



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES SUPERMACROPOROSOS PARA A**  
**PURIFICAÇÃO DE LECTINAS POR AFINIDADE COM AÇÚCARES**

**GABRIEL RAMOS FERREIRA GONÇALVES**

**ITAPETINGA-BA**

**2016**

**GABRIEL RAMOS FERREIRA GONÇALVES**

**DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES SUPERMACROPOROSOS PARA A  
PURIFICAÇÃO DE LECTINAS POR AFINIDADE COM AÇÚCARES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADOR:**

Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**CO-ORIENTADORES:**

Profª. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. DSc. Leandro Soares Santos

**ITAPETINGA-BA**

**2016**

543     Gonçalves, Gabriel Ramos Ferreira  
G626d     Desenvolvimento de adsorventes supermacroporosos para a purificação de lectinas por afinidade com açúcares. / Gabriel Ramos Ferreira Gonçalves. - Itapetinga: UESB, 2016.  
           91p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos.

1. Purificação de lectinas – Monólitos. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Funcionalização dos criogéis. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

CDD(21): 543

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Purificação de lectinas – Monólitos
2. Cromatografia de afinidade
3. Funcionalização dos criogéis



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES SUPERMACROPOROSOS PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS POR AFINIDADE COM AÇÚCARES.

**Autor (a):** GABRIEL RAMOS FERREIRA GONÇALVES


**Orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Leandro Soares Santos

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo (UFLA)

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2016.

*A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”*

*Mahatma Gandhi*

*A Deus  
Aos meus pais  
Aos meus irmãos  
À Olga*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos.*

*Aos meus pais Francisco e Áurea, razão do meu viver, pelo carinho e amor incondicional, por cada gota de suor derramado, pelo esforço dispensado durante toda a vida e por se fazerem sempre presentes.*

*Aos meus irmãos Rafael e Ben-Hur, parceiros de toda a vida, com quem eu passei os melhores momentos, pelo companheirismo e por fazerem com que essa etapa se tornasse mais fácil. Amo vocês!*

*À minha namorada Olga, um presente que Deus colocou no meu caminho, que batalhou comigo os percalços enfrentados durante o mestrado, me dando forças para continuar. Sem você não teria chegado até aqui. Te amo demais!*

*Ao professor Rafael Fontan, pela excelente orientação, pelas sugestões valiosas ao longo do trabalho, pelos esclarecimentos nos momentos de dúvidas e pela amizade.*

*Aos professores Paulo e Renata Bonomo, pelos valiosos ensinamentos e pela amizade.*

*À professora Cristiane Veloso, pelos ensinamentos, por ter me concedido a primeira oportunidade de trabalhar com pesquisa e por fazer parte da banca examinadora.*

*Aos grandes amigos que fiz durante o curso, em especial a Rui, Jequié, Gabriel e Jhones pela parceria.*

*À professora Lizzy Veríssimo pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e por fazer parte da banca examinadora.*

*A todos os professores e alunos do LEP.*

*À Carilan, pela ajuda no desenvolvimento do experimento.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).*

*À FAPESB pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.*

*Ao CNPq pelo financiamento do projeto.*

*Ao CETENE pelas análises de espectroscopia FTIR.*

*A todos, que por ventura não tenha sido citados, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*Muito Obrigado!*

## RESUMO

GONÇALVES, G. R. F. **Desenvolvimento de adsorventes supermacroporosos para a purificação de lectinas por afinidade com açúcares.** Itapetinga-BA: UESB, 2016. 91 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

A produção de estruturas monolíticas poliméricas com poros altamente interconectados tem atraído a atenção de pesquisadores, visto que o desenvolvimento de adsorventes que permitam a purificação de biomoléculas mantendo sua bioatividade é essencial em diversos segmentos. Tais monólitos são versáteis no seu uso e possibilidades de funcionalização. Uma classe de macromoléculas passível de purificação utilizando-se monólitos poliméricos são as lectinas, proteínas que se ligam especificamente e reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados. Essa característica faz com que as lectinas apresentem vários efeitos biológicos, com potencial de uso. Diante do exposto, objetivou-se nesse trabalho desenvolver e caracterizar adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos voltados para o processo de purificação de lectinas por cromatografia de afinidade com carboidratos. Para tanto, foram avaliadas quatro técnicas de imobilização via ligação covalente do carboidrato N-acetil-D-glicosamina. Verificou-se que o método do glutaraldeído apresentou a maior capacidade de imobilização, sendo então utilizado para se avaliar a imobilização de diferentes açúcares no criogel, visando a aplicação na purificação de lectinas com diferentes especificidades. A imobilização dos carboidratos foi confirmada a partir da análise de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e as colunas produzidas com os diferentes métodos e açúcares mantiveram a estrutura macroporosa. Valores encontrados para a capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade, corroboram com o observado na literatura, assim como a elevada permeabilidade demonstra a facilidade de escoamento nas matrizes produzidas. Por fim, colunas funcionalizadas com N-acetil-D-glicosamina foram avaliadas para a adsorção da lectina Concanavalina A, verificando-se que as mesmas apresentaram boa estabilidade ao longo de sucessivos ciclos de uso, mantendo a capacidade adsortiva uniforme. Os resultados obtidos indicam que os criogéis produzidos apresentam potencial para o uso em processos de purificação de lectinas a partir de diversas fontes.

**Palavras-chave:** monólitos, afinidade, funcionalização.

---

\* Orientador: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-orientadores: Leandro Soares Santos, DSc., UESB; Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB.



## ABSTRACT

GONCALVES, G. R. F. **Development of supermacroporous adsorbents for lectins purification by sugar affinity.** Itapetinga-BA: UESB, 2016. 91 p. (Dissertation – Master's in Engineering and Food Science)\*

The production of polymeric monolithic structures with highly interconnected pores have attracted the attention of researchers due to the possibility of biomolecules purification retaining its bioactivity. These monoliths are versatile in their use and functionalization possibilities. One class of macromolecules subject to purification using polymeric monoliths are lectins, proteins which bind specifically and reversibly to carbohydrates and glycoconjugates. This ability does lectins exhibit various biological effects, with potential use in various segments. So, the goal in this study was to develop and characterize supermacroporous monolithic polymeric adsorbents for lectins purification by carbohydrate affinity chromatography. They were evaluated four immobilization techniques via covalent binding of N-acetyl-D-glucosamine carbohydrate. It was found that glutaraldehyde method present the largest immobilization capacity, and then used to evaluate the functionalization with different sugars into the cryogel, aimed at application in the purification of lectins with different specificities. The immobilization of carbohydrate was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis and columns produced present no differences in the macroporous structure as a function of activation methods and types of sugars tested. Found values for the swelling capacity, expansion degree and porosity corroborates with the findings in the literature, as well as high permeability demonstrates the ease of flow in the produced matrices. Finally, columns functionalized with N-acetyl-D-glucosamine were evaluated for adsorption of the lectin Concanavalin A, verifying that they showed good stability over repeated cycles of use, presenting uniform adsorption capacity. The results indicate that these monoliths have potential for lectins purification processes from a variety of sources.

**Keywords:** monoliths, affinity, functionalization.

---

\* Advisor: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-advisors: Leandro Soares Santos, DSc., UESB; Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB.

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL .....	12
REFERÊNCIAS .....	14
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>16</b>
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
1.1. Lectinas.....	17
1.1.1. Ocorrência .....	17
1.1.2. Classificação das lectinas .....	18
1.1.3. Mecanismo de interação com carboidratos .....	19
1.1.4. Propriedades biológicas e aplicações das lectinas.....	20
1.1.5. Purificação de lectinas .....	21
1.2. Purificação de biomoléculas por técnicas cromatográficas .....	22
1.3. Criogéis poliméricos monolíticos.....	23
1.4. Cromatografia de afinidade .....	27
1.5. Métodos de imobilização para produção de monólitos de afinidade .....	29
2. OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivo Geral .....	33
2.2. Objetivos Específicos .....	33
3. REFERÊNCIAS .....	34
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>46</b>
RESUMO .....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1. Reagentes.....	50
2.2. Síntese dos criogéis monolíticos.....	50
2.3. Imobilização do carboidrato .....	51
2.3.1. Método do epóxi.....	51
2.3.2. Imobilização com o método da Base de Schiff .....	52
2.3.3. Imobilização com o método do glutaraldeído .....	52
2.3.4. Imobilização com o método da etilenodiamina.....	53
2.4. Caracterização dos criogéis .....	53
2.4.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade.....	53
2.4.2. Permeabilidade ao escoamento.....	55
2.4.3. Avaliação da morfologia dos crogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
2.4.4. Determinação dos grupos funcionais por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	55

2.5. Avaliação do potencial de uso dos monólitos produzidos.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
Capacidade de inchamento e grau de expansão.....	58
Porosidade .....	59
Permeabilidade ao escoamento.....	62
Capacidade adsortiva e reutilização da coluna .....	64
4. CONCLUSÃO.....	65
5. REFERÊNCIAS .....	65
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>70</b>
RESUMO .....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1. Reagentes.....	73
2.2. Síntese dos criogéis monolíticos.....	73
2.3. Funcionalização dos criogéis.....	74
2.4. Caracterização dos criogéis .....	75
2.4.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade .....	75
2.4.2. Permeabilidade ao escoamento.....	76
2.4.3. Avaliação da morfologia dos criogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
2.5. Avaliação do potencial de uso dos monólitos produzidos.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
Caracterização dos criogéis .....	79
Avaliação da morfologia dos criogéis por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	80
Permeabilidade ao escoamento.....	81
Capacidade adsortiva e reutilização da coluna funcionalizada com D-GlcNAc .....	83
4. CONCLUSÕES .....	83
5. REFERÊNCIAS .....	84
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>90</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que reconhecem e se associam a carboidratos ou glicoconjugados de forma reversível, com alta afinidade e especificidade (SUZUKY et al., 2015; HE et al., 2015). Devido a tal habilidade essas biomoléculas apresentam diversas atividades biológicas, como atividade mitogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, entre outras (VASCONCELOS et al., 2015). Podem também ser utilizadas na produção de biossensores para a indústria de alimentos, verificando a presença de microrganismos, assegurando assim a qualidade de matérias primas e produtos industrializados (RAHAIE; KAZEMI, 2010). Devido às excelentes propriedades oferecidas pelas lectinas, o interesse na purificação das mesmas vem apresentando grande potencial.

Uma alternativa viável a ser utilizada no processo de purificação das lectinas é a utilização de técnicas cromatográficas. Tais técnicas estão entre as mais utilizadas para purificação de proteínas. Porém, a presença de grandes biomoléculas e meios muito concentrados desafiam os limites dos métodos cromatográficos tradicionais. Para superar esses inconvenientes, vem ocorrendo o desenvolvimento de materiais monolíticos poliméricos supermacroporosos, que permitem a separação de grandes biomoléculas e até mesmo de células inteiras em materiais não clarificados (MACHADO et al., 2015; JUNGBAUER; HAHN, 2008; YAVUZ; DENIZLI, 2015).

Dentre os monólitos utilizados como colunas cromatográficas, os criogéis poliméricos de poliacrilamida vêm apresentando destaque. Estes possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, além apresentarem baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas em cromatografia. Além disso, apresentam alta estabilidade química e mecânica, e resistência aos ciclos de secagem, umedecimento e esterilização (GUIOCHON, 2007; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; YAVUZ; DENIZLI, 2015). Tais características fazem dos criogéis poliméricos uma alternativa para serem utilizados nos processos de purificação cromatográficos.

Como desvantagem, tais estruturas apresentam em geral uma área superficial menor do que as tradicionais colunas cromatográficas, possuindo uma menor capacidade de ligação, o que acaba diminuindo a eficiência da purificação. Diante disso, modificações podem ser realizadas na estrutura dos criogéis visando aumentar sua capacidade de purificação (DRAGAN et al., 2012; WANG et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; YUN et al., 2014; UYGUN et al., 2015).

Uma alternativa viável é transformar os criogéis poliméricos em adsorventes de afinidade específica, por meio da enxertia do mesmo com grupos ligantes de interesse. Para a purificação de lectinas uma possibilidade de funcionalização é a imobilização de carboidratos na superfície dos criogéis, dada a habilidade desta classe de proteínas em se ligar a esse tipo de composto, favorecendo assim a adsorção na coluna, com consequente aumento na eficiência do processo de purificação.

Diante das características dos criogéis monolíticos e da possibilidade de obtenção de lectinas com elevado rendimento e grau de pureza, esse trabalho tem como proposta o desenvolvimento de adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos voltados para o processo de purificação de lectinas por meio de técnicas de cromatografia de afinidade. Para tanto, o presente trabalho foi conduzido dividido em três partes.

Na primeira parte foi feita uma revisão de literatura sobre as lectinas, os criogéis poliméricos, a cromatografia de afinidade e os métodos de ativação da superfície dos monólitos, visando à aquisição de conhecimento teórico suficiente para subsidiar o planejamento experimental e discussões subsequentes, além da definição dos principais objetivos deste trabalho.

Na segunda etapa foram avaliados diferentes métodos de ativação da superfície dos criogéis, para se verificar qual deles apresentaria a maior capacidade de imobilização do carboidrato utilizado, neste caso o monossacarídeo modificado N-acetil-D-glicosamina.

Por fim, determinado o melhor método para imobilização do carboidrato na segunda parte, o mesmo foi avaliado para a imobilização de diferentes isômeros do monossacarídeo testado na superfície dos criogéis.

Na segunda e terceira partes também foram avaliados aspectos físicos e químicos das estruturas poliméricas produzidas, além de se avaliar o potencial de aplicação das mesmas na adsorção de lectinas.

## REFERÊNCIAS

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v.204-206, n.15, p.198-209, 2012.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, BO. Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2014.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.

HE, S.; SHI, S.; WALID, E.; ZHANG, H.; MA, Y.; XUE, S. J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 166, p. 93-100, 2015.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies, **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 62-79, 2008.

MACHADO, A. P. F.; MINIM, L. A.; FONTAN; R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based biosensor: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 428-443, 2010.

SUZUKI, T.; ABE, T.; UMEHARA, K.; CHOI, J.-H.; HIRAI, H.; DOHRA, H.; KAWAGISHI, H. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Mycoscience**, v. 56, n. 4, p. 359-363, 2015.

UYGUN, D. A.; UYGUN, M.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 50, p. 379–385, 2015.

VASCONCELOS, M. A.; ALVES, A. C.; CARNEIRO, R. F. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

WANG, C.; BAI, S.; TAO, S-P.; SUN, Y. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1333, p. 54–59, 2014.

YAVUZ, H.; DENIZLI, A. A New Affinity Separation Medium: Supermacroporous Cryogels. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2015.

YUN, J.; CHENG, X.; YE, J.; SHEN, S.; YANG, G.; YAO, K.; KIRSEBOM, H.; LIN, Q.; GUAN, X.; YAO, J. Chromatographic Adsorption of Serum Albumin and Antibody Proteins in Cryogels with Benzyl-Quaternary Amine Ligands, **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 173-183, 2015.

---

***REVISÃO DE LITERATURA***

***OBJETIVOS***

---



# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Lectinas

Segundo Rüdiger e Gabius (2001), para uma molécula ser considerada lectina ela precisa satisfazer três critérios:

- Ser uma proteína que se liga a um carboidrato – excluindo assim todas as outras moléculas capazes de ligar com carboidrato que não seja proteína;
- Não modificar os açúcares aos quais se liga – excluindo assim todas as enzimas capazes de causar aglutinação celular que modificam os carboidratos.
- Lectinas são distintas de imunoglobulinas – no início do estudo sobre lectinas elas eram tidas como substâncias tipo anticorpo. Porém, embora os dois grupos de proteínas tenham especificidade de ligação, as imunoglobulinas necessitam de um estímulo antigênico para serem sintetizadas, enquanto as lectinas são produtos de origem não imunológica.

Assim, as lectinas podem ser definidas como proteínas (glicosiladas ou não) de origem não imunológica que se ligam de maneira reversível e específica a carboidratos (mono ou oligossacarídeo) ou substâncias que contenham açúcares, tais como glicoproteínas, glicolipídios ou até mesmo um ácido nucléico (nucleoproteínas), sem alterar a estrutura de seu ligante (RÜDIGER; GABIUS, 2001; PANDEY et al., 2009).

### 1.1.1. Ocorrência

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT et al., 2004), animais (MOURA et al., 2006) e vegetais (LEITE et al., 2005). Em vegetais, as lectinas são frequentemente isoladas de sementes (LATHA et al., 2006) e, em menores proporções, de outros tecidos vegetais, tais como folhas (COELHO; SILVA, 2000), cascas (INA et al., 2005), raízes (WANG; NG, 2006) e flores (SUSEELAN et al., 2002).

As lectinas produzidas nas sementes de plantas dominam o cenário da lectinologia por serem encontradas em maiores concentrações. A ampla ocorrência das lectinas em diferentes espécies, tecidos ou células demonstram a importância dessas moléculas na natureza (KENNEDY et al., 1995).

Entre tais biomoléculas, as mais estudadas são da família *Leguminosae*. Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, de *Solanaceae* (PEUMANS et al., 2003), *Amaranthaceae* (PORRAS et al., 2005), *Cactaceae* (ZENTENO et al., 1995), *Euphorbiaceae* (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), *Labiatae* (FERNÁNDEZ-ALONSO et al., 2003), *Moraceae* (MOREIRA et al.,

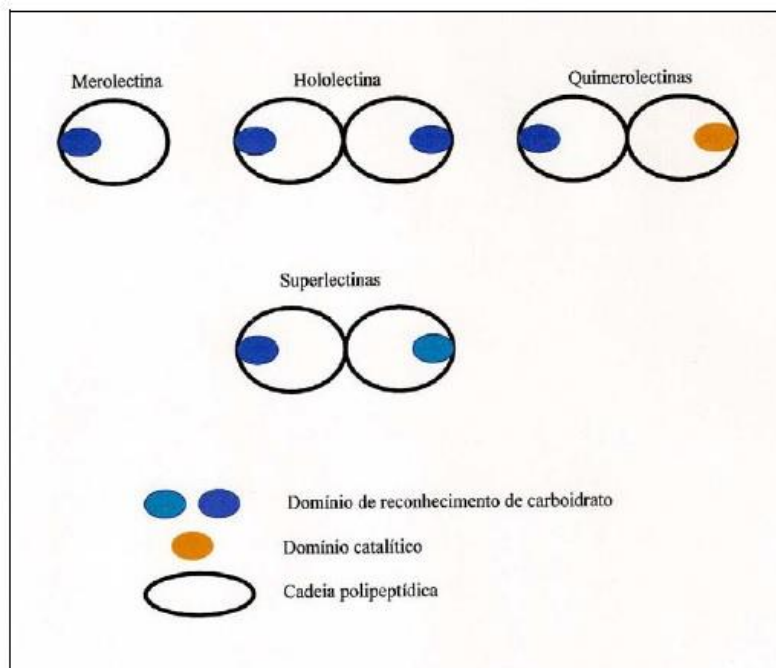
1998) e *Urticaceae* (KAVALALI, 2003), entre diversas outras. Além destas, lectinas vêm sendo extraídas de outras fontes, como a faveira-amargosa (SILVA et al., 2012a), pata-de-vaca (SILVA et al., 2012b), caranguejo-luva chinês (WANG et al., 2013) e banana (DIMITRIJEVIC et al., 2012), entre outros.

### **1.1.2. Classificação das lectinas**

As lectinas são classificadas baseando-se em vários critérios, de acordo com suas propriedades, tais como: na estrutura geral (VAN DAMME et al., 1998) e na especificidade ao carboidrato (LIS; SHARON, 1998).

Com base na estrutura geral, as lectinas têm sido subdivididas em quatro diferentes grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1). Merolectinas são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos. São monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm, pelo menos, dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares; sendo di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a esse grupo. Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado. Esse domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Esse pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas, consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1998).

**Figura 1:** Classificação das lectinas conforme a estrutura geral.



Fonte: Adaptado de VAN DAMME et al. (1998)

Lis e Sharon (1998) propuseram a classificação das lectinas com relação à especificidade açúcares simples: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, frutose e N-acetilneuramínico. Lectinas que apresentam afinidade com galactose geralmente interagem com N-acetilgalactosamina e por essa razão são apresentadas no mesmo grupo de especificidade. Essa especificidade é definida em função do monossacarídeo que mais eficazmente inibe a atividade lectínica (KENNEDY et al., 1995).

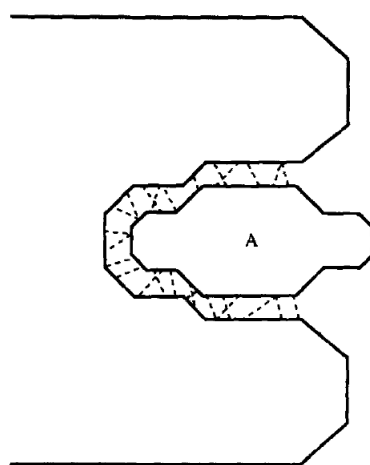
### 1.1.3. Mecanismo de interação com carboidratos

Existe uma grande diversidade na estrutura das lectinas. O número de subunidades por molécula é variável e a natureza dos polipeptídeos pode ser distinta. Interações hidrofóbicas, interações iônicas, ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio podem estar envolvidas na associação das subunidades. Os diferentes polipeptídeos presentes podem apresentar funções distintas. Por exemplo, a lectina de *Ricinus communis* possui dois tipos de subunidade, sendo um responsável pela atividade enzimática e o outro pela interação com os carboidratos (KENNEDY et al., 1995).

A complexação proteína-carboidrato ocorre por meio de uma região denominada domínio reconhecedor de carboidratos, que é altamente conservada em cada tipo de lectina (NI et al., 1996). Esse domínio reconhecedor das lectinas ajustam o carboidrato ligante através de um mecanismo do tipo chave e fechadura, que envolve redes complexas de ligação de hidrogênio (Figura 2). Os processos de interação ocorrem por meio de ligações não

covalentes, envolvendo o deslocamento de moléculas de água, associado ao grupo polar da proteína, e as que estão em torno do carboidrato, resultando na formação de novas redes de ligações de hidrogênio, que juntamente com as interações de Van der Waals, estabilizam essa complexação (KENNEDY et al., 1995). Além dessas interações, as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e atrações dipolo também podem estar envolvidas em tal complexação (VARKI et al., 2009).

**Figura 2:** Representação esquemática da complexação lectina-carboidrato. As linhas pontilhadas representam interações de hidrogênio entre o carboidrato (A) e os sítios de ligação das lectinas.



Fonte: KENNEDY et al. (1995)

#### 1.1.4. Propriedades biológicas e aplicações das lectinas

Devido à habilidade de ligar-se de maneira específica e reversível a carboidratos tem-se observado diversas aplicações para as lectinas. Tais aplicações podem ser utilizadas nos mais diversos campos da ciência, tais como nas áreas médica, biológica, bioquímica, farmacêutica e até mesmo na indústria de alimentos (RUDIGER; GABIUS, 2001; RAHAIE; KAZEMI, 2010). Tais moléculas desempenham variados efeitos sobre as células, tais como ação inseticida (COELHO et al., 2007), fungicida (SITOHY et al., 2007), bactericida (SANTI-GADELHA et al., 2006) e antitumoral (PETROSSIAN et al., 2007).

As lectinas, principalmente as que são específicas para manose ou N-acetilglicosamina, apresentam uma ação inibitória sobre a protease HIV (MOLCHANOVA et al., 2007; WANG; NG, 2006).

A ação dessas biomoléculas contra células bacterianas (TAKAHASHI et al., 2008; WELLMAN-LABADIE et al., 2008; SANTI-GADELHA et al., 2006;), protozoários

(MOURA et al., 2006) e fungos (SITOHY et al., 2007; FREIRE et al., 2002) têm sido avaliadas, indicando que estas proteínas podem ser viáveis na terapêutica clínica.

Lectinas apresentam atividade mitogênica sobre células mononucleares sanguíneas, e antiproliferativa sobre linhagens celulares de câncer humano (KAUR et al., 2006), como células de leucemia (L1210 e M1) e de hepatoma (Hep G2) (NGAI; NG, 2004). A atividade mitogênica é uma propriedade comum para muitas lectinas, especialmente àquelas de origem fúngica, atuando sobre esplenócitos (WANG; NG, 2006; NGAI; NG, 2004) e linfócitos T humanos (MACIEL et al., 2004), entre outros tipos celulares.

A ação antitumoral de lectinas tem sido observada sobre algumas linhagens de células tumorais humanas (LIU et al., 2006;). O efeito modulador da resposta imune é uma propriedade observada em algumas lectinas (GAVROVIC-JANKULOVIC et al., 2008).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão, e citoinvasão de drogas, essas moléculas tem sido exploradas quanto a sua utilização em sistemas de liberação de drogas, para serem utilizados em medicamentos de administração oral (RODRIGUES et al., 2003; GABOR et al., 2004).

A tecnologia de biorreconhecimento de lectinas por açúcares tem sido aplicada no diagnóstico clínico na remoção de vírus de sangue, na purificação de glicoproteínas do plasma, na identificação de grupos sanguíneos (ABO humano). Podem ainda ser aplicadas como marcadores celulares para diagnóstico de agentes infecciosos, serem utilizadas em suportes insolúveis para o isolamento de glicoconjugados por cromatografia de afinidade, na análise dos mecanismos envolvidos na glicosilação das proteínas, entre outros (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Na indústria de alimentos as lectinas podem ser utilizadas na produção de biossensores, verificando a existência de certos grupos de analitos e/ou microrganismos, assegurando a qualidade de matérias-primas e produtos industrializados (RAHAIE; KAZEMI, 2010).

### **1.1.5. Purificação de lectinas**

O passo inicial para a purificação de lectinas a partir de diferentes fontes envolve a preparação do extrato utilizando uma solução salina ou tampão (KAWAGISHI et al., 2001). Após a preparação do extrato, diversas técnicas comuns na purificação de proteínas podem ser empregadas para a purificação de lectinas, tais como cromatografia de afinidade (SUN et al., 2007), cromatografia de troca iônica (SANTI-GADELHA et al., 2006), cromatografia de filtração em gel (MOURA et al., 2006), precipitação com sulfato de amônio (COELHO; SILVA, 2000), entre outras.

Gilboa-Garber et al. (1985) trabalhando com lesmas-do-mar utilizaram precipitação com sulfato de amônia e filtração em gel para purificar lectinas das gônadas e ovos fertilizados. Ortega et al. (1990) utilizaram o princípio de interação com eritrócitos para purificar lectinas a partir de sementes de *Erythrina americana*. Jung et al. (2003) aplicaram técnicas de filtração em membrana, filtração em gel e cromatografia de afinidade para isolar lectinas de ovos de peixes da espécie *Katsuwonus pelamis*. Santi-Gadelha et al. (2006) utilizou a cromatografia de troca iônica para purificar lectinas a partir de sementes de *Araucaria augustifolia*.

Porém, devido à habilidade das lectinas em se ligar a carboidratos e outras glicoproteínas, a técnica mais utilizada na purificação deste grupo de proteínas é a cromatografia de afinidade, no qual tais biomoléculas ligam-se aos carboidratos imobilizados na matriz por meio de interações não covalentes (TYAGI et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2002; ROY et al., 2005). Tal princípio vem sendo amplamente explorado, sendo estudada a interação com goma guar (TYAGI et al., 1996), lactose (FUJII et al., 2011; KAWSAR et al., 2009), glicose (POHLEVEN et al., 2011), galactose (NAEEM et al., 2007; NAGATA, 2005), manose (ANDON et al., 2003; OOI et al., 2010), N-acetilgalactosamina (GERLACH et al., 2005; PERÇIN et al., 2009; QURESHI et al., 2006), N-acetilglicosamina (KAUR et al., 2005; KIM et al., 2006; MAHESWARI et al., 2002), entre outros.

## **1.2. Purificação de biomoléculas por técnicas cromatográficas**

Os procedimentos mais utilizados para a purificação de proteínas consistem na utilização de técnicas cromatográficas. Um dos objetivos das operações cromatográficas é o de isolar e purificar o metabólito de interesse em relação aos demais, levando à pureza adequada para o seu uso (KILIKIAN, 2005).

Um processo cromatográfico compreende duas fases: uma estacionária e uma móvel. O princípio de separação baseia-se na diferença de interação dos componentes da mistura (fase móvel) com a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos compostos (COOLINS et al., 1997).

Entre os vários processos cromatográficos existentes, a adsorção em leito fixo possui a maior eficiência, sendo uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos. Porém, a presença de grandes biomoléculas e materiais altamente concentrados desafiam sua capacidade e produtividade (STICKEL; FOTOPOULOS, 2001).

A adsorção em leito expandido permite o uso de uma solução de alimentação contendo material particulado, eliminando a necessidade de clarificação inicial do meio, reduzindo o número de etapas do processo e evitando a perda de atividade da biomolécula. No entanto,

esse método cromatográfico exige tipos especiais de colunas e acessórios que não podem ser instalados em sistemas tradicionais de cromatografia de leito fixo (FIDELIS, 2011).

Para contornar esses problemas, em especial os problemas de transferência de massa, vem crescendo o interesse dos pesquisadores pelo desenvolvimento de colunas monolíticas, que permitem que o processo ocorra a uma velocidade superficial comparável a cromatografia líquida de alta eficiência convencional e superior às utilizadas em leito expandido, utilizando baixas pressões (GUIOCHON, 2007).

### **1.3. Criogéis poliméricos monolíticos**

Os leitos fixos tradicionais apresentam uma alta capacidade de saturação devido à elevada área superficial das partículas adsorventes. Entretanto, soluções de alimentação altamente concentradas ou particuladas desafiam os limites dos leitos fixos convencionais em relação a sua capacidade e taxa de transferência. Estas limitações levaram ao desenvolvimento de monólitos supermacroporosos para propósitos de separação de biomoléculas (MACHADO et al., 2015; JUNGBAUER; HAHN et al., 2008).

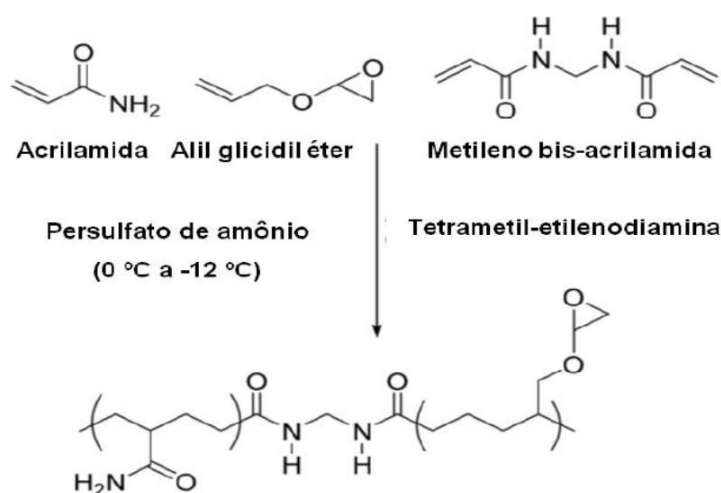
As colunas monolíticas poliméricas, também denominadas de materiais cromatográficos de quarta geração, estão entre os últimos avanços no setor de matrizes cromatográficas. Devido à estrutura de macroporos interconectados de grandes dimensões, o fluxo através dos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; YAVUZ; DENIZLI, 2015).

Os monólitos poliméricos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel, apresentando ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008). Entre os monólitos poliméricos utilizados como colunas cromatográficas, um que apresenta destaque é o criogel de poli(acrilamida), obtido da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento moderado (-10°C a -20°C), pela técnica conhecida como criogeleificação (PLIEVA et al., 2004). Os monólitos assim sintetizados são chamados de criogéis pAam e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores (DRAGAN et al., 2012; YAO et al., 2007; MACHADO et al., 2015; WANG et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; YUN et al., 2014; YAVUZ; DENIZLI, 2015).

A reação de copolimerização dos monômeros Aam, AGE e BAam é apresentada na Figura 3. Cada um dos componentes utilizados apresenta uma função específica na formação do criogel de poli(acrilamida). A Aam, principal monômero da estrutura, atua como o agente reticulante, sendo o responsável pela linearidade da cadeia. A BAam, um monômero com

duas moléculas de AAm acoplada nas extremidades com terminações não reativas, promoverá o enlace das cadeias de AAm, formando as ligações cruzadas necessárias para a formação do gel. O AGE é utilizado para aumentar a resistência estrutural e dispor grupos epóxi reativos na superfície. O persulfato de amônio (APS) e o N,N,N,N-tetrametiletenodiamino (TEMED) fornecem os radicais livres necessários para iniciar e acelerar a reação de polimerização, respectivamente (COOPER, 1977; ARVIDSSON et al., 2003).

**Figura 3:** Reação de copolimerização dos monômeros acrilamida, alil glicidil éter e N,N-metilenobisacrilamida.

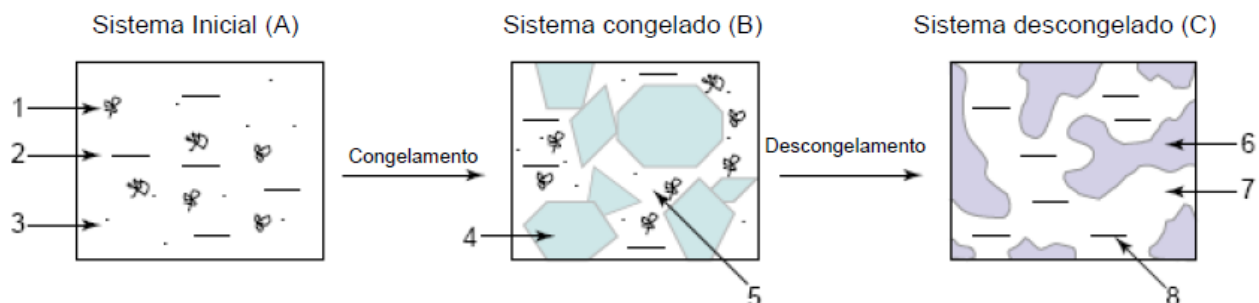


Fonte: Adaptado de MALLIK; HAGE (2006).

A criogeificação que ocorre para a formação dos criogéis é um processo de polimerização comum, porém em condições de congelamento. As diferenças de morfologia dos criogéis para os géis formados em temperatura ambiente são explicadas pelo fato de que, em condições moderadas de congelamento, parte do solvente permanece não congelado, na chamada microfase líquida. As substâncias dissolvidas nesses sistemas concentram-se nessa região, e como o volume dessa microfase é bem menor do que o volume da solução inicial, ocorrerá aumento da concentração dos materiais dissolvidos, denominada crioconcentração. Desse modo, a reação de polimerização ocorre nas regiões monoméricas concentradas não congeladas formando um gel resistente, enquanto os cristais de gelo formados atuam como agentes porogênicos (LOZINSKY et al., 2002; GUN'KO et al., 2013). A representação esquemática para a formação de criogéis poliméricos é mostrada na Figura 4.



**Figura 4:** Representação esquemática da produção de criogéis. Os componentes marcados nos sistemas são: (1) precursor de alta massa molecular, (2) solvente, (3) precursor de baixa massa molecular ou substâncias solúveis, (4) policristais do solvente congelado, (5) microfase líquida não congelada, (6) rede polimérica do criogel, (7) macroporos e (8) solvente descongelado.

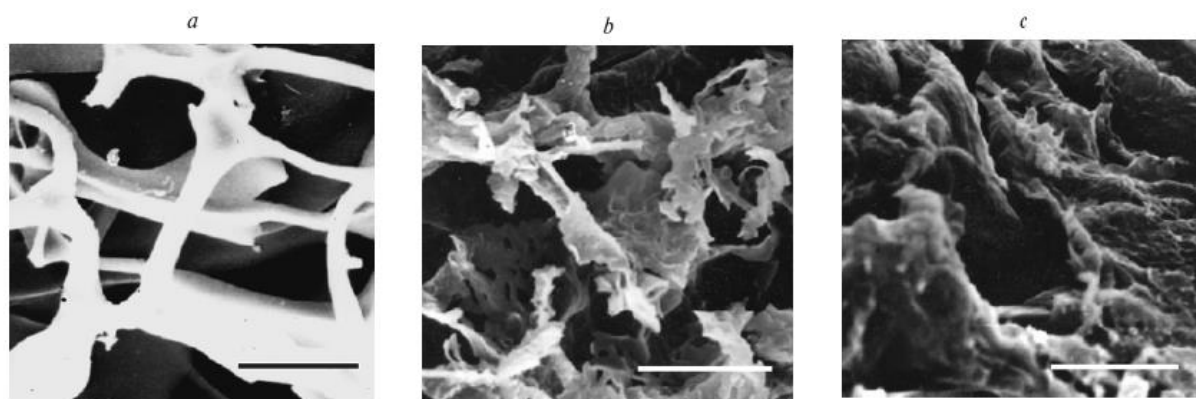


Fonte: Adaptado de LOZINSKY et al. (2003).

A cristalização do solvente é uma etapa crucial para a formação satisfatória de supermacroporos interconectados dentro do criogel, ou seja, os cristais de gelo em crescimento são os responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura macroporosa. A forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem durante a síntese do criogel (PLIEVA et al., 2008).

Lozinsky (2008) realizou a síntese de criogéis de poliacrilamida utilizando três temperaturas de congelamento ( $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$ ) e observou que poros maiores foram formados quando se utilizou temperatura mais elevada (Figura 5). Isto ocorre, pelo fato de, ao se utilizar maiores temperaturas, o congelamento ocorrer de maneira mais lenta, resultando no desenvolvimento de cristais de gelo maiores.

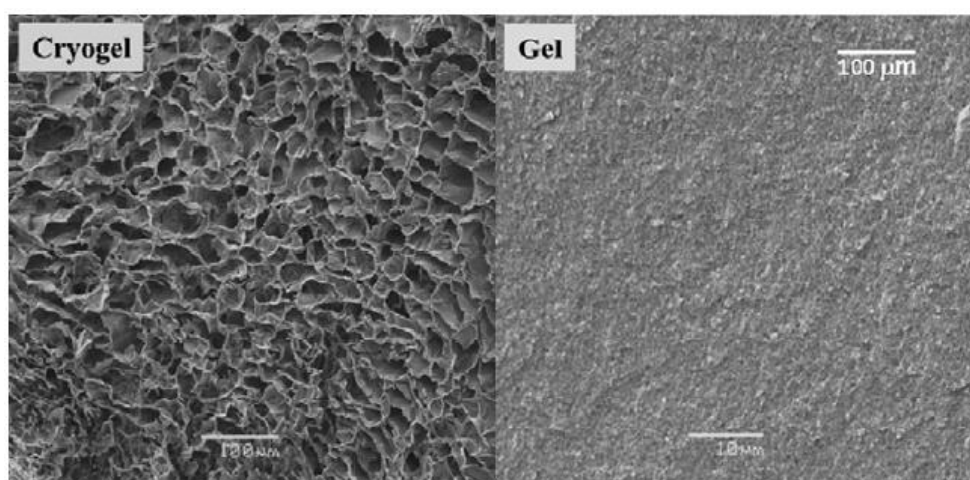
**Figura 5:** Imagens da microscopia eletrônica de criogéis de poliacrilamida. (a)  $-10^{\circ}\text{C}$ , (b)  $-20^{\circ}\text{C}$  e (c)  $-30^{\circ}\text{C}$ .



Fonte: LOZINSKY, 1986.

Na Figura 6 são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações, no entanto produzidas a diferentes temperaturas. Verifica-se que a estrutura do gel formado a 20°C (à direita) é compacta e possui poros de menor tamanho, enquanto o criogel formado a -20°C apresenta poros grandes e interconectados variando de 10 μm a 100 μm, o que reforça a importância da criogeificação na síntese desses compostos.

**Figura 6:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações. A imagem a esquerda representa a síntese do monólito produzido utilizando a temperatura de -20°C (criogel), enquanto a imagem a direita representa o gel produzido a 20°C



Fonte: PLIEVA et al. (2007)

Devido à estrutura contendo macroporos interconectados de grandes dimensões, a utilização de criogéis em processos cromatográficos permite o uso de soluções mais concentradas e particuladas, fornece menor resistência ao escoamento e promove uma difusão desobstruída dos solutos. Além disso, tais estruturas são versáteis, podendo ser produzidas na forma de colunas, discos ou membranas e apresentam baixo custo quando comparadas a matrizes tradicionais utilizadas em cromatografia (LOZINSKY et al., 2002; LOZINSKY et al. 2003).

No entanto, os grandes poros e a elevada porosidade apresentada pelos criogéis poliméricos fazem com que sua área superficial seja menor do que a das colunas cromatográficas tradicionais, o que acaba diminuindo a capacidade adsorptiva das colunas, reduzindo a eficiência do processo de purificação. Diante disso, surge a necessidade de estudos para modificação de sua estrutura, visando melhorar sua capacidade de ligação, aumentando assim a seletividade com os compostos de interesse e, conseqüentemente, elevando a eficiência de tal processo (KUMAR et al., 2006; YAO et al., 2007; WANG et al.,

2008; YUN et al., 2009). Uma alternativa viável para aumentar a eficiência dos criogéis é a imobilização de ligantes específicos para transformá-los em monólitos de afinidade.

#### **1.4. Cromatografia de afinidade**

A cromatografia de afinidade (CA) envolve um conjunto de técnicas de cromatografia líquida baseada em interações altamente específicas e reversíveis entre pares de materiais biológicos (enzima-substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo), garantindo maior seletividade, devido a características estereoquímicas e topológicas apresentadas pelas biomoléculas (HAGE, 2006). Tais características fazem da CA umas das técnicas de purificação mais eficientes, podendo ser utilizada até mesmo quando o composto de interesse está presente em baixa concentração em uma mistura complexa (CARLSSON et al., 1998).

A natureza específica das interações entre os pares de materiais biológicos é responsável pela alta seletividade desse tipo de cromatografia, tornando possível o isolamento seletivo de um analito ou grupo de analitos em amostras complexas (CARLSSON et al., 1998).

A aplicabilidade dessa técnica se deve ao fato de que toda biomolécula que se pretende purificar possui pelo menos um local de reconhecimento que pode ser utilizado para escolha do ligante de afinidade apropriado (MAGDELDIN e MOSER, 2012).

Existem três fatores principais que devem ser considerados para se assegurar a eficiência de processos de purificação envolvendo CA. O primeiro e principal fator é a escolha do ligante a ser imobilizado na fase estacionária. Se a força de associação entre o ligante e a molécula alvo for muito fraca não haverá adsorção, já se for muito forte será difícil realizar a eluição da proteína adsorvida. O suporte usado para a imobilização do ligante de afinidade deve ter uma ligação com fácil modificação em sua fixação, ter uma baixa ligação não específica para com os outros componentes do meio e ser estável sob as condições de operação a serem empregadas com a coluna (MALLIK; HAGE, 2006; MALLIK et al., 2004).

Existem diversos tipos de ligantes que podem ser imobilizados, podendo ser agrupados em duas categorias básicas: ligantes de alta especificidade e ligantes gerais. Os de alta especificidade associam-se a um grupo mais restrito de moléculas, como antígenos para anticorpos e substratos de enzimas. Esses tipos de ligantes são utilizados quando o objetivo é analisar ou purificar um soluto específico. Já os gerais interagem com uma família de solutos sem distinção entre compostos individuais, sendo utilizados quando se objetiva separar uma classe de compostos. Tais ligantes possuem ligações mais fracas com a molécula alvo que os de alta especificidade. É o caso de metais quelatos, corante triazina, proteínas A e G e lectinas (TURKOVÁ, 1999; HAGE, 2010).

Para a correta seleção do ligante a ser imobilizado na matriz, dois principais fatores devem ser considerados: deve apresentar ligação reversível e específica com a molécula alvo e possuir grupos que o permita ser imobilizado na matriz sem afetar a sua capacidade de ligação (KAMIMURA; MAUGERI FILHO, 2005). Alguns exemplos de ligantes e suas respectivas moléculas alvo são listados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Ligantes utilizados em cromatografia de afinidade.

<b>Ligante</b>	<b>Molécula alvo</b>
Anticorpo	Antígeno, vírus, célula.
Inibidor	Enzimas (ligantes são frequentemente substratos análogos ou cofatores análogos).
Lectina	Polissacarídeo, glicoproteína, receptor da superfície celular, proteína da membrana, célula.
Ácido nucléico	Enzima ou histona.
Hormônio	Receptor, proteína transportadora.
Carboidrato	Lectina, enzima.

Fonte: Adaptado de CARLSSON et al., 1998.

O segundo fator a ser considerado para garantir uma boa eficiência na CA é a escolha adequada da fase móvel para realizar a eluição. Nessa etapa, deve-se encontrar condições que promovam a completa dissociação do complexo adsorvente-adsorvato de modo a não destruir a molécula alvo (CARLSSON et al., 1998).

Os métodos de eluição utilizados podem ser seletivos ou não seletivos. Nos métodos seletivos aproveita-se as propriedades naturais das interações bioespecíficas das proteínas, utilizando-se soluções que contêm alta concentração de um composto ligante na forma livre (podendo inclusive ser o mesmo que foi imobilizado na superfície da matriz), ocorrendo assim, uma competição entre os ligantes solúveis e os imobilizados, onde o solúvel deve estar em excesso. Dessa maneira ocorrerá a dissociação e o adsorvato se deslocará para a fase solúvel (KAMIMURA; MAUGERI FILHO, 2005; HAGE, 2010). Nos métodos não seletivos, altera-se as propriedades físicas do adsorvente por meio da variação de pH, efeito da temperatura ou utilização de proteínas desnaturantes, reduzindo a intensidade da interação ligante-proteína, promovendo a dissociação do complexo (HAGE, 2010).

O terceiro fator responsável para a obtenção de bons resultados em processos de purificação utilizando-se a CA é a escolha do suporte a ser utilizado como fase estacionária. Tal suporte deve possuir uma baixa ligação não específica para não ligar-se espontaneamente com os componentes não desejáveis da amostra, ser estável a altas vazões de trabalho e

resistir quimicamente aos diferentes solventes utilizados durante o processo (GUSTAVSSON; LASON, 2006).

### **1.5. Métodos de imobilização para produção de monólitos de afinidade**

Mesmo com a ampla variedade de suportes disponíveis, não há um que represente uma solução universal, visto que cada tipo de biomolécula e cada sistema apresentam suas peculiaridades. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, diversas abordagens para a imobilização de ligantes de afinidade têm sido reportadas. Exemplos incluem vários métodos de imobilização via interação covalente (como os métodos do epóxi, da Base de Schiff, do glutaraldeído e do brometo de cianogênio, entre outros), bem como adsorção bioespecífica e confinamento (MALLIK; HAGE, 2006).

A imobilização de ligantes via interação covalente é a abordagem mais comumente utilizada em suportes cromatográficos empacotados. Muitas das técnicas de imobilização utilizadas em leitos empacotados podem ser empregadas nos monólitos. Nos leitos monolíticos tal imobilização é realizada por meio da circulação de uma solução contendo os grupos ligantes através da sua estrutura, ou por imersão da matriz em uma solução contendo o ligante (MALLIK; HAGE, 2006). Os suportes contendo radicais epóxi disponíveis na superfície estão entre os mais utilizados para a imobilização de biomoléculas. Isso ocorre em razão de tais grupos poderem reagir facilmente com grupamentos amina, tiol ou hidroxila das moléculas, formando uma ligação covalente estável (MATEO et al., 2000; MATEO et al., 2003).

Os radicais epóxi utilizados para reações de imobilização de ligantes via ligação covalente geralmente são advindos da inserção de monômeros específicos no processo de síntese dos monólitos. A utilização dos monômeros glicidil metacrilato (GMA) e alil-glicidil éter (AGE) são exemplos de monômeros comumente utilizados na reação de polimerização, responsáveis pelo fornecimento desses radicais (UYGUN et al., 2015; MEMMEDOVA et al., 2015; PERÇIN et al., 2015; KIMMINS et al., 2014; TÜZMEN et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; ARVIDSSON et al., 2003). Além disso, pode ser realizada uma posterior enxertia com epícloridrina na superfície monolítica para a obtenção de tal radical (MIHAILOVIC et al., 2014; HAJIZADEH et al., 2012).

Na Figura 7 são apresentados três métodos de imobilização via ligação covalente frequentemente utilizados. O primeiro método, Figura 7 (a), é o método do epóxi, que envolve o ataque nucleofílico ao radical epóxi presente no monólito por radicais amina do ligante, levando à interação com a formação de uma amina secundária estável. Os radicais epóxi

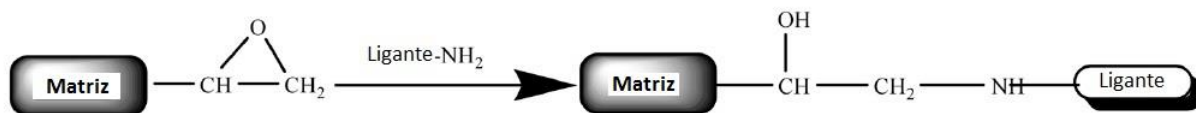
remanescentes são então bloqueados por meio de algum composto contendo o grupamento amina (ex: etanolamina), para evitar ligações indesejáveis. Tal método pode ser realizado em uma única etapa, mas possui velocidade de reação menor que a de outros métodos disponíveis. Isso pode resultar em uma baixa quantidade de ligantes imobilizados ou em maiores tempos de imobilização (JIANG; MALLIK; HAGE, 2005; MALLIK; JIANG; HAGE, 2004). Dependendo das condições de reação, tal técnica pode ser utilizada para a imobilização de ligantes que contém radicais amina, sulfidril ou hidroxil (KIM; HAGE, 2005).

A segunda técnica que tem sido utilizada para a imobilização de ligantes via interação covalente é o método da Base de Schiff (MALLIK; JIANG; HAGE, 2004; MALLIK; HAGE, 2006). Como pode ser observada na Figura 7 (b), este é um método de ligação baseado no radical amina das moléculas. Inicialmente, os radicais epóxi dos monólitos são convertidos em dióis. Os grupos dióis formados são então oxidados com ácido periódico dando origem a grupos aldeídos, que podem reagir com os radicais amina dos ligantes, formando uma base de Schiff. Uma vez que essa é uma reação reversível, as Bases de Schiff formadas são reduzidas com cianoborohidreto de sódio, dando origem a uma ligação amina secundária estável. Os grupos aldeídos remanescentes são eliminados utilizando algum ligante contendo grupamentos amina menores ou reduzidos a álcoois pela adição de borohidreto de sódio (KIM; HAGE, 2005; MALLIK; HAGE, 2006). Este método possui uma maior velocidade de reação quando comparado ao método do epóxi (JIANG; MALLIK; HAGE, 2005). A principal desvantagem dessa técnica é a utilização de agentes redutores, tal como o borohidreto de sódio, que podem afetar o ligante imobilizado (MALLIK; HAGE, 2006).

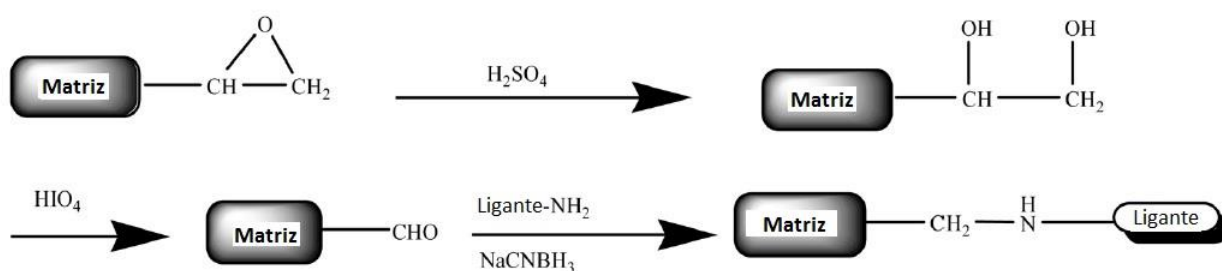
A terceira técnica, Figura 7 (c), é o método do glutaraldeído (MALLIK; HAGE, 2006). Nesse método, um monólito contendo grupamentos epóxi reativos (monólito epóxi-ativado) é inicialmente convertido para a forma amina (monólito amina-ativado) por meio da reação dos grupos epóxi com reagentes contendo grupamento amina, tais como etilenodiamina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996) ou hexanodiamina (LUO et al., 2002). O monólito amina-ativado reage então com glutaraldeído, formando um monólito aldeído-ativado capaz de reagir com grupamento amina das moléculas. Esse suporte é utilizado da mesma maneira que o produzido utilizando o método da Base de Schiff (MALLIK; HAGE, 2006). A principal vantagem em relação ao método da Base de Schiff é a formação de um longo braço espaçador entre o monólito e o ligante, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996; LUO et al., 2002), o que pode acarretar em uma maior capacidade de imobilização do ligante e de purificação da molécula alvo.

**Figura 8:** Métodos de imobilização de ligantes via ligação covalente para produção de monólitos de afinidade.

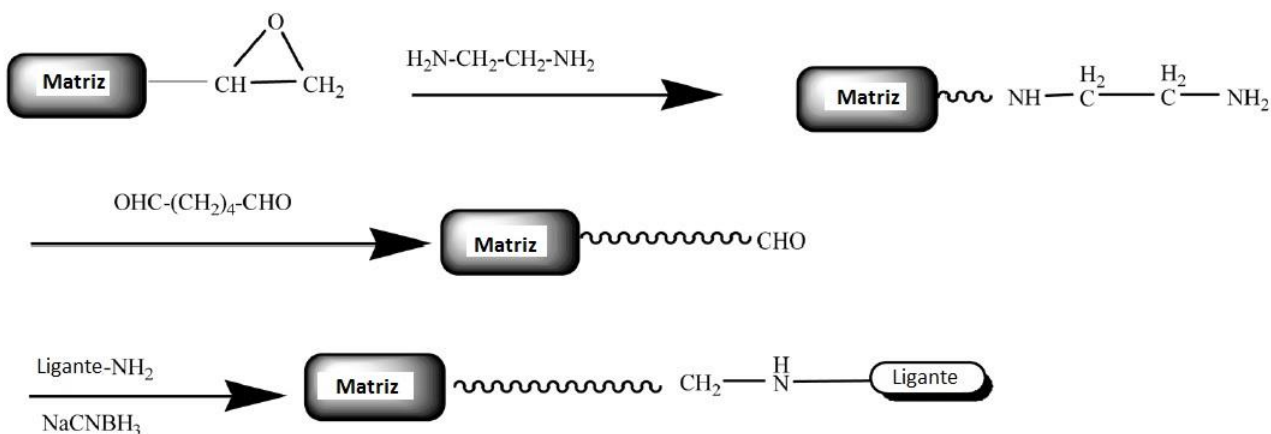
**(a) Método do Epóxi**



**(b) Método da Base de Schiff**



**(c) Método do Glutaraldeído**



Fonte: Adaptado de MALLIK; HAGE, 2006.

Os três métodos apresentados baseiam-se na interação entre os grupamentos amina das moléculas ligantes com grupos específicos presentes na matriz. Porém, metodologias baseadas em ligações que envolvem outros grupamentos presentes na molécula ligante (ao invés da amina) podem ser exploradas, como é o caso do método da hidrazida, que utiliza os

grupamentos aldeídos presente nas moléculas para formar uma interação covalente estável (RUHN; GARVER; HAGE, 1994).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O principal objetivo no trabalho proposto é desenvolver adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos voltados para o processo de purificação de lectinas pela técnica de cromatografia de afinidade com carboidratos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Desenvolver adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos utilizando o processo de criogeleificação e modificá-los quimicamente para serem utilizados em processos de cromatografia de afinidade utilizando diferentes carboidratos como ligantes;
- Avaliar o efeito de diferentes métodos de imobilização na capacidade de ligação do carboidrato modificado N-acetil-D-glicosamina na superfície dos criogéis;
- Avaliar o efeito de diferentes carboidratos modificados (N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-manosamina) no melhor método de imobilização obtido;
- Caracterizar os adsorventes produzidos com relação aos aspectos físicos, químicos e operacionais;
- Avaliar a capacidade de ligação de lectinas e a resistência aos ciclos de reutilização das colunas produzidas.

### 3. REFERÊNCIAS

ANDON, N. L.; ECKERT, D.; YATES, J. R.; HAYNES, P. A. High-throughput functional affinity purification of mannose binding proteins from *Oryza sativa*. **PROTEOMICS**, v. 3, n. 7, p. 1270-1278, 2003.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized et al affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.

CARLSSON, J.; JANSON, J. C.; SPARRMAN, M. **Affinity Chromatography**. In: JAN-CHRISTER JANSON; RYDÉN., L. (Ed.). Protein Purification - Principles, High-Resolution Methods, and Applications. New York, 1998.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporouscolumn of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 406-414, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. B.; **Introdução a métodos cromatográficos**, 7º Edição, Campinas: Ed. da Unicamp, 1997.

COOPER, T. G. The Tools of Biochemistry, Wiley (New York) 423p, 1977.

DIMITRIJEVIC, R.; STOJANOVIC, M.; MICIC, M.; DIMITRIJEVIC, L.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. **Journal of Functional Foods**, v.4, n.3, p.636-641, 2012.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v.204-206, n.15, p.198-209, 2012.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, BO. Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of**

**Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2014.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L.; VEGA, N.; FILGUEIRA, J. J. et al. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 617-633, 2003.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2011.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E. et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1 p. 61-68, 2002.

FUJII, Y.; KAWSAR, S. M. A.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; ISHIZAKI, N.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; TAEI, M.; OZEKI, Y. A D-galactose binding lectin purified from coronate moon turban, Turbo (Lunella) corensis, with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 158, n. 1, p. 30-37, 2011.

GABOR, F.; BOGNER, E.; WEISSENBOECK, A.; WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 459-480, 2004.

GAVROVIC-JANKULOVIC, M.; POULSEN, K.; BRCKALO, T. et al. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 5, p. 929-941, 2008.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K.-H. *N*-acetyl-D-galactosamine/*N*-acetyl-D-glucosamine-recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 223-232, 2005.

GILBOA-GARBER, N.; SUSSWEIN, A. J.; MIZRAHI, L.; AVICHEZER, D. Purification and characterization of the gonad lectin of *Aplysia depilans*. **FEBS Letters**, v.181, n.2, p.267-270, 1985.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal**

of **Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.

GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. 187-188, p. 1-46, 2013.

HAGE, D. S.; RUHN, P. F. An introduction to affinity chromatography. In: **Handbook of Affinity Chromatography**, 2nd Ed.; Hage,D.S., Ed.; Taylor & Francis: New York, Chapter 1. 2006.

HAGE, D.S., Affinity chromatography in: Cazes, J. (ed.), **enciclopeya da chromatography**, third edition. Taylor & Francis Group, p. 2518, 2010.

HAJIZADEH, S.; KIRSEBOM, H.; LEISTNER, A.; MATTIASSON, B. Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 21, p. 2978-2985, 2012.

IMBERT, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.

INA, C.; SANO, K.; YAMAMOTO-TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA-OIKAWA, H. et al. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 21-27, 2005.

JIANG, T.; MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2362-2372, 2005.

JUNG, W. K.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.35, n.2, p.255-265, 2003.

JUNGBAUER, A.; HAHNA, R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies, **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 62-79, 2008.

KAMIMURA e MAUGERI FILHO. Cromatografia de afinidade. Pessoa Jr. A. Kilikian, B. V. (Ed.) **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an *N*-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1933-1940, 2005.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 1, p. 156-65, 2006.

KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GOKSEL, S. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 241-245, 2003.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 2001.

KAWSAR, S. M. A.; MATSUMOTO, R.; FUJII, Y.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; KOJIMA, N.; OZEKI, Y. Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 7, p. 709-716, 2009.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. S. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, n.3, p.219-230, 1995.

KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Ed. Manole – Barueri, SP. 2005.

KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; YOON, K.-S.; SONG, Y.-S.; LEE, K. P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 86-95, 2006.

KIM, H. S.; HAGE, D. S. **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

KIMMINS, S. D.; WYMAN, P.; CAMERON, N. R. Amine-functionalization of glycidyl methacrylate-containing emulsion-templated porous polymers and immobilization of proteinase K for biocatalysis. **Polymer**, v. 55, n. 1, p. 416-425, 2014.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LIU, Q.; WANG, H.; NG, T. First report of a xylose-specific lectin with potente hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 12, p. 1914-1919, 2006.

LOZINSKY V. I., VAINERMAN E. S., IVANOVA, S. A., TITOVA E. F. et al. Study of cryostructurization of polymer systems. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. **Acta Polymerica**, v. 37, n. 3 , p. 142–146, 1986.

LOZINSKY, V. I. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. **Russian Chemical Bulletin**, v.57, n.5, p.1015-1032, 2008.

LOZINSKY, V. I., GALAEV, I. Y, PLIEVA, F. M, SAVINA, I.N., JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n.10, p. 445-451, 2003.

LOZINSKY, V.I, PLIEVA, F.M, GALAEV, I.Y AND MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4-5, p. 163–188, 2002.

LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. 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. F.; MINIM, L. A.; FONTAN; R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.

- MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.
- MAGDELDIN, S.; MOSER, A. **Affinity Chromatography: Principles and Applications**. In: MAGDELDIN, S. (Ed.). *Affinity Chromatography*, p. 3-28. 2012.
- MAHESWARI, R.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of an acetyl group-recognizing agglutinin from the serum of the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, n. 1, p. 65-76, 2002.
- MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.
- MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000.
- MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C. et al. Epoxy Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003.
- MEMMEDOVA, T.; ARMUTCU, C.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Polyglycidyl methacrylate based immunoaffinity cryogels for insulin adsorption. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 178-185, 2015.
- MIHAILOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; CAREVIĆ, M.; PRLAINOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; BEZBRADICA, D. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 637-646, 2014.
- MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O. et al. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-93, 2007.

- MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.
- MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.
- NAEEM, A.; HAQUE, S.; KHAN, R. H. Purification and Characterization of a Novel  $\beta$ -D-Galactosides-Specific Lectin from *Clitoria ternatea*. **The Protein Journal**, v. 26, n. 6, p. 403-413, 2007.
- NAGATA, S. Isolation, characterization, and extra-embryonic secretion of the *Xenopus laevis* embryonic epidermal lectin, XEEL. **Glycobiology**, v. 15, n. 3, p. 281-290, 2005.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 4, p. 988-993, 2004.
- NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, n. 1-3, p. 205-223, 1996.
- OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M. et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 3, p. 301-310, 2002.
- OOI, L. S. M.; HO, W.-S.; NGAI, K. L. K.; TIAN, L.; CHAN, P. K. S.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C. *Narcissus tazetta* lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. **Journal of biosciences**, v. 35, n. 1, p. 95-103, 2010.
- ORTEGA, M.; SANCHEZ, C.; CHACON, E.; RENDON, J. L.; ESTRADA, R. et al. Purification and characterization of a lectin from *Erythrina americana* by affinity chromatography. **Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 133-140, 1990.
- PANDEY, G., FATMA, T., COWSIK, S.M.; KOMATH, S.S. Specific interaction of jacalin with phycocyanin, a fluorescent phycobiliprotein. **Journal of Photochemistry and**



**Photobiology**, v. 97, n. 2, p. 87-93, 2009.

PERÇİN, I.; KHALAF, R.; BRAND, B.; MORBIDELLI, M.; GEZICI, O. Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic. **Journal of Chromatography A**, v. 1386, p. 13–21, 2015.

PERÇİN, I.; YAVUZ, H.; AKSÖZ, E.; DENIZLI, A. *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin isolation from soyflour with poly (HPMA-GMA) beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 1, p. 148-154, 2009.

PETRO, M.; SVEC, F.; RÉCHET, 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.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, n. 6, p. 491-500, 2007.

PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 3, p. 717-724, 2003.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v.16, n. 11, p. 543-551, 2008.

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004.

POHLEVEN, J.; BRZIN, J.; VRABEC, L.; LEONARDI, A.; ČOKL, A.; ŠTRUKELJ, B.; KOS, J.; SABOTIČ, J. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1141-1148, 2011.

PORRAS, F.; URREA, F.; ORTIZ, B. Isolation of the receptor for the Amaranthus

leucocarpus lectin from human T lymphocytes. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 155-162, 2005.

QURESHI, I. A.; DASH, P.; SRIVASTAVA, P. S.; KOUNDAL, K. R. Purification and characterization of an *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 5, p. 350-356, 2006.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based biosensor: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 428-443, 2010.

RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B. et al. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surfacemodification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 1-2, p. 103-112, 2003.

ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M. N. Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 193-198, 2005.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.

RUHN, P. F.; GARVER, S.; HAGE, D. S. Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 669, n. 1-2, p. 9-19, 1994.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.350, n.4, p.1050-1055, 2006.

SILVA, H. C.; NAGANO, C. S.; SOUZA, L. A. G.; NASCIMENTO, K. S. et al. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, v.47, n.12, p.2347-2355, 2012a.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; MENTELE, R.; FERREIRA, R. S. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012b.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Psidium sativum* seed. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-

979, 2007.

STICKEL, J. J.; FOTOPOULOS, A. Pressure-Flow Relationships for Packed Beds of Compressible Chromatography Media at Laboratory and Production Scale. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 4, p. 744-751, 2001.

SUN, J; WANG, L; WANG, B; GUO, Z; LIU, M; JIANG, K; LUO, Z. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 292-299, 2007.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, n. 2, p. 241-247, 2002.

TAKAHASHI, K.; KURODA, T.; MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 45-52, 2008.

TURKOVÁ, J. Bioaffinity chromatography. In: Aboul-Enein, H. I. (Ed.) **Analytical and preparative separation methods of biomacromolecules** (p. 99-165). New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 1999.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 26-33, 2012.

TYAGI, R.; AGARWAL, R.; GUPTA, M. N. Purification of peanut lectin using guar gum as an affinity ligand. *Journal of Biotechnology*, v. 46, n. 2, p. 79-83, 1996.

UYGUN, D. A.; UYGUN, M.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 50, p. 379–385, 2015.

VAN DAMME, E. J.M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. (Eds.). **Essentials of glycobiology**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 978-087-969-770-9, New York, 2009.

WANG, C.; BAI, S.; TAO, S-P.; SUN, Y. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1333, p. 54–59, 2014.

WANG, H.; NG, T. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 181-185, 2006.

WANG, L.; SHEN, S.; HE, X.; YUN, J.; YAO, K.; YAO, S.-J. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 237-242, 2008.

WANG, L.; WANG, L.; ZHANG, D.; LI, F.; WANG, M. et al. A novel C-type lectin from crab *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing cellular encapsulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v.34, n.3, p.832-842, 2013.

WELLMAN-LABADIE, O; LAKSHMINARAYANAN, R; HINCKE, M. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. **FEBS Letters**, v. 582, n. 5, p. 699-704, 2008.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v.1157, n.1-2, p.246-251, 2007.

YAVUZ, H.; DENIZLI, A. A New Affinity Separation Medium: Supermacroporous Cryogels. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2015.

YUN, J.; CHENG, X.; YE, J.; SHEN, S.; YANG, G.; YAO, K.; KIRSEBOM, H.; LIN, Q.; GUAN, X.; YAO, J. Chromatographic Adsorption of Serum Albumin and Antibody Proteins in Cryogels with Benzyl-Quaternary Amine Ligands, **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 173-183, 2015.

YUN, J.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Modeling of protein breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 15-16, p. 2601-2607, 2009.

ZENTENO, E.; VÁZQUES, L.; CHÁVEZ, R. et al. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, n. 5, p. 699–706, 1995.

**ARTIGO**

**Avaliação de diferentes métodos de imobilização na produção de criogéis poliméricos supermacroporosos voltados para a purificação de lectinas.**

---

## RESUMO

As lectinas são proteínas que se ligam de maneira reversível e específica a carboidratos ou moléculas que contenham açúcar. Diante dessa habilidade, a técnica mais utilizada para purificação dessas biomoléculas é a cromatografia de afinidade. Um possível adsorvente a ser utilizado para purificação dessas biomoléculas são os criogéis poliméricos. Tal monólito apresenta uma estrutura macroporosa, fornecendo uma baixa resistência ao escoamento, além de possuir diversas possibilidades de funcionalização. Diante disso, objetivou-se nesse trabalho avaliar diferentes métodos de imobilização na produção de criogéis poliméricos supermacroporosos voltados para a purificação de lectinas. Para isso, foram avaliados quatro diferentes métodos de imobilização baseados em ligações covalentes (epóxi, base de Schiff, glutaraldeído e etilenodiamina) para a imobilização do carboidrato modificado N-acetil-D-glicosamina na superfície dos criogéis. A quantidade imobilizada foi quantificada por diferença, utilizando-se o método do ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS). Verificou-se que o método do glutaraldeído foi o que apresentou a maior capacidade de imobilização do N-acetil-D-glicosamina (147,77 mg de carboidrato / g de criogel seco). A análise do espectro FTIR confirmou a presença do carboidrato imobilizado. O método da etilenodiamina apresentou a menor capacidade de imobilização, 32,47 mg de carboidrato / g de criogel seco. Os criogéis contendo o carboidrato imobilizado foram caracterizados em relação à capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e demais frações constituintes e os resultados encontrados demonstraram que os métodos de ativação não afetaram a estrutura macroporosa desses monólitos. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada e as imagens obtidas comprovaram a presença de macroporos interconectados na estrutura dos criogéis produzidos. A determinação da permeabilidade ao escoamento das colunas produzidas demonstrou a baixa resistência ao escoamento oferecida pelos criogéis. Por fim, o criogel ativado com o método do glutaraldeído foi utilizado no processo de adsorção da lectina Concanavalina A, apresentando uma capacidade de ligação de 44,49 mg de concanavalina / g de criogel seco, além de apresentar estabilidade ao longo do tempo de uso, indicando que tais matrizes são promissoras para serem utilizadas em processos de purificação de lectinas.

**PALAVRAS CHAVES:** criogéis, funcionalização, caracterização, afinidade.

## 1. INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas estruturalmente heterogêneas de origem não imunológica que se ligam de maneira específica a carboidratos sem afetar a estrutura do seu ligante (RÜDIGER; GABIUS, 2001; PANDEY et al., 2009). Devido a tal habilidade essas biomoléculas apresentam diversas atividades biológicas, como atividade mitogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, entre outras (VASCONCELOS et al., 2015). Diante das propriedades apresentadas pelas lectinas, verifica-se o crescente interesse na purificação e utilização das mesmas.

Um possível grupo de adsorventes a ser utilizado na purificação das lectinas é o dos monólitos poliméricos macroporosos. Estes monólitos têm atraído o interesse dos pesquisadores para serem utilizados em processos de biosseparação por possibilitar o isolamento seletivo de biomoléculas com elevado rendimento e grau de pureza (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014).

Uma classe de monólitos que apresenta potencial para ser aplicado na purificação de biomoléculas é a dos criogéis poliméricos, que são sintetizados a partir de monômeros ou precursores de polímeros apropriados, em meio líquido semi-congelado no qual os cristais de gelo formados são os responsáveis pela forma e tamanho dos poros. Os criogéis são bastante versáteis no seu uso, podendo ser produzidos com grupos reativos de interesse utilizando os reagentes apropriados no processo de síntese ou ter a superfície modificada quimicamente por meio da imobilização de diferentes ligantes (LOZINSKY et al., 2002; GUN'KO et al., 2013).

Entre os possíveis polímeros empregados na síntese dos criogéis, destacam-se os monólitos macroporosos de poliacrilamida, obtidos da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAam) adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento moderado, pela técnica conhecida como criogeleificação (PLIEVA et al., 2004a). Os monólitos assim sintetizados são chamados de criogéis de poliacrilamida e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores (DRAGAN et al., 2012; PLIEVA et al., 2004b; YAO et al., 2007; MACHADO et al., 2015; WANG et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

Os criogéis poliméricos apresentam elevada porosidade, o que permite a utilização de soluções mais concentradas ou contendo partículas. Além disso, a alta resistência química e mecânica e a baixa resistência ao escoamento, fazem dos criogéis monólitos com características únicas para serem utilizados na biosseparação. Como consequência da sua estrutura, a presença de grandes poros e a elevada porosidade resulta em um monólito com menor capacidade adsortiva quando comparado com colunas cromatográficas convencionais



(ERTÜRK; MATTIASSON, 2014).

Diante disso, surge a necessidade de modificação da estrutura dos criogéis visando aumentar a sua capacidade de adsorção. Para a purificação de lectinas, uma alternativa viável é transformar os criogéis em monólitos de afinidade por meio da imobilização de carboidratos modificados (contendo grupamento amina) na superfície do mesmo. Diversos métodos de ativação da superfície dos criogéis seguido da imobilização de biomoléculas têm sido relatados. A maioria dos métodos utilizados baseia-se na imobilização de ligantes via ligação covalente. Tais métodos utilizam o radical epóxi presente na superfície dos monólitos para reagir com grupamentos específicos (MALLIK; HAGE, 2006; UYGUN et al., 2012). Em virtude disso, o monômero AGE tem sido utilizado no processo de síntese dos criogéis de poliacrilamida, pois fornece grupos epóxi reativos na superfície dos mesmos (ARVIDSSON et al., 2003).

Entre os métodos de imobilização de ligantes via ligação covalente existentes, três que apresentam destaque são os métodos do Epóxi, da Base de Schiff e do Glutaraldeído. O método do Epóxi envolve o ataque nucleofílico dos grupamentos amina das moléculas sobre os grupos epóxi do monólito, levando a formação de uma ligação amina secundária estável (MALLIK et al., 2004). A desvantagem desse método é que nenhum braço espaçador é inserido entre o suporte e a molécula ligante, o que pode acarretar em uma menor capacidade de imobilização da mesma.

O método da Base de Schiff envolve a conversão dos grupos epóxi em grupos dióis seguida da oxidação desses grupos com ácido periódico, formando grupos aldeídos que podem reagir com aminas primárias das enzimas, formando uma Base de Schiff. Esse método possui uma taxa de imobilização mais rápida que o método do Epóxi, mas apresenta como desvantagem o fato de se utilizar agentes redutores para estabilizar as bases de Schiff formadas, podendo afetar a capacidade do ligante imobilizado (MALLIK et al., 2004; KIM; HAGE, 2005).

No método do glutaraldeído um monólito contendo grupamentos epóxi reativos (monólito epóxi-ativado) é inicialmente convertido para a forma amina (monólito amina-ativado) por meio da reação dos grupos epóxi com reagentes contendo grupamento amina, tais como etilenodiamina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996) ou hexanodiamina (LUO et al., 2002). O monólito amina-ativado reage então com glutaraldeído, formando um monólito aldeído-ativado capaz de reagir com grupamento amina das moléculas. Esse suporte é utilizado da mesma maneira que o produzido utilizando o método da Base de Schiff (MALLIK; HAGE, 2006). A principal vantagem em relação ao método da Base de Schiff é a formação de um longo braço espaçador entre o monólito e o ligante, evitando possíveis efeitos

de impedimento estérico (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996; LUO et al., 2002), o que pode acarretar em uma maior capacidade de imobilização do ligante e de purificação da molécula alvo.

Baseando-se nesses tipos de interações e na formação de Bases de Schiff, uma abordagem de imobilização para moléculas que apresentam grupos aldeído na estrutura seria por meio da produção de um monólito amina-ativado capaz de interagir com os radicais aldeído presentes nas moléculas ligante, como acontece, por exemplo, na ativação utilizando-se o método da hidrazida (MALLIK; HAGE, 2006). Outra alternativa ainda pouco explorada é a produção do monólito amina-ativado com etilenodiamina para a imobilização de ligantes que contenham grupamentos aldeído.

Diante do exposto, objetivou-se nesse trabalho avaliar diferentes métodos de imobilização na produção de criogéis poliméricos supermacroporosos voltados para a purificação de lectinas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes**

Foram utilizados acrilamida (AAm), bis-acrilamida (BAAm) e alil-glicidil-éter (AGE) para a produção dos criogéis. O carboidrato utilizado para os ensaios foi o N-acetil-D-glicosamina (D-GlcNAc), todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os demais reagentes utilizados no experimento estão descritos ao longo da metodologia. Todos os reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS.

### **2.2. Síntese dos criogéis monolíticos**

Para síntese dos criogéis foram adaptadas metodologias propostas por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Resumidamente, 4 g de AAm, 1,2 g de BAAm e 0,8 g de AGE foram dissolvidas em 100 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados então 1% m/m de persulfato de amônio (APS) e 1% m/m de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED) em relação a massa total de monômeros. Após homogeneização da solução a mesma foi imediatamente vertida em seringas plásticas de 5mL, e as seringas foram fechadas e mergulhadas em banho termostático à temperatura de -20,0 °C por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram deixadas à temperatura de 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Posteriormente, as seringas contendo os criogéis foram colocadas em estufa a 60°C até os criogéis serem completamente secos. Em seguida, os criogéis tiveram as extremidades cortadas para retirar partes defeituosas e suas massas foram medidas em balança analítica (precisão de 0,0001 g, Modelo M254A, BEL ENGINEERING). Os criogéis foram

então lavados com 150 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de  $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e foram novamente secos em estufa e as massas foram novamente medidas em balança analítica, para verificar, por diferença, a quantidade de monômeros que não se polimerizou. Em seguida, os criogéis estavam prontos para serem submetidos aos diferentes métodos de imobilização do carboidrato.

### **2.3. Imobilização do carboidrato**

Neste trabalho foi utilizado o carboidrato modificado N-acetil-D-glicosamina para avaliar os diferentes métodos de imobilização testados. Tal molécula possui em sua estrutura um radical carbonila e um radical amina, que podem reagir com os criogéis amina-ativados e aldeído ativados, respectivamente. Além disso, lectinas de diversas fontes apresentam seletividade por essa molécula, sendo adequada para o uso na cromatografia de afinidade (KAUR et al., 2005; KIM et al., 2006; MAHESWARI et al., 2002).

Para a imobilização do carboidrato modificado N-acetil-D-glicosamina foram utilizados 4 diferentes métodos com o objetivo de verificar qual apresenta maior capacidade de imobilização. A quantidade imobilizada em cada método foi quantificada por diferença nas soluções do carboidrato N-acetil-D-glicosamina antes e após a recirculação, utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Todas as soluções foram recirculadas através das seringas contendo os criogéis, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de  $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Em cada método de imobilização avaliada foram utilizados 8 criogéis-base escolhidos de maneira aleatória entre os produzidos.

As diferentes metodologias utilizadas para imobilização do carboidrato estão descritas em detalhes nas seções 2.3.1 a 2.3.4.

#### **2.3.1. Método do epóxi**

Para a imobilização do carboidrato modificado utilizando o método do epóxi foi utilizada uma metodologia adaptada das utilizadas por Babac et al. (2006) e Mallik, Jiang e Hage (2004). Primeiramente, os criogéis nas seringas foram lavados com 30 mL de etanol absoluto, seguido de 30 mL de etanol + água destilada (1:1) e, por fim, 30 mL de água destilada. Nestas lavagens foram passados inicialmente 15 mL de solução, seguido de um repouso por 10 min e completando-se a lavagem com os outros 15 mL. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 40 mL de tampão carbonato de sódio em pH 9,5, na concentração de 50 mM. Em seguida foi preparada uma solução de  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de N-acetil-D-glicosamina no tampão carbonato de sódio e 25 mL dessa solução foi recirculada pelos criogéis à temperatura ambiente por 16 h. Após esse período, os criogéis foram lavadas com 30 mL do

tampão carbonato, e em seguida com 40 mL de uma solução 0,1 M de etanolamina preparada no próprio tampão. Novamente as colunas foram lavadas com 30 mL do tampão carbonato, seguida de 40 mL de água destilada e finalmente foram lavadas com 40 mL do tampão fosfato em pH 7,2 na concentração de 20 mM. As seringas contendo os criogéis preenchidos com o tampão fosfato foram fechadas e armazenadas a 4°C

### **2.3.2. Imobilização com o método da Base de Schiff**

Para a imobilização com o método da Base de Schiff foi utilizada uma metodologia adaptadas de Luo et al. (2002) e Mallik, Jiang e Hage (2004). Primeiramente, os criogéis foram lavados com 30 mL de HCl 0,1 M. Em seguida, as seringas contendo os criogéis foram fechadas preenchidas com HCl e colocadas em estufa BOD a 50°C por 12 h. Decorrido esse tempo, os criogéis foram novamente lavados com 30 mL de água destilada. Em seguida, 40 mL de ácido periódico 0,1 M foi recirculado por 1 h pelos criogéis. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 30 mL de água destilada e em seguida, com 30 mL de tampão citrato de sódio em pH 6,4 na concentração de 0,1 M. Uma solução de N-acetil-D-glicosamina na concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> foi preparada no tampão citrato de sódio em pH 6,4 na concentração de 0,1 M contendo 50 mM de cianoborohidreto de sódio, e recirculou-se 25 mL dessa solução nos criogéis por 16 h. Os criogéis foram então lavados com 40 mL do tampão citrato de sódio contendo 0,1 M de etanolamina e 50 mM de cianoborohidreto de sódio. Nessa etapa, os criogéis foram lavados com 20 mL da solução, interrompendo-se o fluxo da bomba por 30 minutos e passando-se os 20 mL restantes na sequência. Em seguida, os criogéis foram lavados com 30 mL do tampão citrato, seguido de 40 mL de água destilada. Por fim, realizou-se a lavagem com 40 mL do tampão fosfato em pH 7,2 na concentração de 20 mM. As seringas contendo os criogéis foram fechadas preenchidas com o tampão fosfato e armazenadas úmidas a 4°C.

### **2.3.3. Imobilização com o método do glutaraldeído**

Para a imobilização utilizando o método do glutaraldeído foi utilizada uma metodologia adaptada de Kumar et al. (2003) e Petro et al. (1996). Primeiramente, os criogéis foram lavados com 30 mL de etanol anidro, seguido de 30 mL de etanol + água destilada (1:1) e por fim 30 mL de água destilada. Nestas lavagens iniciais foram percolados 15 mL pelo criogel, interrompendo-se o fluxo da bomba por 10 min e passando-se os 15 mL restantes na sequência. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 30 mL de tampão carbonato em pH 9,5, na concentração de 50 mM. Lavou-se então os mesmos com 40 mL de etilenodiamina 0,5 M em tampão carbonato, com recirculação (2h→repouso de 30 min→2h). Após essa etapa os

criogéis foram lavados com água destilada até a solução de lavagem atingir pH neutro. Os criogéis foram lavados com 30 mL de tampão fosfato em pH 7,2, na concentração de 0,1 M. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 40 mL de uma solução de glutaraldeído 5% m/v em tampão fosfato, em recirculação (2,5 h → repouso de 30 min → 2,5 h). Em seguida, foi preparada uma solução de 4 mg.mL<sup>-1</sup> de N-acetil-D-glicosamina no tampão fosfato, e recirculou-se 25 mL dessa solução nas criogéis por 16 h. Posteriormente, as colunas foram lavadas com 40 mL de borohidreto de sódio 0,1 M em tampão carbonato, em recirculação (1,5 h → 30 min → 1,5 h). Lavou-se então os criogéis com 100 mL de água destilada, seguido de 40 mL de etanolamina 0,1 M no tampão carbonato e novamente 40 mL de água destilada. Finalmente, os criogéis foram lavados com 50 mL do tampão fosfato em pH 7,2 na concentração de 0,1 M. As seringas contendo os criogéis foram fechadas preenchidas com o tampão fosfato e armazenadas úmidas a 4°C.

#### **2.3.4. Imobilização com o método da etilenodiamina**

Para a imobilização do carboidrato modificado utilizando o método da etilenodiamina foi utilizada a mesma metodologia do item 2.3.3 (método do glutaraldeído), excluindo apenas a etapa de lavagem com 40 mL de uma solução de glutaraldeído 5% m/v em tampão fosfato, pois dessa maneira o criogel se tornará amino-ativado. Todas as outras etapas anteriores e posteriores a essa foram realizadas do mesmo modo.

### **2.4. Caracterização dos criogéis**

Para a caracterização dos diferentes criogéis produzidos foram realizadas as análises de capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade, permeabilidade ao escoamento, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

#### **2.4.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade**

A capacidade de inchamento (S) foi determinada por meio da imersão de 6 matrizes de cada método em recipientes contendo 50 mL de água à temperatura ambiente, por 24 h. Posteriormente, o excesso de água foi retirado e as massas foram medidas em balança analítica. Em seguida, os criogéis foram secos em estufa a 60°C, até massa constante. O valor de S foi calculado utilizando a Equação 1 (SAVINA et al., 2005).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (1)$$

Onde:  $m_s$  é a massa (kg) do criogel hidratado e  $m_d$  é a massa (kg) do criogel desidratado.

O grau de expansão (ED) dos criogéis é uma medida útil para a conversão entre a massa desidratada do criogel (quando armazenado) e o seu volume hidratado quando em uso. Primeiramente, 6 criogéis de cada método foram identificados e secos em estufa a 60°C até massa constante. Posteriormente, foram saturados com água por 24 h. Após esse período, os criogéis saturados foram transferidos para uma proveta contendo um volume conhecido de água ( $V_1$ ), e após a imersão dos criogéis saturados na proveta foi obtido um novo volume ( $V_2$ ). O valor de ED foi calculado utilizando-se a Equação 2 (FONTAN, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (2)$$

Onde:  $V_1$  é o volume inicial de água na proveta (L),  $V_2$  é o volume final lido na proveta após a colocação do criogel (L) e  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg).

Para determinação da porosidade, 6 criogéis de cada método desidratados e com as massas conhecidas foram mantidos por sete dias em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse em torno de 98% a temperatura ambiente (25°C) (GREESPAN, 1977), registrando novamente as massas ao final desse período. Com essa medida foi determinada a quantidade de água de ligação do criogel. Posteriormente os criogéis foram imersos em recipiente contendo 50 mL de água por 24 h para completa saturação, registrando novamente as massas. Em seguida, os criogéis foram delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. A fração de macroporos ( $\varphi_M$ ), com tamanho  $\geq 1\mu\text{m}$ , fração de meso e microporos ( $\varphi_m$ ), com tamanho  $< 1\mu\text{m}$ , fração de água ligada ( $\varphi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\varphi_d$ ) e porosidade total ( $\varphi_T$ ) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente (PLIEVA et al. 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (4)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (5)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (7)$$

Onde:  $m_s$  é a massa do criogel hidratado (kg),  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg),  $m_e$  é a massa do criogel espremido (kg) e  $m_{wb}$  é a massa do criogel com água de ligação (kg).

#### 2.4.2. Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento foi obtida utilizando-se o método baseado na equação de Darcy (Equação 8) para escoamento em meios porosos. Colunas de criogéis funcionalizadas por cada método testado foram preparadas nas próprias seringas plásticas em que foi feita a síntese. Para tanto, os criogéis foram hidratados livremente e ajustados para um comprimento total de 5,5 cm, sendo em seguida levemente comprimidos até uma altura de 5 cm (cerca de 5,2 mL) utilizando-se um adaptador na extremidade da seringa. As colunas foram então equilibradas com 50 volumes de coluna (VC) de água deionizada e submetidos a um gradiente de pressão hidrostática sobre a coluna entre 1,9 kPa e 8 kPa, sendo a vazão volumétrica registrada na saída do leito. Tal análise foi conduzida com duas repetições em triplicatas, sendo a permeabilidade ao escoamento obtida a partir do coeficiente angular da equação ajustada no gráfico de vazão versus pressão hidrostática sobre a coluna.

$$Q = \frac{AK_p}{\eta L} \Delta P \quad (8)$$

Onde  $\Delta P$  é a variação da pressão hidrostática sobre a coluna (Pa),  $\eta$  é a viscosidade cinemática da fase móvel (Pa.s),  $Q$  é a vazão volumétrica ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $A$  é a área transversal da coluna ( $\text{m}^2$ ),  $L$  é a altura do leito (m) e  $K_p$  é a permeabilidade ao escoamento do leito ( $\text{m}^2$ ).

#### 2.4.3. Avaliação da morfologia dos criogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para melhor conhecimento da estrutura dos criogéis produzidos, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos criogéis produzidos. Para isso, uma amostra de cada monólito produzido foi desidratado e quebrado próximo à região central, fixado em suporte apropriado (stub) e diretamente metalizado com uma fina camada de ouro. Após a metalização, as amostras foram levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, Modelo DSM940). A partir das imagens obtidas foram estimados os valores para diâmetro médio dos poros.

#### 2.4.4. Determinação dos grupos funcionais por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais dos criogéis produzidos foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. As amostras avaliadas foram desidratadas, transformadas em pó e lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de  $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$  em um espectrofotômetro FTIR Bruker,

modelo Vertex 70.

## 2.5. Avaliação do potencial de uso dos monólitos produzidos

Para avaliação do potencial de uso dos criogéis, foi utilizada como modelo a lectina concanavalina A, obtida da leguminosa *Canavalia ensiformis* (C20110, Sigma). A concanavalina A é uma lectina com massa molar de 26 kDa, composta de quatro cadeias peptídicas homólogas e com afinidade pelos açúcares manose e glicose. Para tanto foram avaliados a capacidade de ligação e os ciclos de reutilização dos criogéis produzidos a partir do método que apresentou maior quantidade de carboidrato imobilizado.

Uma solução de concanavalina A a  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) contendo 0,1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$ . Inicialmente, a coluna (idêntica à usada nos ensaios de permeabilidade) foi equilibrada com 50 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2). Posteriormente, 20 mL da solução de concanavalina preparada foi recirculada através das colunas utilizando uma bomba peristáltica na vazão de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ , por um período de 3 h. Após esse tempo, a quantidade de proteína adsorvida na superfície do criogel foi quantificada por diferença na solução de concanavalina antes e após a recirculação, utilizando leitura direta em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) até a total retirada dos materiais não adsorvidos (absorbância menor que 0,001). Por fim, a eluição da lectina adsorvida foi realizada utilizando-se uma solução de glicose 0,5 M no tampão fosfato do sódio 20 mM (pH 7,2) por 12 h. Na sequencia todo o procedimento descrito foi repetido para se avaliar os ciclos de reutilização da coluna usada. Tais ciclos de adsorção e eluição da concanavalina A foram repetidos 5 vezes em duas diferentes colunas para a avaliação da perda de eficiência ao longo do tempo de uso.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criogéis produzidos (Figura 1) apresentaram estruturas consistentes, cilíndricas, esponjosas quando umedecidas, lisas e porosas, conforme relatado por diversos autores (PERSSON et al., 2004; ARVIDSSON et al., 2002; YAO et al., 2006a). Ao serem retirados das colunas, os criogéis puderam ser suavemente espremidos, removendo o excesso de água livre no interior dos poros, sem ter a sua estrutura danificada. Após serem mergulhados em água, os criogéis facilmente voltaram à sua forma original. O mesmo ocorreu após os processos de secagem e reidratação.

**Figura 1:** Imagens de um criogel base produzido no experimento. (A) Criogel seco; (B)



Criogel saturado com água.



(A)



(B)

### Avaliação do processo de imobilização da N-acetil-D-glicosamina

Diversos trabalhos envolvendo a imobilização de proteínas via ligação covalente em monólitos são encontrados na literatura (KUMAR et al., 2003; KHAN et al., 2012; PETRO et al., 1996; LUO et al., 2002), porém não foram encontrados trabalhos para imobilização de carboidratos utilizando as técnicas empregadas no presente estudo. Para que a imobilização fosse possível utilizando-se as técnicas propostas, os carboidratos utilizados deveriam possuir grupamentos amina ou aldeído, a depender da técnica escolhida, assemelhando-se desse modo ao que é encontrado nas proteínas. A molécula de N-acetil-D-glicosamina possui esses dois grupamentos, sendo adequada ao uso neste trabalho.

As concentrações médias de N-acetil-D-glicosamina imobilizada por cada técnica são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Concentração de N-acetil-D-glicosamina imobilizada utilizando-se as diferentes técnicas propostas.

Método de imobilização	Quantidade imobilizada (mg .g <sup>-1</sup> )
Glutaraldeído	147,47 <sup>a</sup> ± 7,77
Epóxi	68,78 <sup>b</sup> ± 8,35
Base de Schiff	61,04 <sup>b</sup> ± 9,90
Etilenodiamina	32,47 <sup>c</sup> ± 6,94

\* Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p > 0,05) pelo teste de Tukey.

As quantidades do carboidrato modificado N-acetil-D-glicosamina que ficaram imobilizadas na superfície dos criogéis foram obtidas por diferença a partir da quantificação do carboidrato na solução antes e após a recirculação. Os valores médios obtidos pelas diferentes técnicas foram comparados entre si utilizando um teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir da análise da Tabela 1 observou-se que o método do Glutaraldeído foi o que apresentou a maior capacidade de imobilização do N-acetil-D-glicosamina. Os criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelos métodos do Epóxi e da Base de Schiff obtiveram os valores intermediários e não apresentaram diferença estatística significativa entre si. O criogel contendo o carboidrato imobilizado utilizando o método da etilenodiamina foi o que apresentou a menor capacidade de imobilização.

Os melhores resultados obtidos no método do glutaraldeído podem ser explicados pelo fato de, ao se utilizar tal técnica, ocorrer a formação de braços espaçadores entre a superfície e a molécula imobilizada, evitando efeitos de impedimento estérico, e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de imobilização de biomoléculas (PETRO et al., 1996; LUO et al., 2002). Os menores resultados obtidos no método da etilenodiamina podem ter ocorrido pelo fato dos grupos aldeídos presentes no carboidrato modificado não estarem tão disponíveis para reagir com o grupamento amina. Devido a maior quantidade de carboidrato imobilizado os criogéis em que se utilizou o método do glutaraldeído foram escolhidos para serem utilizados nos ensaios de adsorção.

### Capacidade de inchamento e grau de expansão

Os valores obtidos para a capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED) dos criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelas diferentes técnicas são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios obtidos para capacidade de inchamento e grau de expansão dos monólitos produzidos.

Parâmetro	Método de imobilização			
	Epóxi	Base de Schiff	Glutaraldeído	Etilenodiamina
S (kg.kg <sup>-1</sup> )	19,35 ± 2,27	19,46 ± 2,53	16,49 ± 1,30	16,41 ± 0,52
ED (L.kg <sup>-1</sup> )	19,89 ± 2,01	20,03 ± 2,35	18,16 ± 1,35	17,26 ± 0,64

Pode ser observado que os métodos do epóxi e da base se Schiff apresentou valores superiores, enquanto os métodos do glutaraldeído e da etilenodiamina apresentaram valores inferiores para essas variáveis. Esses menores valores dos métodos do glutaraldeído e da etilenodiamina pode ter ocorrido pelo devido a inserção de braços espaçadores, podendo ocorrer um aumento da resistência da estrutura do criogel, diminuindo assim a capacidade desses monólitos armazenarem água em sua estrutura.

A avaliação da capacidade de inchamento é uma medida da expansão da matriz do criogel, e quanto maior o seu valor, mais maleáveis são as matrizes após o inchamento e

provavelmente menores pressões elas suportam antes de sofrerem deformações (CARVALHO, 2014). Os valores encontrados nesse trabalho variaram entre 16,41 kg.kg<sup>-1</sup> e 19,46 kg.kg<sup>-1</sup> para os criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelos métodos da etilenodiamina e da Base de Schiff, respectivamente. Tais valores estão próximos ao obtido por SAVINA et al. (2005), que encontraram um valor de cerca de 18 kg.kg<sup>-1</sup> ao produzir criogéis supermacroporosos sem grupos funcionais imobilizados, contendo 6% de monômeros.

O grau de expansão é um parâmetro de grande importância na avaliação dos criogéis, pois fornece uma relação entre a massa do criogel seco (em condição de armazenamento) e o volume que o mesmo ocupa em condições operacionais. Os valores obtidos para o grau de expansão variaram entre 17,26 L.kg<sup>-1</sup> para o criogel ativado pelo método da etilenodiamina e 20,03 L.kg<sup>-1</sup> para o ativado pelo método da base de Schiff, demonstrando que uma pequena massa de criogel ocupa um grande volume quando hidratado, o que reforça a natureza porosa de sua estrutura. Tais valores foram menores do que o obtido por FONTAN (2013), que encontrou um valor próximo a 25 L.kg<sup>-1</sup> para um criogel contendo 6% de monômeros. Isso pode ter ocorrido porque no presente trabalho foi utilizada uma maior quantidade de AGE, que possivelmente aumentou a resistência estrutural do criogel e diminuiu o grau de expansão do mesmo.

### Porosidade

Os valores médios obtidos para a porosidade total e para as diferentes frações de macroporos, de micro e mesoporos, de água de ligação e de polímero seco dos criogéis poliméricos contendo o carboidrato imobilizado pelas diferentes técnicas são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Porosidade total e frações constituintes dos criogéis produzidos.

Parâmetro	Método de imobilização			
	Epóxi	Base de Schiff	Glutaraldeído	Etilenodiamina
Fração de	0,645 ± 0,042	0,658 ± 0,029	0,697 ± 0,084	0,707 ± 0,053

macroporos				
Fração de meso e microporos	0,287 ± 0,043	0,278 ± 0,024	0,238 ± 0,063	0,212 ± 0,062
Fração de água de ligação	0,012 ± 0,004	0,014 ± 0,002	0,008 ± 0,003	0,006 ± 0,001
Fração de polímero seco	0,050 ± 0,007	0,050 ± 0,007	0,057 ± 0,004	0,057 ± 0,001
Porosidade total	0,938 ± 0,002	0,937 ± 0,006	0,935 ± 0,003	0,935 ± 0,003

Uma característica importante para a avaliação de um material cromatográfico é a sua porosidade. Os resultados encontrados para a porosidade total e para as frações constituintes dos criogéis produzidos mostraram que não houve grandes diferenças dessas variáveis para os diferentes métodos de imobilização testados.

O valor encontrado para a fração de polímero seco variou entre 5% e 5,7% nos criogéis produzidos no presente estudo, encontrando-se acima do obtido por Plieva et al. (2004a e 2004b) para criogéis contendo 7% de monômeros. A fração de água ligada variou entre 0,6% para o criogel ativado utilizando o método da etilenodiamina e 1,2% para o ativado com o método do epóxi, estando abaixo dos resultados encontrados por Plieva et al. (2004a e 2004b), que encontrou valores entre 4% e 5%. Juntos, a fração de polímero seco e de água ligada formam as paredes dos poros e ao somar essas duas frações os valores encontraram-se próximos ao dos trabalhos citados anteriormente.

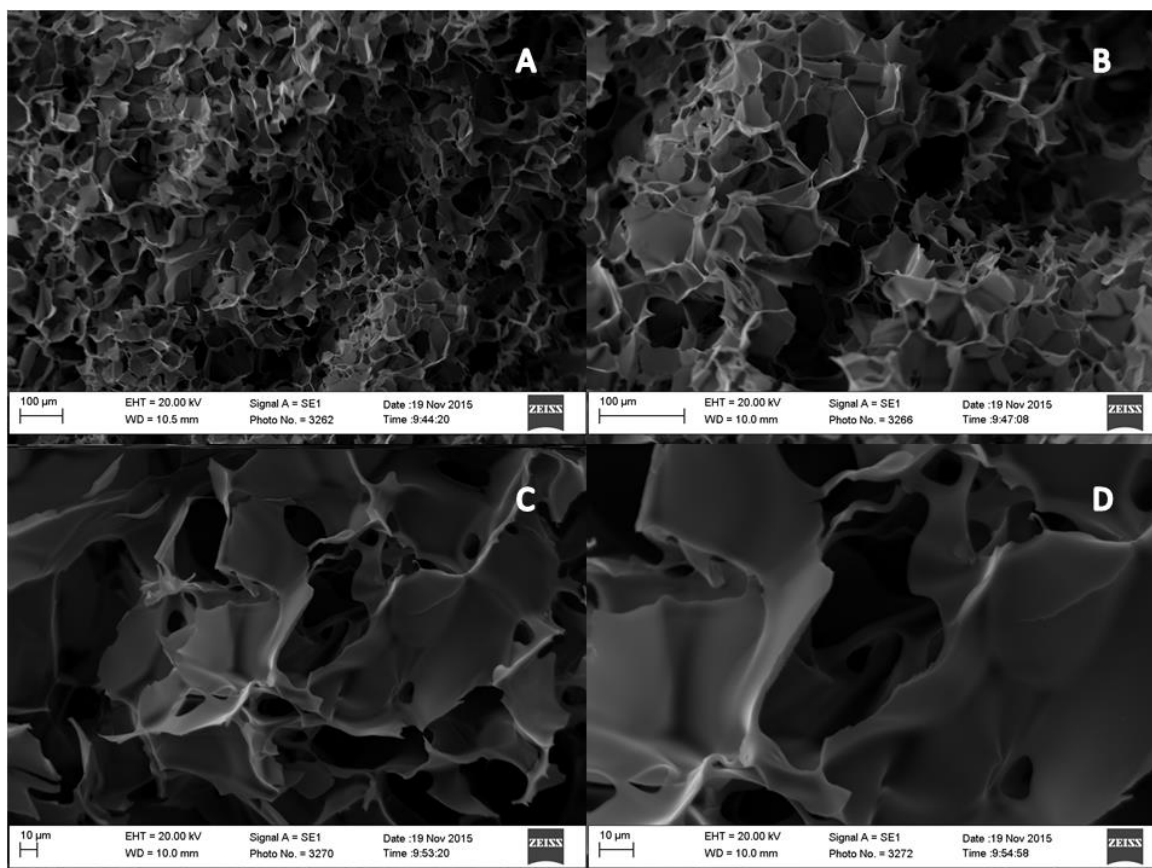
Os valores encontrados para porosidade nos diferentes métodos foram próximos a 94%, demonstrando que o criogel produzido é composto quase que em sua totalidade por poros. Tais valores estão próximos aos encontrados por Plieva et al. (2004a e 2004b) que encontraram uma porosidade total em cerca de 90%.

Os valores obtidos para a fração de macroporos dos criogéis produzidos encontram-se próximos ao encontrado por Yao et al. (2006b) que foi cerca de 70% e inferior ao obtido por Yao et al. (2006a e 2007) que encontraram valores próximos a 85%. A fração de macroporos é calculada a partir da quantidade de água que é possível espremer mecanicamente dos criogéis saturados com água e os resultados obtidos no presente estudo indicaram que a maior parte da estrutura do criogel monolítico é formada por macroporos interconectados, possuindo assim boas características para serem utilizados em processos de purificação de macromoléculas (ARVIDSSON et al., 2002).

#### **Avaliação da morfologia dos crogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Na Figura 2 são apresentadas as imagens da microscopia eletrônica de varredura dos criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelo método do glutaraldeído. Os criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelos demais métodos apresentaram estrutura similar, não sendo mostrados aqui.

**Figura 2:** Imagens da microscopia eletrônica de varredura do criogel contendo o carboidrato imobilizado pelo método do glutaraldeído.



As micrografias obtidas para os criogéis sem ativação foram semelhantes ao criogel ativado, constatando assim que o processo de imobilização de carboidratos não afetou a estrutura macroporosa do mesmo.

Os criogéis apresentaram estrutura homogênea, com poros grandes e interconectados com diâmetro de 40,67 µm (variando entre 15 µm e 70 µm) superfícies com aspecto liso e ausência de poros fechados, estando de acordo ao observado por diversos autores (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2004b; YAO et al., 2006a; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007; CHEN et al., 2008). Este tamanho dos poros permite a passagem tanto de macromoléculas, como de células microbianas, fragmentos celulares e até mesmo soluções concentradas e particuladas (PLIEVA et al., 2008; GUIOCHON, 2007).

## Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento é um parâmetro muito útil no desenvolvimento de monólitos macroporosos, que pode ser definida como a capacidade de permitir o fluxo do fluido através de seus poros e quanto maior o seu valor, menor será a resistência ao escoamento apresentado pelos criogéis. A determinação da constante de permeabilidade baseou-se na medição da vazão da fase móvel na saída da coluna em função da pressão hidrostática sobre ela, por meio da Lei de Darcy (YAO et al., 2007; CHEN et al., 2008). A partir dos resultados experimentais de vazão em função da diferença de pressão os coeficientes angulares das retas foram ajustados e a constante de permeabilidade dos diferentes criogéis produzidos foi determinada. Os valores de permeabilidade obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores da constante de permeabilidade das colunas produzidas.

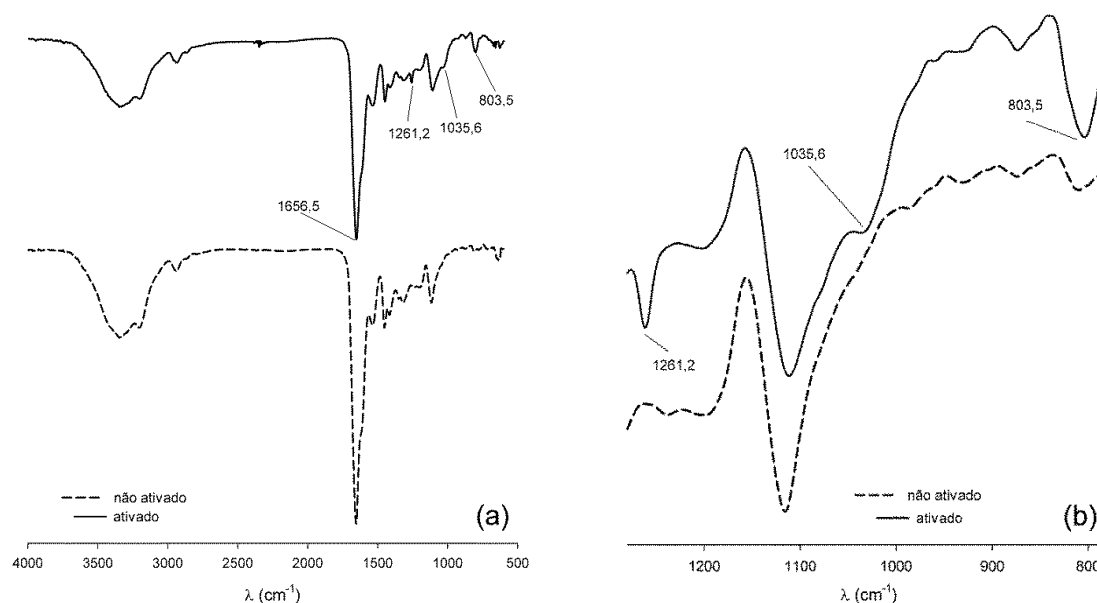
Método de imobilização	Permeabilidade (m <sup>2</sup> )
Epóxi	1,66 x 10 <sup>-11</sup>
Base de Schiff	3,06 x 10 <sup>-11</sup>
Glutaraldeído	2,84 x 10 <sup>-11</sup>
Etilenodiamina	2,16 x 10 <sup>-11</sup>

Os valores da constante de permeabilidade apresentaram-se próximos e na mesma ordem de grandeza, indicando que o método de ativação não exerceu grande influência na resistência ao escoamento dos criogéis produzidos. Os valores obtidos demonstram a baixa resistência ao escoamento dos criogéis produzidos e encontram-se dentro da faixa de 10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup> e 10<sup>-13</sup> m<sup>2</sup> encontrados por diversos autores (CHEN et al., 2008; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007; YAN et al., 2011), ao utilizarem criogéis entre 4% e 7% de monômeros. Essa baixa resistência ocorre devido à presença de macroporos interconectados na estrutura dos criogéis e permite utilizar tais colunas em processos cromatográficos, obtendo altas vazões com a utilização de baixas pressões.

## Determinação dos grupos funcionais por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais podem exercer influência nas propriedades dos criogéis supermacroporosos. Em virtude disso, a análise de espectroscopia FTIR foi utilizada para obter informações sobre a presença de grupos funcionais dos monólitos produzidos. Na Figura 3 são apresentados os espectros dos criogéis contendo o carboidrato imobilizado pelo método do glutaraldeído e dos criogéis base. Os espectros obtidos utilizando os demais métodos não foram colocados no gráfico por apresentarem o mesmo comportamento do espectro utilizando o método do glutaraldeído. Isso ocorre, provavelmente, pelo fato das quantidades de materiais que se ligam aos criogéis durante os procedimentos de imobilização serem baixas, não causando variações significativas nos espectros.

**Figura 3:** Espectros de FTIR dos criogéis produzidos.



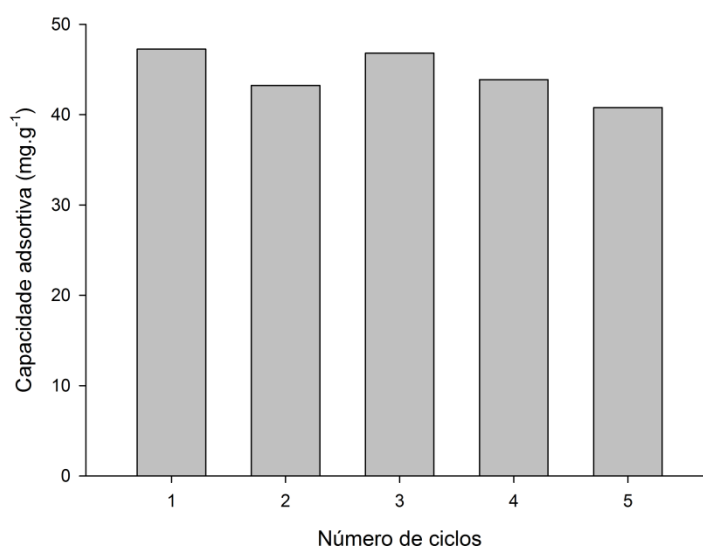
A banda do comprimento de onda de  $1656,5 \text{ cm}^{-1}$  observada nos espectros com e sem ativação foram atribuídas ao grupamento amida (C=O) das moléculas de AAm e BAAm utilizadas no processo de síntese dos criogéis (COATES, 2000). Em diversos trabalhos da literatura, onde foi obtido o espectro FTIR de criogéis de poliacrilamida, observa-se que há a ocorrência de uma banda forte nessa região de comprimento de onda (SAVINA et al., 2005; TAO et al., 2014, PERÇIN et al., 2015), sugerindo que tal banda deve representar a amida. Três bandas observadas apenas nos criogel ativado foram marcadas. A banda em  $1261,2 \text{ cm}^{-1}$  pode estar associada à presença de C-O presente em álcoois. A banda em  $1035,6 \text{ cm}^{-1}$  dos criogéis ativados pode estar associada ao grupo C-O de álcoois e éteres, ou ao grupo C-N de aminas (COATES, 2000). A banda em  $803,5 \text{ cm}^{-1}$  dos criogéis ativados pode indicar a presença de grupos funcional aminas. O aparecimento das bandas em  $1035,6 \text{ cm}^{-1}$  e  $803,5 \text{ cm}^{-1}$

nos criogéis ativados pode ser decorrente dos grupamentos amins presentes nas moléculas de N-acetil-D-glicosamina imobilizada nos criogéis.

### Capacidade adsortiva e reutilização da coluna

As colunas utilizadas para se avaliar o potencial de uso dos monólitos produzidos foram as produzidas utilizando o método do glutaraldeído, pois esse método apresentou a maior capacidade de imobilização do carboidrato N-acetil-D-glicosamina. A partir dos ensaios de capacidade de ligação da lectina concanavalina A e dos testes de reuso, verificou-se que as mesmas apresentaram uma capacidade de ligação média de  $44,49 \pm 2,68$  mg de concanavalina A / g de criogel seco em 5 ciclos de utilização, demonstrando que tais colunas produzidas foram capazes de adsorver lectina em sua estrutura. Além disso, um fator muito importante para utilização dos materiais poliméricos em processos de purificação é a sua estabilidade ao longo do tempo de uso. Na Figura 4 são apresentados os valores da capacidade de ligação da coluna após 5 ciclos consecutivos de uso.

**Figura 4:** Capacidade adsortiva e reutilização da coluna ativada com glutaraldeído.



Os resultados encontrados demonstram que as colunas ativadas com glutaraldeído apresentaram boa estabilidade nos 5 ciclos de utilização, não sendo observada grandes diferenças na sua capacidade adsortiva nos diferentes. Tais resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura, que também obtiveram uma boa estabilidade para os criogéis de poliacrilamida ao longo do tempo de uso (PERÇIN; AKSÖZ, 2012; UYGUN et al., 2015; DEMIRYAS et al., 2007). Mais estudos são necessários, mas os resultados encontrados sugerem que a utilização de tais matrizes são promissoras para serem utilizadas em processos de purificação de lectinas.



#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível a produção de criogéis monolíticos poliméricos com N-acetil-D-glicosamina imobilizada a partir do uso dos métodos propostos. Tal imobilização foi confirmada a partir da análise do espectro de FTIR. O método do glutaraldeído foi o que apresentou a maior capacidade de imobilização do carboidrato, enquanto o método da etilenodiamina apresentou a menor. Foi verificado que os criogéis funcionalizados com os métodos do glutaraldeído e da etilenodiamina apresentaram menores valores para capacidade de inchamento e grau de expansão, enquanto os funcionalizados com os métodos do epóxi e da base de Schiff apresentaram valores superiores. Foi verificado também que os diferentes métodos de imobilização pouco afetaram a porosidade e permeabilidade dos monólitos produzidos. Os mesmos possuem elevada capacidade de armazenar água na sua estrutura, que é constituída majoritariamente de macroporos, verificada na análise de microscopia eletrônica de varredura. Os altos valores de permeabilidade ao escoamento obtidos indicam a baixa resistência ao escoamento oferecida pelos criogéis. Por fim, verificou-se que foi possível a adsorção da lectina concanavalina A na coluna produzida, e que a mesma apresentou estabilidade aos ciclos de reutilização. Mais estudos são necessários para otimizar seu uso, mas os resultados encontrados sugerem que tais matrizes são promissoras para serem utilizadas em processos de purificação de lectinas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized et al affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.
- ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I. et al. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002.
- BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 11, p. 1263-1271, 2006.
- CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008.

COATES, J. **Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach**. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R. A. Meyers (Ed.) p. 10815–10837. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.

DEMIRYAS, N.; NALAN TÜZMEN, N.; GALAEV, I. Y.; PISKIN, E.; DENIZLI, A. Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) Cryogel as a Novel Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 4, p. 1808-1816, 2007.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 204-206, n.15, p.198-209, 2012.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, BO. Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2015.

FONTAN, R. C. I. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas**. 2013. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

GREENSPAN, L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. **Journal of Research of National Bureau of Standards A Physics and Chemistry**, v. 81A, n. 1, p. 89-96, 1977.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.

GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. 187-188, p. 1-46, 2013.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 1, p. 156-65, 2006.

- KHAN, S.; LINDAHL, S; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 80, p. 28-38, 2012.
- KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; YOON, K.-S.; SONG, Y.-S.; LEE, K. P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 86-95, 2006.
- KIM, H. S.; HAGE, D. S. **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006.
- KUMAR, A.; PLIEVA, F. M., GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1-2, p. 185-194, 2003.
- LOZINSKY, V.I, PLIEVA, F.M, GALAEV, I.Y AND MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4-5, p. 163–188, 2002.
- LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. 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. F.; MINIM, L. A.; FONTAN; R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.
- MAHESWARI, R.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of an acetyl group-recognizing agglutinin from the serum of the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, n. 1, p. 65-76, 2002.
- MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.
- MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-Performance Affinity Monolith

Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PANDEY, G., FATMA, T., COWSIK, S.M.; KOMATH, S.S. Specific interaction of jacalin with phycoyanin, a fluorescent phycobiliprotein. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 2, p. 87-93, 2009.

PERÇİN, I.; AKSÖZ, E. PHEMA Based Cryogel For Lectin Purification From Soybean Flour Hacettepe **Journal of Biology and Chemistry**, v.40, n. 3. p. 303-308, 2012.

PERÇİN, I.; KHALA, F. R.; BRAND, B.; MORBIDELLI, M. GEZICI, O. Strong cation-exchange chromatography of proteins on asulfoalkylated monolithic cryogel. **Journal of Chromatography A**, v. 1386,p.13-21, 2015.

PERSSON, P.; BAYBAK, O.; PLIEVA, F.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; NILSSON, B.; AXELSSON, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 224-236, 2004.

PETRO, M.; SVEC, F.; RÉCHET, 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.

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004a.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004b.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v.16, n. 11, p. 543-551, 2008.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and

- applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.
- SAVINA, I.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005.
- TAO, S.-P.; WANG, C.; SUN, Y. Coating of nanoparticles on cryogel surface and subsequent double-modification for enhanced ion-exchange capacity of protein. **Journal of Chromatography A**, v.1359, p.76-83, 2014.
- UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; Ö ÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENİ LI, A. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887–888, n. 0, p. 73-78, 2015.
- VASCONCELOS, M. A.; ALVES, A. C.; CARNEIRO, R. F. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrobium microchaete* Mart seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.
- WANG, C.; BAI, S.; TAO, S-P.; SUN, Y. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1333, p. 54–59, 2014.
- YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. 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.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006a.
- YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v.1157, n.1-2, p.246-251, 2007.
- YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. 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.

**ARTIGO**

**Avaliação do efeito da utilização de diferentes carboidratos na funcionalização de criogéis supermacroporosos voltados para a purificação de lectinas**

---

## RESUMO

As lectinas são proteínas (glicosiladas ou não glicosiladas) que se ligam a carboidratos ou glicoconjugados com considerável especificidade. Sabe-se que diferentes lectinas apresentam maior especificidade com um determinado carboidrato. Assim sendo, para se obter lectinas com um maior rendimento e grau de pureza é importante que a matriz cromatográfica utilizada contenha o carboidrato específico para a lectina de interesse. Diante disso, objetivou-se nesse trabalho avaliar a funcionalização de criogéis poliméricos com diferentes carboidratos (N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-manosamina e N-acetil-D-galactosamina) voltados à purificação de lectinas por técnicas de afinidade. A funcionalização foi conduzida em criogéis de poliacrilamida contendo radicais epóxi, ativados via ligação covalente utilizando-se o método do glutaraldeído, baseando-se na formação de Bases de Schiff. Verificou-se uma concentração de N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-manosamina imobilizada de cerca de 130 mg de carboidrato / g de criogel desidratado, sendo observado um valor um pouco menor para o N-acetil-D-galactosamina (cerca de 105 mg de carboidrato / g de criogel desidratado). As análises de capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e demais frações constituintes demonstraram que o tipo de carboidrato imobilizado não afetou tais características, sendo que os monólitos funcionalizados apresentaram elevada capacidade de hidratação, alta permeabilidade ao escoamento e estrutura macroporosa, comprovada por microscopia eletrônica de varredura. Foram realizados ensaios de adsorção de concanavalina A e ciclos de reuso da coluna funcionalizada com N-acetil-D-glicosamina, obtendo uma capacidade adsortiva em torno de  $50 \text{ mg.g}^{-1}$ , além de apresentar estabilidade ao longo de 5 ciclos de utilização consecutivos. Os resultados encontrados sugerem que a imobilização de carboidratos em criogéis de poliacrilamida abre uma nova perspectiva para o uso em processos de purificação de lectinas.

**PALAVRAS CHAVES:** monólitos, afinidade, inovação, glutaraldeído, isômeros.

## 1. INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas que ligam-se de maneira específica e reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares na estrutura, tais como glicolipídios e glicoproteínas (SUZUKY et al., 2015; HE et al., 2015). Existem diversos tipos de lectinas e essas biomoléculas podem diferir entre si por diferentes especificidades aos carboidratos ligantes. Diante disso, Lis e Sharon (1998) propuseram a classificação das lectinas em relação à especificidade aos carboidratos simples: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, frutose e N-acetilneuramínico (LIS; SHARON, 1998). Devido a habilidade em se ligar aos carboidratos, as lectinas desempenham variados efeitos sobre as células, como ação inseticida (COELHO et al., 2007), fungicida (SITOHY et al., 2007), bactericida (SANTI-GADELHA et al., 2006) e antitumoral (PETROSSIAN et al., 2007), entre outros.

Diante das excelentes propriedades e vasta gama de aplicações apresentadas pelas lectinas é interessante o desenvolvimento de alternativas viáveis para a purificação das mesmas. Diversas técnicas podem ser utilizadas para a purificação das lectinas, porém, devido à habilidade de ligar-se especificamente e reversivelmente a carboidratos, a técnica frequentemente utilizada para realizar a purificação dessas proteínas é a cromatografia de afinidade (ZHOU et al., 2014; OOI et al., 2010; WATANABE et al., 2008).

A purificação de lectinas das mais diversas fontes tem sido descrita utilizando-se diferentes açúcares, tal como a lactose (FUJII et al., 2011; KAWSAR et al., 2009), glicose (POHLEVEN et al., 2011), galactose (NAEEM et al., 2007; NAGATA, 2005), manose (ANDON et al., 2003; OOI et al., 2010), N-acetilgalactosamina (GERLACH et al., 2005; PERÇIN et al., 2009; QURESHI et al., 2006) e N-acetilglicosamina (KAUR et al., 2005; KIM et al., 2006; MAHESWARI et al., 2002), entre outros.

Além do tipo de carboidrato imobilizado, outro fator importante na imobilização de carboidratos em colunas visando à purificação de lectinas é o tipo de matriz a ser utilizada. Um material promissor que pode ser utilizado para essa finalidade são os monólitos poliméricos. Os monólitos são materiais cromatográficos feitos em um único bloco e inseridos em um suporte cromatográfico, e apresentam uma elevada capacidade de transferência de massa e uma reduzida queda de pressão (MACHADO et al., 2015).

Entre os tipos de monólitos poliméricos utilizados como suportes cromatográficos, um que merece destaque é o criogel de poliácridamida. Esse monólito é sintetizado a partir da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), sob condições de congelamento moderado (-10°C a -20°C), pela técnica conhecida como criogeleificação (PLIEVA et al., 2004). Além disso, outros monômeros podem ser utilizados para aumentar a reatividade dos criogéis. Um



monômero comumente utilizado no processo de síntese dos criogéis é o alil-glicidil-éter (AGE). Tal composto fornece grupos epóxi reativos na superfície dos monólitos (ARVIDSSON et al., 2003), possibilitando a reação com diversos grupamentos por meio de ligações covalentes (MATEO et al., 2000; MATEO et al., 2003).

Diversos métodos para imobilização de ligantes em suportes contendo grupamentos epóxi têm sido relatados (LUO et al., 2002; KIM; HAGE, 2005; MALLIK et al., 2004). Entre tais técnicas uma que merece destaque é o método do glutaraldeído, no qual o monólito epóxi ativado é convertido primeiramente para a forma amina-ativada por meio da reação dos grupos epóxi com reagentes contendo grupamento amina, tais como etilenodiamina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996) ou hexanodiamina (LUO et al., 2002). Em seguida, o monólito amina-ativado reage com glutaraldeído, formando um criogel aldeído ativado capaz de se ligar com o radical amina das moléculas. Nessa técnica há um maior espaçamento entre o agente imobilizado e a superfície monólito, o que acaba evitando efeitos de impedimento estérico (MALLIK; HAGE, 2006; LUO et al., 2002), podendo aumentar a capacidade de ligação dos biocompostos a serem imobilizados e até mesmo a capacidade de adsorção das colunas.

Diante do exposto, o objetivo nesse trabalho é avaliar o efeito da utilização de diferentes carboidratos (N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-manosamina e N-acetil-D-galactosamina) na funcionalização de criogéis supermacroporosos de poliacrilamida para o uso na purificação de lectinas por técnicas de afinidade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes**

Foram utilizados os monômeros acrilamida (AAM), bis-acrilamida (BAAM) e alil-glicidil-éter (AGE) para a produção dos criogéis. Os carboidratos imobilizados nos criogéis foram N-acetil-D-glicosamina (D-GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc) e N-acetil-D-manosamina (D-ManNAc). Todos os reagentes citados anteriormente foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os demais reagentes utilizados no experimento estão descritos ao longo da metodologia. Todos os reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS.

### **2.2. Síntese dos criogéis monolíticos**

Para síntese dos criogéis foram adaptadas metodologias propostas por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Resumidamente, 4 g de AAM, 1,2 g de BAAM e 0,8 g de AGE foram dissolvidas em 100 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados então 1%

m/m de persulfato de amônio (APS) e 1% m/m de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED) em relação a massa total de monômeros. Após homogeneização da solução a mesma foi imediatamente vertida em seringas plásticas de 5mL, e as seringas foram fechadas e mergulhadas em banho termostático à temperatura de -20,0 °C por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram deixadas à temperatura de 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Posteriormente, as seringas contendo os criogéis foram colocadas em estufa a 60°C até os criogéis serem completamente secos. Em seguida, os criogéis tiveram as extremidades cortadas para retirar partes defeituosas e suas massas foram medidas em balança analítica (precisão de 0,0001 g, Modelo M254A, BEL ENGINEERING). Os criogéis foram então lavados com 150 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> e foram novamente secos em estufa e as massas foram novamente medidas em balança analítica, para verificar, por diferença, a quantidade de monômeros que não se polimerizou. Em seguida, os criogéis estavam prontos para serem submetidos à imobilização dos diferentes carboidratos.

### **2.3. Funcionalização dos criogéis**

Neste trabalho foram utilizados os carboidratos modificados D-GlcNAc, D-GalNAc e (D-ManNAc) para avaliar o efeito de diferentes isômeros na etapa de imobilização. Tais moléculas possuem na respectiva estrutura o radical amina, que pode reagir com os criogéis aldeído ativados. Para a funcionalização dos criogéis, os três diferentes carboidratos modificados foram imobilizados na superfície dos mesmos, utilizando o método do glutaraldeído de acordo com as metodologias adaptadas propostas por KUMAR et al. (2003) e PETRO et al. (1996). Primeiramente, os criogéis foram lavados com 30 mL de etanol anidro, seguido de 30 mL de etanol + água destilada (1:1) e por fim 30 mL de água destilada. Nestas lavagens iniciais foram percolados 15 mL pelo criogel, interrompendo-se o fluxo da bomba por 10 min e passando-se os 15 mL restantes na sequência. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 30 mL de tampão carbonato em pH 9,5, na concentração de 50 mM. Lavou-se então os mesmos com 40 mL de etilenodiamina 0,5 M em tampão carbonato, com recirculação (2h→repouso de 30 min→2h). Após essa etapa os criogéis foram lavados com água destilada até a solução de lavagem atingir pH neutro. Os criogéis foram lavados com 30 mL de tampão fosfato em pH 7,2, na concentração de 0,1 M. Posteriormente, os criogéis foram lavados com 40 mL de uma solução de glutaraldeído 5% m/v em tampão fosfato, em recirculação (2,5 h → repouso de 30 min → 2,5 h). Em seguida, foi preparada uma solução de 2 mg.mL<sup>-1</sup> do carboidrato modificado (N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina ou N-acetil-D-manosamina) no tampão fosfato, e recirculou-se 25 mL dessa solução nas criogéis

por 16 h. Posteriormente, as colunas foram lavadas com 40 mL de borohidreto de sódio 0,1 M em tampão carbonato, em recirculação (1,5 h → 30 min → 1,5 h). Lavou-se então os criogéis com 100 mL de água destilada, seguido de 40 mL de etanolamina 0,1 M no tampão carbonato e novamente 40 mL de água destilada. Finalmente, os criogéis foram lavados com 50 mL do tampão fosfato em pH 7,2 na concentração de 0,1 M. As seringas contendo os criogéis foram fechadas preenchidas com o tampão fosfato e armazenadas úmidas a 4°C. Finalmente, os criogéis foram lavados com 50 mL do tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Todas as soluções foram recirculadas através das seringas contendo os criogéis, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>.

## 2.4. Caracterização dos criogéis

Para a caracterização dos diferentes monólitos produzidos foram realizadas as análises de capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade, permeabilidade ao escoamento e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### 2.4.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade

A capacidade de inchamento (S) foi determinada por meio da imersão de 6 matrizes de cada carboidrato em recipientes contendo 50 mL de água à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, o excesso de água foi retirado e as massas foram verificadas em balança analítica. Em seguida, os criogéis foram secos em estufa a 60°C, até massa constante. O valor de S foi calculado utilizando a Equação 1 (SAVINA et al., 2005).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (1)$$

Onde:  $m_s$  é a massa (kg) do criogel hidratado e  $m_d$  é a massa (kg) do criogel desidratado.

O grau de expansão (ED) dos criogéis é uma medida útil para a conversão entre a massa desidratada do criogel (quando armazenado) e o seu volume hidratado quando em uso. Primeiramente, 6 criogéis de cada carboidrato foram identificados e secos em estufa a 60°C até massa constante. Posteriormente, foram saturados com água por 24 h. Após esse período, os criogéis saturados foram transferidos para uma proveta contendo um volume conhecido de água ( $V_1$ ), e após a imersão dos criogéis saturados na proveta foi obtido um novo volume ( $V_2$ ). O valor de ED foi calculado utilizando-se a Equação 2 (FONTAN, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (2)$$

Onde:  $V_1$  é o volume inicial de água na proveta (L),  $V_2$  é o volume final lido na proveta após a colocação do criogel (L) e  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg).

Para determinação da porosidade, 6 criogéis de cada carboidrato desidratados e com as massas conhecidas foram mantidos por sete dias em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse em torno de 98% a temperatura ambiente (25°C) (GREESPAN, 1977), registrando novamente as massas ao final desse período. Com essa medida foi determinada a quantidade de água de ligação do criogel. Posteriormente os criogéis foram imersos em recipiente contendo 50 mL de água por 24 horas para completa saturação, registrando novamente as massas. Em seguida, os criogéis foram delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. A fração de macroporos ( $\varphi_M$ ), com tamanho  $\geq 1\mu\text{m}$ , fração de meso e microporos ( $\varphi_m$ ), com tamanho  $< 1\mu\text{m}$ , fração de água ligada ( $\varphi_{wb}$ ), fração de polímero seco ( $\varphi_d$ ) e porosidade total ( $\varphi_T$ ) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente (PLIEVA et al. 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (4)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (5)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (7)$$

Onde:  $m_s$  é a massa do criogel hidratado (kg),  $m_d$  é a massa do criogel desidratado (kg),  $m_e$  é a massa do criogel espremido (kg) e  $m_{wb}$  é a massa do criogel com água de ligação (kg).

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

#### 2.4.2. Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento foi obtida utilizando-se o método baseado na equação de Darcy (Equação 8) para escoamento em meios porosos. Colunas de criogéis contendo os diferentes açúcares testados foram preparadas nas próprias seringas plásticas em que foi feita a síntese. Para tanto, os criogéis foram hidratados livremente e ajustados para um comprimento total de 5,5 cm, sendo em seguida levemente comprimidos até uma altura de 5 cm (cerca de 5,2 mL) utilizando-se um adaptador na extremidade da seringa. As colunas

foram então equilibradas com 50 volumes de coluna (VC) de água deionizada e submetidos a um gradiente de pressão hidrostática sobre a coluna entre 1,9 kPa e 8 kPa, sendo a vazão volumétrica registrada na saída do leito. Tal análise foi conduzida com duas repetições em triplicatas, sendo a permeabilidade ao escoamento obtida a partir do coeficiente angular da equação ajustada no gráfico de vazão versus pressão hidrostática sobre a coluna.

$$Q = \frac{AK_p}{\eta L} \Delta P \quad (8)$$

Onde  $\Delta P$  é a pressão hidrostática sobre a coluna (Pa),  $\eta$  é a viscosidade da fase móvel (Pa.s),  $Q$  é a vazão volumétrica ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $A$  é a área transversal da coluna ( $\text{m}^2$ ),  $L$  é a altura do leito (m) e  $K_p$  é a permeabilidade ao escoamento do leito ( $\text{m}^2$ ).

### **2.4.3. Avaliação da morfologia dos criogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para melhor conhecimento da estrutura dos criogéis produzidos, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos monólitos produzidos com os diferentes carboidratos. Para isso, uma amostra de criogel de cada carboidrato foi desidratado e quebrado próximo à região central, fixado em suporte apropriado (stub) e diretamente metalizado com uma fina camada de ouro. Após a metalização, as amostras foram levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, Modelo DSM940). A partir das imagens obtidas foram estimados os valores para diâmetro médio dos poros.

### **2.5. Avaliação do potencial de uso dos monólitos produzidos**

Para avaliação do potencial de uso dos monólitos, foi utilizada como modelo a lectina concanavalina A, obtida da leguminosa *Canavalia ensiformis* (C20110, Sigma). A concanavalina A é uma lectina com massa molar de 26 kDa, composta de quatro cadeias peptídicas homólogas e com afinidade pelos açúcares manose e glicose. Para tanto, foram avaliados a capacidade de ligação e os ciclos de reutilização dos monólitos produzidos utilizando o carboidrato N-acetil-D-glicosamina.

Uma solução de concanavalina A a  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foi preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) contendo 0,1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e 0,1 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Inicialmente, a coluna (idêntica à usada nos ensaios de permeabilidade) foi equilibrada com 50 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2). Posteriormente, 20 mL da solução de concanavalina preparada foi recirculada através das colunas utilizando uma bomba peristáltica na vazão de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , por um período de 3 h. Após esse tempo, a quantidade de proteína adsorvida na superfície do criogel foi quantificada por diferença na solução de concanavalina

antes e após a recirculação, utilizando leitura direta em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) até a total retirada dos materiais não adsorvidos (absorbância menor que 0,001). Por fim, a eluição da lectina adsorvida foi realizada utilizando-se uma solução de glicose 0,5 M no tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) por 12 h, na vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Na sequência todo o procedimento descrito foi repetido para se avaliar os ciclos de reutilização da coluna usada. Tais ciclos de adsorção e eluição da concanavalina A foram repetidos 5 vezes em duas diferentes colunas para a avaliação da perda de eficiência ao longo dos ciclos de uso.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os criogéis supermacroporosos de poliacrilamida produzidos no experimento apresentaram estrutura esponjosa e elástica quando hidratados, conforme relatado em diversos trabalhos (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2009; CARVALHO et al., 2014). Devido à alta elasticidade, tais monólitos podiam ser suavemente comprimidos mantendo a integridade de sua estrutura. Além disso, as matrizes também apresentaram boa estabilidade aos processos de secagem e hidratação, características que fazem dos criogéis de poliacrilamida um material promissor para ser utilizado em processos de purificação.

#### **Avaliação do processo de imobilização dos diferentes carboidratos**

A maioria dos trabalhos sobre a purificação de lectinas envolve o aproveitamento de sua habilidade em se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados utilizando técnicas de afinidade. Diversos trabalhos para purificação dessas biomoléculas utilizando tais técnicas são encontrados na literatura (ZHOU et al., 2014; SIVAKAMAVALLI; VASEEHARAN, 2014; OURTH; ROSE, 2011; SINGH et al., 2015), porém, não foram encontrados trabalhos visando a purificação de lectinas utilizando os criogéis de poliacrilamida como adsorvente. Segundo Lis e Sharon (1998), lectinas de diferentes fontes apresentam diferentes especificidades aos carboidratos, podendo ser classificados com relação a sua especificidade a açúcares simples. Portanto, a imobilização de diferentes carboidratos em criogéis de poliacrilamida abre uma nova perspectiva para o uso em processos de purificação de lectinas.

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações médias imobilizadas dos diferentes carboidratos testados.

**Tabela 1:** Valores de concentração média dos carboidratos imobilizados nas matrizes monolíticas.

<b>Carboidrato</b>	<b>Quantidade imobilizada (mg .g<sup>-1</sup>)</b>
D-ManNAc	131,68 <sup>a</sup> ± 16,93
D-GlcNAc	130,97 <sup>a</sup> ± 7,99
D-GalNAc	104,54 <sup>b</sup> ± 10,40

\* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p > 0,05) pelo teste de Tukey.

A partir desses resultados pode-se observar que os criogéis com D-ManNAc e D-GlcNAc apresentaram uma maior quantidade imobilizada, não possuindo diferença estatística significativa para os valores encontrados. Observa-se ainda na Tabela 1 que foi possível imobilizar o carboidrato D-GalNAc no criogel de pAAm utilizado, porém em menor quantidade do que os outros dois carboidratos. Os valores encontrados nesse trabalho são menores do que o obtido por Perçin e Aksöz (2012), que obteve uma quantidade imobilizada de 490 mg.g<sup>-1</sup> ao imobilizar N-acetil-D-glicosamina em monólito de metacrilato utilizando a técnica do brometo de cianogênio.

### **Caracterização dos criogéis**

Os resultados da caracterização dos monólitos produzidos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados da caracterização dos criogéis.

<b>Parâmetro*</b>	<b>Carboidrato imobilizado</b>		
	<b>D-GlcNAc</b>	<b>D-GalNAc</b>	<b>D-ManNAc</b>
Capacidade de inchamento (kg.kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	18,873 ± 0,926	18,037 ± 0,348	19,032 ± 1,040
Grau de expansão (L.kg <sup>-1</sup> )	20,189 ± 1,368	18,834 ± 0,474	19,085 ± 0,844
Fração de macroporos	0,722 ± 0,034	0,742 ± 0,036	0,771 ± 0,038
Fração de meso e microporos	0,209 ± 0,035	0,187 ± 0,040	0,161 ± 0,038
Fração de água de ligação	0,019 ± 0,001	0,019 ± 0,007	0,018 ± 0,001
Fração de polímero seco	0,050 ± 0,002	0,053 ± 0,001	0,050 ± 0,002
Porosidade total	0,931 ± 0,003	0,937 ± 0,006	0,935 ± 0,003

\* Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05) para nenhum dos parâmetros analisados em função do tipo de carboidrato imobilizado.

Observa-se que para todas as variáveis estudadas não foram encontradas diferenças

estatísticas significativas para os monólitos contendo os diferentes carboidratos imobilizados. Provavelmente nenhuma alteração foi verificada porque os açúcares utilizados são isômeros e era esperado que o efeito deles fosse similar.

A avaliação da capacidade de inchamento é uma medida da expansão da matriz do criogel, e quanto maior o seu valor maior é a quantidade de água armazenada na estrutura dos criogéis. Os valores encontrados nesse trabalho variaram entre 18 e 19 kg de água / kg de criogel desidratado, demonstrando a alta capacidade de absorção de água apresentada pelos criogéis produzidos. Tais valores estão próximos ao obtido por Savina et al. (2005) que encontrou uma capacidade de inchamento de cerca de 18 kg.kg<sup>-1</sup> ao utilizar criogéis de poliácridamida com 6 % m/m de monômeros e inferior ao obtido por Fontan (2013), que encontrou uma capacidade de inchamento de cerca de 20 kg.kg<sup>-1</sup> para criogéis contendo 6% m/m de monômeros.

Outra medida útil para avaliação da expansão do criogel é o grau de expansão. Tal parâmetro possui grande importância, pois fornece uma relação entre a massa do criogel seco (em condição de armazenamento) e o volume que o mesmo ocupa em condições operacionais. Os valores obtidos para o grau de expansão variaram entre 18,8 L.kg<sup>-1</sup> e 20,2 L.kg<sup>-1</sup>, demonstrando que uma pequena massa de criogel seco ocupa um grande volume quando hidratado, o que reforça a natureza porosa de sua estrutura.

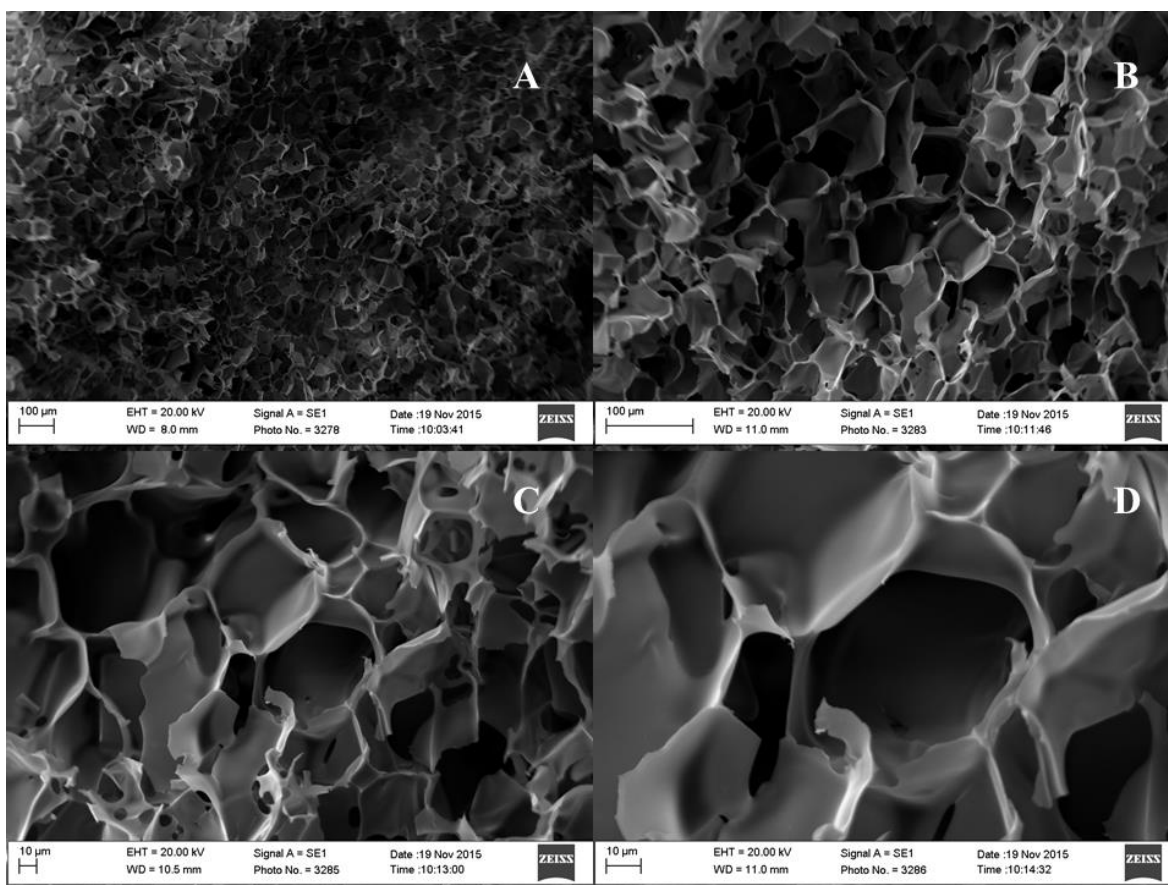
O valor encontrado para fração de macroporos do criogel hidratado variou entre 72,2% para o criogel contendo N-acetil-D-glicosamina e 77% para o criogel contendo N-acetil-D-manosamina, demonstrando que estes predominam em suas estruturas, o que é interessante para a utilização desses monólitos em processos de purificação com soluções contendo materiais mais concentrados ou particulados. A porosidade total dos monólitos variou entre 93,1% para o criogel contendo N-acetil-D-glicosamina e 93,7% para o criogel contendo N-acetil-D-galactosamina, indicando que a água presente nos criogéis saturados com água representa mais de 93% de sua massa total. Tal valor é próximo ao obtido por Plieva et al. (2004) e superior ao encontrado por Carvalho et al. (2014) e Kumar et al. (2003).

#### **Avaliação da morfologia dos criogéis por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

São apresentadas na Figura 1 as micrografias eletrônicas do criogel produzido com a N-acetil-D-manosamina imobilizada. Os criogéis contendo os demais carboidratos apresentaram estrutura similar, não sendo mostrados aqui.



**Figura 1:** Micrografias eletrônicas de varredura dos monólitos funcionalizados com D-ManNAc.

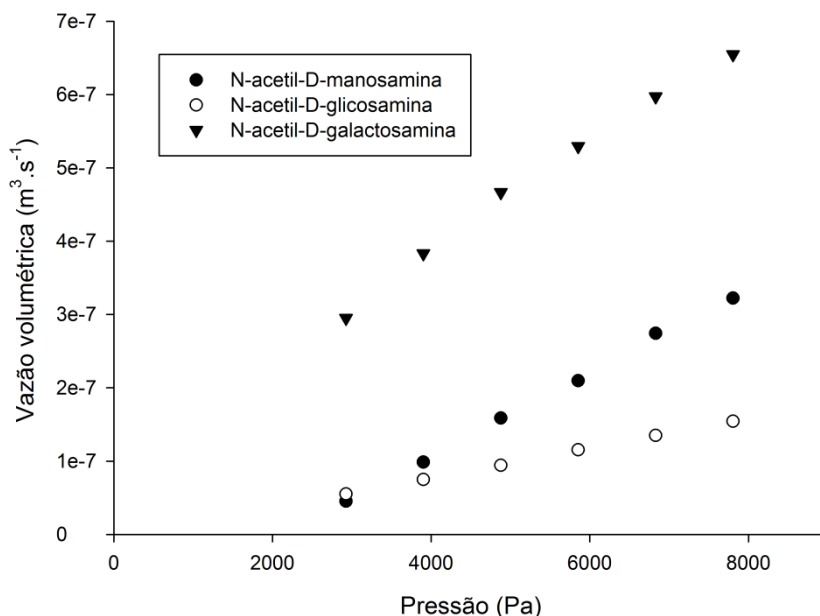


Pode-se observar que o criogel apresentou superfícies com aspesto liso e uma estrutura uniforme contendo poros grandes e interconectados de formato arredondado, com tamanho variando entre 20 µm e 70 µm, onde a maioria dos poros apresentou-se na faixa entre 30 µm e 40 µm, condizente com o observado por outros autores (DRAGAN et al. 2012; YAO et al., 2007; MACHADO et al., 2015). Observa-se também que o processo de ativação não afetou a estrutura macroporosa do criogel, não sendo observada a presença de poros fechados. Tais tamanhos de poros permitem a passagem de macromoléculas sobre a sua estrutura (PLIEVA et al., 2008; GUIOCHON et al., 2007).

### **Permeabilidade ao escoamento**

Na Figura 2 são apresentados os resultados experimentais da vazão volumétrica em função da diferença de pressão hidrostática aplicada sobre as colunas monolíticas funcionalizadas com os diferentes carboidratos. Para todas as colunas o aumento da pressão hidrostática provocou uma elevação linear na vazão, indicando que o aumento da pressão não provocou deformações na estrutura do criogel.

**Figura 2:** Efeito da pressão hidrostática sobre a vazão volumétrica nas colunas monolíticas funcionalizadas com diferentes carboidratos.



A partir dos resultados experimentais obtidos, foi realizada a análise de regressão. A partir dos coeficientes angulares das retas ajustadas, baseado na Lei de Darcy, foram calculados os valores de permeabilidade ao escoamento ( $K_p$ ) das colunas, cujos valores são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Valores da constante de permeabilidade dos diferentes criogéis.

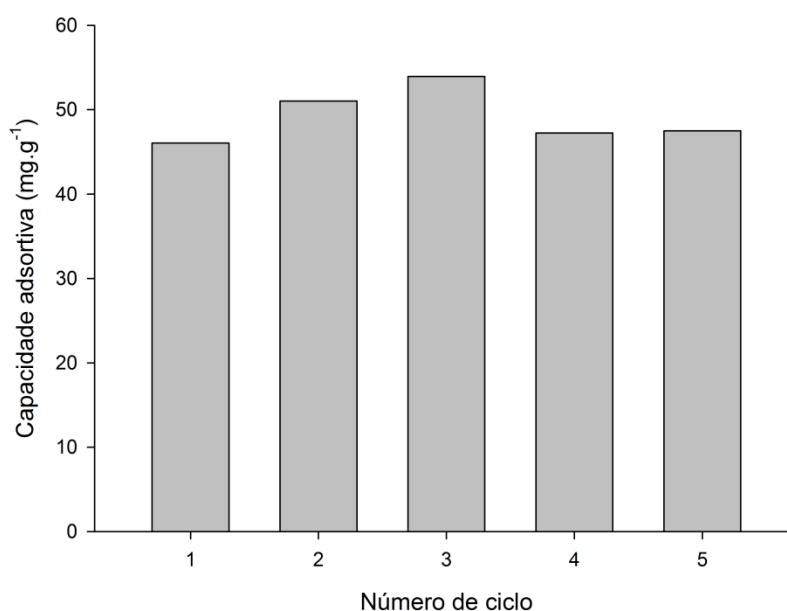
Carboidrato imobilizado	$K_p$ (m <sup>2</sup> )
D-GlcNAc	$1,10 \times 10^{-11}$
D-GalNAc	$3,95 \times 10^{-11}$
D-ManNAc	$3,09 \times 10^{-11}$

Quanto maior o valor de  $K_p$ , maior será a permeabilidade ao escoamento dos criogéis monolíticos. Os resultados encontrados são maiores que o obtido por diversos autores (YAO et al., 2006; CHEN et al., 2008; CARVALHO et al., 2014), que variou na faixa de  $10^{-12}$  m<sup>2</sup> a  $10^{-13}$  m<sup>2</sup> e próximos ao obtido por Yao et al. (2007), ao determinarem a constante de permeabilidade de criogéis de poliacrilamida. Essa baixa resistência ao escoamento ocorre devido a presença de macroporos interconectados na estrutura dos criogéis e permite a utilização dessas matrizes em processos cromatográficos obtendo elevadas vazões com a utilização de baixas pressões.

### Capacidade adsorptiva e reutilização da coluna funcionalizada com D-GlcNAc

Na Figura 3 são apresentados os valores da capacidade adsorptiva da coluna funcionalizada com D-GlcNAc para a lectina Concanavalina A após cada ciclo de uso. Tal coluna foi a escolhida, pois, apesar da Concanavalina A ser manose/glicose específica (SHARON; LIS, 2003), muitos estudos exploram a habilidade de ligação com glicose ou radicais glicosil para a purificação dela (POHLEVEN et al., 2011; KAUR et al., 2005; KIM et al., 2006).

**Figura 3:** Valores experimentais da capacidade adsorptiva da coluna de N-acetil-D-glicosamina em 5 ciclos consecutivos.



A coluna apresentou uma capacidade adsorptiva média de 49,15 mg de lectina / g de criogel seco (mg.g<sup>-1</sup>), com o maior valor obtido no terceiro ciclo (53,93 mg.g<sup>-1</sup>) e menor valor no primeiro ciclo (46,05 mg.g<sup>-1</sup>), demonstrando estabilidade ao longo do tempo de uso. Tais resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura, que também obtiveram uma boa estabilidade para os criogéis de poliacrilamida ao longo do tempo de uso (PERÇIN; AKSÖZ, 2012; UYGUN et al., 2015; DEMIRYAS et al., 2007). Os resultados encontrados sugerem que os criogéis de poliacrilamida contendo carboidrato imobilizado podem ser utilizados em processos de purificação de lectinas.

### 4. CONCLUSÕES

Foi possível realizar a imobilização de diferentes carboidratos nos criogéis produzidos, sendo os maiores valores observados para a D-ManNAc e D-GlcNAc. No entanto, a imobilização com diferentes açúcares não provocou diferenças nas propriedades físicas dos

criogéis produzidos. A análise de permeabilidade ao escoamento indicou baixa resistência ao escoamento oferecida pelas colunas produzidos. Os resultados encontrados sugerem que o processo de funcionalização não afetou a estrutura macroporosa dos monólitos, fato confirmado pela microscopia eletrônica de varredura. A capacidade adsorptiva de concanavalina A observada na coluna usada repetidas vezes demonstra que a mesma apresenta estabilidade e potencial de aplicação em processo de purificação. Os resultados obtidos abrem uma nova perspectiva na produção de colunas voltadas para a purificação de lectinas com diferentes especificidades a partir de diversas fontes.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDON, N. L.; ECKERT, D.; YATES, J. R.; HAYNES, P. A. High-throughput functional affinity purification of mannose binding proteins from *Oryza sativa*. **PROTEOMICS**, v. 3, n. 7, p. 1270-1278, 2003.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized et al affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporouscolumn of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 406-414, 2007.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 204-206, n. 15, p.198-209, 2012.

FONTAN, R. C. I. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas**. 2013. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

FUJII, Y.; KAWSAR, S. M. A.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; ISHIZAKI, N.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; TAEI, M.; OZEKI, Y. A D-galactose binding lectin purified from coronate moon turban, Turbo (*Lunella*) *corensis*, with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 158, n. 1, p. 30-37, 2011.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K.-H. *N*-acetyl-D-galactosamine/*N*-acetyl-D-glucosamine-recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 223-232, 2005.

GREENSPAN, L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. **Journal of Research of National Bureau of Standards A Physics and Chemistry**, v. 81A, n. 1, p. 89-96, 1977.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.

HE, S.; SHI, S.; WALID, E.; ZHANG, H.; MA, Y.; XUE, S. J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 166, p. 93-100, 2015.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 1, p. 156-65, 2006.

KAWSAR, S. M. A.; MATSUMOTO, R.; FUJII, Y.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; KOJIMA, N.; OZEKI, Y. Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 7, p. 709-716, 2009.

KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; YOON, K.-S.; SONG, Y.-S.; LEE, K. P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 86-95, 2006.

KIM, H. S.; HAGE, D. S. **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON,

- B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006.
- KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1-2, p. 185-194, 2003.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.
- LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. 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. F.; MINIM, L. A.; FONTAN; R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.
- MAHESWARI, R.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of an acetyl group-recognizing agglutinin from the serum of the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, n. 1, p. 65-76, 2002.
- MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.
- MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000.
- MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C. et al. Epoxy Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NAEEM, A.; HAQUE, S.; KHAN, R. H. Purification and Characterization of a Novel  $\beta$ -D-Galactosides-Specific Lectin from *Clitoria ternatea*. **The Protein Journal**, v. 26, n. 6, p. 403-413, 2007.

NAGATA, S. Isolation, characterization, and extra-embryonic secretion of the *Xenopus laevis* embryonic epidermal lectin, XEEL. **Glycobiology**, v. 15, n. 3, p. 281-290, 2005.

OOI, L. S. M.; HO, W.-S.; NGAI, K. L. K.; TIAN, L.; CHAN, P. K. S.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C. *Narcissus tazetta* lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. **Journal of biosciences**, v. 35, n. 1, p. 95-103, 2010.

OURTH, D. D.; ROSE, W. M. Purification, characterization and seasonal variation of mannose-binding C-type lectin in Ictalurid catfish. **Aquaculture**, v. 321, n. 3-4, p. 191-196, 2011.

PERÇIN, I.; AKSÖZ, E. PHEMA Based Cryogel For Lectin Purification From **Soybean Flour Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v.40, n. 3. p. 303-308, 2012.

PERÇIN, I.; YAVUZ, H.; AKSÖZ, E.; DENIZLI, A. *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin isolation from soyflour with poly (HPMA-GMA) beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 1, p. 148-154, 2009.

PETRO, M.; SVEC, F.; RÉCHET, 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.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, n. 6, p. 491-500, 2007.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004a.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in

microbiology. **Trends in Microbiology**, v.16, n. 11, p. 543-551, 2008.

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004.

PLIEVA, F. M.; SETA, E.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: processing under compression and scale-up. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 110-116, 2009.

POHLEVEN, J.; BRZIN, J.; VRABEC, L.; LEONARDI, A.; ČOKL, A.; ŠTRUKELJ, B.; KOS, J.; SABOTIČ, J. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1141-1148, 2011.

QURESHI, I. A.; DASH, P.; SRIVASTAVA, P. S.; KOUNDAL, K. R. Purification and characterization of an *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 5, p. 350-356, 2006.

## REFERÊNCIAS

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.350, n.4, p.1050-1055, 2006.

SAVINA, I.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mycelial mucin specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 2251–2258, 2015.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Psidium sativum* seed. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SIVAKAMAVALLI, J.; VASEEHARAN, B. Purification, characterization and functional role of lectin from green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 64-70, 2014.



SUZUKI, T.; ABE, T.; UMEHARA, K.; CHOI, J.-H.; HIRAI, H.; DOHRA, H.; KAWAGISHI, H. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. **Mycoscience**, v. 56, n. 4, p. 359-363, 2015.

WATANABE, Y.; SHIINA, N.; SHINOZAKI, F.; YOKOYAMA, H. et al. Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 487-499, 2008.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v.1157, n.1-2, p.246-251, 2007.

ZHOU, W.; GAO, Y.; XU, S.; YANG, Z.; XU, T. Purification of a mannose-binding lectin *Pinellia ternata* agglutinin and its induction of apoptosis in Bel-7404 cells. **Protein Expression and Purification**, v. 93, p. 11–17, 2014.

## CONCLUSÕES GERAIS

Foram produzidos criogéis poliméricos monolíticos voltados para o processo de purificação de lectinas por afinidade com açúcares.

Para isso, foram avaliados inicialmente 4 diferentes técnicas de imobilização via ligação covalente (método do epóxi, método da base de Schiff, método do glutaraldeído e método da etilenodiamina) para imobilização do carboidrato N-acetil-D-glicosamina. Os resultados encontrados demonstraram que o método do glutaraldeído apresentou a maior capacidade de imobilização, enquanto o método da etilenodiamina a menor capacidade de imobilização.

Diante disso, o método do glutaraldeído foi utilizado para imobilizar e avaliar o efeito da imobilização de 3 diferentes açúcares (N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-manosamina). Foi possível imobilizar os açúcares no criogel, no qual as ativações em que se utilizou N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-manosamina apresentaram valores próximos, enquanto o N-acetil-D-glicosamina apresentou valor um pouco inferior.

As análises de capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade demonstraram que o processo de ativação manteve a estrutura macroporosa dos criogéis produzidos, e a microscopia eletrônica de varredura pode comprovar esses resultados, pois foi verificado que a maior parte dos poros dos criogéis encontram-se na forma de macroporos. As análises de permeabilidade ao escoamento demonstraram a baixa resistência ao escoamento oferecidas pelos criogéis produzidos.

Por fim, os criogéis contendo N-acetil-D-glicosamina imobilizada foi utilizado para realizar a adsorção do concanavalina A. Os resultados encontrados demonstraram que a coluna produzida apresentava capacidade de adsorver lectinas, mostrando uma boa estabilidade em 5 ciclos consecutivos.

A utilização de leitos monolíticos poliméricos é uma realidade na purificação de biomoléculas e os resultados obtidos neste trabalho irão contribuir para ampliação do conhecimento nesse segmento, além de mostrar-se uma nova perspectiva a ser utilizada em processos de purificação de lectinas.