

POTENCIAL DE USO DE MATRIZES MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS MODIFICADAS NA ÁREA DE ALIMENTOS: PRODUÇÃO DE BIOSSENSORES, IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE¹.

Autores: Maria Julia da Silva CAFEZEIRO²; Rafael Da Costa Ilhéu FONTAN³

RESUMO

Monólitos são blocos constantes, com uma configuração porosa e sólida, eles são substanciados a partir dos monômeros, materiais inorgânicos ou precursores poliméricos. Sintetizados em temperaturas muito baixas, ocorrendo o congelamento do solvente, formando-os cristais de gelo, e conseqüentemente, poros, transformando-se em estruturas conhecidas como criogéis. Os criogéis foram elaborados com monômeros de Aam, BAam e com os catalisadores TEMED, APS. Em seringas de 5 mL, foram levadas para o banho termostatizado com álcool à temperatura de -12 °C por 24 horas. Descongelados em geladeira a 4 °C e desidratada na estufa a 60°C. Para a funcionalização foi utilizado uma solução 0,1M de galactose em tampão fostato de sódio 0,1M, e autoclavado a 121°C. Na caracterização foi determinado a S, Ed, φ_o , φ_{wb} , φ_m , φ_M e φ_M . Os criogéis foram avaliados quanto à efetividade de uso em processos de purificação de lectinas a partir de extratos de feijão fradinho, utilizado a reação de Maillard. Na quantificação de proteínas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Na etapa de eluição, o pH 6 alcançou 1,543735 mg.g de proteína recuperada.

Palavras-chaves: Acrilamida; Bis-acrilamida, Criogel, Lectina.

POTENTIAL USE OF MONOLITHIC POLYMER MODIFIED MATRIXES IN THE FOOD AREA: PRODUCTION OF BIOSSENSORS, IMMOBILIZATION OF ENZYMES AND PURIFICATION OF COMPOUNDS OF INTEREST¹.

ABSTRACT

Monoliths are constant blocks, with a porous and solid configuration, they are substantiated from monomers, inorganic materials or polymeric precursors. Synthesized at very low temperatures, the solvent freezes, forming ice crystals and, consequently, pores, transforming into structures known as cryogels. The cryogels were made with monomers, acrylamide (Aam), bis-acrylamide (BAam); as catalysts, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (APS). In 5 mL

¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

syringes, they were taken to a thermostated bath with alcohol at a temperature of -12 °C for 24 hours. Thawed in a refrigerator at 4°C and dehydrated in an oven at 60°C. For functionalization, a 0.1M galactose solution in 0.1M sodium phosphate buffer was used, and autoclaved at 121°C. In the characterization, S , E_d , φ_o , φ_{wb} , φ_m , φ_M e φ_M . were determined. The cryogels were evaluated for their effectiveness in lectin purification processes from black-eyed pea extracts, using the Maillard reaction. In protein quantification there was no significant difference between treatments. In the elution step, pH 6 reached 1.543735 mg.g of recovered protein.

Keywords: Acrylamide; Bis-acrylamide, Cryogel, Lectin.

INTRODUÇÃO

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que reconhecem e se associam a carboidratos ou glicoconjugados de forma reversível, com alta afinidade e especificidade (SUZUKY et al., 2015; HE et al., 2015). Devido a tal habilidade essas biomoléculas apresentam diversas atividades biológicas, como atividade mitogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, entre outras (VASCONCELOS et al., 2015). Devido às excelentes propriedades oferecidas pelas lectinas, o interesse na purificação das mesmas vem apresentando grande potencial. Uma alternativa viável a ser utilizada no processo de purificação das lectinas é a utilização de técnicas cromatográficas.

A cromatografia de afinidade é um método eficiente de isolamento e purificação, pois se baseia na especificidade biológica da proteína, tal como a afinidade de uma enzima a um substrato (Nelson, 2008).

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado e foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação (LOZINSKY, V. et al., 2001). Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 100 μm e se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento de fluidos e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho. Uma alternativa viável é transformar os criogéis poliméricos em adsorventes de afinidade específica, por meio da enxertia do mesmo com grupos ligantes de interesse.

¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

O objetivo do trabalho é produzir criogéis de poliacrilamida funcionalizados com a galactose, avaliando grupos funcionais inovadores para sua futura aplicação na purificação de proteínas por afinidade, em especial, lectinas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese dos Criogéis – Adaptou-se a metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). A formulação dos criogéis foram efetuadas com 7% de monômeros contendo reagentes como acrilamida (Aam), bis-acrilamida (BAam); TEMED e persulfato de amônio (APS) 0,5 g/mL. A solução foi colocada em seringas de 5 mL, seguindo para o banho termostatizado com álcool à 12°C por 24 horas. Foram guardadas na geladeira por 4 horas a 4°C, seguindo para estufa à 60°C por cerca de 10 dias.

Funcionalização - Foram preparados 3 litros de solução 0,1M de galactose em tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 6,7 e 8. Foram para a autoclave a 121°C. Os criogéis foram enxaguados com 100 ml de água destilada, por 20 minutos, trocando a água duas vezes. Após os enxagues, foram levados para a estufa a 60°C.

Caracterização da coluna- Para avaliar as características do criogel foram observados alguns parâmetros como: capacidade de inchamento S (kg.kg^{-1}), grau de expansão ED (L.kg^{-1}), porosidade e suas frações, seguindo a metodologia de Plieva et al. (2004a e 2004b).

Todas as análises foram conduzidas de maneira aleatorizada, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância e Teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

Teses de Adsorção - A solução de proteína foi feita com feijão fradinho triturado no liquidificador. Em tubos de ensaio colocou-se o extrato do feijão e criogel, girando por 4 horas. Os criogéis foram lavados, a água foi descartada e adicionada 10 ml de solução de galactose 0,5 M, girando-os por 2 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Os valores obtidos para a S , ED , φ_o , φ_{wb} , φ_m , φ_M , φ_{Total} dos criogéis avaliados são apresentados na Tabela 1. De acordo com os resultados o criogel controle diferenciou dos demais quanto as características de capacidade de inchamento, ED e fração de polímero seco nos tratamento de pH 6, pH 7 e pH 8 nos tempos de 20 e 60 minutos se diferem dos demais. Fração de água ligada não houve diferença significativa.

TABELA 1: Parâmetros físicos: Distribuição da síntese, de fração de poros e porosidade total.

Parâmetros	S	ED	φ_o	φ_{wb}	φ_m	φ_M	φ_{Total}
Controle	15,087 ^a	18,393 ^a	0,062 ^a	0,018 ^a	0,228 ^c	0,691 ^c	0,920 ^b
pH 6 – 20 min	12,080 ^b	14,435 ^b	0,078 ^b	0,021 ^a	0,357 ^b	0,544 ^b	0,901 ^a
pH 7 – 20 min	14,107 ^{ab}	16,896 ^{ab}	0,067 ^{ab}	0,019 ^a	0,332 ^b	0,582 ^{ab}	0,915 ^{ab}
pH 8 – 20 min	13,877 ^{ab}	16,111 ^{ab}	0,068 ^{ab}	0,018 ^a	0,248 ^{ac}	0,666 ^{ac}	0,914 ^{ab}
pH 6 – 60 min	12,173 ^b	15,523 ^b	0,077 ^b	0,020 ^a	0,303 ^{abc}	0,600 ^{ab}	0,903 ^{ab}
pH 7 – 60 min	12,758 ^{ab}	15,005 ^b	0,074 ^{ab}	0,020 ^a	0,245 ^{ac}	0,662 ^{ac}	0,906 ^{ab}
pH 8 – 60 min	13,462 ^{ab}	15,445 ^b	0,070 ^{ab}	0,020 ^a	0,327 ^b	0,584 ^{ab}	0,910 ^{ab}

Fonte: Própria, 2023. Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. Não existe comparação entre colunas.

A Fração de Macroporos, o controle não se difere dos tratamentos pH 8-20 minutos e pH 7-60 minutos. Nota-se que os criogéis produzidos possuem em sua estrutura poros grandes, uma vez que sua fração variou entre 54 e 69%, característica desejável para o mesmo, pois são utilizados para o processo de purificação de biomoléculas que em sua maioria possuem tamanhos grandes, facilitam o escoamento de fluidos e o não entupimento das colunas devido a presença de impurezas nas amostras utilizadas (Perçin e Aksöz, 2012).

A porosidade de um criogel pode ser definida, de forma geral, como a capacidade que ele tem de armazenar fluidos em seus espaços interiores (PLIEVA et al., 2004a e 2004b). O parâmetro porosidade total, houve diferença do controle com o tratamento pH 6-20 minutos, não havendo diferença significativa nos demais. A partir das análises realizadas, verificou-se que este apresentou elevada porosidade, em torno de 90%, como foi observado na literatura por pesquisadores trabalhando com

¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

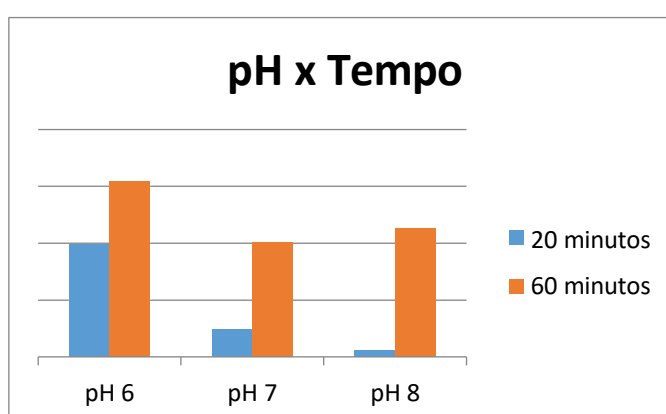
² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

criogéis obtidos com diferentes formulações (Arvidsson et al., 2002; Persson et al., 2004; Yao et al., 2006).

A figura 1 demonstra a quantidade de concentração da proteína (mg.g) recuperada na etapa de eluição, no pH 6, 7 e 8, nos tempos de 20 e 60 minutos.

Gráfico 1: Concentração da proteína recuperada (mg.g).



Fonte: Própria, 2023

Os criogéis no tempo de 60 minutos obtiveram valores com concentrações de proteínas maiores. O pH 6 alcançou 1,543735 mg.g de proteína recuperada, o melhor resultado de ativação no tempo de 60 minutos, ou seja, o pH abaixo de 7, levemente ácido, provavelmente favoreceu a reação de imobilização. No tempo de 20 minutos, o pH 8 obteve a menor concentração, 0,054374 mg.g.

CONCLUSÃO

Foram produzidos criogéis a base de acrilamida e, bis-acrilamida funcionalizados através da reação de Maillard. Este tipo de coluna pode ser utilizado para a purificação de lectinas por afinidade com açúcar. Verificou-se que a ativação dos criogéis alterou suas propriedades de hidratação, o tipo de modificação levou a diferenças significativas nos criogéis quando comparados com o controle, apresentando diferença principalmente da porosidade que é um parâmetro muito importante nos processos de cromatografia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

1. ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2002). Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, v.977, 27-38.
2. HE, S.; SHI, S.; WALID, E.; ZHANG, H.; MA, Y.; XUE, S. J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 166, p. 93-100, 2015.
3. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5ª ed., W. H. Freeman: New York, 2008.
4. Plieva, F. M.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2004a). *Journal of Separation Science*, v.27, 828-836. 48
5. Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Deraz, S.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (2004b). *Journal of Chromatography B*, v.807, 129-137.
6. Perçin, I.; Aksöz, E. (2012). Hacettepe Journal of Biology & Chemistry, v.40, 303-308.
7. RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based biosensor: As powerful tools in bioanalytical applications. *Biotechnology*, v. 9, n. 4, p. 428-443, 2010.
8. SUZUKI, T.; ABE, T.; UMEHARA, K.; CHOI, J.-H.; HIRAI, H.; DOHRA, H.; KAWAGISHI, H. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Mycoscience*, v. 56, n. 4, p. 359-363, 2015.
9. VASCONCELOS, M. A.; ALVES, A. C.; CARNEIRO, R. F. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 600-607, 2015.
10. 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, 2006a.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa.



¹ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

² Maria Julia Da Silva Cafezeiro; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

³ Rafael Da Costa Ilhéu Fontan; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB