

PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE EXTRATOS VEGETAIS POR AFINIDADE IMAC

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

RESUMO

Criogeis são obtidos de precursores polimerizados em condições de congelamento. Realizou-se ensaios de produção do criogel de poliacrilamida para serem utilizados em processos de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando Cu⁺⁺ e Zu⁺⁺ e analisar o efeito de nas características dos adsorventes como capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade (ϕ) e frações de macro, micro e mesoporos para criogéis controle e funcionalizados. Realizou-se teste de adsorção com lisozima e BSA para posteriormente explorar a potencial purificação da matriz em biocompostos. Em relação aos ativados com Cu⁺⁺ e Zu⁺⁺, o criogel apresentou elevada capacidade de interação com água e isso se refletiu na grande quantidade de água retida em relação à massa de polímero do criogel. Os valores de S estão dentro das faixas reportadas para criogeis de poliacrilamida em diversos trabalhos da literatura. A fração de macroporos foi dominante no tipo de poros observado nos criogeis. Já a porosidade total foi pouco afetada com a funcionalização, permanecendo próxima aos 90% da estrutura. Os criogeis funcionalizados com Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺ apresentaram capacidade adsortiva para lisozima de 139,38 e 154,74 e para BSA 32,08 e 40,86 (mgproteína-gcriogel-1). A matriz cromatográfica apresenta grande potencial em processos com macromoléculas pois desempenha bem seu objetivo no processo de purificação e imobilização de células e de biomoléculas.

Palavras-chave: purificação, criogel, proteínas, separação de biomoléculas.

PURIFICATION OF ENZYMES FROM VEGETABLE EXTRACTS BY IMAC AFFINITY

ABSTRACT

Cryogels are obtained from precursors polymerized under freezing conditions. Polyclariamide cryogel production tests were carried out to be used in affinity processes with immobilized metal ions (IMAC), using Cu⁺⁺ and Zu⁺⁺ and to analyze the effect of on the characteristics of the adsorbents such as swelling capacity (S), degree of expansion (ED), porosity (ϕ) and macro, micro and mesopores fractions for control and functionalized cryogels. An adsorption test with lysozyme and BSA was carried out to further explore the potential purification of the matrix in biocompounds. In relation to those activated with Cu⁺⁺ and Zu⁺⁺, the cryogel showed a high capacity for interacting with water and this was reflected in the large amount of water retained in relation to the cryogel polymer mass. The S values are within the ranges reported for polyacrylamide cryogels in several works in the literature. The macropore fraction was dominant in the type of pores observed in cryogels. The total porosity was little affected with the functionalization, remaining close to 90% of the structure. Cryogels functionalized with Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ showed adsorptive capacity for lysozyme of 139.38 and 154.74 and for BSA 32.08 and 40.86 (mgprotein-gcryogel-1). The chromatographic matrix has great potential in processes with macromolecules because it performs well in the process of purification and immobilization of cells and biomolecules.

KEYWORDS: purification, cryogel, proteins, separation of biomolecules.

INTRODUÇÃO

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

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

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos – UESB macedoonya@gmail.com

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

Criogeis são materiais obtidos de precursores poliméricos polimerizados em condições de congelamento. Ele é um importante instrumento para que esse processo ocorra dentro das possibilidades de matriz cromatográfica, uma vez que possui características físico-químicas que permite desempenhar bem seu objetivo no processo de purificação e imobilização de biomoléculas e seu uso tem potencial escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (CLAUDINO, 2015; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014).

No presente trabalho objetivou-se a produção e caracterização um adsorvente monolítico macroporoso voltado ao processo de purificação de enzimas por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) para potencial purificação de amilase.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Síntese das matrizes monolíticas poliméricas

Realizou-se ensaios de produção do criogel, testando a formulação com proporção de 3,30g de acrilamida (AAm); 1,20g de N,N-metileno-bis-acrilamida (BAAm) e 2,50g de alil-glicidil éter (AGE). Esta é composta por 7% de monômeros (AAm, BAAm, AGE), adicionada de 140 μL persulfato de amônio (APS) 0,5g/L e 91 μL tetrametil etilenodiamina (TEMED). A solução foi vertida em seringas de 10 mL, e mantidas em banho termostático a -12°C por 24h. Em seguida, foi armazenada em geladeira comum por 4 horas a 4°C . e posteriormente armazenada em estufa a 60°C até a secagem das matrizes.

2. Funcionalização das matrizes monolíticas poliméricas

Para a funcionalização, foram selecionados 6 criogeis de cada formulação. Os criogeis foram colocados em contato com 20 mL de álcool etílico por 2 horas. Na sequência, foram mantidos em contato com 20 mL de água destilada, seguidos de contato com 20 mL de tampão fosfato de sódio (TFS) 0,05 mol.L⁻¹ pH 6, ambos com tempo de contato de 1 hora. Em seguida, os mesmos foram imersos em 20 mL de ácido iminodiacético 0,5 mol.L⁻¹ e mantidos sob agitação por 14 horas na BOD à temperatura de 40°C . Após essa etapa os criogeis foram imersos em 20 mL de ácido acético, até atingir pH 6. Então, os criogeis foram colocados em contato com 20 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, os criogeis foram submetidos à 20 mL das soluções dos sais dos metais de interesse sulfato de cobre (Cu^{+2}) e sulfato de zinco (Zn^{+2}), respectivamente, durante 2 horas à temperatura ambiente. Os criogeis foram lavados com água destilada e posteriormente imersos em 20 mL de solução tampão HEPES. Após a ativação os criogeis foram colocados em estufa a 60°C (Fontan et al., 2013).

3. Caracterização dos adsorventes

Foram determinados a capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade (ϕ) e frações de macro, micro e mesoporos para criogeis controle e funcionalizados.

4. Ensaio de adsorção

Os ensaios de adsorção de proteína foram realizados pelo método de Bradford. Testou-se nesta etapa lisozima e BSA para verificar a adsorção dos criogeis funcionalizados com Cu^{++} e Zn^{++} , respectivamente. Para cada tipo de ativação, utilizou-se 6 tratamentos com lisozima e 6 com BSA. A cada tubo de plástico, adicionou-se 20 mg de criogel ativado e 4mL de solução de proteína, solubilizada em tampão fosfato de sódio 20Mm (pH 7,2). Os tratamentos foram levados à agitação por 4 horas e finalizando, coletou-se 100 μL ao tubo de vidro correspondente ao seu tratamento. Adicionou-se a um tubo de vidro 5mL solução de Bradford e homogeneizou-se o meio.

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

Realizou-se a leitura das absorvâncias das amostras em espectrofotômetro a 595nm. Com os dados de absorvância das diluições e equação da curva de calibração de Bradford foi possível encontrar a concentração de proteína presente na solução após o contato com o criogel. Esses valores puderam ser comparados com a Concentração inicial da solução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criogéis sintetizados apresentaram estruturas consistentes, cilíndricas, esponjosas quando umedecidas, lisas e porosas, conforme relatado por diversos autores (ARVIDSSON et al., 2002). Nas Tabelas 1 e 2 são apresentados os resultados obtidos na caracterização dos criogéis controle e ativado.

Tabela 1: Parâmetros de capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED) e fração de polímeros secos, avaliados nos criogéis com diferentes funcionalizações.

Variáveis		Capacidade de inchamento (S)	Grau de expansão (ED)	Fração de polímero seco
Criogel	Controle	18,14 ± 0,73	20,86 ± 1,15	0,052 ± 0,002
	Cu ⁺⁺	15,78 ± 1,29	17,36 ± 1,08	0,064 ± 0,005
	Zn ⁺⁺	16,09 ± 1,14	21,94 ± 5,26	0,059 ± 0,004

Tabela 2: Parâmetros de fração de água de ligação, fração de macroporos, fração de meso e microporos e porosidade total, avaliados nos criogéis com diferentes funcionalizações.

Variáveis		F. de água de ligação	F. de macroporos	F. de meso e microporos	Porosidade total
Criogel	Controle	0,033 ± 0,001	0,742 ± 0,056	0,176 ± 0,056	0,914 ± 0,002
	Cu ⁺⁺	0,022 ± 0,018	0,781 ± 0,048	0,133 ± 0,045	0,912 ± 0,005
	Zn ⁺⁺	0,041 ± 0,018	0,684 ± 0,115	0,206 ± 0,100	0,899 ± 0,017

Os valores de Capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED) foram elevados para o criogel controle. Em relação aos funcionalizados com Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺ apresentou elevada capacidade de interagir com água. Os valores de S obtidos neste trabalho estão dentro das faixas reportadas para criogéis de poliácridamida em diversos trabalhos da literatura. Apesar de se observar alguma variação na fração de macroporos, esta foi dominante no tipo de poros observados nos criogéis. Essa diferença pode ser atribuída ao fortalecimento das interações cruzadas e redução do espaço dos poros a partir da funcionalização do criogel, tornando-os menos flexíveis. No entanto, a porosidade total foi pouco afetada com a funcionalização, permanecendo próxima aos 90% da estrutura (NOR et. al. 2016).

Tabela 3: Capacidade adsorviva dos criogéis ativados com íons cobre e zinco, utilizando-se as proteínas lisozima e albumina (BSA).

		Criogel Cu ⁺⁺	Criogel Zn ⁺⁺
Proteína	Lisozima	139,38 ± 18,93	154,74 ± 4,19
	BSA	32,08 ± 8,63	26,30 ± 25,47

Os criogéis funcionalizados com Cu⁺⁺ e Zn⁺⁺ respectivamente apresentaram capacidade adsorviva para lisozima de 139,38 e 154,74 e para BSA 32,08 e 40,86 (mgproteína-gcriogel-1). A alta capacidade adsorviva encontrada para lisozima em ambas funcionalizações podem ser justificados pelo baixo peso molecular da mesma (14 kDa). Isso faz com que ela se ligue com maior facilidade aos metais presentes na superfície da coluna cromatográfica quando entram em contato, apresentando menor impedimento espacial quando comparada à BSA. Observando-se as diferentes ativações com cobre

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

e zinco, a lisozima teve comportamento semelhante de alta adsorção. Quanto a BSA, a capacidade adsorptiva não foi satisfatória como a da lisozima, porque seu peso molecular (66 kDa) é aproximadamente 4 vezes maior que o da lisozima. Esse fato dificulta a interação com a superfície do criogel onde se encontram os íons metálicos.

CONCLUSÃO

Foi possível sintetizar criogeis de policlariamida com 2 formulações, obtidos pelo processo de criogeificação para serem utilizados em processos de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) e analisar o efeito de íons metálicos Cu^{++} e Zu^{++} nas características dos adsorventes.

Os valores de Capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED) foram elevados para o criogel controle. Em relação aos ativados Cu^{++} e Zu^{++} , apresentou elevada capacidade de interagir com água e isso se refletiu na grande quantidade de água retida em relação à massa de polímero do criogel. Os valores de S obtidos neste trabalho estão dentro das faixas reportadas para criogeis de poliácridamida em diversos trabalhos da literatura. A fração de macroporos foi dominante no tipo de poros observado nos criogeis. Ainda, a porosidade total foi pouco afetada com a funcionalização, permanecendo próxima aos 90% da estrutura. Foi possível certificar que os criogeis funcionalizados com íons de cobre e zinco apresentaram maior capacidade adsorptiva para a lisozima, sendo a com BSA consideravelmente inferior.

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. CLAUDINO, A. et al. Adsorção de bsa em sistema criogel de troca iônica. DA SILVA, R. Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. Process Biochemistry, v. 82, p. 75-83, 2019.
3. ERTÜRK, G.; MATTIASSON, BO. Cryogels-versatile tools in bioseparation. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN; R. C. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. Journal of Chromatography B, v. 1033-1034, p. 406-412, 2014.
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. Nor, M.Z.M. Ramchandran, L. Duke, M. Vasiljevic, T. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a two-stage ceramic ultrafiltration process. Food and Bioproducts Processing, 98, 2016, 142-150.

AGRADECIMENTOS

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



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

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos – UESB macedoenva@gmail.com

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