



ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA

**APLICAÇÃO DE CRIOGÉIS FUNCIONALIZADOS COM
L-FENILALANINA NA ADSORÇÃO DE LISOZIMA POR
CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE HIDROFÓBICA**

**LAVRAS – MG
2020**

ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA

**APLICAÇÃO DE CRIOGÉIS FUNCIONALIZADOS COM
L-FENILALANINA NA ADSORÇÃO DE LISOZIMA POR
CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE HIDROFÓBICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, para a
obtenção do título de Mestre.

Dr. Jaime Vilela de Resende
Orientador
Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Meira, Ana Cristina Freitas de Oliveira.

Aplicação de criogéis funcionalizados com L-fenilalanina na
adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica /
Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira. - 2020.

75 p. : il.

Orientador(a): Jaime Vilela de Resende.

Coorientador(a): Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Lisozima. 2. Purificação. 3. Criogel. I. Resende, Jaime Vilela
de. II. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. III. Título.

ANA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA MEIRA

**APLICAÇÃO DE CRIOGÉIS FUNCIONALIZADOS COM
L-FENILALANINA NA ADSORÇÃO DE LIOSZIMA POR
CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE HIDROFÓBICA**

**APPLICATION OF CRYOGELS FUNCTIONED WITH L-
PHENYLALANINE IN THE LYSOZYME ADSORPTION BY
HYDROPHOBIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, para a
obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 06 de fevereiro de 2020.

Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

UFLA
UESB

Dr. Jaime Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

*À Deus que é o Senhor da minha vida.
Ao meu amor, Marcos.
Aos meus pais.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que é meu Senhor sempre guia minha vida e me fortalece perante aos desafios;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), pela estrutura e oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo ao mestrado, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Orientador Dr. Jaime Vilela de Resende pela colaboração, orientações e sugestões úteis durante a execução do projeto.

À Coorientadora Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo pela confiança, orientações e sugestões úteis durante a execução do projeto.

Ao professor Luis Antônio Minim por disponibilizar o laboratório para realização das análises no equipamento ÄKTA™ pure 25.

À professora Maria Irene Yoshida (UFMG) pela total disponibilidade em realizar as Análises Térmicas.

À Central de Análise e Prospecção Química da UFLA pela análise de infravermelho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA pela análise de microscopia eletrônica de varredura.

Ao meu marido Marcos, por todo amor, incentivo, conselhos e paciência;

Aos meus pais Adimar e Dalma que sempre estão ao meu lado me incentivando a alcançar meus sonhos;

Ao meu irmão Paulo Cesar e minha irmã Gabriela juntamente com seu marido Hudson e filhos Vitor Hugo e Higor, pelo carinho;

Aos amigos do Laboratório de Refrigeração de Alimentos, por todo auxílio na execução do trabalho, pela amizade e momentos de descontração;

Aos colegas, professores e técnicos dos demais laboratórios que cederam espaço ou material para realização de análises;

A todos que contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

*“Não fui eu que lhe ordenei?
Seja forte e corajoso! Não se
apavore, nem se desanime,
pois, o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você
andar”. Josué 1:9
(Bíblia Sagrada)*

RESUMO

Criogéis de poliacrilamida supermacroporosos são materiais poliméricos que tem se destacado entre os novos adsorventes desenvolvidos para o emprego em processos cromatográficos. Sua aplicação tem se estendido na purificação de diversas biomoléculas como a lisozima. Devido à sua ação antimicrobiana eficaz contra algumas bactérias, esta enzima é de grande interesse industrial. Este trabalho objetivou sintetizar criogéis de poliacrilamida, funcionaliza-los com o aminoácido L-fenilalanina e aplica-los na adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica em diferentes condições de força iônica, pH e tipo de sal. A melhor condição experimental de adsorção da lisozima foi empregada para a captura dessa enzima, em modo contínuo, a partir de solução contendo clara de ovo de galinha. Posteriormente, o criogel funcionalizado com L-fenilalanina (criogel-Phe) foi caracterizado quimicamente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), suas propriedades mecânicas, morfológicas (fração de macro, micro e mesoporos, fração de água ligada e polímero seco, capacidade de inchamento e grau de expansão), cristalinidade, propriedades térmicas (calorimetria exploratória diferencial, DSC e termogravimetria, TGA) e propriedade hidrodinâmica da coluna também foram analisadas. A melhor condição experimental para a adsorção da lisozima foi obtida ao se utilizar a solução salina de tiocianato de sódio $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0. Nessa condição, a capacidade adsortiva (q) do criogel-Phe foi de $67,65 \pm 1,52 \text{ mg g}^{-1}$. O FTIR confirmou a presença do aminoácido L-fenilalanina imobilizado no criogel-Phe, pois picos em 1716 cm^{-1} , 1475 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 1355 cm^{-1} indicaram a presença deste aminoácido e foi observado uma redução no pico 1100 cm^{-1} indicando que parte dos grupos epóxi disponíveis para imobilização de ligantes na superfície do criogel foram preenchidos. Além disso, a análise de Kjeldahl das soluções de L-fenilalanina antes e após contato com o criogel indicaram que houve uma imobilização de $458,65 \pm 40,59 \text{ mg}_{\text{fenilalanina}} \text{ g}_{\text{criogel}}^{-1}$. O criogel-Phe apresentou um módulo de Young de $526,71 \pm 27,21 \text{ kPa}$. As análises morfológicas indicaram alta porosidade (0,95) do material com poros entre $10 \mu\text{m}$ e $75 \mu\text{m}$. Pelo DRX o criogel-Phe apresentou características de um material amorfo. O DSC indicou uma temperatura de transição vítrea de $17,80 \text{ }^\circ\text{C}$ e a TGA indicou que o início da degradação térmica ocorreu após $200 \text{ }^\circ\text{C}$. A coluna exibiu uma permeabilidade hidráulica de $4,15 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, um coeficiente de dispersão axial variando de 10^{-7} a $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e altura equivalente a um prato teórico (HETP) entre 0,10 e 0,21 cm. Concluiu-se que o criogel-Phe é um material eficaz na captura de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica, pois foi obtido um fator de purificação de 11,49, uma recuperação de 31,66% de lisozima com pureza de 87,92% e atividade enzimática de $1294,17 \text{ U mL}^{-1}$. Além disso, este suporte apresentou alta resistência mecânica e térmicas, elevada porosidade, baixa dispersão axial e alta permeabilidade hidráulica, sendo um adsorvente atraente para ser empregado na purificação desta biomolécula.

Palavras-chaves: lisozima. purificação. criogel.

ABSTRACT

Supermacroporous polyacrylamide cryogels are polymeric materials that have stood out among the new adsorbents developed for use in chromatographic processes. Its application has extended to the purification of several biomolecules such as lysozyme. Due to its effective antimicrobial action against some bacteria, this enzyme is of great industrial interest. This work aimed to synthesize polyacrylamide cryogels, functionalize them with the amino acid L-phenylalanine and apply them to lysozyme adsorption by hydrophobic affinity chromatography under different conditions of ionic strength, pH and type of salt. The best experimental condition for lysozyme adsorption was used to capture this enzyme, in continuous mode, from a solution containing chicken egg white. Subsequently, the cryogel functionalized with L-phenylalanine (cryogel-Phe) was chemically characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), its mechanical and morphological properties (macro, micro and mesoporous fraction, bound water fraction and dry polymer, swelling capacity and degree of expansion), crystallinity, thermal properties (differential scanning calorimetry, DSC and thermogravimetry, TGA) and hydrodynamic properties of the column were also analyzed. The best experimental condition for lysozyme adsorption was obtained by using sodium thiocyanate saline solution 0.025 mol L^{-1} at pH 5.0. In this condition, the adsorptive capacity (q) of the cryogel-Phe was $67.65 \pm 1.52 \text{ mg g}^{-1}$. FTIR confirmed the presence of the amino acid L-phenylalanine immobilized in the cryogel-Phe, since peaks at 1716 cm^{-1} , 1475 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} and 1355 cm^{-1} indicated the presence of this amino acid and a reduction in the peak at 1100 cm^{-1} was observed indicating that part of the epoxy groups available for immobilization of ligands on the cryogel surface were filled. In addition, Kjeldahl's analysis of L-phenylalanine solutions before and after contact with the cryogel indicated an immobilization of $458.65 \pm 40.59 \text{ mg}_{\text{phenylalanine}} \text{ g}_{\text{cryogel}}^{-1}$. The cryogel-Phe showed a Young's modulus of $526.71 \pm 27.21 \text{ kPa}$. Morphological analyzes indicated high porosity (0.95) of the material with pores between $10 \mu\text{m}$ and $75 \mu\text{m}$. By XRD the cryogel-Phe showed characteristics of an amorphous material. DSC indicated a glass transition temperature of $17.80 \text{ }^\circ\text{C}$ and the TGA indicated that the onset of thermal degradation occurred after $200 \text{ }^\circ\text{C}$. The column exhibited a hydraulic permeability of $4.15 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, an axial dispersion coefficient ranging from 10^{-7} to $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and height equivalent to a theoretical plate (HETP) between 0.10 and 0.21 cm. It was concluded that the cryogel-Phe is an effective material in the capture of lysozyme by hydrophobic affinity chromatography, because a purification factor of 11.49, a recovery of 31.66% of lysozyme with a purity of 87.92% and enzymatic activity of $1294.17 \text{ U mL}^{-1}$ was obtained. In addition, this support showed high mechanical and thermal resistance, high porosity, low axial dispersion and high hydraulic permeability, being an attractive adsorbent to be used in the purification of this biomolecule.

Keywords: lysozyme. purification. cryogel.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Ácido N-acetil-murâmico (a) e N-acetil-D-glicosamina (b)	16
Figura 2 - Estrutura de lisozima de clara de ovo de galinha, difração de raio-x com resolução de 1.65 Å.....	17
Figura 3 – Síntese do criogel	20
Figura 4 - Imobilização por método glutaraldeído	21
Figura 5 - Série de Hofmeister	23
Figura 6 - Interação hidrofóbica ligante e proteína.....	25
Figura 7 - Aminoácido L-fenilalanina	27

SEGUNDA PARTE

Figura 1 - Representação da estrutura do criogel imobilizado com L-fenilalanina.....	46
Figura 2 - Espectros de FTIR criogel puro e do criogel-Phe: (a) espectro completo, (b) destaque para a região 1800 – 1070 cm^{-1}	560
Figura 3 - Perfil de adsorção da purificação de lisozima a partir de uma solução de CEW contendo 7,97 mg mL^{-1} de proteínas totais e 0,61 mg mL^{-1} de lisozima usando a coluna criogel-Phe em um sistema cromatográfico Äkta™ pure 25 à temperatura de 25 °C. A coluna foi equilibrada com solução salina de tiocianato de sódio 0,025 mol L^{-1} , pH 5,0 e a eluição com ácido acético (1%).....	60
Figura 4 - Análise de SDS-PAGE da lisozima purificada da clara de ovo pela coluna de criogel-Phe usando cromatografia com eluição isocrática. (1) lisozima pura (1 mg mL^{-1}); (2) Solução inicial de CEW diluída 1:4; (3) e (4) frações do pico eluidos da coluna de criogel-Phe)	61
Figura 5 - Curvas obtidas em diferentes velocidades de fluxo ($1,06 \times 10^{-4}$ a $1,06 \times 10^{-3}$ m s^{-1}): (a) Queda de pressão ao longo da coluna criogel-Phe, (b) Curvas adimensionais E_0 , (c) Variação do tempo de residência na coluna criogel-Phe	63
Figura 6 - Micrografia do criogel-Phe (magnificação $\times 600$).	64
Figura 7 - Curvas de TGA e DTG: (a) criogel puro, (b) criogel-Phe	67
Figura 8 – Curvas de DSC do criogel puro e criogel-Phe.....	68
Figura 9 – Curvas de DRX para criogel puro e criogel-Phe	69

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Fatorial completo empregados nos ensaios de adsorção de lisozima em batelada	48
Tabela 2 - Conteúdo de lisozima adsorvida no criogel-Phe (q) em função das diferenças condições de forças iônica e pH, à temperatura de 25 °C. Concentração inicial de solução de lisozima = 1 mg mL ⁻¹	58
Tabela 3 - Purificação de lisozima de CEW usando o criogel-Phe utilizando uma vazão de 1 mL min ⁻¹ , à temperatura de 25 °C.	61
Tabela 4 - Caracterização morfológicas do criogel-Phe e criogel puro (controle).....	65

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Abs	Absorbância registrada
AAm	Acrilamida
MBAam	N,N'- metileno(bis)acrilamida
AGE	Alil glicidil éter
APS	Persulfato de amônio
HIC	Cromatografia de Interação Hidrofóbica
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
TGA	Análise termogravimétricas
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DRX	Difração de Raios-X
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
UV	Ultravioleta
VC	Volumes de coluna
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CEW	Clara de ovo de galinha
RTD	Distribuição do tempo de residência
S	Capacidade de inchamento
ϕ_{wb}	Fração de água ligada
ϕ_d	Fração de polímero seco
ϕ_M	Fração de macroporos
ϕ_m	Fração de meso e microporos
ϕ_T	Porosidade total
E	Módulo de Young
ED	Grau de expansão
ρ_w	Massa específica da água destilada
q	Capacidade adsortiva
D_{ax}	Coefficiente de dispersão axial
$\frac{D_{ax}}{uL}$	Número de dispersão
$HETP$	Altura equivalente de prato teórico
K_w	Permeabilidade ao escoamento (m ²)
ϵ_{730}	Absortividade molar a 730 nm
m/v	Massa por volume
t_R	Tempo de retenção
ΔP_w	Queda de pressão através da coluna (Pa)
σ^2	Variância do pulso observado (s ²)
μ_w	Viscosidade da água (Pa s ⁻¹)
q	Capacidade de adsorção (mg g ⁻¹)
m_d	Massa do criogel desidratado (g)
m_w	Massa do criogel saturado com água (g)
m_s	Massa do criogel hidratado (g)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Lisozima.....	16
2.2 Adsorventes	18
2.2.1 Criogéis.....	19
2.2.1.1 Funcionalização dos criogéis	20
2.3 Processo cromatográfico	21
2.3.1 Processos cromatográficos que exploram a interação hidrofóbica	22
3. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
SEGUNDA PARTE: ARTIGO.....	41
APÊNDICES	75

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A demanda por biomoléculas purificadas, pelas indústrias de alimentos e farmacêutica é cada vez maior, exigindo o desenvolvimento de técnicas e protocolos que mantenham a atividade biológica desses compostos (GUIOCHON; BEAVER, 2011). Dentre as moléculas de interesse encontra-se a lisozima, uma pequena enzima com ação bacteriostática, encontrada em fluidos de humanos e animais (TÜRKMEN; DENIZLI, 2014). Esta enzima atua catalisando a hidrólise de peptidoglicanos da parede celular de bactérias e algumas tem ação sobre a quitina presente na parede celular de fungos (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984). Devido à essa propriedade, a lisozima é um dos poucos agentes antimicrobianos naturais que podem ser aplicados para conservação de alimentos (LIBURDI et al., 2016). Além disso, esta proteína ainda tem sido aplicada na elaboração de remédios anticancerígenos (UYGUN et al., 2009), tratamento de úlceras, infecções (GHOSH; SILVA; CUI, 2000) e tratamento de HIV (HARTONO et al., 2011; YE et al., 2008).

A aplicação de lisozima na indústria de alimentos é permitida, visto que o Departamento de Saúde e Serviços Humanos da *Food and Drug Administration* a considera segura (FDA, 1998). Porém, sua utilização como aditivo alimentar deve seguir os critérios de pureza estabelecidos pelo Regulamento da Comissão Europeia (EC Regulation No. 231/2012, Commission Regulation, 2012). Para atingir o grau de pureza necessário deve-se aplicar um processo de separação adequado. Entre os métodos utilizados, a cromatografia preparativa tem se destacado, por ser uma técnica que compromete pouco a atividade biológica das moléculas e possibilita um alto grau de pureza (GUIOCHON, 2002).

Os criogéis supermacroporosos é um material cromatográfico consolidado que pode ser aplicado na purificação de biocompostos. Esta matriz é formada por uma rede polimérica contínua com poros interconectados variando de 10 a 100 μm de tamanho (PERÇIN et al., 2015). Sua produção é realizada entre $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante o congelamento uma solução contendo monômeros forma um gel entre os cristais de gelo, originando uma estrutura polimérica tridimensional (HAJIZADEH et al., 2012). Este material tem sido aplicada na separação e purificação de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, células, organelas celulares e vírus (LOZINSKY et al., 2002; YAO et al., 2006a).

A elevada macroporosidade dos criogéis provoca redução na área superficial disponível para adsorção de biomoléculas. Para driblar este problema grupos funcionais podem ser introduzidos em sua superfície, visando aumentar a eficiência de separação (MACHADO et al., 2015; SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005). As características do composto imobilizado no criogel determinará a técnica cromatográfica aplicada no processo.

A purificação de lisozima empregando criogéis de poliacrilamida tem sido reportada em vários trabalhos aplicando criogéis de afinidade (MOL et al., 2017; VERÍSSIMO et al., 2017), criogéis de troca iônica (YAN et al., 2011), criogéis hidrofóbicos (OLIVEIRA et al., 2019; YILMAZ et al., 2009), entre outros. Já a utilização desta matriz funcionalizada com aminoácidos hidrofóbicos tem sido pouco relatada, sendo uma área interessante a ser explorada, pois estes ligantes são estáveis e possuem baixo custo (DEMIRÇELIK; PERÇIN; DENIZLI, 2017). Além disso, separação envolvendo interação hidrofóbica conservam a atividade biológica das moléculas (WESTON; BROWN, 1997).

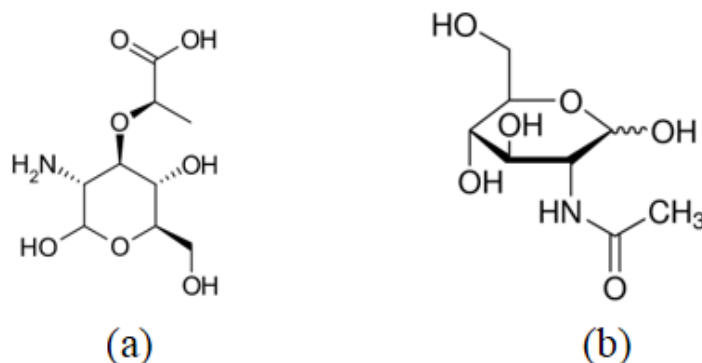
Neste contexto, este trabalho teve por objetivo a síntese e caracterização de um criogel de poliacrilamida funcionalizado com aminoácido L-fenilalanina, e posterior aplicação na purificação de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lisozima

A lisozima (E.C.3.2.1.17) é uma enzima pequena com massa molecular de 14,3 kDa, constituída por 129 aminoácidos reticulados por quatro ligações dissulfeto (MINE; MA; LAURIAU, 2004) e possui ponto isoelétrico de 10,7 (MINE, 1995). Esta proteína catalisa a hidrólise da ligação glicosídica- β -(1-4) entre o ácido N-acetil-murâmico (Figura 1a) e a N-acetil-D-glicosamina (Figura 1b), presentes na parede celular das bactérias gram positivas (CUNNINGHAM, 1991; TÜRKMEN; DENIZLI, 2014; YEH et al., 1997). Esta propriedade permite sua ampla utilização como conservante na indústria de alimentos (CUNNINGHAM, 1991; MASSACHALCK; MICHIELS, 2003; SILVETTI et al., 2017). Além disso, a lisozima tem sido aplicada em remédios contra câncer (YE et al., 2008), tratamentos contra a síndrome da imunodeficiência adquirida (HARTONO et al., 2011), úlceras, infecções e tratamentos oftalmológicos (GHOSH; SILVA; CUI, 2000).

Figura 1 - Ácido N-acetil-murâmico (a) e N-acetil-D-glicosamina (b)



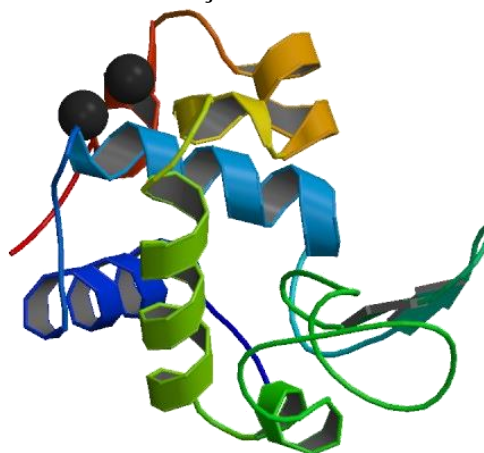
Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3286?lang=pt®ion=BR>

A ação antimicrobiana da lisozima é efetiva sobre as bactérias gram positivas, visto que os componentes hidrolisados por ela predominam nestas bactérias (HASHEMI; AMINLARI; MOOSAVINASAB, 2014). Sua ação foi observada no controle do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*, e outros microrganismos patogênicos gram positivos que podem crescer em alimentos (CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA; LEŚNIEWSKI; KIJOWSKI, 2008). Já para as bactérias gram negativas, como *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, que possuem uma parede celular contendo lipopolissacarídeos protetor, a ação da lisozima é fraca (WU et al., 2017).

Esta proteína também é conhecida como muramidase ou N-acetil-murâmico hidrolase (TÜRKMEN; DENIZLI, 2014). Sua descoberta foi ocasionada a partir de estudos realizados por Alexander Fleming em 1922, em que ao aplicar mucosa nasal em um meio de cultivo, percebeu inibição do crescimento bacteriano (FLEMING, 1922). A lisozima também pode ser encontrada em plantas, bactérias, leite, lágrimas, saliva e no ovo (AMINLARI; MOHAMMADI HASHEMI; AMINLARI, 2014; CÖMERT; ODABAŞI, 2014; TÜRKMEN; DENIZLI, 2014). A clara de ovo é uma fonte natural rica em lisozima, representando de 3 a 4 % das proteínas totais da clara (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013).

Devido sua fonte abundante e características funcionais a lisozima da clara de ovo de galinha (Figura 2) tem ganhado atenção e sido amplamente empregada em pesquisas e no setor industrial (JIANG et al., 2017).

Figura 2 - Estrutura de lisozima de clara de ovo de galinha, difração de raio-x com resolução de 1.65 Å



Fonte: <http://www.rcsb.org/structure/1DPX>

Na indústria de alimentos, a lisozima pode ser aplicada na preservação de carne suína (HUANG et al., 2012), presunto e mortadela (GILL; HOLLEY, 2000), atum e salmão (TAKAHASHI et al., 2011), queijo, picles, sushi e macarrão chinês (MINE; MA; LAURIAU, 2004). Ainda pode ser utilizada no processo de fabricação de vinho (LIBURDI et al., 2016) e na elaboração de filmes antimicrobianas (CORRADINI et al., 2013; MECITOĞLU et al., 2006). Apesar das diversas possibilidades de aplicações desta enzima, sua obtenção purificada a partir de clara de ovo possui alto custo de recuperação e baixa atividade enzimática (ERCAN; DEMIRCI, 2016) limitando assim sua utilização na indústria de alimentos.

Na literatura é relatada a purificação de lisozima por diferentes métodos como precipitação (CHANG; YANG; CHANG, 2000), centrifugação (GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005), ultrafiltração (WAN; LU; CUI, 2006), cromatografia (BAI et al., 2011), entre outros. No campo da cromatografia, pesquisas envolvendo materiais adsorventes têm sido desenvolvidas para obtenção de lisozima purificada em grande escala e custo reduzido.

2.2 Adsorventes

Os adsorventes são materiais utilizados como dessecantes, suporte de catalisadores e podem ser aplicados na purificação de líquidos, separação de gases, controle de poluição e ainda possuem papel em mecanismos biológicos (ROUQUEROL; ROUQUEROL; SING, 1999). Eles promovem adsorção por quimissorção ou fisissorção. O primeiro promove a ligação química entre o adsorvato e os pontos ativos presentes na superfície do adsorvente, enquanto o segundo é um processo reversível onde o adsorvato interage com o adsorvente por meio de forças atrativas fracas (DĄBROWSKI, 2001).

Além disso, os adsorventes podem ser empregados como fase estacionária na separação de biomoléculas por meio de técnicas cromatográficas. Ao escolher adsorventes que serão aplicados em processos cromatográficos, deve-se observar algumas características como a área superficial, custo, morfologia, permeabilidade, estabilidade química e mecânica, densidade de grupos reativos presentes na superfície do material e outros (CLAESSENS, 1998; MENDES et al., 2011).

Dentre os adsorventes disponíveis comercialmente e em escala laboratorial, os monólitos têm se destacado. Eles são moldados em um bloco único, com poros interconectados, que promovem uma menor resistência ao fluxo (HAHN et al., 2001) e apresentam alta performance (ANDAÇ; BAYDEMIR; DENIZLI, 2018), sendo bastante explorada a sua aplicação como matrizes em cromatografia líquida preparativa, principalmente quando a fase móvel se trata de extratos brutos com alta viscosidade e até contendo materiais particulados (ARVIDSSON et al., 2003; SILVA et al., 2019).

Os monólitos podem ser constituídos de duas categorias gerais de polímeros: os orgânicos e a sílica (FARIA et al., 2006). Proveniente de polímeros orgânicos, os criogéis de poliacrilamida têm sido amplamente empregados em cromatografia preparativa visando alto grau de pureza em biomoléculas de interesse (GUIOCHON, 2002).

2.2.1 Criogéis

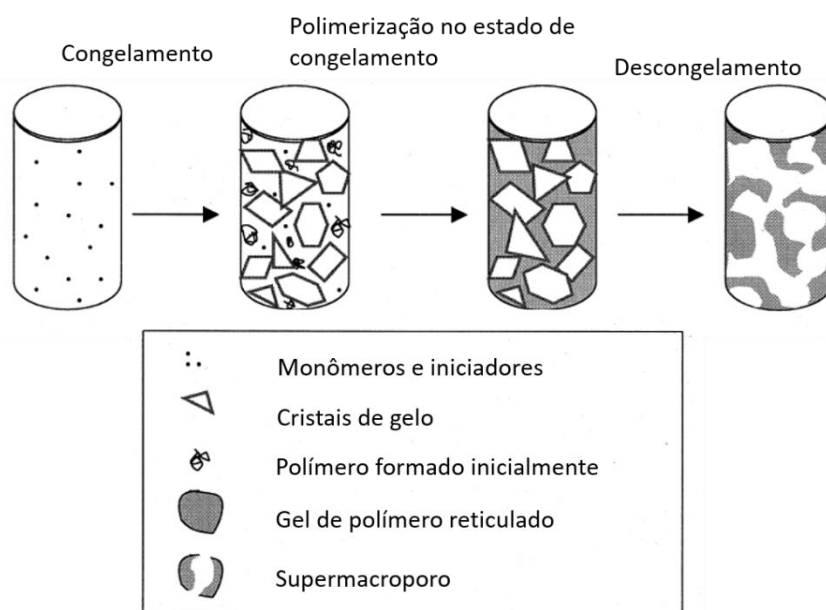
Os criogéis são matrizes cromatográficas consolidadas aplicadas na purificação de biomoléculas. Este material é sintetizado submetendo uma mistura de solvente e precursores monoméricos ou poliméricos, a temperaturas abaixo de 0 °C, para a ocorrência da criopolimerização e o crescimento de cristais de gelo que após o descongelamento dão origem aos poros (JAIN; KUMAR, 2013). Esse material se destaca por apresentar poros de até 100 µm, boa compatibilidade biológica e alta resistência mecânica (GAO et al., 2013). Ainda, são materiais de baixo custo (ÇIMEN; TÜRKMEN; DENIZLI, 2016) que apresentam baixa resistência ao fluxo, sendo ideais para a purificação de macromoléculas (GONÇALVES et al., 2016).

A polimerização dos criogéis é realizada *in situ* de forma que cada unidade sintetizada é única (FONTAN, 2013). Após sua produção sob baixas temperaturas (-12 °C a -18 °C), o criogel é descongelado, resultando em um monólito com rede polimérica contendo poros interconectados (HAJIZADEH et al., 2012). Por apresentar uma rede com grandes poros, os criogéis poliméricos possuem menor área superficial disponível, em comparação às colunas de leito fixo tradicionais (FONTAN, 2013; VERÍSSIMO et al., 2017), resultando em menor eficiência de purificação. Para minimizar este problema os criogéis podem ser funcionalizados.

Na elaboração dos criogéis, pode-se empregar diferentes monômeros e funcionalizá-los com diferentes ligantes, originando uma grande variedade de matrizes. A literatura relata criogéis de gelatina (SHALUMON et al., 2018), poli(vinil álcool) (BOBER et al., 2019), poliacrilamida (OLIVEIRA et al., 2019; PLIEVA et al., 2004a), poli(glicil metacrilato) (ALTINTAŞ et al., 2007), poli(2-hidroxietil metacrilato) (KÖSE et al., 2017; TÜRKMEN; DENIZLI, 2014), quitosana (ACET et al., 2018) e outros.

Os criogéis de poliacrilamida são compostos por acrilamida (monômero de estrutura), N,N-metileno-bis-acrilamida (monômero de ligação) e/ou outro monômero de interesse como o alil glicidil eter (AGE) ou 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA). Além disso, são adicionados os catalisadores persulfato de amônio (APS) e tetrametiletenodiamina (TEMED) (PLIEVA et al., 2004a, 2004b). A polimerização desta matriz ocorre entre -12 °C a -18 °C. Após o descongelamento dos cristais de gelo tem-se uma rede polimérica com poros interconectados (ANDAÇ; BAYDEMIR; DENIZLI, 2018), como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Síntese do criogel



Fonte: PLIEVA et al. (2004a)

Alguns trabalhos reportaram a aplicação de criogéis de poliacrilamida supermacroporos na purificação de algumas biomoléculas como a lisozima (CHAVES et al., 2019; MOL et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; VERÍSSIMO et al., 2017), a lectina (GONÇALVES et al., 2016; SILVA et al., 2019), a albumina de soro bovina (YAO et al., 2006b), a lactoferrina (CARVALHO et al., 2014) e a α -lactoalbumina (MACHADO et al., 2015), demonstrando portanto, sua aplicação na obtenção de biomoléculas purificadas.

2.2.1.1 Funcionalização dos criogéis

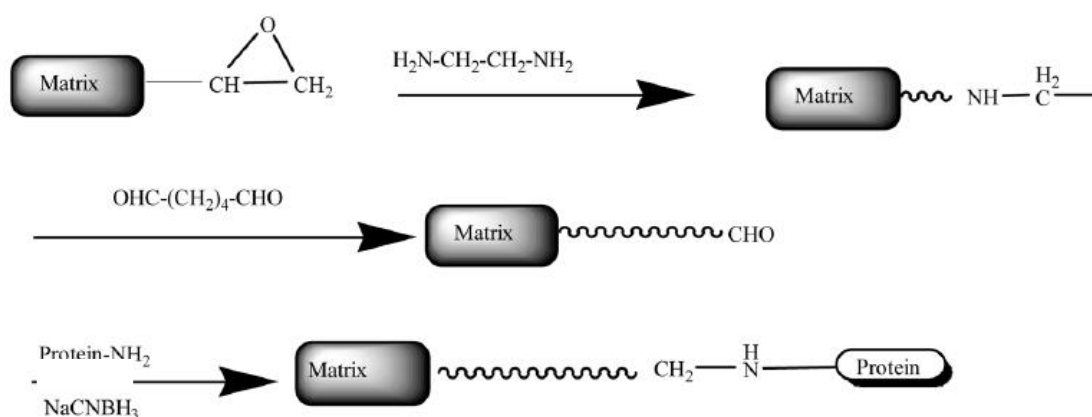
Visando aumentar o desempenho dos criogéis grupos funcionais são introduzidos em sua estrutura resultando em melhorias na capacidade de adsorção (MACHADO et al., 2015; SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005). A funcionalização pode ser realizada imobilizando covalentemente um ligante na superfície do criogel por meio dos métodos epóxi, base de Schiff, glutaraldeído, carbonildiimidazole (CDI), carbonato de di-succinimidil (DSC), hidrazida e brometo de cianogênio (CNBR) (MALLIK; HAGE, 2006).

No método glutaraldeído, um braço espaçador (*spacer arm*) compreendido entre ligante imobilizado e a matriz é construído. Evitando assim, a ocorrência de impedimento estérico, que é comumente ocasionado quando utiliza-se um ligante de pequeno tamanho

molecular e um soluto de tamanho superior (LUO et al., 2002). Sendo ideal para funcionalização de matrizes que serão utilizadas na purificação de macromoléculas biológicas.

As etapas de funcionalização via método glutaraldeído são representadas de forma esquemática na Figura 4. A presença do monômero alil glicidil eter (AGE) adicionado como terceiro monômero na constituição da rede polimérica, disponibiliza grupos epóxi reativos na superfície do criogel (ARVIDSSON et al., 2003). Eles são capazes de interagir com grupos aminas de substâncias como hexaetilenodiamina (LUO et al., 2002) ou etilenodiamina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996), se tornando um criogel amina-ativada. Em contato com uma solução contendo um dialdeído (como glutaraldeído, por exemplo), este se transformará em um criogel aldeído-ativado, que por sua vez está apto a imobilizar ligantes contendo grupamentos amina, como os aminoácidos ou proteínas. Os aminoácidos simples, devido sua seletividade, são ligantes eficientes na purificação de proteínas (LUO et al., 2002).

Figura 4 - Imobilização por método glutaraldeído



Fonte: Adaptado MALLIK; HAGE (2006)

2.3 Processo cromatográfico

Os processos cromatográficos são técnicas de separação que visam isolar componentes de interesse presentes em uma mistura. O sistema cromatográfico é composto pelas fases móvel e estacionária, a separação explora a interação desses compostos com estas fases (POOLE, 2003). Os componentes retidos fortemente na fase estacionária movem-se lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto os componentes retidos fracamente movem-se rapidamente. A diferença de mobilidade promove a

separação dos componentes em frações que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico e a fase estacionária pode ser disposta em uma superfície plana ou colocada em um tubo cilíndrico formando colunas que podem ser preparativas (diâmetro varia de 6 a 50 mm), analíticas (diâmetro varia de 2 a 6 mm) e com microdiâmetro (diâmetros < 2 mm) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Além disso, podem ser empregados mecanismos de separação físicos (adsorção ou partição), químicos (troca iônica ou bioafinidade) e mecânico (exclusão) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Tendo em vista a diversidade de parâmetros há vários tipos de cromatografia, a cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia em fluido supercrítico, cromatografia líquida clássica (CLC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC), entre outros. A escolha do método cromatográfico empregado depende das características da molécula alvo e das interações envolvidas com o ligante.

Quando a molécula de interesse é uma proteína a cromatografia líquida é empregada visando sua obtenção purificada. Por se tratar de uma biomolécula que possui áreas apolares em sua estrutura a adsorção por interação hidrofóbica é um mecanismo de separação que pode ser empregado. Essa técnica tem grande potencial na purificação de proteínas visto que é uma técnica de biosseparação estabelecida e poderosa em escala de laboratório, bem como em escala industrial (BOSCHETTI, 2002). Além disso, pode ser uma técnica complementar a outros processos cromatográficos como a cromatografia de troca iônica, exclusão por tamanho e afinidade (HAIMER et al., 2007).

2.3.1 Processos cromatográficos que exploram a interação hidrofóbica

A cromatográfica por interação hidrofóbica (HIC) explora a ligação reversível entre um ligante hidrofóbico e as áreas hidrofóbicas de um soluto (FAUSNAUGH; REGNIER, 2007; MELANDER; HORVATH, 1977).

O primeiro relato da cromatográfica de interação hidrofóbica e sua base como método de separação foi feito por Tiselius (1948). A esta técnica foi atribuído o termo de cromatografia de “*salting-out*” devido à influência do sal no processo. No ano seguinte Shepard e Tiselius (1949) também relataram a adsorção de proteína em suporte sólido na presença de sal. A denominação cromatografia de interação hidrofóbica foi introduzida por Hjertén em 1973. Ao realizar experimentos Porath et al. (1973) reafirmou que

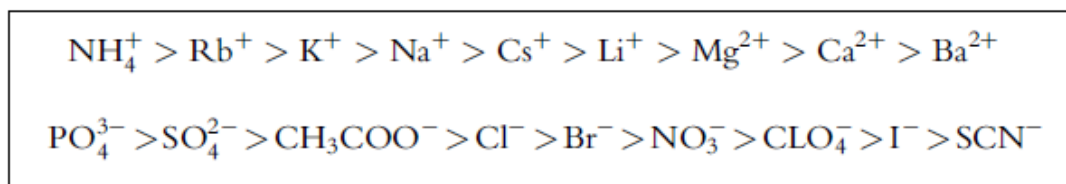
incrementos de sal como por exemplo o cloreto de sódio e sulfato de sódio, favoreciam a adsorção hidrofóbica, denominando o processo de “adsorção promovida pelo sal”. O primeiro modelo termodinâmico criado para explicar a HIC foi proposto por Melander e Horvath (1977), entretanto este modelo não foi considerado válido para ampla faixa de concentração salina (LIENQUEO et al., 2007).

Staby e Mollerup (1996), ao avaliar o comportamento de retenção de lisozima por HIC propuseram um modelo mais completo que descreve uma faixa maior de concentração de sal e relaciona a atividade biológica desta proteína na fase móvel e estacionária. Outras teorias como a de modelo preferencial formulada por Perkins et al. (1997) que relaciona o número de moléculas de água e íons livres durante a retenção de proteína por HIC também foram postuladas.

Acredita-se que os íons salinos atuam alterando a distribuição da água em volta do soluto e dos ligantes presente na fase estacionária segundo a série de Hofmeister (MELANDER; HORVATH, 1977; PAHLMANN; ROSENGREN; HJERTÉN, 1977). Esta série foi elaborada a partir de experimentos realizadas por Franz Hofmeister em 1888, onde foi observado a capacidade dos sais em precipitarem (*salting-out*) ou dissolverem (*salting-in*) proteínas da clara de ovo. Ao analisar os sais Hofmeister observou ainda que os ânions possuem efeito mais pronunciado que os cátions (HOFMEISTER, 1888).

É relatado que o *salting-out* é promovido pelos íons cosmotrópicos que atuam incrementando a interação hidrofóbica entre as superfícies, enquanto o *salting-in* ocorre devido aos íons caotrópicos que promovem o decréscimo desta interação (TOMAZ, 2017). A Figura 5 apresenta os cátions e ânions classificados em ordem decrescente de contribuição na interação hidrofóbica.

Figura 5 - Série de Hofmeister



Fonte: McCue (2009)

O efeito dos íons sobre a estrutura da água é explicada pela habilidade dos íons pequenos (cosmotrópicos) em promoverem a quebra das ligações de hidrogênio devido

sua alta densidade de carga em contraste com os íons grande (caotrópicos) que favorecem as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água (PARSONS et al., 2011; ZHANG; CREMER, 2010).

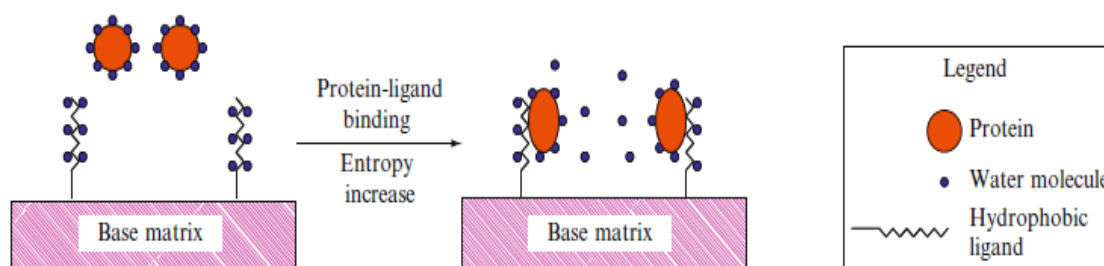
Entretanto experimentos com vibração ultrarrápida (OMTA et al., 2003), absorção de raio-x (CAPPA et al., 2005), espectroscopia de absorção Raman (SMITH; SAYKALLY; GEISLER, 2007), e espectroscopia terahertz (SCHMIDT et al., 2009) sugerem que os íons não influenciam a estrutura da água além da primeira camada de hidratação. Alguns grupos de pesquisas ainda tem demonstrado alterações e reversão da série de Hofmeister (AOKI; SHIRAKI; HATTORI, 2016; CARBONNAUX; RIES-KAUTT; DUCRUIX, 1995; RIES-KAUTT; DUCRUIX, 1989; SALIS; BHATTACHARYYA; MONDUZZI, 2010; TARDIEU et al., 1999; ZHANG; CREMER, 2009). Além disso, não há explicações sobre o efeito dos íons nas propriedades de dobragem e desdobragem das proteínas (KUMAR; VENKATESU, 2014). Neste contexto, a influência dos íons salinos em solução contendo macromoléculas tem sido atribuída a fatores interfaciais que envolvem a interação direta de íon com a interface macromoléculas e água (JUNGWIRTH; WINTER, 2008; ZHANG; CREMER, 2006) e não apenas a interação dos íons com as moléculas de água.

A reversão da série foi observada quando aplicado baixas concentrações salinas (ZHANG; CREMER, 2009) e em determinados valores de pH. Nos estudos de Hofmeister, o pH não foi considerado como um fator importante para a ordenação da série, pois o conceito de pH ainda era desconhecido (ZHANG; CREMER, 2010). Porém, anos posteriores e com a definição deste conceito, foi observado sua influência sobre a série dos íons. DUCRUIX et al. (1996) e FINET et al. (2004) relatam que quando a proteína está em solução cujo pH é maior que o seu ponto isoelétrico (pI), a adsorção é influenciada pelos ânions seguindo uma ordem direta na série de Hofmeister, porém, quando o pH da solução é menor que o pI da proteína, os ânions atuam seguindo uma ordem inversa de Hofmeister. Isto ocorre porque em valores de $\text{pH} < \text{pI}$ as proteínas protonadas adsorvem os íons altamente polarizados (como SCN^{-1}) em sua superfície (BOSTRÖM et al., 2005), gerando uma orientação mais fraca das moléculas de água envolta da superfície da proteína, comparada a orientação ocasionado pela presença dos ânions cosmotrópicos. Logo, uma orientação mais fracas das moléculas de água resultam em uma hidratação fraca da proteína (FLORES; KHERB; CREMER, 2012), assim a interação hidrofóbica entre proteína e superfície é favorecida. Observa-se uma complexidade em se trabalhar com biomoléculas e a necessidade de empregar

corretamente as condições de processo cromatográficos que exploram a interação hidrofóbica.

A interação hidrofóbica ocorre entre as áreas hidrofóbicas de uma proteína e os ligantes hidrofóbicos presentes em uma matriz cromatográfica (Figura 6). Esta interação é termodinamicamente favorável, pois as moléculas de água que envolvem as áreas hidrofóbicas são deslocadas causando um aumento da entropia configuracional e redução da energia livre de Gibbs (TOMAZ, 2017).

Figura 6 - Interação hidrofóbica ligante e proteína



Fonte: McCue (2009)

A eficiência desta técnica de separação é afetada pela hidrofobicidade das moléculas, pelas propriedades da fase estacionária (matriz e ligante), da fase móvel (pH, tipo e concentração de sal) e pela temperatura aplicada durante o processo (TOMAZ, 2017). A presença de sal na fase móvel, normalmente, induz a proteína na direção da fase estacionária (CREASY et al., 2018). Entretanto, a concentração e tipo de sal utilizada depende do sistema adsorvente-proteína (HACKEMANN; HASSE, 2017).

Aminoácidos hidrofóbicos como a alanina, metionina, triptofano e fenilalanina podem ser empregados como ligantes na fase estacionária (PITIOT et al., 2000). Estes ligantes são denominados de pseudo-específicos (KIM et al., 1991a) ou pseudo-bioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1993). Eles são estáveis, de baixo custo (DEMIRÇELIK; PERÇIN; DENIZLI, 2017) e pertencem a família de ligantes de afinidade fraca (PITIOT et al., 2000), pois apresentam baixa constante de ligação e sua seletividade é resultado de múltiplos eventos como ligação eletrostática, hidrofóbica, ligação de hidrogênio e interações de Van der Waals com cinética rápida (ÖNCEL et al., 2005).

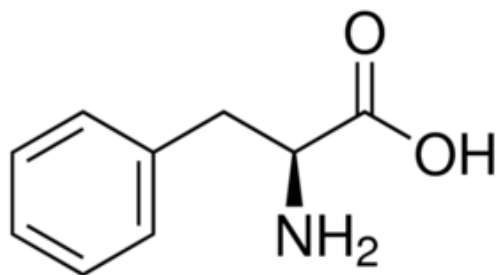
O aminoácido L-fenilalanina tem sido empregado como ligante pseudo-específico para isolamento de biomoléculas (KIM et al., 1991b, 1991a). Por apresentar um grupamento amina em sua estrutura (Figura 7) este aminoácido pode ser imobilizado

na superfície dos criogéis de poliacrilamida funcionalizados pelo método glutaraldeído. Assim haverá livre uma cadeia lateral apolar e uma extremidade polar. Provavelmente a interação deste ligante com as proteínas ocorre principalmente pela contribuição da cadeia lateral apolar (grupo aromático) que promoverá interação hidrofóbica e há uma ligeira interação eletrostática ocasionada pelo grupamento carboxila (COOH), semelhante as observações feitas por HOFSTEE (1973) para aminoácido triptofano e ao observado por VIJAYALAKSHMI (1993) quando utilizou como ligante a histidina, um aminoácido levemente hidrofóbico.

Um adsorvente contendo L-fenilalanina como ligante promoverá uma afinidade hidrofóbica elevada, por se tratar de um aminoácido com cadeia lateral com alta hidrofobicidade, sua aplicação em processos cromatográficos pode ser denominada de Cromatografia de Afinidade Hidrofóbica. Esta técnica foi empregada na purificação de diferentes proteínas como a ATP sintase (SCHNEIDER; ALTENDORF, 1982), albumina de soro bovina, β -lactoglobulina, ovalbumina, α -quimotripsina, quimotripsinogênio A e γ -globulina presentes em uma mistura proteica (HOFSTEE, 1973), penicilina acilase (DEMIRÇELIK; PERÇIN; DENIZLI, 2017), lipase (ÜNLÜER; ÖZCAN; UZUN, 2014), lisozima (OLIVEIRA et al., 2019; YILMAZ et al., 2009), entre outros.

A separação de biomoléculas explorando interação hidrofóbica é uma técnica poderosa com interação branda que possibilita alta probabilidade dos analitos manterem sua conformação e atividade biológica inalterados após serem eluidos da coluna (WESTON; BROWN, 1997). As condições ideais de pH, força iônica e temperatura do meio que favoreceram as interação proteínas e ligante pseudo-específico variam de acordo com o sistema empregado. Algumas pesquisas empregando suportes com ligantes pseudo-específicos reportam maiores capacidades adsortivas em menores forças iônicas (ÇANAK et al., 2004; DEMIRÇELIK; PERÇIN; DENIZLI, 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Já em relação ao pH o ponto isoelétrico da biomolécula será um fator determinante para encontrar a condição ideal.

Figura 7 - Aminoácido L-fenilalanina



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p2126?lang=en®ion=CA>

3. CONCLUSÃO

A aplicação de lisozima nas indústrias alimentícias e farmacêuticas tem se expandido devido à sua ação antibacteriana. Entretanto, a obtenção desta proteína com alto grau de pureza e baixo custo é um desafio, sendo necessário o desenvolvimento de materiais eficientes que reduzam as etapas de purificação da proteína e consequentemente os custos envolvidos. Diante disso, o emprego de matrizes cromatográficas como os criogéis de poliacrilamida supermacroporosos é uma alternativa interessante, pelo fato deste material possuir baixo custo, alta porosidade, alta resistência mecânica e baixa resistência ao fluxo, possibilitando a purificação de proteínas a partir de extratos brutos e viscosos como a clara de ovo de galinha, principal fonte de lisozima. Além disso, esta matriz pode ser funcionalizada com o aminoácido hidrofóbico L-fenilalanina, um ligante pseudo-específico que possui baixo custo, alta estabilidade e biocompatibilidade. Criogéis modificados desta forma podem ser empregados na cromatografia de afinidade hidrofóbica, uma técnica cromatográfica que tem ganhado espaço em escala laboratorial e industrial.

REFERÊNCIAS

ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3292–3299, 2013.

ACET, Ö. et al. O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes as affinity ligands for immobilized metal-ion affinity chromatography of lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v. 1550, p. 21–27, 2018.

ALTINTAŞ, E. B. et al. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 105–113, 2007.

AMINLARI, L.; MOHAMMADI HASHEMI, M.; AMINLARI, M. Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. 1077–1090, 2014.

ANDAÇ, M.; BAYDEMİR, G.; DENİZLİ, A. Molecularly imprinted polymers as a tool for biomolecule separation. In: ALEXANDRU MIHAI GRUMEZESCU (Ed.). . **Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-Up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology**. 1st. ed. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2018. p. 511–545.

AOKI, K.; SHIRAKI, K.; HATTORI, T. Salt effects on the picosecond dynamics of lysozyme hydration water investigated by terahertz time-domain spectroscopy and an insight into the Hofmeister series for protein stability and solubility. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 22, p. 15060–15069, 2016.

ARVIDSSON, P. et al. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275–290, 2003.

BAI, L. et al. Preparation of a novel hybrid organic-inorganic monolith for the separation of lysozyme by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 100–106, 2011.

BOBER, P. et al. Highly conducting and biocompatible polypyrrole/poly(vinyl alcohol) cryogels. **Synthetic Metals**, v. 252, n. 0379–6779, p. 122–126, 2019.

BOSCHETTI, E. Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 333–337, 2002.

BOSTRÖM, M. et al. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. **Biophysical Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 217–224, 2005.

ÇANAK, Y. et al. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin-G. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, n. 3, p. 369–377, 2004.

CAPPA, C. D. et al. Effects of Alkali metal halide salts on the hydrogen bond network of liquid water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 15, p. 7046–7052, 2005.

CARBONNAUX, C.; RIES-KAUTT, M.; DUCRUIX, A. Hypoderma lineatus. **Encyclopedia of Parasitology**, v. 4, p. 2123–2128, 1995.

CARVALHO, B. M. A. et al. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308–314, 2014.

CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; LEŚNIEWSKI, G.; KIJOWSKI, J. Properties and application of egg white lysosome and its modified preparations - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 1, p. 5–10, 2008.

CHANG, H. M.; YANG, C. C.; CHANG, Y. C. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 161–164, 2000.

CHAVES, G. L. et al. Hydrodynamics and dynamic capacity of cryogels produced with different monomer compositions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 48507, p. 1–7, 2019.

ÇİMEN, D.; TÜRKMEN, D.; DENİZLİ, A. Poly-(L)-histidine immobilized cryogels for lysozyme purification. **Adsorption Science and Technology**, v. 34, n. 7–8, p. 469–487, 2016.

CLAESSENS, H. A. **Characterization of stationary phases for HPLC column testing clarification and chemical stability**. [s.l.: s.n.].

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introducao a Metodos Cromatograficos**. 7. ed. Campinas: [s.n.].
- CÖMERT, Ş. C.; ODABAŞI, M. Investigation of lysozyme adsorption performance of Cu²⁺- attached PHEMA beads embedded cryogel membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 2014.
- CORRADINI, C. et al. Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol-gel technique. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 0260–8774, p. 580–587, 2013.
- CREASY, A. et al. Gradient elution behavior of proteins in hydrophobic interaction chromatography with U-shaped retention factor curves. **Journal of Chromatography A**, v. 1547, p. 53–61, 2018.
- CUNNINGHAM, F. Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. **World's poultry science Journal**, v. 47, n. 89, p. 142–163, 1991.
- DAŃBROWSKI, A. Adsorption - From theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, n. 0001–8686, p. 135–224, 2001.
- DEMİRÇELİK, A. H.; PERÇİN, I.; DENİZLİ, A. Supermacroporous hydrophobic affinity sorbents for penicillin acylase purification. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 71–79, 2017.
- DUCRUIX, A. et al. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. **Journal of Crystal Growth**, v. 168, n. 1–4, p. 28–39, 1996.
- EC REGULATION NO. 231/2012, C. R. Commission regulation (EU) No 231/2012. **Official Journal of the European Union**, v. 55, n. 1977– 0677, p. 1–295, 2012.
- ERCAN, D.; DEMIRCI, A. Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1078–1088, 2016.
- FARIA, A. M. et al. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 300–309, 2006.
- FAUSNAUGH, J. L.; REGNIER, F. E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Chromatographic**, v. 359, n. 0021–9673, p. 131–146, 2007.

- FDA. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe; egg white lysozyme. **Federal Register** **63**, n. No. 49/Friday, p. 12421–12425, 1998.
- FINET, S. et al. The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 112–116, 2004.
- FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element found in tissue and secretions. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 93, p. 306–317, 1922.
- FLORES, S. C.; KHERB, J.; CREMER, P. S. Direct and reverse hofmeister effects on interfacial water structure. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 27, p. 14408–14413, 2012.
- FONTAN, R. DA C. I. Development and Characterization of a Supermacroporous Cation Exchanger to Macromolecules Purification. **Food Technology Department, Federal University of Viçosa, Viçosa**, p. 147, 2013.
- GAO, F. X. et al. A pH and temperature dual-responsive macroporous molecularly imprinted cryogel for enhanced recognition capability towards ovalbumin. **Analytical Methods**, v. 5, n. 23, p. 6700–6708, 2013.
- GHOSH, R.; SILVA, S. S.; CUI, Z. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2000.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**, v. 33, n. 0963–9969, p. 83–90, 2000.
- GONÇALVES, G. R. F. et al. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1033–1034, p. 406–412, 2016.
- GUÉRIN-DUBIARD, C. et al. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1–2, p. 58–67, 2005.
- GUIOCHON, G. Preparative Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic A**, v. 965, n. 0021–9673, p. 129–161, 2002.
- GUIOCHON, G.; BEAVER, L. A. Separation science is the key to successful

biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 0021–9673, p. 8836–8858, 2011.

HACKEMANN, E.; HASSE, H. Influence of mixed electrolytes and pH on adsorption of bovine serum albumin in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1521, p. 73–79, 2017.

HAHN, R. et al. Affinity monoliths generated by in situ polymerization of the ligand. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5126–5132, 2001.

HAIMER, E. et al. Hydrophobic interaction chromatography of proteins IV. Kinetics of protein spreading. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 84–94, 2007.

HAJIZADEH, S. et al. Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 21, p. 2978–2985, 2012.

HARTONO, Y. D. et al. Computational study of bindings of HL9, a nonapeptide fragment of human lysozyme, to HIV-1 fusion protein gp41. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1607–1611, 2011.

HASHEMI, M. M.; AMINLARI, M.; MOOSAVINASAB, M. Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme-xanthan gum conjugate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 0023–6438, p. 594–602, 2014.

HJERTÉN, S. Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 87, n. 2, p. 325–331, 1973.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Dritte Mittheilung. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 1888.

HOFSTEE, B. H. J. Hydrophobic affinity chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 430–448, 1973.

HUANG, W. et al. Layer-by-layer immobilization of lysozyme–chitosan–organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. **Food Research International**, v. 48, n. 0963–9969, p. 784–791, 2012.

JAIN, E.; KUMAR, A. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic

- protein production. **Nature Protocols**, v. 8, n. 5, p. 821–835, 2013.
- JIANG, S. et al. Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers. **Food Chemistry**, v. 221, n. 0308–8146, p. 1507–1513, 2017.
- JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 165–189, 1984.
- JUNGWIRTH, P.; WINTER, B. Ions at Aqueous Interfaces: From Water Surface to Hydrated Proteins. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 343–366, 2008.
- KIM, M. et al. Adsorption and elution of bovine γ -globulin using an affinity membrane containing hydrophobic amino acids as ligands. **Journal of Chromatographic**, v. 585, n. 0021–9673, p. 45–51, 1991a.
- KIM, M. et al. Protein adsorption capacity of a porous phenylalanine-containing membrane based on a polyethylene matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 586, n. 1, p. 27–33, 1991b.
- KÖSE, K. et al. Affinity purification lipase from wheat germ: comparison of hydrophobic and metal chelation effect. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 574–583, 2017.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 244–253, 2014.
- LIBURDI, K. et al. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. **Food Control**, v. 63, n. 0956–7135, p. 46–52, 2016.
- LIENQUEO, M. E. et al. Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, n. 1–2, p. 53–68, 2007.
- LOZINSKY, V. I. et al. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4–5, p. 163–188, 2002.

- LUO, Q. et al. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481–489, 2002.
- MACHADO, A. P. DA F. et al. Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, n. 0378–3812, p. 64–69, 2015.
- MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686–1704, 2006.
- MASSACHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria.pdf. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 29, n. 1040–841X, p. 191–214, 2003.
- MCCUE, J. T. **Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463
- MECITOĞLU, Ç. et al. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 12–21, 2006.
- MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt Effects on Hydrophobic Interactions in Precipitation and Chromatography of Proteins - Interpretation of Lyotropic Series. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 183, n. 1, p. 200–215, 1977.
- MENDES, A. A. et al. APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL. **Química nova**, v. 34, n. 5, p. 3–5, 2011.
- MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 225–232, 1995.
- MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial Peptides Released by Enzymatic Hydrolysis of Hen Egg White Lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1088–1094, 2004.
- MOL, P. C. G. et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044–1045, p. 17–23, 2017.

- OLIVEIRA, A. C. F. DE et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 0, n. 00, p. 1–13, 2019.
- OMTA, A. W. et al. Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 347–349, 2003.
- ÖNCEL, Ş. et al. Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 18, p. 7049–7056, 2005.
- PAHLMANN, S.; ROSENGREN, J.; HJERTÉN, S. Hydrophobic interaction chromatography on uncharged sepharose derivatives. **J. Chromatography**, v. 131, p. 99–108, 1977.
- PARSONS, D. F. et al. Hofmeister effects: Interplay of hydration, nonelectrostatic potentials, and ion size. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 27, p. 12352–12367, 2011.
- PERÇİN, I. et al. Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel. **Journal of Chromatography A**, v. 1386, p. 13–21, 2015.
- PERKINS, T. W. et al. Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. **Journal of Chromatographic A**, v. 766, p. 1–14, 1997.
- PETRO, M.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Immobilization of trypsin onto “molded” macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 355–363, 1996.
- PITIOT, O. et al. A potential set up based on histidine hollow fiber membranes for the extracorporeal removal of human antibodies. **Journal of Membrane Science**, v. 166, n. 2, p. 221–227, 2000.
- PLIEVA, F. M. et al. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10–11, p. 828–836, 2004a.
- PLIEVA, F. M. et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide

based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 129–137, 2004b.

POOLE, C. F. General Concepts in Column Chromatography. In: POOLE, C. F. (Ed.). . **The Essence of Chromatography**. 1st. ed. Detroit: Elsevier Science, 2003. p. 2–72.

PORATH, J. et al. Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. **Nature**, v. 245, p. 465–466, 1973.

RIES-KAUTT, M. M.; DUCRUIX, A. F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 2, p. 745–748, 1989.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. Adsorption by Powders and Porous Solids. In: **Adsorption by Powders and Porous Solids**. 1st. ed. Uxbridge: Elsevier, 1999. p. 1–26.

SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7996–8001, 2010.

SAVINA, I. N.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 0032–3861, p. 9596–9603, 2005.

SCHMIDT, D. A. et al. Rattling in the cage: Ions as probes of sub-picosecond water network dynamics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 51, p. 18512–18517, 2009.

SCHNEIDER, E.; ALTENDORF, K. ATP Synthetase (F1IF0) of Escherichia cob K-12 Preparation, High-yield F0, Functional Chromatography, Affinity. **European Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 149–153, 1982.

SHALUMON, K. T. et al. Gelatin/nanohydroxyapatite cryogel embedded poly(lactic-co-glycolic acid)/nanohydroxyapatite microsphere hybrid scaffolds for simultaneous bone regeneration and load-bearing. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 1–27, 2018.

SHEPARD, C. C.; TISELIUS, A. The chromatography of proteins. The effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel. **Discussions of the**

Faraday Society, v. 7, p. 275–285, 1949.

SILVA, J. F. DA et al. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 37, p. 1–9, 2019.

SILVETTI, T. et al. Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry. In: PATRICIA Y. HESTER (Ed.). . **Egg Innovations and Strategies for Improvements**. 1st. ed. Cambridge: Nikki Levy, 2017. p. 233–240.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), 2002.

SMITH, J. D.; SAYKALLY, R. J.; GEISSLER, P. L. The effects of dissolved halide anions on hydrogen bonding in liquid water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 13847–13856, 2007.

STABY, A.; MOLLERUP, J. Solute retention of lysozyme in hydrophobic interaction perfusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 734, n. 1, p. 205–212, 1996.

TAKAHASHI, H. et al. Use of Commercially Available Antimicrobial Compounds for Prevention of *Listeria monocytogenes* Growth in Ready-to-Eat Minced Tuna and Salmon Roe during Shelf Life. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 994–998, 2011.

TARDIEU, A. et al. Proteins in solution : From X-ray scattering intensities to interaction potentials. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, n. 2–4, p. 193–203, 1999.

TISELIUS, A. Adsorption separation by salting out. **Arkiv for Kemi, Mineralogi och Geologi, B**, v. 26, n. 1, p. 5 pp., 1948.

TOMAZ, C. T. Hydrophobic interaction chromatography. In: FANALI, S. et al. (Eds.). . **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition**. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 1p. 171–190.

TÜRKMEN, D.; DENIZLI, A. PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, n. 0927–7765, p. 859–865, 2014.

ÜNLÜER, Ö. B.; ÖZCAN, A.; UZUN, L. Preparation of a novel hydrophobic affinity cryogel for adsorption of lipase and its utilization as a chromatographic adsorbent for fast protein liquid chromatography. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 2, p. 376–382, 2014.

UYGUN, D. A. et al. Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 0928–4931, p. 2165–2173, 2009.

VERÍSSIMO, L. A. A. et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 52, n. 12, p. 1973–1982, 2017.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudo-Biospecific Affinity Ligand Chromatography: The Case of Immobilized Histidine as a Universal Ligand. In: NGO, T. T. (Ed.). . **Molecular Interactions in Bioseparations**. Boston, MA: Springer US, 1993. v. 1p. 257–275.

WAN, Y.; LU, J.; CUI, Z. Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 133–142, 2006.

WESTON, A.; BROWN, P. R. Separations in High-Performance Liquid Chromatography. In: **HPLC and CE**. [s.l: s.n.]. p. 24–70.

WU, T. et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, n. 0144–8617, p. 192–200, 2017.

YAN, L. et al. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 5, p. 876–880, 2011.

YAO, K. et al. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701–6708, 2006a.

YAO, K. et al. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103–110, 2006b.

YE, J. et al. Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 1261–1267, 2008.

YEH, C. K. et al. A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. **Archives of Oral Biology**, v. 42, n. 0003–9969, p. 25–31, 1997.

YILMAZ, F. et al. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 272–279, 2009.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 36, p. 15249–15253, 2009.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Chemistry of Hofmeister Anions and Osmolytes. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 63–83, 2010.

SEGUNDA PARTE: ARTIGO**Aplicação de criogéis funcionalizados com L-fenilalanina na adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica**

Autores: Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira¹, Richard Marins da Silva², Isabelle Cristina Oliveira Neves¹, Luis Antônio Minim², Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo¹, Jaime Vilela de Resende¹

¹ Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brasil

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

(Versão Preliminar)

A ser submetida na revista: Journal of Applied Polymer Science

Aplicação de criogéis funcionalizados com L-fenilalanina na adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica

Resumo

A aplicação de criogéis na purificação de biomoléculas tem se ampliado devido à sua eficiência adsortiva e vantagens operacionais. Neste trabalho, os criogéis de poliacrilamida funcionalizados com L-fenilalanina (criogel-Phe) via método glutaraldeído foram projetados para a adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica. A funcionalização do criogel foi confirmada pela análise de FTIR e pelas análises de Kjeldahl que indicaram imobilização de $458,65 \pm 40,59 \text{ mg}_{\text{fenilalanina}} \text{ g}_{\text{criogel}}^{-1}$. O criogel-Phe apresentou alta porosidade (0,95), módulo de Young de $526,71 \pm 27,21 \text{ kPa}$, a TGA indicou que a degradação térmica ocorre após $200 \text{ }^\circ\text{C}$, o DSC e DRX indicaram que o material é amorfo. Além disso, a coluna apresentou uma permeabilidade hidráulica de $4,15 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, dispersão axial variando de 10^{-7} a $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e altura equivalente a um prato teórico variando de 0,10 a 0,21 cm. A maior adsorção de lisozima ($67,65 \pm 1,52 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtida utilizando solução salina de tiocianato de sódio ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0). A habilidade da coluna de criogel-Phe na captura e purificação da lisozima foi confirmada pela elevada atividade enzimática ($1294,17 \text{ U mL}^{-1}$), pureza (87,92%) e fator de purificação (11,49).

Palavras-chaves: criogel. aminoácido. DRX. DSC. permeabilidade.

INTRODUÇÃO

A demanda por proteínas puras e biologicamente ativas tem impulsionado o desenvolvimento de materiais cromatográficos para bioseparações. O criogel é um exemplo desses materiais. Estes monólitos são produzidos por criocopolimerização de monômeros ou precursores poliméricos sobre condições criogênicas.¹ Após o descongelamento, uma rede de poros interconectados com tamanho variando de 10 a 100 μm é formada.¹⁻³ Devido à sua estrutura altamente porosa, essa matriz polimérica apresenta baixa resistência ao fluxo^{4,5}, possibilitando o uso de extratos brutos⁶ e ainda apresenta baixo custo comparado aos suportes cromatográficos tradicionais.⁷

Entretanto, esses monólitos têm menor capacidade de adsorção do que as matrizes convencionais.⁸ Para minimizar este inconveniente, o criogel pode ter grupos funcionais ancorados em sua superfície.⁹ A funcionalização de criogéis via método glutaraldeído, converte os grupos epóxi na superfície dos criogéis em grupos aldeído-ativado, os quais serão capazes de reagir com grupos aminas de moléculas ligantes.¹⁰ Entre os ligantes, os aminoácidos têm destaque devido sua biocompatibilidade¹¹, estabilidade e baixo custo.¹²

Apesar de suas vantagens, a literatura reporta poucos estudos de purificação de proteínas aplicando criogéis de afinidade hidrofóbica, bem como a funcionalização de criogéis com aminoácidos apolares (fenilalanina, alanina, metionina e triptofano).¹³ A seletividade de colunas hidrofóbicas contendo esses ligantes resulta de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals com cinética rápida.¹⁴ Além da porosidade e do tipo de ligante presente na fase estacionária, a interação hidrofóbica é afetada pela temperatura do sistema, pH, tipo de sal e força iônica da fase móvel.^{15,16} O efeito do tipo de sal na retenção de proteínas ocorre principalmente em virtude dos ânions,¹⁷ sua influência pode seguir a ordem direta ou reversa da série de Hofmeister dependendo do pH¹⁸⁻²⁰ e da concentração salina²¹ aplicada.

A cromatografia de afinidade hidrofóbica é uma poderosa e consolidada técnica de bioseparação em escala laboratorial e industrial.²² Por se tratar de uma interação branda há uma alta probabilidade dos analitos manterem sua conformação e atividade biológica inalterados após serem eluidos da coluna.²³ A aplicação desta técnica se estende à purificação de proteínas como a lisozima (EC 3.2.1.17), uma enzima de interesse comercial e amplamente empregada nas indústrias farmacêutica e alimentícia,²⁴ por ser capaz de hidrolisar ligações glicosídicas β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetil-D-glicosamina presentes na parede celular das bactérias gram-positivas.²⁵⁻²⁷ Está

pequena proteína é composta de 129 resíduos de aminoácidos, possui massa molecular de 14,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,7.²⁸ A lisozima pode ser encontrada em baixo conteúdo na clara de ovo de galinha, compondo cerca de 3,4% das proteínas totais.²⁹ Por isso processos de purificação visando alta pureza e baixo custo devem ser empregados.^{30,31}

As características dos suportes cromatográficos influenciam nas condições de operação e eficiência do processo cromatográfico evidenciando a necessidade de realizar uma caracterização desses materiais. Um material ideal deve possuir porosidade e tamanho de poros adequado, resistência mecânica suficiente para suportar altas pressões, estabilidade química³² e térmica. Além disso, a coluna preenchida por este material deve possuir alta seletividade e baixos valores de dispersão axial e altura equivalente a um prato teórico.³³

O objetivo deste trabalho foi sintetizar criogéis hidrofóbicos funcionalizados com aminoácido L-fenilalanina (criogel-Phe) via método glutaraldeído para a aplicação na captura e purificação de lisozima de clara do ovo de galinha. O criogel-Phe foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Adicionalmente, foi realizado uma extensa caracterização do criogel-Phe a partir de ensaios mecânicos, análises estruturais (microscopia eletrônica de varredura, MEV), morfológicas (fração de macro, micro e mesoporos, fração de água ligada e polímero seco, capacidade de inchamento e grau de expansão), avaliação da cristalinidade (difração de raios-X, DRX) e caracterização das propriedades térmicas (calorimetria exploratória diferencial, DSC e termogravimetria, TGA) e hidrodinâmica da coluna.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A lisozima pura proveniente de clara de ovo de galinha (EC 3.2.1.17, pureza $\geq 90\%$), a acrilamida (AAm, 99%), a *N,N'*-metileno-*bis*-acrilamida (MBAAm, 99%), o alil glicidil éter (AGE, 99%), o *N,N,N,N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED, 99%), o persulfato de amônio (APS, 98%), o 1,6-hexanodiamina, o glutaraldeído (25%) e o boroidreto de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). O aminoácido L-fenilalanina (99%) usado como ligante foi adquirida da Synth (Diadema, Brasil). O ácido acético foi obtido da Vetec (São Paulo, Brasil). Os outros reagentes (todos de grau analítico) usados no experimento são descritos ao longo da metodologia. O ovo de galinha fresco foi obtido

em comércio local. Todos os experimentos foram realizados utilizando água ultrapura (Mili-Q, Millipore USA).

Síntese do criogel de poliacrilamida

Os criogéis foram sintetizados dissolvendo 1,185 g de AAm, 0,3175 g de BAAM e 1 mL de AGE em 25 mL de água ultrapura. Na solução foram adicionados os agentes catalisadores, 100 μL de APS (27,5% m/v) e 23,8 μL de TEMED.⁵ Após homogeneização, a solução foi imediatamente vertida em coluna de vidro HR 10/30 (GE Healthcare Uppsala, Sweden) e imersa em banho de etilenoglicol (Modelo 521/3DE, Nova Ética, Brasil) a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, o criogel foi descongelado a temperatura ambiente, lavado em água destilada e seco em estufa com circulação de ar a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Os criogéis seco tiveram suas extremidades removidas e em seguida foram armazenados em dessecador.

Imobilização de L-fenilalanina no criogel

A funcionalização do criogel por meio da imobilização do ligante L-fenilalanina foi realizada via método glutaraldeído de acordo com Oliveira et al.,³⁴ com modificações. A representação das etapas de imobilização é apresentada na Figura 1. Os criogéis ($\pm 0,15$ g) foram imersos em 25 mL de solução de 1,6-hexanodiamina ($0,5\text{ mol L}^{-1}$) por 10 h a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. O 1,6-hexanodiamina foi imobilizado por meio de ligação covalente entre seus grupamentos aminas e os grupos epóxi presentes na superfície do criogel. Em seguida, os monólitos foram imersos em 25 mL de tampão fosfato de sódio ($0,1\text{ mol L}^{-1}$; pH 5,5) por 1 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação. Após, os criogéis foram colocados em solução de glutaraldeído (5,0% v/v) em tampão fosfato de sódio ($0,1\text{ mol L}^{-1}$; pH 5,5) por 4 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, os criogéis foram imersos em 25 mL de solução de L-fenilalanina (10 mg mL^{-1}) em tampão carbonato de sódio ($0,2\text{ mol L}^{-1}$; pH 9,5) onde permaneceu por 16 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação. Por fim, os criogéis foram colocados em 50 mL de solução de boroidreto de sódio ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato de sódio ($0,2\text{ mol L}^{-1}$; pH 9,5) por 30 minutos em banho gelado. Após funcionalizados, os criogéis hidrofóbicos (criogel-Phe) foram lavados com 400 mL de água destilada e secos a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

A quantificação de L-fenilalanina imobilizado nos criogéis foi determinada pela diferença entre a concentração do aminoácido (mg mL^{-1}) na solução antes e após o contato com o criogel durante a etapa de funcionalização, usando o Método de Kjeldahl.³⁵

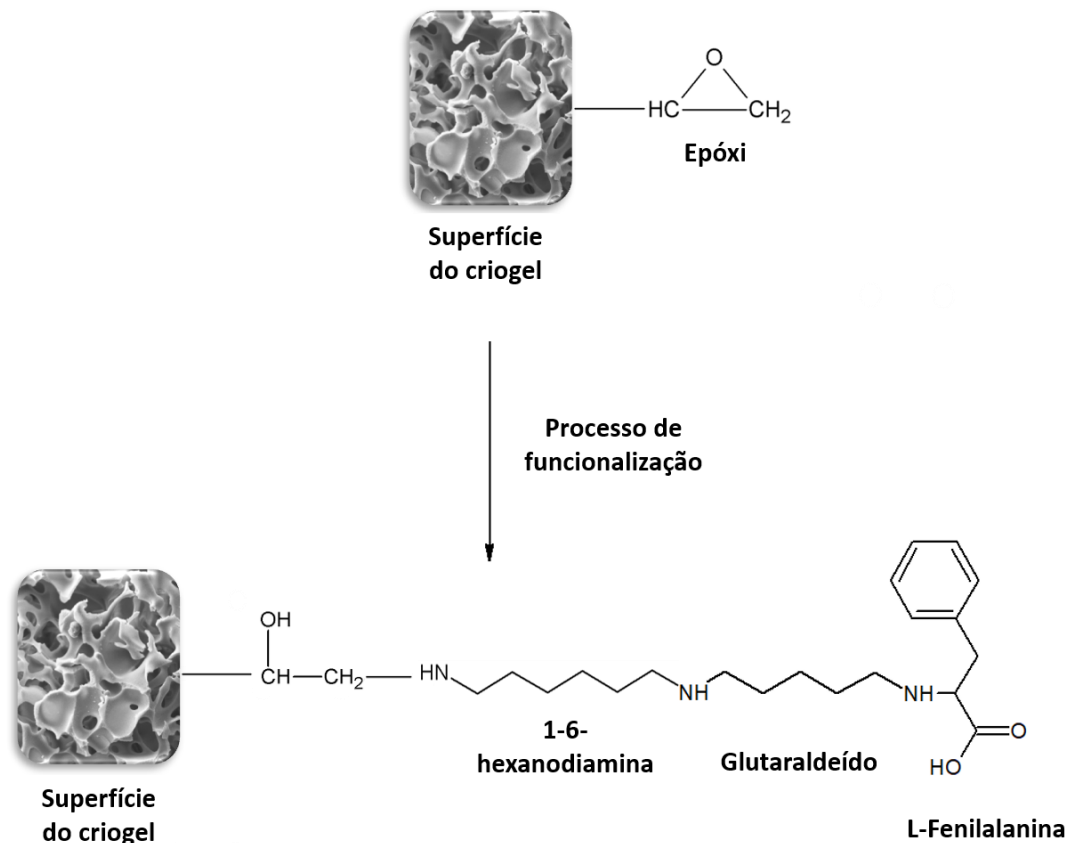


Figura 1 - Representação da estrutura do criogel funcionalizado com L-fenilalanina

Ensaio de adsorção de lisozima em batelada

Os ensaios de adsorção de lisozima foram realizados em batelada, usando tubos Falcon de 50 mL e adicionando 0,02 g de criogel-Phe e 3 mL de solução de lisozima pura (1 mg mL^{-1}) em soluções salinas de fosfato de sódio, tiocianato de sódio, sulfato de sódio ou cloreto de sódio em diferentes valores de pH (Tabela 1). Os ensaios de adsorção foram realizados a 25°C , sob agitação de 50 rpm por 24 h. Após a adsorção os tubos foram centrifugados a $3248 \times g$ por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade adsortiva (q , mg g^{-1}) do criogel-Phe foi determinada de acordo com a Eq. (1). A quantificação das concentrações de lisozima na solução inicial e nos sobrenadantes foram mensuradas por meio da leitura direta da absorbância em

espectrofotômetro (Nova 200 UV, Brasil) a 280 nm. Uma curva analítica foi construída usando solução de lisozima padrão com concentrações variando de 0,05 mg mL⁻¹ a 0,50 mg mL⁻¹.

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

onde q é a quantidade de lisozima adsorvida no criogel-Phe (mg g⁻¹); c_0 e c são as concentrações iniciais e finais de lisozima em solução (mg mL⁻¹); M é a massa de criogel seco (g) e V é o volume de solução de lisozima (mL).

Delineamento experimental e análise estatística

Um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial completo (Tabela 1) com três repetições foi aplicado para avaliar o efeito do tipo de sal, concentração de sal e pH na adsorção de lisozima. Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 95% de significância. O pacote estatístico SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi usado nas análises estatísticas.

Os gráficos foram gerados usando o software SigmaPlot versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, USA).

Tabela 1 - Fatorial completo empregados nos ensaios de adsorção de lisozima em batelada

Sal	Concentração (mol L ⁻¹)	pH
Tiocianato de sódio	0,025	5; 7; 9
	0,050	
	0,100	
Fosfato de sódio	0,025	
	0,100	
	0,300	
Cloreto de sódio	0,025	
	0,100	
	0,300	
Sulfato de sódio	0,025	
	0,100	
	0,300	

Preparo da solução de clara de ovo de galinha (CEW)

A clara de ovo de galinha (CEW) foi preparada a partir de ovos frescos. A clara foi separada manualmente e filtrada em uma peneira de abertura de 1 mm para remover a chalaza. Em seguida, as claras de ovo foram centrifugadas a 12.000×g por 30 min para remoção da ovomucina. Duzentos mL de CEW filtrada foram diluídas com 800 mL de tiocianato de sódio (0,03125 mol L⁻¹, pH 5,0). A concentração final de tiocianato de sódio na solução final foi de 0,025 mol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 5,0 usando HCl (5 mol L⁻¹). Posteriormente, a solução de CEW foi centrifugada novamente a 12.000×g por 15 min e o sobrenadante foi recolhido e filtrado em uma membrana de 0,45 µm de éster misto de celulose (Millipore®).

Captura e purificação de lisozima de clara do ovo

Os ensaios cromatográficos para a captura e purificação de lisozima a partir da CEW foi realizada em um sistema de cromatografia Äkta Pure 25 M (GE Healthcare Bio-

Sciences AB, Uppsala, Sweden) em temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos em uma vazão constante de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Uma coluna de vidro HR 10/15 (GE Healthcare Uppsala, Sweden) contendo o criogel-Phe foi equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de solução salina de tiocianato de sódio ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0). A solução de CEW foi bombeada através da coluna até a formação da curva de ruptura. Após, a coluna foi lavada com 3 VC usando a mesma solução de equilíbrio. A eluição das proteínas adsorvidas na coluna de criogel-Phe foi realizada em modo isocrático aplicando solução de ácido acético (1%, v/v), a absorbância foi monitorada a 280 nm.

As amostras eluídas da coluna de criogel-Phe foram usadas para determinar a pureza de lisozima purificada por meio de gel de eletroforese de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida SDS-PAGE, usando um sistema vertical de eletroforese Bio-Rad (CA, USA). O gel de acrilamida foi preparado usando um gel de separação 12% e um gel de empilhamento de 5%. As amostras foram diluídas em um tampão desnaturante (contendo dodecilsulfato de sódio, azul de bromofenol, glicerol e β -mercaptoetanol), na proporção de 100 μL de amostra: 500 μL de tampão desnaturante e aquecido a 90° C por 10 min. Posteriormente, alíquotas de 10 μL de amostra desnaturada foram injetadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada por 2 h a 100 V e 30 mA.

Quantificação da lisozima por HPLC e das proteínas totais

As proteínas totais das soluções inicial e dos eluídos da coluna de criogel-Phe foram determinadas pelo método de Bradford.³⁶ O conteúdo de lisozima foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu, model LC-10AD, Japan) com monitoramento em detector UV a 220 nm. Uma coluna de fase reversa (C18 Shim-pack VP ODS, 250 x 4,6 mm, Shimadzu) foi usada para a separação cromatográfica. A fase móvel foi composta de acetonitrila pura (99,9%) e acidotrifluoracético 0,05%, em uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ a 30° C . Um volume de 50 μL de amostra foi injetado diretamente no cromatógrafo e as proteínas foram eluídas da coluna em gradiente, segundo metodologia reportada por Liao et al.³⁷ As alíquotas de amostra foram filtradas através de membrana de acetato de celulose (0,22 μm). A quantificação da lisozima foi feita a partir da construção de uma curva de calibração usando lisozima padrão.

A eficiência da purificação de lisozima capturada a partir da CEW pelo criogel-Phe foi avaliada por meio dos parâmetros de recuperação (%), pureza (%) e o fator de purificação (P_F). Esses parâmetros foram determinados pelas Eqs. (2) – (4).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{m_{LYS,rec}}{m_{LYS,perc}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{m_{LYS,rec}}{m_{PROT,rec}} \times 100 \quad (3)$$

$$P_F = \frac{\left(\frac{m_{LYS,rec}}{m_{PROT,rec}} \right)}{\left(\frac{m_{LYS,CEW}}{m_{PROT,CEW}} \right)} \quad (4)$$

onde $m_{LYS,rec}$ é a massa de lisozima recuperada nas amostras de eluidos da coluna de criogel-Phe, $m_{LYS,perc}$ é a massa de lisozima na solução de clara de ovo que percolou através do criogel-Phe, $m_{PROT,rec}$ é o conteúdo de proteína total recuperado nas amostras de eluidos da coluna, $m_{LYS,CEW}$ é a massa de lisozima na solução de clara de ovo e $m_{PROT,CEW}$ é o conteúdo de proteínas totais na solução de clara de ovo.

Atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima purificada foi avaliada de acordo com método Shugar.³⁸ O kit comercial LY0100 da Sigma Aldrich foi usado. Uma suspensão de 0,1% m/v de *Micrococcus lysodeikticus* foi preparado usando tampão fosfato de sódio (66 mmol L⁻¹, pH 6,2). As suspensões de microrganismos (800 µL) adicionadas de 30 µL de amostras dos eluidos ou solução inicial de CEW tiveram suas absorbâncias monitoradas a 450 nm por 5 min para obter a velocidade linear máxima ($\Delta A_{450}/\text{min}$). A atividade enzimática (U mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um decréscimo de 0,001 na densidade óptica por minuto (Eq. (5)). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Ativ. enzimática} = \frac{(\Delta A_{450}/\text{min})_{amostra} - (\Delta A_{450}/\text{min})_{branco}}{0,001 \times 0,03} \times (df) \quad (5)$$

Caracterização hidrodinâmica do criogel-Phe

Permeabilidade hidráulica

A queda de pressão através da coluna de criogel-Phe usando diferentes velocidades de fluxo ($1,06 \times 10^{-4}$ a $1,06 \times 10^{-3}$ m s⁻¹) de água ultrapura como fase móvel

foi verificada. A permeabilidade hidráulica (K_w) foi determinada pela lei de Darcy (Eq. (6)).³⁹

$$\frac{\Delta P_w}{L} = -\frac{\mu_w}{K_w} U \quad (6)$$

onde U é a velocidade de fluxo da água através da coluna em m s^{-1} , μ_w é a viscosidade da água ($1,00 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$), L é o comprimento da coluna em m e ΔP_w é a queda de pressão em MPa.

Distribuição do tempo de residência, porosidade e dispersão axial

A distribuição do tempo de residência (RTD) na coluna de criogel-Phe foi mensurada em um sistema cromatográfico Äkta pure 25 M (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) em temperatura ambiente. O método do pulso de um traçador foi usado. A fase móvel foi composta por água ultrapura usando diferentes velocidades de fluxos ($1,06 \times 10^{-4}$ a $1,06 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$). Um pulso de acetona ($100 \mu\text{L}$, 5% v/v) foi injetado na coluna e a absorbância foi monitorada a 280 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata. O tempo de residência (t_R) e variância (σ_t^2) foram obtidos pelas Eqs. (7) e (8), através dos parâmetros obtidos nas curvas da RTD.

$$M_1 = t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad (7)$$

$$M_2 = \sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (8)$$

A função densidade de residência (E_θ) foi determinada pela Eq. (9).⁴⁰

$$E_\theta = t_R \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (9)$$

A porosidade (ε_T) foi determinada pela Eq. (10).⁴⁰

$$t_R = \frac{L}{U} \varepsilon_t \quad (10)$$

O coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) para cada curva de fluxo também foi determinado a partir das curvas de RTD (Eq. (11)).⁴¹

$$\frac{\sigma_t^2}{t_R^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(\frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] v \quad (11)$$

onde D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial em $m^2 s$, u é a velocidade intersticial do fluido através do criogel ($u = U \varepsilon_T^{-1}$), sendo ε_T a porosidade do criogel e U a velocidade de fluxo do líquido em $m s^{-1}$.

A altura equivalente a um prato teórico (*HETP*) foi obtida pela Eq. (12).⁴²

$$HETP = L \frac{\sigma_t^2}{t_r^2} \quad (12)$$

Caracterização do criogel-Phe

Capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchamento (S) do criogel-Phe e do criogel puro (controle) foram determinadas segundo Savina et al.⁴³ As análises foram realizadas em oito repetições. Uma massa ($\pm 0,14$ g) de criogel seco (m_d , g) foi imerso em 50 mL de água destilada por 24 h. O excesso de água foi removido com a ajuda de papel toalha e a massa úmida mensurada (m_w , g). A capacidade de inchamento foi determinada pela Eq. (13).

$$S (g g^{-1}) = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (13)$$

O grau de expansão (ED) foi calculado mensurando o volume ocupado pelo criogel hidratado ($V_2 - V_1$, mL) e a massa do criogel seco (m_d , g) após hidratado. O ED foi calculado usando a Eq. (14).⁴⁴

$$ED (mL g^{-1}) = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (14)$$

Propriedades morfológicas

A caracterização morfológica e a determinação do tamanho dos poros do criogel-Phe foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma pequena amostra de criogel-Phe seco foi quebrada ao meio, fixada em suportes (*stub*), metalizada com ouro e examinada usando um microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss LEO EVO 40 XVP, Oberkochen, Germany) com uma voltagem de aceleração de 20 kV.

A fração de água ligada (φ_{wb}), fração de polímero seco (φ_d), fração de macroporos (φ_M) e meso e microporos (φ_m) foram determinadas segundo a metodologia proposta por Plieva et al.^{45,46} Pedacos de criogel-Phe secos (aproximadamente 2 cm) de massas conhecidas foram mantidos por 15 dias em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio a 25 °C. Após este período, as massas dos criogéis foram pesadas. Posteriormente, os criogéis foram imersos em 50 mL de água destilada por 24 h e pesados novamente. Oito criogéis modificados e oito criogéis puros (controle) foram usados nesta análise. Os parâmetros φ_{wb} , φ_d , φ_M e φ_m foram determinados através Eqs. (15) – (18).

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (15)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (16)$$

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (17)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (18)$$

onde m_s é a massa de criogel hidratado (g), m_d é a massa de criogel desidratado (g), m_e é a massa do criogel espremido (g) e m_{wb} é massa do criogel com água ligada (g).

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A ancoragem da L-fenilalanina da superfície do criogel foi confirmada por meio de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) usando a técnica de refletância total atenuada (ATR). Amostras de criogel-Phe secas foram transformadas em pó e lida na região infravermelha de 4000 a 500 cm^{-1} com um espectrofotômetro Bruker (Vertex 70, EUA). A mesma análise foi realizada para o criogel puro (controle).

Determinação da densidade de ligantes no criogel

A quantidade de grupos epóxi disponíveis para o acoplamento de ligantes foi determinada pelo método reportado por Arvidsson et al.⁴⁷, com modificações. Os criogéis puros foram equilibrados com água ultrapura e, em seguida, saturados com 25 mL na solução de CuSO_4 (0,5 mol L^{-1}) a uma vazão de 0,5 mL min^{-1} , seguido de lavagem com água ultrapura para remover o excesso de íons de cobre. Os íons Cu^{2+} ligados foram eluidos da coluna com 25 mL de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,1 mol L^{-1} , pH 7,6) a uma vazão de 0,5 mL min^{-1} e determinados por meio de leitura da

absorbância em espectrofotômetro a 730 nm. O complexo Cu^{2+} -EDTA possui uma absorvância molar (ϵ_{730}) de $46,8 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ a 730 nm. As análises foram realizadas em oito replicatas.

Propriedades mecânicas

O teste de compressão uniaxial no criogel-Phe e no criogel puro foram realizados utilizando o texturômetro Stable Micro Systems (TA - XT2i, Godalming, Inglaterra) com uma sonda cilíndrica de 20 mm de diâmetro, em temperatura ambiente. Foram utilizadas cinco amostras com dimensões médias de $23,7 \pm 1,7$ mm de altura e $7,9 \pm 0,3$ mm de diâmetro. Os criogéis secos foram colocados verticalmente entre duas placas metálicas e, em seguida, compactados até 60% do comprimento inicial. Uma célula de carga de 5 kN a uma velocidade de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ foi aplicada.⁴⁸ A força máxima foi registrada pelo software Exponent (v.5). O módulo de Young (E , kPa) foi calculado pela Eq. (19).

$$\frac{F}{\pi r^2} = E \frac{\Delta h_0}{h} \quad (19)$$

onde F é a força máxima (N) aplicada nos criogéis, πr^2 e h são a área da seção transversal (m^2) e a altura inicial (m) do criogel, e Δh_0 é a variação da altura da amostra (m) após a análise de compressão.

Análises térmicas

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas por meio de analisador térmico da Shimadzu (DTG-60A/60AH, Japan) com um fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} . Amostras de 3,0 mg de criogel-Phe e criogel puro (controle) foram, separadamente, macerados e aquecidos de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a $700 \text{ }^\circ\text{C}$ em uma taxa controlada de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram conduzidas em um analisador da TA 60 Shimadzu DSC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Aproximadamente 5 mg de amostras de criogel-Phe e criogel puro (controle) em pó foram usadas separadamente. Um cadinho vazio foi usado como referência. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até $120 \text{ }^\circ\text{C}$, em seguida foi resfriado até $-45 \text{ }^\circ\text{C}$ e novamente aquecido a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, sobre uma corrente de gás nitrogênio de 50 mL min^{-1} .

Difração de Raio-x (DRX)

Amostras de criogel-Phe e criogel puro (controle) foram secas, maceradas e analisadas separadamente. A difração de raios-X (DRX) foi conduzida em temperatura ambiente em um DRX Rigaku Multiflex (modelo XRD 6000) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) sob uma voltagem de 40 kv e corrente de 30 mA. O ângulo 2θ variou de 10° a 70° , com taxa controlada de 2° min^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação de L-fenilalanina imobilizado na superfície do criogel-Phe

Os espectros de FTIR foram realizados para determinar os grupos funcionais químicos presentes no criogel puro e no criogel-Phe. Os resultados são apresentados na Figura 2a e b. Os espectros apresentaram um pico em 1655 cm^{-1} , característico de grupo amida formado na união dos monômeros AAm e MBAAm durante a síntese do criogel.³ A vibração desse grupo químico também foi relatada em outros trabalhos de criogéis de poliacrilamida.^{8,34,49,50}

O espectro do criogel-Phe exibiu uma pequena banda em 1355 cm^{-1} que foi atribuída a grupos amina proveniente da ligação covalente entre as aminas presentes no hexanodiamina e o epóxi livre na superfície do criogel.⁵¹ Este espectro também apresentou, respectivamente, uma banda em 1510 cm^{-1} e uma a 1475 cm^{-1} devido ao alongamento da ligação C=C-C do anel aromático⁵² e a vibração da dupla ligação entre carbonos que compõem o anel aromático⁵³ presente na L-fenilalanina ancorada no criogel. Uma banda em 1716 cm^{-1} característica da ligação -COOH- também foi observada. Vibrações para este grupo funcional são encontradas entre 1725 e 1700 cm^{-1} ⁵³. Além disso, a banda de 1100 cm^{-1} que indica alongamento da ligação C-O, devido a presença do epóxi livre na superfície do criogel⁸ apresentou uma redução no espectro do criogel-Phe confirmando assim a imobilização do braço espaçador e aminoácido L-fenilalanina na superfície do criogel.

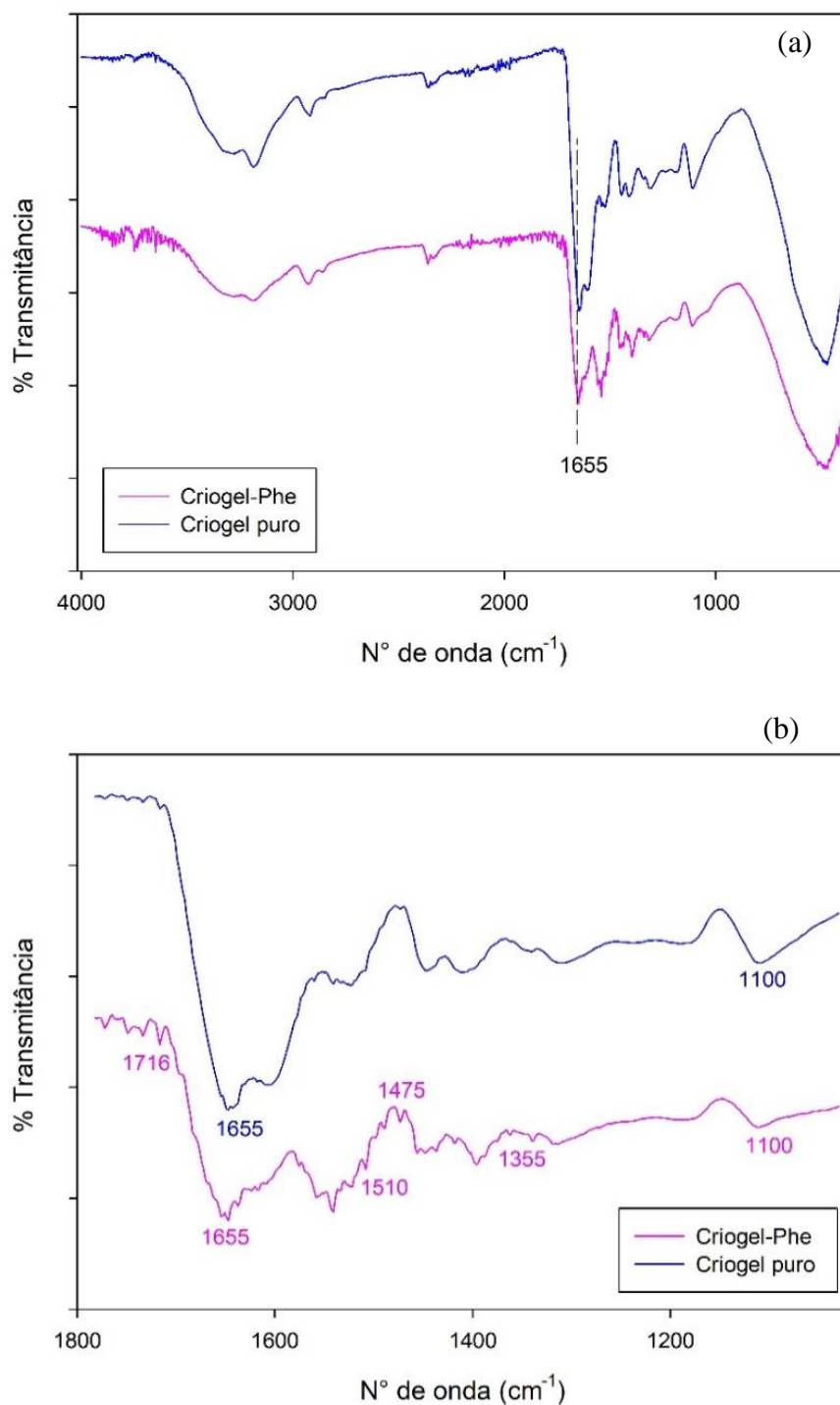


Figura 2 – Espectros de FTIR criogel puro e do criogel-Phe: (a) espectro completo, (b) destaque para a região 1800 – 1070 cm⁻¹

A confirmação da imobilização da L-fenilalanina na superfície do criogel foi observada também através da diferença de concentração do aminoácido, nas soluções de L-fenilalanina antes e após o contato com o criogel durante o processo de funcionalização.

O conteúdo de fenilalanina imobilizado no criogel-Phe foi de $458,65 \pm 40,59 \text{ mg}_{\text{fenilalanina}} \text{ g}_{\text{criogel}}^{-1}$.

Efeito do tipo de sal e força iônica na adsorção de lisozima

As condições de adsorção de lisozima pura em soluções aquosas foram avaliadas aplicando diferentes tipos e concentrações de sais de sódio e pH (Tabela 1). Os resultados médios de adsorção da lisozima no criogel-Phe são apresentados na Tabela 2. Uma maior quantidade de lisozima adsorvida ($67,65 \pm 1,52 \text{ mg g}^{-1}$) foi alcançada ao se utilizar a solução salina de tiocianato de sódio $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0. Os resultados observados aqui para a adsorção de lisozima em criogel-Phe demonstraram que o tipo de ânion empregado na solução tampão influenciou o processo adsorptivo seguindo a série inversa de Hofmeister ($\text{SCN}^- > \text{Cl}^- \approx \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-}$). Efeito semelhante foi observado por Salis e colaboradores⁵⁴ quando estudaram a adsorção de lisozima em sílica mesoporosa SBA-15. Outras pesquisas também reportam a inversão da série de Hofmeister ao avaliarem a precipitação de lisozima^{20,55-57} e investigarem o efeito da concentração de eletrólitos²¹ e dos sais na hidratação de lisozima^{19,58}.

A inversão da série ocorreu porque os valores de pH utilizados neste trabalho foram inferiores ao ponto isoelétrico (pI) da lisozima (10,7). Em valores de $\text{pH} < \text{pI}$, as proteínas protonadas adsorvem os íons altamente polarizados (como SCN^{-1}) em sua superfície¹⁸. Isto gera uma orientação mais fraca das moléculas de água em volta da superfície da proteína comparada com a orientação ocasionada pelos ânions classificados como cosmotrópicos (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}). Nesta condição, a adsorção dos íons resulta em uma hidratação fraca da proteína,^{58,59} favorecendo assim a interação hidrofóbica entre ligante e áreas hidrofóbicas da lisozima. Percebe-se que a ação dos íons sobre as proteínas está associada a efeitos complexos envolvendo múltiplas interações entre ânions e proteína⁶⁰. O cátion Na^+ , por motivos eletrostáticos, tendem a afastar da proteína carregada positivamente.⁵⁹

Além disso, Zhang e Cremer²¹ indicam que em concentrações salinas inferiores a 200 ou 300 mmol L^{-1} a lisozima segue a série inversa de Hofmeister, permitindo assim que, em baixas concentrações de ânions caotrópicos, haja pouca hidratação da proteína. Neste trabalho foi observado que em concentrações de tiocianato de sódio superiores a 0,100 mol L^{-1} , os ânions SCN^{-1} promoveram a precipitação da lisozima⁶¹⁻⁶³, o que explica o uso de menores concentrações deste sal durante os ensaios.

Na Tabela 2 observa-se que incrementos na força iônica promoveram uma redução na adsorção de lisozima pelo criogel-Phe, indicando que esta coluna apresenta um mecanismo de adsorção muito específico. O aumento da concentração salina sugere um favorecimento da interação proteína-proteína em detrimento da interação proteína-ligante presente no criogel-Phe e a presença de hidroxila do ácido carboxílico no ligante L-fenilalanina pode ter contribuído para adsorção de lisozima por ligação de hidrogênio.^{16,34}

Tabela 2 - Conteúdo de lisozima adsorvida no criogel-Phe (q) em função das diferenças condições de forças iônica e pH, à temperatura de 25 °C. Concentração inicial de solução de lisozima = 1 mg mL⁻¹.

		q (mg g ⁻¹)		
		pH		
Tipo de sal	Concentração (mol L ⁻¹)	5,0	7,0	9,0
Tiocianato de sódio	0,025	67,65 ± 1,52 ^a	56,53 ± 1,24 ^{ab}	45,65 ± 4,52 ^{bc}
	0,050	32,30 ± 3,49 ^d	36,23 ± 5,93 ^{cd}	61,92 ± 2,36 ^a
	0,100	31,41 ± 1,44 ^d	35,16 ± 6,43 ^{cd}	40,79 ± 4,86 ^{cd}
Fosfato de sódio	0,025	18,46 ± 1,20 ^{cd}	25,91 ± 1,05 ^b	45,26 ± 4,35 ^a
	0,100	3,94 ± 0,66 ^e	13,58 ± 1,84 ^d	19,11 ± 1,10 ^c
	0,300	2,20 ± 0,56 ^e	6,06 ± 0,57 ^e	13,75 ± 0,19 ^d
Sulfato de sódio	0,025	56,00 ± 1,48 ^a	52,42 ± 6,55 ^a	35,51 ± 1,11 ^b
	0,100	14,89 ± 0,60 ^c	15,36 ± 1,05 ^c	17,03 ± 1,13 ^c
	0,300	3,79 ± 0,48 ^d	7,12 ± 0,59 ^d	6,26 ± 1,36 ^d
Cloreto de sódio	0,025	53,85 ± 0,72 ^a	30,52 ± 4,78 ^{bc}	25,81 ± 0,28 ^c
	0,100	30,24 ± 1,27 ^{bc}	27,59 ± 1,74 ^{bc}	32,11 ± 1,62 ^b
	0,300	7,39 ± 0,43 ^e	6,91 ± 0,46 ^e	13,81 ± 0,50 ^d

*Os valores médios seguidos de mesma letra para cada tipo sal indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Efeito do pH na adsorção de lisozima

Analisando os resultados da Tabela 2, nota-se que, para os diferentes sais testados, os incrementos no pH não afetaram a capacidade adsortiva do criogel-Phe de forma homogênea. De modo geral, à medida que o pH da solução tende a se aproximar do pI da proteína ocorre uma redução da hidratação da proteína⁶⁴, contribuindo positivamente para a interação hidrofóbica.⁶⁵ Porém, isto não foi percebido em todos os tratamentos testados, evidenciando que em determinadas condições, o efeito da força iônica se sobrepôs ao efeito do pH. No entanto, ressalta-se que nas maiores concentrações salinas, o efeito hidrofóbico é mais pronunciado, uma vez que a capacidade adsortiva aumentou com a elevação do pH. As maiores capacidades adsortivas foram obtidas em pH 5,0, indicando que nesta condição foram maximizadas as interações hidrofóbicas e outros tipos de interações fracas (interações de afinidade inespecíficas, interações de Van der Waals, interações fracas de troca iônica) e ligações de hidrogênio envolvidos entre a lisozima e a matriz do criogel-Phe.^{14,34,66}

Purificação de lisozima de clara de ovo de galinha

A solução de clara de ovo de galinha (CEW) foi aplicada na coluna cromatográfica objetivando a purificação de lisozima. A Figura 3 ilustra um pico único obtido após percolar a solução inicial CEW, realizar a lavagem e eluir a lisozima da coluna criogel-Phe.

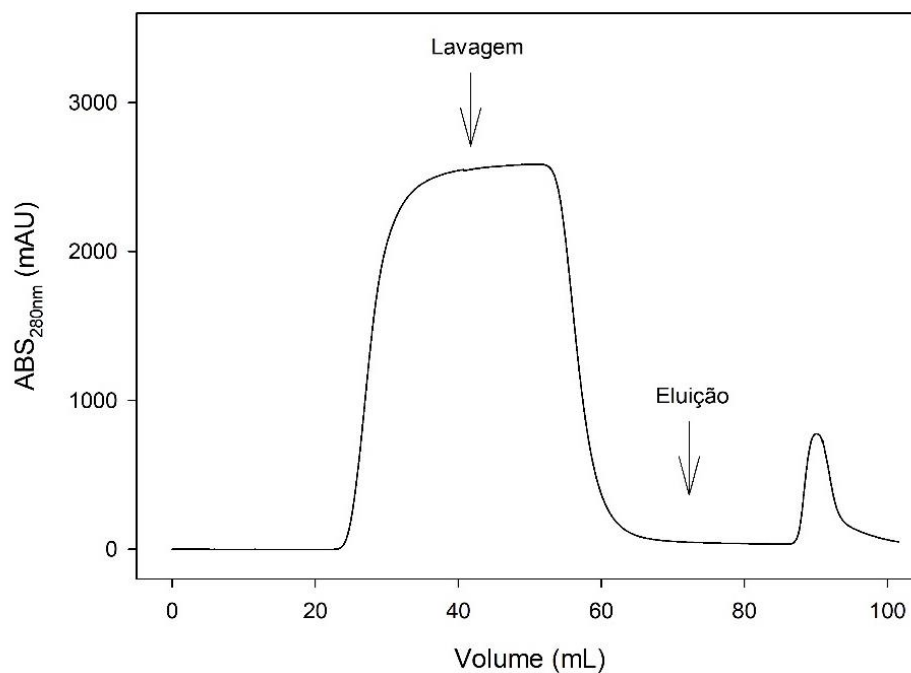


Figura 3 - Perfil de adsorção da purificação de lisozima a partir de uma solução de CEW contendo $7,97 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas totais e $0,61 \text{ mg mL}^{-1}$ de lisozima usando a coluna criogel-Phe em um sistema cromatográfico Äkta™ pure 25 à temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A coluna foi equilibrada com solução salina de tiocianato de sódio $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0 e a eluição com ácido acético (1%).

A Tabela 3 mostra os valores da atividade enzimática na solução inicial de CEW e na fração de eluido coletado na coluna de criogel-Phe, bem como os parâmetros relacionados a pureza da lisozima purificada. Observa-se que o processo de purificação manteve a atividade enzimática da lisozima, conservando assim sua ação contra microrganismos. A recuperação e fator de purificação foi inferior aos resultados obtidos por Türkmen e Denizli³¹ (78% e 52) para criogéis com esferas de afinidade hidrofóbicas. A pureza foi superior ao valor de 79% relatado por Veríssimo et al.⁵ quando utilizou a clara de ovo de galinha diluída nas proporções 1:2 e 1:7 e ao reportado por Türkmen e Denizli³¹ (85%).

A Figura 4 apresenta o gel de eletroforese SDS-PAGE, no qual observa-se uma banda única em 14,3 kDa para a amostra eluída do criogel-Phe, confirmando a purificação da lisozima a partir da solução de CEW.

Tabela 3 - Purificação de lisozima de CEW usando o criogel-Phe utilizando uma vazão de 1 mL min⁻¹, à temperatura de 25 °C.

Amostras	Proteína total (mg mL ⁻¹)	Concentração de lisozima (mg mL ⁻¹)	Atividade total (U mL ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Recuperação (%)	Fator de purificação	Pureza (%)
Solução inicial de CEW	7,97	0,61	2176,67	273,11	100	1	-
Eluido	0,67	0,59	1294,17	1931,60	31,66	11,49	87,92

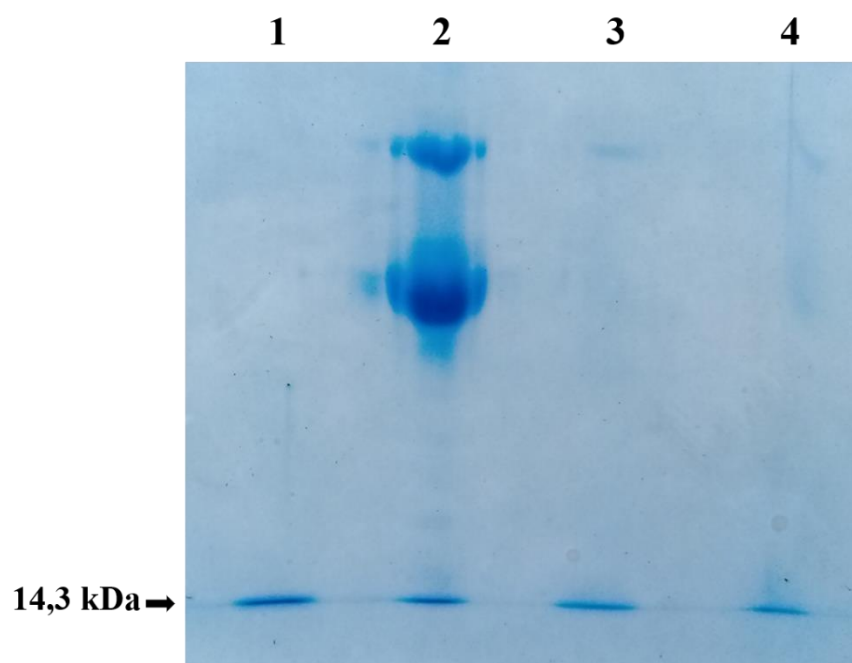


Figura 4 - Análise de SDS-PAGE da lisozima purificada da clara de ovo pela coluna de criogel-Phe usando cromatografia com eluição isocrática. (1) lisozima pura (1 mg mL⁻¹); (2) Solução inicial de CEW diluída 1:4; (3) e (4) frações do pico eluído da coluna de criogel-Phe.

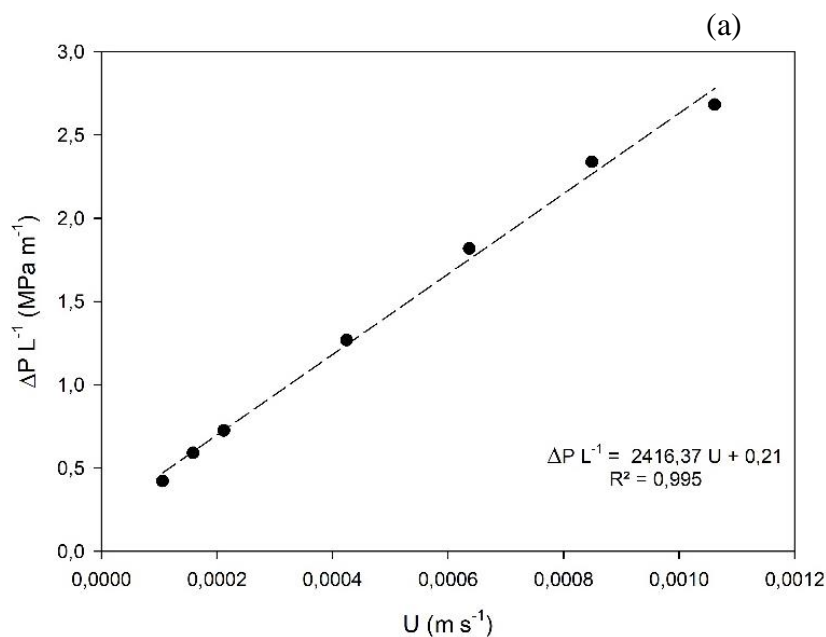
Caracterização hidrodinâmica

A relação linear entre queda de pressão na coluna de criogel-Phe e a velocidade de fluxo é apresentada na Figura 5a. Pela equação de Darcy (Eq. (6)) a permeabilidade hidráulica calculada para o criogel-Phe foi de $4,15 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Esse resultado foi semelhante aos obtidos por Carvalho et al.⁶⁷ ($4,71 \times 10^{-13} \text{ m}^2$) para criogéis de poliacrilamida com íons de cobre e menor que o obtido por Mól et al.⁴ ($5,9 \times 10^{-13} \text{ m}^2$)

para criogéis de poli(acrilamida) imobilizados de tris-hidroximetil-aminometano e Yao et al.⁶⁸ ($8,27 \times 10^{-13} \text{ m}^2$) para criogel de poli(acrilamida) com nanopartículas de Fe_3O_4 .

A Figura 5b apresenta as curvas adimensionais de E_θ (função densidade de residência) em diferentes velocidades de fluxos. Observa-se que as curvas são quase simétricas indicando que a matriz do criogel possui uma estrutura porosa homogênea e uma distribuição uniforme dos poros.⁶⁹

O coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) variou de 10^{-7} a $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, valor este semelhante ao encontrado por Yao et al.⁶⁹ e ligeiramente superior ao obtido por Yao et al.⁶⁸ (10^{-8} a $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). A HETP variou de 0,10 a 0,21 cm. Resultados próximos foram relatados por Yao et al.⁶⁹ (0,13 a 0,20 cm) utilizando água como fase móvel e por Mól et al.⁴ ($\pm 0,20 \text{ cm}$) aplicando polietilenoglicol (2,5 %) como fase móvel.



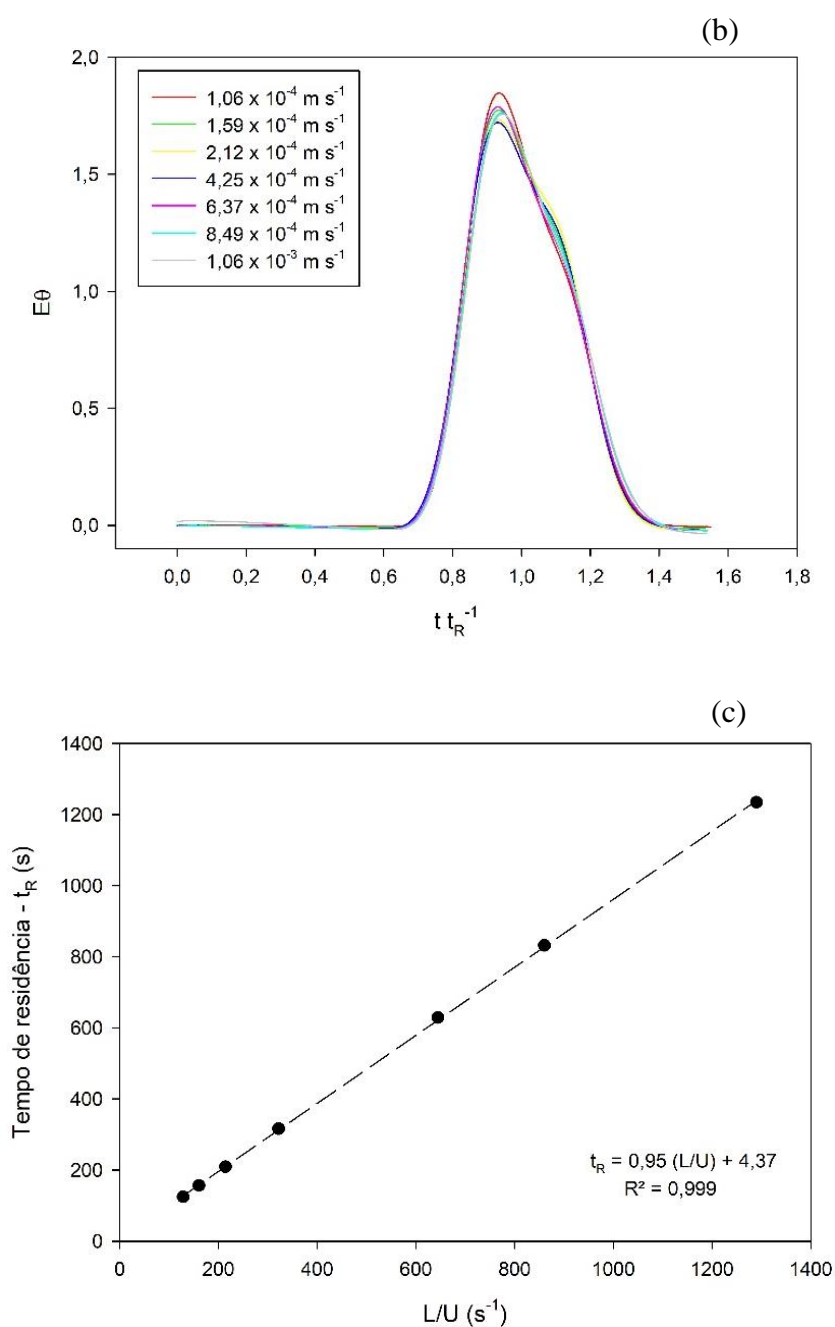


Figura 5 – Curvas obtidas em diferentes velocidades de fluxo ($1,06 \times 10^{-4}$ a $1,06 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$): (a) Queda de pressão ao longo da coluna criogel-Phe, (b) Curvas adimensionais E_θ , (c) Variação do tempo de residência na coluna criogel-Phe.

A porosidade determinada para o criogel-Phe foi de 0,95 ($R^2 = 0,999$, Figura 5c), valor ligeiramente superior ao de 0,91 observado por Mól et al.⁴ A alta porosidade apresentada pelo criogel-Phe e a estrutura porosa formada por poros interconectados com diâmetro variando de 10 a 75 μm podem ser visualizadas na Figura 6. Observa-se que o processo de funcionalização do criogel não alterou sua característica de estrutura

supermacroporosa, possibilitando assim seu uso na purificação de extratos brutos, viscosos e até contendo partículas.^{8,47}

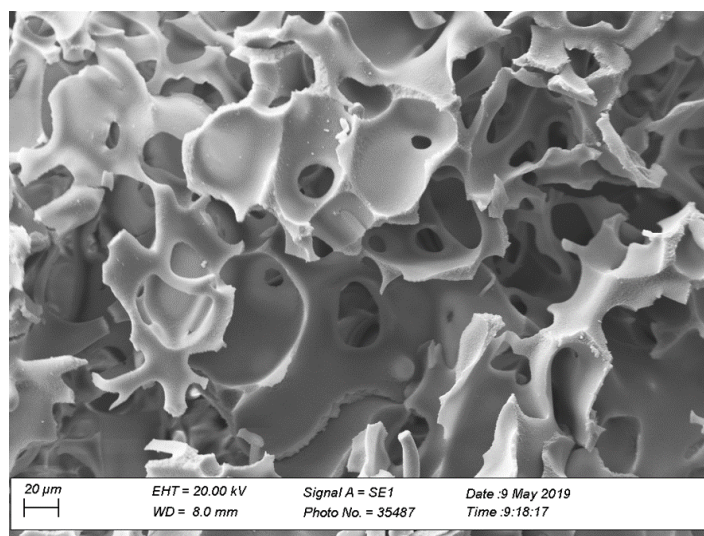


Figura 6 – Micrografia do criogel-Phe (magnificação $\times 600$).

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi investigada para o criogel puro e o criogel-Phe. Os resultados das características avaliadas são apresentados na Tabela 4. Foram observadas diferenças mínimas entre os parâmetros dos criogéis puros e aqueles funcionalizados com L-fenilalanina, indicando pouco efeito do processo de ativação química na estrutura do criogel. Nota-se que o criogel-Phe apresenta uma redução da fração de meso e microporos devido a obstrução dos pequenos poros após a funcionalização e incremento da fração de macroporos, pois a presença do aminoácido hidrofóbicos promoveu menor adsorção de água, ocupando mais espaços.

A capacidade de inchamento do criogel-Phe foi superior aos valores de $6,99 \text{ g g}^{-1}$ e $7,199 \text{ g g}^{-1}$ reportados por Yilmaz et al.⁶⁶ e Oliveira et al.³⁴, para criogéis contendo L-triptofano. O grau de expansão foi ligeiramente inferior ao obtido por Oliveira et al.³⁴ ($16,960 \text{ mL g}^{-1}$) e a fração de macroporos foi superior (0,343). A fração de meso e microporos e a fração de polímero seco foi superior aos valores obtidos por Silva et al.⁸ (0,119 e 0,044) e Gonçalves et al.⁴⁹ (0,238 e 0,057) em criogéis imobilizados com carboidrato N-acetil-D-glicosamina por método glutaraldeído.

Tabela 4 - Caracterização morfológicas do criogel-Phe e criogel puro (controle).

Parâmetros	Criogel-Phe	Criogel puro
S (g g ⁻¹)	13,995 ± 1,147 ^a	13,143 ± 0,979 ^a
ED (mL g ⁻¹)	18,138 ± 2,681 ^a	16,065 ± 1,738 ^a
φ_{wb}	0,011 ± 0,001 ^a	0,010 ± 0,001 ^a
φ_d	0,067 ± 0,006 ^a	0,071 ± 0,005 ^a
φ_M	0,585 ± 0,052 ^b	0,654 ± 0,053 ^a
φ_m	0,337 ± 0,051 ^a	0,264 ± 0,050 ^b

*Valores médios com a mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Determinação da densidade de ligantes

Por possuírem monômeros AGE em sua composição, a superfície dos criogéis sintetizados contém grupamentos epóxi que possibilitam a imobilização de ligantes via ligação covalente. A determinação da densidade de grupamentos epóxi alcançada foi de $369,17 \pm 58,12 \mu\text{mol g}^{-1}$ de polímero seco. Uma densidade de ligantes superior foi obtido por Arvidsson et al.⁴⁷ ($745 \mu\text{mol g}^{-1}$) e Bibi et al.⁷⁰ ($770 \mu\text{mol g}^{-1}$) para criogéis aplicados em cromatografia de afinidade por íons metálicos.

Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos criogéis foram determinadas exercendo compressão uniaxial sobre o monólito e por meio da força máxima foi calculado o módulo de Young. O criogel puro apresentou um módulo de Young de $418,26 \pm 47,00 \text{ kPa}$ enquanto o criogel-Phe exibiu um valor de $526,71 \pm 27,21 \text{ kPa}$. Observa-se que o braço espaçador formado durante a funcionalização do criogel contribuiu para aumentar a resistência estrutural do material. O resultado obtido foi inferior ao reportado por Oliveira et al.³⁴ em criogéis de poliácridamida imobilizados com aminoácido triptofano ($866,37 \text{ kPa}$) e superior ao relatados por Wang et al.⁴⁸ (125 kPa) para criogéis de poliácridamida com nanocristais de celulose e óxido de zinco e por Bóber et al.⁷¹ (20 kPa) para criogéis de

poli(vinil álcool). O elevado valor do módulo de Young encontrado no presente trabalho ainda pode ser atribuído à presença do monômero AGE na composição do criogel.⁴⁹

Análises térmicas

As curvas de TGA e DTG do criogel puro e criogel-Phe são mostradas nas Figuras 7 a e b. O primeiro evento térmico (I) promoveu uma redução de massa de 11,42% e 16,65% devido à perda de água absorvida pelo criogel puro e criogel-Phe, respectivamente. Ambos os criogéis apresentam alta resistência térmica, pois permaneceram estáveis até aproximadamente 200 °C. Posteriormente (II) ocorreu a decomposição térmica com uma perda acentuada de massa de 59,43% para o criogel puro e 68,22% para o criogel-Phe. No estágio III ocorreu uma lenta perda de massa, resultando na degradação total de 89,21% do criogel puro e de 91,27% do criogel-Phe.

Por meio da DTG nota-se que o criogel puro (Figura 7a) exibiu duas perdas de massas na etapa II (próxima a 310°C), que pode ser atribuída a perda de NH₃ por imidização e perda de água por desidratação da poliacrilamida, pois esta degradação ocorre entre 220 °C e 340 °C, e uma perda (em torno de 394 °C) devido à quebra da cadeia principal de poliacrilamida que ocorre em temperatura superior a 340 °C.⁷² No criogel-Phe (Figura 7b) observa-se um pico alargado que engloba além das curvas de degradação da poliacrilamida, curvas referente a decomposição do aminoácido L-fenilalanina que inicia em 291 °C com a descarboxilação e produção de CO₂ e benzenoetamina seguida por um segundo estágio de decomposição, aproximadamente 404 °C, que gera tolueno, NH₃, HNCO₃, HCN, CO e CO₂.⁷³

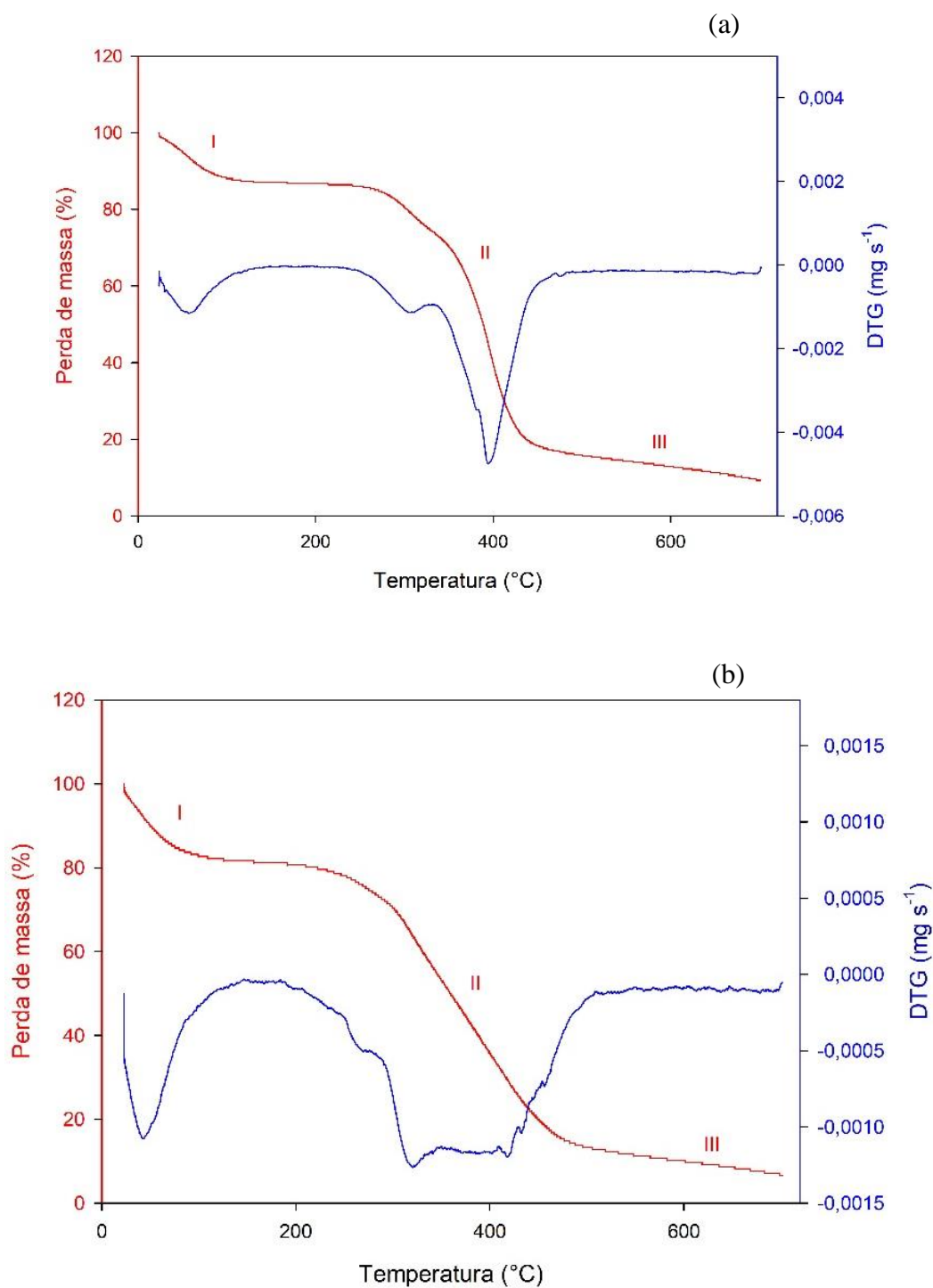


Figura 7 – Curvas de TGA e DTG: (a) criogel puro, (b) criogel-Phe.

O comportamento térmico do criogel também foi estudado por meio da calorimetria diferencial de varredura (DSC) e as transições térmicas são apresentadas no Figura 8. Durante a etapa de aquecimento, observou uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 17,29 °C para o criogel puro e 17,80 °C para o criogel-Phe. Nota-se que o

processo de imobilização do aminoácido L-fenilalanina elevou ligeiramente a Tg do criogel, o que pode ser atribuído à presença do braço espaçador ancorado no monólito. A ausência de outro evento térmica como a fusão sugere que os criogéis possuem uma estrutura amorfa.

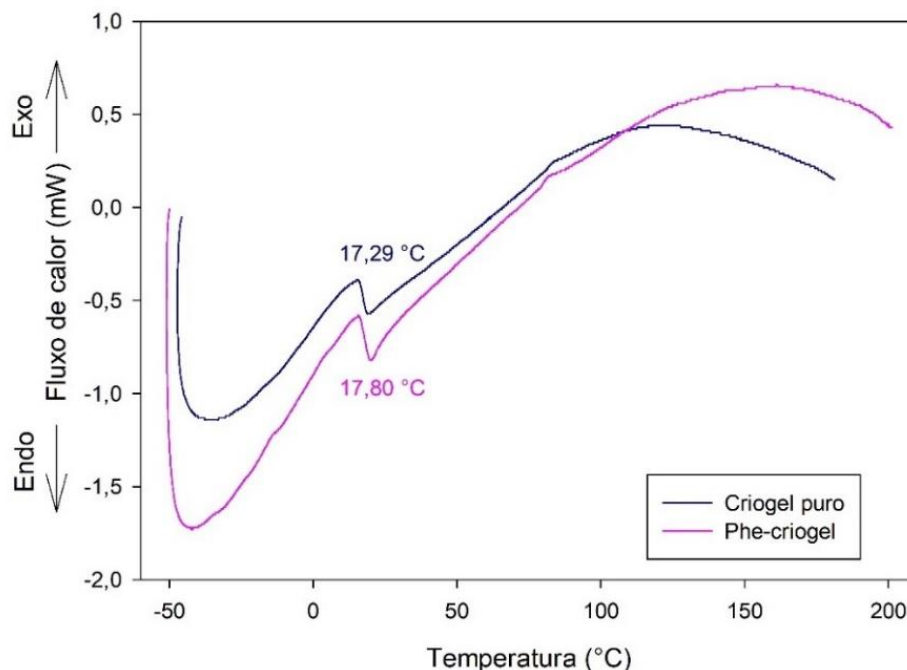


Figura 8 – Curvas de DSC do criogel puro e criogel-Phe

Difração de raio-X (DRX)

A cristalinidade do criogel foi verificado por meio de DRX. A Figura 9 apresenta o difratograma para o criogel puro e o criogel-Phe. Para ambas as amostras, somente uma pequena elevação com intensidade máxima de aproximadamente 21° foi observada entre 2θ variando de 10° a 30° . Percebe-se que o processo de funcionalização do criogel com L-fenilalanina não afetou a estrutura do monólito. Nenhum pico cristalino acentuado foi observado, indicando uma estrutura amorfa dos criogéis, o que também é suportado pelos resultados observados nas curvas de DSC (Figura 9). Perfil semelhante foi observado por Babić et al.⁷⁴, que relataram um aspecto típico de material amorfo para o criogel nanocompósito de SBA-15. Os espectros de difração de raios X obtidos por Goganian et al.⁷⁵ para hidrogéis de metacrilato de dimetil-amino-etil e acrilamida e obtido por Nath et al.⁷⁶ para hidrogéis de gelatina-g-poli(ácido-acrílico-co-acrilamida) também apresentaram naturezas amorfas.

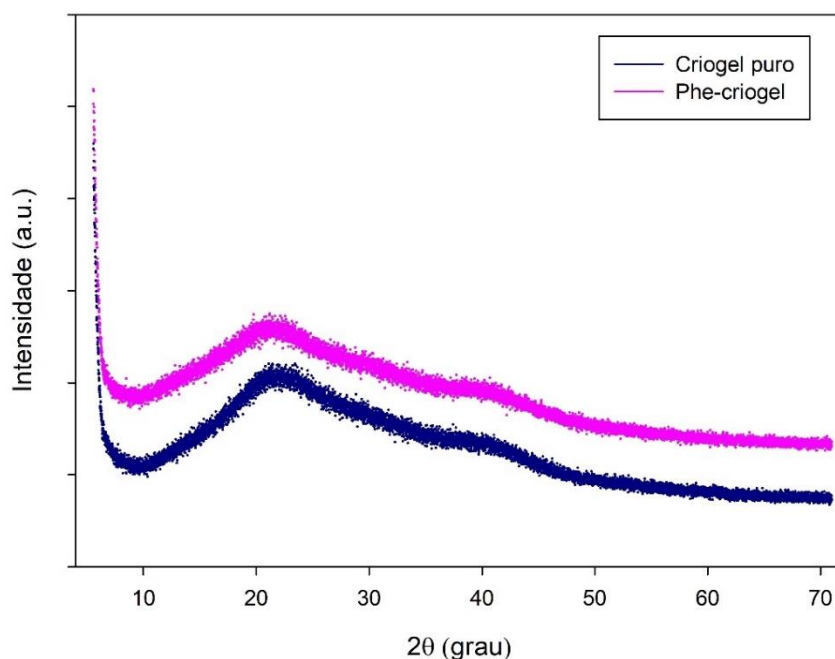


Figura 9 – Curvas de DRX para criogel puro e criogel-Phe

CONCLUSÃO

Neste trabalho uma nova coluna de criogel de poliacrilamida funcionalizada com L-fenilalanina foi sintetizada e aplicada na purificação de lisozima. Este material desperta interesse já que se trata de uma matriz com ligante pseudo-específico, de baixo custo e funcional na adsorção de lisozima. O criogel-Phe apresentou alta resistência mecânica ($526,71 \pm 27,21$ kPa) e térmica, iniciando a degradação térmica após 200 °C. Além de alta permeabilidade, ligeira dispersão axial e alta porosidade (0,95) em sua estrutura, o que o torna um material cromatográfico ideal para a purificação de extratos brutos como a clara de ovo de galinha. Por meio do DSC (T_g igual a $17,80$ °C) e DRX o criogel-Phe apresentou características de um material amorfo. A maior adsorção de lisozima ($67,65 \pm 1,52$ mg g⁻¹) no criogel-Phe foi obtida usando solução salina de tiocianato de sódio ($0,025$ mol L⁻¹, pH 5,0) indicando uma inversão da série aniônica de Hofmeister e o favorecimento das interações hidrofóbicas e outras interações fracas entre proteína-ligante nesta condição. A lisozima de clara de ovo de galinha foi purificada de forma satisfatória empregando o criogel-Phe, vide os resultados de pureza de 87,92%, fator de purificação de 11,49, atividade enzimática de $1294,17$ U mL⁻¹ e a presença de uma banda única de lisozima no gel de eletroforese SDS-PAGE.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [número de concessão 001]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [número da concessão 134556 / 2014-3], [número da concessão 150744 / 2015-3]; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais [número de concessão TEC - APQ-00647-17]. Os autores também agradecem ao Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ) e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras e a Finep, Fapemig, Capes e CNPq pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, cromatografia líquida de alta eficiência e microscopia eletrônica, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Ertürk, G.; Mattiasson, B. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1357*, 24.
2. Lozinsky, V. I.; Plieva, F. M.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *Bioseparation* **2002**, *10*, 163.
3. Perçin, I.; Khalaf, R.; Brand, B.; Morbidelli, M.; Gezici, O. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1386*, 13.
4. Mol, P. C. G.; Veríssimo, L. A. A.; Eller, M. R.; Minim, V. P. R.; Minim, L. A. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1044–1045*, 17.
5. Veríssimo, L. A. A.; Paganoto, F. S.; Mol, P. C. G.; Fontan, R. d. C. I.; Minim, V. P. R.; Minim, L. A. *Sep. Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1973.
6. Andaç, M.; Galaev, I. Y.; Denizli, A. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1021*, 69.
7. Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 101.
8. Silva, J. F. da; Silva, D. L. da; Nascimento, R. G.; Veríssimo, L. A. A.; Veloso, C. M.; Bonomo, R. C. F.; Fontan, R. da C. I. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 1.
9. Machado, A. P. da F.; Minim, L. A.; Fontan, R. da C. I.; Minim, V. P. R.; Gonçalves, G. R. F.; Mól, P. C. G. Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. *Fluid Phase Equilib.*

- 2015**, 401, 64–69.
10. Luo, Q.; Zou, H.; Zhang, Q.; Xiao, X.; Ni, J. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 80, 481.
 11. Vijayalakshmi, M. A. In *Molecular Interactions in Bioseparations*; Ngo, T. T., Ed.; Springer US: Boston, MA, **1993**; pp 257.
 12. Demirçelik, A. H.; Perçin, I.; Denizli, A. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **2017**, 54, 71.
 13. Pitiot, O.; Legallais, C.; Darnige, L.; Vijayalakshmi, M. A. *J. Memb. Sci.* **2000**, 166, 221.
 14. Öncel, Ş.; Uzun, L.; Garipcan, B.; Denizli, A. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 7049.
 15. Tomaz, C. T. In *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*; Fanali, S.; Poole, C. F.; Haddad, P. R.; Riekkola, M.-L., Eds.; Elsevier Inc., **2017**; Vol. 1, pp 171.
 16. Queiroz, J. A.; Tomaz, C. T.; Cabral, J. M. S. *J. Biotechnol.* **2001**, 87, 143.
 17. Hofmeister, F. *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **1888**, 25, 1.
 18. Boström, M.; Tavares, F. W.; Finet, S.; Skouri-Panet, F.; Tardieu, A.; Ninham, B. W. *Biophys. Chem.* **2005**, 117, 217.
 19. Finet, S.; Skouri-Panet, F.; Casselyn, M.; Bonneté, F.; Tardieu, A. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 112.
 20. Carbonnaux, C.; Ries-kautt, M.; Ducruix, A. *Encycl. Parasitol.* **1995**, 4, 2123.
 21. Zhang, Y.; Cremer, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 15249.
 22. Boschetti, E. *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 333.
 23. Weston, A.; Brown, P. R. In *HPLC and CE*; **1997**; pp 24.
 24. Abeyrathne, E. D. N. S.; Lee, H. Y.; Ahn, D. U. *Poult. Sci.* **2013**, 92, 3292.
 25. Hashemi, M. M.; Aminlari, M.; Moosavinasab, M. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, 57, 594.

26. Houpalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Shcade, R. *Lysozyme.pdf*; **2007**.
27. Yeh, C. K.; Dodds, M. W. J.; Zuo, P.; Johnson, D. A. *Arch. Oral Biol.* **1997**, *42*, 25.
28. Doi, E.; Naofumi, K. In *Food Proteins and Their Applications*; **1997**; Vol. 1, pp 325.
29. Ghosh, R.; Silva, S. S.; Cui, Z. *Biochem. Eng. J.* **2000**, *6*, 19.
30. Quan, L.; Cao, Q.; Li, Z.; Li, N.; Li, K.; Liu, F. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877, 594.
31. Türkmen, D.; Denizli, A. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 859.
32. Claessens, H. A. *Characterization of stationary phases for HPLC column testing clarification and chemical stability*; **1998**.
33. Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B. *Isolation and Purification of Proteins*; **2003**.
34. Oliveira, A. C. F. de; Neves, I. C. O.; Saraiva, J. A. M.; de Carvalho, M. F. F.; Batista, G. A.; Veríssimo, L. A. A.; Resende, J. V. de *Sep. Sci. Technol.* **2019**, *0*, 1.
35. Grappin, R.; Horwitz, W. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 893.
36. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
37. Liao, Y.-H.; Brown, M. B.; Martin, G. P. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 549.
38. Shugar, D. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *8*, 302.
39. Paredes, B.; González, S.; Rendueles, M.; Díaz, J. M. *Sep. Purif. Technol.* **2004**, *40*, 243.
40. Furusawa, T.; Smith, M.; Suzuki, M. *Catal. Rev.* **1976**, *13*, 43.
41. Chang, Y. K.; Chase, H. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 512.
42. Bidlingmeyer, B. A.; Warren Jr., F. V. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1583A.
43. Savina, I. N.; Mattiasson, B.; Galaev, I. Y. *Polymer (Guildf)*. **2005**, *46*, 9596.
44. Fontan, R. da C. I. *Food Technol. Fed. Univ. Viçosa, Viçosa* **2013**, 147.

45. Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Deraz, S.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *807*, 129.
46. Plieva, F. M.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 828.
47. Arvidsson, P.; Plieva, F. M.; Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *J. Chromatogr. A* **2003**, *986*, 275.
48. Wang, D. C.; Yu, H. Y.; Song, M. L.; Yang, R. T.; Yao, J. M. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 6776.
49. Gonçalves, G. R. F.; Gandolfi, O. R. R.; Santos, C. M. S.; Bonomo, R. C. F.; Veloso, C. M.; Fontan, R. da C. I. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1033–1034*, 406.
50. Mourão, C. A.; Marcuz, C.; Haupt, K.; Bueno, S. M. A. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2019**, *1129*, 121783.
51. Mallik, R.; Hage, D. S. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1686.
52. Mohamed, M. A.; Jaafar, J.; Ismail, A. F.; Othman, M. H. D.; Rahman, M. A. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*; Elsevier B.V., **2017**; Vol. 74.
53. Coates, J. *Encycl. Anal. Chem.* **2006**, *1*.
54. Salis, A.; Bhattacharyya, M. S.; Monduzzi, M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7996.
55. Ducruix, A.; Guilloteau, J. P.; Riès-Kautta, M.; Tardieu, A. *J. Cryst. Growth* **1996**, *168*, 28.
56. Ries-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 745.
57. Tardieu, A.; Le Verge, A.; Malfois, M.; Bonneté, F.; Finet, S.; Riès-Kautt, M.; Belloni, L. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196*, 193.
58. Aoki, K.; Shiraki, K.; Hattori, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 15060.
59. Flores, S. C.; Kherb, J.; Cremer, P. S. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 14408.
60. Paterová, J.; Rembert, K. B.; Heyda, J.; Kurra, Y.; Okur, H. I.; Liu, W. R.; Hilty, C.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8150.

61. Jones, W. F.; Wiencek, J. M.; Darcy, P. A. *J. Cryst. Growth* **2001**, 232, 221.
62. Jones, W. F.; Arnold, M. A.; Wiencek, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2004**, 4, 1387.
63. Riès-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F. *J. Cryst. Growth* **1991**, 110, 20.
64. Baumann, P.; Baumgartner, K.; Hubbuch, J. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1396, 77.
65. Xia, F.; Nagrath, D.; Cramer, S. M. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1079, 229.
66. Yilmaz, F.; Bereli, N.; Yavuz, H.; Denizli, A. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 43, 272.
67. Carvalho, B. M. A.; Carvalho, L. M.; Silva, W. F.; Minim, L. A.; Soares, A. M.; Carvalho, G. G. P.; Da Silva, S. L. *Food Chem.* **2014**, 154, 308.
68. Yao, K.; Yun, J.; Shen, S.; Wang, L.; He, X.; Yu, X. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1109, 103.
69. Yao, K.; Shen, S.; Yun, J.; Wang, L.; He, X.; Yu, X. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, 61, 6701.
70. Bibi, N. S.; Singh, N. K.; Dsouza, R. N.; Aasim, M.; Fernández-Lahore, M. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 145.
71. Bober, P.; Capáková, Z.; Acharya, U.; Zasońska, B. A.; Humpolíček, P.; Hodan, J.; Hromádková, J.; Stejskal, J. *Synth. Met.* **2019**, 252, 122.
72. Van Dyke, J. D.; Kasperski, K. L. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1993**, 31, 1807.
73. Jie, L.; Yuwen, L.; Jingyan, S.; Zhiyong, W.; Ling, H.; Xi, Y.; Cunxin, W. *Thermochim. Acta* **2007**, 467, 20.
74. Babić, B.; Kokunešoski, M.; Miljković, M.; Prekajski, M.; Matović, B.; Gulicovski, J.; Bučevac, D. *Ceram. Int.* **2012**, 38, 4875.
75. Goganian, A. M.; Arsalani, N.; Khaksar Khiabani, H.; Zakerhamidi, M. S. *J. Polym. Res.* **2014**, 21, 1.
76. Nath, J.; Chowdhury, A.; Ali, I.; Dolui, S. K. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, 136, 1.

APÊNDICES

APÊNDICE A.

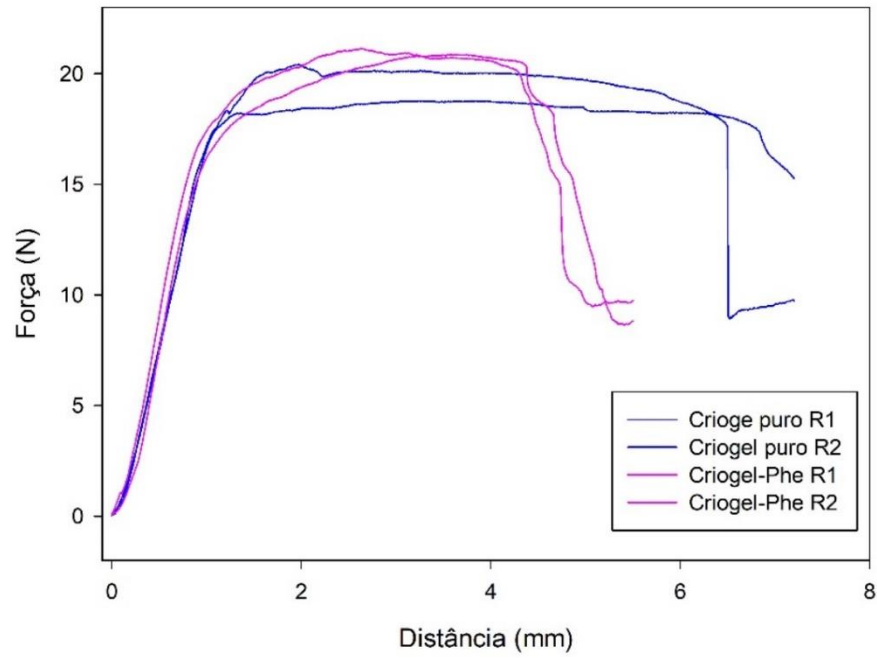


Figura 1 - Compressão uniaxial do criogel puro e do criogel-Phe