



DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES MONOLÍTICOS POLIMÉRICOS PARA APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Emilly Beatriz Braz Da Paixao¹, Débora Lemos Da Silva², Rafael Da Costa Ilhéu Fontan³

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 macroporosa, 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. Para este trabalho, foi realizada a produção e funcionalização de trocadores iônicos supermacroporosos possuindo de grupamentos amina disponibilizados pelo aminoácido. Estes criogéis foram caracterizados e aplicados para adsorção das moléculas de proteína do soro do leite: a Albumina Soro Bovina (BSA). A capacidade adsortiva foi de $23,46 \text{ m}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{criogel}}^{-1}$. Dessa forma é possível concluir que os criogéis poliméricos podem ser utilizados como colunas de extração e purificação de biomoléculas ativas.

Palavras-chave: Adsorção; Criogel; Polimerização; Proteína.

Title: DEVELOPMENT OF POLYMERIC MONOLITHIC ADSORBENTS FOR APPLICATION IN THE PURIFICATION OF BIOCOMPOUNDS BY CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

Abstract: The cryogel is an important instrument for the purification of biocompounds by chromatographic techniques. This material, obtained from the freezing of a reactive mixture, is an alternative to transform them into adsorbents capable of promoting ionic interactions, that is, potential interaction between matrix-biomolecule from opposing ions. They have physicochemical 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 the specific properties of these biocompounds. For this work, the production and functionalization of supermacroporous ion exchangers with amine groups made available by the amino acid was carried out. These cryogels were characterized and applied for adsorption of whey protein molecules: Bovine Serum Albumin (BSA). The adsorptive capacity was $23.46 \text{ m}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}_{\text{cryogel}}^{-1}$. Thus, it is possible to conclude that polymeric cryogels can be used as columns for extraction and purification of active biomolecules.

Keywords: Adsorption; cryogel; Polymerization; Protein

¹Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Engenharia de Processos;

²Mestranda em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Engenharia de Processos;

³Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Tecnologia Rural e animal

INTRODUÇÃO: As principais proteínas presentes no soro são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, as imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase e a albumina de soro bovino (BSA). Essas proteínas apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. Ao saber que a BSA corresponde cerca de 10% das proteínas do soro do leite, estudos sobre purificação e obtenção de maior grau de pureza da mesma passam ser importante devido tal propriedade [6]

Os métodos adsorptivos são utilizados em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. Por essa razão a otimização dessas técnicas é de grande relevância, por trazer impacto direto no rendimento de tais processos e o surgimento de colunas cromatográficas ditas não convencionais é promissora [4].

Dentre as colunas cromatográficas não convencionais, os criogéis poliméricos vêm apresentando destaque. Estes possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, e essa característica traz consigo uma redução nos custos operacionais, pois elimina etapas de pré-preparo das amostras como pré-concentração, sem afetar a eficiência da purificação.[1]

Frente a isso, foi sintetizado e modificado um criogel de poli(acrilamida) para promover a adsorção da BSA via troca iônica, a partir da imobilização de aminoácidos em sua estrutura, utilizando o método do glutaraldeído para tal. [2]

MATERIAL E MÉTODOS:

Síntese dos criogéis poliméricos

Para a produção dos criogéis, foram utilizados os reagentes listados abaixo, que possuem grau de pureza analítico. Os componentes utilizados na síntese de criogéis são acrilamida (Aam), N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam), tetrametil etilendiamina (TEMED), persulfato de amônio (APS) e alil-glicidil éter (AGE). Foram usadas seringas plásticas descartáveis de 10mL. Diversas vidrarias tais como béqueres, micropipeta, provetas, balões volumétricos, balança analítica de precisão, banho ultrassônico, banho termostático, entre outros.

Imobilização do grupo funcional

Inicialmente, os criogéis são colocados em contato com 20 mL de álcool metílico por 2 horas. Posteriormente, são mantidos em contato com 20 mL de água destilada, seguido de contato com tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6 (20 mL), ambos com tempo de contato de 1 hora. Na sequência os criogéis devem ser expostos a 20mL da solução de ligante (os aminoácidos sozinhos) a 10 mg.mL^{-1} no tampão fosfato de sódio pH 6,0 durante 14 horas. Feito isso, as colunas devem ser imersas em 20 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,0 durante 1 hora e colocadas em 20 mL de solução de borohidreto de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio pH 6, por 60 minutos. A etapa de contato das colunas com a solução de borohidreto de sódio é a única realizada sem agitação e com o recipiente aberto. Posteriormente são lavados com 20 mL de água destilada, por 1 hora. Após a ativação os criogéis devem ser colocados em estufa a 60°C e após a secagem tem-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de troca iônica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criogéis sintetizados apresentaram aspectos visuais satisfatórios como estruturas consistentes, cilíndricas esponjosas quando umedecidas, lisas e porosas, conforme relatado por diversos autores e estão visualmente aptos para serem funcionalizados, caracterizados após a ativação, e posteriormente, purificados [5]. Os dados obtidos por meio da caracterização do criogel controle para serem comparados aos dados do criogel ativado estão disponíveis na Tabela 1.

O resultado demonstra que os criogéis funcionalizados com ácido aspártico tem potencial para adsorção de proteínas, obtendo um valor médio de $23,46 \text{ m}_{\text{BSA}}/\text{g}_{\text{criogel seco}}$. Mais estudos se faz necessário no intuito de aperfeiçoar as condições de adsorção, aumentar a capacidade adsortiva e conseqüentemente o grau de pureza nos processos de purificação de enzimas [7]. O valor médio obtido para a capacidade adsortiva dos criogéis funcionalizados com ácido aspártico está apresentado **Tabela 2**.

Tabela 1- Valores médios obtidos para Capacidade de Inchamento (S), Grau de expansão (ED), porosidade total e frações de poros das matrizes produzidas.

Parâmetro	Criogel Controle
S (kg/kg)	$15,46 \pm 1,54$
ED (L/kg)	$18,12 \pm 2,03$
Fração de macroporos	$0,082 \pm 0,04$
Fração de micro/mesoporos	$0,11 \pm 0,04$
Porosidade total	$0,92 \pm 0,004$

Tabela 2 – Avaliação da capacidade de adsorção do criogel funcionalizado com ácido aspártico.

Determinação	Criogel
Capacidade adsortiva ($\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{criogel seco}}$)	$23,46 \pm 0,56$

Conclusão

Foi possível a produção de criogéis poliméricos funcionalizados com ácido aspártico via método do glutaraldeído. Foi verificado também que o criogel produzido obteve valores satisfatórios para porosidade, capacidade de inchamento, e que por este fato a sua estrutura é constituída majoritariamente de macroporos. Por fim, verificou-se que foi possível a adsorção da BSA na coluna produzida. 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.

Referências Bibliográficas:

1. ANDAÇ, M.; GALAEV, I. Y.; DENZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. *Journal of Chromatography B*, v. 1021, p. 69-80, 2016.
2. ARRUA, R.D.; STRUMIA, M.C.; ALVAREZ IGARZABAL, C.I. Macroporous Monolithic
3. EL-SAYED, M. M., & CHASE, H. A. Single and two-component cation-exchange adsorption of the two pure major whey proteins. *Journal of Chromatography A*, 1216(50), 8705-871,(2009).
4. 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.
5. 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.
6. HARAGUCHI, Fabiano Kenji; ABREU, Wilson César de; PAULA, Heberth de. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de nutrição*, v. 19, p. 479-488, 2006.
7. MACHADO, A. P. F.; MINIM, L. A.; FONTAN, R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cationexchange supermacroporous monolithic column. *Fluid Phase Equilibria*. v. 40, p. 64-69, 2015.