

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

Kleuber Balduino, MATEUS <sup>1</sup>; Rafael da Costa Ilhéu, FONTAN <sup>1</sup>

## RESUMO

Técnicas cromatográficas são essenciais na purificação de biocompostos e os processos de troca iônica estão entre os métodos mais usados. É constante o desenvolvimento de novos materiais e, neste sentido, os criogéis poliméricos supermacroporosos estão entre o que existe de mais moderno, pois são suportes eficazes na separação em processos downstream. Neste trabalho, foi avaliado a captura da enzima lisozima em criogel polimérico supermacroporoso trocador catiônico. Eles foram produzidos a partir da mistura de monômeros e um agente porogênico, polimerizada *in situ* em um molde, neste caso um tubo de seringa. A matriz de criogel foi caracterizada por medidas de capacidade de inchamento, e os resultados experimentais mostraram capacidade de inchamento em torno de 15,80  $\text{kg}_{\text{água}}/\text{kg}_{\text{criogel seco}}$ . Os resultados de adsorção apresentaram uma boa resposta de interação entre o sistema criogel com a enzima. A matriz de criogel apresenta-se como uma tecnologia promissora na área de bioseparações e vem sendo bastante utilizada na área farmacêutica e de ciência de alimentos.

Palavra chave: Adsorção; macroporos; lisozima; criogel.

## DEVELOPMENT OF POLYMERIC MONOLITHIC ADSORBENTS FOR APPLICATION IN THE PURIFICATION OF BIOCOMPOUNDS BY CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES.

### ABSTRACT

Chromatographic techniques are essential in the purification of biocompounds and ion exchange processes are among the most used methods. The development of new materials is constant and, in this sense, supermacroporous polymeric cryogenics are among the most modern, because they are effective supports in separation in downstream processes. In this work, the capture of the lysozyme enzyme in supermacroporous cationic exchanger polymeric cryogel was evaluated. They were produced from the mixture of monomers and a porogenic agent, polymerized *in situ* in a mold, in this case a syringe tube. The criogel matrix was characterized by swelling capacity measurements, and the experimental results showed swelling capacity of around 15.80  $\text{kg}_{\text{water}}/\text{kg}_{\text{drycriogel}}$ . The adsorption results showed a good interaction response between the criogel system and the enzyme. The criogel matrix presents itself as a promising technology in the area of bioseparations and has been widely used in the pharmaceutical and food science area.

Keywords: Adsorption; macropores; lysozyme; cryogel.

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI)

## INTRODUÇÃO

A lisozima é uma enzima que tem estrutura elipsoidal e tem sido muito utilizada por apresentar propriedades antimicrobianas principalmente sobre bactérias gram-positivas, podendo atuar também contra bactérias gram-negativas. Obtida de diversos substratos como ovos de galinha, lágrimas e outras secreções (Purice et al., 2007), se apresentam em grande quantidade na natureza, variando em peso molecular, sequência de aminoácidos e propriedades enzimáticas. Em específico a encontrada no ovo da galinha foi a primeira proteína a ter a sua estrutura sequenciada e o seu mecanismo de ação descrito detalhadamente.

Criogéis são monólitos poliméricos formados em um meio congelado e que foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação (LOZINSKY et al., 2001). O criogel apresenta-se como um excelente material cromatográfico e vem se tornando uma tecnologia muito útil permitindo a retenção de proteínas, vírus entre outros. Isso é possível pelo fato de que as condições criogênicas conferem um sistema contínuo de macroporos interconectados, uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho, fatores esses que tornam atrativos para cromatografia (LOZINSKY et al., 2008). Esses compostos são versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e apresentam baixo custo se comparados a matrizes tradicionais na cromatografia (Guiochon, 2007). A caracterização do criogel tem grande importância para se conhecer a dinâmica do escoamento de fluidos em seu interior, bem como o processo de interação dos sítios ativos com moléculas em solução visando a otimização dos processos de purificação de diferentes biocompostos existentes, o que demanda um amplo conhecimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Todos os reagentes necessários para o desenvolvimento deste trabalho possuíram, no mínimo, grau analítico PA-ACS. Foram utilizados acrilamida (AAm), bis-acrilamida (BAAm), alil glicidil éter (AGE), persulfato de amônio (APS), N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamino (TEMED) e ácido acrílico (AAc).

### 3.1. Síntese de criogel

Para a síntese dos criogéis foi utilizada metodologia adaptada de KUMAR et al. (2006) e YAO et al. (2006). Uma solução (100 mL) contendo 7% de monômeros foi preparada contendo AAm (3,30 g), BAAm (1,20 g), AGE (2,50g), APS (140 µ) e TEMED (91 µ). A solução foi vertida em seringas plásticas de 10mL, seladas e colocadas em banho ultratermostático (Quimis) por 24 h à -12 °C. Posteriormente os criogéis foram colocados em

uma geladeira para descongelar durante 4 horas, logo após secos em estufa a 60 °C ainda nas seringas por 24 horas e posteriormente armazenado até o uso.

### 3.2. Caracterização dos Criogéis

Para a caracterização dos criogéis produzidos foram realizada as análises de capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade, capacidade iônica total, capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchaço (S) foi realizada em 10 não ativados (controle). Os criogéis secos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada em temperatura ambiente, por 24 h. Após a imersão, as massas foram verificadas novamente. Calculou-se o valor de S utilizando a equação 1 (SAVINA et al., 2005).

$$S = (ms - md) / md \quad (1)$$

Onde: ms é a massa (g) do criogel hidratado e md é a massa (g) do criogel desidratado.

### 3.3. Avaliação da capacidade adsortiva

Os adsorventes produzidos foram cortados com uma lâmina de aço em pequenos cubos com cerca de 1,5 mm de aresta. Utilizou-se lisozima como proteína modelo. Foram pesados cerca de 30 mg das matrizes produzidas em tubos de centrífuga, e os mesmos foram colocados em contato com 4 mL da solução de lisozima (1 mg.mL<sup>-1</sup>) em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. Os tubos foram mantidos sob agitação a 25 rpm por cerca de 2 horas à temperatura ambiente (25±2) °C. Posteriormente, retirou-se o líquido sobrenadante e foram avaliados a concentração de proteína pelo método de Bradford (1976) à 595 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criogéis produzidos a partir do processo de criogeleificação da mistura de monômeros reticulantes com o agente porogênico apresentaram uma estrutura esponjosa, rígida e uniforme quando seco, elástica e de aspecto gelatinoso quando hidratados, com coloração esbranquiçada e forma cilíndrica, assumindo a forma tubular da seringa. Estes são formados por canais não uniformes e poros que apresentam diâmetros variando pouco. Eles foram funcionalizados utilizando o ligante glutamato de sódio e a adsorção ocorreu com a enzima lisozima. A partir de uma curva de calibração com R igual a 0,9928, pode-se definir a concentração final da enzima em solução após a adsorção, obtendo-se uma capacidade adsortiva de 91,72 ± 4,53 mg<sub>lisozima</sub>/g<sub>criogelseco</sub>. A partir das análises realizadas, verificou-se que os criogéis atingiram o objetivo da pesquisa, obtendo bons resultados e também características desejáveis, tais como alta porosidade e com capacidade de inchamento de 15,80 kg<sub>água</sub>/kg<sub>criogelseco</sub>, como foi observado também na literatura por pesquisadores em criogéis obtidos com diferentes formulações (ARVIDSSON et al., 2002; PERSSON et al., 2004; YAO et al., 2006).

## CONCLUSÕES

Foi possível sintetizar colunas macroporosas de poliacrilamida pelo método da criogeificação. Sendo possível, também, após funcionalização da sua estrutura com grupamentos amina disponibilizados pelo aminoácido glutamato de sódio, a adsorção da enzima lisozima. Mais estudos devem ser feitos para aperfeiçoar o resultado, uma vez que tem aplicabilidade na área de engenharia e ciência de alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v.977, 27-38, 2002.
2. KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. (2006). Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v.1103, 35-42.
3. PERSSON, P., BAYBAK, O., PLIEVA, F.M., GALAEV, I.Y., MATTIASSON, B., NILSSON, B., AXELSSON, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. **Biotechnology and Bioengineering** 88, 224, 2004.
4. SAVINA, I. N; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p .9596-9603, 2005.
5. 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.