agente terapêutico, o que realça a importância da sua produção como biofármaco^{7,23,47}.

1.3.4 Condicionalismos farmacocinéticos

O potencial terapêutico, já descrito, do IFN α -2b e dos IFNs em geral é amplamente reconhecido. Contudo, como são moléculas imunomodadoras envolvidas em diversas vias de sinalização celular, os seus efeitos colaterais limitam de certa forma a eficácia do tratamento⁶⁹.

O tratamento com IFN é sempre considerado significativo quando se analisa os seus possíveis efeitos secundários³³. Estes efeitos podem ser divididos em agudos ou crónicos^{33,70}, sendo que os efeitos agudos podem ser controlados ajustando a dose de

interferão, ou rapidamente suprimidos quando se interrompe o tratamento^{33,70,71}. Os efeitos crônicos estão relacionados com doses cumulativas e tendem a agravar-se com o passar do tempo^{33,71}. Em suma, verifica-se que a gravidade dos efeitos secundários está diretamente relacionada com a dose e duração da terapia com IFN^{7,33}.

O IFN α -2b é pouco absorvido no trato gastrointestinal e as suas formulações baseiam-se principalmente em soluções administradas parentericamente por injeção subcutânea⁶⁹. A conjugação do IFN α -2b com polietilenoglicol (PEG) aumentou a eficácia da terapia. O PEG tem a capacidade de aumentar a solubilidade e estabilidade do IFN α -2b e diminuir a degradação por proteólise, a antigenicidade e depuração renal (reduzindo a quantidade de IFN α -2b necessária a administrar)^{72,73}. Além disso, o tempo de circulação aumenta de 5 para 90 horas diminuindo a frequência da dosagem⁷⁴. As formas peguiladas do IFN α -2b com ribavirina como coadjuvante são, atualmente, a pedra angular do tratamento da infecção por hepatite C em crianças com menos do que 12 anos⁷⁵. No entanto, como as formas de IFN peguiladas têm consequências na dosagem, absorção, biodisponibilidade, depuração e gestão do paciente, é importante conhecer suas diferenças para garantir um tratamento adequado⁷². Uma estimativa realizada, refere que entre 125 a 170 milhões de pessoas estão infetadas pelo vírus da hepatite C, e que o custo associado a um único tratamento utilizando o IFN α -2b na versão peguilada auxiliado por ribavirina é de 29 milhares de dólares⁷⁶. Este aspeto demonstra a importância deste fármaco no tratamento desta doença viral, bem como a necessidade de diminuir o custo total de fabrico do mesmo.

As versões peguiladas não são a única solução, existe também a fusão genética com outras macromoléculas com o intuito de aumentar o tempo de semivida deste IFN^{77,78}. Neste processo ocorre, por exemplo, a fusão entre o IFN α -2b e a albumina humana, dando origem ao que hoje se denomina como “Albinterferão”⁷⁷. Na literatura, há ainda relatos de novas formulações de libertação prolongada a serem testadas *in vitro* e de vários sistemas de administração de medicamentos (nanopartículas de poliaminoácidos e microesferas poliméricas) em desenvolvimento^{78,79}.

Desta forma, as novas formulações são apresentadas como uma versão que irá permitir controlar os efeitos secundários da terapêutica com o IFN α -2b^{78,79}. Todavia, estas novas formulações não devem diminuir a atividade biológica *in vitro* do IFN α -2b, nem afetar a estrutura deste material bioterapêutico⁷⁷⁻⁷⁹.

1.4 Proteínas terapêuticas recombinantes

1.4.1 Processo geral para obtenção de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes são um conjunto de proteínas produzidas recorrendo à técnica de ADN recombinante¹³. Esta técnica, permite que um gene ou múltiplos genes possam ser identificados, clivados, e inseridos no genoma de outro organismo⁸⁰. O primeiro conceito descrito na literatura, para a técnica de ADN recombinante, provém da descoberta de Werner Arber que reportou a existência de enzimas de restrição bacterianas que clivam um local específico da molécula de ADN⁸¹. Para além deste tipo de enzimas, existem ainda outras bastante importantes para esta técnica, como as polimerases (síntese de moléculas de ADN complementar) ou as ligases (facilitam a união de cadeias do ADN)^{80,82}.

De um modo geral, o processo de produção de proteínas terapêuticas recorrendo à tecnologia do ADN recombinante engloba diversas etapas, como se encontra ilustrado na Figura 7 ⁸⁰. Em primeiro lugar, o ADN correspondente ao gene-alvo é isolado, amplificado por reação em cadeia da polimerase (*PCR*), e de seguida é clonado no vetor adequado. O vetor recombinante é introduzido no hospedeiro apropriado, onde através da maquinaria celular deste, ocorre a replicação do ADN e respetiva síntese proteica^{80,83}. Posteriormente, recorre-se à seleção e identificação das células que incorporam o ADN recombinante e, verifica-se se a proteína foi devidamente expressa⁸⁰.

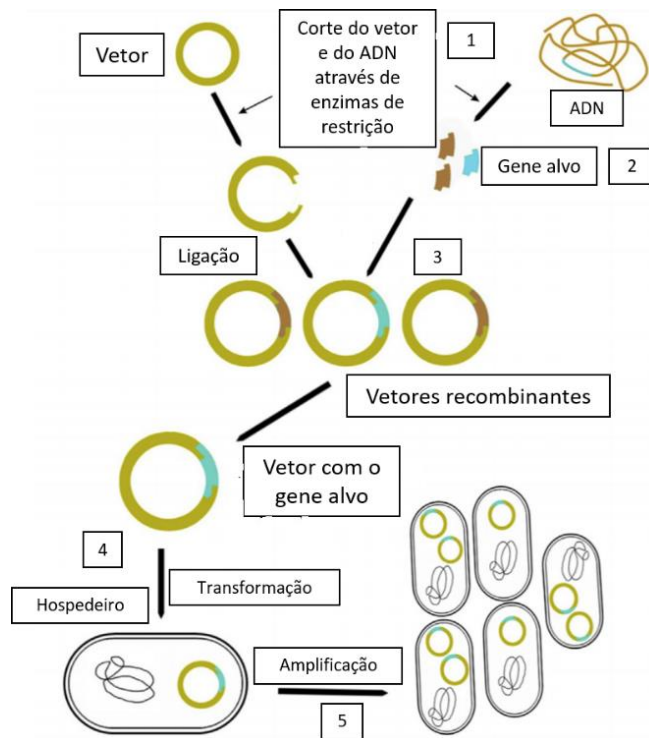


Figura 7- Tecnologia de ADN recombinante que compreende cinco etapas principais: (1) cortar o ADN desejado por enzimas de restrição, (2) amplificar as cópias dos genes por PCR, (3) inserir os genes nos vetores, (4) transferir os vetores para o organismo hospedeiro e (5) obter os produtos de genes recombinantes. Adaptado de ⁸⁰.

O processo de fabrico do biofármaco propriamente dito compreende duas etapas (Figura 8): a etapa *upstream* que tem como aspetos essenciais a escolha do hospedeiro, do vetor e das condições de crescimento celular, bem como todo o procedimento de otimização do processo, visando a sua aplicabilidade em grande escala⁸⁴. E a etapa *downstream* que, como já mencionado anteriormente, abrange as etapas de recuperação e purificação. Embora os esforços tecnológicos na expansão dos processos de produção possam ser considerados bastante diretos e visíveis, o processamento *downstream* enfrenta ainda alguns desafios.

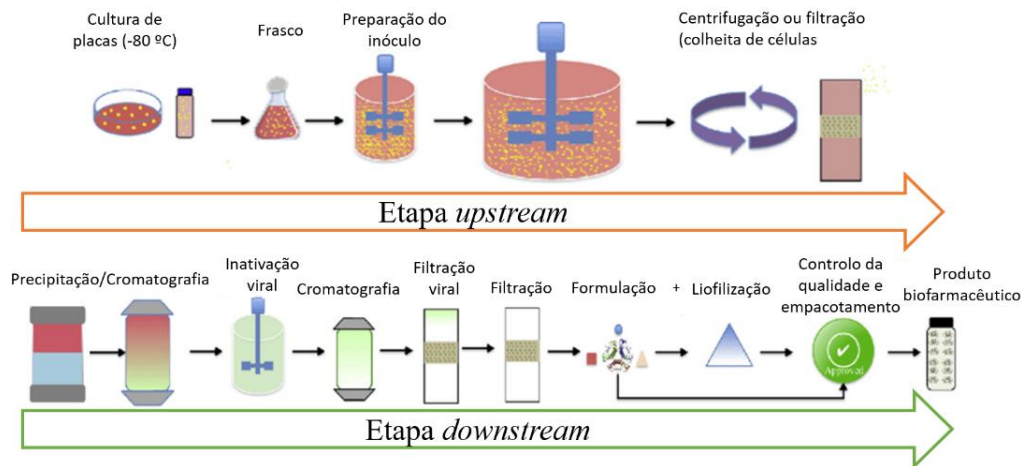


Figura 8- Fluxograma geral do processo de fabricação de biofármacos. Adaptado de ⁸⁴.

Nas etapas iniciais, a rápida redução de volume e concentração do produto são os principais problemas. Com o intuito de ultrapassar essas dificuldades, são utilizadas técnicas como centrifugação, filtração, precipitação e/ou cromatografia. A cromatografia, em concreto, também domina as etapas posteriores, mais especificamente associada à purificação seletiva, representando cerca de 70 % dos custos do processo *downstream*^{84,85}. Deste modo, várias alternativas têm sido apresentadas, seja para substituir/otimizar as habituais técnicas cromatográficas ou para eliminar a total dependência desta. Alguns exemplos incluem sistemas aquosos bifásicos (SAB), precipitação, cristalização, filtração por membrana, cromatografia em membrana e cromatografia com auxílio de *SILs*⁸⁶.

1.4.2 Produção de proteínas terapêuticas recombinantes (etapa de *upstream*)

O processamento *upstream* visa fornecer grandes quantidades de proteína alvo, por meio de engenharia genética ou química, mantendo ou aprimorando as suas características biológicas^{13,84}. A produção de proteínas recombinantes em microrganismos revolucionou o processo de fabricação de biofármacos, tornando-se a técnica de eleição e superiorizando-se ao método alternativo até então utilizado, onde era necessário uma enorme quantidade de tecido animal, ou vegetal, ou fluidos biológicos (fontes naturais)^{14,87}. Um exemplo esclarecedor de como a produção de proteínas recombinantes com recurso a microrganismos é vantajosa, foi a comercialização da insulina recombinante nos anos 80⁸⁸. Até esta data, esta hormona era obtida através da extração de grandes quantidades de tecido animal⁸⁸.

De uma forma geral, existem diversos fatores suscetíveis de otimização que devem ser considerados para o desenvolvimento com sucesso de um método de biossíntese de proteínas recombinantes, os quais dependem do tipo de proteína a ser sintetizada^{80,87}. Assim, a primeira questão prende-se com a escolha do hospedeiro, onde é necessário escolher uma célula hospedeira, cuja maquinaria da síntese proteica seja capaz de produzir a proteína em estudo⁸⁷. Um exemplo que descreve este tipo de situação é quando existe a necessidade de efetuar modificações pós-tradução, tais como glicosilação e, neste caso, um sistema de expressão procariota poderá não ser o mais adequado⁸⁹.

Até ao momento, existem diversos hospedeiros que são utilizados para a produção de proteínas recombinantes, nomeadamente, bactérias, leveduras, fungos, células animais e vegetais⁹⁰. A escolha do hospedeiro apropriado deve ter em consideração os seguintes fatores: 1) segurança (patogenicidade); 2) estabilidade, qualidade e funcionalidade da proteína; 3) rendimento e velocidade de produção; 4) propriedades físico-químicas e biológicas da proteína alvo e da célula hospedeira; 5) expressão e regulação do vetor (por ex. plasmídeo); 6) fatores de manutenção celular; 7) recuperação da proteína; e, 8) aplicação desejada^{90,91}. A introdução do ADN recombinante no hospedeiro escolhido, processo denominado por transformação genética, pode ser feito de diversas formas, tais como, choque térmico, microinjeção, eletroporação, entre outras⁹⁰.

A Tabela 2 refere as principais vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão mais utilizados e aprovados pelas autoridades farmacêuticas^{80,83,89,90}. A partir da escolha do sistema de expressão, e tendo em conta as características próprias de cada proteína recombinante, é plausível delinear uma estratégia de ferramentas moleculares, equipamentos e reagentes necessários para otimizar a produção^{87,90}.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes^{80,83,87,89,90}.

Hospedeiros	Vantagens	Desvantagens
Bacterianos (<i>E. coli</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Taxa de crescimento muito rápida; • Elevado rendimento de produção; • Bem caracterizado do ponto de vista genético, fisiológico e metabólico; • Económica; • Cresce facilmente numa grande variedade de meios de cultura; • Processos de fácil escalonamento para aplicações industriais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade limitada de efetuar modificações pós-tradução; • Maior dificuldade em produzir proteínas numa forma solúvel e com o enrolamento adequado; • Frequência a que ocorrem códons sinónimos difere dos eucariotas.
Leveduras (<i>Pichia Pastoris</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Taxa de crescimento rápida; • Elevado rendimento de produção; • Baixo custo de produção; • Capaz de realizar glicosilações simples; • Elevada capacidade para produção de proteínas com o enrolamento adequado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de vias de modificações pós-tradução complexas.
Células de inseto (Baculovírus)	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de realizar glicosilações simples e complexas; • Taxa de crescimento moderada; • Muita boa capacidade para produção de proteínas com o enrolamento adequado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado custo de produção; • Baixa densidade de biomassa; • Difícil utilização em larga escala.
“Cell-Free”	<ul style="list-style-type: none"> • Condições de reação podem ser facilmente modificadas; • Rápida otimização do processo de expressão. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado custo.
Células de mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> • Excelente capacidade para produção de proteínas com o enrolamento adequado; • Capacidade de realizar glicosilações simples e complexas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taxa de crescimento muito lenta; • Elevado custo de produção; • Dificuldade de utilização em larga escala; • Baixo rendimento de produção.
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de realizar modificações pós-tradução complexas; • Sistema de produção versátil; • Requisitos simples de crescimento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado custo; • Potencial de imunogenicidade devido ao padrão de glicosilação, específico de plantas; • Intensa vigilância das variedades de plantas transgênicas.

O IFN α -2b foi produzido e isolado pela primeira vez utilizando a bactéria *E. coli* em 1980 e, desde então, embora vários sistemas hospedeiros tenham sido empregues para a sua biossíntese, a bactéria em questão é a escolha atual para a produção recombinante deste IFN⁸². É necessário referenciar que as condições de produção (densidade celular, composição do meio de cultura, níveis de O₂, pH, temperatura, endotoxinas, etc) na bactéria *E. coli* têm sido otimizadas com o desenrolar deste tipo de investigações^{82,87,92,93}. Assim, tendo em conta as vantagens que esta bactéria apresenta, mencionadas anteriormente, bem como a existência de um processo de produção otimizado e, de modo a mimetizar o que acontece na indústria farmacêutica, a bactéria *E. coli* será o hospedeiro escolhido para a produção do IFN α -2b no decorrer deste trabalho^{82,87,93}.

A segunda questão, recai na escolha do vetor mais apropriado para a transmissão do gene ao organismo hospedeiro escolhido^{87,94}. Por norma, devem conter os mesmos locais de restrição que o gene desejado, para facilitar a integração do mesmo⁸². Além disso, os vetores devem também conter sequências para seleção e identificação, como por exemplo, um gene para resistência a um antibiótico⁸⁷.

Atualmente, existe um enorme leque de vetores que podem ser utilizados, como por exemplo, plasmídeos, bacteriófagos, cosmídeos, cromossoma artificial bacteriano, cromossoma artificial de levedura, entre outros⁸⁹. No entanto, é necessário ter em atenção certos parâmetros, como a aplicação da proteína desejada, compatibilidade entre os locais de restrição, tipo de célula onde será introduzido, a dose do gene alvo pretendida, tamanho do gene, entre outros^{87,89}. Para o presente trabalho optou-se pela escolha do plasmídeo como vetor de expressão. Todavia, existem diferentes características inerentes a cada plasmídeo (utilizado como vetor de expressão) que deverão ser consideradas de modo a otimizar o processo de produção da proteína, e que se encontram representados na Figura 9⁸⁷.

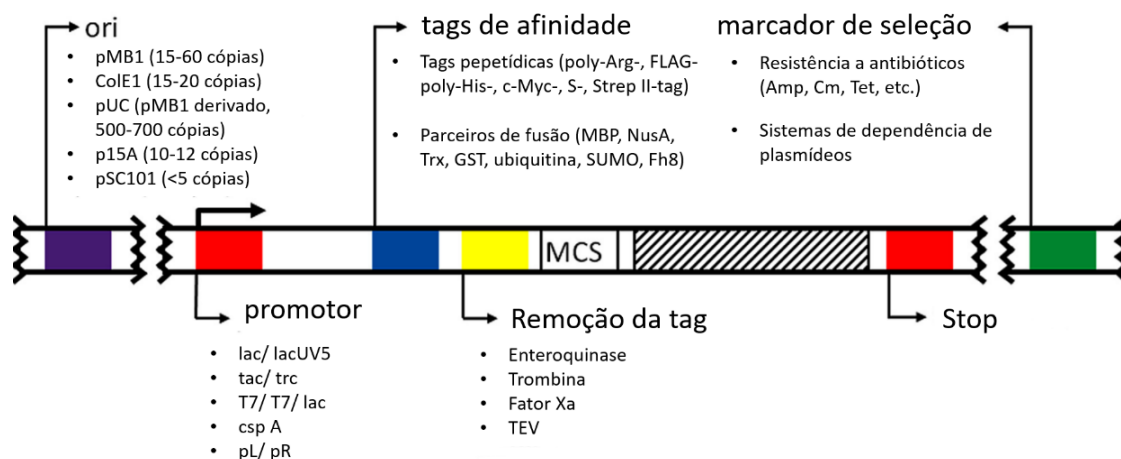


Figura 9- Anatomia de um vetor de expressão⁸⁷.

A escolha do local onde irá ocorrer a origem da replicação revela-se importante, na medida em que, é responsável por controlar o número de cópias do plasmídeo⁹⁵. Assim, é intuitivo pensar que quanto maior for o número de cópias maior será a produção da proteína recombinante^{87,95}. Contudo, este princípio nem sempre funciona como esperado, uma vez que, a carga metabólica imposta por um grande número de cópias pode ser demasiado elevada, reduzindo desta forma a população de células viáveis que contribuem efetivamente para a síntese proteica⁸⁷.

Em segundo lugar, a escolha de um promotor, definido como a região de ADN em que se inicia a transcrição de um gene^{87,94}. O promotor é dito eficaz para a expressão de proteínas, quando permite que a quantidade de proteína alvo corresponda a, pelo menos, 10 a 30 % da quantidade total de proteínas celulares⁹⁴. Este pode ser classificado em dois tipos: constitutivo, onde ocorre uma expressão constante ao longo do crescimento celular, e indutível, em que para estar ativo é necessário a presença no meio de cultura de determinada molécula, como por ex. isopropil β -d-1-tiogalactopiranosida (IPTG)⁹⁶. A vantagem do tipo de promotores que são indutíveis é que a cultura já está estável quando este é adicionado, ou seja, permite ter um controlo temporal da produção de proteínas e a separação da fase de crescimento celular da fase de síntese proteica^{87,94,96}. Para além disso, não representa um stress metabólico extra para a célula, como pode acontecer com os promotores constitutivos. A Figura 10 exemplifica um promotor do tipo indutível dos mais utilizados na produção de proteínas recombinantes⁹⁴. Este exemplo, é conhecido como o sistema pET (DE3/T7), onde o gene de interesse é inserido num hospedeiro (*E. coli*), o qual se encontra também modificado de modo a conseguir produzir a enzima ARN

polimerase T7 (ARNpT7) necessária para a transcrição⁹⁴. Esta enzima está sob controle de um promotor indutível por IPTG, denominado lacUV5, que está incorporado no cromossoma no locus DE3^{94,97}. Assim, antes de ocorrer a indução, o promotor está reprimido por LacLacI (Figura 10A)⁹⁴. No entanto, a adição de IPTG faz com que o repressor LacLacI se ligue ao indutor adicionado, levando à desocupação do promotor LacUv5, permitindo desta forma a produção da ARNp7 e, por conseguinte, a transcrição do plasmídeo (Figura 10B). Por fim, importa referir que nenhum promotor é adequado para todas as proteínas recombinantes, ou seja, cada promotor e indutor são escolhidos com base nas características de cada proteína alvo e do próprio hospedeiro^{94,96}.

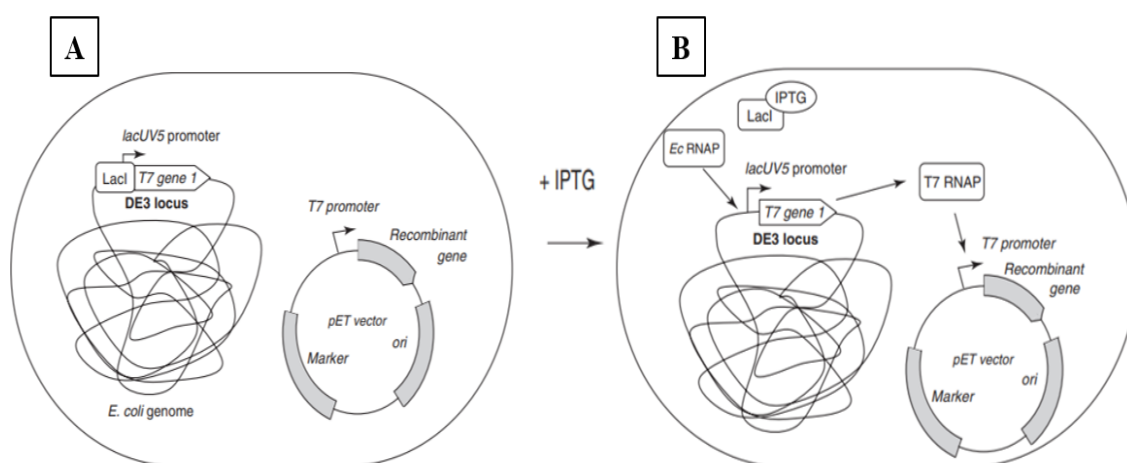


Figura 10- O sistema pET (DE3/T7)⁹⁴.

Em terceiro lugar a escolha de um eventual marcador seletivo, que é utilizado para impedir o crescimento de células que não possuem o plasmídeo⁸⁷. O plasmídeo contém na sua estrutura um marcador de resistência, como por exemplo, genes de resistência a antibióticos. Em particular, o plasmídeo pode conter o gene *bla* que é responsável pela resistência à ampicilina, e quando introduzido em *E. coli*, confere resistência ao hospedeiro da seguinte forma: o gene em questão produz uma enzima periplasmática (β -lactamase) que inativa o anel β -lactâmico deste tipo de antibióticos^{87,90,98}. Assim, no meio de cultura, apenas as bactérias que possuem o plasmídeo recombinante e, por conseguinte, o gene de resistente à ampicilina, é que irão sobreviver^{87,98}.

Em quarto lugar, deve-se avaliar a necessidade de utilizar tags de afinidade que se ligam à proteína^{87,99}. Estes tipos de moléculas podem servir para: 1) facilitar a detecção da proteína recombinante ao longo do esquema de expressão, 2) melhorar a solubilidade e enrolamento da proteína e 3) facilitar a sua purificação⁹⁹. Caso seja necessário um estudo

estrutural, bioquímico ou aplicabilidade farmacêutica por parte das proteínas sintetizadas, será essencial proceder à remoção da tag adicionada^{99,100}.

Tendo em conta a pesquisa desenvolvida nas últimas décadas, verifica-se que a bactéria *E.coli* tem sido amplamente empregue na produção de diversos IFNs, inclusive o IFN α -2b. Srivastava e colaboradores¹², em 2005, publicaram a síntese do IFN α -2b em *E.coli* DH5a, com recurso a corpos de inclusão, utilizando o vetor pRSET em co-expressão com o vetor pGP1-2, e otimizaram diversas condições experimentais tais como o meio de cultura, tempo e temperatura de indução. Após otimização dos aspetos referidos num processo de produção conduzido em biorreator, obtiveram-se 5,2 g/L do interferão em estudo. Todavia, após solubilização dos corpos de inclusão e purificação (métodos que serão analisados com maior detalhe na secção seguinte) foram obtidos aproximadamente 3,0 g/L, o que espelha um rendimento por volta dos 58 %. Em 2006, Valente e colaboradores⁹³ exploraram a produção do IFN α -2b em *E. coli* JM109 (DE3) transformada com o vetor pET-9a, sendo as células cultivadas a 37 °C, sob agitação (250 rpm) em meio *LB* suplementado com canamicina e, a expressão da proteína induzida por IPTG. Os autores reportaram que o interferão em estudo foi produzido sob a forma de corpos de inclusão, os quais foram solubilizados recorrendo a 6 M de hidróclorato de guanidina (agente caotrópico) e 100 mM de 2-mercaptoetanol (agente redutor). Desta forma, o artigo referido descreve a otimização do processo de solubilização dos corpos de inclusão, sendo que também menciona a obtenção do IFN α -2b numa forma biologicamente ativa, mas não refere qual a concentração a que este IFN é produzido. No ano seguinte, Rabhi-Essafie e colaboradores¹⁰¹, exploraram a expressão do IFN α -2b como proteína de fusão GST em *E. coli* BL21 usando o vetor pGEX em meio *LB* contendo ampicilina e, as células foram cultivadas durante a noite sob agitação (250 rpm) a 37°C. A expressão da proteína em *erlenmeyers*, foi induzida por IPTG resultando num rendimento final de 100 mg/L, após um passo de purificação por cromatografia de afinidade (método abordado na secção seguinte). As variações de rendimento apresentadas em diversos artigos, estão diretamente relacionadas com as condições de produção, já referidas anteriormente. Para além disso, a escala de produção pode também ter um impacto nos rendimentos obtidos, ou seja, um aumento na escala de produção poderia beneficiar potencialmente a produção e expressão do IFN α -2b. Para além dos estudos mencionados existem outros trabalhos, que focam a otimização da produção de

outros subtipos de IFNs e, que permitem da mesma forma, retirar conclusões importantes para desenvolver e otimizar a etapa geral de *upstream*^{92,93,101-103}.

1.4.3 Recuperação e purificação de proteínas terapêuticas recombinantes (etapa de *downstream*)

Tal como referido anteriormente, a etapa *upstream* tem sofrido inúmeros avanços nos últimos tempos, nomeadamente nas tecnologias de culturas celulares que permitem a obtenção de maiores níveis de expressão e elevadas densidades celulares¹³. Contudo, o processamento *downstream*, que representa geralmente 50 a 80 % do custo da produção de proteínas recombinantes, não seguiu esta tendência, sendo atualmente considerado o passo limitante no fabrico de proteínas recombinantes^{13,84}. Os aspetos principais a ter em consideração durante o desenvolvimento de um processo de *downstream* são a rapidez, o rendimento total e, a pureza dos produtos alvo¹³. Para além disso, o processo deve apresentar elevada robustez, fiabilidade e ser passível de aplicação em escalas industriais^{13,84}.

O nível final de purificação e o rendimento de extração, não dependem apenas da estratégia de purificação mas também do processo *upstream*, o qual influencia principalmente a concentração e pureza iniciais da proteína^{12,84}. Após a produção da proteína recombinante, o primeiro passo envolve a recuperação, que, de certa forma, depende da via de produção e é essencial para o processo final de purificação¹³. Por exemplo, uma proteína quando é expressa de forma recombinante numa bactéria, como a *E. coli* pode seguir duas vias principais, a citoplasmática e a periplasmática. A via citoplasmática, é segundo a literatura, a via mais utilizada na produção do IFN α -2b¹¹⁻¹³. Esta via tende a formar agregados proteicos insolúveis e amorfos denominados corpos de inclusão¹³. Visto que o citoplasma tem um ambiente redutor, os corpos de inclusão formados são geralmente inativos e possuem ligações dissulfureto intra e intermoleculares não nativas e cisteínas incomuns livres¹⁰⁴. Os mecanismos de formação dos corpos de inclusão estão relacionados com certas propriedades proteicas como a carga, hidrofobicidade, frações de cisteína e prolina, número total de resíduos e condições de cultura e de *refolding* (temperatura, pH, níveis de oxigénio e nutrientes)^{84,93,104}. A formação deste tipo de agregados é frequente, principalmente, quando proteínas eucarióticas são expressas em hospedeiros bacterianos. Por outro lado, a via

periplasmática apresenta-se mais vantajosa em termos do enrolamento de proteínas, solubilidade e formação de ligações dissulfureto. Todavia, o rendimento de expressão proteica é mais elevado na via citoplasmática e a proteína alvo constitui a maior parte das proteínas totais. A Tabela 3 sintetiza as vantagens e desvantagens de trabalhar com proteínas recombinantes expressas como corpos de inclusão^{13,84,93,104}.

Tabela 3- Vantagens e desvantagens da utilização de corpos de inclusão^{13,84,93,104}.

Vantagens	Desvantagens
Elevados níveis de expressão;	<i>Refolding</i> é complicado e aumenta o preço do processo;
Podem ser isolados com elevada pureza;	
Oferecem proteção contra enzimas proteolíticas;	Condições ideais de <i>refolding</i> não podem ser previstas.
Permitem a expressão de proteínas tóxicas para a célula.	

Assim sendo, torna-se necessário otimizar condições para um eventual passo de lise celular, de solubilização e de *refolding*. As células de *E. coli*, onde ocorreu a síntese dos corpos de inclusão, são rompidas por forças mecânicas (esferas de vidro, sonicação, solventes orgânicos, surfactantes) ou métodos enzimáticos (lisozima)¹⁰⁵. Em relação a esta etapa, as condições otimizadas devem maximizar a lise celular, o rendimento de extração e a estabilidade da proteína recombinante, procurando minimizar a oxidação da proteína e a sua proteólise, o que é geralmente conseguido através da adição de agentes redutores ou inibidores de proteases, respetivamente¹⁰⁶. De seguida, os corpos de inclusão são removidos do lisado celular por centrifugação e o sedimento é lavado e solubilizado numa elevada concentração de solução desnaturante, como a ureia ou hidrócloro de guanidina⁹³. Além disso, ditioneitol (DTT) é comumente adicionado para diminuir as ligações dissulfureto não nativas^{93,107}. Finalmente, após solubilização, os corpos de inclusão são sujeitos ao processo de *refolding* utilizando técnicas que levam em consideração vários fatores como a concentração de proteínas, co-agregação de contaminantes proteicos, temperatura, pH e força iónica^{12,93,106,107}. A técnica convencional mais utilizada é a diálise. Dashbolaghi e colaboradores¹⁰⁸ descreveram um método aprimorado de *refolding*, para o IFN α -2b, através da modelação do pH. Nesse

estudo, está relatado que quando o valor do pH é 8 existe uma maior atividade biológica. Assim, seguindo esta ideologia de protocolo, é possível contornar as desvantagens associadas à produção sob a forma de corpos de inclusão e, assim, obter um elevado rendimento de produção proteica^{12,93}.

Para além de um processo de recuperação, a necessidade de purificação é também evidente, uma vez que, para uso terapêutico este tipo de biofármaco necessita de elevados graus de pureza^{6,11}. Desta forma, é possível purificar as proteínas recombinantes recorrendo a técnicas de cromatografia que, de uma forma geral, consistem num conjunto de técnicas através das quais a passagem de solutos por colunas pode ser seletivamente restringida e cujas interações com a matriz determinam a distribuição de solutos entre a fase móvel e estacionária. Os métodos cromatográficos mais utilizados são as cromatografias de: filtração em gel (CFG), interação hidrofóbica (CIH), troca iónica (CTI), e fase reversa (CFR) (Figura 11)¹⁰⁹.

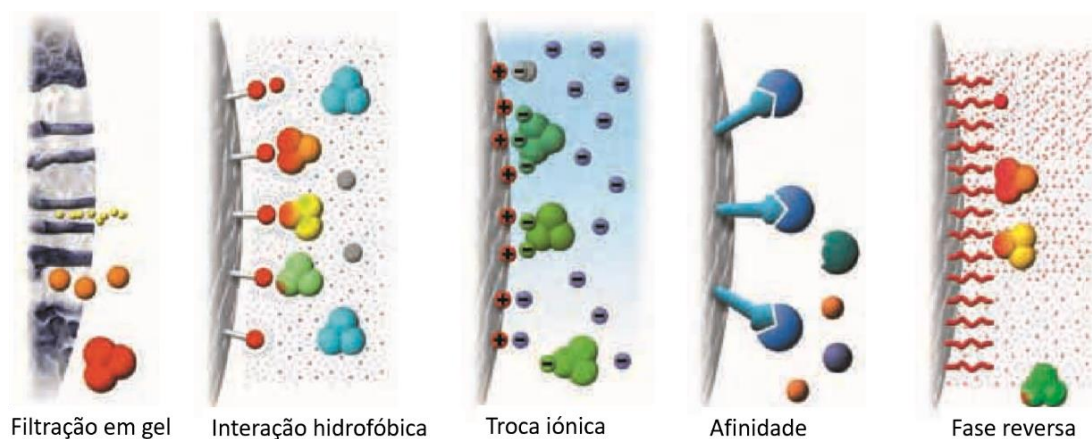


Figura 11- Tipos de cromatografia líquida utilizados na purificação de biomoléculas, de acordo com o mecanismo de separação¹⁰⁹.

A CFG possui a capacidade de separar as proteínas pela diferença de tamanho e forma molecular¹⁰⁹. A técnica em questão, é adequada para uma etapa final de purificação quando os volumes de amostras são reduzidos, já que o volume da amostra influencia significativamente a velocidade e a resolução na filtração em gel¹¹⁰.

A CIH é utilizada para separar proteínas que apresentam diferenças ao nível da hidrofobicidade. Esta separação baseia-se na interação reversível entre uma proteína e a superfície hidrofóbica de um ligando cromatográfico¹¹⁰.

A maioria das proteínas contém alguns aminoácidos hidrofóbicos, que estão geralmente “escondidos” na estrutura proteica como resultado do ambiente aquoso envolvente¹⁰⁹. A diversidade de condições de eluição, onde se destaca um gradiente decrescente da força iônica (sulfato de amônio) de uma solução tampão, possibilita a resolução de misturas complexas de proteínas, difíceis de purificar por outras técnicas cromatográficas^{109,110}. Contudo, a presença de contaminantes hidrofóbicos na amostra diminui a eficiência deste tipo de processo.

A CTI possui a capacidade de separar proteínas tendo em conta as diferenças na carga superficial que estas apresentam¹¹⁰. Esta separação, deve-se à interação reversível entre grupos carregados na superfície das proteínas com grupos de carga oposta imobilizados na matriz, sendo que a eluição diferenciada das biomoléculas ocorre através de alterações na composição dos tampões cromatográficos, nomeadamente, através do aumento da força iônica (aumento da concentração de sal) ou alteração do pH¹⁰⁹.

Quando o pH do meio é superior ao pI, as proteínas apresentam carga superficial negativa e ligam-se a um permutador de aniões que se encontra positivamente carregado¹¹⁰. O contrário também se verifica para um pH inferior ao pI das proteínas, onde estas se ligam a um permutador de catiões.

A CA tem como princípio a separação de proteínas com base numa interação reversível entre a proteína e o ligando¹¹⁰. Esta técnica oferece uma elevada seletividade, alta resolução e, geralmente, elevada capacidade para as proteínas de interesse^{109,110}. O material não ligado é removido por lavagem e a proteína alvo ligada é recuperada pela mudança de condições, tais como, alteração do pH, força iônica ou polaridade, que favorecem a dessorção¹¹⁰. Este método cromatográfico está por norma associado à utilização de tags de fusão ligados a uma proteína de interesse, onde esta é capturada com base no reconhecimento do tag¹⁰⁹. Desta forma, o recurso a tags permite a utilização de protocolos comuns para diferentes proteínas recombinantes.

A CFR separa as proteínas e péptidos com diferentes hidrofobicidades, tendo em conta a sua interação reversível com a superfície hidrofóbica de um meio cromatográfico¹⁰⁹. Devido à natureza das matrizes de fase reversa, a ligação entre os solutos e a fase estacionária é geralmente muito forte e requer o uso de solventes orgânicos e outros aditivos para a eluição^{109,110}. A eluição é normalmente realizada por aumento da concentração de solvente orgânico, mais comumente acetonitrilo. Esta

técnica possui elevada seletividade e é amplamente utilizada para análises de verificação de pureza¹⁰⁹. Todavia, não é recomendada para purificação de proteínas se for necessária a recuperação da atividade ou o retorno a uma estrutura terciária correta, uma vez que, muitas proteínas (não todas) são desnaturadas na presença de solventes orgânicos¹⁰⁹.

Outra técnica cromatográfica que também é bastante utilizada é a cromatografia multimodal, na qual se estabelecem pelo menos dois tipos de interações diferentes entre o soluto e a fase estacionária¹¹¹. Esses diferentes modos de ação podem agir independentemente ou em conjunto. As interações iônicas são comumente envolvidas, mas as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas também podem contribuir de forma significativa para a interação soluto-suporte. A força dessas interações individuais depende da biomolécula alvo e das condições gerais do processo^{111,112}.

A preparação do meio de cromatografia multimodal pode ser realizada de três maneiras diferentes (Figura 12)¹¹². A primeira abordagem (estocástica) baseia-se na introdução de duas ou mais interações diferentes independentemente da matriz. Esta possibilidade, fornece uma maneira muito eficiente de estudo de uma segunda interação, porque neste tipo de construção a proporção dos diferentes grupos pode ser gradualmente modificada. No entanto, a homogeneidade do meio e as interações tridimensionais não podem ser garantidas. Na abordagem do ligando multimodal, os diferentes grupos promotores de interações são conectados pelo *scaffold*, resultando numa estrutura tridimensional bem definida e na qual a razão estequiométrica entre grupos é fixa. Por último, existe a possibilidade de utilizar um material responsivo que de acordo com diferentes condições como temperatura ou o pH, exhibe diferentes interações primárias.

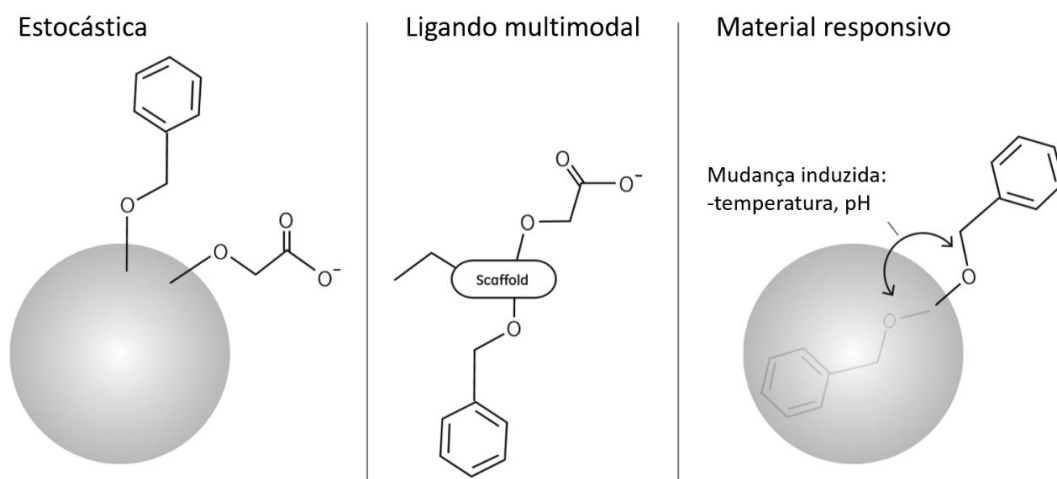


Figura 12- Diferentes métodos de preparação de uma coluna multimodal¹¹².

Na maioria dos casos, as múltiplas interações presentes nos ligandos multimodais podem influenciar a adsorção das moléculas¹¹¹. Todavia, este fenómeno pode ser controlado, por exemplo minimizando as interações iónicas. Assim, através desta abordagem é possível realizar uma eluição onde se usufrui de cada interação em particular ou das duas em conjunto, o que de certa forma pode contribuir para um melhor resultado ao nível da purificação^{111,112}.

O tipo de cromatografia mencionado oferece novas soluções em trabalhos de purificação, nomeadamente na redução do número de etapas de purificação, levando a uma economia do tempo e do custo total do processo, ou pode resultar ainda num aumento de seletividade, tendo para além disso uma elevada janela de operação¹¹².

Em suma, tendo em vista a procura de proteínas recombinantes como biofármacos ou para estudos estruturais, torna-se imperativo o desenvolvimento de estratégias de produção mais eficientes, económicas, e rápidas, que deverão ser combinadas com estratégias de purificação que permitam atingir elevados níveis de pureza e rendimento, tendo sempre em conta todos os aspetos até agora mencionados^{13,84,87}.

Relativamente à purificação do IFN α -2b, diversas técnicas já foram utilizadas com o intuito de obter uma elevada purificação, tais como, ultrafiltração, SAB e diversas técnicas cromatográficas, nomeadamente, CFR, CTI, CFG, CA com metais imobilizados, entre outras^{6,9,11,12}. Desta forma, a Tabela 4 resume o rendimento de recuperação/extração e a pureza/fator de purificação de diferentes métodos de purificação do IFN α -2b, bem como o hospedeiro a partir do qual a biomolécula é obtida^{6,8,9,11,12,113,114}.

Tabela 4- Comparação entre diferentes métodos de purificação para o IFNa-2b reportados na literatura.

Processo de purificação	Hospedeiro	Rendimento de Recuperação /Extração (%)	Fator de purificação /Pureza (%)	Ref.
Sistema aquoso bifásico (álcool/sal)	<i>E. coli</i>	74,64	16,24	6
Sistema aquoso bifásico (PEG/sal)	<i>E. coli</i>	40,70	26,30	11
Cromatografia de troca aniônica	<i>E. coli</i>	58,00	≈99,00 %	12
Cromatografia de troca aniônica, ultrafiltração e filtração em gel	<i>Pichia pastoris</i>	64,00	>95,00 %	113
Filtração, dessalinização, cromatografia de troca catiónica	<i>Pichia pastoris</i>	25.20	99,90 %	8
Cromatografia de afinidade com metais imobilizados, cromatografia de fase reversa e cromatografia de troca iónica	<i>E. coli</i>	12,00	99,90 %	9
Cromatografia troca catiónica	<i>E. coli</i>	72,00	56,80 %	114

A CTI^{8,12,113} e a CA⁹ são os métodos mais mencionados, tanto em processos que compreendem uma única etapa de purificação, como em processos envolvendo várias etapas. Estes processos baseados em cromatografia apresentam uma elevada resolução, levando a purezas próximas de 100 %, necessárias para a aplicação comercial do IFN-2b como biofarmaco^{84,85}.

Em geral, o rendimento de purificação parece ser proporcional à concentração inicial de IFN e à sua pureza. Este aspeto, demonstra que para se obter uma elevada percentagem de purificação não é suficiente um método adequado de purificação, como também, é essencial um processo de produção e extração devidamente otimizados¹².

Existe um contínuo e renovado interesse para o desenvolvimento de novos suportes e ligandos cromatográficos que permitam atingir elevadas purezas e elevados rendimentos, em linha com os desenvolvimentos que se têm verificado na etapa de *upstream* onde se produzem elevadas concentrações de proteínas^{6,11,84}. Assim, uma solução para o problema referido poderão ser os líquidos iónicos suportados num determinado suporte¹¹⁵. Sendo que, este tipo de fase estacionária, já foi utilizado em cromatografia líquida preparativa de diversos compostos de valor acrescentado¹⁵⁻¹⁸.

1.5 Líquidos Iónicos

1.5.1 Estrutura química e características gerais

Os LIs são, por definição, sais que possuem uma temperatura de fusão inferior a 100 °C, sendo constituídos por um catião orgânico (derivados do imidazol, colina, piridina, pirrol, amónio, entre outros) e um anião orgânico ou inorgânico (cloreto, brometo, acetato, nitrato, entre outros) - Figura 13 ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Devido à grande diversidade de catiões/aniões, múltiplas combinações podem ser produzidas e as características dos LIs ajustadas em prol de uma aplicação específica, levando a que os LIs sejam recorrentemente designados por “*designer solvents*”^{119,120}.

O seu valor de ponto de fusão pode ser justificado pela assimetria de pelo menos um dos iões e de atrações intermoleculares fracas^{116,117}. Desta forma, eles não formam uma estrutura cristalina ordenada, daí apresentarem-se frequentemente no estado líquido à temperatura ambiente¹¹⁶⁻¹¹⁸.

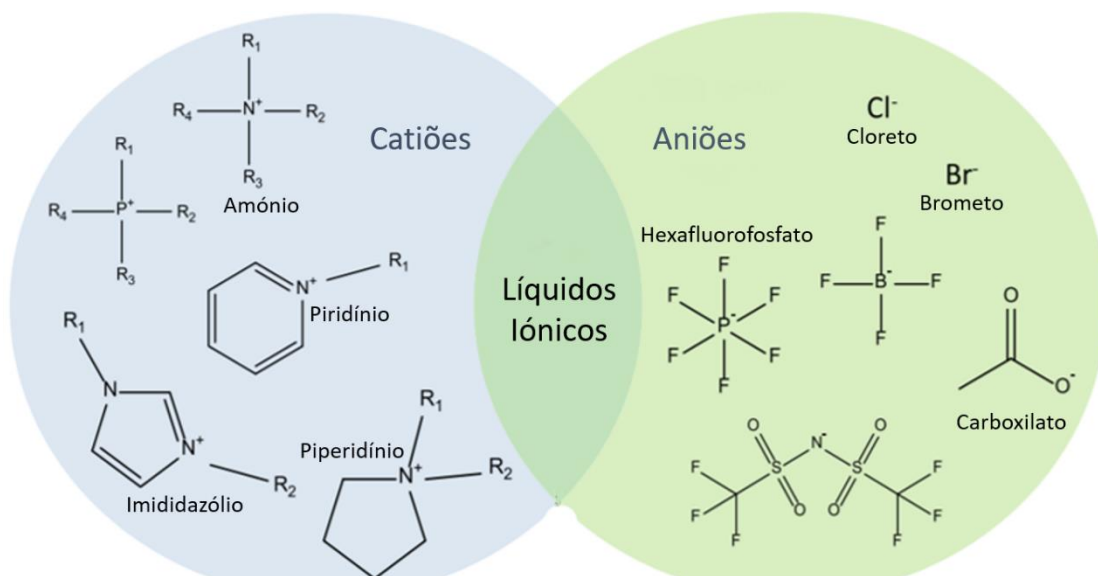


Figura 13- Estrutura química dos cátions e aniões mais comuns utilizados na formação de LIs¹¹⁸.

Atualmente, os LIs são apresentados como uma alternativa frequentemente mais sustentável e ecológica aos solventes orgânicos clássicos utilizados^{118,119}. Apesar de nas duas últimas décadas se ter assistido a um aumento do número de aplicações envolvendo LIs, estes não são compostos recentes. O primeiro LI ($[\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3] [\text{NO}_3]$) foi, segundo a literatura, sintetizado no ano de 1914, por Walden, de forma casual enquanto testava novos explosivos¹²¹. A performance superior das tecnologias envolvendo LIs deve-se sobretudo ao facto das suas propriedades físico-químicas, tais como, a densidade, viscosidade, solubilidade e toxicidade poderem ser moduladas mediante o tipo de catião e anião que os constituem, tornando possível ajustá-las para cumprir os requisitos de aplicações específicas^{122–124}. O carácter iónico inerente permite ainda que estes compostos apresentem certos atributos notáveis tais como, uma pressão de vapor nula à temperatura ambiente e a não inflamabilidade, o que contribui para que os LIs sejam designados frequentemente por solventes verdes, o que leva a que estes compostos sejam atualmente utilizados numa ampla gama de processos como substitutos dos solventes orgânicos voláteis e perigosos geralmente usados¹²⁴. Teoricamente, essa substituição eliminaria perdas desses solventes para a atmosfera e, conseqüentemente, diminuiria os efeitos nocivos para o meio ambiente, possibilitando o desenvolvimento de processos mais ecológicos^{124,125}. Estes compostos apresentam ainda uma elevada condutividade térmica, e elevada estabilidade química, térmica e eletroquímica^{116,118}.

No entanto, o facto dos LIs apresentarem uma pressão de vapor desprezável, não é suficiente para garantir que estes solventes sejam considerados inofensivos para o meio ambiente, tornando imperativo determinar seu impacto no ambiente, e na saúde humana¹²⁵. De facto, os principais desafios do uso de LIs para a manipulação de biomoléculas são a incerteza significativa da sua eco- e citotoxicidades, biodegradabilidade e o eventual efeito dos mesmos nas biomoléculas¹¹⁸. Até ao momento, vários estudos realizados em diferentes tipos de células, tais como bactérias, fungos, algas, linhas celulares de mamíferos, vertebrados e outros revelaram que os efeitos tóxicos dos LIs variam consideravelmente de acordo com a sua estrutura, condições de teste e morfologia dos organismos modelo^{126,127}. Por exemplo, está bem estabelecido que a toxicidade do catião aumenta com o aumento do comprimento das cadeias laterais do grupo alquilo, devido ao aumento da hidrofobicidade e, conseqüentemente, da lipofilicidade¹²⁸. Além do efeito significativo da cadeia lateral, a estrutura química do grupo catiónico também tem um efeito considerável na toxicidade, ou seja, os grupos imidazol e pirimidina exibem efeitos toxicológicos mais fortes, mesmo quando possuem cadeias laterais mais curtas¹¹⁸. Em relação ao efeito do anião, estudos demonstraram que estes apresentam um menor efeito na toxicidade. No entanto, o impacto dos aniões na toxicidade não deve ser subestimado¹²⁹. Portanto, é da maior importância realizar uma caracterização eco- e citotoxicológica completa antes de assumir os LIs como compatíveis com o ambiente e seguros para a saúde humana.

Deve-se notar que os LIs não se limitam apenas ao papel de solventes, pelo contrário, devido à sua enorme versatilidade e características benéficas, nas últimas décadas, estes compostos foram aplicados em campos diferentes da indústria, como química, eletroquímica, nanotecnologia, medicina, produção de materiais, engenharia de energia, biotecnologia, entre outros¹¹⁸.

1.5.2 Imobilização de líquidos iônicos em suportes sólidos e potenciais aplicações

Certas características associadas aos LIs podem, em determinadas situações, ser pouco vantajosas ou até mesmo prejudiciais, como por exemplo, a sua elevada viscosidade, o baixo coeficiente de difusão, a dificuldade em promover a sua reciclagem ou o seu elevado custo devido às grandes quantidades de LIs necessárias¹³⁰.

De modo a ultrapassar os problemas acima referenciados, têm-se vindo a desenvolver estratégias em que o LI é imobilizado na superfície de um suporte sólido, dando origem aos *SILs*. Neste processo de imobilização o LI deixa de estar no estado líquido, mas a escolha de um catião e um anião em prol de uma aplicação pode ser na mesma realizada, dotando os *SILs* da capacidade de “*designer adsorbents*”^{119,130–132}. Os *SILs* apresentam vantagens sobre outro tipo de materiais já existentes (grafeno; carvão ativado), uma vez que, conseguem conciliar as propriedades benéficas do material de suporte, como a elevada área de superfície e determinados aspetos mecânicos, com as propriedades benéficas dos LIs¹³⁰. Em suma, a criação dos *SILs* veio revolucionar o processo de extração, aumentando a eficiência de separação e extração, sendo nos dias de hoje bastante utilizado para os mais diversos fins^{130,132}.

Na síntese dos *SILs*, os LIs podem ser imobilizados na superfície do material por quimiosorção ou fisiosorção^{132,133}. Na quimiosorção, método utilizado neste trabalho, os LIs são imobilizados por ligação covalente aos grupos funcionais presentes na superfície do material de suporte^{130,132,134}. Normalmente, os sistemas obtidos por este método estão presentes como uma monocamada, contudo uma disposição em multicamada também pode ser obtida^{132,134}. Na fisiosorção, um filme fino de LI é disperso em multicamadas num sólido poroso com elevada área superficial, e desta forma as propriedades físico-químicas dos LIs são transferidas para a superfície de um material sólido^{130,132,135}. Neste caso, apenas interações fracas como forças de Van der Waals e ligações de hidrogénio entre o LI e a superfície do suporte estão presentes. A Figura 14 representa as estratégias mencionadas para a incorporação de LIs no material de suporte: quimiosorção (A) e fisiosorção (B)¹³².

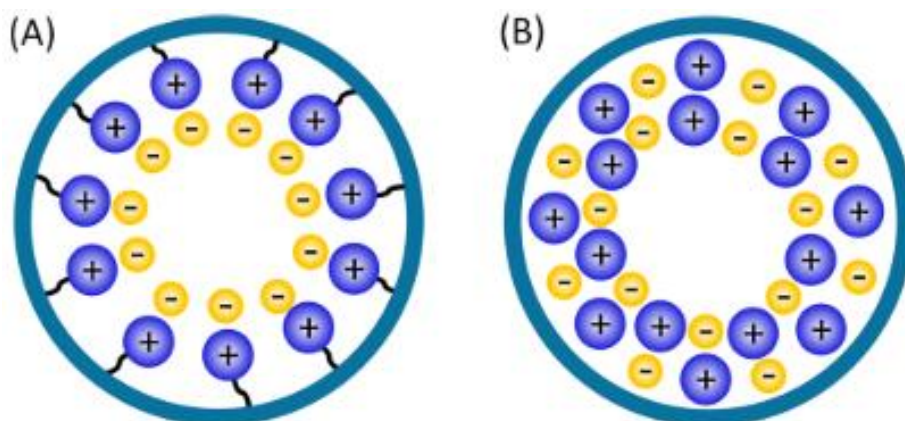


Figura 14- Incorporação de LIs na estrutura de um poro (material de suporte) por duas estratégias diferentes: (A) quimiosorção e (B) fisiosorção. Adaptado de ¹³².

A principal desvantagem associada à fisiosorção é o potencial de “lixiviação”, devido às fracas interações existentes entre o suporte e o LI, especialmente quando estes tipos de *SILs* são utilizados com solventes que conseguem dissolver LIs, tais como as soluções aquosas geralmente utilizadas como fases móveis em cromatografia líquida preparativa de biofármacos^{130,132,136}. Todavia, esta abordagem possui certas vantagens como por exemplo: (1) a maioria das características físico-químicas dos LIs são mantidas; (2) facilidade na reciclagem dos LIs e do material de suporte e (3) as propriedades dos LIs acoplados podem ser facilmente moduladas para uma determinada aplicação^{130,132}.

Por outro lado, a imobilização de LIs em matrizes porosas, por ligação covalente, é uma estratégia atrativa para contornar a “lixiviação” referida, o que é estritamente necessário para determinadas aplicações, como por exemplo, em cromatografia líquida¹³². Neste caso, algumas propriedades específicas dos LIs são perdidas, pois não há fase líquida. Todavia, a estrutura química do LI e os grupos funcionais específicos ainda estão presentes, o que pode contribuir para melhorar as propriedades do material e desempenho global do *SIL* utilizado numa determinada aplicação^{130,132}. Este método apresenta, no entanto, algumas limitações, tais como: (1) uma preparação mais desafiante do ponto de vista técnico, uma vez que, pelo menos uma etapa de reação é necessária; (2) uma baixa densidade de íons resultante da formação de uma monocamada; e (3) o requisito de um pré-tratamento de materiais inertes^{130,132,137}.

A escolha do material de suporte é também um passo muito importante, pois a estrutura e as propriedades dos *SILs* são significativamente influenciadas pela estrutura, tamanho dos poros e pela própria química do material, o que determina a natureza e

extensão da interação LI-material¹³². Os materiais de suporte mais comuns são a sílica (gel, macroporosa, mesoporosa, nanopartículas), nanotubos de carbono, polímeros (polietersulfona, sefarse), materiais cristalinos e outros materiais inorgânicos como γ -alumina^{130,132}.

A sílica é o material de suporte mais utilizado para a síntese de *SILs*, uma vez que possui uma elevada área superficial, elevada estabilidade térmica, química e mecânica, é fácil de manusear, apresenta uma química de superfície que pode ser adaptada para melhorar a seletividade de extração e capacidade de adsorção, e apresenta um baixo custo^{130,138}. A química de superfície do material de sílica depende principalmente do conteúdo em grupos silanol (SiOH)¹³⁸. Por norma, este tipo de material necessita de um pré-tratamento para melhorar o conteúdo de grupos SiOH e remover impurezas, através de uma solução aquosa ácida (geralmente ácido nítrico ou ácido clorídrico)^{138,139}. A atenção dada aos grupos SiOH existentes na sílica é porque constituem um grupo adequado que permite a funcionalização do material (ligação covalente)^{130,138,139}.

A Figura 15, demonstra cinco maneiras distintas para se realizar a imobilização dos LIs num material de suporte, como por exemplo a sílica, através de um processo de quimiosorção¹⁴⁰.

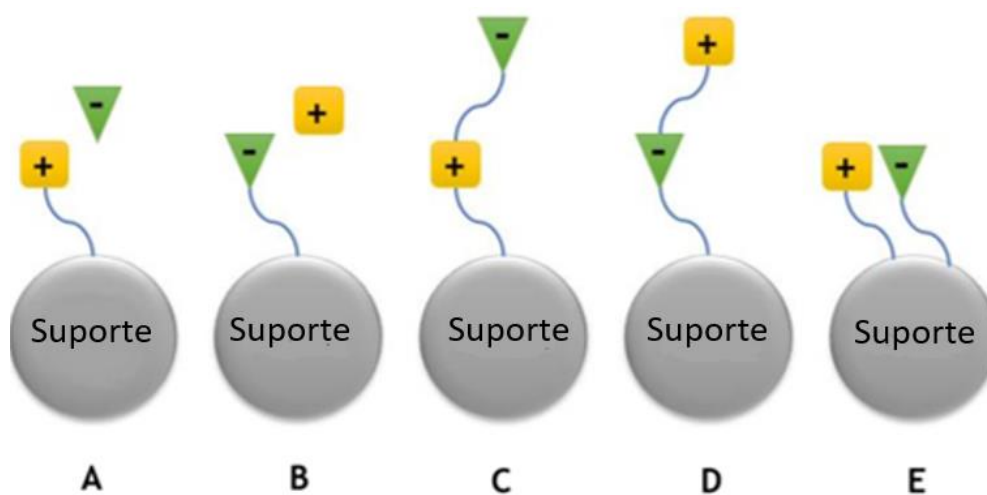


Figura 15- Imobilização de LIs num suporte por quimiosorção¹⁴⁰. Em A e B apenas o catião ou anião é imobilizado no suporte, enquanto os contra íões estão livres. Em C e D são LIs zwitteriônicos imobilizados, onde o catião e o anião estão ligados através de uma ligação covalente. Em E, o catião e o anião são co-imobilizados no suporte.

Uma das estratégias mais recorrente para a preparação dos SILs e adotada no presente trabalho, é a ligação covalente do catião à superfície do suporte sólido, enquanto o anião atua como um contra ião livre (Figura 15A). A preparação do material segundo este processo é relativamente simples e, tem a vantagem de que os aniões livres podem ser facilmente substituídos, tornando os processos de regeneração mais simples e permitindo pequenas modificações pela troca de vários aniões¹⁴⁰. A sílica esférica e porosa funcionalizada, já demonstrou capacidade de explorar diferentes tipos de interações (hidrofóbicas e iônicas) e, portanto, uma separação multimodal¹⁴⁰. Geralmente, o catião é ancorado na sílica por uma pequena cadeia carbonada, e diferentes comprimentos dessa cadeia carbonada podem influenciar a seletividade do suporte, pela alteração da hidrofobicidade¹⁴⁰⁻¹⁴². Por outro lado, os aniões raramente são imobilizados nos suportes (Figura 15B), uma vez que, um estudo específico de Qiu e colaboradores¹⁴³, demonstrou que, neste caso, os contra iões eram facilmente trocados pelas espécies iônicas presentes nas fases móveis durante o ensaio experimental. A Figura 15C e D dizem respeito a LIs zwitteriônicos, os quais podem evitar os problemas anteriores, tendo em conta que o catião e o anião estão covalentemente ligados entre si¹⁴⁰. Por fim, na Figura 15E, os LIs são co-imobilizados nos suportes sólidos, o que pode melhorar a estabilidade desses ligandos durante o uso de fases móveis com diferentes composições e tampões, influenciando a seletividade pela distribuição dos grupos polares¹⁴⁰⁻¹⁴².

A aplicabilidade dos *SILs* como auxílio a uma técnica de microextração em fase sólida, encontra-se inicialmente reportada no ano de 2005, onde foi realizada uma extração de compostos aromáticos¹⁴⁴. No entanto, um estudo sobre adsorventes de sílica modificados por LIs foi publicado em 2009¹⁴⁵. Tian e colaboradores¹⁴⁵, demonstraram através dessa publicação a capacidade superior deste tipo de material para a extração de tanshinona da *Salvia Miltiorrhiza Bunge* comparativamente a um material de sílica comercial (sem a presença de LIs). Este e outros trabalhos publicados, demonstraram a aplicabilidade dos *SILs* na área química, biológica, ambiental, entre outras o que proporcionou um maior interesse por parte da comunidade científica, aumentando anualmente o leque de possíveis utilizações dos *SILs*, bem como a sua eficácia de utilização. Para além deste tipo de aplicabilidade, os *SILs* mostraram-se eficientes na separação de vários compostos, nomeadamente em amostras aquosas, como fármacos, metais pesados, resíduos nucleares entre outros^{130,146,147}. Desta forma, criou-se a hipótese

de que os *SILs* podem proporcionar diferentes mecanismos de interação com os compostos alvo, como troca aniônica, ligações de hidrogênio, interações iônicas e π - π ¹⁴⁷.

Ao nível das proteínas verificou-se, por exemplo, que os *SILs* são vantajosos para aplicações biocatalíticas, uma vez que, a atividade enzimática pode ser aumentada quando uma determinada enzima é suportada neste tipo de materiais^{15,18,130}. Para além disso, Marwani e colaboradores¹⁴⁸ reportaram a imobilização de um LI quirál na superfície da sílica, com o intuito de realizar uma separação seletiva de D fenilalanina de soluções aquosas. Os autores examinaram o desempenho do material preparado aplicando-o a amostras reais de água (lençóis freáticos, lagos, mar, águas residuais) com resultados bastantes satisfatórios.

Recentemente, Márcia C. Neves e colaboradores¹⁷ prepararam e caracterizaram uma nova matriz cromatográfica multimodal, nomeadamente, uma resina macroporosa funcionalizada com o LI cloreto de 1-metil-3-propilimidazólio, através do processo de quimiosorção, com capacidade para purificar numa única etapa ácidos nucleicos obtidos a partir de um lisado bacteriano. Os autores reportaram ainda que a matriz em questão pode ser regenerada e reutilizada sem comprometer o seu desempenho. Este trabalho em particular pode servir de referência, uma vez que, vai de encontro ao que é pretendido para a realização desta dissertação, alterando o tipo de matriz cromatográfica e o produto a ser purificado.

Em conclusão, ao longo dos últimos anos, aumentou a consciencialização sobre as vantagens da aplicabilidade dos *SILs*, como adsorventes cromatográficos, para diversos problemas já mencionados, em particular a extração e purificação de proteínas^{18,130}. Para conseguir isso, a aplicabilidade dos *SILs* ao nível das biomoléculas deve ser adicionalmente investigada e aprimorada, de modo, a assumirem-se como um método viável de extração e purificação de proteínas num futuro próximo, respeitando as normas de toxicidade ambiental e citológica existentes, bem como a biodegradabilidade e sustentabilidade dos materiais utilizados^{146,149}.

1.6 Motivação e objetivos da dissertação

De um modo geral, e através da revisão da literatura efetuada, é possível concluir que os *SILs* são uma alternativa com grande potencial para aplicação como fase estacionária em cromatografia líquida preparativa de biofármacos¹³⁰. Este tipo de suporte apresenta elevada biocompatibilidade, facilidade de aplicação à escala industrial, elevada seletividade e elevada estabilidade química e proteolítica^{130,150}. Para além disso, a possibilidade de sintetizar o interferão alvo com recurso a um hospedeiro bacteriano, mais concretamente a *E. coli*, facilita todo o processo quer ao nível de quantidade sintetizada como do custo do processo⁸⁷. Assim, é possível perspetivar a utilização de diversos LIs na formação de *SILs*, proporcionando uma melhoria considerável em termos de seletividade, devido à possibilidade de ajustar e manipular as interações entre o LI escolhido e a biomolécula em questão tirando partido do seu carácter de “*designer adsorbent*”^{130,147}. Face ao exposto, pretende-se com esta tese avaliar o potencial da utilização de *SILs* como fase estacionária em cromatografia líquida preparativa tendo em vista a purificação do biofármaco IFN α -2b. Para atingir este objetivo, delinearam-se os seguintes objetivos intermediários: 1) síntese e caracterização dos *SILs*; 2) produção e recuperação do IFN α -2b em *E. coli*; 3) estabelecimento das condições cromatográficas ótimas de adsorção e eluição do IFN α -2b nos diferentes *SILs* em *batch*; e 4) purificação do IFN α -2b por cromatografia líquida preparativa utilizando as condições ótimas e os *SILs* mais promissores em coluna.

2. Parte experimental

2.1 Materiais utilizados

A parte experimental deste trabalho foi dividida em três etapas principais: 1) síntese e caracterização dos *SILs*; 2) produção e recuperação do IFN α -2b; 3) purificação da proteína alvo, utilizando os suportes cromatográficos sintetizados, em *batch* e em coluna, nos quais se analisou a quantidade de proteína total por medição de absorvância a 280 nm enquanto o perfil de eluição das proteínas foi avaliado qualitativamente por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras.

Na Tabela 5 encontram-se listados todos os materiais e reagentes utilizados na primeira etapa deste trabalho, bem como as informações relativas ao grau de pureza e respectivo fornecedor.

Tabela 5- Reagentes utilizados na síntese e caracterização dos *SILs*, com o respectivo grau de pureza e fornecedor.

Reagentes	Grau de pureza (%)	Fornecedor
1-metilimidazol	99,0	Acros Organics
3-cloropropiltrimetoxisilano	98,0	Acros Organics
Etanol	96,0	Fischer Scientific
HCl	37,0	Sigma-Aldrich
Metanol	98,0	Chem-Lab
N,N-Dimetilbutilamina	99,0	Aldrich
N,N-Dimetilhexilamina	98,0	Sigma Aldrich
N,N-Dimetiloctilamina	95,0	Aldrich
Sílica esférica (75-200 μ m)	-----	Sigma- Aldrich
Tolueno	99,0	Carlos Erba
Tributilamina	99,0	Acors Organics
Trietilamina	99,6	Fischer Chemical
Trihexilamina	99,0	Fischer Chemical
Trioctilamina	>98,0	Fluka

A segunda etapa, tinha como objetivo uma adequada e máxima produção do IFN α -2b, bem como, a sua respetiva recuperação (lise bacteriana e solubilização dos corpos de inclusão). Este protocolo foi previamente otimizado¹⁵¹ e os reagentes necessários encontram-se demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6- Reagentes, estirpe bacteriana e plasmídeo utilizados na produção e recuperação do IFN α -2b, com o respetivo grau de pureza e fornecedor.

Reagentes/ Estirpe bacteriana/ Plasmídeo	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Agar	-----	PanReac
Ampicilina	-----	NZYtech
DTT	99,0	Acros Organics
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	-----	Merck/Sigma-Aldrich
Extrato de levedura	-----	Biokar Diagnostics
Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)	-----	NZYtech
Inibidor de protéases	-----	Fisher Scientific
IPTG	-----	NZYtech
MgCl ₂	>99,0	Prolab
MgSO ₄	>99,0	Prolab
NaCl	>99,5	PanReac
pET-3a	-----	Genscript
Triton-x-100	-----	Acros Organics
Triptona	-----	Biokar Diagnostics
2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (Tris)	-----	Acros Organics
Ureia	99,0	Acros Organics

A realização dos ensaios cromatográficos teve como princípio a exploração preferencial, das interações iônicas ou hidrofóbicas entre a proteína alvo e os *SILs* sintetizados. Todos os materiais utilizados para a realização e interpretação dos respectivos ensaios cromatográficos estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7- Reagentes utilizados nos ensaios cromatográficos e respetiva análise das frações obtidas, com o grau de pureza e fornecedor.

Reagentes	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Blue Safe	-----	NZYtech
Colunas descartáveis de polipropileno	-----	BioRad
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	99,0	Panreac
Fosfato monossódico (NaH ₂ PO ₄)	99,0	Panreac
Géis comerciais	-----	Expedon
HCl	37,0	Sigma-Aldrich
Marcador de proteínas multicor GRS	-----	Grisp
NaCl	>99,5	PanReac
NaOH	>98,0	Merck
Run blue	-----	Expedon
Sulfato de amónio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	99,5	Merck
Tris	-----	Acros Organics

2.2 Síntese dos líquidos iónicos suportados (*SILs*)

O primeiro passo para a síntese de *SILs* foi a ativação da sílica esférica. Para esta etapa, foi adicionado HCl, a 37%, à sílica e colocado em contacto com a mesma durante um período de 24 horas. De seguida, a sílica ativada foi lavada com água destilada, até que o valor de pH fosse idêntico ao pH da água destilada inicial, e colocada a secar a 55 °C durante 24 horas. Posteriormente, 5,0 g da sílica ativada foram dispersas em 60 mL de tolueno num balão de fundo redondo e adicionou-se 5 mL de 3-cloropropiltrimetoxisilano (agente de ligação/ compatibilização). A suspensão foi colocada sob agitação magnética em refluxo a uma temperatura de 93°C durante 24 horas. Posteriormente, o sólido

resultante desta reação foi filtrado e lavado com vários solventes na seguinte ordem: 100 mL de tolueno, 200 mL de etanol/ H₂O (1:1), 500 mL de água destilada e, por último, 100 mL de metanol. O material produzido, denomina-se [Si]l[C₃]Cl e, foi colocado a secar a 55 °C por 24 horas. O segundo passo da funcionalização compreendeu a dispersão de 5,0 g de [Si]l[C₃]Cl, em 60 mL de tolueno, ao qual se adicionou 0,05 moles do composto que originará o catião do *SIL* (“fonte de catião”), como por exemplo o 1-metilimidazol. Esta mistura foi colocada num balão de fundo redondo em refluxo sob agitação magnética (300 rpm) a 115 °C durante 24 horas. Este segundo passo permitiu que os grupos cloropropil, ligados covalentemente à superfície da sílica, reagissem com a “fonte de catião” através de uma reação de substituição nucleofílica¹⁶. O material resultante foi filtrado e lavado com 100 mL de tolueno, 350 mL de metanol, 300 mL de água destilada e 150 mL de metanol, sendo posteriormente colocado a secar a 55 °C durante 24 horas. O *SIL* obtido, tendo em conta o exemplo mencionado anteriormente, foi baseado no LI cloreto de 1-metil-3-propilimidazólio ([Si]l[C₃C₁Im]Cl) e o esquema da sua síntese encontra-se demonstrado na Figura 16.

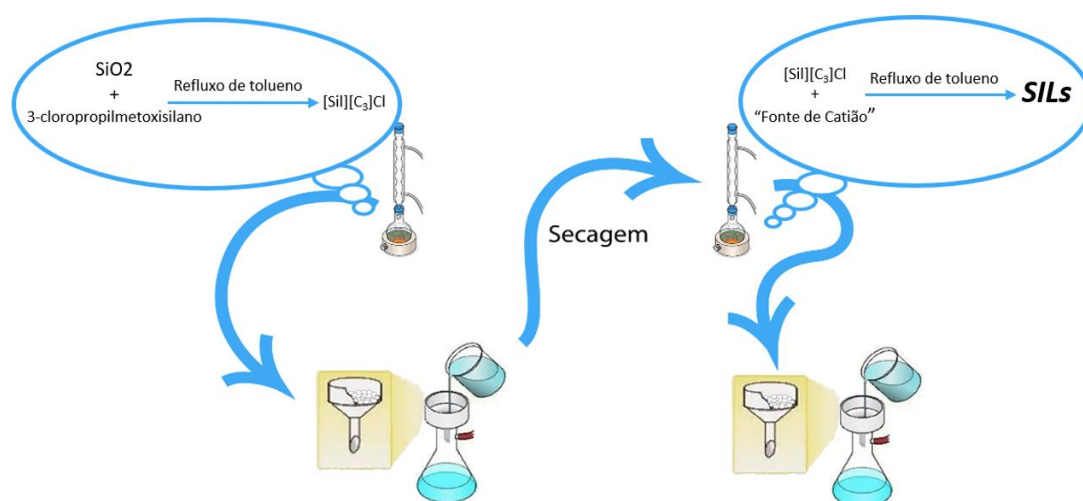
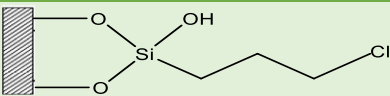
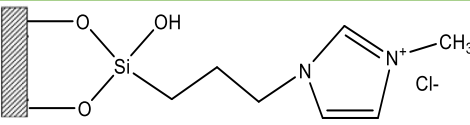
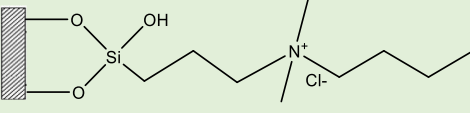
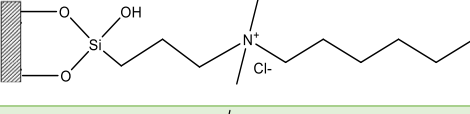
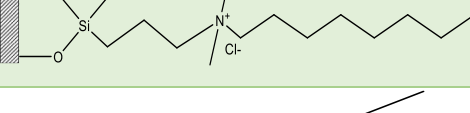
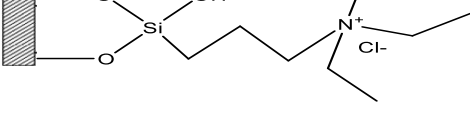
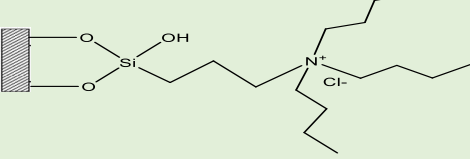
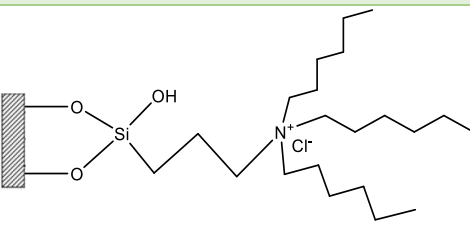
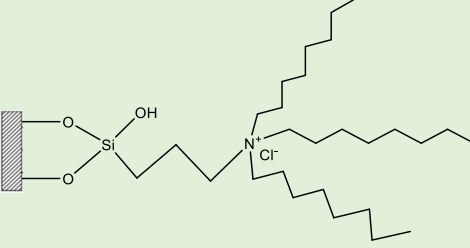


Figura 16- Processo global de síntese de SILs.

A síntese em questão, para além do exemplo referido, foi repetida utilizando diferentes aminas terciárias como fonte de catião, dando origem a amónios quaternários exibidos na Tabela 8. Conforme representado, o número de moles de cada fonte catiónica foi o mesmo (0,05 moles) para todos os *SILs* e, como todos eles têm diferentes massas moleculares (Tabela S1, em anexo), o volume (mL) adicionado em cada síntese foi distinto, de acordo com o descrito na Tabela 8.

Tabela 8- Estrutura química de todos os SILs sintetizados, bem como as respectivas abreviaturas, “fonte de catião” e volume utilizado correspondente a 0,05 moles.

Abreviatura	Estrutura dos materiais preparados	“Fonte de catião”	Vol. (mL)
[Sil][C ₃]Cl		-	-
[Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl		1-metilimidazol	4,03
[Sil][N ₃₁₁₄]Cl		N,N-Dimetilbutilamina	7,02
[Sil][N ₃₁₁₆]Cl		N,N-Dimetilhexilamina	8,69
[Sil][N ₃₁₁₈]Cl		N,N-Dimetiloctilamina	10,21
[Sil][N ₃₂₂₂]Cl		Trietilamina	6,97
[Sil][N ₃₄₄₄]Cl		Tributilamina	11,91
[Sil][N ₃₆₆₆]Cl		Trihexilamina	16,97
[Sil][N ₃₈₈₈]Cl		Triocetilamina	21,80

2.3 Caracterização dos líquidos iônicos suportados (SILs)

Todos os materiais sintetizados foram analisados por análise elementar, área de superfície pelo método Brunauer-Emmet-Teller (*SBET*), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*), ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C (RMN ^{13}C), medição do potencial zeta em função do pH para determinar o ponto de carga zero (PCZ) e microscopia eletrônica de varrimento (*SEM*), a fim de verificar a funcionalização do material de sílica com os LIs de interesse.

2.3.1 Análise Elementar

A composição dos *SILs* preparados em termos de teores de carbono, hidrogénio e nitrogénio foi determinada por análise elementar, recorrendo ao equipamento Truspec 630-200-200. Utilizaram-se aproximadamente 2 mg de cada material, uma temperatura do forno de combustão de 1075 °C e do forno pós-queimador de 850 °C. O método de quantificação de carbono e hidrogénio foi a absorção de radiação infravermelha e, do nitrogénio, foi a condutividade térmica.

2.3.2 Determinação da área de superfície (*SBET*)

Este método de caracterização foi executado por adsorção de nitrogénio, através de um analisador de área superficial Micromeritics Gemini V-2380. O método BET foi utilizado para estimar a área de superfície (*SBET*).

2.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*)

A espectroscopia de infravermelho foi avaliada por análise *FTIR*. Esta técnica foi executada utilizando um espectrofotómetro de *FTIR* (Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX) e uma amostra sólida de cada material, a 25 °C e entre 4000-400 cm^{-1} . As amostras foram sujeitas a 128 scans, com uma resolução de 8,0 e intervalo de 2,0.

2.3.4 Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C (RMN ^{13}C)

Relativamente à análise por RMN ^{13}C , cada material foi analisado por um espectrómetro Bruker Avance III - 400 MHz (modelo DSX). O espectro foi registado em 9,7 T com sondas VTN de 4 mm e rotação do ângulo mágico de polarização cruzada (CPMAS) a 100,6 MHz.

2.3.5 Determinação do ponto de carga zero (PCZ)

O PCZ de todos os materiais foi determinado por medições do potencial zeta de suspensões aquosas dos materiais numa ampla gama de valores de pH. Para ajustar o pH, foram utilizadas soluções aquosas de NaOH e HCl, com concentrações de 0,01 M. Estes resultados foram registados através do equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Malvern) à temperatura ambiente (20 °C).

2.3.6 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Para verificar o efeito na morfologia da presença dos LIs à superfície da sílica, foram recolhidas imagens de SEM, utilizando os microscópios eletrónicos Hitashi SU-70 operados a 15 kV, e Hitashi S4100 a 25 kV. Uma amostra de cada material foi colocada numa porção de fita de carbono e, para aumentar a condutividade elétrica, foi depositada uma fina película de carbono.

2.4 Produção recombinante do IFN α -2b na bactéria *E. coli*

A produção recombinante do biofármaco IFN α -2b foi realizada com uma estirpe de *E. coli* BL21 (DE3), previamente transformada por choque térmico com o plasmídeo pET-3a_ IFN α -2b, que tinha uma versão do gene do IFN α -2b humano com a frequência de codões otimizada para *E. coli*. O sistema recombinante onde foi expressa a proteína alvo designa-se por *E. coli* IFN α -2b-pET-3a¹⁵¹.

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram os seguintes: LB-Agar (10 g/L triptona; 5g/L extrato de levedura; 5 g/L NaCl; 15 g/L agar; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina), e meio SOB (20 g/L triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl; 20 mg/L de MgCl_2 ; 20 mg/L de MgSO_4 ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina). Os meios de cultura em questão, bem como todo o material utilizado foram autoclavados. A biossíntese recombinante do

IFN α -2b foi realizada de acordo com o protocolo previamente reportado¹⁵¹ e descrito de forma breve a seguir: uma placa de meio sólido (*LB-Agar*) foi inoculada com uma alíquota de *E. coli* IFN α -2b-pET-3a, e incubada a 37 °C durante 16-18 horas. Após este período, efetuou-se a inoculação do meio SOB líquido (62,5 mL meio em *erlenmeyers* de 250,0 mL) com a cultura proveniente da placa e colocou-se a incubar a 37 °C com agitação (250 rpm). Ao longo de todo o processo, monitorizou-se o crescimento celular através da medição da absorvância a 600 nm (densidade ótica- DO₆₀₀) efetuando uma diluição apropriada e utilizando NaCl 0,8% (m/m), o qual mimetiza o meio de cultura. Quando a pré-cultura atingiu a densidade ótica de 2,6 (aproximadamente após 3 horas de cultivo), retirou-se uma alíquota da pré-fermentação, cujo volume foi calculado a partir da eq. 1), de forma a proceder ao início da fermentação com uma DO₆₀₀ de 0,2 (em *erlenmeyers* de 500 mL contendo 125 mL de meio *SOB*).

$$DO_{pré-fermentação} \times V = (V + V_{fermentação}) \times DO_{inicial} \quad (\text{equação 1})$$

Quando se verificou uma DO₆₀₀ de 0,6 (aproximadamente uma hora após o início da fermentação), procedeu-se à indução da fermentação com 1 mM de IPTG de forma a promover o início da produção da proteína recombinante alvo. Finalmente, após 3 horas de fermentação, mediu-se a DO₆₀₀, a qual deveria estar compreendida entre 1,6 e 1,8, e centrifugou-se a cultura (4000 x g, 4°C, durante 10 minutos). O sobrenadante foi removido e o pellet armazenado a -20 °C para posteriormente se realizar a lise bacteriana.

2.5 Recuperação (lise bacteriana e solubilização) do IFN α -2b

A lise bacteriana foi efetuada recorrendo a um método mecânico com esferas de vidro, e de seguida procedeu-se à solubilização dos corpos de inclusão com ureia em meio alcalino. Inicialmente, ressuspenderam-se os pellets celulares em 2,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM pH 7,5), 25 μ L de PMSF 100 mM, 50 μ L de inibidor de proteases, 25 μ L de DTT 100 mM) e adicionaram-se 3,75 g de esferas de vidro. De seguida, agitou-se a mistura no vórtex durante 7 ciclos de 1 minuto, espaçados com 1 minuto de incubação em gelo, de forma a promover a lise celular. Posteriormente, retiraram-se as esferas de vidro, recolheram-se alíquotas de 250 μ L e centrifugou-se a mistura a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C. De seguida, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à lavagem dos corpos de inclusão. Para tal, ressuspendeu-se o pellet em 500

μL de triton-X-100 (a 1% dissolvido em Tris-HCl 10 mM pH 8) e centrifugou-se a 10000 x g, durante 10 minutos à temperatura ambiente, tendo-se descartado o sobrenadante. Efetuou-se uma segunda lavagem dos corpos de inclusão com 500 μL de ureia 4 M (dissolvida em Tris-HCl 10 mM pH 8) e efetuou-se nova centrifugação (10000 x g, 10 minutos à temperatura ambiente). Finalmente, removeu-se o sobrenadante e procedeu-se à solubilização dos corpos de inclusão com 250 μL de ureia a 8 M (dissolvida em Tris-NaOH 50 mM pH 12,5) e DTT 20 mM durante 90 minutos à temperatura ambiente no agitador de rolos (40 rpm). Após este período, voltou-se a centrifugar (10000 x g, 10 minutos à temperatura ambiente), recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se à diálise (Termo fisher 7000 MWCO) à temperatura ambiente com 250 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8 de forma a retirar a ureia. Após um período de 16 horas, a solução existente dentro da manga de diálise foi concentrada em 5 vezes (concentradores Vivaspin 10 MWCO) e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizada posteriormente.

2.6 Ensaios de purificação

Para avaliar o comportamento do IFN α -2b, em termos de ligação e eluição nos diferentes suportes, cada um dos ensaios foi inicialmente otimizado em *batch*, e posteriormente testado em coluna.

Em todos os ensaios realizados (em batch e em coluna), procedeu-se à medição da absorvância a 280 nm, permitindo desta forma identificar as frações onde as proteínas eluem e, quando aplicável, traçar os respetivos cromatogramas. Adicionalmente e de acordo com esses valores, procedeu-se à dessalinização e concentração das diferentes frações cromatográficas (concentradores Vivaspin, 10 MWCO), permitindo avaliar o perfil de eluição das proteínas por eletroforese desnaturante e redutora de acrilamida, como descrito em mais detalhe nas subsecções que se seguem.

2.6.1 Ensaios em *batch*

De uma forma geral, foram preparados diversos tampões cromatográficos, nomeadamente: Tris 10 mM pH 8 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10mM pH 8) para testar preferencialmente interações iónicas, e 2,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (em Tris 10mM pH 8) e Tris 10 mM pH 8 para explorar maioritariamente o estabelecimento de interações hidrofóbicas. Para avaliar a performance de purificação dos *SILs* sintetizados em batch,

inicialmente, foram pesadas 150 mg do material em estudo e de seguida realizaram-se as seguintes etapas, as quais foram intercaladas por um passo de centrifugação (1800 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente): 1) lavagem do material com 1 mL de água destilada (em duplicado); 2) Equilíbrio do suporte cromatográfico com 1 mL do tampão de ligação, respetivamente com tampão Tris 10 mM pH 8/NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para o estudo preferencial de interações iónicas ou hidrofóbicas (em duplicado); 3) Adição de 250 μL da amostra dialisada; 4) Remoção das proteínas que não interagiram com o suporte através da adição de 1 mL da solução de equilíbrio (em triplicado); 5) Eluição com um ou múltiplos passos através da adição de 1 mL do tampão de eluição, respetivamente: para interações iónicas, com concentrações crescentes de NaCl enquanto para interações hidrofóbicas, com concentrações decrescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (em triplicado). Com o intuito de explorar o mesmo tipo de interações, foi realizado o mesmo protocolo com uma solução tampão que continha as mesmas características da solução referida, mas com um pH de 6,5 e, com uma solução tampão onde o NaCl estava dissolvido numa solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 200 mM pH 8.

2.6.2 Ensaio em coluna

Para a realização deste tipo de ensaios, foi empacotada 1,0 g do respetivo suporte cromatográfico numa coluna EconoPac (Bio-Rad) e utilizando os mesmos tampões cromatográficos descritos na secção anterior efetuaram-se as seguintes etapas: 1) lavagem do material com 25 mL de água destilada; 2) Equilíbrio do suporte cromatográfico com 25 mL do tampão de ligação; 3) Adição de 500 μL da amostra dialisada; 4) Adição de tampão de equilíbrio para remover as proteínas que não interagem com o suporte cromatográfico (interações iónicas- Tris 10 mM pH 8; interações hidrofóbicas- 2,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em Tris 10 mM pH 8), no mínimo 5 volumes de coluna; 5) Eluição com diversos passos consecutivos com concentrações crescentes de NaCl (0,35; 1,5 M- interações iónicas) ou concentrações decrescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0; 0,5 M e Tris 10 mM pH 8- interações hidrofóbicas), onde ambos os sais estão dissolvidos em Tris 10 mM pH 8. Com exceção da adição de amostra que foi efetuada manualmente com o auxílio de uma micropipeta, todos os passos cromatográficos foram realizados com auxílio de uma bomba peristáltica com um fluxo de 0,5 mL/min.

2.6.3 Regeneração da coluna

Para garantir a reprodutibilidade entre os ensaios e, manter o desempenho dos suportes, é imprescindível estabelecer um protocolo de regeneração eficaz. Para isso, incubou-se cada suporte com 25 mL de uma solução de 0,2 M de NaOH durante 10 minutos, removeu-se a solução e voltou-se a incubar com o mesmo volume de uma solução de 0,5 M de HCl para a substituição do contra ião (Cl⁻) na matriz. Após cada protocolo de regeneração, os suportes foram lavados com água destilada.

2.6.4 Concentração das frações cromatográficas: ultrafiltração vs precipitação

As amostras provenientes dos ensaios cromatográficos foram sujeitas a um processo de ultrafiltração, permitindo a sua concentração (para um volume de 50 µL) e dessalinização (com Tris 10 mM pH 8) utilizando concentradores Vivaspin, 10 MWCO.

Em alternativa ao método de ultrafiltração, testou-se a precipitação com etanol: adicionou-se etanol (96 % (v/v)) a cada amostra numa proporção 1:4, incubou-se a -20°C durante 16 horas. Após este período, realizou-se uma centrifugação a 10000 rpm durante 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet obtido para um volume de 50 µL em Tris 10 mM pH 8.

2.7 Avaliação qualitativa do fator de purificação de INF α -2b por eletroforese desnaturante e redutora de acrilamida

A análise do perfil proteico do INF α -2b e contaminantes produzidos em *E. coli* e, dos respetivos picos obtidos dos ensaios em *batch* e em coluna, foi realizada com recurso a eletroforese de acrilamida desnaturante e redutora em gel de agarose. Posteriormente, a amostra dialisada, bem como as frações foram adicionados ao *loading buffer*, numa diluição 1:1. Após esta diluição, a amostra dialisada e as frações recolhidas foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos com o intuito de quebrar a estrutura quaternária e desconstruir parte da estrutura terciária, reduzindo as ligações dissulfureto e assim, desnaturar as proteínas. No final da corrida, colocou-se o gel a corar com o reagente BlueSafe, num agitador orbital a 50 rpm por 3 horas à temperatura ambiente.

3. Resultados e discussão

3.1 Síntese e caracterização dos SILs

Após a síntese dos SILs, é importante analisar e verificar se os diferentes LIs se encontram corretamente imobilizados no material de suporte – sílica, assim como o grau de funcionalização conseguido. Para isso, foram realizadas análises recorrendo a diferentes técnicas onde além dos SILs, analisaram-se também a sílica ativada e o suporte intermediário ([Si][C₃]Cl), os quais funcionam como controlo, permitindo deste modo avaliar o grau de funcionalização.

3.1.1 Análise elementar e área de superfície

De forma a verificar o conteúdo (em percentagem mássica) de carbono, hidrogénio e nitrogénio, foi realizada a análise elementar de cada SIL e do material intermediário, Tabela 9.

Tabela 9- Percentagem mássica de carbono, hidrogénio e nitrogénio do material intermediário e de cada SIL.

Amostra	% Carbono	% Hidrogénio	% Nitrogénio
[Si][C ₃]Cl	3,868	1,161	0,000
[Si][C ₃ C ₁ Im]Cl	6,048	1,376	1,950
[Si][N ₃₁₁₄]Cl	6,987	1,826	0,792
[Si][N ₃₁₁₆]Cl	8,411	2,003	0,849
[Si][N ₃₁₁₈]Cl	9,484	2,329	0,725
[Si][N ₃₂₂₂]Cl	3,609	1,042	0,188
[Si][N ₃₄₄₄]Cl	4,205	1,197	0,102
[Si][N ₃₆₆₆]Cl	5,098	1,333	0,098
[Si][N ₃₈₈₈]Cl	4,077	1,193	0,055

De modo a completar a análise elementar e, para ter certeza da correta funcionalização da sílica esférica foi, inicialmente, determinada a *SBET* da mesma (288,59 m²/g). A área superficial é uma característica particular de um sistema de poros, como a sílica esférica, e depende principalmente do tamanho da partícula e da própria porosidade²⁰.

Com o valor da área superficial, foi possível combinar esse dado com a percentagem de carbono e nitrogénio dadas pela análise elementar no [Sil][C₃]Cl e em cada *SIL*, *respetivamente*. Assim, calculou-se a quantidade de ligação (*BA*) em $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, utilizando as seguintes equações:

$$BA = \frac{\%C}{\frac{3 \times M(C)}{SBET}} \quad (\text{equação 2})$$

A equação 2 apresentada, foi usada para o cálculo da *BA* do [Sil][C₃]Cl. A % C está referida na Tabela 9, M (C) é a massa molecular relativa do carbono, 12 g/mol, e é multiplicado por três para representar os três carbonos presentes na molécula (propilo) e, *SBET* é a área da superfície da sílica, já mencionada anteriormente.

$$BA = \frac{\%N}{\frac{2 \times M(N)}{SBET}} \quad (\text{equação 3})$$

$$BA = \frac{\%N}{\frac{1 \times M(N)}{SBET}} \quad (\text{equação 4})$$

A equação 3 foi utilizada apenas para o [Sil][C₃C₁Im]Cl, porque é o único *SIL* que possui 2 átomos de nitrogénio por molécula (grupo imidazólio). Por outro lado, a equação 4 foi aplicada aos restantes *SILs*, uma vez que, estes possuem apenas um átomo de nitrogénio na sua estrutura (grupo amónio). A % N encontra-se explícita na Tabela 9, M (N) é o peso molar de nitrogénio, 14 g/mol, e *SBET* é a área superficial da sílica referida em cima. Os valores obtidos através dos cálculos da equação 2, 3 e 4 encontram-se demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10- Quantidade de LI ligada à sílica esférica ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

Amostra	BA ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
[Si][C ₃]Cl	3,723
[Si][C ₃ C ₁ Im]Cl	2,413
[Si][N ₃₁₁₄]Cl	1,959
[Si][N ₃₁₁₆]Cl	2,100
[Si][N ₃₁₁₈]Cl	1,794
[Si][N ₃₂₂₂]Cl	0,465
[Si][N ₃₄₄₄]Cl	0,282
[Si][N ₃₆₆₆]Cl	0,243
[Si][N ₃₈₈₈]Cl	0,135

Através da análise dos valores descritos na Tabela 9, é adequado concluir que todas as amostras de *SILs* contêm na sua composição nitrogénio. Pelo contrário, como era esperado, o [Si][C₃]Cl não apresenta nitrogénio. Estes resultados indicam que o processo de imobilização foi à partida bem-sucedido, uma vez que, apenas após a introdução da fonte de catião é possível detetar a presença de nitrogénio. Tendo por base a Tabela 10, é possível afirmar que o material [Si][C₃C₁Im]Cl é o *SIL* que apresenta um maior número de moles de nitrogénio por m² de sílica (2,413). Este aspeto, significa que este material é aquele com um maior grau de funcionalização. Os outros *SILs* apresentam um menor número de moles de nitrogénio por m² de sílica, o que pode ser, de forma geral, devido a um impedimento estereoquímico associado, por exemplo, ao aumento do comprimento das cadeias alquílicas. De facto, o impedimento estereoquímico possui um papel decisivo no processo de funcionalização. Na medida em que, quando o ligando adicionado é assimétrico este impedimento é menor, comparativamente à ligação de um ligando simétrico. Esta teoria pode, à partida, ser comprovada pelos resultados obtidos, uma vez que, na presença de ligandos assimétricos ([Si][N₃₁₁₄]Cl, [Si][N₃₁₁₆]Cl e [Si][N₃₁₁₈]Cl)) obteve-se uma maior *BA* e, como tal, um maior grau de funcionalização.

3.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho, é uma técnica útil para a identificação de modificações químicas. Sendo por isso, importante para analisar o processo de funcionalização^{17,152}. Os espectros recolhidos da sílica ativada, do material intermediário e de todos os *SILs* estão representados na Figura 17.

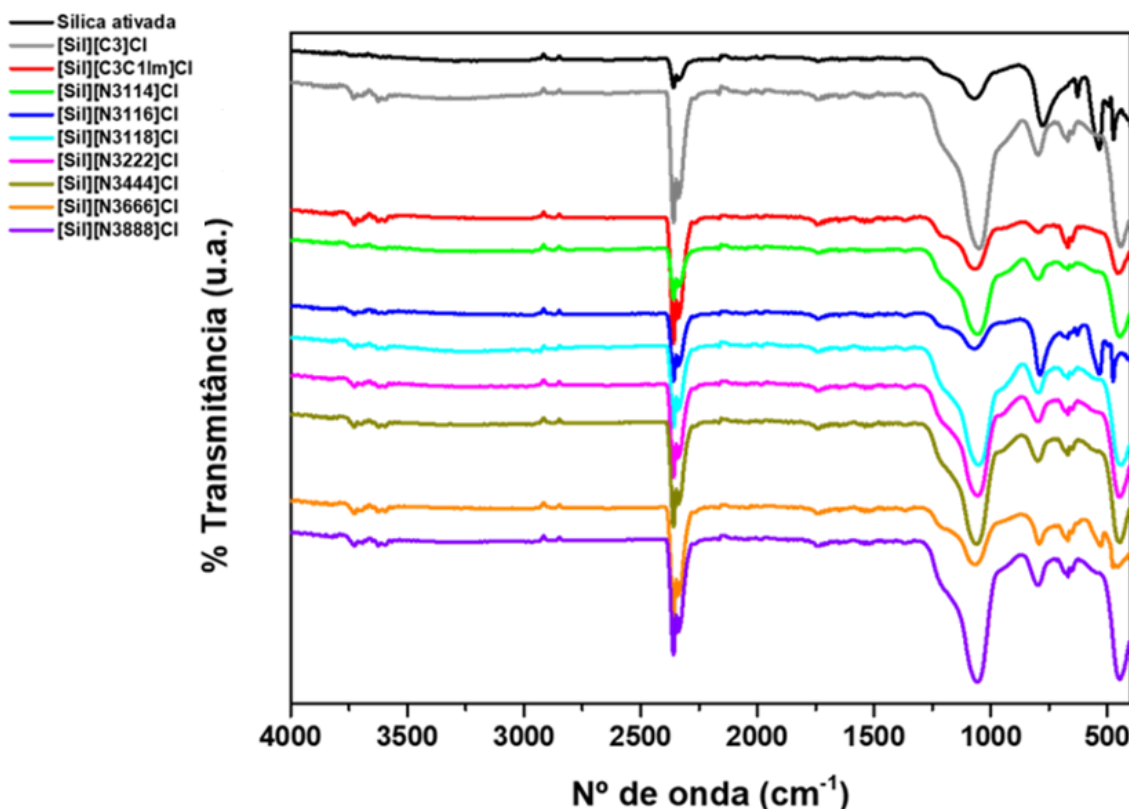


Figura 17- Espectro FTIR da sílica ativada, do material intermediário e de todos os *SILs* sintetizados.

Os espectros *FTIR* dos materiais apresentados são muito semelhantes, mostrando que a integridade química da matriz é mantida. Para confirmar o referido, a banda existente por volta de 1052 cm⁻¹ é atribuída à vibração assimétrica e simétrica de Si-O-Si, respetivamente. Sendo que, este tipo de ligação é apresentada na matriz da sílica¹⁵². Todavia, as ligeiras diferenças visíveis entre o espectro da sílica ativada, do material intermediário e dos *SILs*, podem retratar que ocorreu funcionalização.

Em suma, a técnica referida comprova a integridade da matriz da sílica, mas não permite retirar conclusões assertivas sobre o processo de funcionalização.

3.1.3 Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN ^{13}C para cada material sintetizado estão representados na Figura 18. Todavia, uma análise mais detalhada foi realizada para determinados *SILs* na Figura 19 - Figura 23.

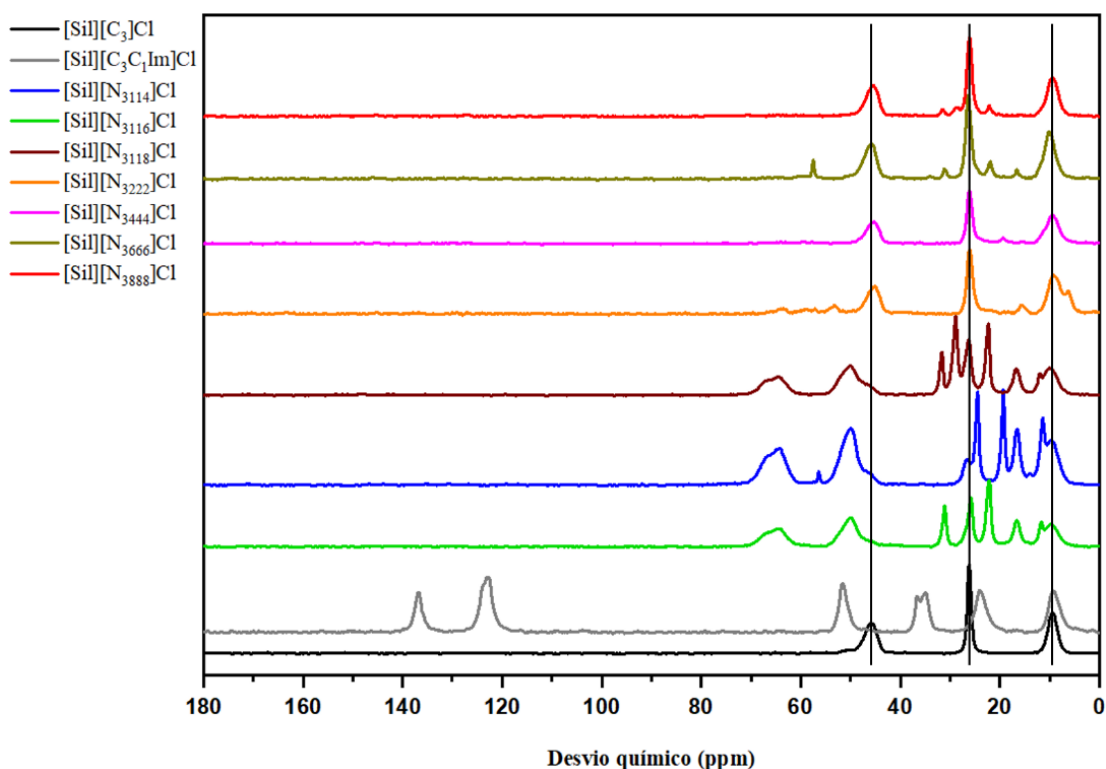


Figura 18- Espectros de RMN ^{13}C para os diferentes materiais sintetizados.

Através da análise da Figura 18 é possível verificar diferenças significativas entre os espectros dos *SILs* sintetizados espelhando, portanto, os diferentes graus de funcionalização. Em particular, os espectros de RMN ^{13}C do [Si][N₃₂₂₂]Cl, [Si][N₃₄₄₄]Cl, [Si][N₃₆₆₆]Cl e [Si][N₃₈₈₈]Cl retratam um baixo grau de funcionalização, uma vez que, apesar de demonstrarem picos com desvios químicos que não estão presentes no espectro do material intermediário (Figura 19), estes possuem uma baixa intensidade. Para além disso, observa-se a presença de picos com valores de desvio químico iguais e com a mesma intensidade, comparativamente aos que se encontram retratados no espectro do [Si][C₃]Cl.

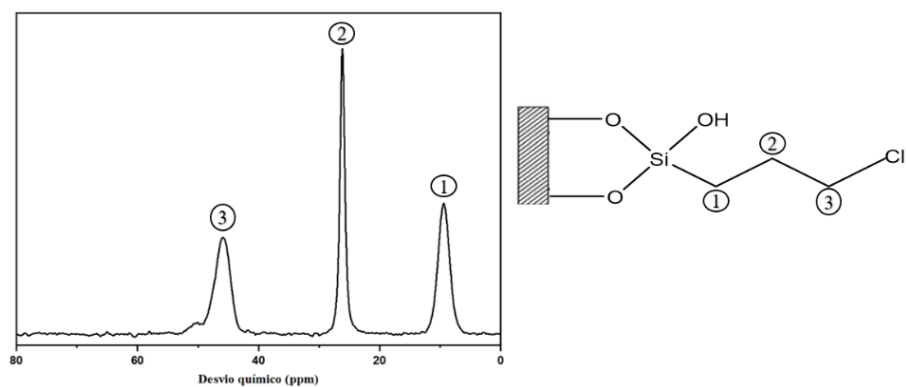


Figura 19- Espectro de RMN ^{13}C do $[\text{Sil}][\text{C}_3]\text{Cl}$.

Na Figura 19, encontra-se representado, de forma individual, o espectro obtido para o $[\text{Sil}][\text{C}_3]\text{Cl}$. Este espectro apresenta três picos, com desvios químicos a 10, 27 e 47 ppm, que correspondem aos três carbonos da cadeia propilo.

O espectro do material $[\text{Sil}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$ está demonstrado na Figura 20. Salientar, que este *SIL* foi aquele com maior *BA* e apresenta um anel imidazólio como principal característica.

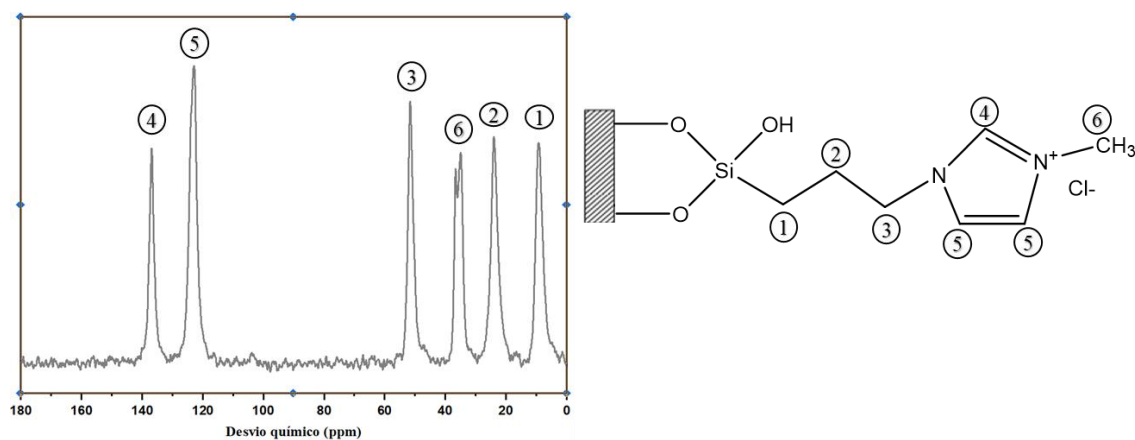


Figura 20- Espectro de RMN ^{13}C do $[\text{Sil}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$.

De facto, é possível verificar na Figura 20 a presença dos picos correspondentes aos C5 e C4 do anel imidazólio com desvios químicos de 122 e 137 ppm, respetivamente. Para além disso, é ainda possível verificar a presença do C6 por volta dos 37 ppm e, os picos correspondentes às cadeias propilo, C1, C2 e C3 na ordem dos 10, 24 e 52 ppm, respetivamente.

Os espectros dos materiais que possuem LIs assimétricos, $[\text{Si}][\text{N}_{3114}]\text{Cl}$, $[\text{Si}][\text{N}_{3116}]\text{Cl}$ e $[\text{Si}][\text{N}_{3118}]\text{Cl}$, estão representados na Figura 21 - Figura 23, respetivamente, sendo que estes *SILs* têm, em particular, um grupo metilo ligado ao nitrogénio.

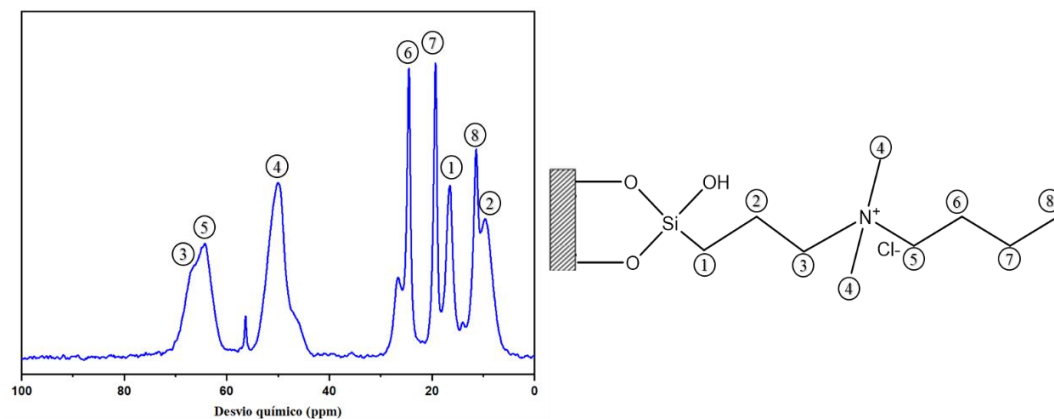


Figura 21- Espectro de RMN ^{13}C do $[\text{Si}][\text{N}_{3114}]\text{Cl}$.

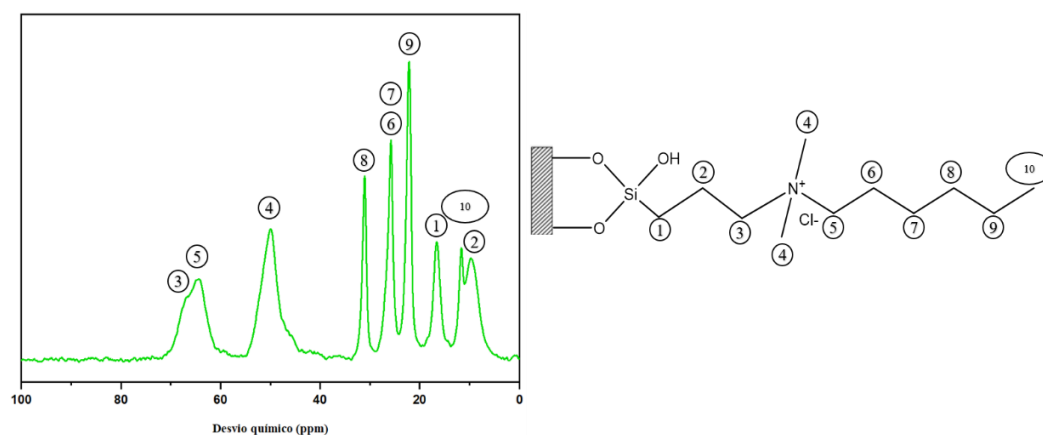


Figura 22- Espectro de RMN ^{13}C do $[\text{Si}][\text{N}_{3116}]\text{Cl}$.

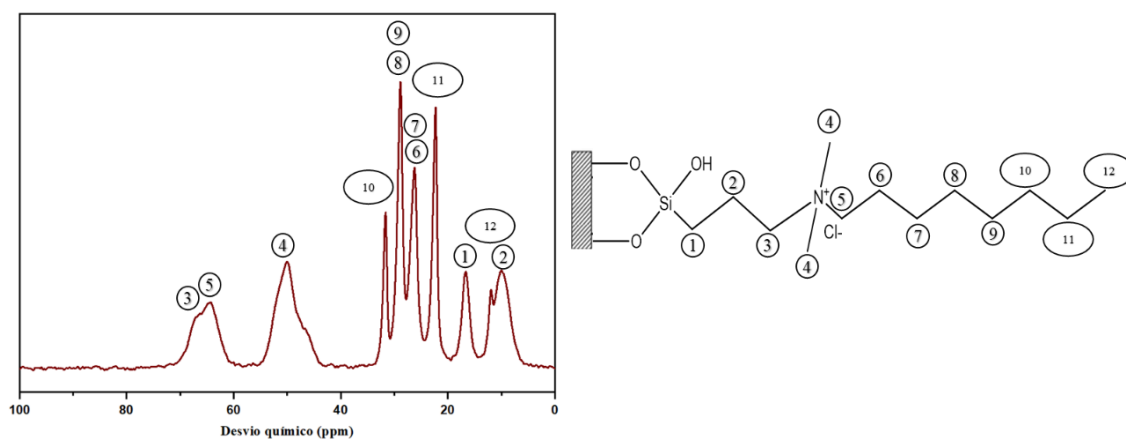


Figura 23- Espectro de RMN ^{13}C do $[\text{Si}][\text{N}_{3118}]\text{Cl}$.

Na Figura 21 - Figura 23 é possível observar um pico com um desvio químico de aproximadamente 52 ppm, que corresponde aos grupos metilo (C4) ligados ao nitrogênio, indicando uma efetiva funcionalização do LI assimétrico no material de suporte. Para além disso, ainda se consegue distinguir nos três materiais os picos representativos dos outros carbonos, como por exemplo da cadeia propilo, onde os C1, C2 e C3 têm desvios químicos na ordem dos 17, 9 e 67 ppm, respetivamente. Todavia, os espetros dos três materiais em questão diferem essencialmente nos picos correspondentes aos últimos carbonos, como por exemplo, o C10 no material [Si][N₃₁₁₆]Cl apresenta um pico a 13 ppm e no material [Si][N₃₁₁₈]Cl a 32 ppm.

Assim, tendo em conta os espetros de RMN ¹³C pode-se concluir que ocorreu a funcionalização de todos os materiais, significando que os LIs estão efetivamente imobilizados na sílica. Contudo, o grau desta funcionalização é distinto, sendo que os materiais [Si][C₃C₁Im]Cl, [Si][N₃₁₁₄]Cl, [Si][N₃₁₁₆]Cl e [Si][N₃₁₁₈]Cl apresentam um elevado grau de funcionalização, e os materiais [Si][N₃₂₂₂]Cl, [Si][N₃₄₄₄]Cl, [Si][N₃₆₆₆]Cl e [Si][N₃₈₈₈]Cl possuem um baixo grau de funcionalização.

3.1.4 Ponto de carga zero (PCZ)

As medições do potencial zeta em função do pH foram realizadas com o intuito de estudar a carga da superfície das partículas dos materiais. Na Figura S1, em anexo, encontram-se exibidas a representação gráfica do potencial zeta em função do pH e, na Tabela 11 está demonstrado o PCZ da sílica ativada, do [Si][C₃]Cl e de cada *SIL*, bem como a respetiva carga à superfície (positiva + ou negativa-) para valores de pH inferiores e superiores ao PCZ.

Tabela 11- PCZ da sílica ativada, do [Sil][C₃]Cl e de cada SIL sintetizado, bem como a respectiva carga de superfície para um determinado intervalo de valores de pH.

pH			
Amostra	Carga à superfície do SIL	PCZ	Carga à superfície do SIL
Sílica ativada	+	3,18	-
[Sil][C ₃]Cl		3,60	
[Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl		8,74	
[Sil][N ₃₁₁₄]Cl		8,72	
[Sil][N ₃₁₁₆]Cl		7,75	
[Sil][N ₃₁₁₈]Cl		8,30	
[Sil][N ₃₂₂₂]Cl		6,80	
[Sil][N ₃₄₄₄]Cl		5,96	
[Sil][N ₃₆₆₆]Cl		3,70	
[Sil][N ₃₈₈₈]Cl		3,85	

O PCZ, determinado por exemplo em dispersões coloidais, é definido como as condições da solução sob as quais a soma das densidades da carga superficial é igual a zero¹⁵³. Essa técnica é frequentemente utilizada para quantificar a carga superficial e pode ser usada para antecipar a interação de Coulomb (cargas opostas no adsorvato e adsorvente induzem a atração entre partículas e iões)^{153,154}. Desta forma, o estado elétrico da superfície de um material adsorvente em solução pode ser caracterizado pelo seu PCZ.

Por norma, abaixo do valor determinado como PCZ a superfície do material adsorvente está carregada positivamente, enquanto que acima do valor de PCZ a superfície encontra-se carregada negativamente¹⁵⁴. Logo, entre os diversos parâmetros físico-químicos usados para caracterizar a interface sólido-líquido, o PCZ obtido pela análise do potencial zeta, é essencial para explicar o mecanismo de adsorção, principalmente do ponto de vista da adsorção iónica^{154,155}.

A partir da análise dos resultados obtidos (Tabela 11), é possível verificar que o PCZ de todos os SILs sintetizados é superior comparativamente à sílica ativada e ao [Sil][C₃]Cl, oscilando entre 3,70 ([Sil][N₃₆₆₆]Cl) e 8,74 ([Sil][C₃C₁Im]Cl). Estes

resultados, refletem que a superfície dos *SILs* está mais carregada positivamente quando comparadas à da sílica ativada e do [Si][C₃]Cl. Do ponto de vista estrutural, este aspeto está de acordo com uma funcionalização bem-sucedida da sílica ativada, uma vez que, os catiões estão presentes na superfície da sílica, proporcionando um aumento do PCZ¹⁶.

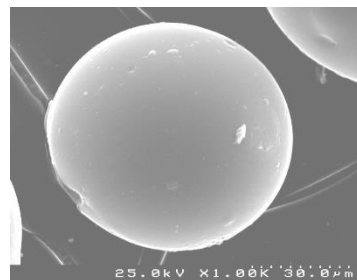
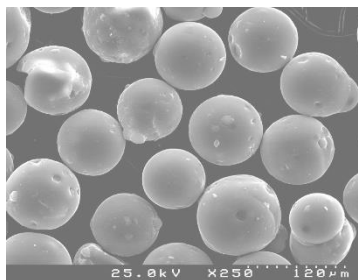
A diferença entre os valores de PCZ dos *SILs* pode ser justificada, de uma forma geral, através dos distintos graus de funcionalização, sendo que, os valores mais elevados de PCZ correspondem aos *SILs* que têm uma *BA* superior e, portanto, uma maior presença de catiões à superfície. Assim, é possível concluir que os materiais [Si][C₃C₁Im]Cl, [Si][N₃₁₁₄]Cl, [Si][N₃₁₁₆]Cl e [Si][N₃₁₁₈]Cl, sintetizados com recurso a LIs assimétricos, são aqueles com um maior grau de funcionalização e, conseqüentemente uma maior presença de catiões à superfície.

Face aos resultados e, tendo em conta o pI (5,9) da proteína alvo¹² é possível prever, qual o intervalo de pH mais adequado para explorar preferencialmente interações iónicas entre o *SIL* e o IFN α -2b num contexto de cromatografia líquida. Por exemplo, a pH 8 a carga superficial do material [Si][C₃C₁Im]Cl é positiva e da proteína é negativa, o que deve facilitar uma atração iónica e, por conseguinte, conduzir a uma melhor adsorção. Porém, outras interações, como por exemplo interações hidrofóbicas, podem ser mais fortes do que forças puramente iónicas, não tornando o efeito da carga superficial tão significativo.

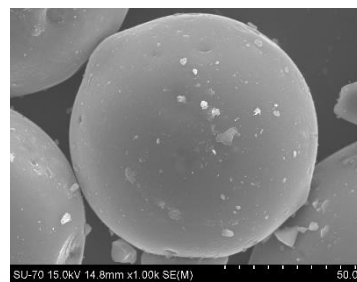
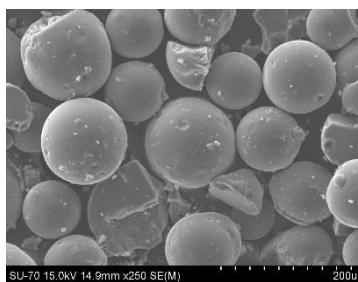
3.1.5 Microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*)

Para avaliar se ocorreram alterações morfológicas da sílica ativada ou dos *SILs* sintetizados que possam comprometer uma aplicação futura, como a sua aplicação cromatográfica, foram obtidas imagens através da técnica SEM com duas ampliações (250 x e 1000 x) representadas na Figura 24.

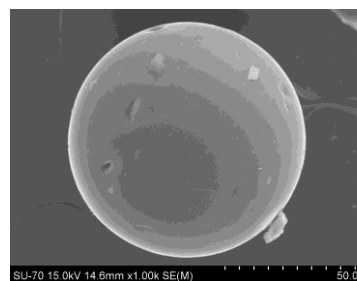
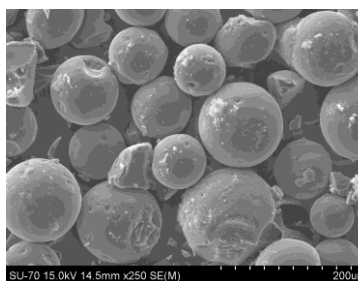
Sílica ativada



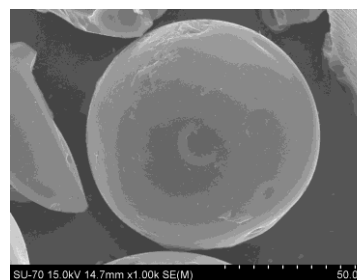
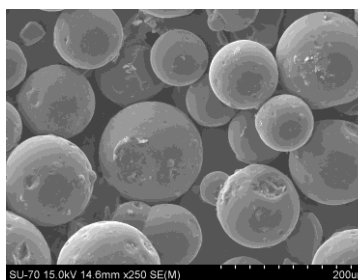
[Si][C₃C₁Im]Cl



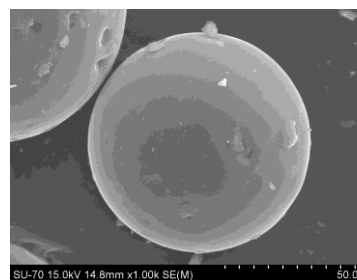
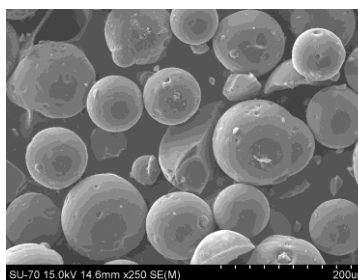
[Si][N₃₁₁₄]Cl



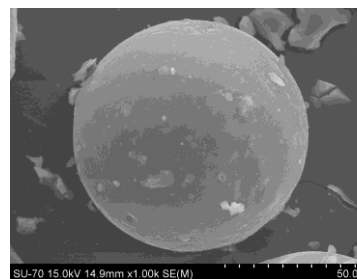
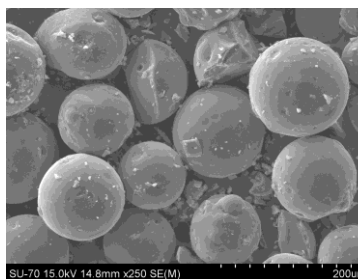
[Si][N₃₁₁₆]Cl



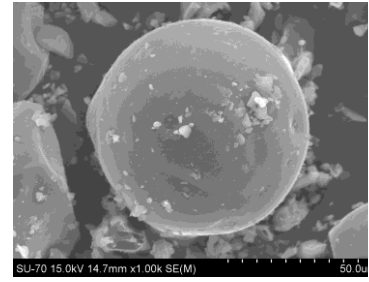
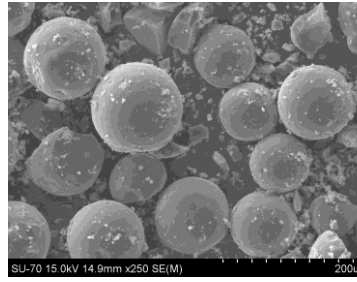
[Si][N₃₁₁₈]Cl



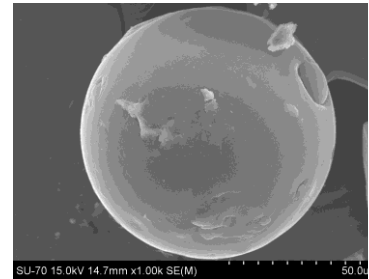
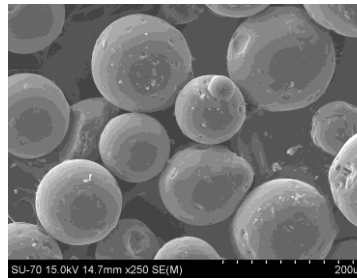
[Si][N₃₂₂₂]Cl



[SiI][N₃₄₄₄]Cl



[SiI][N₃₆₆₆]Cl



[SiI][N₃₈₈₈]Cl

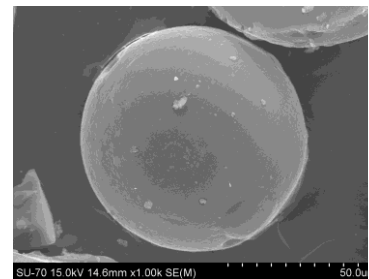
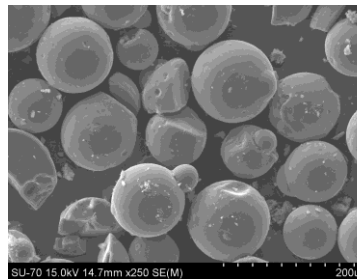


Figura 24- Análise, com recurso a SEM, da superfície da sílica ativada e de cada SIL sintetizado. Imagens realizadas com uma ampliação de 250 x e 1000 x, à esquerda e direita, respetivamente.

Ao analisar e comparar as imagens obtidas através da técnica de SEM da sílica ativada e dos SILs sintetizados, é possível observar que a sílica utilizada tem uma morfologia esférica com tamanho entre 75-200 µm, tal como indicado pelo fornecedor. De uma forma geral, a morfologia é mantida quer na sílica ativada, como nos SILs. No entanto, é possível observar a presença de algumas esferas partidas resultado das condições utilizadas durante o processo de síntese. Este aspeto não é uniforme para todos os SILs, muito provavelmente, devido à não utilização da mesma barra magnética e à oscilação no valor de rpm no processo de síntese.

3.2 Produção e recuperação do IFN α -2b

A produção e respetiva recuperação do IFN α -2b a partir de lisados bacterianos recombinantes é aqui abordada devido ao potencial desta proteína como um importante biofármaco, atualmente empregue no tratamento de várias doenças humanas^{7,25}. Considerando ainda, que a bactéria *E. coli* continua a ser o principal hospedeiro para o fabrico de diversas proteínas terapêuticas (incluindo o IFN α -2b) e, que os elevados rendimentos de produção são devidos à utilização de corpos de inclusão, é de extrema importância desenvolver estratégias de recuperação e purificação de proteínas a partir destes agregados insolúveis^{12,93,156}.

A produção do IFN α -2b é geralmente realizada usando *E. coli*, para a qual parâmetros operacionais distintos como composição do meio, concentração do indutor, período de indução, entre outros, foram previamente otimizados quer pelo grupo onde realizei a minha dissertação¹⁵¹, quer por outros grupos de investigação, como descrito na literatura^{12,93,151}.

A Figura 25 possibilita a análise de forma qualitativa da presença de proteínas contaminantes, bem como do IFN α -2b ao longo de todo o processo de recuperação e solubilização dos corpos de inclusão. Esta análise, permite verificar a eficácia do processo global de recuperação e de cada passo de lavagem e solubilização em particular. A banda indicada como aquela que corresponde ao IFN α -2b, encontra-se por volta dos 19 kDa, tendo como referência o artigo de Castro e colaboradores¹⁵¹ que identificaram esta mesma banda com recurso a *western blot* utilizando um anticorpo específico para a proteína alvo.

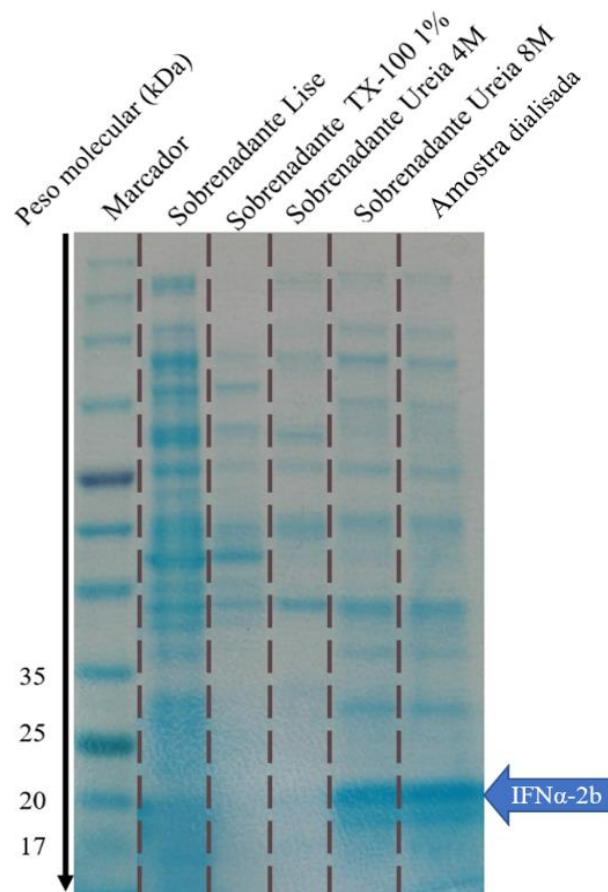


Figura 25- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas após a lise celular, incluindo as que resultam do processo de lavagem e solubilização de corpos de inclusão de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante contendo pET-3a_IFN α -2b.

A acumulação preferencial do IFN α -2b sob a forma de corpos de inclusão em sistemas baseados em *E. coli* está de acordo com trabalhos anteriores e, requer etapas de processamento adicionais que visam o isolamento e solubilização da proteína alvo^{12,93,151}. Considerando diversos trabalhos, já desenvolvidos, sobre a solubilização de IFN α -2b a partir de corpos de inclusão, uma estratégia otimizada para a solubilização eficiente de IFN α -2b foi adotada.

O protocolo aplicado inclui quatro etapas sequenciais intercaladas com passos de centrifugação: duas lavagens iniciais com 1% (v/v) de Triton X-100 e 4 M de ureia (em Tris 10 mM pH 8), seguido de solubilização com 8 M de ureia, a pH 12,5 e, por fim uma etapa de diálise tendo em vista a remoção da ureia. Cada uma dessas frações, foi subsequentemente analisada por eletroforese (Figura 25) para avaliar se há perdas da

proteína alvo nas etapas de lavagem e, conseqüentemente, se o IFN α -2b é eficientemente solubilizado. Desta forma, é possível observar que alguns contaminantes proteicos, aderentes aos corpos de inclusão, são removidos nas etapas de lavagem projetadas (Triton X-100 e ureia 4 M), mas não ocorrem perdas do IFN α -2b.

A utilização de Triton X-100 e ureia 4 M, ambos a pH 8, no processo de lavagem tem sido relatado como útil para a remoção de alguns contaminantes⁹³. Contudo, para o processo de solubilização, a escolha de ureia 8 M e de um pH 12,5, é justificada pelo facto deste tipo de condição aliado à presença de um agente caotrópico influenciar de forma bastante positiva este tipo de processo, permitindo obter um elevado rendimento de extração de IFN α -2b a partir dos corpos de inclusão, como observado no sobrenadante analisado (Sobrenadante Ureia 8 M).

Ao analisar, em termos comparativos, o perfil de bandas do Sobrenadante Ureia 8 M e da amostra dialisada, é possível verificar que as diferenças observadas são mínimas ou inexistentes. Contudo, é importante realçar que o último passo realizado no processo de recuperação (diálise) permite não só a remoção da ureia, como também promove o *refolding* do IFN α -2b ao seu estado nativo. Isto possibilita, respetivamente, inibir possíveis interferências nos ensaios subseqüentes de purificação e manter a sua atividade biológica característica, ultrapassando uma das principais dificuldades no que concerne à produção com recurso a corpos de inclusão^{12,87,93,151}.

Em suma, as condições de lavagem e de solubilização utilizadas mostraram ser eficazes, permitindo a remoção de algumas impurezas durante os processos de lavagem sem perda da proteína alvo e, a obtenção da mesma após o processo de solubilização. Sendo, desta forma, a amostra obtida após diálise utilizada para os ensaios posteriores de purificação com os *SILs* sintetizados.

3.3 Ensaios cromatográficos em *batch*

Inicialmente, optou-se pela realização de ensaios cromatográficos em *batch*, com o intuito de otimizar e identificar as melhores condições de ligação e eluição, para numa fase posterior testar estas mesmas condições num ensaio cromatográfico em coluna.

3.3.1 Ensaios em condições que promovem maioritariamente interações iónicas

O recurso a interações iónicas é bastante habitual em ensaios cromatográficos, tendo sido já testado na purificação de diversos tipos de biofármacos incluindo ácidos nucleicos e proteínas^{17,157}. Com o intuito de explorar este tipo de interações, foram pesadas 150 mg de *SIL* e, de seguida realizaram-se as seguintes etapas (intercaladas com passos de centrifugação): 1) lavagem do material com água destilada; 2) equilíbrio; 3) adição da amostra dialisada; 4) adição de tampão de ligação para remoção das proteínas que não interagem com o suporte; 5) eluição com diversos passos consecutivos com concentrações crescentes de NaCl.

Desta forma, a escolha de uma solução tampão, que permita o correto processo de ligação da proteína alvo ao *SIL*, bem como a respetiva eluição com o aumento da concentração de sal é um dos fatores que mais influencia a performance cromatográfica. Para tal, efetuaram-se ensaios em dois tampões distintos, nomeadamente tampão Tris 10 mM pH 8 e tampão fosfato 200 mM pH 8, e procedeu-se da seguinte forma: efetuou-se a ligação da amostra dialisada no respetivo tampão, e posteriormente procedeu-se à eluição em duas etapas com concentrações crescentes de NaCl, 0,4 e 1,5 M (preparados em Tris 10 mM pH 8 ou em 200 mM tampão fosfato). Avaliou-se a quantidade de proteína total por medição da absorvância a 280 nm, cujos resultados se encontram em anexo na Tabela S2 e Tabela S3, e as frações correspondentes aos passos de ligação e eluição foram concentradas e dessalinizadas por ultrafiltração (concentradores Vivaspin 10 MWCO) e analisadas por eletroforese (Figura 26). É de salientar que além da ultrafiltração, avaliou-se também a possibilidade de concentrar e dessalinizar as amostras através da precipitação com etanol, mas visto que a ultrafiltração permite uma análise mais rigorosa e reproduzível das diferentes amostras, adotou-se este método ao longo de todo o trabalho efetuado nesta dissertação. Além disso, importa realçar que as concentrações de NaCl escolhidas para os ensaios cromatográficos iniciais foram escolhidas tendo por base trabalhos anteriores com este biofármaco utilizando cromatografia de troca aniónica¹².

Ao pH em estudo - 8,0 - a proteína alvo está carregada negativamente ($pI=5,9$)¹², por outro lado, o *SIL* escolhido para o ensaio ([SiI][C₃C₁Im]Cl) possui a sua superfície carregada positivamente, tendo em conta o seu PCZ (Tabela 11). Assim, é expectável que

ocorram interações iônicas não covalentes entre os ligandos acoplados ao suporte de sílica e o IFN α -2b. Para além deste tipo de interações, existem outros fatores como por exemplo, o tamanho e/ou a hidrofobicidade que afetam a afinidade entre a molécula alvo e o *SIL*, e, como tal, podem influenciar o processo de purificação¹⁵⁸. Num processo classificado como “ideal”, a totalidade da proteína alvo é ligada ao *SIL* no passo de ligação e, a etapa de eluição ocorre com recurso ao aumento da força iónica, a qual é conseguida através do aumento da concentração de sal no tampão de eluição, e que irá provocar a rotura das interação não covalentes^{157,158}.

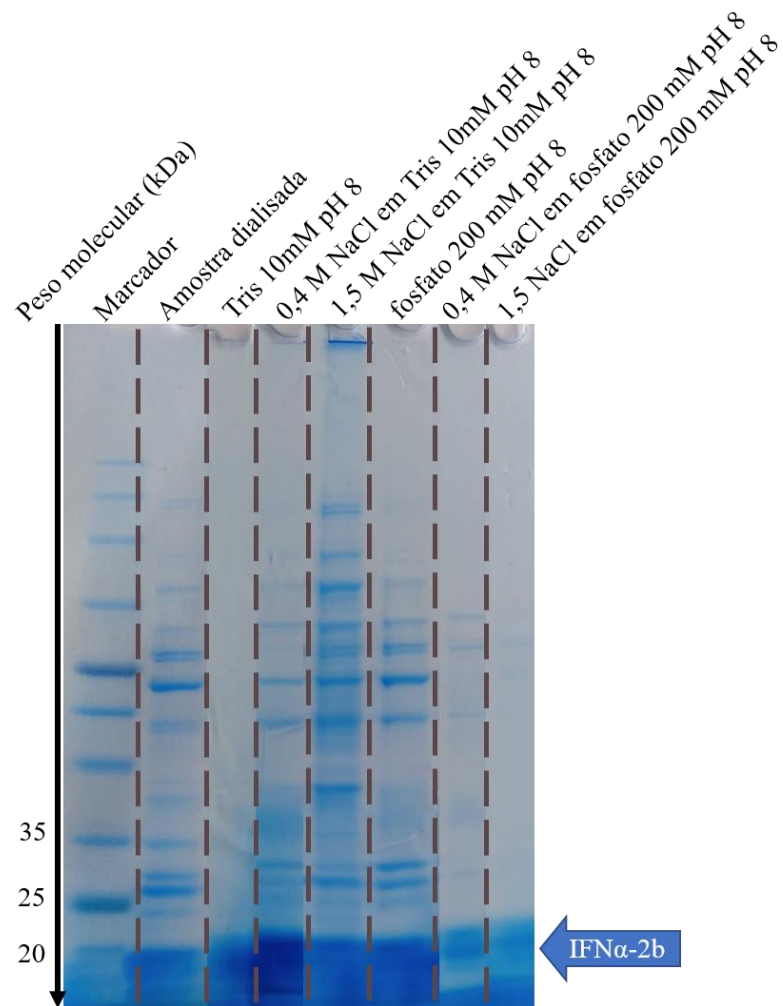


Figura 26- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C₃C₁Im]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8 ou fosfato 200 mM pH 8, seguido de eluição com 0,4 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8 ou em fosfato 200 mM pH 8).

Através da análise da Figura 26, verifica-se que a solução tampão Tris 10 mM pH 8 é a mais adequada, tendo sido a escolhida para todos os ensaios cromatográficos posteriores. Esta escolha, prende-se com a análise das frações correspondentes ao passo de ligação - Tris 10 mM ou fosfato 200 mM, ambos a pH 8 -, onde se observa que apesar de algumas proteínas contaminantes serem detetadas, verifica-se igualmente que uma grande quantidade de proteína alvo (banda de peso molecular entre 19 e 20 kDa) não se liga ao suporte. Pelo contrário, este perfil não é observado quando se utilizou a mesma concentração de sal nos tampões formulados com a solução de Tris 10 mM pH 8. Estes dados são confirmados pela análise da quantidade de proteína total (Tabela S2 e Tabela S3-em anexo), nos quais as absorvâncias a 280 nm das frações correspondentes à etapa de ligação com tampão fosfato são superiores às do tampão Tris.

Outra justificação poderá estar relacionada com o pH e respetivo pKa de cada solução tampão. No caso da solução tampão Tris (escolhida para futuros ensaios), o pH é inferior ao pKa, o que significa que esta solução tampão possui mais de 50 % de espécies ionizadas¹⁵⁹. No que concerne, à solução tampão fosfato, o pH é igual ao pKa existindo apenas 50 % de espécies ionizadas. Esta diferença associada à percentagem de espécies ionizadas pode ser determinante, uma vez que, como já mencionado anteriormente a um pH de 8,0 o *SIL* utilizado ([SiI][C₃C₁Im]Cl) estará carregado positivamente na sua superfície e, uma maior percentagem de espécies ionizadas pode facilitar ou mesmo intensificar eventuais interações iónicas, permitindo que no caso da solução tampão Tris exista um processo mais eficiente de ligação da proteína alvo ao suporte.

Tendo em vista a purificação do IFN α -2b e, mais concretamente, a otimização das concentrações de NaCl mais adequadas para obter um processo seletivo, efetuou-se inicialmente um ensaio de purificação compreendendo a adição de amostra dialisada em tampão Tris 10 mM, seguido de dois passos de eluição através do aumento de força iónica recorrendo ao aumento da concentração de NaCl (em Tris 10 mM pH 8) para 0,3 e 1,5 M. A razão que sustenta a opção pelo decréscimo ligeiro da concentração de NaCl para 0,3 M no primeiro passo de eluição é justificada pelo facto de na Figura 26 se verificar que a 0,4 M de NaCl tinha eluído o IFN α -2b, mas também muitas proteínas contaminantes, apresentando desta forma uma pureza mais reduzida. Cada uma das frações foi recolhida e analisada por eletroforese, sendo possível a visualização do perfil das bandas correspondentes na Figura 27.

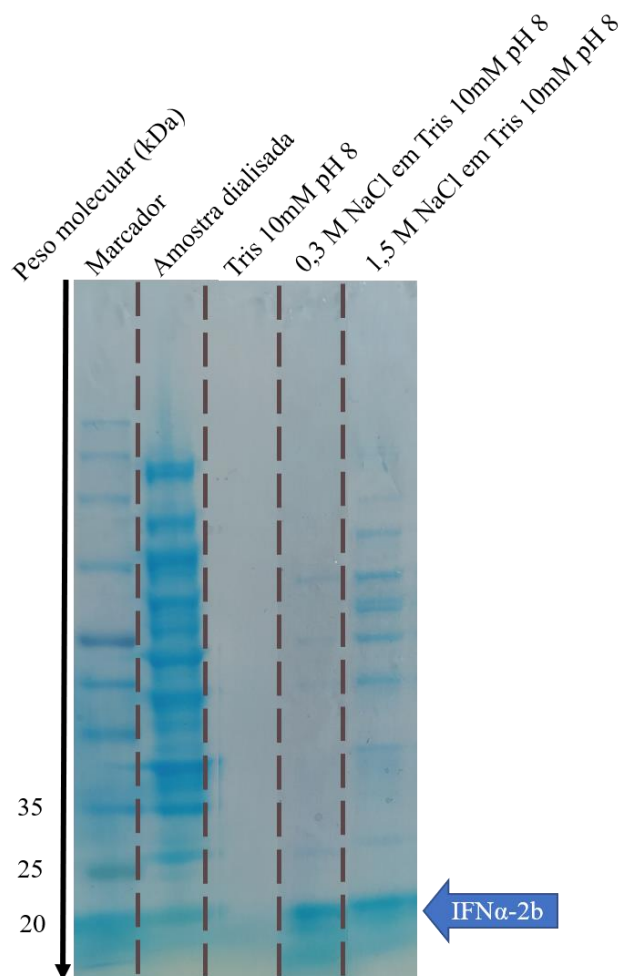


Figura 27- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material $[\text{Sil}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).

Ao analisar a Figura 27, observa-se que praticamente todas as proteínas se ligaram ao suporte cromatográfico. Contudo, quando a força iónica é aumentada para 0,3 M de NaCl ocorre a eluição da proteína alvo com uma pureza elevada, como se pode confirmar pelo gel de eletroforese (Figura 27). O último passo de eluição, a 1,5 M de NaCl, demonstra que o rendimento obtido na etapa de eluição anterior não é máximo, uma vez que, se verifica que ocorreu a eluição do IFN α -2b.

Desta forma, com o intuito de melhorar os resultados obtidos, novos gradientes crescentes de NaCl em Tris 10 mM pH 8 foram testados – (0,05; 0,3; 1,5 M) e (Tris 10 mM pH 8; 0,35; 1,5 M) -, mantendo a quantidade de amostra dialisada adicionada. O perfil de eluição obtido das frações recolhidas está apresentado na Figura 28.

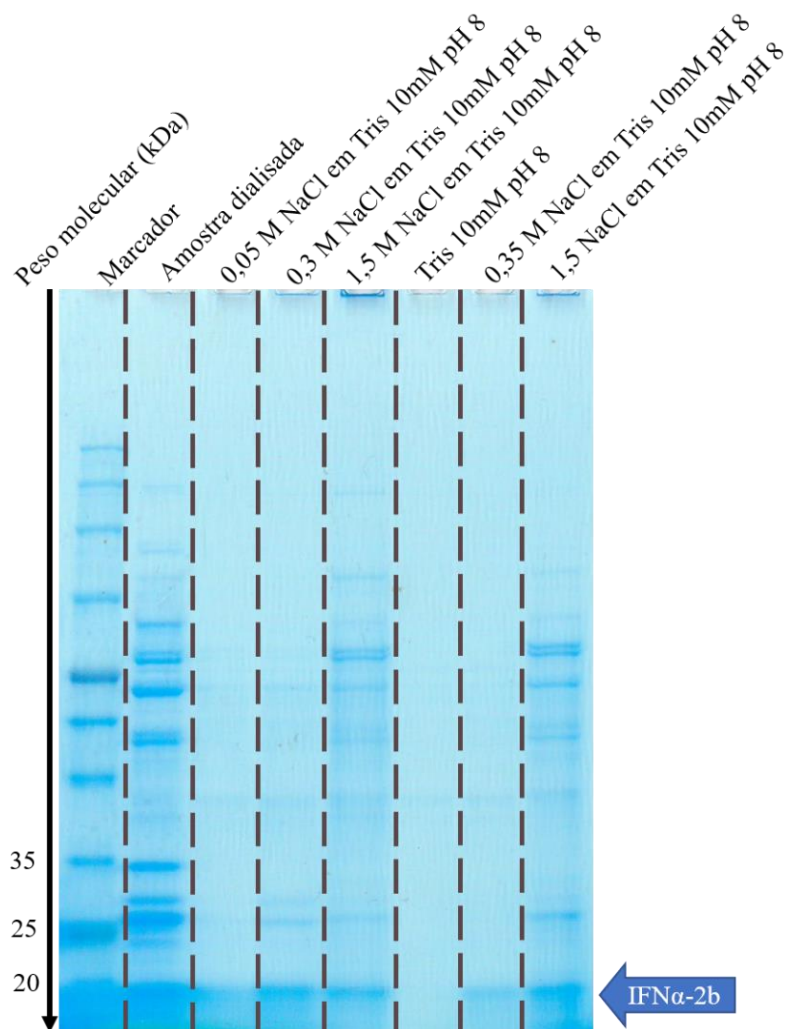


Figura 28- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material $[\text{SiI}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 0,05 M de NaCl em Tris 10 mM pH 8 ou Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M ou 0,35 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).

Face à observação do gel representado na Figura 28, verifica-se que o aumento da concentração de NaCl no passo de ligação para 0,05 M, proporcionou um ligeiro aumento na presença de alguns contaminantes de elevado peso molecular, mas não afetou a ligação da proteína alvo ao $[\text{SiI}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$. Contudo, no segundo passo de eluição (0,3 M de NaCl) apesar de ser observável uma banda que corresponde ao IFN α -2b com um rendimento aceitável (não total), é também visível a presença de contaminantes indicando que este ensaio não teve o efeito desejável, isto é, não promoveu um aumento do rendimento de recuperação do IFN α -2b com elevada pureza no primeiro passo de eluição.

Relativamente ao ensaio com o gradiente de NaCl em tampão Tris 10 mM pH 8 (Tris 10 mM pH 8; 0,35; 1,5 M), observa-se novamente que a proteína alvo liga-se ao suporte cromatográfico, visto que não é detetada no passo de ligação. Porém, com o aumento da concentração de NaCl para 0,35 M de NaCl, já se verifica a eluição da proteína alvo com um rendimento considerável e com elevada pureza compreendendo uma quantidade mínima de contaminantes. Esta diminuta presença de contaminantes, associada ao rendimento já comentado e, comparando com os resultados obtidos e discutidos relativos à Figura 26 e Figura 27, permitem concluir que o ensaio compreendendo a injeção da amostra com uma fase móvel constituída por tampão Tris 10 mM pH 8, seguida de duas etapas de eluição com 0,35 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10mM pH 8) é o ideal para o material [SiI][C₃C₁Im]Cl quando se deseja explorar interações iónicas num contexto de purificação do IFN α -2b.

Com o intuito de facilitar a perceção entre a possibilidade da presença de interações iónicas, tendo em conta a carga de superfície de cada *SIL* e da proteína alvo em função de um determinado valor de pH, foi realizada a Tabela 12. Estes tipos de interações serão, à partida, mais fortes quando a um determinado pH da solução tampão as cargas da proteína alvo e da superfície do material são opostas.

Tabela 12- Cargas superficiais da proteína alvo e de cada material sintetizado, em função do pH da solução.

pH	(...)	3	4	5	6	7	8	9	(...)
IFN α -2b	+	+	+	+	-	-	-	-	-
[SiI][C ₃]Cl	+	+	-	-	-	-	-	-	-
[SiI][C ₃ C ₁ Im]Cl	+	+	+	+	+	+	+	-	-
[SiI][N ₃₁₁₄]Cl	+	+	+	+	+	+	+	-	-
[SiI][N ₃₁₁₆]Cl	+	+	+	+	+	+	-	-	-
[SiI][N ₃₁₁₈]Cl	+	+	+	+	+	+	+	-	-
[SiI][N ₃₂₂₂]Cl	+	+	+	+	+	-	-	-	-
[SiI][N ₃₄₄₄]Cl	+	+	+	+	-	-	-	-	-
[SiI][N ₃₆₆₆]Cl	+	+	-	-	-	-	-	-	-
[SiI][N ₃₈₈₈]Cl	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Após a otimização das composições dos tampões cromatográficos que favorecem a purificação da proteína alvo em condições que exploram preferencialmente interações iônicas (Tris 10 mM pH 8; 0,35; 1,5 M de NaCl em Tris 10mM pH 8) com um grau de pureza e rendimento aceitáveis no material [Sil][C₃C₁Im]Cl, optou-se por testar outro tipos de materiais, nomeadamente o [Sil][N₃₁₁₆]Cl (Figura 29).

Este material, foi o escolhido tendo em conta os resultados obtidos na caracterização do mesmo, nomeadamente nos valores de BA e PCZ. Para além do [Sil][N₃₁₁₆]Cl, os materiais [Sil][N₃₁₁₄]Cl e [Sil][N₃₁₁₈]Cl também podiam ser testados, tendo em conta a mesma justificação apresentada. Porém, a escolha recaiu sobre o [Sil][N₃₁₁₆]Cl para observarmos com mais detalhe a influência do PCZ (7,75) que, neste caso em particular, é inferior ao pH da solução tampão.

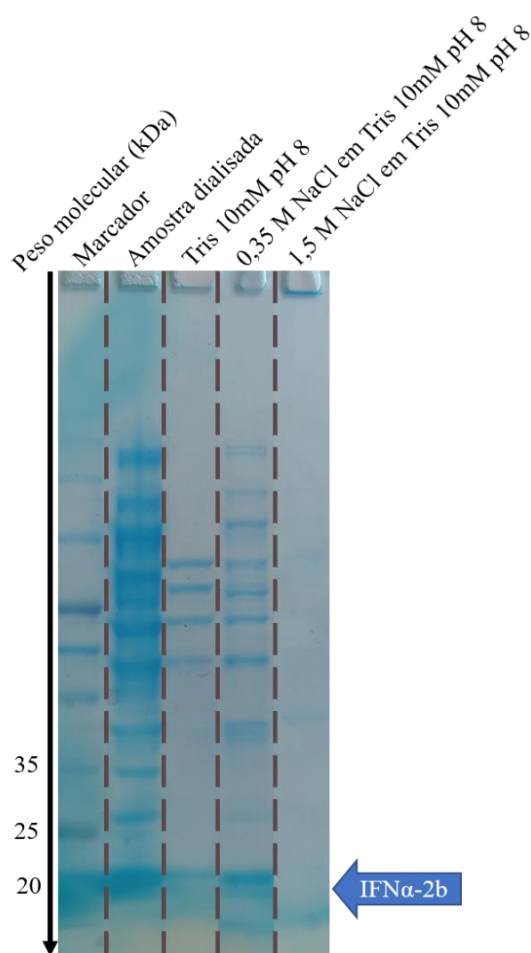


Figura 29- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][N₃₁₁₆]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,35 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 8).

A partir da análise da Figura 29, é possível constatar que proteínas contaminantes, bem como a proteína alvo são detetadas no passo de ligação – Tris 10 mM pH 8. Para além disso, quando a eluição é realizada com 0,35 M de NaCl verifica-se que a banda correspondente ao IFN α -2b demonstra um rendimento considerável, mas um baixo grau de pureza, uma vez que, também são eluídas proteínas contaminantes. De uma forma geral, o facto de uma fração considerável do IFN α -2b (carregado negativamente a pH 8¹²) se ligar ao suporte cromatográfico (carga superficial ligeiramente negativa a pH 8) nas referidas condições cromatográficas pode espelhar que estamos perante um caso de cromatografia multimodal. Logo, deverão existir outros tipos de interações, não iónicas, que contribuem para a ligação da proteína alvo ao suporte [Sil][N₃₁₁₆]Cl.

Relativamente a eventuais ensaios em *batch* com os materiais [Sil][N₃₁₁₄]Cl e [Sil][N₃₁₁₈]Cl e, tendo em conta o resultado já obtido e discutido com o [Sil][N₃₁₁₆]Cl, uma nova estratégia foi utilizada. Esta estratégia englobou a redução do pH da solução tampão Tris 10 mM para 6,5. Assim, é possível assegurar que a superfície dos materiais referidos possui carga positiva e a proteína alvo apresenta carga negativa (pI=5,9¹²) possibilitando o estabelecimento de interações iónicas. O perfil das frações recolhidas encontra-se representado na Figura 30.

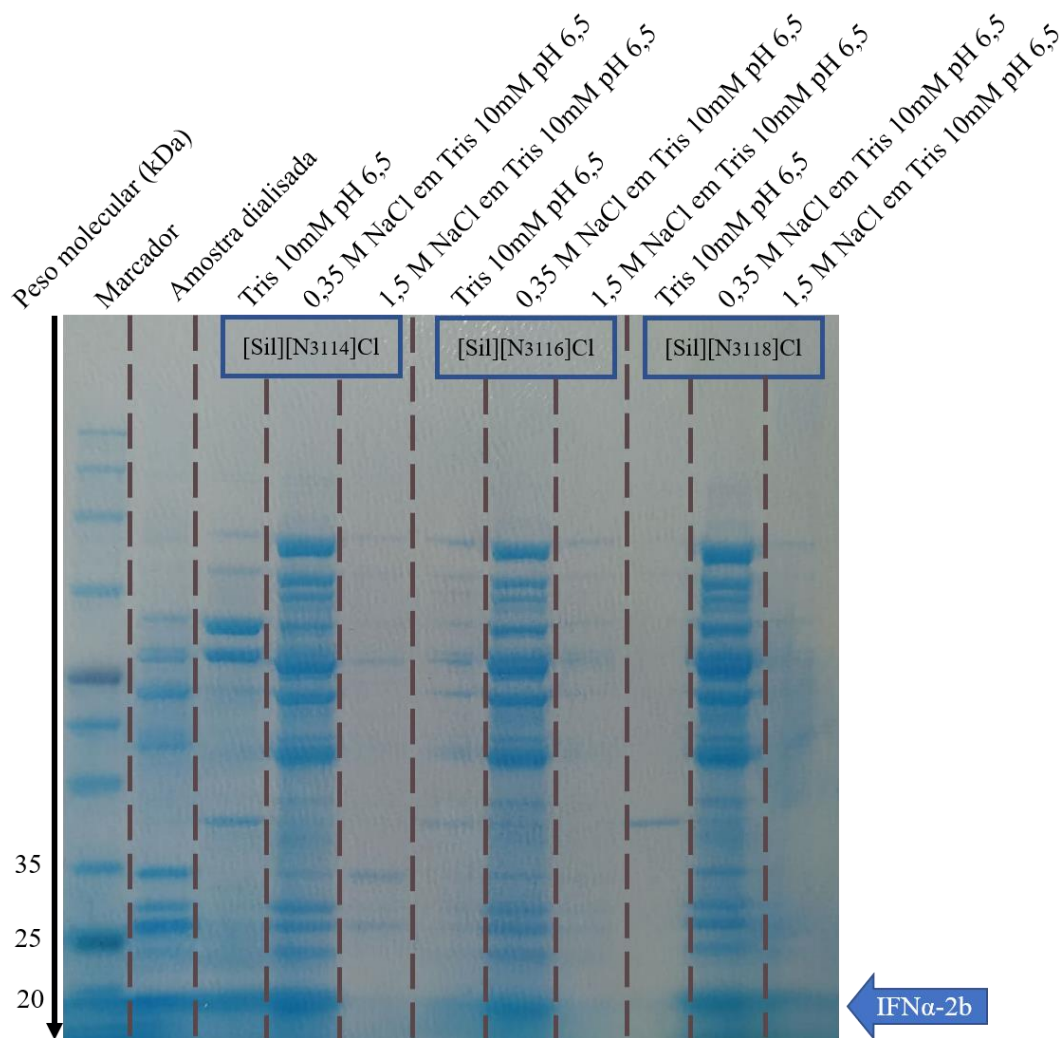


Figura 30- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N₃₁₁₄]Cl, [Sil][N₃₁₁₆]Cl e [Sil][N₃₁₁₈]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com Tris 10 mM pH 6,5, seguido de eluição com 0,3 e 1,5 M de NaCl (em Tris 10 mM pH 6,5).

A partir da análise da Figura 30, observa-se que o IFN α -2b ligou-se aos três SILs utilizados como matriz. No entanto, a proteína alvo elui juntamente com as proteínas contaminantes a 0,35 M de NaCl em Tris 10 mM pH 6,5. Este aspeto pode ser justificado de várias formas, tais como, o tamanho das cadeias alquílicas dos LIs constituintes (grupos carregados estão menos expostos para que a interação ocorra), a estereoquímica dos próprios SILs, interações proteína-proteína que podem ocorrer de forma distinta a pH 6,5, este valor de pH afetar de alguma forma a estrutura proteica da nossa proteína alvo, entre outros aspetos. De modo a ultrapassar este problema, seria necessário testar outras

concentrações adicionais de NaCl no sentido de aumentar a seletividade do processo, promovendo a eluição diferencial do IFN α -2b e das proteínas contaminantes, permitindo a sua obtenção num estado de elevado pureza. Numa análise mais particular do material [Sil][N₃₁₁₆]Cl, é importante realçar a sua versatilidade, na medida em que, ocorre a ligação da proteína alvo a este suporte, com as cargas superficiais opostas (pH 6,5) ou semelhantes (pH 8).

Através de uma interpretação direta e rápida da Tabela 12 pode-se afirmar que a pH de 8,0 os materiais, [Sil][N₃₂₂₂]Cl, [Sil][N₃₄₄₄]Cl, [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl terão a sua superfície carregada negativamente, assim como o IFN α -2b. Para além disso, estes materiais são muito hidrofóbicos, não ficam bem dispersados e não sedimentam facilmente (mesmo após centrifugação) em soluções aquosas, comprometendo a execução dos ensaios cromatográficos. Desta forma, estes tipos de *SILs* não foram testados nos ensaios em *batch* para a purificação do IFN α -2b.

Em suma, conclui-se no que concerne à exploração maioritária de interações iónicas que as condições de ligação e respetiva eluição com o gradiente de NaCl em tampão Tris 10 mM pH 8 (Tris 10 mM pH 8; 0,35; 1,5 M), são as ideais comparativamente a outras testadas. E, o material [Sil][C₃C₁Im]Cl é aquele onde este tipo de interações podem ser mais favorecidas, obtendo melhores resultados na purificação seletiva do IFN α -2b, nomeadamente no passo de eluição com 0,35 M de NaCl. Desta forma, estes dois parâmetros (condições de eluição e escolha do material) serão aplicados em coluna e os respetivos resultados obtidos, analisados e discutidos posteriormente.

3.3.2 Ensaios em condições que promovem maioritariamente interações hidrofóbicas

Ensaio cromatográficos foram realizados com o intuito de avaliar a performance de purificação do IFN α -2b utilizando os *SILs* sintetizados como fases estacionárias em condições que promovem maioritariamente interações hidrofóbicas. Para tal, foram pesadas 150 mg de *SIL* e, de seguida realizaram-se as seguintes etapas cromatográficos (intercaladas com passos de centrifugação): 1) lavagem do material com água destilada; 2) equilíbrio; 3) adição de amostra dialisada; 4) adição de tampão de ligação na presença de sulfato de amónio; 5) eluição com diversos passos consecutivos com concentrações decrescentes de sulfato de amónio dissolvido em Tris 10 mM pH 8.

O primeiro *SIL* a ser testado, com o intuito de explorar as interações já referidas foi o [Sil][N₃₁₁₆]Cl (Figura 31). Esta escolha foi realizada tendo em conta diversos fatores, tais como, o elevado grau de funcionalização deste *SIL* comparativamente aos restantes e, a sua estrutura química, uma vez que, possui na sua composição uma longa cadeia alquílica, um fator preponderante para o estabelecimento de interações hidrofóbicas.

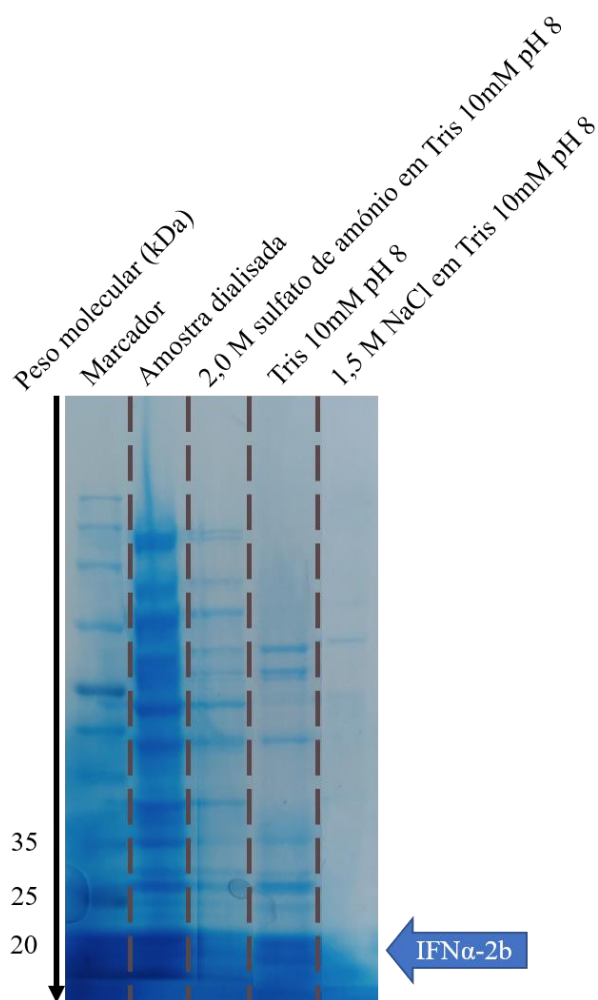


Figura 31- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][N₃₁₁₆]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 2,0 M de sulfato de amónio em Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com Tris 10 mM pH 8 e 1,5 M de NaCl em Tris 10 mM pH 8.

Ao analisar o perfil de eluição retratado na Figura 31, verifica-se que ocorreu a ligação das proteínas (IFN α -2b e contaminantes) à matriz e, apesar de neste ensaio se ter acoplado um passo cromatográfico com 1,5 M de NaCl, as proteínas referidas são apenas eluídas na presença da solução tampão Tris 10 mM pH 8, ou seja, na ausência de sal.

De seguida, tendo por base a análise realizada referente à Figura 31, testaram-se diferentes concentrações de sulfato de amónio em Tris 10 mM pH 8 (2,0; 1,0; 0,5 M) e apenas Tris 10 mM pH 8, de forma a promover a ligação e posterior eluição diferenciada da proteína alvo e das proteínas contaminantes. Para estas condições, além do SIL já referido foi ainda testado o material [Sil][C₃C₁Im]Cl, com o objetivo de analisar a performance de um material com um grau de funcionalização também elevado, mas com uma estrutura química totalmente distinta, nomeadamente, a presença de um anel aromático, sendo por isso, verosímil assumir a possibilidade de se estabelecer interações hidrofóbicas (Figura 32).

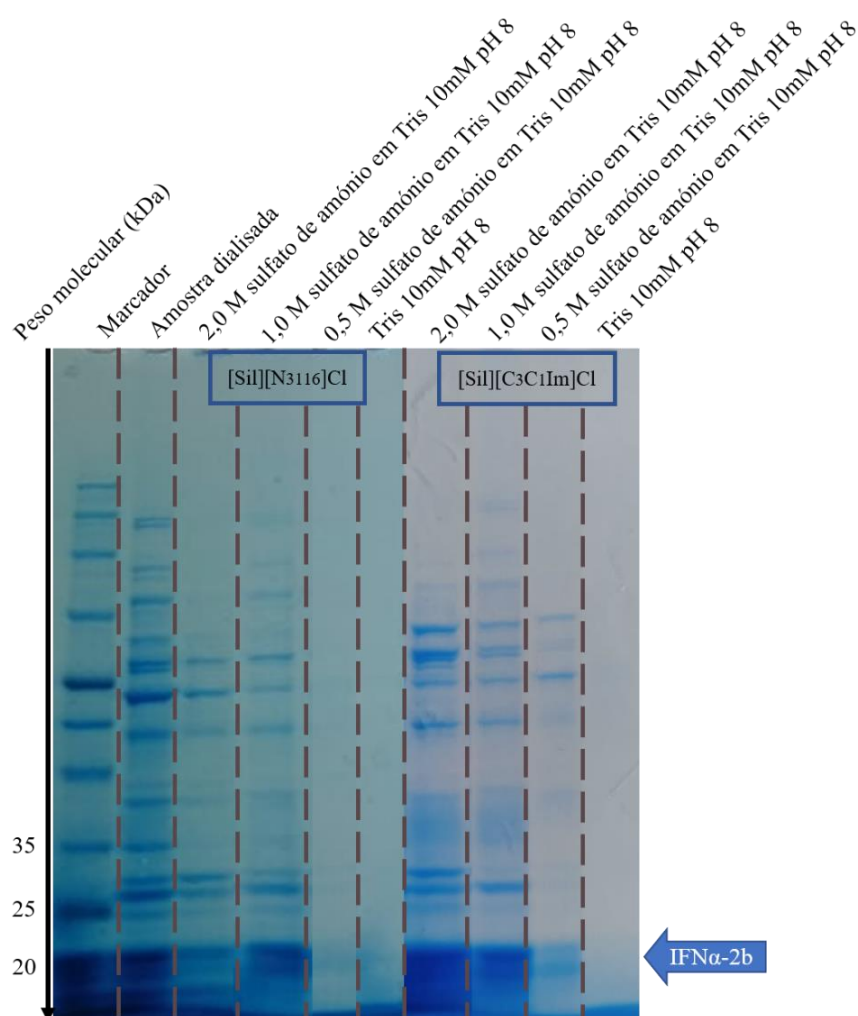


Figura 32- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [Sil][N₃₁₁₆]Cl e [Sil][C₃C₁Im]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 2,0 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.

Na Figura 32 observa-se que grande parte da proteína alvo liga-se ao material [Si][N₃₁₁₆]Cl. Por outro lado, a etapa de ligação do IFN α -2b ao material [Si][C₃C₁Im]Cl não parece ser tão eficaz. Para além disso, em ambos os ensaios é visível a eluição da proteína alvo e de proteínas contaminantes com 1,0 M de sulfato de amónio dissolvido na solução tampão.

Desta forma, e optando essencialmente por melhorar a pureza obtida tendo em consideração a impossibilidade de realizar otimizações individuais para cada *SIL* sintetizado, optou-se por efetuar um ensaio cromatográfico nas mesmas condições para todos os *SILs*, isto é ligação com 1,8 M e eluição recorrendo a 1,0; 0,5 M e Tris 10 mM pH 8, mantendo o sal (sulfato de amónio) e o tampão até agora utilizados. A opção de diminuir ligeiramente a concentração inicial de sal é justificada pelo facto de que o sulfato de amónio promove, na presença de interações hidrofóbicas, a ligação das proteínas aos *SILs*. Ou seja, ao diminuir ligeiramente este valor, espera-se que a ligação de proteínas contaminantes ao suporte seja menor, permitindo nos passos de eluição seguintes obtenção do IFN α -2b com um maior grau de pureza.

A respetiva análise comparativa será realizada em três grupos distintos, tendo em atenção a estrutura química de cada *SIL* sintetizado. Logo, os *SILs* [Si][N₃₂₂₂]Cl, [Si][N₃₄₄₄]Cl, [Si][N₃₆₆₆]Cl e [Si][N₃₈₈₈]Cl, constituem o grupo 1 (Figura 33). O grupo 2 é formado pelos *SILs* [Si][N₃₁₁₄]Cl, [Si][N₃₁₁₆]Cl e [Si][N₃₁₁₈]Cl (Figura 34). E o grupo 3 é apenas composto pelo *SIL* [Si][C₃C₁Im]Cl (Figura 35).

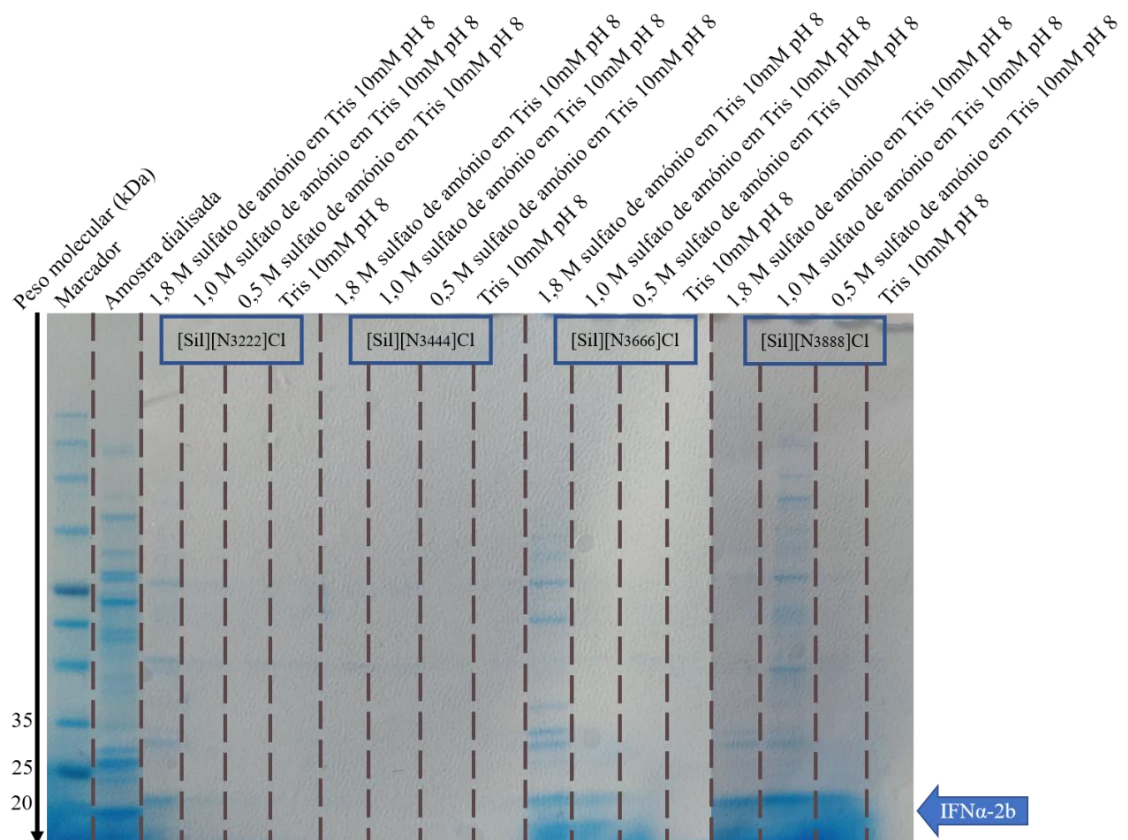


Figura 33- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais $[Si][N_{3222}]Cl$, $[Si][N_{3444}]Cl$, $[Si][N_{3666}]Cl$ e $[Si][N_{3888}]Cl$. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8.

Antes de analisar a Figura 33 em detalhe, é importante falar dos resultados esperados tendo em conta a estrutura química deste grupo de materiais. Como ponto de partida, é sabido que os materiais, $[Si][N_{3666}]Cl$ e $[Si][N_{3888}]Cl$ são os mais hidrofóbicos e, teoricamente, a uma concentração de 1,8 M de sulfato de amónio quanto mais hidrofóbico for o material maior é a ligação proteína-SIL. Desta forma, tendo como base os princípios mencionados, é expectável que a etapa de ligação no ensaio com o material $[Si][N_{3888}]Cl$ seja eficaz e, como tal, a presença de bandas proteica deve ser muito diminuída ou inexistente.

Através de uma observação geral da Figura 33 é imediatamente observável que os resultados obtidos não correspondem ao esperado e, que a concordância entre os mesmos também não existe ou é praticamente insignificante. Esta afirmação será explicada de

seguida, tendo em conta, uma análise mais pormenorizada do perfil de eluição de cada *SIL* testado.

Relativamente ao perfil de eluição do ensaio com o material [Sil][N₃₂₂₂]Cl, observa-se que no passo de ligação existe a presença de proteínas contaminantes e da proteína alvo. Este aspeto pode ser classificado como esperado, na medida em que este, material não apresenta características tão hidrofóbicas como os outros materiais testados neste grupo de análise. Ao compararmos a etapa de ligação dos restantes materiais verificamos que no material [Sil][N₃₄₄₄]Cl esta etapa é total e, tendo em atenção, as premissas já mencionadas relativas à hidrofobicidade de cada material e respetivo comportamento das interações proteína-*SIL*, seria expectável que no perfil de eluição do material [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl não existisse bandas proteicas (passo de ligação total). No entanto, em ambos os materiais é possível verificar a existência quer de proteínas contaminantes como da proteína alvo, demonstrando que as interações hidrofóbicas existentes no ensaio com o material [Sil][N₃₄₄₄]Cl foram mais fortes do que as existentes com estes materiais. Este aspeto não vai de acordo ao que seria esperado.

Uma possível explicação pode ser realizada tendo como base os seguintes fatores, um impedimento estereoquímico existente entre as moléculas acopladas à sílica e o diferente grau de funcionalização obtido. Relativamente ao segundo fator e, tendo como base a Tabela 10, pode-se verificar que os materiais [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl apresentam os valores mais baixos de *BA* obtidos, 0,243 e 0,135, respetivamente. Estes valores, espelham que a quantidade de moléculas acopladas à sílica são inferiores quando comparadas aos materiais [Sil][N₃₂₂₂]Cl e [Sil][N₃₄₄₄]Cl. Logo, a hidrofobicidade característica dos materiais que apresentam uma maior cadeia alquílica é menor comparativamente aos outros materiais, porque a quantidade de moléculas acopladas com 6 e 8 carbonos é inferior ao número de moléculas acopladas com 2 e 4 carbonos. Face a tudo isto, uma possível solução para comprovar se é realmente esta a problemática, seria a síntese deste tipo de *SIL* com o mesmo grau de funcionalização.

Apesar de o perfil de eluição de cada material, retratado na Figura 33, não estar totalmente de acordo com aquilo que seria esperado pode-se concluir, à partida, que estes tipos de materiais, principalmente o [Sil][N₃₄₄₄]Cl, [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl dificilmente seriam aplicados numa escala industrial de purificação, uma vez que, a dispersão deste tipo de materiais em água é bastante complicada originando a formação

de agregados que certamente iriam influenciar de forma negativa um eventual empacotamento numa coluna cromatográfica.

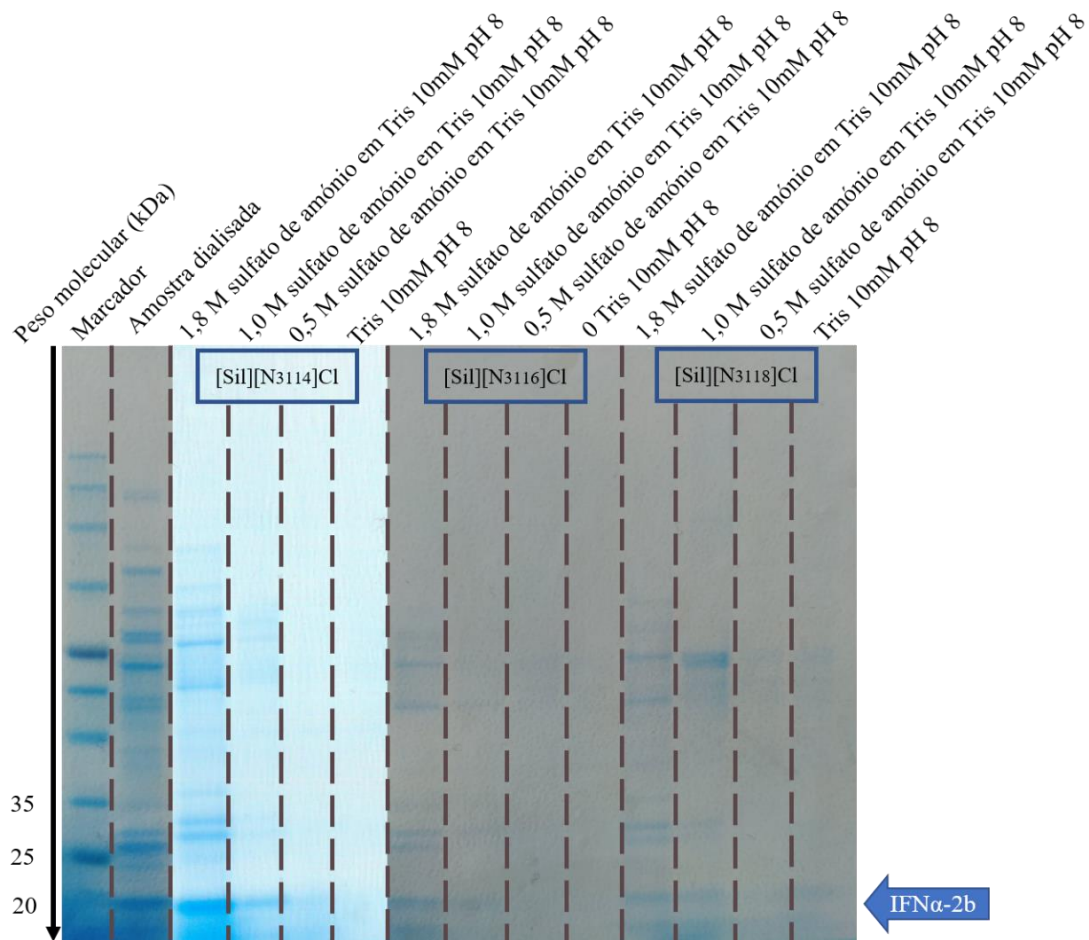


Figura 34- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando os materiais [SiI][N₃₁₁₄]Cl, [SiI][N₃₁₁₆]Cl e [SiI][N₃₁₁₈]Cl. Os ensaios foram realizados em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amônio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amônio e Tris 10 mM pH 8.

Os perfis de eluição obtidos nos ensaios realizados com os materiais [SiI][N₃₁₁₄]Cl, [SiI][N₃₁₁₆]Cl e [SiI][N₃₁₁₈]Cl, demonstrados na Figura 34, vão de acordo ao que era esperado. A afirmação referida é válida porque, do grupo 2, o material [SiI][N₃₁₁₄]Cl é o menos hidrofóbico e, por isso, era expectável que no passo de ligação existisse um maior número de bandas proteicas, contaminantes e IFN α -2b, comparativamente aos outros dois materiais. Este aspeto é verificado, demonstrado que os materiais [SiI][N₃₁₁₆]Cl e [SiI][N₃₁₁₈]Cl são mais hidrofóbicos e portanto com uma elevada concentração de sulfato de amônio promovem uma maior ligação proteína-SIL.

A observação da Figura 34 possibilita ainda a conclusão de que os materiais mais hidrofóbicos, [SiI][N₃₁₁₆]Cl e [SiI][N₃₁₁₈]Cl, com um gradiente decrescente de sulfato de amônio em solução tampão apresentam um problema na eluição quer de proteínas contaminantes como do IFN α -2b. Uma possível solução para resolver este problema, seria verificar se com a adição de NaCl dissolvido na solução tampão Tris 10 mM pH 8, ocorria a eluição das proteínas em questão, demonstrando também se estes materiais possuem nesse tipo de ensaio uma capacidade multimodal.

Apesar dos resultados obtidos para o grupo 2 não corresponderem a um processo completamente otimizado, quer ao nível de rendimento como de pureza, relativamente à ligação e respetiva eluição do IFN α -2b. É legítimo afirmar que os materiais [SiI][N₃₁₁₄]Cl e [SiI][N₃₁₁₆]Cl podem ter um futuro promissor no que concerne à sua aplicação em coluna, uma vez que, a sua hidrofobicidade em soluções aquosas não é tão limitante quando comparada com os materiais referidos no grupo 1.

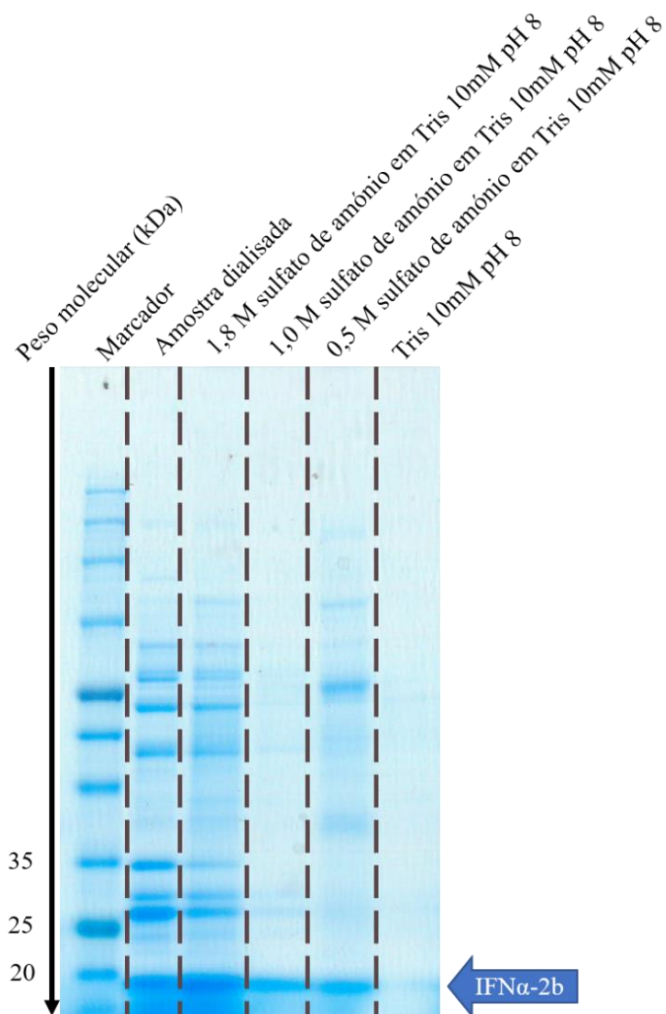


Figura 35- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas utilizando o material [Sil][C₃C₁Im]Cl. O ensaio foi realizado em batch nas seguintes condições: ligação efetuada com 1,8 M de sulfato de amônio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amônio e Tris 10 mM pH 8.

No que concerne às interações iônicas o material [Sil][C₃C₁Im]Cl foi o mais promissor, como explicado anteriormente. Desta forma, decidiu-se explorar as interações hidrofóbicas neste material e, assim, verificar se o *SIL* em questão possui capacidade multimodal.

Ao analisar o perfil de eluição representado na Figura 35, verifica-se que a concentração de sal utilizada no passo de ligação não é a adequada, uma vez que, o IFN α -2b (a sua maioria) não se liga ao suporte cromatográfico, na medida em que, são visíveis bandas correspondentes ao IFN α -2b. Contudo, apesar de esta etapa não ser totalmente eficaz, o perfil de eluição obtido com a concentração de 1,0; 0,5 M de sulfato de amônio

e Tris 10 mM pH 8, comprova o estabelecimento de interações hidrofóbicas entre as proteínas (IFN α -2b e contaminantes) e o material em questão, uma vez que, com um gradiente decrescente da concentração de sulfato de amónio, explorando as interações hidrofóbicas, as mesmas são separadamente eluídas.

O perfil de eluição obtido com 1,0 M de sulfato de amónio reflete que, de todos os ensaios realizados, este tipo de material será provavelmente aquele que, com as condições utilizadas, mais garantias dá para a obtenção do IFN α -2b, com um rendimento e pureza aceitáveis.

Assim, tendo em conta todos os aspetos analisados pode-se concluir que o material [Sil][C₃C₁Im]Cl é o mais promissor para uma purificação seletiva, podendo ser aplicado na exploração maioritária de interações hidrofóbicas e iónicas, demonstrando ser o *SIL* com maior capacidade multimodal. Para além disso, dispõe de boas características de empacotamento, tornando a escolha do material [Sil][C₃C₁Im]Cl óbvia para futuros ensaios de purificação cromatográfica em coluna, tendo como objetivo uma possível aplicação industrial.

3.3.3 Avaliação do potencial do ligando na purificação do IFN α -2b

Após o estabelecimento das condições ótimas de eluição na exploração preferencial das interações iónicas e hidrofóbicas, bem como a escolha do *SIL* onde este tipo de condições é mais eficaz, foi avaliado em *batch* se a seletividade se deve efetivamente ao ligando cromatográfico imobilizado (líquido iónico), ou ao invés se deve ao próprio suporte intermediário. Para tal, efetuou-se na exploração maioritária de interações iónica o passo de ligação com Tris 10 mM pH 8, seguido de eluição com 0,35 e 1,5 M de NaCl em Tris 10 mM pH 8 e, na exploração maioritária de interações hidrofóbicas o passo de ligação com 1,8 M de sulfato de amónio, seguido de eluição com 1,0; 0,5 M de sulfato de amónio e Tris 10 mM pH 8. Estas foram as condições empregues, uma vez que, permitiram obter resultados mais promissores quando aplicadas no suporte [Sil][C₃C₁Im]Cl. O perfil de eluição encontra-se demonstrado na Figura 36.

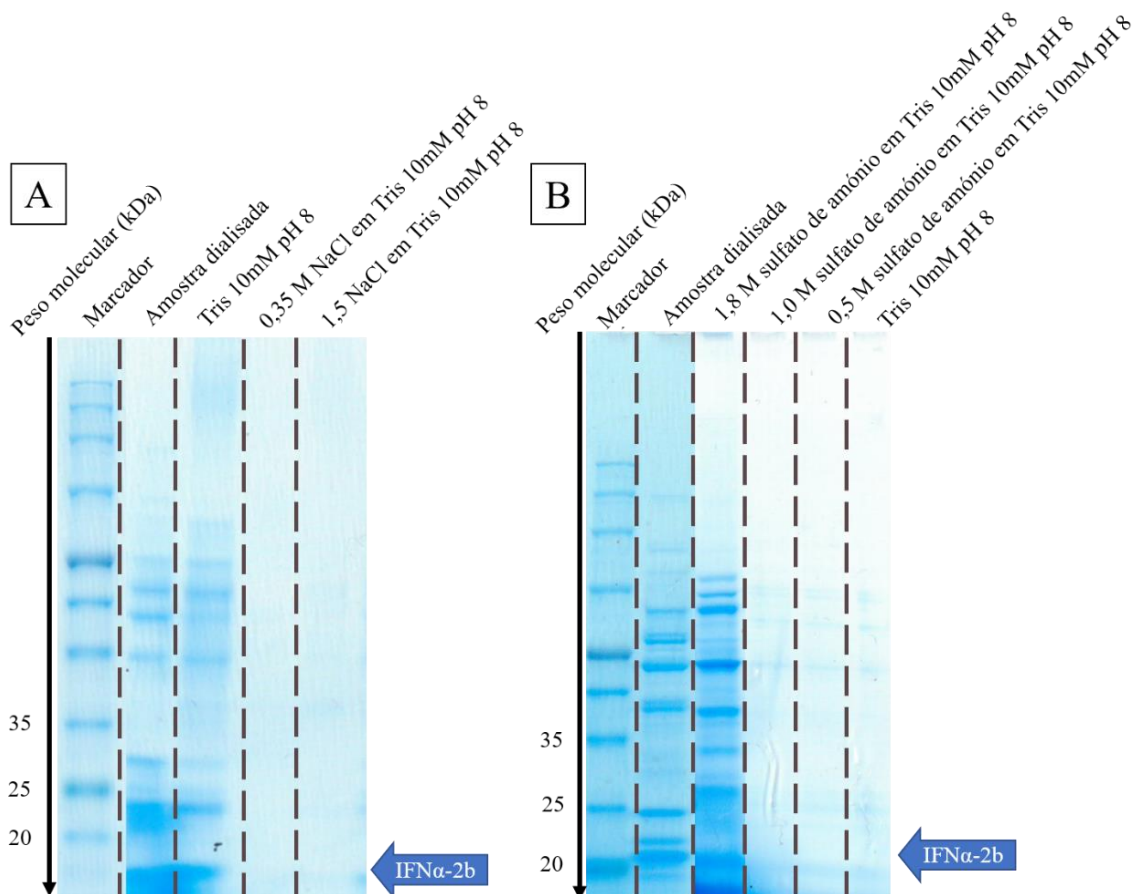


Figura 36- Análise por eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações cromatográficas obtidas após ensaios em batch com o material [Sil][C3]Cl, explorando maioritariamente a presença de interações iônicas (em A) e interações hidrofóbicas (em B).

Através da análise do perfil de eluição relativo à exploração das interações iônicas (Figura 36A) é possível observar que não ocorre interação entre as proteínas da amostra dialisada e o material, sendo estas detetadas apenas no passo de ligação (Tris 10 mM pH 8), o que vem corroborar que em condições que favorecem maioritariamente interações iônicas, a performance de purificação melhorada dos SILs se deve ao LI imobilizado.

Relativamente às interações hidrofóbicas (Figura 36B) e, tendo em conta que o material intermediário dispõe de uma cadeira propil, que lhe devia conferir uma certa hidrofobicidade, não é observável a presença de interação entre a amostra dialisada e o suporte. Ou seja, o passo de ligação, em semelhança ao ensaio anterior, é praticamente inexistente, não existindo possibilidade de se realizar uma separação e posterior extração do IFN α -2b com uma pureza aceitável.

3.4 Ensaios cromatográficos em coluna

Nos ensaios em coluna foram também exploradas maioritariamente as interações iônicas ou hidrofóbicas existentes entre a amostra dialisada e o material mais promissor nos ensaios em batch [Sil][C₃C₁Im]Cl, tendo por base as condições ótimas já referidas e discutidas nesses mesmos ensaios. Desta forma, com o intuito de explorar este tipo de interações, foi empacotada 1,0 g do respetivo suporte cromatográfico numa coluna e efetuaram-se as seguintes etapas cromatográficas: 1) lavagem do material com água destilada; 2) equilíbrio; 3) adição de amostra dialisada; 4) adição do tampão de ligação (interações iônicas-Tris 10 mM pH 8; interações hidrofóbicas- 1,8 M de sulfato de amónio em Tris 10 mM pH 8); 5) eluição com diversos passos consecutivos com concentrações crescentes de NaCl (0,35; 1,5 M- interações iônicas) ou concentrações decrescentes de sulfato de amónio (1,0; 0,5 M -interações hidrofóbicas), preparados em Tris 10mM pH 8. Avaliou-se a quantidade de proteína total através da absorvância a 280 nm, cujos valores foram representados na forma de um cromatograma e as frações correspondentes aos passos de ligação e eluição foram concentradas, dessalinizadas e analisadas por eletroforese (Figura 37- interações iônicas e Figura 38- interações hidrofóbicas).

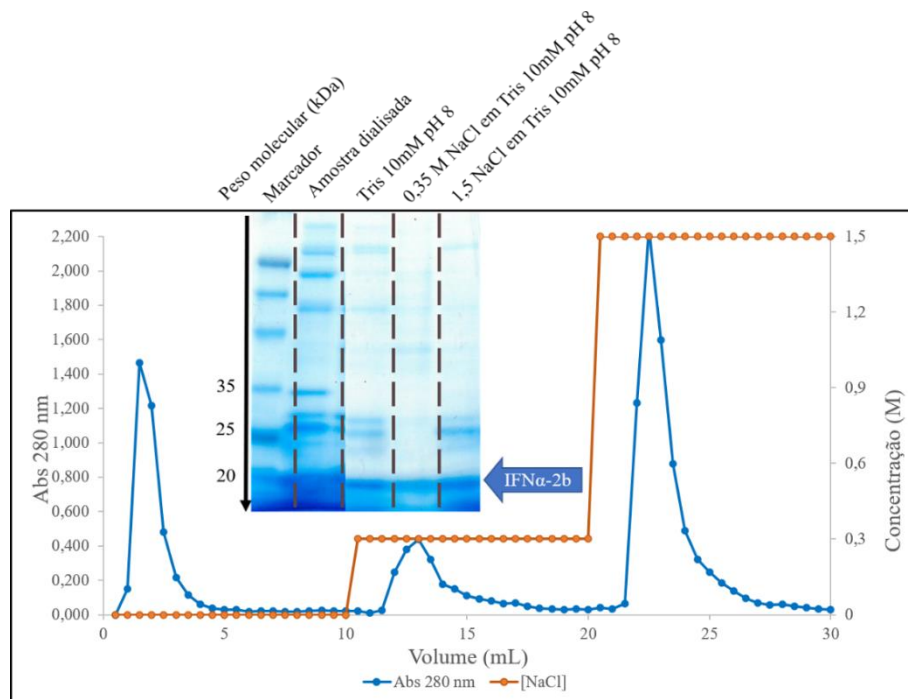


Figura 37- Perfil cromatográfico obtido após ensaio em coluna com o material [Sil][C₃C₁Im]Cl, explorando o estabelecimento de interações iônicas, e eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações selecionadas.

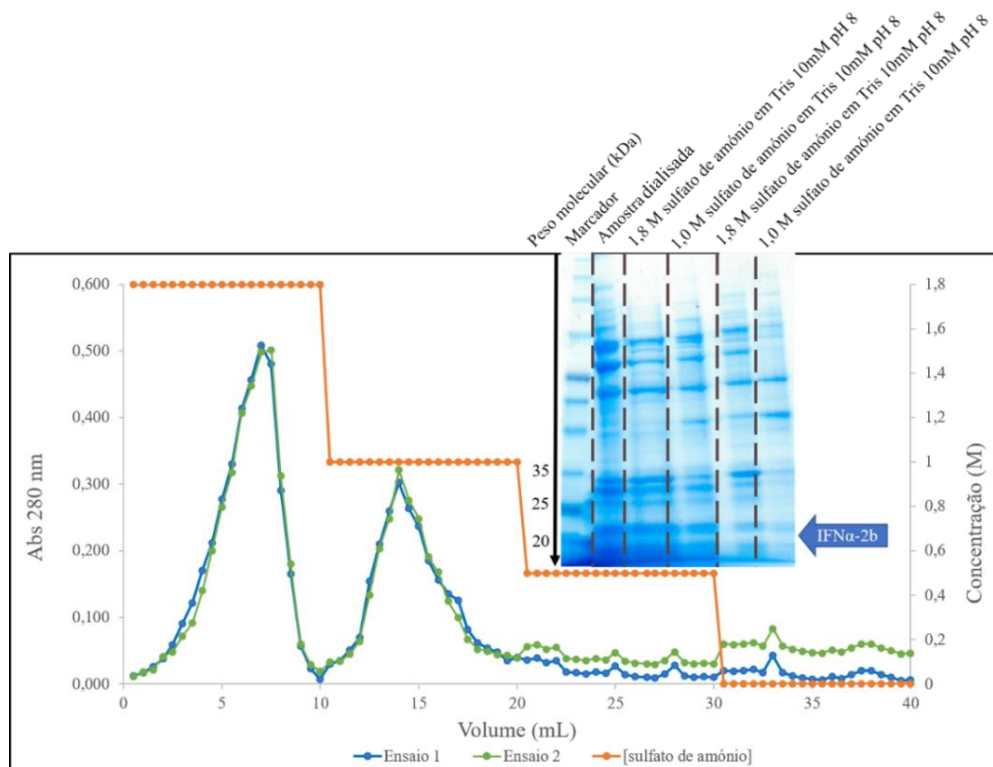


Figura 38- Perfil cromatográfico obtido após ensaio em coluna com o material [Sil][C₃C₁Im]Cl, explorando o estabelecimento de interações hidrofóbicas, e eletroforese de acrilamida em condições desnaturantes e redutoras das frações selecionadas.

No que concerne à exploração das interações iônicas em coluna (Figura 37) observa-se presença de três picos cromatográficos correspondentes ao gradiente de NaCl utilizado. Ao completar esta análise com o perfil de eluição demonstrado na mesma figura, verifica-se que no passo de ligação a interação proteína – [Sil][C₃C₁Im]Cl não é muito extensa, na medida em que, no pico cromatográfico obtido com Tris 10 mM pH 8 observa-se a presença de bandas correspondentes à proteína alvo e contaminantes. Todavia, com 0,35 M de NaCl ocorre a eluição do IFN α -2b com uma pureza aceitável e um rendimento satisfatório (mas não total), o que vai de acordo ao esperado tendo em conta os ensaios de otimização realizados em *batch* (Figura 28).

Relativamente à exploração das interações hidrofóbicas em coluna (Figura 38), conclui-se que a seletividade obtida por parte deste processo não é a desejada, contudo podemos classificá-lo como funcional, na medida que, ao utilizar diferentes concentrações de sulfato de amônio em Tris 10 mM pH 8, verifica-se a presença de proteínas contaminantes e do IFN α -2b, mas com uma pureza muito longe do desejável.

Assim, e assumindo que o resultado obtido não vai de acordo ao que era expectável, deve-se no futuro realizar ensaios de otimização adicionais variando, por exemplo, na concentração de sulfato de amónio e/ou o pH da solução tampão.

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e, verificar se o material [SiI][C₃C₁Im]Cl aplicado em coluna pode ou não ser regenerado e reutilizado, foram realizados dois ensaios demonstrados na Figura 38. Apesar dos resultados obtidos não apresentarem diferenças significativas, seria necessário um conjunto mais alongado de ensaios (n=10) para avaliar melhor a reprodutibilidade, regeneração e reutilização do suporte e, a partir daqui retirar as respetivas conclusões.

4. Conclusão e perspectivas futuras

Considerando os resultados obtidos e discutidos relativos aos *SILs* sintetizados: [Sil][C₃C₁Im]Cl, [Sil][N₃₁₁₄]Cl, [Sil][N₃₁₁₆]Cl, [Sil][N₃₁₁₈]Cl, [Sil][N₃₂₂₂]Cl, [Sil][N₃₄₄₄]Cl, [Sil][N₃₆₆₆]Cl e [Sil][N₃₈₈₈]Cl, pode-se concluir que a funcionalização da sílica com os LIs foi bem-sucedida, tendo sido obtido materiais versáteis e promissores para a purificação do IFN α -2b. Todavia, o grau de funcionalização é distinto, sendo os materiais [Sil][C₃C₁Im]Cl, [Sil][N₃₁₁₄]Cl, [Sil][N₃₁₁₆]Cl e [Sil][N₃₁₁₈]Cl aqueles que obtiveram um grau de funcionalização mais elevado. Um possível motivo deste fenômeno poderá estar relacionado com um impedimento estereoquímico, aquando da funcionalização dos *SILs* com LIs “mais volumosos” e simétricos, que não permite a presença de tantas moléculas de LI immobilizadas na superfície da sílica esférica.

Neste trabalho, foi ainda realizado a produção e respetiva recuperação do IFN α -2b em *E. coli*, tendo em conta um protocolo previamente otimizado que possibilita minimizar as perdas da proteína alvo durante as etapas de lavagem e, a obtenção do IFN α -2b após diálise com um *refolding* adequado. Desta forma, este tipo de protocolo possibilita a superação dos principais problemas associados à produção deste tipo de proteínas com auxílio a corpos de inclusão.

Após a obtenção da proteína alvo, foi delineada uma estratégia para a purificação do IFN α -2b através da otimização da composição dos tampões cromatográficos (força iónica e pH) em diversos materiais, com o intuito de explorar maioritariamente o estabelecimento de interações iónicas ou hidrofóbicas entre a proteína alvo e os materiais sintetizados. Deste modo, foi primeiramente testado em *batch* a solução tampão ideal, tendo sido escolhido a solução tampão de Tris 10 mM pH 8. Na exploração das interações iónicas, foi determinado o gradiente ascendente de concentração de NaCl dissolvido na solução tampão já mencionada, que possibilita a obtenção da proteína alvo com uma pureza e rendimento qualitativamente consideráveis. Assim, o gradiente de Tris 10 mM pH 8; 0,35 e 1,5 M de NaCl e o material [Sil][C₃C₁Im]Cl foram selecionados para explorar este tipo de interações no valor de pH já mencionado, uma vez que, foi com estas condições em particular a 0,35 M que se obteve uma purificação e rendimento mais aceitável do IFN α -2b, comparativamente às restantes condições utilizadas em outros ensaios. No que concerne à exploração de interações hidrofóbicas o mesmo propósito foi realizado, ou seja, determinar qual seria o gradiente decrescente de (NH₄)₂SO₄ dissolvido em Tris 10 mM pH 8 que possibilitava um melhor processo de purificação. Desta forma,

foi determinado o gradiente 1,8; 1,0; 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Tris 10 mM pH 8, bem como o material $[\text{Sil}][\text{C}_3\text{C}_1\text{Im}]\text{Cl}$ como aquele que dava mais garantias ao nível de purificação do IFN α -2b. Tendo em conta o *SIL* referido como o mais promissor, é possível prever que a particularidade da sua estrutura, onde dispõe de um anel aromático e carga positiva, permite estabelecer certos tipos de interações importantes para a sua promissora aplicação na purificação do IFN α -2b, como iónicas, hidrofóbicas, π - π , entre outras.

As condições e o material escolhido foram aplicados em ensaios cromatográficos em coluna. Face aos resultados obtidos, conclui-se que a exploração de interações iónicas em coluna permite obter um maior grau de pureza e rendimento do IFN α -2b comparativamente aos ensaios realizados para a exploração das interações hidrofóbicas. Para além disso, é aceite de uma forma geral na literatura que para a purificação de biomoléculas, é preferível a utilização de NaCl, o qual apresenta um potencial de eutrofização inferior relativamente ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e no qual a estabilidade dos biofármacos é geralmente superior, permitindo desta forma minimizar o impacto no ambiente e assegurar simultaneamente a estabilidade e, conseqüentemente, a bioatividade da proteína terapêutica. Relativamente à reprodutibilidade entre ensaios, regeneração e reutilização dos *SILs* os dados obtidos ainda são muito preliminares. Contudo, com os dois ensaios efetuados ($n=2$) os resultados mostraram ter diferenças pouco significativas, sendo por isso bastante promissores.

Além disso, foram efetuados ensaios em *batch* com o material intermediário ($[\text{Sil}][\text{C}_3]\text{Cl}$) e verificou-se que este material não tinha capacidade, na exploração maioritária de interações iónicas ou hidrofóbicas, de ligar a proteína alvo, o que demonstra que a performance de purificação melhorada dos *SILs* se deve efetivamente aos LIs imobilizados e não ao material de suporte ou ao agente de ligação (3-cloropropiltrimetoxisilano).

De uma forma geral, é importante realçar que os LIs imobilizados em sílica atuam como ligandos cromatográficos, apresentando características típicas de trocadores iónicos, ligandos hidrofóbicos ou multimodais, o que demonstra a sua versatilidade para a purificação de biofármacos a partir de amostras complexas explorando diferentes mecanismos de separação cromatográfica.

Como trabalho futuro, mencionar a possibilidade de sintetizar e caracterizar *SILs* que contenham um grau de funcionalização o mais semelhante possível. Aprimorar as

condições ótimas, nomeadamente, no que concerne à escolha da concentração de sal nos gradientes cromatográficos e o valor de pH, com o intuito de obter um processo de purificação seletivo com maior pureza e rendimento. A necessidade de aumentar o número de ensaios (n=10) para avaliar adequadamente a reprodutibilidade dos resultados e respetiva regeneração e reutilização dos *SILs*. A realização de ensaios de citotoxicidade para os *SILs* sintetizados, com o intuito de verificar se realmente este tipo de estratégia é adequada, tendo em conta que é desejado a purificação de um biofármaco. Proceder à quantificação do IFN α -2b, por um ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*), e da proteína total por um método comercial, para se conseguir obter um valor exato do grau de pureza /fator de purificação e rendimento do IFN α -2b. Analisar por dicroísmo circular a estabilidade da proteína alvo obtida após o ensaio cromatográfico e verificar se a atividade biológica do IFN α -2b se mantém após o processo de purificação, permitindo que este possa exercer os seus efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores.

5. Bibliografia

1. Nathan, C. & Cars, O. Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *N. Engl. J. Med.* 689–691 (2014).
2. Guiochon, G. & Beaver, L. A. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. A* **1218**, 8836–8858 (2011).
3. Sauna, Z. E. *et al.* Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* **6**, 1–17 (2017).
4. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
5. You, W. & Henneberg, M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. *Evol. Appl.* **11**, 140–152 (2018).
6. Lin, Y. K. *et al.* Recovery of human interferon alpha-2b from recombinant *Escherichia coli* using alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* **120**, 362–366 (2013).
7. Priyanka, R. & Muralidharan. Interferons and interferon therapy. *J. Pharm. Sci. Res.* **6**, 400–403 (2015).
8. Ayed, A., Rabhi, I., Dellagi, K. & Kallel, H. High level production and purification of human interferon α 2b in high cell density culture of *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 173–180 (2008).
9. Beldarraín, A., Cruz, Y., Cruz, O., Navarro, M. & Gil, M. Purification and conformational properties of a human interferon α 2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**, 173–182 (2001).
10. World Health Organization. *WHO Model Lists of Essential Medicines.* (2015).
11. Lin, Y. K., Ooi, C. W., Ramanan, R. N., Ariff, A. & Ling, T. C. Recovery of Human Interferon Alpha-2b from Recombinant *Escherichia coli* by Aqueous Two-Phase System. *Sep. Sci. Technol.* **47**, 1023–1030 (2012).
12. Srivastava, P., Bhattacharaya, P., Pandey, G. & Mukherjee, K. J. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **41**, 313–322 (2005).
13. Graumann, K. & Premstaller, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol. J.* **1**, 164–186 (2006).
14. Francis, D. M. & Page, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr.*

- Protoc. Protein Sci.* 1–29 (2010).
15. Vidal, L., Riekkola, M. L. & Canals, A. Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. *Anal. Chim. Acta* **715**, 19–41 (2012).
 16. Almeida, H. F. D., Neves, M. C., Trindade, T., Marrucho, I. M. & Freire, M. G. Supported ionic liquids as efficient materials to remove non-steroidal anti-inflammatory drugs from aqueous media. *Chem. Eng. J.* **381**, 122616 (2020).
 17. Neves, M. C. *et al.* Improved ionic-liquid-functionalized macroporous supports able to purify nucleic acids in one-step. *Mater. Today Bio* 1–42 (2020).
 18. Belchior, D. C. V., Duarte, I. F. & Freire, M. G. Ionic Liquids in Bioseparation Processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1–29 (2019) doi:10.1007/10_2018_66.
 19. Lemus, J., Palomar, J., Gilarranz, M. A. & Rodriguez, J. J. Characterization of Supported Ionic Liquid Phase (SILP) materials prepared from different supports. *Adsorption* **17**, 561–571 (2011).
 20. Fehrmann, R., Haumann, M. & Riisager, A. Supported Ionic Liquids: Fundamentals and Applications. in *Wiley-VCH* 1–10 (2014).
 21. Kretzmer, G. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 135–142 (2002).
 22. Goldstein, G., Fuccello, A. J., Norman, D. J. & Cosimi, A. B. OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *TRANSPLANTION* **42**, 507–511 (1986).
 23. Asmana Ningrum, R. Human Interferon Alpha-2b: A Therapeutic Protein for Cancer Treatment. *Scientifica (Cairo)*. 1–8 (2014).
 24. Jarvis, L. Interferon. *Arch Dermatology* **123**, 743–744 (1987).
 25. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **36**, 1136–1145 (2018).
 26. Roger, S. D. Biosimilars: current status and future. *Expert Opin.* 79–96 (2010).
 27. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. 258–267 (1957).
 28. Weissmann, C. *et al.* Structure and expression of human IFN-alpha genes. *Philos. Trans. R. Soc. London.* **299**, 7–28 (1982).
 29. Pestka, S. Interferon from 1981 to 1986. *Methods Enzymol.* **119**, (1986).
 30. Pestka, S., Jerome A. Langer, Zoon, K. C. & Department, C. E. S. INTERFERONS AND THEIR ACTIONS. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 727–777 (1987).

31. Hauptmann, R. & Swetly, P. A novel class of human type I interferons. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4739–4750 (1985).
32. Feinstein, S. I. *et al.* Family of human alpha-interferon-like sequences. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 510–517 (1985).
33. Jonassch, E. & Haluska, F. G. Interferon in Oncological Practice: Review of Interferon Biology, Clinical Applications, and Toxicities. *Oncologist* **6**, 34–55 (2001).
34. Wheelock, E. F. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science* . 310–311 (1965)
35. Pfeffer, L. M. *et al.* Biological properties of recombinant α -interferons: 40th Anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* **58**, 2489–2499 (1998).
36. Bach, E. A., Aguet, M. & Schreiber, R. D. The IFN γ receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563–591 (1997).
37. Merlin, G., Falcoff, E. & Aguet, M. 125I-Labeled human interferons alpha, beta and gamma: Comparative receptor-binding data. *J. Gen. Virol.* **66**, 1149–1152 (1985).
38. Foster, G. R. & Finter, N. B. Are all Type I human interferons equivalent? *J. Viral Hepat.* **5**, 143–152 (1998).
39. Leader, B., Baca, Q. J. & Golan, D. E. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 21–39 (2008).
40. Lenschow, D. J. *et al.* Identification of Interferon-Stimulated Gene 15 as an Antiviral Molecule during Sindbis Virus Infection In Vivo. *J. Virol.* **79**, 13974–13983 (2005).
41. Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A. & Zoon, K. C. Antiproliferative properties of type I and type II interferon. *Pharmaceuticals* **3**, 994–1015 (2010).
42. Gibbert, K., Schlaak, J. F., Yang, D. & Dittmer, U. IFN- α subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 1048–1058 (2013).
43. Klein, M. L., Bartley, T. D., Lai, P. H. & Lu, H. S. Structural characterization of recombinant consensus interferon- α . *J. Chromatogr.* **454**, 205–215 (1988).
44. Blatt, L. M., Davis, J. M., Klein, S. B. & Taylor, M. W. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *J. Interf. Cytokine Res.* **16**, 489–499 (1996).
45. Miller, D. L., Kung, H. F. & Pestka, S. Crystallization of recombinant human leukocyte interferon A. *Science (80-.)*. **215**, 689–690 (1982).
46. Dianzani, F. & Dolei, A. The interferon system-A Bird's eye view of its biochemistry.

- Ann. Ist. Super. Sanita* **23**, 765–768 (1987).
47. Wang, Y. Sen *et al.* Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 547–570 (2002).
 48. Liu, Y. H. *et al.* Mass spectrometric characterization of the isoforms in *Escherichia coli* recombinant DNA-derived interferon alpha-2b. *Anal. Biochem.* **408**, 105–117 (2011).
 49. Nyman, T. A., Kalkkinen, N., Tölö, H. & Helin, J. Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- α 2b and interferon- α 14c produced by Sendai-virus- induced human peripheral blood leukocytes. *Eur. J. Biochem.* **253**, 485–493 (1998).
 50. Brunetto, M. R. *et al.* Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: A long term cohort study. *J. Hepatol.* **36**, 263–270 (2002).
 51. Fried, M. W. & Hoofnagle, J. H. Therapy of Hepatitis C. *Semin. LIVER DISEASE* **15**, 82–91 (1995).
 52. Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E. & Kirkwood, J. M. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor* **13**, 119–134 (2002).
 53. Romerio, F. & Zella, D. MEK and ERK inhibitors enhance the anti-proliferative effect of interferon-alpha2b. *FASEB J.* 1–23 (2002).
 54. Romerio, F., Riva, A. & Zella, D. Interferon-alfa2b reduces phosphorylation and activity of MEK and ERK through a Ras/Raf-independent mechanism. *Br. J. Cancer* **83**, 532–538 (2000).
 55. Steelman, L. S. *et al.* JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**, 189–218 (2004).
 56. Bazhanova, E. D. Participation of interferon-alpha in regulation of apoptosis. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **41**, 127–133 (2005).
 57. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237–249 (2003).
 58. Maeda, S. *et al.* Interferon- α acts on the S/G2/M phases to induce apoptosis in the G1 phase of an IFNAR2-expressing hepatocellular carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* **289**, 23786–23795 (2014).

59. Keating, S. E., Baran, M. & Bowie, A. G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* **32**, 574–581 (2011).
60. Ankel, H., Westra, D. F., Welling-Wester, S. & Lebon, P. Induction of interferon- α by glycoprotein D of herpes simplex virus: A possible role of chemokine receptors. *Virology* **251**, 317–326 (1998).
61. Botos, I., Segal, D. M. & Davies, D. R. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* **19**, 447–459 (2011).
62. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
63. Genin, P., Lin, R., Hiscott, J. & Civas, A. Differential Regulation of Human Interferon A Gene Expression by Interferon Regulatory Factors 3 and 7. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3435–3450 (2009).
64. Erlandsson, L. *et al.* Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr. Biol.* **8**, 223–226 (2014).
65. Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol.* **14**, 778–809 (2001).
66. Sadler, A. J. & Williams, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 559–568 (2008).
67. Samuel, C. E. Reoviruses and the interferon system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **233 II**, 125–145 (1998).
68. Devasthanam, A. S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence* **5**, 270–277 (2014).
69. George, P. M., Badiger, R., Alazawi, W., Foster, G. R. & Mitchell, J. A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol. Ther.* **135**, 44–53 (2012).
70. Borden, E. C. & Parkinson, D. Interferons: effectiveness, toxicities, and costs. *Ann. Intern. Med.* **125**, 614–616 (1996).
71. Sacchi, S. *et al.* Immune-mediated and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.* **13**, 2401–2407 (1995).
72. Foster, G. R. Pegylated interferons: Chemical and clinical differences. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**, 825–830 (2004).
73. Milton Harris, J., Martin, N. E. & Modi, M. Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **40**, 539–551 (2001).

74. Jay H. Hoofnagle, M.D., and Leonard B. Seeff, M. . Peginterferon and ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1270–1277 (2007).
75. World Health Organization (WHO). *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection.* WHO (2018).
76. Helsen, C. W. *et al.* Real-life costs of hepatitis C treatment. *Neth. J. Med.* **70**, 145–153 (2012).
77. Subramanian, G. M., Fiscella, M., Lamousé-Smith, A., Zeuzem, S. & McHutchison, J. G. Albinterferon α -2b: A genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1411–1419 (2007).
78. Dutta, R. Drug Carriers in Pharmaceutical Design: Promises and Progress. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 761–769 (2007).
79. Malik, D. K., Baboota, S., Ahuja, A., Hasan, S. & Ali, J. Recent trends in protein and peptide drug delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* **4**, 141–151 (2007).
80. Pham, P. V. Medical biotechnology: Techniques and applications. in *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life* vol. 1 449–469 (2018).
81. Arber, W. & Lin, S. DNA MODIFICATION AND RESTRICTION. *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 467–500 (1969).
82. Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–128 (2005).
83. Andersen, D. C. & Krummen, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Biochem. Eng.* **13**, 117–123 (2002).
84. Jozala, A. F. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian J. Microbiol.* **47**, 51–63 (2016).
85. Azevedo, A. M., Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F. & Aires-Barros, M. R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends Biotechnol.* **27**, 240–247 (2009).
86. Przybycien, T. M., Pujar, N. S. & Steele, L. M. Alternative bioseparation operations: Life beyond packed-bed chromatography. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 469–478 (2004).
87. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).

88. Ladisch, M. R. & Kohlmann, K. L. Recombinant Human Insulin Analogues. *Biotechnol. Prog.* **8**, 469–477 (1992).
89. Zerbs, S., Frank, A. M. & Collart, F. R. Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins. in *Methods in Enzymology* vol. 463 149–168 (2009).
90. Brondyk, W. H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. in *Methods in Enzymology* vol. 463 131–147 (Elsevier Inc., 2009).
91. Schmidt, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 363–372 (2004).
92. Neves, F. O. *et al.* Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* **35**, 353–359 (2004).
93. Valente, C. A., Monteiro, G. A., Cabral, J. M. S., Fevereiro, M. & Prazeres, D. M. F. Optimization of the primary recovery of human interferon α 2b from Escherichia coli inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **45**, 226–234 (2006).
94. Overton, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov. Today* **19**, 590–601 (2014).
95. Solar, G. del & Espinosa, M. Plasmid copy number control: an ever-growing story Gloria. *Mol. Microbiol.* **37**, 492–500 (2002).
96. Berkner, S., Wlodkowski, A., Albers, S. V. & Lipps, G. Inducible and constitutive promoters for genetic systems in Sulfolobus acidocaldarius. *Extremophiles* **14**, 249–259 (2010).
97. Reznikoff, W. S. The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. *Mol. Microbiol.* **6**, 2419–2422 (1992).
98. Korpimäki, T., Kurittu, J. & Karp, M. Surprisingly fast disappearance of β -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *J. Microbiol. Methods* **53**, 37–42 (2003).
99. Hwang, P. M., Pan, J. S. & Sykes, B. D. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **588**, 247–252 (2014).
100. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. & Pedersen, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1–13 (2006).
101. Rabhi-Essafi, I., Sadok, A., Khalaf, N. & Fathallah, D. M. A strategy for high-level

- expression of soluble and functional human interferon α as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 201–209 (2007).
102. Maldonado, L. M. T. P. *et al.* Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: The case of human interferon beta. *Biomol. Eng.* **24**, 217–222 (2007).
 103. Platis, D. & Foster, G. R. High yield expression, refolding, and characterization of recombinant interferon $\alpha 2/\alpha 8$ hybrids in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **31**, 222–230 (2003).
 104. Fischer, B., Sumner, I. & Goodenough, P. Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **42**, 1512–1515 (1992).
 105. Demain, A. L. & Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**, 297–306 (2009).
 106. Gräslund, S. *et al.* Protein production and purification. *Nat. Methods* **5**, 135–146 (2008).
 107. Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* **4**, 235–251 (2014).
 108. Dashbolaghi, A., Khatami, S., Sardari, S., Cohan, R. A. & Norouzian, D. Improved refolding efficacy of recombinant human interferon α -2b via pH modulation. *Trop. J. Pharm. Res.* **14**, 385–390 (2015).
 109. GE Healthcare Bio-Science. *Recombinant Protein Purification Handbook Principles and Methods imagination at work.* (2009).
 110. Amersham Pharmacia Biotech. *The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification.* (2000).
 111. Zhang, K. & Liu, X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **128**, 73–88 (2016).
 112. GE Healthcare. *Multimodal Chromatography Handbook.* GE Healthcare (2013).
 113. Shi, L., Wang, D., Chan, W. & Cheng, L. Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **54**, 220–226 (2007).
 114. Cao, Y. *et al.* Preparation and characterization of magnetic microspheres for the purification of interferon α -2b. *J. Chromatogr.* **833**, 236–244 (2006).

115. Han, D. & Row, K. H. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules* **15**, 2405–2426 (2010).
116. Welton, T. Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **99**, 2071–2083 (1999).
117. Brennecke, J. F. & Maginn, E. J. Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing. *AIChE J.* **47**, 2384–2389 (2001).
118. Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M. & Goto, M. Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnol. J.* **11**, 1000–1013 (2016).
119. Ríos, A. P. de los, Hernández-Fernández, F. J., Lozano, L. J. & Godínez, C. Supported Ionic Liquid Membranes: Preparation, Stability and Applications. in *Green Solvents II: Properties and Applications of Ionic Liquids* 275–288 (2012).
120. Seddon, K. R. Ionic liquids for clean technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 351–356 (1997).
121. P. Walden. Ueber die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzeneserie. **8**, (1914).
122. Davis, J. H. Task-specific ionic liquids. *Chem. Lett.* **33**, 1072–1077 (2004).
123. Wang, J. *et al.* Recent development of ionic liquid membranes. *Green Energy Environ.* **1**, 43–61 (2016).
124. Freire, M. G. *et al.* Aqueous biphasic systems: A boost brought about by using ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4966–4995 (2012).
125. Petkovic, M., Seddon, K. R., Rebelo, L. P. N. & Pereira, C. S. Ionic liquids: A pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1383–1403 (2011).
126. Amde, M., Liu, J. F. & Pang, L. Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 12611–12627 (2015).
127. Sintra, T. E. *et al.* Ecotoxicological evaluation of magnetic ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **143**, 315–321 (2017).
128. Mikkola, S. K. *et al.* Impact of amphiphilic biomass-dissolving ionic liquids on biological cells and liposomes. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 1870–1878 (2015).
129. Thuy Pham, T. P., Cho, C. W. & Yun, Y. S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.* **44**, 352–372 (2010).

130. Pedro, A. Q., Coutinho, J. A. P. & Freire, M. G. Immobilization of Ionic Liquids, Types of Materials, and Applications. *Encycl. Ion. Liq.* 1–12 (2019).
131. Vangeli, O. C. *et al.* Grafting of imidazolium based ionic liquid on the pore surface of nanoporous materials - Study of physicochemical and thermodynamic properties. *J. Phys. Chem.* **114**, 6480–6491 (2010).
132. Zhang, S., Zhang, J., Zhang, Y. & Deng, Y. Nanoconfined Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **117**, 6755–6833 (2017).
133. Virtanen, P. *et al.* Supported ionic liquid catalysts-From batch to continuous operation in preparation of fine chemicals. *Catal. Today* **147**, 144–148 (2009).
134. Giacalone, F. & Gruttadauria, M. Covalently Supported Ionic Liquid Phases: An Advanced Class of Recyclable Catalytic Systems. *ChemCatChem* **8**, 664–684 (2016).
135. Campisciano, V., Giacalone, F. & Gruttadauria, M. Supported Ionic Liquids: A Versatile and Useful Class of Materials. *Chem. Rec.* **17**, 918–938 (2017).
136. Zhou, H. *et al.* Immobilizing penicillin G acylase using silica-supported ionic liquids: the effects of ionic liquid loadings. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**, 13173–13181 (2012).
137. Zhang, H. *et al.* An ionic liquid-magnetic graphene composite for magnet dispersive solid-phase extraction of triazine herbicides in surface water followed by high performance liquid chromatography. *Analyst* **143**, 175–181 (2018).
138. Xin, B. & Hao, J. Imidazolium-based ionic liquids grafted on solid surfaces. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 7171–7187 (2014).
139. Wanigasekara, E. *et al.* Bonded ionic liquid polymeric material for solid-phase microextraction GC analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 511–524 (2010).
140. Shi, X., Qiao, L. & Xu, G. *Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography. Journal of Chromatography A* (2015).
141. Qiu, H. *et al.* Anionic and cationic copolymerized ionic liquid-grafted silica as a multifunctional stationary phase for reversed-phase chromatography. *Anal. Methods* **6**, 469–475 (2014).
142. Zhang, M., Chen, J., Gu, T., Qiu, H. & Jiang, S. Novel imidazolium-embedded and imidazolium-spaced octadecyl stationary phases for reversed phase liquid chromatography. *Talanta* **126**, 177–184 (2014).
143. Qiu, H., Jiang, S., Takafuji, M. & Ihara, H. Polyanionic and polyzwitterionic azobenzene ionic liquid-functionalized silica materials and their chromatographic

- applications. *Chem. Commun.* **49**, 2454–2456 (2013).
144. Liu, J. F. *et al.* Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography-flame ionization detection. *J. Chromatogr. A* **1066**, 27–32 (2005).
 145. Tian, M., Yan, H. & Row, K. H. Solid-phase extraction of tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge using ionic liquid-modified silica sorbents. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 738–742 (2009).
 146. Egorova, K. S. & Ananikov, V. P. Toxicity of ionic liquids: Eco(cyto)activity as complicated, but unavoidable parameter for task-specific optimization. *ChemSusChem* **7**, 336–360 (2014).
 147. Fontanals, N., Borrull, F. & Marcé, R. M. Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **41**, 15–26 (2012).
 148. Marwani, H. M., Bakhsh, E. M., Al-Turaif, H., M-Asiri, A. & Khan, S. B. Enantioselective Separation and Detection of D-Phenylalanine Based on Newly Developed Chiral Ionic Liquid Immobilized Silica Gel Surface. *Int. J. Electrochem. Sci.* **9**, 7948–7964 (2014).
 149. Wood, N. & Stephens, G. Accelerating the discovery of biocompatible ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 1670–1674 (2010).
 150. Ventura, S. P. M. *et al.* Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem. Rev.* **117**, 6984–7052 (2017).
 151. Castro, L. S., Pereira, P., Passarinha, L. A., Freire, M. G. & Pedro, A. Q. Enhanced performance of polymer-polymer aqueous two-phase systems using ionic liquids as adjuvants towards the purification of recombinant proteins. *Sep. Purif. Technol.* **248**, 1–10 (2020).
 152. Wang, Z., Zhu, Y., Chen, H., Wu, H. & Ye, C. Fabrication of three functionalized silica adsorbents: Impact of co-immobilization of imidazole, phenyl and long-chain alkyl groups on bisphenol A adsorption from high salt aqueous solutions. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **86**, 120–132 (2018).
 153. Menéndez, J. A., Illán-Gómez, M. J., y León, C. A. L. & Radovic, L. R. On the difference between the isoelectric point and the point of zero charge of carbons.

- Carbon N. Y.* **33**, 1655–1657 (1995).
154. Tong, Y., McNamara, P. J. & Mayer, B. K. Adsorption of organic micropollutants onto biochar: A review of relevant kinetics, mechanisms and equilibrium. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **5**, 821–838 (2019).
 155. Zhang, W., Feng, X., Alula, Y. & Yao, S. Bionic multi-tentacled ionic liquid-modified silica gel for adsorption and separation of polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chem.* 637–648 (2017).
 156. Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O. & Herwig, C. Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 1143–1153 (2019).
 157. Pedro, A. Q., Pereira, P., Bonifácio, M. J., Queiroz, J. A. & Passarinha, L. A. Purification of Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase by Arginine-Affinity Chromatography. *Chromatographia* **78**, 1339–1348 (2015).
 158. Pereira, P. *et al.* Purification of pre-miR-29 by arginine-affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **951–952**, 16–23 (2014).
 159. Reijenga, J., van Hoof, A., van Loon, A. & Teunissen, B. Development of methods for the determination of pKa values. *Anal. Chem. Insights* **8**, 53–71 (2013).

6. Anexos

Tabela S1- Valores tabelados da densidade, massa molar e percentagem massa/massa de cada SIL sintetizado.

SILs	Densidade (g/mL)	M (g/mol)	% (w/w)
[Sil][C ₃ C ₁ Im]Cl	1,030	83,10	0,99
[Sil][N ₃₁₁₄]Cl	0,721	101,19	0,99
[Sil][N ₃₁₁₆]Cl	0,744	129,24	0,98
[Sil][N ₃₁₁₈]Cl	0,77	157,30	0,95
[Sil][N ₃₂₂₂]Cl	0,726	101,19	0,99
[Sil][N ₃₄₄₄]Cl	0,778	185,35	0,99
[Sil][N ₃₆₆₆]Cl	0,794	269,51	0,96
[Sil][N ₃₈₈₈]Cl	0,811	353,67	0,98

Tabela S2- Valores de absorvância obtidos a 280 nm, após um ensaio em batch com o material [Sil][C₃C₁Im]Cl, utilizando um gradiente ascendente de NaCl dissolvido em solução tampão Tris 10 mM pH 8 (Tris 10 mM pH 8; 0,4 e 1,5 M de NaCl).

Volume Total (μ L)	Concentração de NaCl (M) em Tris 10 mM pH 8	Absorvância 280 nm
500	apenas solução tampão	0,103
1000	apenas solução tampão	0,031
1000	apenas solução tampão	0,014
1000	0,4	0,363
1000	0,4	0,293
1000	0,4	0,196
1000	1,5	2,481
1000	1,5	0,721
1000	1,5	0,205

Tabela S3- Valores de absorvância obtidos a 280 nm, após um ensaio em batch com o material [Sil][C3C1Im]Cl, utilizando um gradiente ascendente de NaCl dissolvido em solução fosfato 200 mM pH 8 (fosfato 200 mM pH 8; 0,4 e 1,5 M de NaCl).

Volume Total (μ L)	Concentração de NaCl (M) em fosfato 200 mM pH 8	Absorvância 280 nm
500	apenas solução tampão	0,505
1000	apenas solução tampão	0,088
1000	apenas solução tampão	0,043
1000	0,4	0,168
1000	0,4	0,154
1000	0,4	0,111
1000	1,5	1,456
1000	1,5	0,361
1000	1,5	0,095

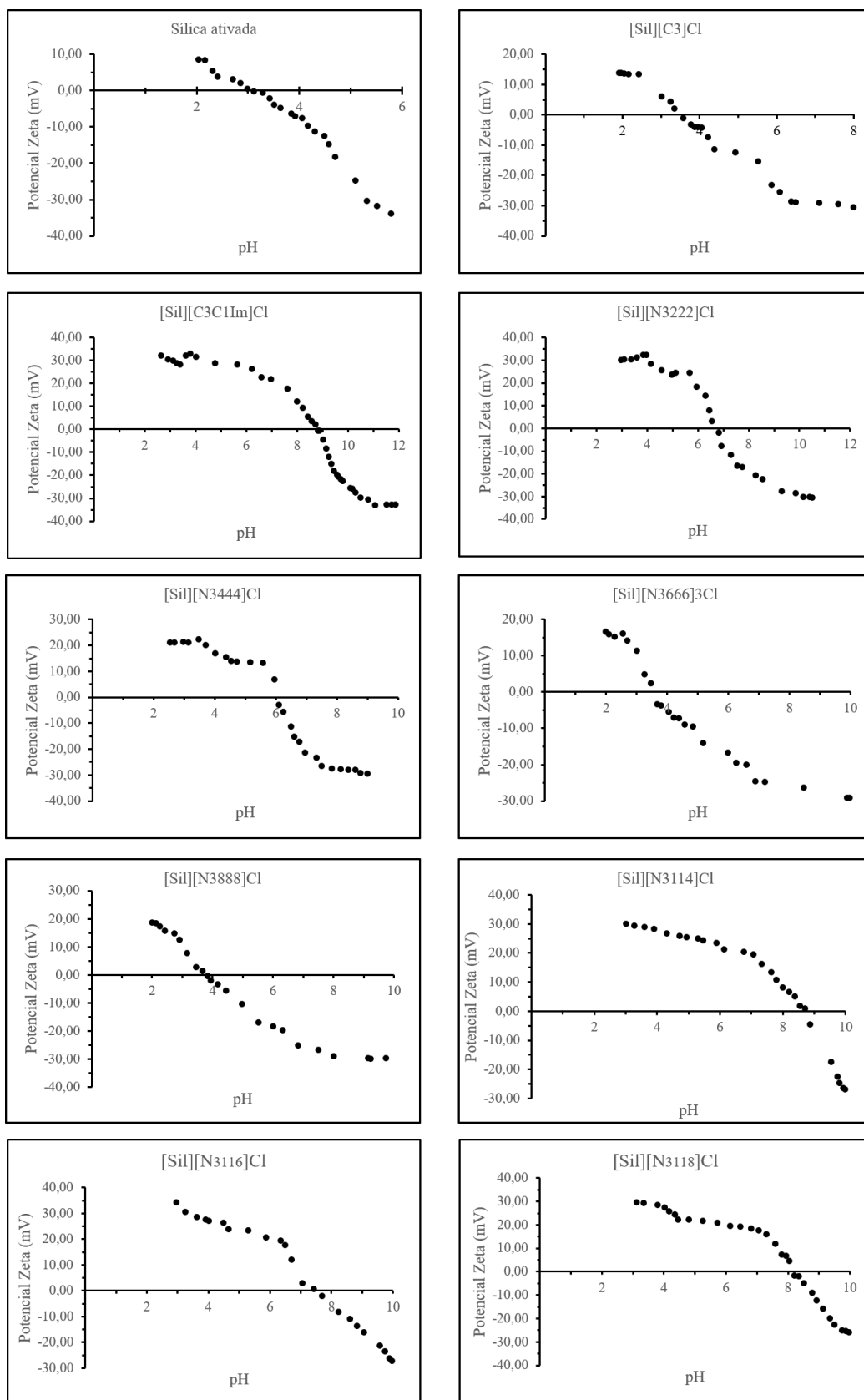


Figura S1- Potencial zeta em função do pH para a sílica ativada, material intermediário e todos os SILs sintetizados.