

# DESENVOLVIMENTO DE UM LEITO MONOLÍTICO FUNCIONALIZADO COM L-ÁCIDO ASPÁRTICO PARA ADSORÇÃO DE LISOZIMA

*Data de aceite: 26/01/2024*

### **Ivonéa Soares do Nascimento**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL

### **Débora Lemos da Silva**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL

### **Lorena Kamila de Melo Souza**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL

### **Charline Soares dos Santos Rolim**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL

### **Jonathan Barbosa Santos**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL

### **Rafael da Costa Ilhéu Fontan**

Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos-PPGECAL.

**RESUMO** – O objetivo neste trabalho foi desenvolver uma coluna monolítica supermacroporosa funcionalizada com o aminoácido L-Ácido aspártico de caráter catiônico para uso em processos de adsorção de proteínas, avaliando-se a lisozima comercial como modelo. Foi desenvolvido um criogel a base de acrilamida e bis-acrilamida em condições de congelamento (-12°C) e funcionalizado com L-Ácido aspártico. Após isso os criogéis foram utilizados nos ensaios de adsorção com lisozima utilizando PBS (pH 7,0 e 20mM). A coluna monolítica supermacroporosa ativada com L-Arginina (pAAm-Arginina) de caráter aniônico possui características físicas e morfológicas adequadas para uma coluna de cromatografia e nos ensaios de adsorção conseguiu adsorver 0,264 mg/mL de enzima.

## 1 | INTRODUÇÃO

Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio da separação se baseia na existência de interações entre os constituintes da amostra com a fase móvel e a fase estacionária. As moléculas possuem interações diferentes (Cargas iônicas) com a fase estacionária, sendo transportada a velocidades diferentes separando-se assim umas das outras (Fidelis, 2011).

A cromatografia de troca iônica (CTI) envolve um fenômeno físico-químico em que uma solução troca íons com a superfície de um sólido poroso (Guiochon, 2002). A vantagem do uso da CTI para proteínas é que a adsorção pode ser facilmente reversível com a mudança das condições do processo (Fidelis, 2011; Nascimento et al. 2019).

Neste sentido os monólitos supermacroporosos chamados de criogel são utilizados como colunas cromatográficas para purificação de diversas biomoléculas. Este monólito é desenvolvido através da polimerização de monômeros como, por exemplo, acrilamida e bis-acrilamida sobre ação de compostos químicos que agem como aceleradores da reação de polimerização são o persulfato de amônia (APS) e o N, N, N', N'-tetra-metiletilenodiamina (TEMED) em condições de congelamento (-12°C) (Gonçalves, 2016; Nascimento, 2021; Nascimento 2019).

A lisozima é conhecida como muramidase ou N-acetil-murâmico hidrolase, sendo uma proteína amplamente usada como modelo em sistemas de adsorção/purificação (TÜRKMEN; DENIZLI, 2014). Foi descoberta em 1922 por Alexander Fleming em seus estudos onde percebeu a inibição microbiana de um cultivo da mucosa nasal o (FLEMING, 1922). A lisozima é uma enzima com peso molecular de 14, 3 kDa constituída por 129 aminoácidos reticulados por quatro ligações dissulfeto com ponto isoelétrico de 10,7 (MINE; MA; LAURIAU, 2004; MINE, 1995).

Pode ser encontrada em uma variedade de células e secreções de vertebrados, como baço, leite, lágrimas e clara de ovo. Devido às estas características a lisozima passou a ter um valor comercial principalmente na indústria alimentícia podendo ser implementadas em diversas aplicações neste ramo, como por exemplo, na preservação de carnes, queijos, macarrão chinês, na fabricação de vinhos, elaboração de filmes antimicrobianos e em outras áreas, componente de preparações oftalmológicas e como medicamento para o tratamento de úlceras e infecções (Ghosh, Silva e Cui, 2000; HUANG et al., 2012; LIBURDI et al., 2016; CORRADINI et al., 2013; MECITOĞLU et al., 2006).

Devido a estas importantes aplicações a lisozima, principalmente a extraída da clara de ovo de galinha tem sido amplamente estudada. Para isso é necessário a extração e purificação desta enzima para que ela possa exercer tais aplicações. No entanto este processo de obtenção da enzima purificada, ou seja, o mais pura possível possui alto custo, uma vez que, a cromatografia uma técnica bastante utilizada nesse processo é uma técnica onerosa, além do que a enzima extraída da clara do ovo de galinha após este processo

apresenta baixa atividade enzimática.

Deste modo, há necessidade de novos estudos que possa suprimir tais desvantagens, logo, a cromatografia de troca iônica é amplamente utilizada na purificação de biomoléculas através do uso de colunas porosas. Neste sentido tem-se crescido bastante o uso de criogéis com características de trocadores iônicos, pois, é um material mais barato quando comparados com as colunas de cromatografia comercial e que tem apresentados bom resultados.

O objetivo neste trabalho foi desenvolver uma coluna monolítica supermacroporosa funcionalizada com o aminoácido L-Ácido aspártico de caráter catiônico para uso em processos de adsorção utilizando a lisozima comercial.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Síntese e funcionalização do criogel

Para o desenvolvimento das colunas cromatográficas, adaptou-se as metodologias propostas por Yao et al. (2006). Onde uma solução contendo 7% (m/v) de monômeros acrilamida (AAM 4,4 g), Bis-acrilamida (BAAM 1,2 g) e alil-glicidil éter (AGE 1,4 g) foi preparada usando banho de gelo. Posteriormente adicionou-se 140  $\mu\text{L}$  de APS (0,5g/mL) e 91  $\mu\text{L}$  de TEMED em relação à massa total de monômeros para um volume final de 100 mL. Após a homogeneização da solução, a mesma foi vertida em seringas plásticas e mergulhadas em um banho termostático à temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Para a etapa de descogelamento para que ocorra a formação dos poros as seringas foram deixadas à  $4^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Os criogéis então foram desidratados em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  para a verificação de defeitos no processo de síntese.

Após esta etapa os criogéis foram lavados com água deionizada para a remoção de reagentes não polimerizados e então novamente desidratados. Por fim, os criogéis foram submetidos aos processos de ativação e enxertia do grupo trocador. Os criogéis prontos apresentaram aspecto de um cilindro branco rígido e uniforme quando desidratados, com cerca de 4 cm de altura e 1 cm de diâmetro.

Posteriormente os criogéis foram funcionalizados com o ligante L-Ácido aspártico como trocador catiônico. Para a funcionalização foram adaptadas as metodologias propostas por Gonçalves (2016) e Nascimento (2021) com algumas alterações. Utilizou-se seringas de 20 mL e uma solução de ácido aspártico numa concentração de  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em PBS (20mM, pH 7,2). Os criogéis foram secos em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  e assim obteve-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de interação catiônica.

## 2.2 Caracterização do criogel

Para avaliar as características do criogel foram observados alguns parâmetros como: capacidade de inchamento  $S$  ( $\text{kg.kg}^{-1}$ ), grau de expansão  $ED$  ( $\text{L.kg}^{-1}$ ) e porosidade e suas frações, seguindo a metodologia de Nascimento (2019). A fração de macroporos ( $\phi M$ ), com tamanho  $\geq 1\mu\text{m}$ , fração de meso e microporos ( $\phi m$ ), com tamanho  $< 1\mu\text{m}$ , fração de água ligada ( $\phi wb$ ), fração de polímero seco ( $\phi d$ ) e porosidade total ( $\phi T$ ) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente, Onde:  $m_s$  é a massa do criogel hidratado (kg),  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg),  $m_e$  é a massa do criogel espremido (kg) e  $m_{wb}$  é a massa do criogel com água de ligação (kg), (Plieva et al. 2004a e 2004b).

$$\phi M = m_s - m_e / m_s \quad (1)$$

$$\phi m = m_e - m_{wb} / m_s \quad (2)$$

$$\phi wb = m_{wb} - m_d / m_s \quad (3)$$

$$\phi d = m_d / m_s \quad (4)$$

$$\phi T = m_s - m_{wb} / m_s = \phi M + \phi m \quad (5)$$

Todas as análises foram conduzidas de maneira aleatorizada, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância e Teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

## 2.3 Ensaios adsorptivos

Para testar a capacidade adsorptiva do criogel foi realizado um ensaio de adsorção com lisozima. Os ensaios foram realizados seguindo as metodologias de Gonçalves (2017) e Nascimento (2022) com alterações, em pH 7,2 e em triplicata. O processo se deu em batelada, em tubos Falcon de 50 mL, sendo adicionado cerca de 199 mg de criogel e 20 mL da solução de lisozima pura ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) solubilizado em tampão fosfato de sódio (pH 7,2 e concentração de  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

Os criogéis imersos na solução de lisozima foram deixados em agitação orbital de 20 rpm por 12 horas (*overnight*), à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente o sobrenadante foi coletado para a quantificação da concentração de lisozima por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, seguindo-se a metodologia descrita por Bradford (1976).

Foi construída uma curva de calibração de  $0,1$  a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de lisozima pura. A capacidade adsorptiva foi calculada utilizando-se a Equação (6).

$$q = (c_0 - c) \times v / M \quad (6)$$

Sendo,  $q$  se refere a quantidade de lisozima adsorvida no criogel ( $\text{mg.mL}^{-1}$ );  $c_0$  e  $c$

são as concentrações iniciais e finais da solução de lisozima ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $V$  é o volume de solução enzimática (mL) utilizada no processo; e  $M$  é a massa de criogel seco (g).

Os testes de adsorção foram repetidos por três dias consecutivos para testar a capacidade de reprodutibilidade do criogel.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Síntese e caracterização do criogel

Foi possível desenvolver um criogel a base de acrilamida e bis-acrilamida em condições de congelamento ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) com característica física lisa, esponjoso e de coloração branca funcionalizado com L-Ácido Aspártico, outros autores também encontraram tais características no desenvolvimento de colunas cromatográficas (Arvidsson et al., 2002; Yao et al., 2006a). Na tabela 1 encontra-se os resultados obtidos da caracterização deste criogel quanto aos parâmetros físicos e morfológicos.

Parâmetros	Criogel Puro	L-Ácido Aspártico
S (kg/kg)	14,870	9,22
ED (L/kg)	9,503	11,13
$\phi_d$	0,063	0,102
$\phi_{wb}$	0,044	0,056
$\phi_M$	0,637	0,464
$\phi_m$	0,259	0,350
$\phi_T$	0,896	0,82

Capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), Fração de macroporos ( $\phi_M$ ), fração de meso e microporos ( $\phi_m$ ), fração de água ligada ( $\phi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\phi_d$ ) e porosidade total ( $\phi_T$ ).

Tabela 1: Parâmetros físicos e morfológicos dos criogéis puros e funcionalizados com L-Ácido Aspártico.

De acordo com a tabela 1 o criogel apresentou uma capacidade de inchamento de 9,22 kg/kg, grau de expansão de 11,13 L/kg e uma porosidade de 82%, sendo 46% de macroporos, fato este muito importante quando se pretende ter uma coluna de cromatografia uma vez que estes poros permitem à adsorção de moléculas grandes e pequenas e que permite um bom escoamento do leito móvel sendo o extrato de biomoléculas ou até mesmo os tampões de eluição utilizados no processo, além de não entupir a coluna devido a impurezas nas amostras utilizadas.

Estes resultados corroboram com outros achados por outros autores que desenvolveram criogéis com outras formulações e obtiveram criogel com uma elevada porosidade por volta de 90% ((Arvidsson et al., 2002; Yao et al., 2006a).

### 3.2 Ensaios adsortivos

Para os ensaios foi utilizada uma solução de lisozima comercial numa concentração inicial de 0,991mg/mL. Após a adsorção foi observado que o valor de lisozima adsorvida no criogel aumentou proporcionalmente durante os testes. No primeiro dia 0,905mg/mL, segundo dia 0,806mg/mL e terceiro dia 0,726mg/mL. Logo, na tabela 2 nota-se que a capacidade adsortiva (q) nesse ensaio foi aumentando gradativamente durante os dias 1, 2 e 3.

Dia	L-Ácido aspártico/ q (mg/g)
1	8,55
2	18,53
3	26,51

Tabela 2: Capacidade adsortiva- q (mg/g).

Por se tratar de uma coluna monolítica de caráter catiônico, ou seja, apresenta em sua estrutura cargas negativas onde pode se ligar nessa coluna algum composto com cargas positivas. As proteínas ou enzimas apresentam em sua superfície cargas positivas e negativas, o pH determina como estas cargas se comportam em uma solução, logo, o pH é um fator importante no processo de adsorção.

Sendo assim é comum observar o ponto isoelétrico (pI) destas moléculas ao se estudar processos adsortivos. A lisozima da clara de ovo apresenta aproximadamente 11 (Katiyar et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2010). Deste modo, buscou-se utilizar um tampão com pH que não interfira nas forças eletrostáticas entre o adsorvente e adsorvato, logo, usou o tampão fosfato de sódio (PBS) com pH 7,2 a 20mM.

Em outros estudos de purificação de lisozima da clara de ovo de galinha notou-se a influencia do pH, onde em pH na faixa de 7,0 promoveu uma maior interação entre a molécula e suporte cromatográfico. No estudo realizado por Zhang et al., (2011) e Quan et al., (2008) usaram suportes ativados com Tris e obtiveram uma maior purificação desta enzima em pH 7,0.

Assim como no estudo realizado por Paganoto (2014) que também conseguiu um maior rendimento na purificação usando um pH de 7,0. No estudo realizado por Kubiak-Ossowska (2015) enfatiza que no pH7 a principal força motriz de adsorção é a eletrostática, complementada por forças hidrofóbicas mais fracas, sendo o melhor pH para a adsorção da lisozima.

De acordo com os dados da tabela 2 é possível observar que o criogel pAAm-Ácido aspártico possui uma capacidade adsortiva de 26,51mg/g, com 0,264mg/mL de lisozima adsorvida. Isso qualifica esta coluna como uma boa matriz para adsorção de lisozima da clara de ovo de galinha.

## 4 | CONCLUSÃO

A coluna monolítica supermacroporosa ativada com L-Arginina (pAAm-Arginina) de caráter aniônico possui características físicas e morfológicas adequadas para uma coluna de cromatografia. Nos ensaios de adsorção foi possível adsorver 0,265 mg/mL de enzima usando um tampão fosfato de sódio (20mM, pH 7,0).

## REFERÊNCIAS

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2002). *Journal of Chromatography A*, v.977, 27-38.

BHATTACHARYYA, M. S. et al. Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 47, p. 19928–19934, 2010.

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254, 1976.

GONÇALVES G. R. F., GANDOLFI O. R. R., SANTOS C. M. S., BONOMO R. C. F., VELOSO C. M., FONTAN R. C. I. (2016). Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B* 1033-1034, 406-412.

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. *Journal Chromatogr B*. 2017 Nov 15;1068-1069:71-77.

HANG, G.; CAO, Q.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Tris(hydroxymethyl)aminomethanemodified magnetic microspheres for rapid affinity purification of lysozyme. *Talanta*, v. 83, n. 5, p. 1515-1520, 2011. ISSN 0039-9140.

KATIYAR, A. et al. Adsorption of Bovine Serum Albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 80, n. 1–3, p. 311–320, 2005.

KUBIAK-OSSOWSKA K, CWIEKA M, KACZYNSKA A, JACHIMSKA B, MULHERAN PA. Adsorção de lisozima em superfície de sílica utilizando simulação e experimento: efeitos do pH na estrutura da camada proteica. *Phys Chem Chem Phys*. 2015 Outubro 7;17(37):24070-7.

NASCIMENTO I. S., SILVA D. L., PEREIRA T. B., GONCALVES G. R. F., VERÍSSIMO L. A. A., VELOSO C. M., ... & FONTAN R. C. I. (2019). Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(1), 313-324.

NASCIMENTO R.G., PORFÍRIO M.C.P., NASCIMENTO P.A. et al. A novel hydrophobic matrix grafted with aniline for protein capture and thermodynamic study of BSA adsorption. *Journal of Polymers and the Environment* 30, 3230–3238 (2022).

PAGANOTO, FS (2014). *Adsorção de lisozima por interação específica em um criogel supermacroporoso*. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

QUAN, L.; WEI, D.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F.; LAI, L. Resurveying the Tris buffer solution: The specific interaction between tris(hydroxymethyl)aminomethane and lysozyme. *Analytical Biochemistry*, v. 378, n. 2, p. 144-150, 2008. ISSN 0003-2697.

YAO K., SHEN S., YUN J., WANG L., HE X., YU X. (2006). In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. *Chemical Engineering Science*, v.61, 6701-6708.