

## DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES PARA PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE TROCA IÔNICA<sup>1</sup>

Emilly Beatriz Braz Da Paixao<sup>1</sup>, Jonathan Barbosa Santos<sup>2</sup>, Rafael Da Costa Ilhéu Fontan<sup>3</sup>

### RESUMO

O criogel é um importante instrumento para a purificação de biocompostos por técnicas cromatográficas. Este material, obtido a partir do congelamento de uma mistura reativa, é uma alternativa para transformá-los em adsorventes capazes de promover interações iônicas, ou seja, potencial interação entre matriz-biomolécula a partir de íons contrapostos. Possuem características físico-químicas como, estrutura macroporosas, grupamentos iônicos e outros, que desempenham de modo positivo seu objetivo no processo de imobilização e purificação de proteínas e/ou enzimas devido propriedades específicas destes biocompostos. Portanto, objetivou-se nesse trabalho a produção e caracterização um adsorvente monolítico macroporoso voltado ao processo de adsorção por troca catiônica de compostos por troca catiônica. A matriz adsorvente foi feita a partir da polimerização de uma solução contendo acrilamida e bis acrilamida, catalisada por persulfato de amônio e N,N,N',N'- tetrametiletenodiamino, em condições criogênicas (24 h/-12 °C) e posterior ativação com diperiodato cuprato de potássio e enxertia do ácido acrílico. A capacidade adsortiva do criogel ativado foi de 56,99 mg/g<sub>criogel</sub>. Dessa forma é possível concluir que os criogéis poliméricos podem ser utilizados como colunas cromatográficas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Adsorção, Criogel, Catiônico, Polimerização

---

<sup>1</sup> Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

## **TITLE:** PURIFICATION OF ENZYMES BY ION EXCHANGE

### **ABSTRACT**

Cryogel is an important instrument for the purification of biocompounds by chromatographic techniques. This material, obtained from freezing a reactive mixture, is an alternative to transforming them into adsorbents capable of promoting ionic interactions, that is, potential interaction between matrix-biomolecule based on opposing ions. They have physical-chemical characteristics such as macroporous structure, ionic groups and others, which positively perform their objective in the process of immobilization and purification of proteins and/or enzymes due to specific properties of these biocompounds. Therefore, the objective of this work was to produce and characterize a macroporous monolithic adsorbent aimed at the cation exchange adsorption process of cation exchange compounds. The adsorbent matrix was made from the polymerization of a solution containing acrylamide and bis acrylamide, catalyzed by ammonium persulfate and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, under cryogenic conditions (24 h/-12 °C) and later activation with potassium cuprate diperiodate and acrylic acid grafting. The adsorptive capacity of the activated cryogel was 56.99 mg/g cryogel. Therefore, it is possible to conclude that polymeric cryogels can be used as chromatographic columns.

**KEYWORDS:** Adsorption, Cryogel, Cationic, Polymerization.

### **INTRODUÇÃO**

As técnicas cromatográficas estão presentes e se destacam em processos de purificação de proteínas para aplicações farmacêuticas, médicas e na área de alimentos devido sua eficiência. O desenvolvimento de novas matrizes cromatográficas para essa finalidade é constante e a produção de monólitos macroporosos poliméricos por criogeificação mostra-se uma alternativa por sua versatilidade e custo reduzido comparado às matrizes usuais (Gonçalves et al., 2017; Fontan et al., 2018; Mól et al., 2019).

Dentre os adsorventes monolíticos utilizados, encontram-se os criogéis, que se destacam por apresentar uma estrutura única e flexível, assemelhando-se a uma

esponja em condições operacionais. Os criogéis monolíticos poliméricos são matrizes cromatográficas que possuem poros amplos e interconectados, formando-se quando são submetidos a processos de criogelificação a baixas temperaturas. (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; GONÇALVES et al., 2017; PRIVAR et al., 2018).

Dentre as inúmeras proteases extraídas de fontes naturais já identificadas, está a papaína, obtida do mamão e pertencente à classe das cisteíno-proteases. A papaína (EC 3.4.22.2) é uma enzima que é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, têxteis, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes (Alpay et al., 2015). Portanto, a extração e purificação desta enzima assumem uma grande importância devido à sua ampla aplicabilidade. Estratégias alternativas incluem a utilização de diversas técnicas cromatográficas, tais como cromatografia de troca iônica, cromatografia covalente e cromatografia de afinidade. (Yuhai et al., 2014).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Síntese dos criogéis poliméricos**

Para a síntese dos criogéis foi utilizada metodologia adaptada de YAO et al., (2006). Uma solução 100 mL contendo 7% de monômeros foi preparada contendo AAm (5,8 g), BAAm (1,2 g), APS (140 µL, 0,5 g/mL) e TEMED (91 µL). A solução foi colocada em seringas plásticas de 10 mL, seladas e colocadas em banho ultra termostático por 24 h à -12 °C. Posteriormente os criogéis foram deixados em temperatura de refrigeração durante 4 horas, logo após secos em estufa a 60 °C por 7 dias.

### **Funcionalização dos Criogéis por troca catiônica**

Para funcionalização dos criogéis foi preparada uma solução de Diperiodato Cuprato de Potássio  $K_5[Cu(HIO_6)_2]$  0,0562 mol/L e misturada a uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) em uma proporção de uma 3:1 respectivamente, aquecido até 45 °C. Após isso, os criogéis foram mantidos em contato com a solução previamente preparada por 90 min a 45 °C. Posteriormente os criogéis foram mantidos em contato com uma solução de ácido acrílico 2 mol/L a 45 °C por 120 min sob agitação orbital. Os criogéis foram lavados e mantidos em contato com uma solução

de ácido clorídrico 0,1 mol/L por 30 min. Finalmente os criogéis foram lavados, secos e armazenados para posterior uso.

### **Análise de ponto de carga zero (PCZ)**

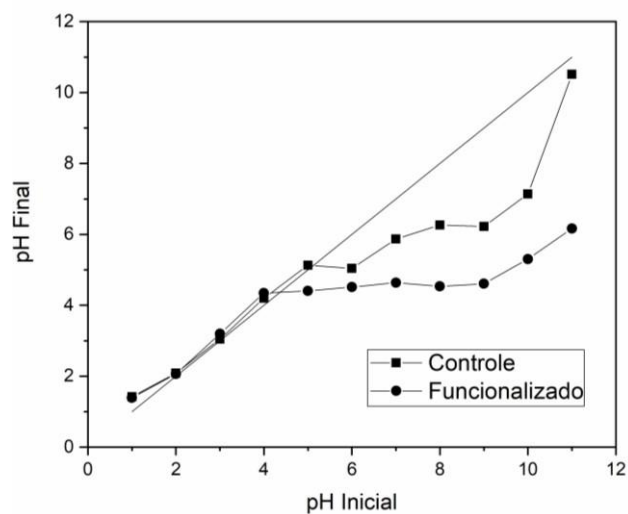
A análise do ponto de carga zero seguiu a metodologia descrita por MÓL et al., (2019). O procedimento consistiu em condicionar 50 mg dos criogéis, em contato com 50 mL de soluções de cloreto de sódio (0,1 mol/L) em diferentes valores de pH (1-11) durante 24 h. Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus o pH inicial.

### **Ensaio Adsorptivos**

Os ensaios adsorptivos foram realizados em pH 7,0 em triplicata. Em tubos Falcon de 15 mL, foi adicionado cerca de 50 mg de criogel e 5 mL da solução de papaína (5 mg/mL). Os criogéis imersos na solução enzimática foram levados à estufa BOD a temperatura de 25 °C, sob agitação orbital de 20 rpm por 4 h. Os sobrenadantes foram coletados para a quantificação da concentração de proteína por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, seguindo-se a metodologia descrita por Bradford (1976).

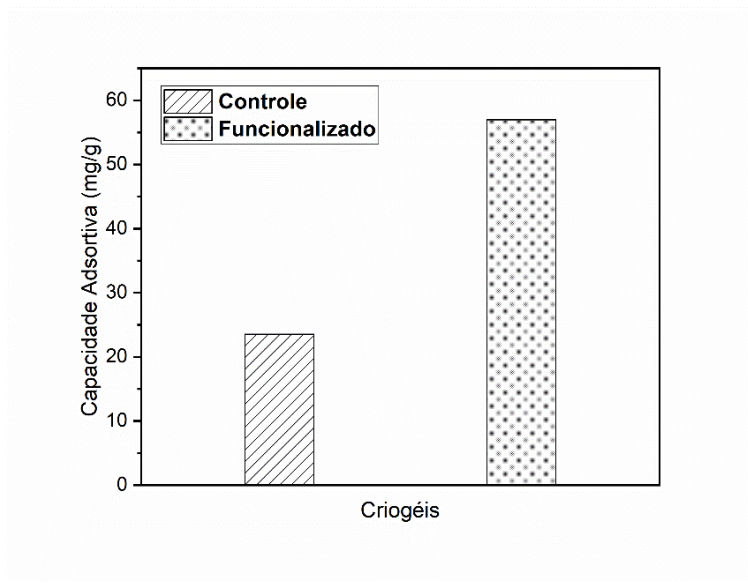
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O ponto de carga zero foi realizado com o criogel ativado e o funcionalizado foi realizado através da plotagem do gráfico por meio dos dados obtidos. O criogel funcionalizado apresentou um PCZ de 4.35 com um intervalo de tamponamento de 4 a 9. A característica cationica do suporte produzido foi obtida pela funcionalização utilizando ácido acrílico, conhecido como forte trocador cationico indicando uma faixa significativa para processos adsorptivos.



**FIGURA 1.** Análise de ponto de carga zero

Os resultados do teste da capacidade adsortiva com a papáia apresentados na Figura 2. Foi possível se observar um aumento da capacidade adsortiva do criogel controle para o funcionalizado, sendo de 23,52 mg/g para 56,99 mg/g respectivamente. O incremento observado na capacidade adsortiva tem relação ao processo de ativação empregado, neste caso a incorporação do ácido acrílico (troca de cargas positivas) disponibilizou cargas negativas à superfície do material produzido. Dessa forma, o alto ponto isoelétrico da papáia, em torno de 9, com grande presença de cargas positivas foi ideal para que o mecanismo de interação por troca iônica fosse efetivo.



**Figura 2.** Capacidade adsorptiva das matrizes produzidas.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o criogel produzido obteve valores de capacidade adsorptivas satisfatório, mais estudos são necessários para aperfeiçoar seu uso, mas os resultados encontrados sugerem que tal matriz é promissora para ser utilizada em processos de purificação de proteínas.

## CONSIDERAÇÕES

Agradeço ao órgão Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- Fapesb pelo apoio financeiro e a Universidade Estadual Do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo suporte para a condução do estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 27, p. 248-254, 1976

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v. 1357, p. 24-35, 2014.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN, R. D. C. I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 1068, p. 71-77, 2017.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, C. M. S., BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B*, v. 1033, p. 406-412, 2016

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor-made anionic cryogel. *Process Biochemistry*. v, 82, p. 75-83, 2019.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous super macroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1109, p. 103-110, 2006b.