

DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTE PARA PURIFICAÇÃO DE LECTINAS POR AFINIDADE COM AÇÚCAR

Enya Macedo Alves de Almeida¹, Rafael da Costa Ilhéu Fontan ²

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam aos açúcares. Diante dessa habilidade, a técnica mais utilizada para purificação dessa proteína é a cromatografia de afinidade. Uma das alternativas para purificação da mesma é por meio da adsorção utilizando o criogel. Este adsorvente é constituído por 7% de monômeros, que na presença de catalisadores e sob condições criogênicas apresentam uma estrutura macroporosa, consistente, cilíndrica e esponjosa quando umedecida. Diante disso, objetivou-se nesse trabalho purificar lectinas do extrato proteico de feijão, baseando-se na afinidade por glicose, utilizando-se matrizes poliméricas inovadoras para tal. As matrizes foram funcionalizadas por meio dos princípios da reação de Maillard para imobilização de glicose à sua superfície. Para caracterizar os criogéis, foram realizadas análises para capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), e porosidade (ϕ). Os criogéis funcionalizados em pH variando de 6 a 8 em 20 min ou 60 min foram mantidos em contato com o extrato de feijão para verificação da capacidade adsorptiva da lectina na matriz. Tais resultados foram comparados com o controle. Os tratamentos de pH 6 se destacaram neste trabalho, apresentando alta capacidade adsorptiva. Em 20 min obteve-se 234,26 mg_{proteína/g_{criogel}} e em 60 min 304,29 mg_{proteína/g_{criogel}}. Ainda, o pH 8 em 60 min adsorveu 116,25 mg_{proteína/g_{criogel}}. Na caracterização, a capacidade de inchamento (S), Grau de Expansão (ED), fração de macroporos e porosidade total diminuíram após a funcionalização. Em contrapartida, as frações de polímero seco, de água ligada e de meso e microporos e aumentaram seus valores após as matrizes serem funcionalizadas.

Palavras-chave: criogel, cromatografia de afinidade, lectinas, reação de Maillard.

DEVELOPMENT OF ADSORBENT FOR PURIFICATION OF LECTINS BY AFFINITY WITH SUGAR

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind to sugars. Given this ability, the most used technique for purifying this protein is affinity chromatography. One of the alternatives for purifying it is through adsorption using cryogel. This adsorbent consists of 7% monomers, which in the presence of catalysts and under cryogenic conditions present a macroporous, consistent, cylindrical and spongy structure when moistened. Therefore, the objective of this work was to purify lectins from bean protein extract, based on their affinity for glucose, using innovative polymeric matrices for this purpose. The matrices were functionalized using the principles of the Maillard reaction to immobilize glucose on their surface. To characterize the cryogels, analyzes were carried out for swelling capacity (S), degree of expansion (ED), and porosity (ϕ). The cryogels functionalized at pH ranging from 6 to 8 in 20 min or 60 min were kept in contact with the bean extract to verify the adsorption capacity of the lectin in the matrix. These results were compared with the control. The pH 6 treatments stood out in this work, presenting high adsorption capacity. In 20 min, 234,26 mg_{proteína/g_{criogel}} were obtained and in 60 min, 304,29 mg_{proteína/g_{criogel}}. Furthermore, pH 8 in 60 min adsorbed 116,25 mg_{proteína/g_{criogel}}. In the characterization, the swelling capacity (S), Expansion Degree (ED), macropore fraction

Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (Pibic/CNPq)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos - UESB macedoenya@gmail.com

²Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB rafaelfontan@yahoo.com.br

and total porosity decreased after functionalization. In contrast, the fractions of dry polymer, bound water and meso- and micropores increased their values after the matrices were functionalized.

KEYWORDS: cryogel, affinity chromatography, lectins, Maillard reaction.

INTRODUÇÃO

É crescente a importância da purificação de biocompostos, utilizados com efetividade pelas indústrias bioquímicas, farmacêuticas e mais recentemente as indústrias alimentícias. O uso de criogéis é uma interessante alternativa nesse segmento, com potencial escalonamento dos processos de isolamento de proteínas.

Criogéis são materiais obtidos de precursores poliméricos polimerizados em condições de congelamento. Entre os possíveis monômeros empregados na síntese dos criogéis está a poli(acrilamida), obtida da polimerização de acrilamida (Aam), principal monômero da estrutura, responsável pela linearidade da cadeia e a N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAam) que promove o enlace das cadeias de Aam, formando as ligações cruzadas necessárias para a formação do gel. Na formulação, há adição dos catalisadores APS e TEMED que fornecem os radicais livres necessários para iniciar e acelerar a reação de polimerização (COSTA et. al. 2014).

Na cromatografia, durante a passagem da fase móvel (extrato protéico) pela fase estacionária (matriz monolítica polimérica), os componentes da mistura são distribuídos de modo que deles são seletivamente retidos na fase estacionária por meio da afinidade, enquanto outros migram de forma diferenciada. Para a separação de uma proteína em particular por afinidade, é introduzida uma substância que se liga à fase estacionária removendo-a da coluna. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um novo adsorvente de purificação de lectinas por afinidade com glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Síntese das matrizes monolíticas poliméricas

Adaptou-se a metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006). Testou-se uma formulação com 7% de monômeros, com proporção de 5,80g de Aam e 1,20g de BAam, adicionadas de 140 µL de APS 0,5g/mL e 91 µL de TEMED. Esta foi vertida em seringas plásticas e mantida em banho termostático a -12°C por 24 h. Após, foi armazenada a 4°C por 4 h e posteriormente levada à estufa a 60°C até a sua secagem.

Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (Pibic/CNPq)

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos - UESB macedoenya@gmail.com

²Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB rafaelfontan@yahoo.com.br

2. Funcionalização das matrizes monolíticas poliméricas

Os tratamentos foram obtidos da combinação do tempo de reação (20 ou 60 min) e pH do meio (6, 7 ou 8), utilizando os princípios da Reação de Maillard (RM). Em triplicata, adicionou-se aos erlenmeyers 100 mL de solução com 0,1M de glicose e 50%*m/v* de sacarose dissolvidas em Tampão Fosfato de Sódio (TFS) 0,02 M no pH desejado, e 2 criogéis. Os erlenmeyers tampados foram levados à autoclave a 121°C em 20 e 60 min. Posteriormente foram enxaguados com água destilada e secos em estufa à 60°C.

3. Caracterização dos adsorventes

Realizou-se as análises seguindo as metodologias propostas por Savina et al. (2011) para capacidade de inchamento (S), Fontan et al. (2013) e Gonçalves et al. (2016) para o grau de expansão (ED), e Plieva et al. (2004) para porosidade (ϕ).

4. Obtenção do extrato de feijão

Adicionou-se 30 g do feijão triturado e peneirado (48 mesh) em 300 mL de solução TFS 0,02 M em pH 7,2, adicionado de 0,9 %*m/v* de NaCl. A solução foi mantida em um agitador magnético por 2 h e centrifugada a 5000g por 10 min. O sobrenadante foi coletado, filtrado e armazenado sob refrigeração.

5. Ensaio adsorativo de proteína

Em triplicata, adicionou-se a tubos de 15mL 100 mg de criogel funcionalizado e 10 mL de extrato, mantidos em agitação a 20 rpm por 4 h. Coletou-se 100 μ L do sobrenadante para quantificação da concentração de proteína, seguindo a metodologia de Bradford (1976), sendo necessária a diluição de 1:20.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Síntese das matrizes monolíticas poliméricas

Os criogeis apresentaram estruturas consistentes, cilíndricas, esponjosas quando umedecidas, lisas e porosas, conforme relatado por diversos autores (ARVIDSSON et al., 2002).

2. Funcionalização das matrizes monolíticas poliméricas

O pH na faixa de alcalinidade e o maior tempo de contato com o açúcar em elevada temperatura são condições favoráveis para promover a RM. O

escurecimento do pH 7; 60 min e pH 8; 60 min é decorrente de reações químicas durante a polimerização dos açúcares, que formam melanoidinas (BASTOS et al., 2011; BRIÃO et al., 2011; FENNEMA, 2010).

3. Caracterização das matrizes monolíticas poliméricas

A Tabela 1 apresenta dados de caracterização dos criogéis controle e funcionalizados.

TABELA 1: Caracterização das matrizes controle e funcionalizadas.

Parâmetro	Controle	pH 6; 20 min	pH 6; 60 min	pH 7; 20 min	pH 7; 60 min	pH 8; 20 min	pH 8; 60 min
Capacidade de inchamento (S) (kg/kg)	15,087 ± 0,492	12,023 ± 1,058	11,985 ± 1,045	11,349 ± 1,767	12,471 ± 1,026	11,736 ± 0,925	13,115 ± 0,670
Grau de expansão (ED) (L/kg)	18,393 ± 1,481	15,932 ± 0,606	15,548 ± 3,957	17,184 ± 2,094	15,118 ± 1,429	18,632 ± 4,565	18,117 ± 2,443
Fração do Polímero seco (ϕ_p)	0,062 ± 0,002	0,077 ± 0,007	0,077 ± 0,006	0,082 ± 0,013	0,075 ± 0,006	0,079 ± 0,006	0,071 ± 0,003
Fração de Água Ligada (Φ_{wB})	0,018 ± 0,001	0,023 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,021 ± 0,003	0,021 ± 0,001	0,023 ± 0,002	0,022 ± 0,002
Fração de Mesos e Microporos (ϕ_m)	0,228 ± 0,030	0,297 ± 0,048	0,271 ± 0,046	0,262 ± 0,028	0,351 ± 0,050	0,308 ± 0,030	0,307 ± 0,023
Fração de Macroporos (Φ_M)	0,691 ± 0,029	0,602 ± 0,051	0,629 ± 0,044	0,635 ± 0,041	0,553 ± 0,050	0,590 ± 0,045	0,600 ± 0,028
Porosidade Total (ϕ_{Total})	0,920 ± 0,002	0,899 ± 0,009	0,900 ± 0,008	0,897 ± 0,016	0,905 ± 0,007	0,898 ± 0,008	0,907 ± 0,005

Em relação ao controle, os funcionalizados apresentaram menor Capacidade de Inchamento (S). O Grau de Expansão (ED) também diminuiu, uma vez que a capacidade de reter água e ocupar maior volume quando hidratado foi diminuída. Houve um aumento na fração de polímero seco (ϕ_p), o que também ocorreu para fração de água ligada, já que a açúcar incorporado à matriz interage com a água por ligação de hidrogênio mais efetivamente em relação ao controle, que não contém açúcares disponíveis para interações, permitindo que o funcionalizado absorva maior quantidade de água.

Enquanto as frações de meso e microporos (ϕ_m) aumentam, a de macroporos diminui, pois na funcionalização os espaços macroporosos são ocupados pelos açúcares imobilizados, reduzindo o espaço vazio no poro, sendo eles quantificados como meso/microporos. A porosidade total diminuiu em relação ao controle, pois parte dos espaços vazios foram ocupados pelos açúcares imobilizados.

4. Adsorção das matrizes monolíticas poliméricas

A Tabela 2 apresenta a capacidade adsorptiva (q) das matrizes funcionalizadas, sob diferentes condições de pH e tempo de aquecimento.

TABELA 2: Capacidade adsorptiva dos diferentes tratamentos nos criogéis.

Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (Pibic/CNPq)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos - UESB macedoenya@gmail.com

²Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB rafaelfontan@yahoo.com.br

Tratamento	q (mg _{proteína} /g _{criogel})
pH 6; 20 min	234,259
pH 6; 60 min	304,286
pH 7; 20 min	64,551
pH 7; 60 min	0,377
pH 8; 20 min	0,000
pH 8; 60 min	116,245

Os tratamentos em pH 6 apresentaram alta capacidade adsortiva, uma vez que o pH na faixa de acidez retarda o processo da RM. O tempo de 20 min foi suficiente para ocorrer as primeiras etapas da RM, sendo ela interrompida antes da formação de polímeros que formam melanoidinas. A não formação de polímeros, que por sua vez apresentam reduzido número de sítios ativos de interação, permite a imobilização de moléculas menores de açúcares, formando muitos sítios ativos na matriz e o aumento do seu poder de interação com o açúcar. O prolongamento a reação em 60 min potencializou a imobilização de açúcares à matriz, que foi capaz de adsorver maior quantidade proteína do extrato (BASTOS et al., 2011; FENNEMA, 2010).

O pH 7 não favoreceu a imobilização dos açúcares à matriz. No pH 8 em 60 min houve adsorção de proteína. O pH na faixa de alcalinidade, combinado a um maior tempo de reação permitiu a formação de polímeros maiores e suficientemente estáveis, contendo extremidades disponíveis para interagir com a proteína e servindo como braços espaçadores, facilitando a interação do açúcar com a proteína. O tempo de 20 min não foi suficiente para formar polímeros estáveis, não havendo meios da proteína se ligar à matriz (FENNEMA, 2010).

CONCLUSÃO

O trabalho de Iniciação Científica PIBIC/CNPq foi concluído conforme previsto. Foi possível sintetizar e posteriormente funcionalizar adsorventes monolíticos poliméricos macroporosos por meio de uma técnica inovadora, utilizando a imobilização de açúcares por reação de Maillard, para utilizá-los em processos de purificação de lecitinas por afinidade com açúcar. Verificou-se a eficiência da coluna funcionalizada por meio da alta capacidade adsortiva para alguns tratamentos nas matrizes. Os tratamentos que apresentaram coloração mais escuras não tiveram alta capacidade adsortiva, já que a formação de melanoidinas diminui a quantidade de açúcares disponíveis para serem adsorvidos na etapa de adsorção na matriz polimérica. Em contrapartida, os tratamentos que não apresentaram elevado escurecimento foram os que melhor adsorveram. A capacidade de inchamento (S), Grau de Expansão (ED),

Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (Pibic/CNPq)

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos - UESB macedoenya@gmail.com

²Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan - UESB rafaelfontan@yahoo.com.br

fração de macroporos e porosidade total diminuiram após a funcionalização. Em contrapartida, as frações de polímero seco, de água ligada e de meso e microporos e aumentaram seus valores após as matrizes serem funcionalizadas. O estudo foi de grande importância para o meu desenvolvimento profissional dentro da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à agência de fomento CNPq pela bolsa de iniciação científica e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia ao apoio para realização das atividades.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I. et al. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 15710-15713, 2015.
2. BASTOS, D. H. M. et al. Produtos da reação de Maillard em alimentos industrializados. Nutrire, v. 36, n. 3, p. 63-78, 2011.
3. 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.
4. BRIÃO, V. B. et al. Cinética do escurecimento não-enzimático com soluções modelo de açúcares e aminoácidos em pH neutro e ácido. Acta Scientiarum Technology, v. 33, n. 1, p.87-93, 2011.
5. COSTA, H.B. FERNANDES, P.M.B. ROMÃO, W. VENTURA, J.A. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. Industrial Crops and Products, 59, 2014, 163-168.
6. FENNEMA, O. R.; SRINIVASAN D.; KIRK, L. P. Química de Alimentos de Fennema. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.
7. FONTAN, R. C. I. Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.

8. 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.
9. PLIEVA F. M., ANDERSSON J., GALAEV I. Y., MATTIASSON B., Characterization of polyacrylamide based monolit CIH columns. *Journal of Separation Science*, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004.
10. SAVINA I. N, GUN'KO V. M, TUROV V.V, DAINIAK M, PHILLIPS GJ, GALAEV I. Y., Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo- hydrogels. *Soft Matter*, v. 7, n. 42, p.76-83, 2011.
11. YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. *Chemical engineering science*, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006.