

DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR COM HIDROLASES IMOBILIZADAS

=

Emilly Beatriz Braz Paixão ¹, Rafael Da Costa Ilhéu Fontan ² Jonathan Barbosa Santos³.

RESUMO

Dentro do contexto da separação cromatográfica, as colunas macroporosas interconectadas, especialmente os criogéis, estão ganhando espaço. Os criogéis são formados pela polimerização em baixas temperaturas, onde cristais de gelo, após o descongelamento, dão origem a uma estrutura porosa. Este material apresenta vantagens como flexibilidade, durabilidade, boa estabilidade química, baixo custo e, crucialmente, baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções viscosas e facilitando a purificação de componentes.

A lisozima é introduzida como uma proteína modelo para estudos de purificação e termodinâmicos. Devido ao seu alto ponto isoelétrico e à presença de resíduos básicos como lisina e arginina, a lisozima possui um caráter básico, sendo ideal para ser utilizada em pesquisas de adsorção por trocadores catiônicos.

Com base em todo o contexto apresentado, o trabalho em questão teve como objetivo a produção de um adsorvente polimérico monolítico utilizando a técnica de criogeleificação, funcionalizado com glutaraldeído, para a purificação parcial de hidrolases immobilizadas da lisozima da clara do ovo.

PALAVRAS-CHAVE: Criogel, Hidrolases, Imobilização, Lisozima.

ABSTRACT

In the context of chromatographic separation, interconnected macroporous columns, especially cryogels, are gaining ground. Cryogels are formed by low-temperature polymerization, where ice crystals, after thawing, form a porous structure. This material offers advantages such as flexibility, durability, good chemical stability, low cost, and, crucially, low flow resistance, allowing the use of viscous solutions and facilitating the purification of components.

Lysozyme is introduced as a model protein for purification and thermodynamic studies. Due to its high isoelectric point and the presence of basic residues such as lysine and arginine, lysozyme has a basic nature, making it ideal for use in cation exchanger adsorption research. Based on the entire context presented, the work in question aimed to produce a monolithic polymeric adsorbent using the cryogelation technique, functionalized with glutaraldehyde, for the partial purification of immobilized hydrolases from egg white lysozyme.

KEYWORDS: Cryogel, Hydrolases, Immobilization, Lysozyme.

INTRODUÇÃO

Técnicas de separação de biomoléculas são frequentemente utilizadas em algumas áreas de pesquisa, indústrias de alimentos e farmacêutica, para que se obtenha compostos com alto grau de pureza. Dentre essas técnicas pode-se destacar às cromatográficas, por sua capacidade de auxiliar na identificação de componentes através de uma comparação com padrões já pré-estabelecidos, e também na purificação desses compostos. Assim, a cromatografia se destaca por suas vantagens em relação a outros métodos, principalmente o curto tempo de preparo das amostras e as variadas formas de detecção. Diferentes princípios de ação também são comumente usados nas técnicas cromatográficas como a interação hidrofóbica, de afinidade e iônica (VECHIA et al., 2016; CORRÊA et al., 2016; GOMES et al., 2020).

No contexto da separação cromatográfica de biomoléculas, as colunas macroporosas interconectadas vem a cada vez mais ganhando espaço, devido aos seus bons resultados de recuperação. Estruturas monolíticas poliméricas macroporosas sintetizadas em temperaturas abaixo de zero, chamadas criogéis, são particularmente interessantes para a aplicação em processos de purificação. No processo de obtenção dos criogéis, há a polimerização do material com formação de gelo nos espaços vazios. Após o descongelamento os cristais de gelo dão lugar à estrutura porosa dos criogéis, obtendo um material flexível, durável, com boa estabilidade química e um curto caminho para difusão das moléculas, além de ser um material mais barato quando comparado às colunas cromatográficas convencionais (GONÇALVES et al., 2017; FONTAN et al., 2018; OZTURK et al., 2020).

Criogéis macroporosos apresentam baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções moderadamente viscosas como alimentação, com baixa interferência na

eficiência da purificação de componentes de interesse. Por esta característica, verifica-se um aumento na utilização desses materiais para purificar moléculas com diferentes características (SHOW et al., 2020; LIU et al., 2020; SUN et al., 2020).

A lisozima possui alto ponto isoelétrico, em decorrência da presença de certos aminoácidos a sua estrutura, que é o caso de 6 resíduos de lisina e 9 resíduos de arginina, dando-lhe um caráter básico. Assim, ela tem uma boa vantagem em processos cromatográficos em relação à sua utilização dentro de uma ampla faixa de pH, com isso ela é tratada como uma espécie de proteína modelo para avaliar procedimentos de purificação e estudos termodinâmicos. Por ter um caráter básico a lisozima pode ser utilizada em pesquisas relacionadas a adsorção por trocadores catiônicos (VERÍSSIMO et al., 2017; GUAN et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Diante do exposto, esse trabalho objetivou a produção de um adsorvente polimérico monolítico pela técnica da criogeleificação, funcionalizado com glutaraldeído como um trocador catiônico, para purificação parcial da lisozima da clara do ovo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese dos criogéis poliméricos

Para a síntese dos criogéis foi utilizada metodologia adaptada de YAO et al., (2006). Uma solução 100mL contendo 7% de monômeros foi preparada contendo AAm (5,8 g), BAAm (1,2 g), APS (140 μ L(0,5g/mL) e TEMED (91 μ L). A solução foi colocada em seringas plásticas de 10 mL, seladas e colocadas em banho ultra termostático por 24 h à -12 °C. Posteriormente os criogéis foram deixados em temperatura de refrigeração durante 4 horas, logo após secos em estufa a 60 °C por 7 dias.

Funcionalização dos criogéis para troca iônica

O processo de funcionalização dos criogéis seguiu a metodologia descrita por Gonçalves et al. (2017) e Nascimento (2021), com adaptações. Foi preparada uma solução-tampão de fosfato de sódio (TFS) 0,05 mol.L⁻¹ em pH 6, para dissolução dos componentes utilizados na funcionalização. Para isso, utilizou-se seringas de 20 mL que eram então seladas, em cada percolação de solução, mantendo-se a agitação orbital a 20 rpm. A cada etapa do processo os criogéis eram suavemente comprimidos

para retirada do excesso da solução da última etapa. 34 Primeiramente os criogéis foram imersos em 20 mL de álcool metílico por 2 h para abertura do anel epóxi. Feito isso, realizou-se uma lavagem com água destilada por 1 h, sendo posteriormente utilizada a solução TFS por também 1 h. Em seguida, os criogéis foram imersos em 20 mL de solução etilenodiamina (0,5 mol.L⁻¹) em TFS e mantidos por 14 h a temperatura ambiente (25 °C). Passado esse tempo realizou-se duas lavagens com água destilada, cada uma de 30 min, na qual, os criogéis eram deixados nas seringas em agitador orbital. Em seguida, 20 mL de solução TFS foi mantido em contato com o criogel por 1 h. Na sequência, 20 mL de solução de glutaraldeído 5% em TFS foi mantida em contato com criogel por 5 h em estufa BOD (Tecnal, modelo TE-184, Piracicaba, BR) a temperatura controlada de 12±1 °C. Para retirada do excesso da solução anterior realizou-se duas lavagens de 30 min com água destilada.

Atividade enzimática

A atividade enzimática da lisozima das soluções 'Extrato' e 'Eluido' foram determinadas pelo método de Shugar (1952). Para isso foi utilizada uma suspensão 0,15 % m.v - 1 de *Micrococcus lysodeikticus* preparada em Solução Fosfato de Potássio (50 mmol.L⁻¹) em pH 6,24, ajustado com soluções de KOH ou HCl, ambas a 1 mol.L⁻¹. Foi preparada uma suspensão do micro-organismo, que foi lida diretamente em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração da suspensão foi ajustada com tampão de modo que a sua leitura inicial estivesse com valores de absorvância entre 0,6 e 0,7. A análise de atividade foi realizada para as duas soluções, na qual, 200 µL de amostra foram deixados em contato com 5 mL da suspensão de *micrococcus* por 5 min a temperatura ambiente (25 °C), sendo realizadas leituras a cada 30 segundos para obtenção da velocidade linear máxima ($\Delta A_{450}/\text{min}$). Foi realizada também análise do branco com tampão puro. A atividade enzimática (U.mL⁻¹) é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um decréscimo de 0,001 na densidade óptica por minuto, sendo calculada a partir da Equação (16). Os três ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{(\Delta A_{450/\text{min}})_{\text{amostra}} - (\Delta A_{450/\text{min}})_{\text{branco}}}{0,001} \times (df)$$

Onde ($\Delta A_{450}/\text{min}$) amostra é a variação da absorvância no tempo no de 0 a 5 minutos para a amostra pelo total da análise, 5 minutos; ($\Delta A_{450}/\text{min}$) branco é a variação da para a amostra pelo total da análise, 5 minutos; ($\Delta A_{450}/\text{min}$) branco é a variação da absorvância para o branco; e df é o fator de diluição

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TUBO 1 apresenta uma boa capacidade adsorptiva (17,3579) e uma eficiência de 65%, o que indica um desempenho consistente e satisfatório dentro do contexto analisado. Já o TUBO 3 se destaca por apresentar valores semelhantes de capacidade adsorptiva (17,00081), mas com uma eficiência ligeiramente superior (65,85%), sendo o melhor desempenho entre os três tubos. Isso sugere que o TUBO 3 é o mais eficiente no processo de adsorção analisado, mesmo com uma capacidade muito próxima à do TUBO 1.

Por outro lado, o TUBO 2 apresenta o pior desempenho da amostra. Sua eficiência é a mais baixa (48,73%), e os dados de capacidade adsorptiva apresentam uma inconsistência, já que dois valores distintos (12,0675 e 6) estão listados. Essa duplicidade pode indicar um erro de registro ou uma tentativa de representar duas medições distintas (como mínimo e médio), mas sem explicação clara, gera dúvidas sobre a confiabilidade dos dados para essa amostra.

De maneira geral, os resultados sugerem que tanto o TUBO 1 quanto o TUBO 3 possuem desempenho adequado, com o TUBO 3 sendo o mais promissor para aplicações que demandem maior eficiência. O TUBO 2, além de menos eficiente, precisa de revisão nos dados para uma análise mais precisa. A consistência e clareza na apresentação dos dados também são fundamentais para interpretações confiáveis e decisões mais acertadas.

CONCLUSÕES

Conclui-se, de forma geral, que os dados analisados demonstram variações significativas na performance das amostras quanto à capacidade adsorptiva e à eficiência do processo. Observa-se uma tendência de que maiores capacidades adsorptivas estejam associadas a maiores eficiências, o que reforça a relação direta entre esses dois parâmetros. No entanto, a presença de inconsistências em algumas informações compromete a integridade da análise e destaca a necessidade de maior rigor na coleta e no registro dos dados experimentais. Ainda assim, é possível identificar amostras com desempenho satisfatório, indicando viabilidade técnica para aplicações futuras, desde que se assegure a padronização e a confiabilidade dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, C. M. S., BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B*, v. 1033, p. 406- 412, 2016.

SHOW, P. L.; OOI, C. W.; LEE, X. J.; YANG, C-L.; LIU, B-L.; CHANG, Y-K. Batch and dynamic adsorption of lysozyme from chicken egg on dye-affinity nanofiber membranes modified by ethylene diamine and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 162, p. 1711-1724, 2020.

VERÍSSIMO, L. A. A., PAGANOTO, F. S., MOL, P. C. G., ILHÉU FONTAN, R. D. C., MINIM, V. P. R., & MINIM, L. A. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. *Separation Science and Technology*, v. 52, n. 12, p. 1973-1982, 2017.

VECHIA, C. A. D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A. P.; DIEL, K. P.; FAUST, C. MENIN, C.; GOMES, D. B.; ROMAN, J. W. A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* v. 18, n. 1, p. 288-296, 2016.

| Amostras | Capacidade Adsorviva | Eficiência |
|----------|----------------------|------------|
| TUBO 1 | 17,3579 | 65 |
| TUBO 2 | 12,0675 6 | 48,73171 |
| TUBO 3 | 17,00081 | 65,85366 |

TABELA 1- *Capacidade adsorviva e Eficiência do Criogel*

