

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

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS MACROPOROSAS PARA APLICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA**

Ester Rocha Santos<sup>1</sup>; Jonathan Barbosa Santos<sup>2</sup>; Márjorie Castro Pinto Porfirio<sup>2</sup>; Rafael da Costa Ilhéu Fontan<sup>3</sup>.

**RESUMO**

Os processos cromatográficos são frequentemente utilizados para separação e purificação de biomoléculas de interesses industrial. Entre as proteínas de interesse, a lisozima é uma enzima que se destaca pela sua atividade antimicrobiana, sendo usada como conservante na indústria de alimentos. Este trabalho teve como avaliar a adsorção da lisozima em trocadores catiônicos de quitosana funcionalizados com lisina. Para melhor compreensão do comportamento dos suportes, foi determinado o ponto de carga zero das matrizes, permitindo avaliar a influência das condições de pH na interação enzima-suporte. A eficiência de adsorção da lisozima foi comparada entre os diferentes criogéis produzidos, possibilitando identificar as condições mais favoráveis para purificação. Os resultados obtidos indicam que a funcionalização e o controle do pH exercem papel fundamental no desempenho dos criogéis como suportes, evidenciando o potencial de aplicação desses materiais em processos de purificação e reutilização de enzimas em escala industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cromatografia; Funcionalização polimérica; Proteínas catiônicas; Separação.

**POTENTIAL USE OF MODIFIED POLYMERIC MONOLITHIC MATRICES IN THE FOOD FIELD: BIOSENSOR PRODUCTION, ENZYME IMMOBILIZATION, AND PURIFICATION OF COMPOUNDS OF INTEREST.**

**ABSTRACT**

CHROMATOGRAPHIC PROCESSES ARE FREQUENTLY EMPLOYED FOR THE SEPARATION AND PURIFICATION OF BIOMOLECULES OF INDUSTRIAL INTEREST. AMONG THESE PROTEINS, LYSOZYME STANDS OUT DUE TO ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY, BEING USED AS A PRESERVATIVE IN THE FOOD INDUSTRY. THIS WORK AIMED TO EVALUATE THE ADSORPTION OF LYSOZYME ONTO CATION-EXCHANGE CHITOSAN CRYOGELS FUNCTIONALIZED WITH LYSINE. TO BETTER UNDERSTAND THE BEHAVIOR OF THE SUPPORTS, THE POINT OF ZERO CHARGE OF THE MATRICES WAS DETERMINED, ALLOWING THE ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF PH CONDITIONS ON THE ENZYME-SUPPORT INTERACTION. THE ADSORPTION EFFICIENCY OF LYSOZYME WAS

COMPARED AMONG THE DIFFERENT CRYOGELS PRODUCED, MAKING IT POSSIBLE TO IDENTIFY THE MOST FAVORABLE CONDITIONS FOR PURIFICATION. THE RESULTS OBTAINED INDICATE THAT FUNCTIONALIZATION AND PH CONTROL PLAY A FUNDAMENTAL ROLE IN THE PERFORMANCE OF THE CRYOGELS AS SUPPORTS, HIGHLIGHTING THE POTENTIAL APPLICATION OF THESE MATERIALS IN PURIFICATION PROCESSES AND ENZYME REUSE ON AN INDUSTRIAL SCALE.

**KEYWORDS:** Chromatography; Polymeric functionalization; Cationic proteins; Separation.

## **INTRODUÇÃO**

A tecnologia de bioprocessos abrange diferentes segmentos industriais, destacando-se a aplicação de enzimas devido à sua eficiência, seletividade e capacidade de transformar biomoléculas em produtos de alto valor agregado. No entanto, desafios como baixa estabilidade, recuperação e uso em escala industrial exigem o desenvolvimento de novas estratégias (Porfirio et al., 2024). Nesse contexto, técnicas de adsorção têm se destacado por melhorar a estabilidade e a reutilização das enzimas, sendo amplamente empregadas em imobilização, separação e purificação, com avanços voltados para o desenvolvimento de novos suportes (Pérez-Botella et al., 2022; Pour et al., 2025).

O uso de biorreatores com enzimas imobilizadas é uma alternativa promissora para otimizar processos industriais e reduzir impactos ambientais. Esse tipo de abordagem possibilita reutilização e maior estabilidade frente a variações de pH, temperatura e solventes (Shomal et al., 2024). Nesse cenário, matrizes monolíticas poliméricas, estruturas tridimensionais altamente porosas, apresentam ampla aplicação em processos de purificação, separação e detecção de compostos, além de possibilitarem a interação de enzimas com os suportes por meio de adsorção (Norberto et al., 2017).

Entre essas matrizes, os criogéis se destacam por sua rede macroporosa interconectada, obtida por polimerização sob congelamento, que garante flexibilidade, seletividade e reutilização (Öztürk, Saylan e Denizli, 2021). A modificação química amplia ainda mais suas aplicações. Dentre os materiais empregados, a quitosana é relevante por ser biocompatível, biodegradável e formar géis estáveis, tornando-se alternativa sustentável e economicamente viável, com aplicações farmacêuticas e biomédicas (Vázquez e Paull, 2010).

O estudo tem como objetivo desenvolver suportes poliméricos funcionalizados para purificação de enzimas, avaliando o potencial de utilização em processos industriais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados acrilamida (AAm), N,N'-metileno-bis(acrilamida) (MBAAm), quitosana (95% de desacetilação), persulfato de amônio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED), lisina, tampões fosfato (pH 6 e 8,5) e carbonato (pH 10), além de lisozima comercial e demais reagentes de grau analítico.

### Síntese do criogel com quitosana

AAm (1,0 g) e MBAAm (0,3 g) foram dissolvidos em 20 mL de água destilada, resfriados a 4 °C e misturados a 2,5 mL de quitosana 1% (p/v). A polimerização foi iniciada com APS (30 mg) e TEMED (30 µL). As soluções foram transferidas para seringas de 5 mL, congeladas a -12 °C por 24 h e descongeladas a 4 °C. Os criogéis obtidos foram secos em estufa a 60 °C.

### Funcionalização dos criogéis em diferentes pH.

Os criogéis foram lavados em etanol (2 h) e água (1 h) e incubados em solução de lisina (10 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio (pH 6) ou tampão carbonato de sódio (pH 10) por 14 h. Após lavagem com água destilada, foram secos a 60 °C.

### Adsorção da lisozima

Foram utilizados 30 mg de cada suporte, em contato com 4 mL de solução de lisozima (4 mg/mL, tampão fosfato pH 8,5) por 12 h à temperatura ambiente. A concentração final foi determinada a 595 nm pelo método de Bradford (1976), com curva de calibração utilizando BSA como padrão (0,1–1 mg/mL). A capacidade adsortiva foi calculada de acordo com a equação (1).

$$q = \frac{(c_0 - c) \times V}{M} \quad (1)$$

Na qual  $q$  é a concentração de enzima retida ao suporte (mg/g de suporte);  $C_0$  e  $C$  são as concentrações iniciais e finais de enzima (mg/mL) respectivamente;  $M$  é a massa de suporte seco; e  $V$  é o volume de solução de enzima utilizada (mL).

### Análise de ponto de carga zero (PCZ)

Determinado pelo “Experimento dos 11 Pontos” (Mól et al., 2019), em que 50 mg de criogel foram condicionados em NaCl 0,1 mol/L (pH 1–11), sob agitação por 24 h. O pH<sub>pzc</sub> foi definido como a faixa em que o pH final permaneceu constante, indicando carga superficial nula.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

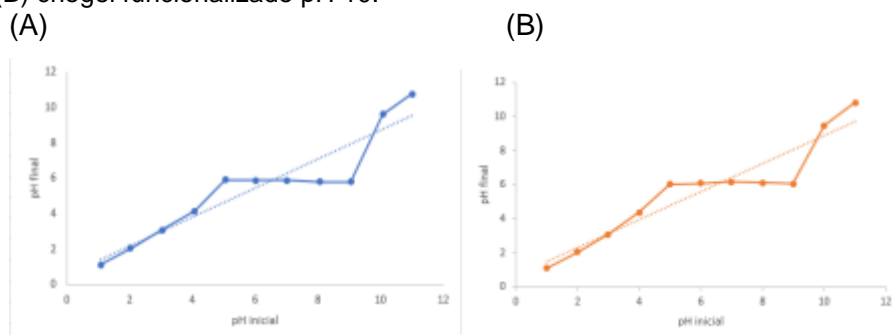
### Criogéis de quitosana funcionalizados com Lisina

Os criogéis sintetizados apresentaram coloração branca e estrutura cilíndrica, rígida quando desidratados. A literatura descreve que criogéis de quitosana e acrilamida possuem poros interconectados, alta área superficial e boa estabilidade mecânica, características promissoras para adsorção enzimática (Oliveira et al., 2019). A presença da quitosana contribui para a estabilidade estrutural e funcionalização da superfície, devido aos grupos amina.

#### Ponto de carga zero do criogéis iônicos

A análise do ponto de carga zero (pHpzc) mostrou valores em torno de 5,8–5,9 para pH 6 e 6,0–6,1 para pH 10, evidenciando a modificação pela lisina (Figura 1). Diferente da quitosana pura (pHpzc 6,2–6,5). O deslocamento é atribuído à contribuição das unidades poliméricas e do caráter ácido-base da lisina (Munim et al., 2020). Assim, acima do pH<sub>pzc</sub>, a superfície torna-se negativa, favorecendo a adsorção da lisozima, proteína de pI ≈ 11 que permanece positiva em pH fisiológico. Além das forças eletrostáticas, contra-íons e interações hidrofóbicas também estabilizam o processo.

**Figura 1.** Gráfico do ponto de carga zero dos criogéis produzidos (A) criogel funcionalizado pH 6. (B) criogel funcionalizado pH 10.



Fonte: Autor

### Capacidade adsortiva

Quanto à capacidade adsortiva, os criogéis funcionalizados em pH 10 apresentaram melhor desempenho em relação aos de pH 6 (Tabela 1). A funcionalização com lisina conferiu caráter de troca iônica à matriz, permitindo interações eletrostáticas com a lisozima, proteína catiônica em pH fisiológico (Liu et al., 2020)

Esse comportamento pode ser explicado pela maior densidade de cargas negativas efetivamente disponíveis, favorecendo interações com grupos catiônicos da enzima, conforme descrito por Baimenov et al. (2020). Os resultados demonstram que

a modificação em meio básico torna o suporte mais eficiente para aplicações em bioprocessos.

**Tabela 1.** CQ.pH 6: Criogéis de quitosana funcionalizados com lisina a uma solução de pH 6 ;CQ.pH 10: Criogéis de quitosana funcionalizados com lisina a uma solução de pH 10.

Suportes	Capacidade adsortiva (mg/g)
CQ.pH 6	19,05± 0,35
CQ.pH 10	24,38±0,44

Fonte: Autor

## CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

Os resultados obtidos demonstram que foi possível produzir os criogéis de quitosana-poliacrilamida e realizar sua funcionalização com lisina, possibilitando sua aplicação em processos de adsorção e purificação de enzimas.. A determinação do ponto de carga zero evidenciou que ambos os suportes se encontravam carregados negativamente nas condições experimentais, favorecendo a interação eletrostática com a lisozima. No entanto, a maior capacidade adsortiva observada para os criogéis básicos (pH 10) em relação aos criogéis tendendo a neutralidade (pH 6,0) indica que a funcionalização em pH mais elevado confere uma superfície mais estável e com maior densidade de cargas aniônicas disponíveis, o que potencializa a eficiência do processo adsortivo. Esses estudos demonstram que os suportes são promissores para aplicações biotecnológicas e industriais, com destaque para aquele em pH básico sugerindo maior eficiência em processos de purificação. Estudos futuros deverão avaliar a estabilidade operacional, a reutilização e a performance desses materiais em diferentes condições e com outras biomoléculas de interesse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAIMENOV, A. Z.; BERILLO, D. A.; POULOPOULOS, S. G.; INGLEZAKIS, V. J. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 276, p. 102088, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102088>.
2. LIU, B.-L.; O, C. W.; NG, I.-S.; SHOW, P. L.; CHANG, Y.-K. Effective purification of lysozyme from chicken egg white by tris(hydroxymethyl)aminomethane affinity nanofiber membrane. *Food Chemistry*, v. 327, p. 1–12, 2020.
3. MUNIM, S. A.; MUHAMMAD; SADDÍQUE, M. T.; RAZA, Z. Fabrication of cellulose-mediated chitosan adsorbent beads and their surface chemical characterization. *Polymer Bulletin*, v. 77, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02711-4>.

4. NORBERTO, V. et al. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. *Revista Geum*, 2017.
5. OLIVEIRA, L. C. A.; LAGO, R. M. Síntese de nanopartículas de magnetita por coprecipitação. *Anais do 74o Congresso Anual da ABM – Internacional*, 2019.
6. ÖZTÜRK, G.; SAYLAN, Y.; DENIZLI, A. Separation and Purification Technology, v. 254, 117622, 2021. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117622.
7. PÉREZ-BOTELLA, E.; VALENCIA, S.; REY, F.; POUR, S. E.; MAMAGHANI, A. H.; HASHISHO, A. Zeolites in adsorption process: state of the art and future prospects. *Chemical Reviews*, v. 122, n. 24, p. 17647–17695, 2022.
8. PORFIRIO, M. C. P.; SANTOS, J. B.; ALVES, A. N.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Purification of pineapple bromelain by IMAC chromatography using chlorophyll-activated macroporous matrices. *Journal of Chromatography B*, v. 1234, p. 124027, 2024.
9. SHOMAL, R.; ABDELKAREEM, M. A.; OLABI, A. G.; ZUHAIR, S. A. Macro porous ZIF-8 beads: Promising supports for enzyme immobilization. *Materials Today Sustainability*, v. 25, p. 100632, 2024.
10. VÁZQUEZ, M.; PAULL, B. *Analytica Chimica Acta*, v. 668, p. 100–113, 2010. DOI: 10.1016/j.aca.2010.04.033.