



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



**MÁRJORIE CASTRO PINTO PORFIRIO**

**USO DE CLOROFILA COMO AGENTE QUELANTE NO DESENVOLVIMENTO DE**  
**MATRIZES MACROPOROSAS PARA PURIFICAÇÃO DE BROMELINA POR**  
**AFINIDADE IMAC**

ITAPETINGA – BAHIA

2022

**MÁRJORIE CASTRO PINTO PORFIRIO**

**USO DE CLOROFILA COMO AGENTE QUELANTE NO DESENVOLVIMENTO DE  
MATRIZES MACROPOROSAS PARA PURIFICAÇÃO DE BROMELINA POR  
AFINIDADE IMAC**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do programa, para obtenção do título de doutor.

**Orientador:** *DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan*

**Co-orientadores:** *DSc. Cristiane Martins Veloso*

*DSc. Leandro Soares Santos*

ITAPETINGA – BAHIA

2022

660.634 Porfirio, Márjorie Castro Pinto.  
P872u Uso de clorofila como agente quelante no desenvolvimento de matrizes macroporosas para purificação de bromelina por afinidade IMAC. / Márjorie Castro Pinto Porfirio. – Itapetinga-BA: UESB, 2022.  
172f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do programa, para obtenção do título de doutor. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Enzimas – Extração e purificação. 2. Enzimas - Purificação - Clorofila. 3. Purificação da bromelina - Cromatografia. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Bromelina – Purificação - IMAC
2. Clorofila - Purificação de proteases - Criogel
3. Proteases - Purificação - Cromatografia IMAC

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

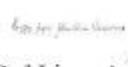
**Título:** USO DE CLOROFILA COMO AGENTE QUELANTE NO DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES MACROPOROSAS PARA PURIFICAÇÃO DE BROMELINA POR AFINIDADE IMAC.

**Autor (a):** MÁRJORIE CASTRO PINTO PORFÍRIO

**Orientador (a):** Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Coorientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso  
Prof. Dr. Leandro Soares Santos

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

  
Lizzy Ayra Alcântara  
Veríssimo  
2022.04.04 09:20:25  
-03'00'  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Membro Externo - UFLA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monique Renon Eller  
Membro Externo - UFV

  
Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior  
UESB

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
UESB

  
Assinado de forma digital  
por Rafael da Costa Ilhéu  
Fontan  
Data: 2022.03.30 19:42:03  
-03'00'  
Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 30 de março de 2022

*"Faça. Continue fazendo. Mesmo que não percebam a evolução. Continue fazendo. Mesmo que não deem valor as transformações. Faça e faça bem feito, mesmo que por estar tão próximo não sejam capazes de notar.*

*Tente, se errar, tente novamente. Se pensar em desistir, desista de pensar em desistir e continue acreditando. Quando estiver cansado, respire, se imagine onde deseja estar. Confie!...*

*Faça seus planos consciente de que a diferença ente o Sucesso e o Fracasso é o tempo que o fracassado leva para desistir. Não desista."*

*Tico Santa Cruz*

*À minha mãe Kátia  
Ao meu irmão Ayslan  
Ao meu pai Antonio  
Aos meus avós Wanderley e Eliete*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser sempre a minha fortaleza e permitir-me superar todos os obstáculos para o alcance dessa conquista, guiando-me e sustentando-me todos os dias.

À minha mãe Kátia, a minha maior incentivadora, por me apoiar em todas as minhas escolhas, paciência em todas as fases da minha vida, a quem devo tudo que sou, o seu amor incondicional que me fez continuar e nunca desistir, acreditando sempre no meu potencial. Essa conquista é nossa!

Ao meu irmão Ayslan, por ser meu melhor amigo, confidente, que esteve ao meu lado em toda a minha vida, sempre me apoiando com todo amor e carinho. E a minha cunhada Ingrid, pela amizade, carinho e apoio ao longo dessa jornada.

Ao meu pai Antonio, por acreditar no meu potencial, estando sempre a me apoiar.

Aos meus avós Wanderley e Eliete, pelo amor, incentivo, apoio, pois sem o acolhimento de vocês jamais teria chegado até aqui. E aos meus familiares que mesmo distante se fizeram presentes, demonstrando-me que família é amor, união, confiança, e porto seguro.

Ao meu orientador professor Dr. Rafael Fontan, pela orientação, conhecimento compartilhado e contribuição intelectual, paciência, compreensão e, principalmente, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega Rui, pelo auxílio e conhecimento compartilhado no início experimental deste trabalho.

A Mateus, pela amizade, companheirismo, desde as caronas ao apoio nos experimentos, paciência, conhecimento compartilhado, o seu auxílio foi essencial em muitas etapas deste estudo. E por ter dividido ao longo de toda essa caminhada, as conquistas, responsabilidades, inúmeros momentos de descontração e até desespero.

À amiga Annie, minha companheira de laboratório, pelo incentivo, parceria, apoio, generosidade, por sempre me ouvir, por compartilhar comigo as conquistas, angústias e diversos momentos de descontração. As amigas Ingrid, Juliana, Cristina e Marília, pelo incentivo, apoio, conselhos e pelos bons e valiosos momentos compartilhados durante esses longos anos. Amizades que levarei sempre comigo!

Aos professores Dr. Leandro Soares e Dra. Cristiane Veloso, pela co-orientação, apoio, sugestões e por contribuírem positivamente para o desenvolvimento do projeto.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pelo acolhimento, companhia, troca de conhecimento e prestatividade durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

Aos colegas, Jonathan, Priscilla, Matheus, Lucas, Jéssica e Emília pela companhia, troca de conhecimento, auxílio e momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve e prazerosa. Amigos que pretendo levar para a vida!

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos pela oportunidade e por oferecerem as condições de trabalho necessária para o desenvolvimento do projeto. Um agradecimento em especial aos professores do programa, a Jamile e aos funcionários do módulo de laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos integrantes da banca examinadora por terem aceito o convite em contribuir com esse trabalho.

Aos colegas da pós-graduação pela convivência e parceria durante essa jornada.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para essa conquista.

**Muito obrigado!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1.INTRODUÇÃO GERAL .....	17
2. REFERÊNCIAS .....	19
<b>CAPITULO 1</b> .....	<b>21</b>
1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	22
1.1. Enzimas proteolíticas.....	22
1.2. Bromelina .....	25
1.2.1. Aplicações da Bromelina.....	27
1.2.2. Processos de extração e purificação .....	28
1.3. Purificação de biomoléculas por cromatografia .....	30
1.3.1. Cromatografia de Afinidade para purificação de enzimas .....	31
1.4. Suportes monolíticos: criogéis poliméricos.....	33
1.4.1. Modificações nas superfícies dos criogéis poliméricos.....	37
1.5. Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC).....	39
1.6. Clorofilas .....	44
2. OBJETIVOS .....	48
2.1. Objetivo geral .....	48
2.2. Objetivos específicos .....	48
3. REFERENCIAS .....	49
<b>CAPITULO 2</b> .....	<b>61</b>
1. INTRODUÇÃO .....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
2.1. Reagentes.....	65
2.2.Preparo do extrato bruto de clorofila.....	65
2.3.Síntese dos criogéis monolíticos.....	66
2.4.Funcionalização dos criogéis para purificação por afinidade por metal quelato.....	66
2.4.1.Funcionalização dos criogéis com extrato bruto de clorofila.....	66
2.4.2.Funcionalização dos criogéis com ácido iminodiacético (IDA).....	68
2.5.Quantificação de clorofila imobilizada nos monólitos de criogel .....	68
2.6.Quantificação de íons metálicos imobilizados nas matrizes cromatográficas.....	69
2.7.Estudos de adsorção .....	69
2.8. Caracterização dos criogéis .....	70

2.8.1. Avaliação do potencial de utilização dos monólitos produzidos.....	71
2.8.1.1. Atividade enzimática proteolítica.....	71
2.8.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	72
2.9. Delineamento experimental.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1. Síntese e funcionalização dos adsorventes produzidos.....	73
3.2. Quantidade de clorofila imobilizada no criogel.....	74
3.3. Quantidade de íons metálicos imobilizados nas matrizes.....	75
3.4. Estudos de adsorção.....	78
3.4.1. Efeito do pH e concentração de sal na capacidade de adsorção.....	78
3.5. Caracterização das matrizes produzidas.....	82
3.5.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e morfologia.....	82
3.5.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	85
3.5.3. Difração de raios-X.....	87
3.5.4. Análise Termogravimétrica.....	89
3.5.5. Potencial de utilização das matrizes.....	91
3.5.5.1. Reutilização das matrizes.....	93
4. CONCLUSÃO.....	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	106
RESUMO.....	107
1. INTRODUÇÃO.....	107
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	109
2.1. Reagentes.....	109
2.2. Preparo dos extratos bruto de clorofila.....	109
2.3. Síntese e funcionalização dos criogéis.....	110
2.4. Caracterização hidrodinâmica do leito monolítico utilizado.....	111
2.5. Preparo das soluções de alimentação.....	114
2.5.1. Obtenção do extrato bruto.....	114
2.5.2. Precipitação do extrato enzimático.....	114
2.6. Purificação da bromelina.....	114
2.6.1. Purificação em batelada.....	114
2.6.2. Purificação em leito monolítico.....	115
2.6.3. Avaliação do extrato e frações eluídas.....	116
2.7. Delineamento experimental.....	118
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118

3.1.Caracterização das matrizes.....	118
3.2.Purificação da bromelina em batelada.....	122
3.2.1.Cromatografia de filtração em gel, eletroforese e zimograma SDS-PAGE .....	125
3.3.Purificação da bromelina em leito monolítico.....	130
4. CONCLUSÃO .....	134
5. REFERÊNCIAS.....	134
ANEXOS .....	143
Depósito pedido de patente.....	143

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

**Tabela 1-** Características de algumas proteases, animais, vegetais e microbianas.....22

### CAPITULO 2

**Tabela 1-** Quantidade de clorofila no extrato bruto de espinafre, na solução de extrato em TFS colocado em contato com criogel, e do pigmento imobilizado na superfície do criogel ..... 74

**Tabela 2-** Teor dos íons metálicos imobilizados na superfície dos criogéis funcionalizados com ácido iminodiacético (IDA) e clorofila extraído do espinafre (CLO) ..... 76

**Tabela 3-**Caracterização dos criogéis não funcionalizados e modificados com ácido iminodiacético (IDA) e extrato vegetal de espinafre (CLO) ..... 82

**Tabela 4-** Características da solução de proteína recuperada após o processo de adsorção ....92

### CAPITULO 3

**Tabela 1-** Características das soluções de alimentação e eluição ..... 123

**Tabela 2-** Resultados da purificação cromatográfica da bromelina em leito monolítico ..... 131

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

<b>Figura 1-</b> Mecanismo de ação das endopeptidases e exopeptidases.....	23
<b>Figura 2 –</b> Estrutura terciária da bromelina do talo. Os resíduos em destaque são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho), Lys-174 (azul). .....	25
<b>Figura 3-</b> Métodos de eluição da molécula alvo retida.....	32
<b>Figura 4-</b> Síntese dos criogéis.....	34
<b>Figura 5-</b> Criogéis sintetizados em diferentes formas .....	35
<b>Figura 6-</b> Reação de formação das ligações cruzadas das cadeias de acrilamida .....	36
<b>Figura 7-</b> Métodos de imobilização de ligantes via ligação covalente para produção de suportes poliméricos de afinidade.....	38
<b>Figura 8-</b> O princípio da adsorção na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados .....	40
<b>Figura 9-</b> Estrutura dos agentes quelantes polidentados complexados com íons metálicos. (a) IDA, (b) NTA .....	41
<b>Figura 10-</b> Esquema de ativação, acoplamento do agente quelante e imobilização dos íons metálicos em matrizes de afinidade IMAC .....	43
<b>Figura 11-</b> Estrutura da clorofila a e clorofila b .....	44
<b>Figura 12-</b> Esquema de degradação da clorofila .....	46

### CAPITULO 2

<b>Figura 1-</b> Esquema funcionalização criogéis ativados com clorofila.....	67
<b>Figura 2-</b> Esquema funcionalização dos criogéis ativados com IDA.....	68
<b>Figura 3-</b> Imagens dos criogéis produzidos. (a) controle sem ativação, (b) ativados com ácido iminodiacético (IDA) e funcionalizados com os diferentes metais, (c) ativado com clorofila (CLO) sem imobilização dos metais, (d) ativados com CLO e funcionalizados com os metais. ....	73
<b>Figura 4-</b> Efeito do pH na adsorção de bromelina nos adsorventes ativados com clorofila (A) e com IDA (B) de afinidade por íons metálicos (IMAC).....	78
<b>Figura 5-</b> Efeito da concentração de sal na adsorção da Bromelina nos adsorventes funcionalizados com a clorofila (A) e com o IDA (B). Para o $\text{Cu}^{+2}$ e $\text{Co}^{+2}$ em pH 7,0; $\text{Ni}^{+2}$ , $\text{Zn}^{+2}$ e $\text{Fe}^{+3}$ em pH 6,0.....	81
<b>Figura 6-</b> Imagem de MEV das matrizes controle (A e B), funcionalizadas com clorofila (C e D) e com IDA (E e F). Aumento: 350x (A, C); 400x (E); 750x (B, D e F). ....	84
<b>Figura 7-</b> Espectros de FTIR dos criogéis produzidos. (A): $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ; (B): $500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ; (C): espectros do extrato de espinafre, e etapas da funcionalização com clorofila antes e após a imobilização do metal; (D) etapas da funcionalização com IDA antes e após a imobilização do metal.. ....	85
<b>Figura 8-</b> Espectro de DRX dos adsorventes não funcionalizado (Controle), ativado com clorofila extraída de vegetais (Glut-CLO), ativado com ácido iminodiacético (Glut-IDA) e das folhas de espinafre secas.....	88
<b>Figura 9-</b> Curvas de TG dos criogéis controle (a), IDA- $\text{Cu}^{+2}$ (b) e CLO- $\text{Cu}^{+2}$ (c).....	89

<b>Figura 10-</b> Gel de eletroforese de proteínas das eluições dos criogéis imobilizados com clorofila (EL CLO) e imobilizados com o agente ácido iminodiacético (EL IDA). .....	92
<b>Figura 11-</b> Capacidade adsortiva durante a reutilização dos criogéis produzidos funcionalizados com clorofila (CLO-Cu <sup>+2</sup> ) e com ácido iminodiacético (IDA-Cu <sup>+2</sup> ). .....	93

### CAPITULO 3

<b>Figura 1-</b> Esquema das etapas de funcionalização do criogel .....	111
<b>Figura 2-</b> Curvas de distribuição do tempo de residência em várias velocidades de fluxo na coluna .....	119
<b>Figura 3-</b> Dados experimentais e equações ajustadas na determinação da $\epsilon_T$ com pulsos de acetona .....	119
<b>Figura 4-</b> Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito utilizado. ....	120
<b>Figura 5-</b> Valores de HETP em função da vazão de escoamento para pulsos de acetona ....	121
<b>Figura 6-</b> Dados experimentais da variação de pressão em diferentes velocidades superficiais de escoamento da fase móvel no leito de CLO-Cu produzido. ....	122
<b>Figura 7-</b> Cromatogramas dos padrões de $\alpha$ -lactoalbumina (A), $\beta$ -lactoglobulina (B), Quimosina (C), albumina sérica bovina (D). .....	125
<b>Figura 8-</b> Relação tempo de retenção X logaritmo da massa molecular das proteínas padrões .....	126
<b>Figura 9-</b> Cromatogramas de filtração em gel das soluções de alimentação e eluição da purificação da bromelina em batelada. (A) extrato bruto; (B) eluição com solução imidazol do extrato bruto; (C) eluição com tampão acetado +1,5 NaCl do extrato bruto; (D) extrato após precipitação; (E) eluição com tampão imidazol da solução precipitada; (F) eluição com tampão acetado +1,5 NaCl do extrato precipitado .....	127
<b>Figura 10-</b> Géis de proteínas SDS-PAGE- Solução de alimentação e eluições extrato bruto: (A) gel de eletroforese, (B) gel do zimograma; Solução de alimentação e eluição do extrato após precipitação: (C) gel de eletroforese, (D) gel do zimograma. P: padrão; EXT: extrato bruto; EL.TA: eluição com tampão acetato; EL.IM: eluição com tampão imidazol; EXT.PR: extrato após precipitação. ....	129

## RESUMO

**PORFIRIO, M.C.P. Uso de clorofila como agente quelante para o desenvolvimento de matrizes macroporosas para purificação de bromelina por afinidade IMAC.** Itapetinga – BA: UESB, 2021. 172 p. (Exame de Defesa – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

Proteases como a bromelina podem ser aplicadas em diversos segmentos da indústria e a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) é uma técnica considerada eficaz para a purificação dessas enzimas. A clorofila é um agente quelante em potencial devido apresentarem o quelato de magnésio em sua estrutura, além de ser facilmente extraída das folhas de plantas, podendo reduzir os custos das matrizes (IMAC). Os criogéis macroporosos são uma boa alternativa de matrizes para a purificação de macromoléculas, devido a sua elevada porosidade, permitindo o uso de soluções não clarificadas. Diante do exposto, objetivou-se nesse trabalho desenvolver um novo adsorvente macroporoso (criogel) de afinidade por íons metálicos funcionalizado com clorofila de fontes vegetais (CLO), voltado para a purificação de proteases, comparando-o com matrizes funcionalizadas com ácido iminodiacético (IDA). Imobilizou-se cerca de  $45,25 \pm 0,56 \text{ mg.g}^{-1}$  de clorofila presente em extrato de folhas de espinafre na superfície das matrizes produzidas. A imobilização dos ligantes foi confirmada a partir das análises de DRX que demonstraram para o criogel ativado com clorofila uma estrutura cristalina, FTIR apresentaram vibrações em regiões associadas aos compostos inseridos durante a funcionalização, TGA com eventos exotérmicos em temperaturas entre  $460 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  atribuídos a degradação dos agentes quelantes e imagens de MEV que comprovaram a estrutura macroporosa. Os criogéis foram funcionalizados com diferentes íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ) e avaliadas as condições de adsorção de bromelina em função do tipo de íon metálico, pH e concentração de NaCl. O pH e a concentração de sal influenciam na capacidade de adsorção de bromelina, a depender do íon imobilizado na matriz. As matrizes imobilizadas com íons de cobre apresentaram maior capacidade de adsorção ( $46,95 \pm 2,91$  para CLO e  $45,88 \pm 2,95 \text{ mg.g}^{-1}$  para IDA). Os criogéis apresentaram características promissoras para a purificação em colunas, como porosidade de cerca de 85%, baixa dispersão axial ( $6,58 \cdot 10^{-8}$  a  $1,52 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) e baixa resistência ao fluxo ( $K_w = 1,69 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ ) para um leito de 6,6 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro, além de estabilidade ao longo de 7 ciclos de uso, mantendo cerca de 87% da capacidade adsortiva inicial. Por fim, foi aplicado com êxito na purificação parcial da bromelina obtida do abacaxi, com um fator de purificação igual a 2,44 para os produtos eluidos com tampão imidazol e 3,21 para eluição com tampão acetato de sódio acrescido de cloreto de sódio (NaCl), enquanto, que para o extrato previamente precipitado obteve-se fatores 3,09 e 4,23 para os eluidos com tampão imidazol, e tampão acetato + NaCl, respectivamente,

e rendimentos não superior a 23%. Ao realizar a purificação em leito monolítico, obteve-se um produto com fator de purificação superior a seis, conseguindo separar diferentes formas da protease em apenas uma etapa cromatográfica. A clorofila é um quelante em potencial para a funcionalização dessas matrizes, visando a sua aplicação na purificação de proteases por cromatografia IMAC. Mais estudos são demandados a fim de aumentar o rendimento da enzima obtida.

**Palavras Chave:** Criogel, afinidade, separação, proteases, imobilização metais.

---

\* Orientador (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## **ABSTRACT**

**PORFIRIO, M.C.P. Use of chlorophyll as a chelating agent for the development of macroporous matrices for purification of bromelain by IMAC affinity.** Itapetinga – BA: UESB, 2020. 172 p. (Defense Exam - Doctorate in Food Engineering and Science).\*

Proteases such as bromelain can be applied in several segments of the industry and immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is a technique considered effective for the purification of these enzymes. Chlorophyll is a potential chelating agent because it contains magnesium chelate in its structure, in addition to being easily extracted from plant leaves, which can reduce matrix costs (IMAC). Macroporous cryogels are a good alternative matrix for the purification of macromolecules, due to their high porosity, allowing the use of unclarified solutions. In view of the above, the objective of this work was to develop a new macroporous adsorbent (cryogel) of affinity for metal ions functionalized with chlorophyll from plant sources (CLO), aimed at the purification of proteases, comparing it with matrices functionalized with iminodiacetic acid (IDA). About  $45.25 \pm 0.56 \text{ mg.g}^{-1}$  of chlorophyll present in spinach leaf extract was immobilized on the surface of the produced matrices. The immobilization of the ligands was confirmed from the XRD analyzes that showed a crystalline structure for the cryogel activated with chlorophyll, FTIR showed vibrations in regions associated with the inserted compounds during functionalization, TGA with exothermic events at temperatures between  $460 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  assigned the degradation of chelating agents and SEM images that confirmed the macroporous structure. The cryogels were functionalized with different metal ions ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ) and the bromelain adsorption conditions as a function of the type of metal ion, pH and NaCl concentration were evaluated. The pH and salt concentration influence the adsorption capacity of bromelain, depending on the ion immobilized in the matrix.

Matrices immobilized with copper ions showed higher adsorption capacity ( $46.95 \pm 2.91$  for CLO and  $45.88 \pm 2.95 \text{ mg.g}^{-1}$  for IDA). The cryogels showed promising characteristics for column purification, such as porosity of about 85%, low axial dispersion ( $6.58 \cdot 10^{-8}$  to  $1.52 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) and low flow resistance ( $K_w = 1,69 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ ) for a bed 6.6 cm high and 2.2 cm in diameter, in addition to stability over 7 cycles of use, maintaining about 87% of the initial adsorptive capacity. Finally, it was successfully applied in the partial purification of bromelain obtained from pineapple, with a purification factor equal to 2.44 for products eluted with imidazole buffer and 3.21 for elution with sodium acetate buffer plus sodium chloride (NaCl), while for the previously precipitated extract factors 3.09 and 4.23 were obtained for the eluates with imidazole buffer and acetate buffer + NaCl, respectively, and yields not exceeding 23%. When performing the purification in a monolithic bed, a product with a purification factor greater than six was obtained, managing to separate different forms of the protease in just one chromatographic step. Chlorophyll is a potential chelator for the functionalization of these matrices, aiming its application in the purification of proteases by IMAC chromatography. More studies are required in order to increase the yield of the enzyme obtained.

**Keywords:** Cryogen, affinity, separation, proteases, immobilization metals

---

\* Orientador (a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

## 1.INTRODUÇÃO GERAL

As proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, se referem a um grupo de enzimas que atuam na hidrólise de proteínas, clivando ligações peptídicas. São encontradas naturalmente em diversos organismos animais, vegetais e microbianos, sendo algumas delas produzidas de forma heteróloga a partir de sistemas recombinantes (Fernadèz-lucas et al., 2017; Alici e Arabi, 2018). Comercialmente são aplicadas em diversos segmentos industriais, estando entre os três grupos de enzimas mais comercializadas mundialmente (Manjrekar et al., 2021). Entre as diversas proteases obtidas de fontes vegetais já identificadas, está a bromelina, obtida do abacaxi, pertencente à classe das cisteino-proteases, possuindo em geral um sítio catalítico histidina-cisteína (Damodaran et al., 2018).

A bromelina (3.4.22) é uma enzima de ampla importância econômica devido às suas diversas aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética, alimentícia e têxtil, além de apresentar propriedades anti-inflamatória, anticoagulante, antitumorais e antiedêmica (Wang et al., 2018; Nwagu e Ugwodo, 2019). No entanto, comercialmente possui custo elevado, devido aos dispêndios operacionais de obtenção e purificação dessa biomolécula (Han et al., 2019a). O processo de produção de enzimas consiste em diversas etapas, passando pela extração até a obtenção do produto em pó. Os processos de purificação, geralmente, constituem uma porcentagem significativa do custo total de produção, especialmente quando se deseja alto grau de pureza. A utilização da cromatografia é uma estratégia para eliminar algumas etapas, aumentando o rendimento e reduzindo os custos do processo (Ramli et al., 2017).

A cromatografia de alta pressão é uma das técnicas mais eficientes para separação e concentração de proteases. Dentre elas, está a cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC), que se baseia na interação entre um íon metálico imobilizado e grupos doadores de elétrons, como a histidina e a cisteína, localizadas na superfície das proteínas (Han et al., 2019a; Han et al., 2019b). No entanto, a utilização de soluções contendo material particulado, pode provocar a obstrução dos poros dos adsorventes de leito fixo tradicionalmente utilizados, pois esse material aumenta a resistência ao escoamento da coluna, o que dificulta a produção em larga escala (Han et al., 2019a).

Neste contexto, colunas monolíticas poliméricas supermacroporosas têm sido desenvolvidas, com destaque para os criogéis, que possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento e permitindo o uso de soluções mais viscosas. Essa característica traz consigo uma redução nos custos operacionais, pois elimina etapas de preparo das amostras, como a filtração, centrifugação e precipitação

(Kartal e Denizli, 2020). Visando aperfeiçoar a utilização dos monólitos poliméricos como matrizes cromatográficas para purificação de biomoléculas, são realizadas modificações em sua estrutura, através da inclusão de braços espaçadores nos radicais epóxi, para evitar impedimentos estéricos na adsorção de moléculas, e a imobilização de ligantes de afinidade, aumentando a especificidade e capacidade de purificação (Silva et al., 2019).

No caso da cromatografia IMAC, um agente quelante, como por exemplo o ácido iminodiacético, é utilizado para a imobilização de íons metálicos na superfície dos adsorventes, e assim, as macromoléculas marcadas por essa afinidade podem ser separadas das matérias primas brutas de uma maneira altamente específica e num único passo (Shi et al., 2019). Além do desenvolvimento de suportes cromatográficos modernos, outra área em crescimento é a de identificação de novos agentes quelantes (Riguero et al., 2020). Neste sentido, a clorofila pode ser um ligante em potencial, visto que possui o quelato de magnésio presente em sua estrutura. Além disso, para atenuar os processos de degradação do pigmento, outros íons metálicos podem complexar com a clorofila, substituindo os íons de  $Mg^{+2}$ , formando complexos metal-clorofila, que são mais estáveis a mudanças de pH, temperatura e luz (Kang et al., 2018). Portanto, essas características indicam a possível utilização desse pigmento como ligante quelante na funcionalização de adsorventes, podendo reduzir os custos de separação e purificação de biomoléculas.

Diante do exposto, esse trabalho tem como proposta inovadora e pioneira o desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos funcionalizados com clorofila extraída de fontes vegetais, voltados para a purificação de proteases por técnica de cromatografia de afinidade por imobilização de íons metálicos.

Para isso, o trabalho foi dividido em três capítulos, sendo que neste primeiro é apresentado o referencial teórico utilizado como base para a execução da pesquisa, e os objetivos norteadores do presente estudo.

No segundo capítulo, o qual já foi tramitado o pedido para depósito de uma patente de invenção junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o registro BR 10 2021 009055 3 (pedido em anexo), é apresentado o desenvolvimento da matriz macroporosa (criogel) e sua funcionalização para o uso em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, através da aplicação da clorofila como agente quelante, sendo também avaliados os aspectos físicos e químicos dos suportes poliméricos produzidos, imobilização de diferentes metais, condições de adsorção (pH e concentração de sal) e o potencial de aplicação na adsorção da bromelina.

Por fim, o terceiro capítulo é dedicado à utilização dos adsorventes poliméricos desenvolvidos para processos de purificação das proteases, no caso, a bromelina presente na polpa do abacaxi, sendo avaliados a atividade enzimática, pureza e rendimento na purificação.

## 2. REFERÊNCIAS

ALICI, E.H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.

BANERJEE, S.; ARORA, A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PATTI, A.F. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318-326, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

HAN, J.; WANG, L.; WANG, L.; LI, C.; MAO, Y.; WANG, Y. Fabrication of a core-shell-shell magnetic polymeric microsphere with excellent performance for separation and purification of bromelain. **Food Chemistry**, v. 283, p.1-10, 2019a.

HAN, L.; WANG, L.; WANG, Y.; CAI, Y.; MAO, Y.; NIE, L.; XIE, X.; Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 253-262, 2019b.

KANG, Y.R.; PARK, J.; JUNG, S.K.; CHANG, Y.H. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943-950, 2018.

KARTAL, F.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted cryogel beads for cholesterol removal from milk samples. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 190, 2020.

MANJREKAR S., WADEKAR T., SUMANT O. Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027, março 2021. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em janeiro, 2022.

NWAGU, T.N.; UGWUODO, C.J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 406-414, 2019.

RAMLI, A.N.M.; AZNAN, T.N.T.; ILLIAS, R.M. Bromelain: From production to commercialization. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed. 5, v. 97, 2017.

RIGUERO, V.; CLIFFORD, R.; DAWLEY, M.; DICKSON, M.; GASTFRIEND, B.; THOMPSON, C.; WANG, S-C.; O'CONNOR, E. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1629, 2020.

SHI, Y.; YAN, Z.; XU, T.; QU, R.; YUAN, J.; CAI, F.; WANG, Y.; WANG, X. An environmentally friendly deproteinization and decolorization method for polysaccharides of *Typha angustifolia* based on a metal ion-chelating resin adsorption. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 160-167, 2019.

SILVA, J.F. Da; SILVA, D.L. Da.; NASCIMENTO, R.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 49756, p. 1-9, 2019.

WANG, X.; HE, L.; WEI, B.; YANG, G.; WANG, J.; TANG, R. Bromelain- immobilized and lactobionic acid-modified chitosan nanoparticles for enhanced drug penetration in tumor tissues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 129-142, 2018.

## CAPITULO 1

---

*REFERENCIAL TEÓRICO*

*OBJETIVOS*

---

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. Enzimas proteolíticas

As proteases (também conhecidas como peptidases ou proteinases) abrangem uma variedade de enzimas que são capazes de hidrolisar ligações peptídicas covalentes, convertendo as moléculas de proteínas em peptídeos (fragmentos menores) e eventualmente em aminoácidos livres (Fernandéz-Lucas et al., 2017; Damodaran et al., 2018). Elas estão presentes em praticamente todos os organismos vivos (Tabela 1), de microrganismos (exceto alguns vírus) a plantas e animais, representando 2% do total de proteínas.

**Tabela 1-** Características de algumas proteases, animais, vegetais e microbianas

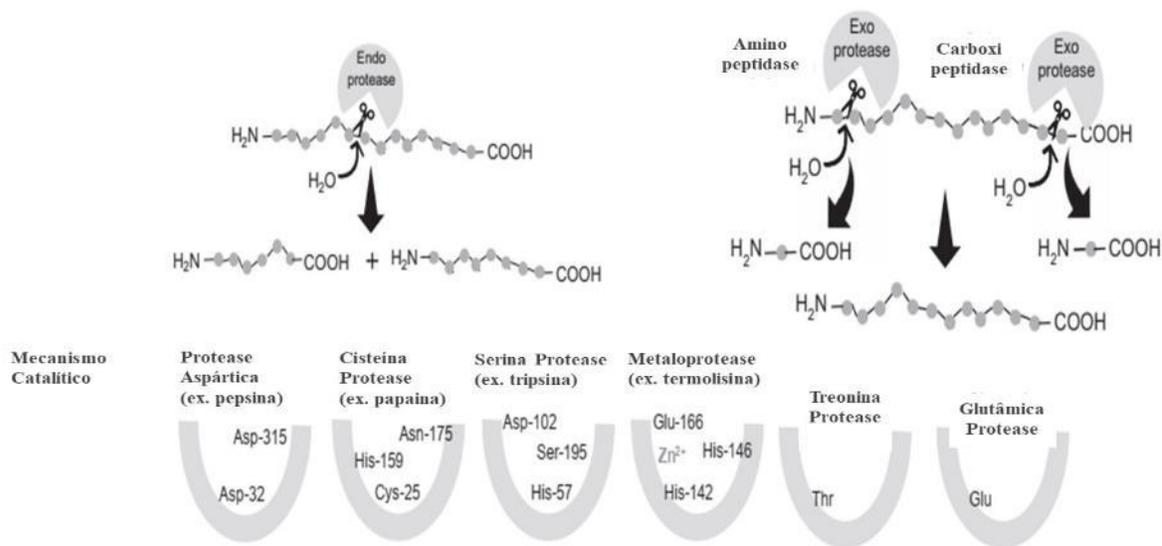
Enzima	Tipo	pH	Principal fonte
<i>Animal</i>			
Pepsina	Aspártica	1-4	Mucosa gástrica bovina de suína
Quimosina	Aspártica	3-6	Estômago de cabra, ovelha e cordeiro
Tripsina	Serínica	6-9	Pâncreas bovino e suíno
Quimotripsina	Serínica	6-9	Pâncreas bovino e suíno
Elastase	Serínica	6-8	Pâncreas bovino e suíno
<i>Microbiana</i>			
Bacteriana neutra	Metalo	6-8	<i>Bacillus subtilis, Bacillus amyoliquefaciens</i>
Bacteriana neutra	Serínica	6-9	<i>Bacillus subtilis</i>
Bacteriana neutra	Serínica	7-10	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bacteriana alcalina	Metalo	7-9	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>
Bacteriana alcalina	Serínica	7-11	<i>Bacillus ssp.</i>
Fúngica ácida	Aspártica	2-5	<i>Aspergillus niger</i>
Fúngica ácida	Aspártica	4-6	<i>Rhizopus ssp</i>
Fúngica ácida	Aspártica	3-7	<i>Cryphonectria parasítica, Rhizomucor miehi</i>
Fúngica alcalina	Aspártica	6-9	<i>Aspergillus oryzae</i>
Fúngica alcalina	Metalo	6-9	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Planta</i>			
Ficcina	Cisteínica	5-8	Figo
Papaína	Cisteínica	5-9	Mamão
Bromelina	Cisteínica	5-8	Abacaxi

Fonte: Godfrey e West, 1996

Elas exercem diversas funções biológicas importantes, como ocultar os marcadores que direcionam proteínas para suas organelas específicas, retirar propéptidos de hormônios e receptores, no reciclo de aminoácidos para seu reaproveitamento, entre outros (Rawlings, 2013; Alici e Arabaci, 2018). Nos seres humanos, desempenham um papel importante na digestão de alimentos, cicatrização de feridas e coagulação sanguínea; e nos tecidos vegetais estão associadas aos processos de germinação e senescência (Chinnadurai et al., 2018; Jannat e Yang, 2018).

Em geral, a estrutura das proteases é constituída de dois subdomínios separados por um sítio ativo, formado por uma sequência de três a quatro resíduos de aminoácidos específicos, que constituem uma fenda. Tal sequência de resíduos culmina na especificidade de cada família de proteases, pois determina qual o tipo de resíduos de outras proteínas que irão “encontrar” na fenda para que haja interação e hidrólise da ligação peptídica (Rawlings, 2013).

Portanto, as proteases são classificadas de acordo com a reação em que atuam e as propriedades químicas do substrato. Elas pertencem ao grupo das hidrolases (classe 3) e a subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases), no qual são subdivididas em quatro subclasses. Aquelas que clivam as ligações no interior da cadeia polipeptídica são denominadas de endopeptidases (EC 3.4.21-29). As exopeptidases atuam na extremidade da cadeia de polipeptídeos (EC 3.4.11-19), as que atuam na região C-terminal da proteína são denominadas carboxipeptidases e as que atuam na região N-terminal são classificadas como aminopeptidases, como observado na Figura 1 (Gurumallesh et al. 2019).



**Figura 1-** Mecanismo de ação das endopeptidases e exopeptidases.

Fonte: Adaptada de Fernandes et al., 2018

A especificidade das proteases não se relaciona apenas à posição da ligação peptídica ou ao tamanho da cadeia de resíduos dos aminoácidos, existindo também seletividade em relação à cadeia de aminoácidos vizinhas à ligação. Com isso, as endopeptidases e as carboxipeptidases podem ser classificadas de acordo com a estrutura química associada ao seu sítio catalítico (Gurumallesh et al., 2019).

Nesse sentido, quatro classes são as mais conhecidas: serina proteases, que possuem um resíduo de serina ativado no seu sítio ativo; cisteína proteases, que apresentam um resíduo de cisteína ativado no seu sítio ativo; metaloproteases, que possuem um íon metálico responsável pela catálise; aspártica protease, que apresenta duas unidades de ácido aspártico ativo no seu centro catalítico (Sharma et al., 2017; Harish e Uppuluri, 2018; Gurumallesh et al., 2019). No entanto, outras classes são conhecidas, embora apresentem menor importância comercial, como as treoninas proteases e glutamyl proteases (Rawlings, 2013; Fernandes et al., 2018). As diferentes classificações das proteases estão evidenciadas na Tabela 1.

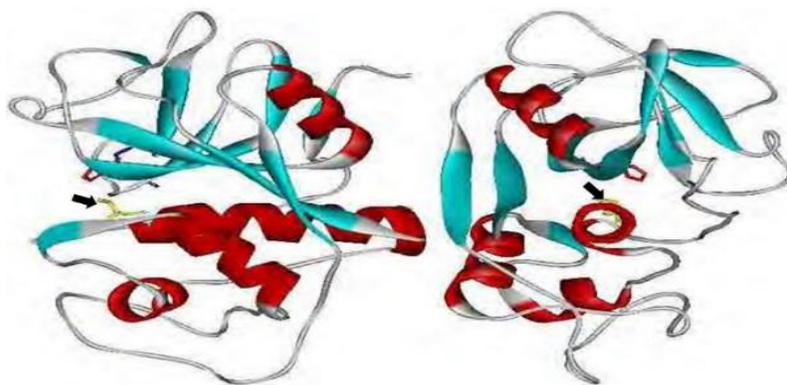
Comercialmente, as proteases encontram aplicação em diversos segmentos industriais, sendo usadas em formulações de detergentes, cosméticos e medicamentos, amaciamento de couros, biocombustível, alimentos e bebidas, tratamento de resíduos, entre outros (Fernández- Lucas et al, 2017). Elas correspondem a mais de 25% das biomoléculas produzidas para aplicação industrial e representam a segunda posição dentre os três grupos de enzimas mais comercializadas mundialmente devido a sua gama de especificidades de substrato, atividade em ampla faixa de pH e sua tolerância relativamente alta ao tratamento térmico (Arshad et al, 2014; Banerjee et al, 2020; Manjrekar et al., 2021). As proteases de origem microbiana são a de maior interesse industrial, pois são facilmente produzidas em larga escala em um curto período de tempo, requerem pequeno espaço para o cultivo e dispõem de uma variedade de estruturas químicas associadas ao sítio catalítico (Alici e Arabaci, 2018). Além disso, elas possuem um tempo de vida mais longo e podem ser armazenadas sob condições ideais sem perdas significativas da atividade (Nongonierna e Fitzgerald, 2016).

Apesar do uso das proteases vegetais ser limitado devido às restrições quanto a sua produção, como a baixa concentração de proteína entre vários contaminantes presente no extrato bruto, o que torna também o processo demorado, elas possuem propriedades indispensáveis do ponto de vista industrial, como a estabilidade a ampla faixa de pH e temperatura, além de serem estáveis na presença de aditivos e compostos orgânicos, possibilitando sua ampla aplicação em processos industriais (Alici e Arabaci, 2018).

Proteases vegetais, como bromelina, papaína e ficina já são muito utilizadas na indústria de alimentos, na fabricação de cervejas e bebidas, prevenindo a formação de turbidez; no amaciamento de carnes, onde promove a degradação das proteínas miofibrilares e do colágeno; na produção de hidrolisados proteicos para modificação de propriedades funcionais (solubilidade, capacidade emulsificante e espumante); em ovos desidratados; e destaque na fabricação de queijos, usadas como coagulante e para acelerar o processo de maturação (Arshad et al., 2016; Sun et al., 2016; Sharif et al., 2018; Afsharnejad, 2019; Alavi e Momen, 2020; Morellon-Sterling et al., 2020). Estudos ainda relatam a aplicação dessas proteases em cosméticos como ingredientes ativos que podem amenizar problemas de pele como rugas, acne e pele seca; farmacêuticas e no uso clínico, potencializando o efeito dos antibióticos, ações mucolíticas e gastrointestinais, agregação plaquetária, tratamento de câncer, modulação da replicação imune (Arshad et al., 2014; Novaes et al., 2016; Ramli et al, 2017).

## 1.2. Bromelina

A bromelina (Figura 2), faz parte do grupo das cisteíno proteases, e possui em geral um sítio catalítico com a díade histidina-cisteína complementada por um resíduo de asparagina, ácido aspártico ou glutâmico e consolidada nas etapas de clivagem intermediárias por um resíduo de glutamina, asparagina ou tirosina (Dutta e Bhattacharyya, 2013; Rawlings, 2013). A bromelina apresenta função semelhante à papaína e à ficina e a sua atividade enzimática depende do grupo tiol do resíduo de cisteína presente no seu sítio ativo (Amid et al., 2011).



**Figura 2** – Estrutura terciária da bromelina do talo. Os resíduos em destaque são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho), Lys-174 (azul).

Fonte: Cabral, 2005

Bromelina é a denominação dada a uma enzima proteolítica presente em tecidos de plantas da família *Bromeliaceae*, entre as quais o abacaxi (*Ananas cosmosus*) é a fonte mais conhecida (Costa et al., 2014; Novaes et al., 2016). Embora as bromelinas comercialmente disponíveis sejam extraídas do caule e do fruto do abacaxi, estudos relatam que elas podem ser obtidas de partes não comestíveis, consideradas subprodutos agroindustriais, como a casca, a coroa e as folhas (Nor et al., 2016; Nwagu e Ugwodo, 2019).

Misran et al. (2019) ao estudarem as propriedades do extrato de bromelina de diferentes partes do abacaxi, verificaram que os extratos da casca, coroa e folhas apresentam atividade enzimática relevante, com destaque para a enzima obtida da casca que apresentou resultados de concentração similares a bromelina extraída da polpa do fruto. Concluíram que apesar da enzima extraída da polpa apresentar atividade um pouco superior, a casca é proporcionalmente mais desperdiçada e parece ter maior potencial de extração da bromelina. Devakate et al. (2009) observaram que a bromelina extraída da polpa do fruto e purificada por cromatografia apresentou 2,8 vezes mais pureza do que a bromelina comercial (extraída do caule). Han et al. (2020) ao avaliarem o processo de purificação da bromelina extraída da casca do abacaxi, constataram que o processo é viável e que o produto obtido pode ser aplicado em escala industrial. Os estudos demonstram que as cascas, que representam 30% dos resíduos do abacaxi, podem ser uma boa fonte de bromelina.

O abacaxi, além da bromelina contém enzimas como, glicosidases, peroxidases, ribonucleases e cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  que atuam como cofatores nas funções das enzimas relatadas (Godoi, 2007). Portanto, a bromelina (EC 3.4.22) como extrato bruto do abacaxi, é uma mistura de diferentes tipos endopeptidases e outros componentes como glicosidases, fosfatases, celulasas, peroxidases, glicoproteínas, carboidratos e vários inibidores de proteases (Ramli et al., 2018; Nwagu e Ugwodo, 2019). Compreendem o grupo de enzimas que apresentam massa de 24-35 kDa, têm atividade ótima em pH 6,0-7,5 e podem suportar temperaturas de até 60-80 °C (Damodaran et al., 2018). Dentre esse conjunto de proteases, a bromelina extraída da polpa (EC 3.4.22.33) possui ponto isoelétrico (pI) igual a 4,6 e massa molar igual a 21 kDa e é a principal protease existente nele, tendo sido identificada antes da bromelina do caule (BC). Já a bromelina do caule (EC 3.4.22. 32) possui massa molar em torno de 25 kDa e ponto isoelétrico igual a 9,5 e é formada por uma única cadeia polipeptídica constituída por 212 aminoácidos em duplo domínio estabilizado por diversas ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto (Novaes et al., 2016; Ataide et al., 2018).

A bromelina do fruto possui maior atividade catalítica que a BC, no entanto a bromelina extraída do caule apresenta maior aplicação comercial, por ser mais fácil de obter na forma de extrato (Bresolin et al., 2013). A bromelina do caule também é muito estável o que permite que a enzima mantenha sua atividade entre 40 a 60 °C, na qual a maioria das enzimas é desnaturada (Coelho et al., 2014).

A bromelina é uma das proteases que requerem cofatores para expressar sua ação catalítica e aumentar a atividade enzimática. Os íons metálicos são importantes cofatores pois ativam a reação enzimática e os cátions divalentes como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  dentre outros são alguns dos cofatores demandado pelas proteases (Saranya et al., 2015).

Essa enzima possui aplicação em diversas áreas industriais, com utilização principalmente na indústria farmacêutica, dados seus efeitos em condições inflamatórias e em várias outras doenças como angina, indigestão e disfunções respiratórias (Wang et al., 2018). Devido às diversas aplicações industriais, o desenvolvimento de técnicas efetivas e economicamente viáveis para a extração e purificação da bromelina com elevado rendimento e grau de pureza é de grande interesse científico e industrial (Han et al., 2019)

### **1.2.1. Aplicações da Bromelina**

A bromelina possui diversas aplicações, todas baseadas em sua atividade proteolítica. A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, utilização na indústria alimentícia e indústria têxtil, (Nwagu e Ugwuodo, 2019).

Na indústria alimentícia a bromelina tem sido aplicada no amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, panificação, produção de hidrolisados proteicos e como suplemento (Novaes et al., 2016). Zhao et al. (2020) relataram que a bromelina, além de melhorar a maciez da carne bovina, auxilia no processo de digestão desse alimento pelo organismo, atuando como uma “pré-digestão”. A adição de bromelina também pode produzir um efeito amaciador sobre a miosina e outras proteínas miofibrilares da linguiça e outros produtos cárneos (Arshad et al., 2014). Junhui et al. (2020) verificaram que a bromelina pode ser utilizada para a tenderização da carne de lula, que apresenta um músculo rígido e resistente, o que afeta diretamente a aceitação do consumidor. Na indústria de panificação, a bromelina melhora o relaxamento da massa, aumentando a solubilidade e impedindo o encolhimento da massa, o que permite que a massa cresça

uniformemente durante o processo de forneamento. A bromelina também tem sido utilizada para produzir farinha hipoalergênica, adequada para pacientes alérgicos a trigo (Holyavka et al., 2021).

A bromelina também é útil na indústria de bebidas, como na produção de vinhos, pois evita a formação de precipitados de proteínas indesejados após o engarrafamento (Novaes et al., 2016). Benucci et al. (2011) e Esti et al. (2015), demonstraram que essa enzima é capaz de estabilizar proteínas presente no vinho.

Esta enzima também é utilizada na indústria cosmética e de higiene como ingrediente ativo de dentifrícios no clareamento dental e produtos para a pele, tratamento de rugas, acne e pele seca (Chakravarthy e Archarya, 2012; Arshad et al, 2014; Ramli et al., 2017). É utilizada como agente de limpeza (Chaurasiya e Hebbar, 2013), e como ingrediente ativo para proporcionar efeitos de *peeling* (Bala et al., 2013).

A bromelina é amplamente aplicada na indústria farmacêutica, como ativo para o tratamento de distúrbios intestinais, doenças relacionadas com a coagulação sanguínea, e doenças inflamatórias (Nor et al., 2015; Novaes et al., 2016; Ramli et al., 2017, Liu et al., 2019), como agente fibrinolítico (Chaurasiya e Hebbar, 2013; Ramli et al., 2017), imunogenicidade (Sharma e Brajbhushan, 2015; Novaes et al., 2016; Ramli et al., 2017), tratamento periodontal (Shoba et al., 2020), tratamento para queimaduras (Bernela et al., 2016; Ferancikova et al., 2020; Hirche et al., 2020), curativos e cicatrização de feridas (Bayat et al., 2019; Chen et al., 2020), ação micolítica (Costa et al., 2014) e aplicação terapêutica de anticorpos (Tap et al., 2016).

Na indústria têxtil é incorporada ao processamento de couro (Wu et al., 2017). Nesse segmento, também é utilizada para melhorar a qualidade de tingimento de fibras proteicas, como seda e lã (Arshad et al., 2014; Ramli et al., 2017).

A bromelina é uma biomolécula de grande interesse industrial e clínico, com diversas aplicações, porém o processo de produção ainda é oneroso, e com isso amplia-se o interesse em determinar métodos viáveis de extração e purificação dessa enzima.

### **1.2.2. Processos de extração e purificação**

A obtenção da bromelina comercial envolve várias etapas, que iniciam com a extração, purificação até obter o produto em pó (Nor et al., 2015; Ramli et al., 2017). Levando-se em consideração os aspectos técnicos e econômicos, geralmente, os processos de isolamento e purificação representam maior porcentagem dos custos totais de produção, principalmente quando se deseja alto grau de pureza (Ramli et al., 2017). Com isso, o desenvolvimento de métodos

simples, eficientes, econômicos, biocompatíveis, rápidos e de alto rendimento para a purificação de proteínas tem sido pré-requisito essencial para muitos avanços na biotecnologia (Han et al., 2019b; Han et al. 2020).

A bromelina comercial é encontrada com diferentes níveis de pureza, a depender da finalidade de aplicação, seja para indústrias alimentícias, farmacêuticas ou terapêuticas, sendo obtida tanto associadas a outras enzimas na mesma formulação, quanto com elevado teor de pureza (Lopes et al., 2010; Miranda et al., 2016). Em geral, os processos convencionais para isolamento da bromelina são etapas de pré-purificação, incluindo filtração e centrifugação ou precipitação com acetona e sulfato de amônio a depender do grau de pureza desejado, visto que a maioria das aplicações industriais não requerem elevado nível de pureza. Quando é necessária uma enzima com alta pureza, com por exemplo, em aplicações medicinais (antibióticos, e outros medicamento orais), uma sequência de etapas cromatográficas, ultrafiltração e liofilização são acrescentados no processo de purificação (Han et al., 2020). Entretanto, em cada etapa do processo de produção perde-se atividade enzimática e, portanto, a sequência de métodos apresenta algumas desvantagens como baixa recuperação de atividade, e o aumento dos custos (Wiltschi et al., 2020).

A centrifugação é utilizada para melhorar a homogeneidade da solução, rompendo parcialmente as células do vegetal, liberando enzimas intracelulares, como por exemplo na utilização do abacaxi como fonte de bromelina, porém essa etapa consegue apenas produzir uma fração bruta, que pode conter impurezas adicionais (Ramli et al., 2017). A etapa de precipitação é eficiente para remover alguns contaminantes, gerando agregados de moléculas proteicas de elevada concentração, envolvem equipamentos simples e são fáceis de escalonar (Arshad et al., 2014). Por outro lado, o principal problema desses métodos é o uso de altas concentrações de sais inorgânicos ou solventes orgânicos, o que implica em etapas adicionais de purificação e recuperação da proteína; além disso esse processo apresenta baixo rendimento de extração, bem como perda de atividade de enzimas (Campos et al., 2019). Já a etapa de ultrafiltração é o método mais eficaz para concentrar proteínas e tem sido amplamente utilizada em escalas comerciais. Algumas desvantagens da ultrafiltração é o longo tempo de processo e formação de incrustação. Os polissacarídeos (açúcares) no extrato de abacaxi, afetam o desempenho da membrana devido à aglomeração desses polímeros com proteínas sob diferentes condições físico-químicas, levando a incrustação e declínio do fluxo (Abreu e Figueiredo, 2019).

Nos processos de isolamento de proteínas pode ser complexo e dispendioso separar uma enzima específica de um extrato bruto que apresente baixos níveis de concentração de proteína

entre os vários contaminantes, além da similaridade das propriedades físicas entre as enzimas constituintes da solução (Abreu e Figueiredo, 2019). Com isso, técnicas mais modernas que visam reduzir os custos e o número de etapas no processamento tem recebido atenção, tais como extração aquosa em duas fases (Wu et al., 2017; Wang et al., 2019; Han et al., 2020), troca iônica (Costa et al., 2014), sistemas micelares reversas (Wan et al., 2016; Guo et al., 2018), filtração em gel (Wan et al. 2016), adsorção (Xu et al., 2018; Han et al., 2019a; Han et al., 2019b) e cromatografia de afinidade (Wan et al., 2016; Fang et al., 2018).

O uso de cromatografia para purificação de bromelina é uma boa estratégia, devido a sua elevada especificidade e alto grau de recuperação da molécula, sem que as mesmas percam suas características essenciais, aumentando os rendimentos, e assim, melhorando a economia do processo. Devido a isso, a utilização de técnicas cromatográficas vem sendo discutidas (Uygun et al., 2015; Gonçalves et al., 2017; Ramli et al., 2017; Han et al., 2019a, Zhou et al., 2020).

O estudo sobre tecnologias de purificação e extração alternativos, são de grande interesse, visando sempre obter processos economicamente viáveis (Han et al., 2019a). Neste cenário de estudo dos processos de purificação, novas metodologias cromatográficas de purificação são exigidas para reduzir o número de etapas envolvidas na produção, melhorar os rendimentos enzimáticos e o grau de pureza da bromelina purificada (Wu et al., 2017).

### **1.3. Purificação de biomoléculas por cromatografia**

As técnicas cromatográficas são os métodos mais empregados para a separação de biomoléculas, pois são considerados os procedimentos mais eficazes para a purificação. Essa técnica tem como objetivo isolar e purificar o metabólito de interesse em relação aos demais, adquirindo a pureza adequada para a aplicação a qual se destina (Lakka e Kuppan, 2019).

A separação cromatográfica é baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (líquida ou gasosa). Os fatores nesse processo incluem características moleculares relacionadas à adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-sólido) ou diferenças entre suas massas moleculares. O tipo de interação entre a fase estacionária, a fase móvel e as substâncias contidas na mistura são o componente básico para a separação das biomoléculas (Coskun, 2016).

Para procedimentos de purificação, sejam para fins alimentícios ou farmacêuticos, as técnicas cromatográficas, como troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade, exercem um papel

importante e estão em constante desenvolvimento. São métodos de adsorção, que tem como objetivo isolar biomoléculas presentes em fluidos, através da adsorção dessas na superfície de alguns sólidos (Nascimento et al., 2014). As forças atrativas presentes na superfície dos sólidos utilizados para o processo de adsorção, irão reter os compostos de interesse presentes na solução fluida. Esta técnica se destaca pelo seu alto grau de recuperação das substâncias adsorvidas e especificidade para processos de separação de biomoléculas (Fontan et al., 2016).

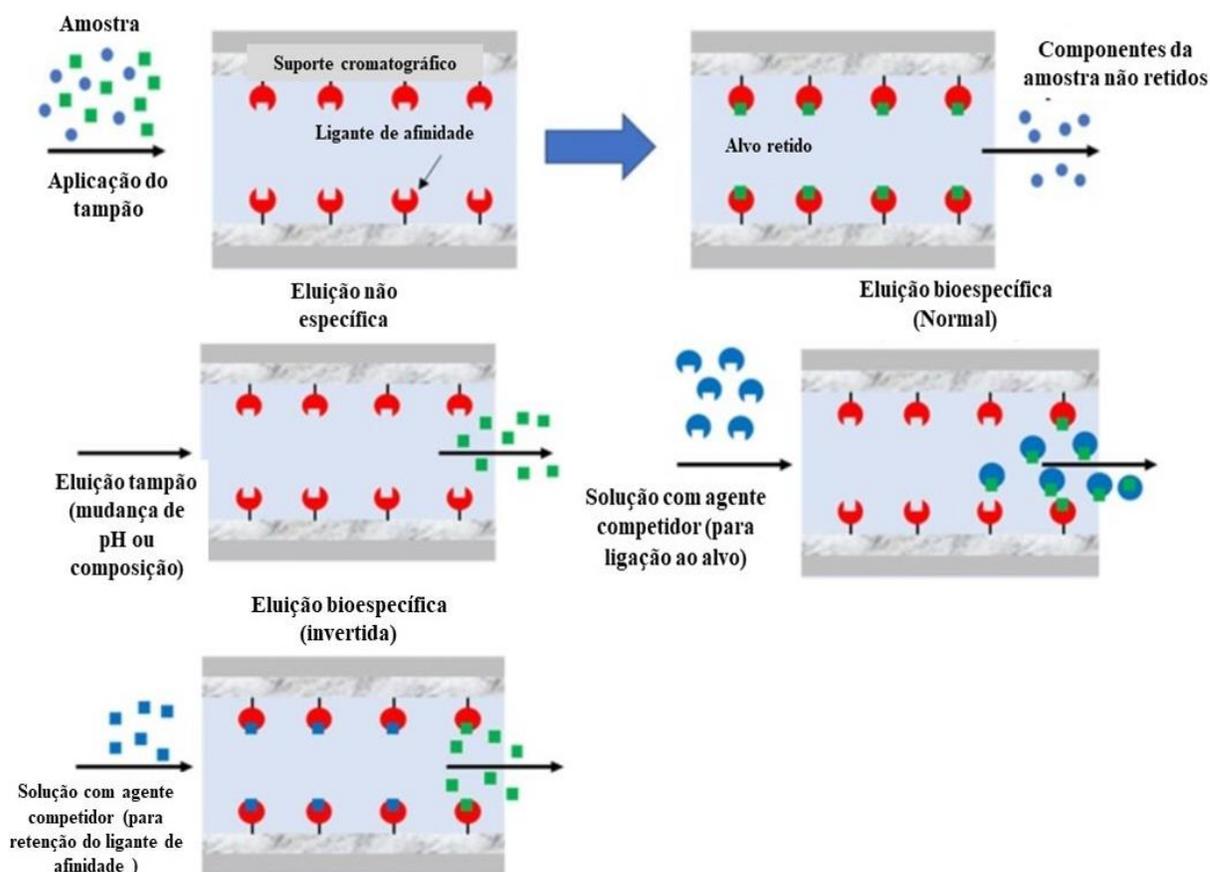
Entre os diferentes métodos cromatográficos existentes, a cromatografia de afinidade apresenta destaque em função da sua capacidade e seletividade de separação. A cromatografia de afinidade é considerada um processo bem consolidado para identificação, separação e purificação de biomoléculas. É comumente usada para purificação de enzimas, anticorpos, hormônios, ácido nucléicos e proteínas específicas (Coskun, 2016; Liu et al., 2020). Esse método consiste em imobilizar um ligante na superfície de uma matriz que é colocada em contato com uma solução contendo a molécula alvo a ser adsorvida, permitindo que as interações ocorram (Coskun et al., 2016). Essa técnica apresenta diversas vantagens, como seleção de características, alta estabilidade, baixo custo e boa repetibilidade (Liu et al., 2020).

### **1.3.1. Cromatografia de Afinidade para purificação de enzimas**

A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia líquida que aproveita as ligações seletivas e reversíveis que ocorrem entre muitas interações (anticorpo-antígeno, enzima-substrato, enzima-inibidor, hormônio-receptor) para o isolamento e purificação de alvos específicos, garantindo maior seletividade (Rodriguez et al., 2020). Nesse método, um dos componentes dos pares dos materiais biológicos, é imobilizado em um suporte poroso, funcionando como um adsorvente seletivo (agente ligante) para a molécula complementar, obtendo eficiência nas biosseparações (Hage et al., 2017).

Os processos em cromatografia de afinidade consistem em percolar uma solução tampão contendo a amostra, sobre uma coluna com pares específicos de ligação, que são capazes de capturar e reter o alvo. O tampão de aplicação geralmente é similar ao pH e força iônica em que o ligante de afinidade está totalmente ativo e tem sua ligação mais forte ao alvo. Na presença do tampão de aplicação, a molécula de interesse é capturada, enquanto outros componentes da amostra são eluídos com pouca ou nenhuma ligação. Uma fase móvel em condições dessortivas é então passada pela coluna revertendo a ligação específica que havia sido formada (Pfaunmiller et al., 2016; Rodriguez et al., 2020).

Uma abordagem alternativa é a eluição bioespecífica, em que a fase móvel não é tão drasticamente alterada, sendo em geral empregada uma solução com alta concentração de ligante livres (agente competidor), ocorrendo assim, uma competição entre os ligantes imobilizados e os livres, o que irá reverter a interação entre ligante imobilizado e soluto-alvo, como apresentado na Figura 3. Na eluição bioespecífica, o processo de eluição é mais lento quando comparado à eluição não-específica, no entanto, tem a vantagem de causar menos alterações nas biomoléculas de interesse (Hage et al., 2017; Rodriguez et al., 2020).



**Figura 3-** Métodos de eluição da molécula alvo retida

Fonte: Adaptada de Rodriguez et al., 2020

Para a purificação de enzimas, a cromatografia de afinidade utiliza a capacidade de uma proteína de reconhecer e se conectar a ligantes naturais ou sintéticos (Perret e Boschetti, 2018). Os agentes de ligação naturais incluem enzimas, antígenos, anticorpos, lectinas, proteínas séricas, lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas de ligação à imunoglobulina. Enquanto, que os ligantes sintéticos incluem quelatos de íons metálicos, corantes, aptâmeros e boronatos (Rodriguez

et al., 2020). A aplicabilidade dessa técnica se deve ao fato de que toda biomolécula que se pretende purificar possui ao menos um local de reconhecimento que pode ser utilizado para a escolha do ligante apropriado. Portanto, o tipo de ligante a ser imobilizado é um ponto crítico na cromatografia de afinidade, visto que esse método não é de aplicações gerais e os ligantes devem ser selecionados especificamente (Perret e Boschetti, 2018).

A cromatografia com ligante corante é parte de uma ampla gama de métodos conhecidos como a cromatografia de afinidade. Essa técnica já foi utilizada para purificar proteínas como lisozima, lactoferrina e  $\alpha$ -quimiotripsina (Baieli et al., 2014; Zayed et al., 2016). O baixo custo, a facilidade de imobilização e a estabilidade tornam esses agentes de ligação tradicionais em separação por afinidade, especialmente para processos em larga escala (Rodríguez et al., 2020).

Os quelatos de íons metálicos, são outro exemplo importante de agentes de ligação. Essa combinação é a base da cromatografia IMAC, sendo essa técnica muito utilizada para purificação de enzimas proteolíticas, pois esses ligantes atuam complexando íons metálicos que interagem com os aminoácidos do analito alvo que pode atuar como grupos doadores de elétrons (cisteína, triptofano, histidina), visto que as proteases requerem íons metálicos como cofatores para expressar a sua ação catalítica. A alta durabilidade, seletividade para biomoléculas e purificação em larga escala tem feito com que a IMAC seja utilizada com sucesso na separação de proteínas, ácidos nucleicos e toxinas bacterianas (Acet et al., 2019; Rodríguez et al., 2020).

A cromatografia de afinidade, além de empregar diferentes agentes de ligação, também pode utilizar diferentes tipos de suportes de fase estacionária, como agarose, sílica, celulose e outros polímeros. Uma área em crescimento são os suportes monolíticos, em que têm sido empregados polímeros orgânicos, sílica, agarose e outros. Esses suportes oferecem várias vantagens sobre os suportes particulados tradicionais, incluem baixa compressão, alta permeabilidade e boa eficiência de separação (Arora et al., 2017; Li et al., 2017). Ao aperfeiçoar várias propriedades, como seletividade, especificidade, reprodutibilidade, química de conjugação e custo-benefício destes componentes, este método pode ser aplicado para purificação em larga escala para alcançar o rendimento e a pureza desejada do produto (Arora et al., 2017).

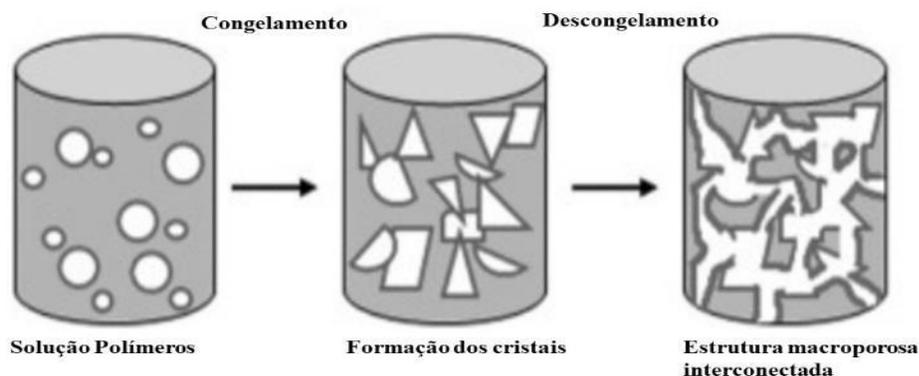
#### **1.4. Suportes monolíticos: criogéis poliméricos**

Apesar das técnicas de desenvolvimento dos processos cromatográficos para purificação de biomoléculas em escala industrial serem conhecidas, o uso de colunas empacotadas na cromatografia para separação de proteínas pode ser um desafio, pois as interações dessas moléculas

com a fase estacionária são complexas e às vezes irreversíveis e as estruturas biomoleculares grandes podem bloquear os poros das matrizes cromatográficas, tornando-as ineficazes (Lynch et al., 2019). Por esses motivos surge o interesse no desenvolvimento e uso de monólitos macroporosos na cromatografia (Li et al., 2017).

Os suportes monolíticos fornecem alternativas às colunas tradicionais, com potencial para aprimorar a separação de proteínas e enzimas através de uma combinação do aumento da permeabilidade, tolerância a impurezas das amostras e, possivelmente, melhor resolução (Lynch et al., 2019). Nesse sentido, os criogéis monolíticos estão entre o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas. Caracterizam-se por uma estrutura em corpo único e inseridos em um suporte cromatográfico, conhecidos como materiais cromatográficos de quarta geração (Yavuz e Denizli, 2015; Guan et al., 2018).

Os criogéis são um tipo de hidrogel com estrutura superporosa interconectada que fornecem características atrativas, como alta estabilidade mecânica e propriedades de flexibilidade em comparação com os hidrogéis tradicionais (Hixon et al., 2017). Os criogéis são materiais sintetizados em condições de congelamento, onde a polimerização ocorre a partir de uma mistura aquosa de precursores monoméricos; reticulador, iniciador e acelerador, a temperaturas abaixo de 0 °C (Figura 4).



**Figura 4** - Síntese dos criogéis

Fonte: Adaptado de Hixon et al., 2017

Os cristais de gelo atuam como agentes porogênicos, pois quando descongelados deixam espaços vazios entre as cadeias poliméricas formando poros com tamanhos que podem variar de 10 até 250  $\mu\text{m}$  (Hixon et al., 2017; Demirci, et al., 2020; Farías et al., 2020). Estes formam uma

rede macroporosa interligada que permite a passagem desobstruída de biomoléculas. Estas matrizes podem ser produzidas com variedade de formatos que incluem colunas, discos, membranas, capilares, microchips (Figura 5); além de possuírem baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas na cromatografia (Yavuz e Denizli, 2015; Baimenov et al., 2020).



**Figura 5-** Criogéis sintetizados em diferentes formas

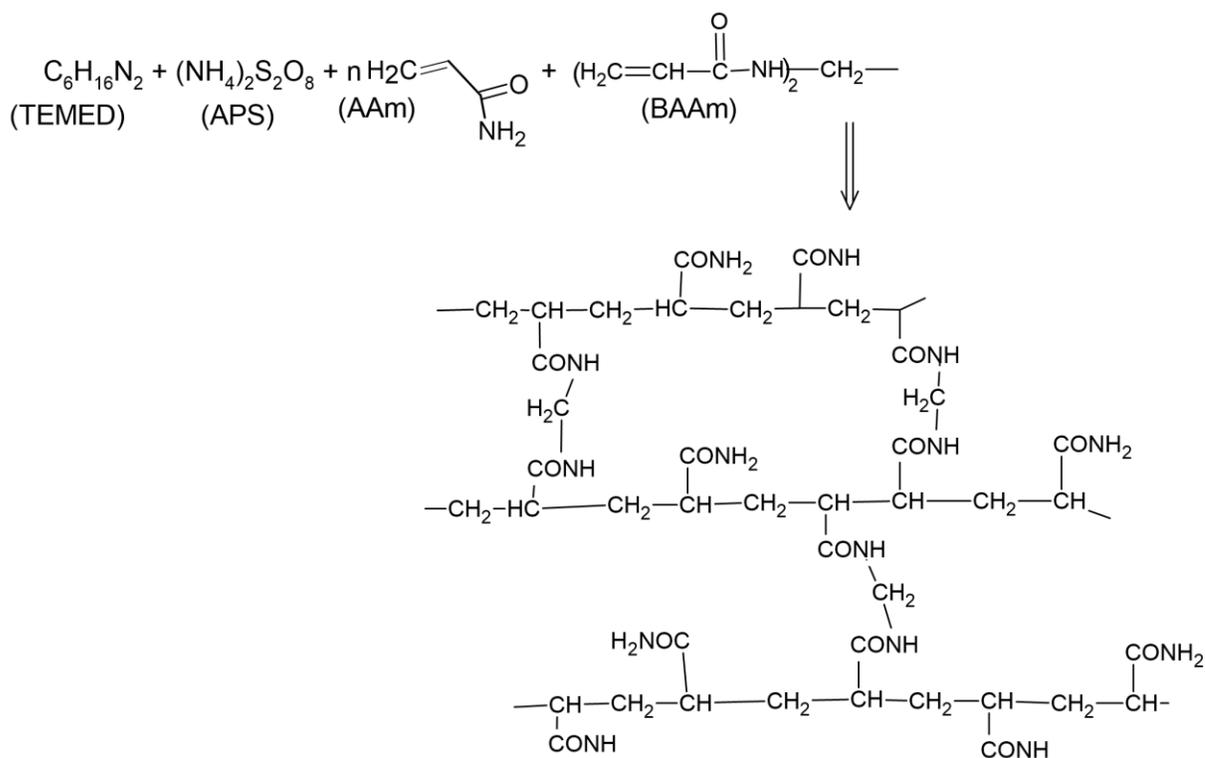
Fonte: Yavuz e Denizli (2015); Nascimento (2021).

A geleificação criotrópica permite a produção de criogéis com morfologias distintas. A concentração de monômero, o grau de reticulação, a temperatura e o tempo de congelamento têm efeito sobre a estrutura do monólito. Um maior grau de entrelaçamentos físico-químicos entre as cadeias poliméricas é evidenciado com o aumento da concentração de polímeros, havendo maior conectividade entre os poros, e conseqüentemente, diminuição do tamanho e da porosidade (Perçin et al., 2015). A taxa de congelamento influencia diretamente na estrutura do criogel, onde taxas mais lentas podem resultar em poros maiores com maior interconectividade. Em contraste, taxas de congelamento mais rápidas produzem criogéis mecanicamente mais fracos com um baixo nível de interconectividade. Isso pode ser devido ao alto resfriamento do solvente antes que os cristais de gelo comecem a se formar, produzindo poros pequenos e irregulares. Por isso, a síntese de criogel é geralmente realizada em temperaturas que variam entre -10 a -20 °C, de forma que a maior parte do solvente cristaliza e poros maiores são formados (Hixon et al., 2017).

Entre os possíveis polímeros empregados na síntese dessas matrizes, como o hidroxietilmetilacrilato (HEMA), o N-vinilcaprolactama (VCL), a N- isopropilacrilamida (NIPAm), o dimetracrilato de etilenoglicol (EGDMA) e o ácido acrilamido metilpropanossulfônico (AMPS), a acrilamida (Aam) se destaca (Jian et al., 2015) e tem sua utilização já reportada por

diversos autores (Fontan et al., 2017; Gonçalves et al., 2017; Deng et al., 2018; Nascimento et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Silva et al., 2019).

Os criogéis de poliacrilamida (pAAm) são obtidos a partir 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), juntamente com o persulfato de amônio (APS) e o N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED), que fornecem radicais livres para iniciar e acelerar, respectivamente, a reação de polimerização das moléculas de acrilamida, como mostrado no esquema reacional da Figura 6 (Carvalho et al., 2014).



**Figura 6-** Reação de formação das ligações cruzadas das cadeias de acrilamida

Fonte: Adaptado de Carvalho et al., 2014

Os criogéis poliméricos são caracterizados como esponjosos, elásticos, macios, de coloração opaca, além de apresentarem elevada porosidade, o que permite o uso de soluções mais concentradas contendo partículas. Além disso, a alta resistência química e mecânica e baixa resistência ao fluxo, conferem a esses monólitos características únicas para o uso em processos de biosseparação (Kartal e Denizli, 2020). Devido à crescente demanda de leitos monolíticos,

diferentes aplicações requerem acesso a novos tipos de criogéis com propriedades aprimoradas (Acet et al., 2019).

#### **1.4.1. Modificações nas superfícies dos criogéis poliméricos**

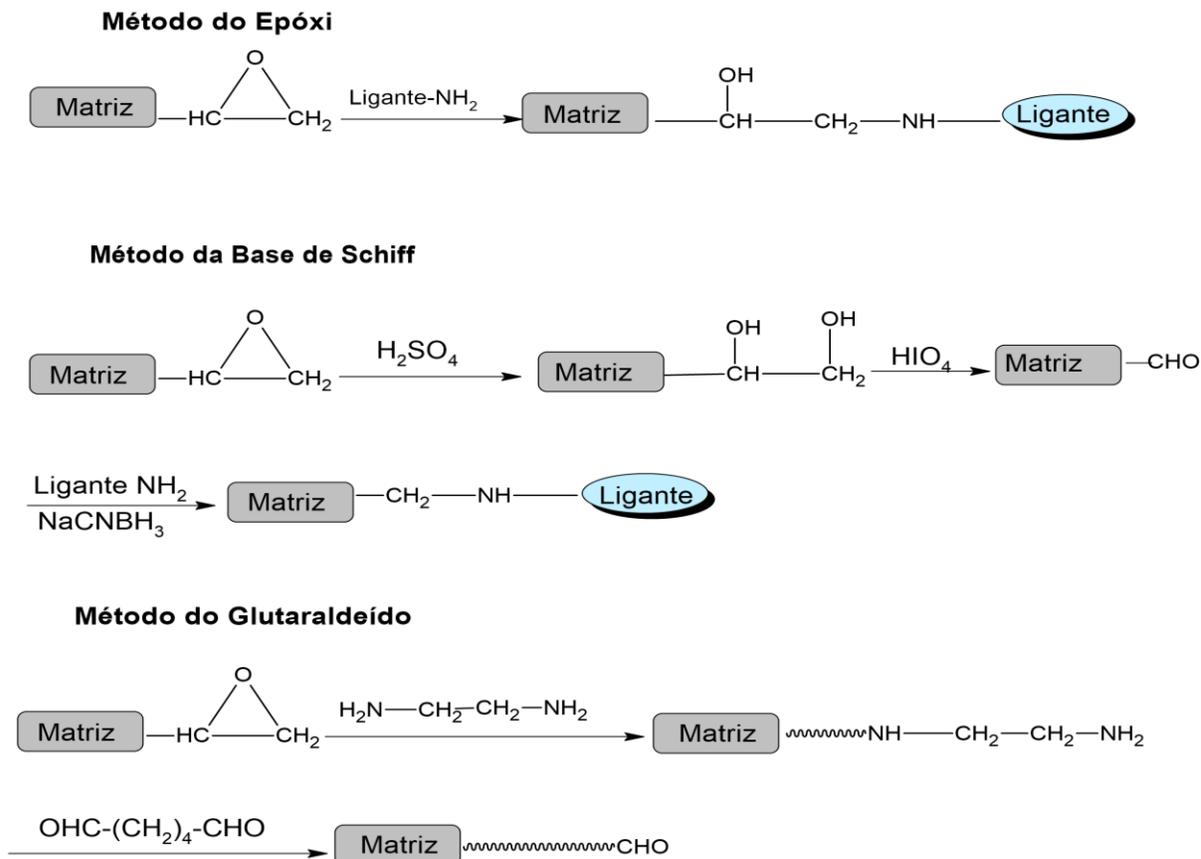
Uma ampla variedade de suportes monolíticos encontra-se à disposição para processos de purificação das mais diversas biomoléculas existentes. Porém, não há um que seja uma solução universal. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como matrizes de imobilização e purificação de biomoléculas, diversas metodologias de funcionalização desses suportes têm sido reportadas (Andaç et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Fontan et al., 2017; Nascimento et al., 2019; Farias et al., 2020).

A funcionalização consiste na introdução de grupos funcionais na superfície do polímero. Tal modificação pode ser realizada pela circulação de agentes reticulantes através do suporte polimérico ou pela imersão da matriz (geralmente para criogéis em forma de discos) em uma solução contendo agentes ligantes (Jian et al., 2015). As modificações estruturais do criogel podem ser químicas ou físicas. Na modificação química da superfície do material, grupos reativos como o radical epóxi, fornecido, por exemplo, pelo alil glicidil éter (AGE) ou glicidil meta acrilato (GMA), são introduzidos para permitir a ligação covalente entre o agente ativo funcional e o suporte cromatográfico, ou para melhorar propriedades como hidrofobicidade, pH ou temperatura de ativação. Além disso, os grupos epóxi são estáveis em valores de pH próximos ao neutro, o que permite o armazenamento dessas matrizes por um longo período (Uygun et al., 2015).

A inserção de novas estruturas químicas na superfície do criogel permite obter fases estacionárias que tenham relação mais específica com uma determinada proteína. Cada método de funcionalização apresenta uma diferente reação química para se atingir o máximo de imobilização da molécula de interesse (Yavuz e Denizli, 2015).

Os protocolos de funcionalização existentes utilizando ligações covalentes incluem os métodos epóxi, base de Schiff e glutaraldeído. O método epóxi envolve o ataque nucleofílico por radicais amina dos ligantes ao grupo epóxi presente no monólito, levando a formação de uma amina secundária estável (Figura 7a). A desvantagem desse método é que nenhum braço espaçador é inserido entre o suporte e a molécula ligante, o que pode resultar em uma menor capacidade de imobilização (Mallik et al., 2004; Gonçalves et al., 2016). No método da base de Schiff, os radicais epóxi são convertidos em grupo dióis, que são oxidados dando origem a grupos aldeídos que podem interagir com os radicais amina dos ligantes (Figura 7b). Esse método possui uma maior velocidade

de reação quando comparado ao epóxi, entretanto, apresenta como principal desvantagem a utilização de agentes redutores, que podem afetar o ligante imobilizado (Mallik e Hage, 2006; Gonçalves et al., 2016).



**Figura 7-** Métodos de imobilização de ligantes via ligação covalente para produção de suportes poliméricos de afinidade

Fonte: Adaptado de Mallik e Hage, 2006

No método do glutaraldeído, um adsorvente contendo grupos epóxi reativos (monólito epóxi-ativado) é inicialmente convertido na forma amina-ativada, por meio das reações do grupamento epóxi com reagentes contendo amina, como a etilenodiamina ou hexanodiamina (Figura 7c). O monólito amina-ativado reage então com o glutaraldeído, formando um monólito aldeído-ativado capaz de reagir com grupamento amina das moléculas ativas de interesse (Mallik e Hage, 2006; Gonçalves et al., 2016). Esse suporte é utilizado da mesma maneira que o produzido pelo método da base de Schiff. A principal vantagem desse método está na capacidade de formação de um longo braço espaçador entre o ligante e o criogel, evitando possíveis efeitos de impedimento

estérico, o que pode acarretar uma maior capacidade de imobilização do ligante e de adsorção da molécula alvo (Gonçalves et al., 2016).

Gonçalves et al. (2016) ao avaliarem a capacidade de imobilização do carboidrato N-acetil-D-Glucosamina em criogéis de poliacrilamida utilizando os métodos Epóxi, Base de Schiff e Glutaraldeído, comprovaram que o método do glutaraldeído apresentou maior capacidade de imobilização do que os demais, sendo assim utilizado para avaliar a imobilização de diferentes açúcares no monólito, visando a purificação de lectinas com diferentes especificidades por Gonçalves et al. (2017). Esse tipo de estudo, evidencia a utilização desse método para a imobilização de diferentes ligantes, aumentando a especificidade das matrizes, e possibilitando a aplicação em técnicas cromatográficas distintas.

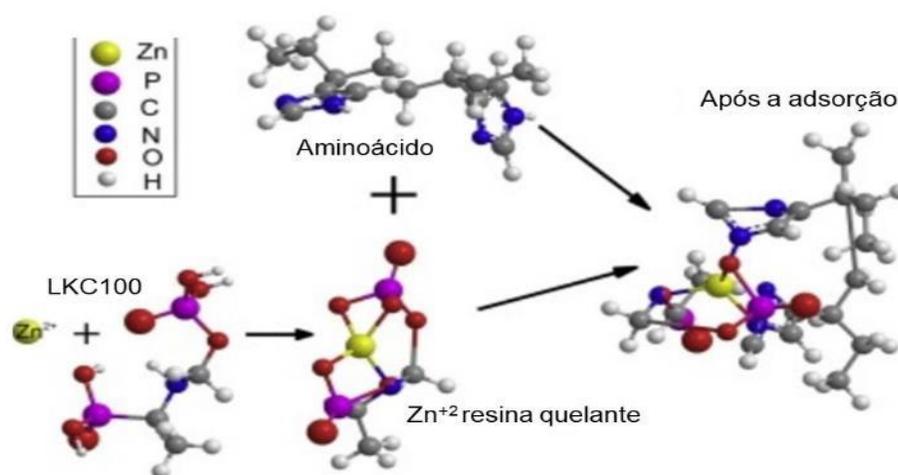
Os suportes de criogel ainda podem ser funcionalizados com a impregnação de diversos compostos de cadeia curta na parede dos poros do monólito, como o ácido húmico, o ácido acrílico, o ácido 3-mercaptopropano sulfônico, o dietil-aminoetanol, poli (metacrilato de carboxibetaína) e o ácido iminodiacético, de modo a melhorar o reconhecimento específico e a capacidade de adsorção de macromoléculas no criogel (Jian et al., 2015; Guven et al., 2018). O ácido iminodiacético é utilizado para a imobilização de íons metálicos na coluna cromatográfica, para ser aplicado na cromatografia IMAC. A cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados é uma técnica que aproveita interações coordenado-covalentes de analitos biomoleculares com íons metálicos quelatos. Através da imobilização dos íons metálicos na superfície dos adsorventes, as macromoléculas marcadas por essa afinidade podem ser separadas das matérias primas brutas de uma maneira específica e num único passo (Bibi et al., 2013).

### **1.5. Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC)**

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) foi descrita pela primeira vez por Porath et al. (1975), como uma das técnicas de separação de proteínas ou peptídeos. A partir de então, vários protocolos foram desenvolvidos e amplamente adotados para purificação de uma ampla gama de enzimas, tornando-se um procedimento fácil para separação de proteínas e uma ferramenta para determinar a acessibilidade superficial de resíduos de aminoácidos ou peptídeos, convertendo-a em uma técnica consolidada para a purificação de proteínas nos modos analíticos e de larga escala (Nagami et al., 2014; Kokhan e Marzolf, 2019).

A IMAC é um método que explora a associação entre um íon metálico imobilizado na matriz sólida e certos grupamentos expostos na superfície de um analito em solução. Esta afinidade

resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e determinados resíduos de aminoácidos, tais como o imidazol da histidina, e em menor extensão, o tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, ou seja, atuam como base de Lewis (Bresolin et al., 2009; Uygun et al., 2015; Qiu et al., 2020). O agente quelante é imobilizado na matriz sólida por meio de ligações covalentes, enquanto o íon metálico é complexado ao agente quelante por ligações de coordenação com os átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura dos agentes quelantes, como mostrado na Figura 8 (Chang e Sun, 2017; Shi et al., 2019). Resumidamente, os elétrons desemparelhados dos íons metálicos que são ocupados por moléculas de água ou ânions em solução, atuam como locais de coordenação para os doadores de elétrons. Quando a força de ligação entre os resíduos de aminoácidos na superfície da proteína e os íons metálicos é mais forte do que entre a superfície da proteína e as moléculas de ânions ou água, os aminoácidos podem formar complexos com os íons metálicos (Shi et al., 2019).

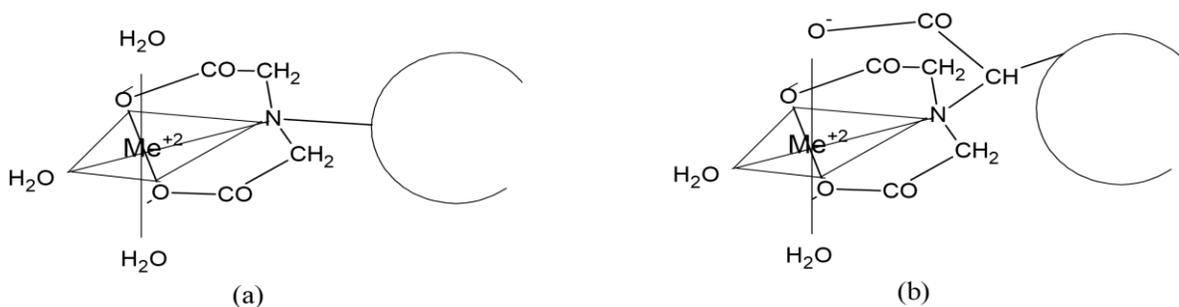


**Figura 8-** O princípio da adsorção na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

Fonte: Adaptado de Shi et al., 2019

A seletividade na IMAC depende do agente quelante e dos íons metálicos complexados. No geral, qualquer íon metálico que apresente capacidade de interagir com as proteínas pode ser utilizado, porém,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ , são os íons mais comumente empregados, devido serem elementos de transição, e apresentarem em comum a mesma quantidade de níveis de energia na distribuição eletrônica, podendo interagir de maneira semelhante, diferindo apenas pela

quantidade de elétrons presentes em sua última camada, o que pode influenciar para que a interação íon-proteína, ou íon-suporte sejam fortalecidas (Bresolin et al., 2009; Karakus et al., 2016; Trang et al., 2019). Muitos compostos são empregados como agentes quelantes, mas em geral o ácido iminodiacético (IDA) e o ácido nitrilotriacético (NTA) são os mais utilizados (Figura 9), pois possuem, respectivamente, três e dois sítios disponíveis para a ligação reversível com a proteína, quando formados complexos octaédricos de metal-IDA e metal-NTA, respectivamente (Karakus et al., 2016; Chang e Sun, 2017).



**Figura 9-** Estrutura dos agentes quelantes polidentados complexados com íons metálicos. (a) IDA, (b) NTA

Fonte: Adaptado de Bresolin et al., 2009

A afinidade de uma proteína por um quelato metálico depende fortemente do íon envolvido na coordenação. Bresolin et al. (2009) reportam uma predição de afinidade da proteína com o ligante IDA baseado nos resíduos de histidina acessíveis na superfície da proteína. A presença de um resíduo de histidina é suficiente para a retenção da proteína em suportes imobilizados com íons de  $\text{Cu}^{+2}$ . Quando houver mais de um resíduo de histidina, os íons de  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$  podem ser utilizados para a retenção da proteína; no caso de ocorrer um *cluster* de histidina, os íons de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ou  $\text{Co}^{+2}$  são apropriados para a adsorção da proteína. Como resultado dessa regra, para as matrizes imobilizadas com ácido iminodiacético, pode-se determinar a seguinte ordem  $\text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Co}^{+2}$  de força de retenção das proteínas (Chang e Sun, 2017).

Proteínas ou outras moléculas existentes na fase móvel são adsorvidas na cromatografia IMAC, principalmente pela formação de ligações de coordenação. Porém, existe a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, sendo que nem sempre é possível determinar suas contribuições relativas (Huss, 2016). As ligações de coordenação são favorecidas quando os resíduos de aminoácidos estão parcialmente

desprotonados, ou seja, quando o pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis. De modo geral, a adsorção é favorecida numa faixa de pH entre 6 e 8, para proteínas que possuem resíduos de cisteína e histidina acessíveis quando utilizado íons de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  imobilizado, enquanto para proteínas ricas em ácidos carboxílicos ou fosfatos, a adsorção ocorre em valores de pH mais baixos (pH igual a 5), quando se utiliza  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  (Bresolin et al., 2009; Vera-Aviles et al., 2018). E uma fase móvel isenta ou com baixas concentrações de sal favorece as interações eletrostáticas, fazendo com que o metal se comporte semelhante a uma resina de troca iônica (Vera-Aviles et al., 2018).

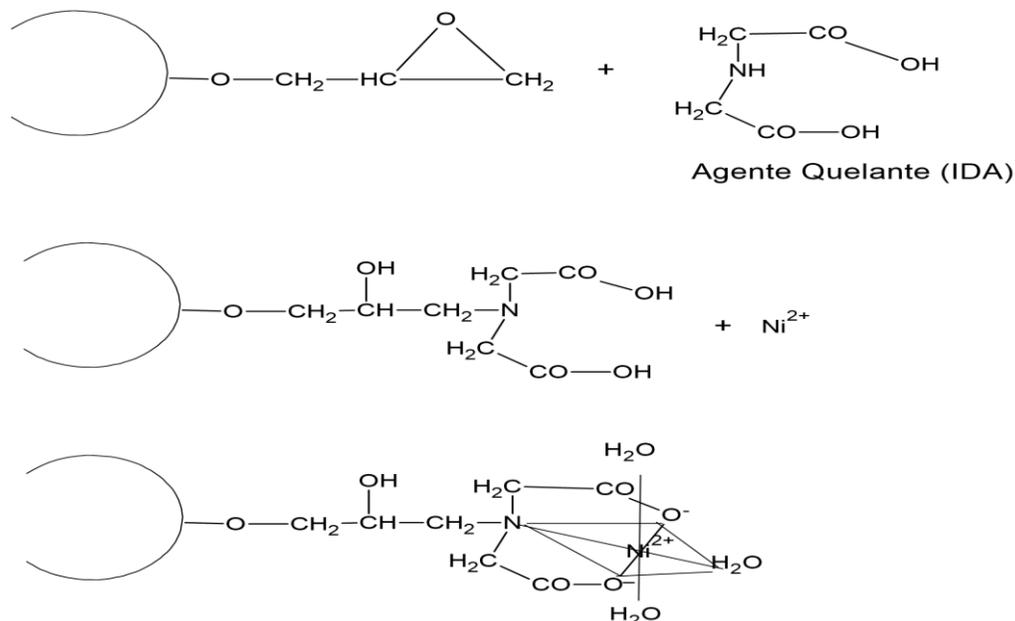
As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel) ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida (redução de pH). De forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de agentes competidores fortes, como o EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), entretanto, esse composto extrai os íons metálicos e interrompe as interações entre as proteínas e os ligantes quelantes, fazendo necessária a recarga da coluna com íons metálicos antes da próxima purificação (Cheung et al., 2012).

Vários materiais de suporte preparado pelo método IMAC são usados em estudos como na imobilização de enzimas, adsorção de biomoléculas e corantes, purificação de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e toxinas bacterianas (Inanan, 2019). É aconselhável que a matriz apresente elevada resistência mecânica, área superficial e porosidade; estabilidade em ampla faixa de pH e na presença de sais ou solventes orgânicos, além de grupos funcionais (Figura 10) que possibilitem a modificação química do material para imobilização do ligante (Bresolin et al., 2009).

Diversos estudos relatam a aplicação de criogéis em cromatografia de afinidade de íon metálicos imobilizados, na adsorção e purificação de proteínas e enzimas (Akduman et al., 2013; Bibi et al., 2013; uygun et al., 2015; Rigüero et al., 2020), para purificação de lactoferrina (Carvalho et al., 2014), imobilização de lisozima (Acet et al., 2018), adsorção de insulina (Erol et al., 2019), remoção de metais de águas residuais (Yang et al., 2020).

Outra área em desenvolvimento se concentra na identificação de novos ligantes. Zhang et al. (2015) ao estudarem os ligantes 1,4,7-triazaciclononano (TACN), e ácido 5,5-ditiobis-2-(2-nitrobenzóico) em adsorventes IMAC coordenados com íons de  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$  para purificação de proteínas, verificaram que os agentes quelantes apresentaram eficiência igual ou superior quando comparados àqueles disponíveis comercialmente. Além disso, as matrizes mantiveram a

capacidade de retenção da proteína por vários ciclos, sem a necessidade de serem recarregadas pelos íons metálicos, devido à alta estabilidade iônica dos ligantes utilizados.



**Figura 10-** Esquema de ativação, acoplamento do agente quelante e imobilização dos íons metálicos em matrizes de afinidade IMAC

Fonte: Adaptado de Bresolin et al., 2009

Nesse contexto, também surge o interesse de estudar compostos naturais como agentes quelantes, como aqueles que naturalmente já formam um complexo com íons metálicos, como é o caso da clorofila, que funciona como agente quelante para os íons de  $\text{Mg}^{+2}$ . O desenvolvimento de novos ligantes quelantes é vantajoso por várias razões, pois pode aumentar a capacidade de ligação e seletividade da matriz, para eluir um produto com maior grau de pureza, tornando a purificação mais eficiente, além de possivelmente reduzir os custos da produção das matrizes de separação (Riguero et al., 2020).

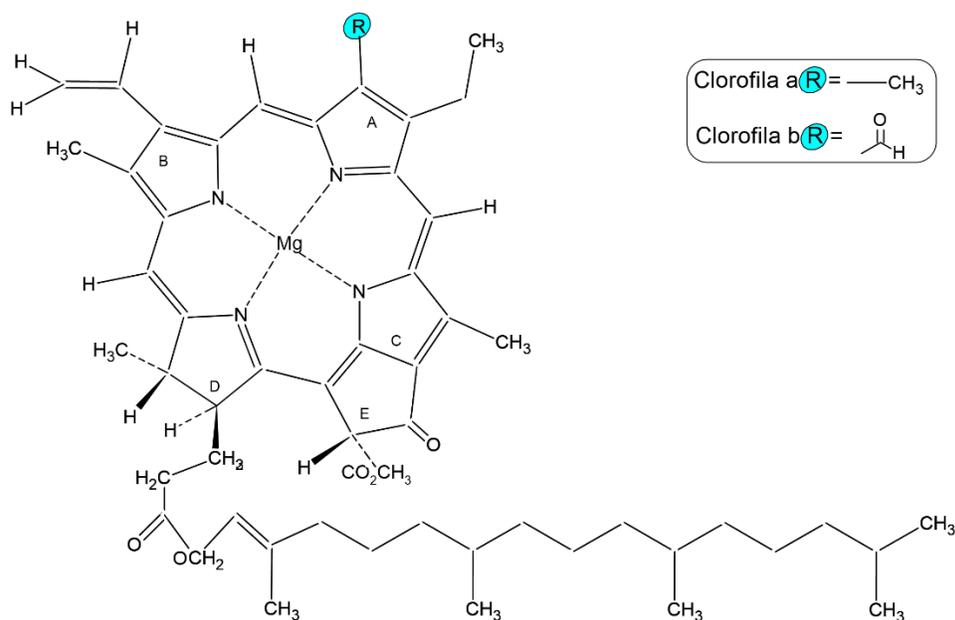
Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e das condições cromatográficas. A estabilidade dos quelatos em uma ampla faixa de temperatura e condições da fase líquida é uma vantagem da técnica, pois, além de significar estabilidade operacional, propicia a reutilização dos mesmos, sem que haja perda de desempenho (Carvalho et al., 2014). Além disso, é uma operação de baixo custo, alta especificidade (em alguns casos apresentando purificação em uma única etapa),

alta capacidade de adsorção, e condições brandas de eluição da molécula adsorvida, o que torna a IMAC uma técnica muito utilizada para purificação de proteínas (Riguero et al., 2020).

## 1.6. Clorofilas

As clorofilas destacam-se dentre os pigmentos naturais mais abundantes na natureza encontrado em organismos fotossintéticos, como plantas e algas, sendo responsáveis pela captura de luz solar, produção de oxigênio e açúcares através da fotossíntese. A intensa cor verde das clorofilas deve-se a suas fortes absorções de luz nas regiões do azul e vermelho do espectro eletromagnético, fazendo com que transmitam na região do verde (Yilmaz e Gökmen, 2016; Sato et al., 2018).

Estruturalmente, as clorofilas são porfirinas compostas por quatro anéis pirrólicos ligados a ponte de meteno (-C=), e os quatro átomos de nitrogênio são coordenados por um átomo de magnésio ( $Mg^{+2}$ ) de ligação central. Além dos quatro anéis pirrole (A, B, C, D), contém um quinto anel isocíclico (anel E) localizado ao lado do terceiro anel pirrólico (Figura 11). As clorofilas possuem uma cauda de fitol ( $C_{20}H_{39}$ ) que é esterificado com a carboxila do quarto anel conferindo a hidrofobicidade a molécula (Yilmaz e Gökmen, 2016; Kang et al., 2018).



**Figura 11-** Estrutura da clorofila *a* e clorofila *b*

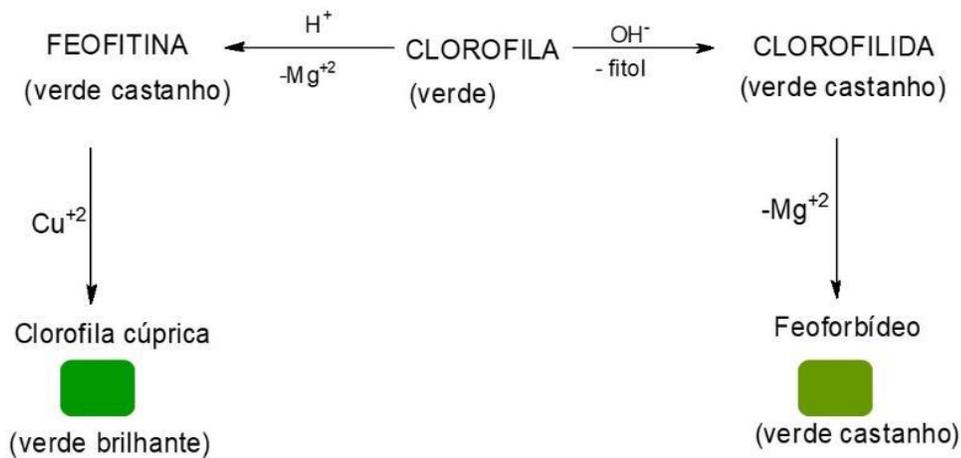
Fonte: Adaptado de Yilmaz e Gökmen, 2016

Existem cinco tipos de clorofila, conhecidas: a, b, c, d, e. As clorofilas a e b são as principais formas desse pigmento encontradas nas plantas, ocorrendo em proporções aproximadas de 2,5 a 3,5 :1, respectivamente. No entanto, essa relação pode variar de acordo com fatores ambientais e genéticos. A diferença estrutural entre as clorofilas é devido a um radical no segundo anel pirrol (anel B) na posição C<sub>7</sub>. A clorofila a tem um grupo metil (-CH<sub>3</sub>), enquanto a clorofila b tem um grupo aldeído (-CHO), representado na Figura 11 (Lipke et al., 2013; Kang et al., 2018). Embora ambas sejam verdes, os seus espectros de absorção são ligeiramente diferentes, de maneira que para o olho humano a clorofila *a* apresenta uma tonalidade verde-azulada, e a clorofila *b* verde-amarelada (Mann, 2017).

Na literatura ainda não há informações padronizadas sobre o teor de clorofila das plantas. A mudança no conteúdo desse pigmento depende do cultivar, tempo de colheita, estágio de maturação e partes da planta, condições de armazenamento, além dos métodos de extração e determinação do teor de clorofila (Yilmaz e Gökmen, 2016; Derrien et al., 2017; Derrien et al., 2019). Dentre os diversos vegetais existentes, o espinafre se destaca como uma boa fonte de clorofila. É um vegetal altamente consumido em todo o mundo, e sua produção gera cerca de 25% de resíduos, dos quais biomoléculas valiosas podem ser extraídas. Sanchez et al. (2014) ao avaliarem o teor de clorofila entre brócolis, espinafre e pimenta verde, verificaram que o espinafre apresentou maiores teores (79,07 e 29,27 mg.100g<sup>-1</sup>) para clorofila *a* e *b*, respectivamente, do que os demais. Yilmaz e Gökmen (2016) também demonstraram em um estudo o teor de clorofila para diversos vegetais, com destaque para o espinafre que apresentou maiores teores dentre todos vegetais analisados.

Nos cloroplastos as clorofilas estão ligadas a carotenoides, lipídios e lipoproteínas, através de ligações não-covalentes, que podem ser rompidas com facilidade, e por isso são facilmente extraídas com solventes orgânicos, especialmente solventes polares, como o metanol, a acetona, o acetato de etila, o etanol, a dimetilformamida e a piridina (Yilmaz e Gökmen, 2016; Derrien et al., 2017). A sensibilidade das clorofilas à temperatura e pH extremos permite a formação de vários derivados distintos, tais como feofitinas, clorofílicas e feoforbídeos (Figura 12) (Kang et al., 2018).

A clorofila é suscetível à degradação em condições de pH ácido, sendo mais estáveis em pH alcalino. A degradação da clorofila em condições de pH baixo é o resultado da decomposição da clorofila em feofitina, onde dois íons de hidrogênio substituem o íon de magnésio no centro do anel porfirina. Como resultado, a cor verde brilhante torna-se verde castanho (Yilmaz e Gökmen, 2016; Damodaran et al., 2018).



**Figura 12-** Esquema de degradação da clorofila

Fonte: Adaptado Streit et al., 2005

O processamento térmico também causa a conversão de clorofilas em derivados isentos de Mg<sup>+2</sup>. Altas temperaturas ou longos períodos de tratamento térmico podem levar a outro tipo comum de degradação do pigmento que é a remoção da cadeia fitol, conduzindo a formação de feoforbídeo ou clorifidilas, que também apresentam uma mudança na tonalidade de cor, do verde brilhante para o verde castanho (Streit et al., 2005; Damodaran et al., 2018).

Para atenuar os problemas de degradação, as clorofilas podem ser quimicamente modificadas. Devido ao fato de a clorofila possuir o íon de magnésio complexado em sua estrutura, os dois átomos de hidrogênio no interior do núcleo tetrapirrólico livre de magnésio são facilmente deslocados por outros íons metálicos, formando outros complexos metal-clorofila. São principalmente utilizados os íons de Zn<sup>+2</sup> e Cu<sup>+2</sup> e esses complexos formados são mais verdes e mais estáveis em ambientes de processamento e armazenamento que a clorofila natural. Esses derivados metal-clorofila, são menos sensíveis à degradação na presença de luz, enquanto que o pigmento isolado e purificado de Mg<sup>+2</sup> é facilmente degradado, particularmente na presença de ácidos e luz. A clorofila cúprica é conhecida como um dos “corantes naturais” mais estáveis, principalmente quando comparada a antocianinas, betalaínas e carotenoides (Yilmaz e Gökmen, 2016; Damodaran et al., 2018; Kang et al., 2018).

Devido à capacidade da clorofila em complexar com os metais; o tamanho da sua molécula, que possibilita atuar como braço espaçador evitando possíveis efeitos de impedimento estérico; além das carbonilas presentes em sua estrutura que são capazes de interagir com o suporte amino

ativado produzindo bases de Schiff, todas essas características tornam possível a aplicação desse corante natural como agente quelante para utilização na cromatografia de afinidade, podendo atuar nos processos de separação de biomoléculas, nenhum estudo foi encontrado na literatura relatando a utilização da clorofila como composto quelante em suportes cromatográficos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver adsorventes monolíticos macroporosos funcionalizados com clorofila extraída de fontes vegetais, voltados para o processo de purificação de bromelina pela técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver adsorventes poliméricos macroporosos monolíticos, obtidos pelo processo de criogelificação e modificados quimicamente para serem utilizados em processos de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC);
- Imobilizar a clorofila no adsorvente e avaliar o seu efeito como agente quelante;
- Avaliar as condições de adsorção (pH e força iônica) da enzima bromelina nos adsorventes de afinidade por íons metálicos;
- Avaliar o efeito de diferentes íons metálicos na eficiência de purificação de bromelina;
- Caracterizar os adsorventes produzidos, com relação a aspectos físicos, químicos e operacionais;
- Avaliar a capacidade adsortiva e a resistência aos ciclos de reutilização das matrizes produzidas;
- Purificar e caracterizar bromelina obtida a partir da polpa do abacaxi, avaliando a eficiência, grau de pureza e atividade.

### 3. REFERENCIAS

- ABREU, D.C.A.; FIGUEIREDO, K.C.S. Bromelain separation and purification processes from pineapple extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 1029-1039, 2019.
- ACET, O.; BARET, T.; ORDONEZ, D.; AKSOY, N.S.; ALACABEY, I.; MENTEŞ, A.; ODABAŞI, M. O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes as affinity ligands for immobilized metal-ion affinity chromatography of lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v.1550, p.21-27, 2018.
- ACET, O.; ÖNAL, B.; SANZ, R.; SANZ-PÉREZ, E.S.; ERDÖNMEZ, D.; ODABAŞI, M. Preparation of a new chromatographic media and assessment of some kinetic and interaction parameters for lysozyme. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 480-487, 2019.
- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 173–182, 2019.
- AKDUMAN, B.; UYGUN, M.; UYGUN, D.A.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, p. 4842-4848, 2013.
- ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, 2020.
- ALICI, E.H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.
- AMID, A.; ISMAIL, N.A.; YUSOF, F.; SALLEH, H.M. Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2232-2239, 2011.
- ANDAÇ, M.; GALAEV, I. Y.; DENZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 69-80, 2016.
- ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, B.V. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification. **Methods**, v.116, p. 84-94, 2017.
- ARSHAD, Z.I.M.; AMID, A.; YUSOF, F.; JASWIR, I.; AHMAD, K.; LOKE, P. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, 2014.
- ARSHAD, M.S.; KWON, J.-H.; IMRAN, M.; SOHAIB, M.; ASLAM, A.; NAWAZ, I.; AMJAD, Z.; KHAN, U.; JAVED, M. Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016.

ATAIDE, J.A.; GÉRIOS, E.F.; MAZZOLA, P.G.; SOUTO, E.B. Bromelain-loaded nanoparticles: A comprehensive review of the state of the art. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 254, p. 48-55, 2018.

BAIELI, M.F.; URTASUN, N.; MIRANDA, M.V.; CASCONI, O.F.J. Wolman Isolation of lactoferrin from whey by dye-affinity chromatography with Yellow HE-4R attached to chitosan mini-spheres. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 53-59, 2014.

BAIMENOV, A.; BERILLO, D.A.; POULOPOULOS, S.G.; INGLEZAKIS, V.J. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 276, 2020.

BALA, M.; MEL, M.; JAMI, M.S.; AMID, A.; SALLEH, H.M. Kinetic studies on recombinant stem bromelain, **Advances in Enzyme Research**, v. 1, p. 52-60, 2013.

BANERJEE, S.; ARORA, A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PATTI, A.F. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318-326, 2020.

BAYAT, S.; AMIRI, N.; PISHAVAR, E.; KALALINIA, F.; MOVAFFAGH, J.; HASHEMI, M. Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models. **Life Sciences**, v. 229, p. 57-66, 2019.

BENUCCI, I.; LIBURDI, K.; GARZILLO, A.M.V.; ESTI, M. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1349-1353, 2011.

BERNELA, M.; AHUJA, M.; THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles, **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p.18-24, 2016.

BIBI, N.S.; SINGH, N.K.; DSOUZA, R.N.; AASIM, M.; FERNÁNDEZ-LAHOIRE, M. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 145-149, 2013.

BRESOLIN, I. R. A. P.; BRESOLIN, I. T. L.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B.; MAZZOLA, P. G. Isolation and Purification of Bromelain from Waste Peel of Pineapple for Therapeutic Application. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, 971-979, 2013.

BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas, **Química Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

CABRAL, H. **Análise funcional e estrutural comparativa da fastuosaina com papaína e bromelinas**. 170f. Tese (Doutorado em Biofísica molecular), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São José do Rio Preto, SP, 2005.

CAMPOS, D.A.; COSCUETA, E.R.; VALETTI, N.W.; PASTRANA-CASTRO, L.M.; TEIXEIRA, J.A.; PICÓ, G.A.; PINTADO, M.M. Optimization of bromelain isolation from

pineapple byproducts by polysaccharide complex formation. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 792-804, 2019.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA Jr., W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; Da 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.

CHAKRAVARTHY, P.K.; ACHARYA, S. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, p. 245–249, 2012.

CHANG, Y.-Y.; SUN, L.H. **Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for metalloproteomics and phosphoproteomics**. Inorganic and organometallic transition metal complexes with, Biological Molecules and living cells, chapter nine, p. 329-342, 2017

CHAURASIYA, R.S.; HEBBAR, U.H. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. **Separation and Purification Technology**, v. 111, p.90–97, 2013.

CHEN, X.; WANG, X.; WANG, S.; ZHANG, X.; YU, J.; WANG, C. Mussel-inspired polydopamine-assisted bromelain immobilization onto electrospun fibrous membrane for potential application as wound dressing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, 2020.

CHEUNG, R.C.F.; WONG, J.W.; NG, T.B. Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1411-1420, 2012.

CHINNADURAI, G.S.; KRISHNAN, S.; PERUMAL, P. Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants. **Phytomedicine**, v. 40, n. January, p. 176–188, 2018.

COELHO, D.F., SILVEIRA, E., TAMBOURGI, E.B. Purification Processes and Market Potential of Bromelain in Brazil, **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 8, p. 882-888, 2014.

COSKUN, O. Separation techniques: chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, p. 156-160, 2016.

COSTA, H.B.; FERNANDES, P.M.B.; ROMÃO, M.; VENTURA, J.A. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies, **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 163-168, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

DEMIRCI, S.; SAHINER, S.; YILMAZ, S.; KARADAG, E.; SAHINER, N. Enhanced enzymatic activity and stability by in situ entrapment of  $\alpha$ -Glucosidase within super porous p(HEMA) cryogels during synthesis. **Biotechnology Reports**, v. 28, 2020.

DENG, Z.; GUO, Y.; MA, P.X.; GUO, B. Rapid thermal responsive conductive hybrid cryogels with shape memory properties, photothermal properties and pressure dependent conductivity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 526, p. 281-294, 2018.

DERRIEN, M.; BADR, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; ANGERS, P. Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). **LTW- Food Science and Technology**, v. 79, p. 170-177, 2017.

DERRIEN, M.; BADR, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; ANGERS, P. Optimization of a sustainable purification protocol for lutein and chlorophyll from spinach by-products by a saponification procedure using Box Behnken design and desirability function. **Food and Bioproducts Processing**, v. 116, p. 54-62, 2019.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; TJORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 259-264, 2009.

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, D. Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of Ananas Comosus (pineapple) crown leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 451-457, 2013.

EROL, B.; EROL, K.; GÖKMEŞE, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 104-113, 2019.

ESTI, M.; BENUCCI, I.; LIBURDI, K.; GARZILLO, A.M.V. Immobilized pineapple stem bromelain activity in a wine-like medium: Effect of inhibitors. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 84-89, 2015.

FANG, Y.M.; LIN, D.Q.; YAO, S.J. Review on biomimetic affinity chromatography with short peptide ligands and its application to protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1571, p. 1-15, 2018.

FARÍAS, T.; HAJIZADEH, S.; YE, L. Cryogels with high cisplatin adsorption capacity: Towards removal of cytotoxic drugs from wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 235, p. 116203, 2020.

FERANCIKOVA, N.; BUKOVCAN, P.; SARKOZYOVA, N.; DRAGUNOVA, J.; CUCUROVA, B.; KOLLER, J. Bromelain-based enzymatic debridement as a treatment of choice in high-risk patient with deep facial burns, a case report. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 71, p. 6-10, 2020.

FERNANDES, P.; TECNICO, I.S.; LISBOA, U. DE. **Enzymatic Processing in the Food Industry**. [s.l.] Elsevier, 2018.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

FONTAN, R.C.I.; BONOMO R.C.; COIMBRA, J.S.R. **Adsorção e Troca Iônica**. In: TADINI, C.C.; TELIS, V.R.N.; MEIRELLES, A.J.A.; PESSOA FILHO, P.A. Operações Unitárias na Indústria de Alimentos. Grupo Gen-LTC, p400-425, 2016.

FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F.; GONÇALVES, G.R.F.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 85, p. 1717-1725, 2017.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p, 1996.

GODOI, P. H. Estudo Da Atividade Enzimática Da Bromelina Pura Em Solução Em Diferentes Temperaturas e pH. Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas.

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

GONÇALVES, G.R.F.; GANDOLFI, O.R.R.; SANTOS, L.S.; BONOMO, R.C.F.; VELOSO, C.M.; VERÍSSIMO, L.A.A.; FONTAN, R.C.I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.1068-1069, p. 71-77, 2017.

GUAN, J.; GUAN, X-Y.; YUN, J.; YAO, S-J. Chromatographic separation of phenyllactic acid from crude broth using cryogels with dual functional groups. **Journal of Chromatography A**, v. 1554, p. 92-100, 2018.

GUO, J.; MIAO, Z.; WAN, J.; GUO, X. Pineapple peel bromelain extraction using gemini surfactant-based reverse micelle – Role of spacer of gemini surfactant. **Separation and Purification Technology**, v. 190, p. 156-164, 2018.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 2018, p. 254–267, 2019.

GUVEN, H.; GEZICI, O.; BAYRAKCI, M.; MORBIDELLI, M. Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1558, p. 59-68, 2018.

HAGE, D.S.; ANGUIZOLA, J.A.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, M.S.; ZHENG, X. **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation**, ed. Fanali, S.; Haddad, P.R.; Poole, C.; Schoenmakers, P.; Lloyd, D.K., Elsevier, v. 1, 2 ed. Ch. 12: Affinity chromatography, p. 319-341, 2017.

HARISH, B.S.; UPPULURI, K.B. Microbial Serine protease inhibitors and their therapeutic applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1373-1387, 2018.

HAN, J.; WANG, L.; WANG, L.; LI, C.; MAO, Y.; WANG, Y. Fabrication of a core-shell-shell magnetic polymeric microsphere with excellent performance for separation and purification of bromelain. **Food Chemistry**, v. 283, p.1-10, 2019a.

HAN, L.; WANG, L.; WANG, Y.; CAI, Y.; MAO, Y.; NIE, L.; XIE, X.; Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 253-262, 2019b.

HAN, J.; CAI, Y.; WANG, L.; MAO, Y.; NI, L.; WANG, Y. A high efficiency method combining metal chelate ionic liquid-based aqueous two-phases flotation with two-step precipitation process for bromelain purification. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.

HIRCHE, C.; ALMELAND, S.K.; DHEANSA, B.; FUCHS, P.; GOVERNA, M.; HOEKSEMA, H.; KORZENIOWSKI, T.; LUMENTA, D.B.; MARINESCU, S.; MARTINEZ-MENDES, J.R.; PLOCK, J.A.; SANDER, F.; ZIEGLER, B.; KNESER, U. Eschar removal by bromelain based enzymatic debridement (Nexobrid®) in burns: European consensus guidelines update. **Burns**, v. 46, p. 782-796, 2020.

HIXON, K.R.; LU, T.; SELL, S.A. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. **Acta Biomaterials**, v. 62, p. 29-41, 2017.

HOLYAVKA, M.; FAIZULLIN, D.; KOROLEVA, V.; OLSHANNIKOVA, S.; ZAKHARTCHENKO, N.; ZUEV, Y.; KONDRATYEV, M.; ZAHKAROVA, E.; ARTYUKHOV, V. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 161-176, 2021.

HUSS, E. The Establishment of a Small Challenger Company in a Segmented High Technology Life Science Market, IMAC-A Review. UPPSALA Universited, **Oktober**, p. 1-88, 2016.

INANAN, T. Chitosan *Co*-polymeric nanostructures for catalase immobilization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 135, p. 94-102, 2019.

JANNAT, M.; YANG, K.L. Continuous proteases assays liquid crystal as a reporter. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 269, p. 8-14, 2018.

JIAN, W.; QUIN-MEI, W.; LI-LI, T.; CHEN, Y.; SU-HUA, Y.; CHUN, Y. Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 43, p. 1777-1784, 2015.

JUN-HUI, X.; HUI-JUAN, C.; BIN, Z.; HUI, Y. The mechanistic effect of bromelain and papain on tenderization in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle. **Food Research International**, v.131, 2020.

KANG, Y.R.; PARK, J.; JUNG, S.K.; CHANG, Y.H. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943-950, 2018.

KARAKUS, C.; USLU, M.; YAZICI, D.; SALIH, B.A. Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant Cag A protein. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 182-187, 2016.

KARTAL, F.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted cryogel beads for cholesterol removal from milk samples. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 190, 2020.

KOKHAN, O.; MARZOLF, D.R. Detection and quantification of transition metal leaching in metal affinity chromatography with hydroxynaphthol blue. **Analytical Biochemistry**, v. 582, 2019.

LAKKA, N.S.; KUPPAN, C. Principles of chromatography method development. **Biochemical Analysis Tools- Methods for Bio- Molecules Studies**, 2019.

LI, Z.; RODRIGUEZ, E.; AZARIA, S.; PEKAREK, A.; HAGE, D.S. Affinity monolith chromatography: a review of general principles and applications. **Electrophoresis**, v. 38, p. 2837-2850, 2017.

LIPKE, A.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J.; MAJDAN, M.; JANIK, E. Spectroscopy and biocatalytic properties of a chlorophyll containing extract in silica gel. **Journal of Molecular Structure**, v. 1052, p. 158-164, 2013.

LIU, S.; ZHAO, H.; WANG, Y.; ZHAO, H.; MA, C. Oral Bromelain for the Control of Facial Swelling, Trismus, and Pain After Mandibular Third Molar Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 77, p. 1566-1574, 2019.

LIU, S.; LI, Z.; YU, B.; WANG, S.; SHEN, Y.; CONG, H. Recent advances on protein separation and purification methods. **Advance Colloid and Interface Science**, v. 284, p.102254, 2020.

LOPES, F.L.G.; SANTANA, J.C.C.; SBRUZZI, D.; SOUZA, R.R.; TAMBOURGI, E.B. Produção e cálculo do custo de um fármaco obtido do suco do abacaxi por microfiltração. **Gestão da Produção, Operações e Sistemas**. Ano 5, p. 93-105, 2010.

LYNCH, K.B.; REN, J.; BECKNER, M.A.; HE, C.; LIU, S. Monolith columns for liquid chromatographic separations of intact proteins: A review of recent advances and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 1046, p. 48-68, 2019.

MALLIK, R.; HAGE, D.S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1686-1706, 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.

MANJREKAR S., WADEKAR T., SUMANT O. Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and

Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027, março 2021. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em janeiro, 2022.

MANN, M.S.M; **Avaliação de sorventes para remoção de clorofila na determinação de agrotóxicos em espinafre empregando método QuEChERS e GC-ECD**. 126p. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Analítica), UFSM: Santa Maria, RS, 2017.

MIRANDA, I.S.P.B.; MIRANDA, A.F.S.; SOUZA, F.V.D.; VANNIER-SANTOS, M.A.; PIROVANI, C.P.; PEPE, I.M.; RODOWANSKI, J.I.; FERREIRA, K.T.S.E.; VAZ, L.M.S.; ASSIS, S.A. The biochemical characterization, stabilization studies and the antiproliferative effect of bromelain against B16F10 murine melanoma cells. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, p.442-454, 2016, <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1254599>

MISRAN, E.; IDRIS, A.; SARIP, S.H.M.; YA'AKOB, H. Properties of bromelain extract from different parts of the pineapple variety Morris. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, 2019.

MORELLON-STERLING, R.; EL-SIAR, H.; TAVANO, O.L.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ficcina: A proteases extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, 394-4041, 2020.

NAGAMI, H.; UMAKOSKI, H.; KITaura, T.; THOMPSON, G.L.; SCHIMANOUCI, T.; KUBOI, R. Development of metal affinity-immobilized liposome chromatography and its basic characteristics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 66-73, 2014.

NASCIMENTO, R.F.; DE LIMA, A.C.A.; VIDAL, C.B.; DE QUADROS MELO, D.; RAULINO, G.S.C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**, 2014

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

NASCIMENTO, R.G. **Desenvolvimento e Caracterização de adsorventes monolíticos macroporosos para purificação de bromelina**. 134f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). UESB: Itapetinga, 2021.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. **Trends in food science and technology**, v. 50, p. 26–43, 2016.

NOVAES, L.C.L.; JOZALA, A.F.; LOPES, A.M.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; MAZZOLA, P.G.; JUNIOR, A.P. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. **Biotechnology Progress**, v. 32, p. 5-13, 2016.

NOR, M.Z.M.; RAMCHANDRAM, L.; DUKE, M.; VASILJEVIC, T. Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing, **Food and Bioproducts Processing**, v. 52, p. 7103-7112, 2015.

NOR, M.Z.M.; RAMCHANDRAN, L.; DUKE, M.; VASILJEVIC, T. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a twostage ceramic ultrafiltration process, **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p.142-150, 2016.

NWAGU, T.N.; UGWUODO, C.J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 406-414, 2019.

OLIVEIRA, A.C.F.; NEVES, I.C.O.; SARAIVA, J.A.M.; CARVALHO, M.F.F.; BATISTA, G.A.; VERÍSSIMO, L.A.A.; RESENDE, J.V. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v.55, p. 2012-2024, 2019.

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

PERRET, G.; BOSCHETTI, E. Aptamer affinity ligands in protein chromatography. **Biochimie**, v. 145, p. 98-112, 2018.

PFAUNMILLER, E.L.; BAS, J.; BROOKS, M.; MILANUL, M.; RODRIGUEZ, E.; VARGAS, J.; MATSUDA, R.; HAGE, D.S. Affinity chromatography, in: Anderson, J.; Berthod, V.P.; Stalculp, A. (Eds.), **Analytical Separation Science**, v. 2, part. 1, Wiley, New York, p. 461-482, 2016.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p.598-599, 1975.

QIU, X.; XIANG, X.; LIU, T.; HUANG, H.; HU, Y. Fabrication of an organic–inorganic nanocomposite carrier for enzyme immobilization based on metal–organic coordination. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 47-54, 2020.

RAMLI, A.N.M.; AZNAN, T.N.T.; ILLIAS, R.M. Bromelain: From production to commercialization. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed. 5, v. 97, 2017.

RAMLI, A.N.M.; MANAS, N.H.A.; HAMID, A.A.A.; HAMID, H.A.; ILLIAS, R.M. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas Comosus*. **Food Chemistry**, v. 266, p. 183-191, 2018.

RAWLINGS, N.D. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In: **Proteases: Structure and Function**. Brix, K.; Stöcker, W. (Eds.). Springer, 2013.

RIGUERO, V.; CLIFFORD, R.; DAWLEY, M.; DICKSON, M.; GASTFRIEND, B.; THOMPSON, C.; WANG, S-C.; O'CONNOR, E. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1629, 2020.

RODRIGUEZ, E.L.; PODDAR, S.; IFTEKHAR, S.; SUH, K.; WOOLFORK, A.G.; OVBUDE, S.; PAKAREK, A.; WALTERS, M.; LOTT, S.; HAGE, D.S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, 2020.

SÁNCHEZ, C.; BARANDA, A.B.; DE MARAÑÓN, I.M. The effect of high pressure and high temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. **Food Chemistry**, v. 163, p. 37-45, 2014.

SARANYA, P.; RANJITHA, S.; SEKARAN, G. Immobilization of thermotolerant intracellular enzymes on functionalized nanoporous activated carbon and application to degradation of an endocrine disruptor: kinetics, isotherm and thermodynamics studies, **RSC Adv.**, v. 5, p. 66239–66259, 2015, <https://doi.org/10.1039/C5RA11279F>

SATO, T.; SHIMODA, Y.; MATSUDA, K.; TANAKA, A.; ITO, H. Mg-dechelation of chlorophyll a by Stay-Green activates chlorophyll b degradation through expressing non-yellow coloring 1 in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 222, p. 94-102, 2018.

SCHEJTMAN, S.D.G.; IGARZABAL, C.I.A.; MARTINELLI, M. Syntesis and characterization of novel dendritic macroporous monoliths. **European Polymer Journal**, v. 106, p. 102-111, 2018.

SHARIF, M.K.; SALEEM, M.; JAVED, K. Chapter 15 - Food Materials Science in Egg Powder Industry. **Role of Materials Science in Food Bioengineering**. A. M. Grumezescu and A. M. Holban, Academic Press, p. 505-537, 2018.

SHARMA, S.P.; BRAJBHUSHAN. A study on nutritional efficacy of pineapple juice in the treatment of bronchial asthma. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 5, p. 1– 4, 2015.

SHARMA, K.M.; KUMAR, R., PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.

SHI, Y.; YAN, Z.; XU, T.; QU, R.; YUAN, J.; CAI, F.; WANG, Y.; WANG, X. An environmentally friendly deproteinization and decolorization method for polysaccharides of *Typha angustifolia* based on a metal ion-chelating resin adsorption. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 160-167, 2019.

SHOBA, E.; LAKRA, R.; KIRAN, M.S.; KORRAPATI, P.S. 3 D nano bilayered spatially and functionally graded scaffold impregnated bromelain conjugated magnesium doped hydroxyapatite nanoparticle for periodontal regeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 109, 2020.

SILVA, J.F. Da; SILVA, D.L. Da.; NASCIMENTO, R.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 49756, p. 1-9, 2019.

SOARES, P.A.G; VAZ, A.F.M.; CORREIA, M.T.S.; PESSOA JR, A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389-395, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.042>

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. The Chlorophylls. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.

SUN, Q.; ZHANG, B.; YAN, Q.-J.; JIANG, Z.-Q. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, v. 213, p. 708–713, 2016.

TAP, F.M.; MAJID, F.A.A.; KHAIRUDIN, N.B.A. Structure prediction of Stem Bromelain from pineapples (*Ananas Comosus*) using procaricain enzyme as a modelling template, **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 9, p. 6109-6111, 2016.

TRANG, H.K.; JIANG, L.; MARCUS, R.K. Grafting polymerization of glycidyl methacrylate onto capillary-channeled polymer (C-CP) fibers as a ligand binding platform: Applications in immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) protein separations. **Journal of Chromatography B**, v. 1110-1111, p. 144-154, 2019.

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.

VERA-AVILES, M.; VENTANA, E.; KARDINASARI, E.; KOH, N.L.; LATUNDE-DADA, D.O. Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.11, p.111, 2018.

WAN, J.; GUO, J.; MIAO, Z.; GUO, X. Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple peel – Effect of surfactant structure. **Food Chemistry**, v. 197A, p. 450-456, 2016.

WANG, X.; HE, L.; WEI, B.; YANG, G.; WANG, J.; TANG, R. Bromelain- immobilized and lactobionic acid-modified chitosan nanoparticles for enhanced drug penetration in tumor tissues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 129-142, 2018.

WANG, L.; LI, W.; LIU, Y.; ZHI, W.; HAN, J.; WANG, Y.; NI, L. Green separation of bromelain in food sample with high retention of enzyme activity using recyclable aqueous two-phase system containing a new synthesized thermo-responsive copolymer and salt. **Food Chemistry**, v. 282, p. 48-57, 2019.

WILTSCHI, B.; CERNAVA, T.; DENNING, A.; CASAS, M.G.; GEIER, M.; GRUBER, S.; HABEBAUER, M.; HEIDINGER, P.; ACERO, E.H.; KRATZER, R.; LULEY-GOEDL, C.; MULLER, C.A.; PITZER, J.; RIBISTCH, D.; SAUER, M.; SCHMOLZER, K.; SCHNITZHOFFER, W.; SENSEN, C.W.; SOH, J.; STEINER, K.; WINKLER, C.K.; WINKLER, M.; WRIESSNEGGER, T. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, v. 40, 107520, 2020.

WU, W-C.; NG, H.S.; SUN, I-M.; LAN, J.C-W. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 158-162, 2017.

XU, X.; LIU, R.; GUO, P.; LUO, Z.; CAI, X.; SHU, H.; GE, Y.; CHANG, C.; FU, Q. Fabrication of a novel magnetic mesoporous molecularly imprinted polymer based on pericarpium granati-derived carrier for selective absorption of bromelain. **Food Chemistry**, v. 256, p. 91-97, 2018.

YANG, X.; DEBELI, D.K.; SHAN, G.; PAN, P. Selective adsorption and high recovery of La<sup>3+</sup> using graphene oxide/poly (*N*-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, 2020.

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

YILMAZ, C.; GÖKMEN, V. Chlorophyll. Reference Module in Food Science **Encyclopedia of Food and Health**, p. 37-41, 2016.

ZAYED, A.; MUFFLER, K.; HAHN, T.; RUPP, S.; FINKELMEIER, D.A. Burger-Kentischer, R. Ulber Physicochemical and biological characterization of fucoidan from *Fucus vesiculosus* purified by dye affinity chromatography. **Marine Drugs**, v.14, p. 79-94, 2016.

ZHANG, C.; FREDERICKS, D.; LONGFORD, D.; CAMPI, E.; SAWFORD, T.; HEARN, M.T.W. Changed loading conditions and lysate composition improve the purity of tagged recombinant proteins with tacn-based IMAC adsorbents. **Systems & Synthetic Biology Nanobiotech Medicine**, v.10, p. 480-489, 2015.

ZHAO, D.; XU, Y.; GU, T.; WANG, H.; YIN, Y.; SHENG, B.; LI, Y.; NIAN, Y.; WANG, C.; LI, C.; XU, X.; ZHOU, G. Peptidomic Investigation of the Interplay between Enzymatic Tenderization and the Digestibility of Beef Semimembranosus Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 1136-1146, 2020.

ZHOU, L.; ZHU, J.; LIN, M.; XUA, J.; XIEC, Z.; YANG, D. Tetra-alkylsulfonate functionalized poly(aryl ether) membranes with nanosized hydrophilic channels for efficient proton conduction, **Journal of Energy Chemistry**, v. 40, p. 57-64, 2020.

---

ARTIGO

***SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES CROMATOGRÁFICAS  
FUNCIONALIZADAS COM CLORÓFILA PARA A PURIFICAÇÃO DE PROTEASES POR  
CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR METAIS***

---

Sugestão periódicos:

Journal of Chromatography B

International Journal of Biological Macromolecules

## RESUMO

Técnicas cromatográficas estão presentes na maioria dos processos de purificação e estudos sobre tecnologias alternativas de extração e separação de enzimas, são de grande interesse, visando sempre obter processos economicamente viáveis. A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) tem sido considerada uma técnica eficaz para separação e enriquecimento de proteases e o desenvolvimento de leitos poliméricos macroporosos, como criogéis, são uma alternativa para esses processos, devido à sua versatilidade e custos reduzidos de produção. Objetivou-se no presente estudo uma abordagem inovadora para a funcionalização de criogéis de poli(acrilamida), utilizando clorofila extraída de vegetais (CLO) como agente quelante, para purificação de bromelina por cromatografia IMAC. Avaliou-se as condições de adsorção pH (3 a 8) e concentração de sal (0 a 1 M) de bromelina nos adsorventes produzidos, imobilizados com diferentes íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ). O comportamento dos adsorventes funcionalizados com clorofila (CLO) e ácido iminodiacético (IDA) foi semelhante, com ponto máximo de adsorção de bromelina em pH 6 para os íons de  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$  e em pH 7 para os íons de  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$ . Os criogéis com íons de cobre imobilizados não diferiram entre si e apresentaram capacidade adsorptiva em torno de  $46,41 \pm 2,93$  mg/g, grau de expansão média de  $11,96 \pm 2,66$  kg/kg, capacidade de inchamento de  $15,13 \pm 2,32$  L/kg e porosidade (em torno de 85%). A funcionalização das matrizes foi comprovada pelas análises de espectroscopia FTIR, difração de raios-X e termogravimétrica. Microscopia eletrônica de varredura confirmou a estrutura macroporosa. Os resultados demonstraram a similaridade entre os adsorventes funcionalizados com diferentes agentes quelantes, indicando que a clorofila não alterou as características do adsorvente e o potencial para aplicação em matrizes de afinidade por metais imobilizados.

**Palavras chave:** agentes quelantes, bromelina, separação biomoléculas.

## 1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas de grande importância tecnológica, sendo aplicadas em diversos segmentos das indústrias alimentícias, farmacêuticas, químicas e ocupa o segundo lugar dentre as enzimas mais comercializadas mundialmente (Banerjee et al., 2020; Manjrekar et al., 2021). Dentre as proteases existentes de fonte vegetal, merece destaque a bromelina pertencente a classe das cisteíno-proteases no qual o abacaxi é a sua principal fonte de obtenção (Damodaran et al., 2018).

Essa enzima pode ser encontrada em várias partes do abacaxi, incluindo o fruto, o caule, a casca, a coroa e as folhas (Ramli et al., 2017; Nwagu e Ugwodo, 2019). Embora as bromelinas comercialmente disponíveis, são extraídas do caule e fruto do abacaxi (Nor et al., 2016).

A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, utilização na indústria alimentícia (amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, panificação, produção de hidrolisados proteicos) e indústria têxtil (Erol et al., 2019).

Como extrato bruto derivado do abacaxi, a bromelina (EC 3.4.22) é uma mistura de diferente tiol endopeptidases e outros componentes como glicosidases, fosfatases, celulasas, peroxidases, glicoproteínas, carboidratos e vários inibidores de proteases (Ramli et al., 2018; Nwagu e Ugwodo, 2019). E, portanto, a viabilidade dessas enzimas está diretamente relacionada com as etapas de extração e purificação.

As técnicas cromatográficas estão presentes na maioria dos processos de purificação de enzimas e com isso a necessidade de purificação dos compostos em larga escala de maneira eficaz e de baixo custo resultou na evolução de técnicas que proporcionam protocolos rápidos, eficientes e econômicos. Nessa vertente, colunas monolíticas poliméricas macroporosas, com destaque para os criogéis vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. Esses monólitos possibilitam a separação de biomoléculas de elevada massa molecular e até mesmo de células inteiras a partir de materiais não clarificados, devido à sua elevada porosidade e estabilidade mecânica, aumentando a escala de produção e reduzindo os custos operacionais (Acet et al., 2018; Kartal e Denizli, 2020).

Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como matrizes de imobilização e purificação de biomoléculas, pode-se modificar sua estrutura tornando-os adsorventes de afinidade específica. Dentre os diversos métodos utilizados tem-se a funcionalização com íons metálicos, para a utilização dessas matrizes na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), considerada como a mais eficiente nos processos de separação e purificação de proteases (Ramli et al., 2017). Essa técnica baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por grupos doadores de elétrons (como o anel imidazol de histina e o grupo tiol da cisteína) expostos na superfície das proteínas (Rodriguez et al., 2020).

A capacidade adsortiva e a seletividade na cromatografia de afinidade IMAC depende do agente quelante, dos íons metálicos complexados, das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, tipo de tampão, velocidade superficial (Karakus et al., 2016). O ácido iminodiacético

(IDA) e o ácido nitrilotriacético (NTA) são os agentes quelantes mais utilizados, por possuírem, respectivamente, três e dois sítios disponíveis para a ligação reversível com a proteína, quando complexados ao metal (Chang e Sun, 2017). Entretanto, a identificação de novos agentes quelantes é uma área em desenvolvimento, surgindo o interesse por compostos quelantes naturais. Esses ligantes podem aumentar a seletividade e capacidade de adsorção da matriz, tornando a purificação mais eficiente, proporcionando condições brandas de eluição da molécula adsorvida além de provavelmente reduzir os custos do processo de produção dos adsorventes de separação (Rodriguez et al., 2020).

Como o pigmento da clorofila estruturalmente é formado por porfirinas compostos por quatro anéis pirrólicos substituído por um átomo de magnésio ( $Mg^{+2}$ ) de ligação central, e apesar da instabilidade desses pigmentos a luz, ácidos e calor, os íons de magnésio são facilmente deslocados por outros íons metálicos, formando complexos metal-clorofila e tornando esse pigmento mais estável (Kang et al., 2018). Devido a essas características, a clorofila pode ser utilizada como agente quelante para funcionalização dos criogeis, em substituição aos agentes quelantes tradicionais como o ácido iminodiacético (IDA).

Além disso, esse pigmento possui em sua estrutura carbonilas que são capazes de interagir com o suporte amino ativado formando bases de Schiff, podendo atuar também como braços espaçadores, devido ao tamanho da sua molécula, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico, o que pode favorecer o processo de adsorção, além de reduzir os custos das matrizes, visto que esse pigmento pode ser extraído com facilidade das folhas das plantas, pois estão ligadas a carotenoides, lipídios e lipoproteínas, através de ligações não-covalentes, que podem ser rompidas com facilidade, e por isso são facilmente extraídas com solventes orgânicos (Yilmaz e Gökmen, 2016; Derrien et al., 2017).

Inúmeros exemplos do potencial de aplicação de diferentes adsorventes na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados podem ser verificados na literatura (Carvalho et al., 2014; Erol et al., 2019, Trang et al., 2019; Riguero et al., 2020), porém nenhum estudo relata a utilização do pigmento extraído das folhas vegetais como agente quelante nas matrizes cromatográficas.

Assim, o presente estudo surge com uma proposta inovadora, com o objetivo de desenvolver um adsorvente polimérico macroporoso, funcionalizado com clorofila de origem vegetal, voltado para o processo de purificação da bromelina por cromatografia IMAC, comparando-o com o adsorvente ativado com agente quelante comercial (IDA) e caracterizá-lo com relação as condições

de adsorção, aspectos físicos, químicos e operacionais. O mesmo já possui registro (BR 10 2021 009055 3) para depósito de patente de invenção junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Acrilamida (AAm, Sigma CAS: 79-06-1, 99%), bis- acrilamida (BAAm, NEON, CAS: 110-26-9, 99%), alil-glicidil-éter (AGE, Sigma, CAS: 106-92-3, 99%), persulfato de amônio (APS, NEON, CAS: 7727-54-0, 98%), N,N,N',N'-tetrametiletenodiamino -TEMED (NEON, CAS: 110-18-9, 98,5%), borohidreto de sódio (Sigma, CAS: 16940-66-2, 98%), N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) -HEPES (Êxodo científica, CAS: 75277-39-3, 98%), imidazol (Êxodo científica, CAS: 288-32-4, 99%), ácido iminodiacético (Sigma, CAS: 142-73-4, 98%), fosfato de sódio monobásico (Sigma, CAS: 7558-807-7, 99%), fosfato de sódio bibásico (Sigma, CAS 7558-79-4, 99%), bromelina (Sigma, CAS: 37189-34-7,  $\geq 3$  unidades/mg de proteína), etanolamina (Sigma, CAS: 141-43-5, 99%), glutaraldeído (Dinâmica Química Científica, CAS: 111-30-8, 25% em H<sub>2</sub>O), etilenodiamina (Sigma, CAS: 107-15-3, 99%), água destilada. Todos os outros reagentes necessários para o desenvolvimento do trabalho possuíam, no mínimo, grau analítico PA-ACS, sendo descritos ao longo do detalhamento das metodologias.

Folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) foram adquiridas no mercado local do município de Itapetinga-Bahia e usadas para a obtenção do extrato de clorofila.

### 2.2. Preparo do extrato bruto de clorofila

O extrato de clorofila foi obtido a partir de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) usando métodos adaptados descrito por Fernandes et al. (2016), Derrien et al. (2017) e Singh et al. (2018). Ramos de espinafre (~700 g) foram lavados e higienizados com água clorada a 100 ppm por 15 min, sendo então as folhas separadas das hastes. Posteriormente foi realizada a secagem das folhas em estufa com circulação de ar (Solab Científica, SL 102, Brasil) a 45 °C por 24 h. Depois de seco o material (40 g) foi triturado em moinho de facas (Willye, Marconi, Brasil). Para a extração do pigmento, pesou-se 0,5 g do material seco, que foi misturado com 10 mL de solução de álcool metílico: água (70:30 v/v). A mistura foi colocada em banho ultrassônico (Sanders, Soniclean 6, Minas Gerais, Brasil) por 30 min a 37 °C e em seguida filtrada em papel-filtro Whatman nº 1, sendo

o resíduo reextraído mais duas vezes com o solvente para garantir extração completa. Todos os extratos foram reunidos e então centrifugados a 2630 xg por 10 min, e então concentrados em evaporador rotativo (IKA<sup>®</sup>HB Digital, RV8, USA) a 40 °C até a eliminação do álcool. Posteriormente foram acondicionados em frascos âmbar, e armazenados a  $\pm$  -18°C, até a utilização dos mesmos

### **2.3. Síntese dos criogéis monolíticos**

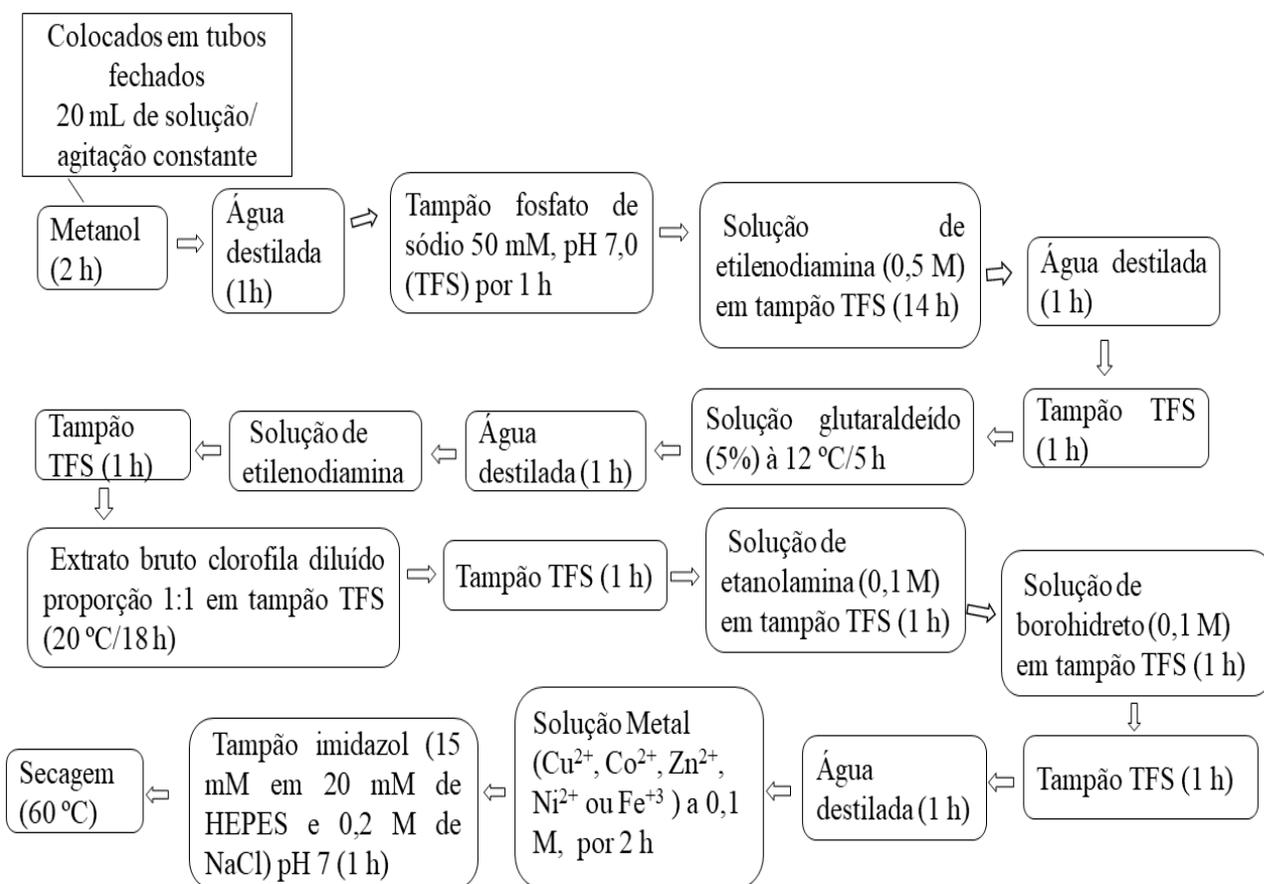
Para a síntese dos criogéis foram adotadas metodologias propostas por Gonçalves et al. (2016), Nascimento et al. (2019) e Silva et al. (2019), com modificações. Dissolveram-se 4,4 g de acrilamida (AAm), 1,2 g de bis- acrilamida (BAAm) e 1,4 g de alil-glicidil-éter (AGE) em 100 mL de água destilada, sendo a solução desgaseificada em banho ultrassônico por 5 min. Em seguida, com a solução em banho de gelo adicionou-se 140  $\mu$ L de solução de persulfato de amônio (APS) na concentração de 0,5 g/mL e 91  $\mu$ L de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED). Após homogeneização da solução, a mesma foi imediatamente vertida em seringas plásticas de 5mL, que foram seladas e mantidas em banho termostático (Modelo Q214S2; Quimis, São Paulo, Brasil) à temperatura de -12°C por 24 h. Decorrido esse período, as seringas foram abertas e mantidas a 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Posteriormente, as seringas contendo os criogéis foram colocadas em estufa a  $\pm$ 60 °C até secagem completa dos mesmos. Após a secagem, cada criogel foi submetido ao corte das extremidades para eliminação das partes defeituosas e lavados com cerca de 200 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica (Minipuls evolution, Gilson, Middleton, WI) a uma vazão de 1,5 mL/min e então novamente secos em estufa a  $\pm$ 60 °C, sendo posteriormente armazenados à temperatura ambiente ( $\pm$ 25 °C) em potes plásticos vedados para posterior uso no processo de funcionalização.

### **2.4. Funcionalização dos criogéis para purificação por afinidade por metal quelato**

#### **2.4.1. Funcionalização dos criogéis com extrato bruto de clorofila**

Para o processo de modificação da superfície e funcionalização com clorofila, foi adotada a metodologia de Gonçalves et al. (2016) e Silva et al. (2019), com modificações. Utilizou-se o método do glutaraldeído em sistema em batelada (Figura 1). Os monólitos poliméricos de criogéis secos, com cerca de 3,5 cm de altura, 1 cm de diâmetro, e peso médio de 260 mg, foram colocados em tubos fechados adicionados de 20 mL de cada solução e submetidos a agitação rotativa à 15 xg

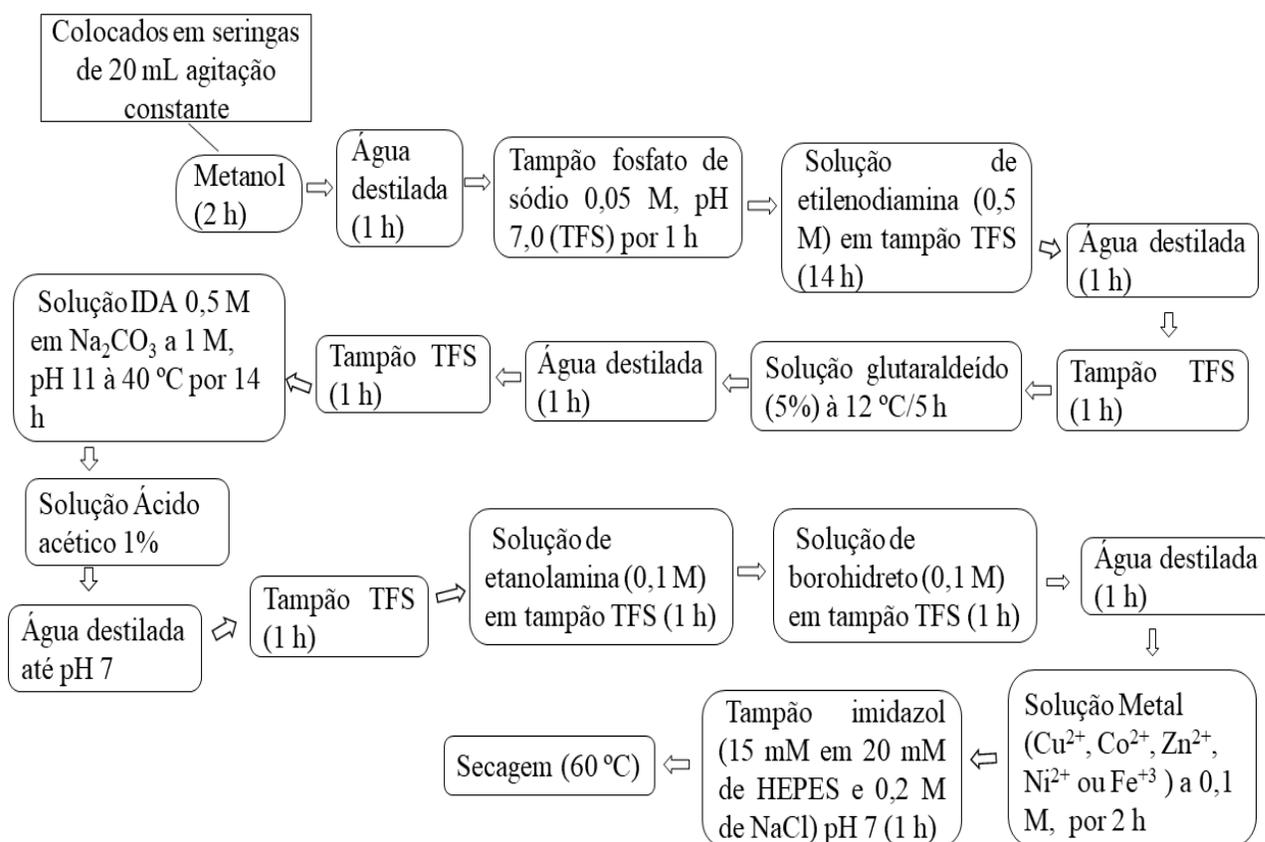
em todas as etapas do processo. A cada etapa realizada os criogéis sofreram uma suave compressão manual, para a retirada do excesso de solução da etapa anterior. A etapa em que as matrizes foram colocadas em contato com a solução do extrato bruto de clorofila (CLO) em tampão fosfato de sódio (TFS) foi realizada sob ausência de luz e à temperatura controlada ( $\pm 20$  °C). Na etapa em que os criogéis são colocados em contato com a solução de borohidreto os frascos permanecem abertos devido a formação de gases. Após a ativação os adsorventes foram colocados em estufa a 60 °C até serem completamente secos e armazenados em frascos herméticos em temperatura ambiente até o seu uso. Decorrida a secagem obteve-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de afinidade por íons metálicos. Foi solicitada a proteção intelectual das matrizes desenvolvidas junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, Brasil), a partir da solicitação do depósito de patente de invenção, registro número BR 10 2021 009055 3 (em anexo).



**Figura 1-** Esquema funcionalização criogéis ativados com clorofila

## 2.4.2. Funcionalização dos criogéis com ácido iminodiacético (IDA)

Para comparar a eficácia da clorofila como agente quelante, os criogéis foram funcionalizados com o agente quelante comercial ácido iminodiacético (IDA) de acordo com a metodologia adaptada de Carvalho et al. (2014), Gonçalves et al. (2016) e Silva et al. (2019), apresentado na Figura 2. Adotou-se uma metodologia similar em ambas as funcionalizações para obter uma melhor comparação entre a eficiência dos agentes quelantes, a inclusão dos braços espaçadores pode possibilitar uma maior imobilização do agente quelante. A modificação da superfície dos criogéis seguiu as condições descritas no item 2.4.1 até a etapa em que os monólitos são colocados em contato com a solução de glutaraldeído a 5 %.



**Figura 2-** Esquema funcionalização dos criogéis ativados com IDA

## 2.5. Quantificação de clorofila imobilizada nos monólitos de criogel

A determinação da concentração de clorofila (a, b e total) foi efetuada conforme método proposto por Lichtenthaler (1987). A quantidade de clorofila adsorvida na superfície do criogel foi

quantificada por diferença na solução de clorofila antes e após a recirculação no adsorvente. Utilizou-se leitura direta em espectrofotômetro (UV Q898, Quimis, São Paulo, Brasil), nos comprimentos de onda 647 nm e 663 nm, para as clorofilas a e b, respectivamente. As concentrações dos pigmentos foram determinadas de acordo com as equações 1, 2 e 3. Os resultados foram expressos em mg/100 mL de extrato.

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 12,25 A_{663} - 2,79A_{647} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 21,50 A_{647} - 5,10A_{663} \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total (Ct)} = 7,4 A_{663} + 20,7A_{647} \quad (3)$$

## 2.6. Quantificação de íons metálicos imobilizados nas matrizes cromatográficas

A quantificação dos íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ) imobilizados na superfície dos criogéis foi determinada de acordo metodologia proposta por Cheeks et al. (2009). Os íons metálicos foram removidos do adsorvente utilizando uma solução de EDTA 0,1 M pH 7,6. O complexo EDTA-metal foi medido por absorvância em espectrofotômetro (Cu-EDTA  $\lambda_{730}$ , Ni-EDTA  $\lambda_{590}$ , Co-EDTA  $\lambda_{490}$ , Zn-EDTA  $\lambda_{255}$ , Fe-EDTA  $\lambda_{510}$ ). Como branco a solução de EDTA foi percolada nos criogéis funcionalizados com ácido iminodiacético ou clorofila isentos de íons metálicos. Curvas de concentrações conhecidas (20 a 140 mM) dos metais em solução EDTA foram utilizadas para determinar o teor de metal imobilizado.

## 2.7. Estudos de adsorção

Estudos de adsorção foram realizados nos monólitos modificados com clorofila (CLO) ou IDA, e funcionalizados com os diferentes íons metálicos. Avaliou-se os efeitos do pH e concentração de sal (força iônica) na capacidade adsortiva, a fim de definir as condições de adsorção e seleção de uma matriz com um dos metais imobilizados para dar continuidade aos estudos. Primeiramente, foi avaliado o efeito do pH utilizando-se diferentes sistemas tampões (tampão acetato de sódio 20 mM para pH 4,0-5,0 e tampão fosfato de sódio para pH 6,0-8,0), isentos da adição de NaCl. O efeito da concentração de sal foi investigado a partir do melhor pH de adsorção para cada adsorvente funcionalizado, através da adição de cloreto de sódio (NaCl) no sistema tampão, em concentrações que variaram entre 0 e 1 M. Utilizou-se bromelina (Sigma, cod.

B4882,  $\geq 3$  unidades/mg de proteína,  $\geq 30$  % de proteína) em solução contendo aproximadamente 0,9 mg/mL de proteína, verificada utilizando-se o método de Bradford (1976).

Os adsorventes produzidos foram cortados com uma lâmina de aço em pequenos cubos com cerca de 1,5 mm de aresta. Pesou-se lotes de 30 mg, que foram colocados em tubos de centrifuga, em que foram adicionados 4 mL da solução de bromelina em tampão 20 mM na condição desejada, com três repetições. Os tubos foram mantidos sob agitação a 15 g por cerca de 12 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C. Posteriormente, retirou-se o líquido sobrenadante, e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) a 595 nm. A quantidade de proteína adsorvida foi determinada de acordo com a Equação 4:

$$q = (C_0 - C_e)V/m \quad (4)$$

*Em que  $q$  é a capacidade adsortiva do adsorvente ( $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{criogel}}$ );  $C_0$  e  $C_e$  são respectivamente as concentrações inicial e final de proteínas em solução ( $\text{mg}/\text{mL}$ );  $V$  é o volume de solução ( $\text{mL}$ );  $m$  é a massa de criogel seco utilizado.*

## **2.8. Caracterização dos criogéis**

Após a conclusão dos experimentos de adsorção e definido quais adsorventes seriam usados para dar continuidade aos estudos, seis monólitos não-ativados (controle) e seis dos que apresentaram melhor capacidade adsortiva foram utilizados para a caracterização.

A capacidade de inchamento (S) e o grau de expansão (ED) foram determinados de acordo com Gonçalves et al. (2016) e Fontan et al. (2017). A porosidade e frações constituintes foram avaliadas empregando a metodologia proposta por Plieva et al. (2004). Os resultados obtidos para os monólitos (controle) e funcionalizados com metal quelato foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de médias de Tukey ao nível de significância ( $p = 0,05$ ) para verificar se havia diferença entre eles.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV), e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas conforme os métodos utilizados por Silva et al. (2019). A perda de massa dos criogéis foi avaliada através da análise termogravimétrica (TGA) utilizando-se um calorímetro STA Pt 1000 TG-DSC/DTA (Linseis, Alemanha), aproximadamente 8 mg de cada criogel foi colocado em um cadinho de alumínio, onde as amostras foram submetidas ao aquecimento da temperatura de 20 °C até 700 °C, com uma taxa de aquecimento de 10° C/min

e uma atmosfera de oxigênio. Os padrões de difração de raios X (DRX) foram registrados em um difratômetro de raios-x (Bruker, D2 Phaser) usando radiação com um comprimento de onda de 1,54184 Å, a 30 KV e 10 mA, com uma varredura de 5° a 90° (2θ) a uma taxa de 4°/min. Para melhor entendimento das características do criogel funcionalizado com clorofila, foram avaliados os padrões de DRX das folhas de espinafre secas, e a espectroscopia FTIR do extrato de clorofila, ambos nas mesmas condições descritas para os adsorventes.

### **2.8.1. Avaliação do potencial de utilização dos monólitos produzidos**

Após selecionar o tratamento de funcionalização com íons metálicos que apresentou a melhor capacidade adsorptiva, avaliou-se o potencial de uso dos monólitos produzidos nessa condição, por meio da análise da atividade enzimática, associada a novos ensaios de adsorção. O processo de adsorção foi realizado conforme descrito no item 2.6, utilizando como modelo a bromelina em solução tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0) contendo 0,9 mg/mL de proteína, verificada através do método de Bradford (1976). Após o período de contato da proteína com o adsorvente, retirou-se o sobrenadante para avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática. Na sequência, a eluição da proteína adsorvida foi realizada utilizando-se uma solução tampão de imidazol (200 mM, pH 7,6) por uma hora. O sobrenadante foi coletado e avaliado a concentração de proteínas, atividade enzimática, atividade específica e análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Posteriormente, os adsorventes foram lavados com água destilada, e mantidos em contato com uma solução de sulfato de cobre 0,1 M por uma hora. Em seguida, lavou-se os criogéis com água destilada e então com solução tampão imidazol (15 mM em 20 mM de HEPES e 0,2 M NaCl, pH 7,0) para remover os íons não imobilizados. O procedimento descrito para adsorção e eluição foi repetido sete vezes com três repetições, para avaliar os ciclos de reutilização da coluna produzida.

#### **2.8.1.1. Atividade enzimática proteolítica**

A atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada de Devakate et al. (2009), utilizando-se caseína como substrato. Os sobrenadantes coletados e a solução de alimentação (0,5 mL) foram adicionados a 5 mL de solução de caseína 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0). A mistura foi incubada a 37 °C em banho termostático (Tecnal, modelo Te-

184) por 10 min. Para parar a reação foi adicionado 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético a 30%, e a solução foi centrifugada a 2000 xg por 10 min para remoção do precipitado, e a absorbância do sobrenadante medido a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina equivalente em 1 mL de meio reacional por minuto, calculada de acordo com a equação 5.

$$AP(U) = \frac{(\mu\text{mol/mL de tirosina}) * \text{fator de diluição} * \text{volume reacional(mL)}}{\text{Volume da amostra(mL)} * \text{tempo de reação (min)}} \quad (5)$$

A atividade enzimática específica foi determinada de acordo com a equação 6, e o fator de purificação (FP) dado pela equação 7, que compara atividade enzimática específica no material purificado com a atividade enzimática específica do material bruto.

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\text{Atividade enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de proteína (mg/mL)}} \quad (6)$$

$$FP = \frac{\text{Atividade específica do eluido (U/mg)}}{\text{Atividade específica do extrato bruto (U/mg)}} \quad (7)$$

### 2.8.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada segundo metodologia proposta por Laemmli (1970), com modificações. Para isso, utilizou-se gel de separação com 12% de concentração e gel de empilhamento com 5% de concentração de poliacrilamida. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  das amostras desnaturadas foram transferidas para cada poço do gel, de modo que a quantidade de proteína aplicada foi de aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ , e as corridas realizadas a uma tensão constante de 100 V (Loccus, LPS 300V, Brasil). Foi usado o padrão de peso molecular SDS-PAGE (Bio-rad, Hercules, CA, EUA), composto por Miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,5 kDa,) e aprotinina (6,5 kDa). Após a corrida, as proteínas foram coradas usando solução de 0,1% (m/v) de Coomassie Blue G-250.

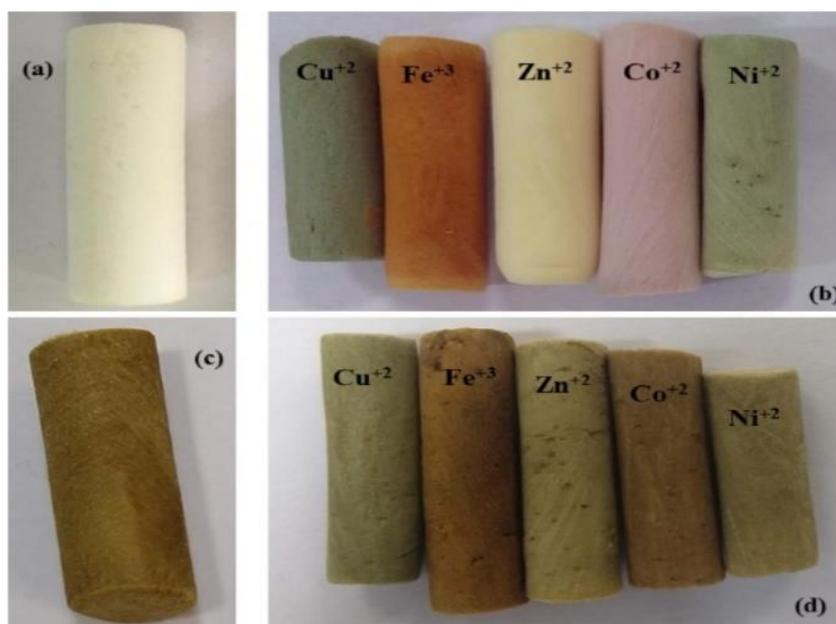
## 2.9. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey ao nível de significância de ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Síntese e funcionalização dos adsorventes produzidos

Imagens dos criogéis produzidos e posteriormente ativados com clorofila ou ácido iminodiacético, imobilizados com diferentes metais são apresentados na Figura 3.



**Figura 3-** Imagens dos criogéis produzidos. (a) controle sem ativação, (b) ativados com ácido iminodiacético (IDA) e funcionalizados com os diferentes metais, (c) ativado com clorofila (CLO) sem imobilização dos metais, (d) ativados com CLO e funcionalizados com os metais.

Os adsorventes produzidos apresentaram estrutura cilíndrica devido ao molde usado, rígida quando desidratados, uniforme e porosa. Quando umedecidos apresentaram-se esponjosos, elásticos e de aspecto macio. Tais características vêm sendo descritas como características dos monólitos de poliacrilamida, como relatado por diversos autores (Mól et al., 2019; Nascimento et al., 2019; Farías et al., 2020; Yang et al., 2020).

Os monólitos ativados com IDA, apresentaram diferentes colorações compatíveis com o metal utilizado (Figura 1b). Enquanto, as matrizes ativadas com clorofila (Figura 1d) apresentaram coloração na tonalidade tendendo ao verde castanho independente do metal utilizado, cor característico do pigmento, como pode ser observado no criogel imobilizado com clorofila sem interferência dos íons metálicos (Figura 1c).

### 3.2. Quantidade de clorofila imobilizada no criogel

A quantidade de clorofila no extrato bruto e imobilizada na superfície do adsorvente polimérico estão apresentados na Tabela 1. Pode ser observado que cerca de 45,25 mg de clorofila/g de criogel seco foi imobilizada na superfície deste, esses valores indicam que aproximadamente 59% do pigmento presente na solução do extrato foi imobilizado na matriz, o que pode ser comprovado ao analisar os teores de clorofila remanescentes na solução após o contato com o criogel. Tais resultados indicam a ativação dos adsorventes com a imobilização de clorofila utilizando o extrato vegetal.

**Tabela 1-** Quantidade de clorofila no extrato bruto de espinafre, na solução de extrato em TFS colocado em contato com criogel, e do pigmento imobilizado na superfície do criogel

	<b>Extrato Bruto</b> (mg/100 mL)	<b>Extrato em TFS</b> <b>(1:1)</b> (mg/100 mL)	<b>Após contato</b> <b>com o criogel</b> (mg/100 mL)	<b>Imobilizado</b> <b>no criogel</b> (mg/g)	<b>% de</b> <b>imobilização</b>
<i>Clorofila a</i>	138,44±0,25	71,60±0,09	31,74±0,09	30,87±0,46	56,06±0,38 <sup>a</sup>
<i>Clorofila b</i>	53,96±0,06	28,12±0,01	10,81±0,05	13,32±0,65	60,15±0,75 <sup>a</sup>
<i>Total</i>	193,91±0,35	100,52±0,09	41,73±0,19	45,25±0,56	58,72±0,45

Valores médios ± desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente, entre si pelo teste F ( $p \geq 0,05$ )

A concentração de clorofila total obtida para o extrato bruto de 193,9 ±0,35 mg/100 mL foi superior ao reportado na literatura por Bohn et al. (2004) que obtiveram 79,1 mg/100 mL ao analisarem folhas de espinafre fresco, Derrien et al. (2017) e Derrien et al. (2019) que encontraram valores na faixa de 112,75 mg/100 mL ao trabalharem com espinafre liofilizado. Essa diferença pode ser justificada devido aos diferentes métodos analíticos utilizados para a extração do pigmento (Rouphael et al., 2012).

A razão entre a clorofila a e b no extrato bruto foi de 2,56 :1, as clorofilas a e b são os tipos mais abundantes nas plantas superiores, e geralmente estão presentes em proporções médias de 2,5 a 3:1. No entanto, essa relação pode variar de acordo com fatores ambientais e genéticos (Silva et al., 2015; Yilmaz e Gökmen, 2016). As clorofilas “a” e “b” diferem uma da outra devido a um radical diferente no segundo anel pirrólico (Anel B) na posição C<sub>7</sub> (Yilmaz e Gökmen, 2016). A primeira tem um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) na posição C<sub>7</sub>, enquanto, a clorofila b possui um grupo aldeído (-CHO), apesar dessa diferença estrutural, a proporção entre a clorofila b (60%) e clorofila a (56%) imobilizadas na superfície do criogel não diferiram estatisticamente entre si. O processo de funcionalização ocorre por meio da formação de bases de Schiff sequenciais entre os radicais carbonila e radicais amino, e a presença da carboxila no quarto anel e dos grupos oxigenados presentes no quinto anel isocíclico permitiram a imobilização do pigmento no monólito, além do grupo aldeído da clorofila b que contribuiu para a adsorção da clorofila na superfície do criogel. As ligações entre as moléculas de clorofila são muito frágeis, e por isso, se rompem com facilidade quando expostos à tratamentos térmicos ou pH extremos, o que permite a formação de derivados distintos, como a clorofidila ou feoforbídeo proveniente da remoção da cadeia fitol (Yilmaz e Gökmen, 2016; Kang et al., 2018). O processo de secagem das folhas vegetais pode ter proporcionado o rompimento da longa cadeia de fitol, deixando expostos radicais hidroxilas presente no quarto anel pirrole da estrutura, que pode ter facilitado a imobilização eficiente da clorofila no criogel.

### **3.3. Quantidade de íons metálicos imobilizados nas matrizes**

Os teores dos íons metálicos imobilizados na superfície dos adsorventes produzidos estão apresentados na Tabela 2. Observou-se diferença estatística entre os criogéis funcionalizados com IDA e CLO para aqueles imobilizados com íons de zinco, cobre ou níquel.

Valores inferiores aos obtidos neste estudo foram reportados por You et al. (2020) que obtiveram o teor de 153,9 µM/g para suportes epóxi a base de sílica ativados com IDA e imobilizados com íons de cobre. Já Erol et al. (2019) ao avaliarem criogéis poli (HEMA-GMA) imobilizados com íons de cobre e zinco encontraram valores na faixa de 216, 6 a 238, 1 µM/g e 158 a 170 µM/g, respectivamente.

**Tabela 2-** Teor dos íons metálicos imobilizados na superfície dos criogéis funcionalizados com ácido iminodiacético (IDA) e clorofila extraído do espinafre (CLO)

Criogel	Íons metálicos ( $\mu\text{M/g}$ )				
	$\text{Ni}^{+2}$	$\text{Fe}^{+3}$	$\text{Co}^{+2}$	$\text{Zn}^{+2}$	$\text{Cu}^{+2}$
IDA	131,51 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	74,13 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	85,75 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	129,99 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	173,33 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>
CLO	110,33 $\pm$ 2,39 <sup>b</sup>	69,90 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	86,00 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	164,25 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	209,15 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>

As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente, entre si pelo teste F ( $p \geq 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  desvio padrão

Valores inferiores também foram observados por Uygun et al. (2015) ao analisarem criogéis de poli (acrilamida-glicidil-metacrilato) funcionalizados com IDA e íons de ferro encontrando uma concentração de 59,8  $\mu\text{M/g}$  e Qu et al. (2011) que obtiveram uma capacidade de imobilização de íons de níquel de 40,5  $\mu\text{M/g}$  em microesferas IMAC a base de agarose ativadas com IDA. A capacidade de imobilização dos metais pode ser influenciada pelo tipo de tampão, pH, concentração dos íons metálicos utilizados durante a funcionalização das matrizes, o que pode justificar a diferença nos valores observados (Chang e Sun, 2017). Entretanto, os resultados demonstram que a clorofila pode ser utilizada como agente quelante em suportes cromatográficos IMAC, uma vez que os resultados mostram valores iguais ou superiores ao determinado para os criogéis com IDA.

Os íons metálicos apresentam configurações eletrônicas com poucos elétrons de valência e alguns orbitais vazios. Quando perdem seus elétrons de valência, seus orbitais vazios podem receber pares de elétrons de outra espécie, resultando em uma ligação de coordenação. Na cromatografia IMAC os íons metálicos são imobilizados junto ao agente quelante por meio de ligações de coordenação entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do ligante (Shi et al., 2019).

Segundo Chang e Sun (2017) a estabilidade dos complexos de metal para os íons de transição segue uma tendência  $\text{Fe}^{+3} < \text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Ni}^{+2} < \text{Cu}^{+2}$ , o que sugere que os íons de cobre formam complexos mais estáveis. Essa sequência foi observada para os suportes imobilizados com o IDA, entretanto, aqueles contendo clorofila houve uma inversão sequencial entre os íons de níquel e zinco.

De modo geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados, o ácido iminodiacético é um agente quelante tridentado (possui um átomo de nitrogênio e dois de oxigênio para a coordenação), enquanto a clorofila é um agente tetradentado (possui quatro átomos de nitrogênio para coordenação), o fato de o zinco ter uma afinidade por ligantes contendo nitrogênio e enxofre como átomos doadores, pode ter contribuído para o maior teor imobilizado pela clorofila (Erol et al., 2019).

Além disso, o número de ligações de coordenação e a preferência geométricas dos íons também deve ser levado em consideração. A relação entre a espécie central e seus ligantes em um complexo podem ser agrupadas de acordo com o número de coordenação da espécie central. O cobalto e o ferro se ligam de forma hexacoordenada, possuindo geometria octaédrica, já os complexos de níquel podem adotar geometria quadrática ou octaédrica a depender do ligante presente. O zinco é o único metal que apresenta todos os orbitais do subnível “d” preenchido, e geralmente, apresenta geometria tetraédrica. A diversidade química do cobre concede a este elemento a possibilidade de formar complexos com várias geometrias, como quadrática planar, tetraédrica, octaédrica, piramidal de base quadrática, bipiramidal trigonal, a depender do agente quelante utilizado, esse fator pode justificar o fato dos quelantes formados com esse elemento serem mais estáveis (Chang e Sun, 2017).

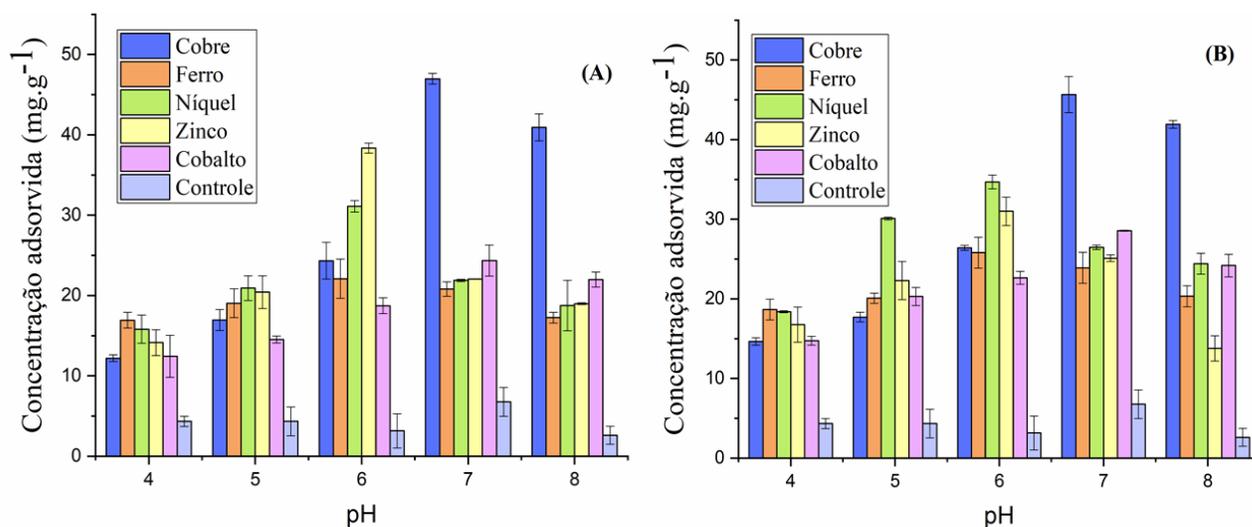
O arranjo dos ligantes ao redor do íon central é influenciado, também, pelo tamanho do ligante, complexos tetraédricos são favorecidos quando o átomo central é pequeno e os ligantes são grandes, o que pode justificar o maior teor dos íons de cobre e zinco imobilizados nas matrizes com clorofila, além disso, em um complexo tetraédrico, os quatro ligantes ocupam os vértices de um tetraedro regular, e todas as posições são equivalentes, a presença dos quatro átomos de nitrogênio de ligação central disponíveis para coordenação, podem ter contribuído para imobilização dos íons metálicos com essa preferência geométrica. Já os complexos de geometria quadrado-planar são favorecidos por ligantes menores, o que explica maior imobilização dos íons de níquel nas matrizes com IDA, pois esse ligante é menor comparado a molécula de clorofila. A regra do número atômico efetivo (NAE) diz que quando se forma um complexo, há adição de ligantes até que o número de elétrons do átomo metálico central mais o número de elétrons cedidos pelos ligantes seja igual ao número de elétrons do gás nobre seguinte, para os íons (cobalto e ferro) que se agrupam de forma hexacoordenada, devido ao maior número de coordenação pode ter ocorrido impedimento estérico dos ligantes polidentados, havendo repulsão ligante-ligante, proporcionando uma menor imobilização dos metais (Hartshorn e Constable, 2021; Juraj e Kirin,

2021). Portanto, a distribuição eletrônica dos metais, seu tamanho, estrutura geométrica, estado de oxidação e disponibilidade do doador de elétrons pode influenciar na imobilização dos metais ao ligante quelante, e conseqüentemente na estabilidade dos complexos formados.

### 3.4. Estudos de adsorção

#### 3.4.1. Efeito do pH e concentração de sal na capacidade de adsorção

Os resultados obtidos para o efeito do pH na adsorção da bromelina estão apresentados na Figura 4. É possível observar que houve diferença para o pH ótimo de adsorção a depender do metal utilizado. O comportamento entre os criogéis imobilizados com o extrato vegetal de clorofila e aquele com ácido iminodiacético não diferiram estatisticamente apenas para os íons de cobre e zinco, no entanto, o pH ótimo de adsorção não diferiu entre as duas matrizes imobilizadas com o mesmo íon metálico, o que evidencia o potencial do pigmento da clorofila como agente para imobilização de metais em adsorventes. Os monólitos com CLO modificados com íons de  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Fe^{+3}$  apresentaram maior capacidade de adsorção da bromelina em torno do pH 6, enquanto para os adsorventes com  $Cu^{+2}$  e  $Co^{+2}$  a maior adsorção ocorreu em pH 7.



**Figura 4-** Efeito do pH na adsorção de bromelina nos adsorventes ativados com clorofila (A) e com IDA (B) de afinidade por íons metálicos (IMAC)

O pH desempenha um papel complexo na adsorção de proteínas, pois influencia uma série de propriedades, incluindo o comportamento nucleofílico dos componentes do tampão,

propriedades dos solutos doadores de elétrons, e estabilidade do metal (Eldin et al., 2017; Han et al., 2019). A estabilidade dos quelatos de metal pode ter sido alterada com a mudança do pH, o que pode ter influenciado para o máximo de adsorção da enzima ocorrer em pH diferente a depender do íon metálico. A estabilidade de um complexo com metal depende da estrutura atômica dos metais quelatos, como já dito anteriormente, e está relacionado à distribuição eletrônica, o número de orbitais vazios e à preferência geométrica de cada metal. Portanto, apesar desses metais possuírem características similares, apresentando o mesmo número de níveis de energia, podem se comportar de maneira distinta a depender do pH (Morato, 2014). Geralmente os complexos de metais são instáveis em condições extremamente ácidas ou básicas, podendo ocorrer a dissociação da coordenação do agente quelante com o íon metálico. A protonação do nitrogênio do agente quelante torna esse átomo menos disponível para a coordenação, o que pode explicar a diminuição da capacidade de adsorção das matrizes nessas condições (Borsoi-Ribeiro et al., 2013, Han et al., 2019). Outros autores já relataram essa diferença de comportamento entre os quelatos metálicos formados com o mesmo agente quelante, Sharma e Agarwal (2012) mostraram o efeito do pH nas ligações de coordenação de IDA com  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$  e verificaram que o níquel apresentou menor lixiviação em pH 6 e que o cobre foi estável em uma faixa de pH de 6-9, similar aos resultados obtidos nesse estudo.

Nos processos de cromatografia IMAC, a adsorção ocorre principalmente por meio da afinidade mais forte dos resíduos de histidina pelos íons metálicos, entretanto, a cisteína e resíduos adjacentes dos aminoácidos podem contribuir para a retenção da proteína (Acet et al., 2018). As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da histidina, cisteína, glutamato e ácido aspártico presente na superfície da bromelina são os que provavelmente podem interagir com os íons metálicos. Os resíduos de histidina apresentam um pK<sub>r</sub> em torno de 6 o que pode ter contribuído para o máximo de adsorção da bromelina ocorrer em pH entre 6 e 7, pois os resíduos de histidina estão parcialmente desprotonados, aumentando a ligação específica com os íons imobilizados (Acet et al., 2019). Com relação a cisteína (pK<sub>r</sub>=8,18) na faixa de pH 6 a 7 sua cadeia lateral está protonada e possuem um par de elétrons disponíveis para a coordenação com o metal quelato, entretanto a contribuição para a adsorção da enzima pode ter sido de pouca relevância, devido aos efeitos de repulsão eletrostática entre o metal e o resíduo da cisteína. As cadeias laterais do ácido aspártico (pK<sub>r</sub>=3,6) e do glutamato (pK<sub>r</sub>=4,2) estão desprotonados na faixa de pH em que ocorreu maior adsorção, e podem ter contribuído de forma relevante para a interação da proteína com o criogel. Apesar de em pH 8 mais pares de elétrons estarem disponíveis (de ambos resíduos de

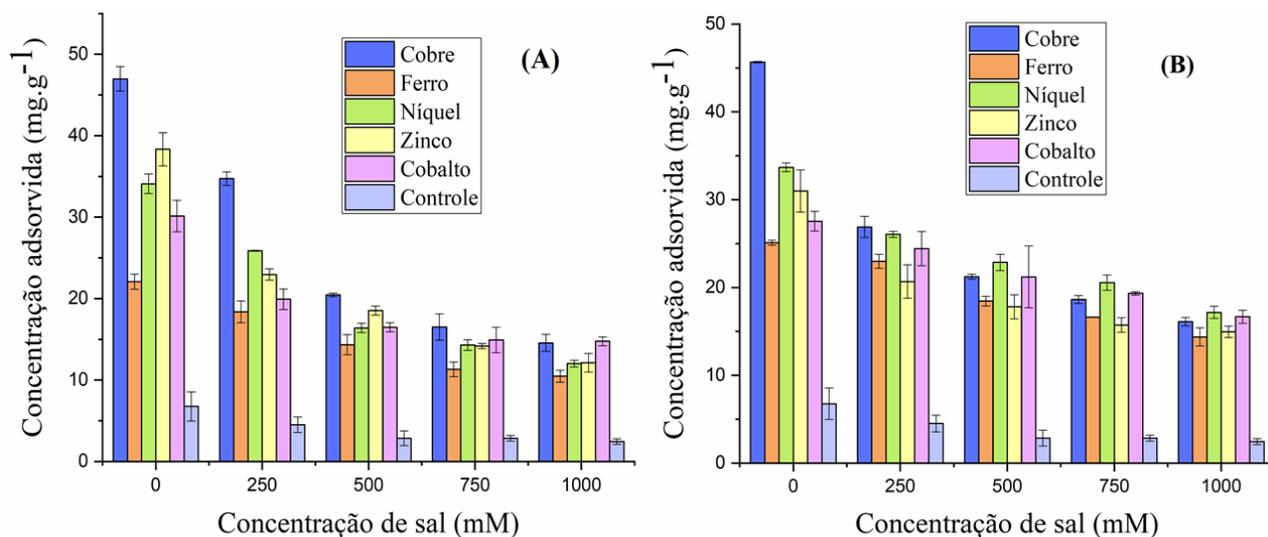
histidina e cisteína) para formarem ligações de coordenação entre a bromelina e o criogel, a instabilidade do quelato de metal pode ter influenciado para uma menor adsorção, em relação ao pH 6 e 7. Essa instabilidade também pode ter contribuído para o comportamento diferente da adsorção nos diferentes valores de pH para cada íon metálico. Os resultados foram consistentes com outros estudos na literatura em que se trabalhou com cromatografia de afinidade por íons metálicos, como Akduman et al. (2013) ao avaliar adsorventes IMAC com íons de  $Zn^{+2}$  para purificação de álcool desidrogenase, verificaram que a capacidade adsorviva aumentou com o aumento do pH de 4-6, e diminuiu em pH superior a esse valor. Eldin et al. (2017), Gu et al. (2018), Acet et al. (2019), Han et al. (2020), que verificaram uma capacidade máxima de adsorção de proteínas (quitinase His-Tag, papaína, lisozima, bromelina, respectivamente) em torno do pH 7 para matrizes com íons de  $Cu^{+2}$ . Qiu et al. (2020) relatam que em adsorventes imobilizados com íons de  $Co^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  o pH de adsorção máxima de lipase pancreática foi próximo a neutralidade. Han et al. (2019) reportam um aumento na capacidade de adsorção de bromelina em pH 6 para microesferas IMAC com íons de  $Ni^{+2}$  imobilizados. Coutinho et al. (2020), ao analisarem as condições de adsorção de xilanases em matrizes com quelatos de íons  $Ni^{+2}$ , verificaram um ponto máximo de adsorção em pH próximo a 6.

Na IMAC, as ligações são favorecidas quando grupos ionizáveis doadores de elétrons dos resíduos de aminoácidos presentes na biomolécula são parcialmente desprotonados, ou seja, quando o pH da solução está acima do  $pK_a$  dos grupos ionizáveis (Carvalho et al., 2016). De modo geral, o pH ideal de adsorção depende dos grupos doadores de elétrons e do íon metálico envolvido nas interações. Geralmente a adsorção é favorecida numa faixa de pH entre 6 e 8 para as proteínas que possuem resíduos de histidinas e cisteínas quando se utiliza íons de  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ou  $Co^{+2}$  (Vera-Aviles et al., 2018; Inanan, 2019).

Os adsorventes imobilizados com íons de cobre apresentaram o maior valor de bromelina adsorvida no pH de maior capacidade adsorviva, quando comparado com os monólitos imobilizados com os outros íons metálicos. Segundo Chang e Sun (2017), no caso dos agentes quelantes como IDA, NTA e o tris(carboximetil)etilenodiamina (TED), geralmente a sequência  $Cu^{+2} > Ni^{+2} > Zn^{+2} > Co^{+2} > Fe^{+3}$  representa a ordem decrescente de afinidade dos íons metálicos, essa mesma sequência foi observada no estudo ao comparar o máximo de adsorção da bromelina para cada íon metálico. Em geral, os adsorventes IMAC carregados  $Cu^{+2}$  e  $Ni^{+2}$  exibem afinidade mais forte para proteínas marcadas com histidina. Entretanto, para o criogel ativado com o extrato de clorofila, o  $Cu^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  foram os que apresentaram maior capacidade de adsorção, e consequentemente

afinidade mais intensa. Essas mesmas relações foram verificadas para a capacidade de imobilização dos metais, o que pode ter contribuído para este resultado, como já relatado anteriormente, os íons de zinco possuem afinidade por ligantes de nitrogênio, o que justifica a maior quantidade desse metal imobilizado na matriz com clorofila e maiores valores para a capacidade de adsorção da enzima. Portanto as propriedades do centro de adsorção estão relacionadas ao agente quelante utilizado (Erol et al., 2019).

Quanto ao efeito da concentração de sal (Figura 5), foi observado que a capacidade adsorviva é reduzida com a adição de NaCl. A diminuição da adsorção com o aumento da concentração de sal, indica a predominância das interações eletrostáticas em relação as interações por coordenação. Assim, os íons do NaCl (aq) mascaram as cargas opostas entre a proteína e a coluna cromatográfica, ou até mesmo neutralizam as cargas superficiais da proteína, tornando a estrutura do centro ativo das enzimas menos disponíveis (Acet et al., 2019). Resultados semelhantes foram observados por Uygun et al. (2015); Acet et al. (2019); Erol et al. (2019); Han et al. (2019); Öztürk et al. (2021) para diferentes proteínas adsorvidas em suportes IMAC.



**Figura 5-** Efeito da concentração de sal na adsorção da Bromelina nos adsorventes funcionalizados com a clorofila (A) e com o IDA (B). Para o  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$  em pH 7,0;  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  em pH 6,0.

De fato, o comportamento de adsorção reflete a natureza das interações físico-químicas entre a proteína e os sítios de ligação disponíveis dos criogéis. De acordo com Han et al. (2019), a mudança do pH e da força iônica do tampão pode induzir a mudanças na carga líquida, distribuição de carga, estrutura conformacional das moléculas de proteína, e até mesmo a carga líquida de

coordenação de metal, e assim alterar as capacidades de ligação. Esses fatores podem justificar os resultados obtidos neste estudo.

Como os criogéis imobilizados com cobre apresentaram maior capacidade de adsorção, foi dada a continuidade aos estudos na avaliação dos aspectos físicos e químicos destes suportes produzidos.

### 3.5. Caracterização das matrizes produzidas

#### 3.5.1. Capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e morfologia

Os valores médios obtidos para as propriedades avaliadas das matrizes produzidas, funcionalizadas com cobre, são apresentados na Tabela 3. Observou-se que para a capacidade de inchamento (S) e o grau de expansão (ED) do criogel houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o controle e os monólitos funcionalizados, entretanto os adsorventes funcionalizados não diferiram estatisticamente entre si, o que indica que a clorofila não interferiu nas propriedades físicas do criogel de modo diferente se comparado ao agente quelante comercial.

**Tabela 3-**Caracterização dos criogéis não funcionalizados e modificados com ácido iminodiacético (IDA) e extrato vegetal de espinafre (CLO)

Parâmetros	Controle	Modificados	
		IDA-Cu <sup>+2</sup>	CLO-Cu <sup>+2</sup>
<i>S (kg/kg)</i>	16,61±2,01 <sup>a</sup>	12,40±1,93 <sup>b</sup>	11,53±3,4 <sup>b</sup>
<i>ED (L/kg)</i>	18,33±2,63 <sup>a</sup>	14,86±1,99 <sup>b</sup>	15,41±2,66 <sup>b</sup>
<i>Fração de macroporos</i>	0,81±0,04 <sup>a</sup>	0,79±0,03 <sup>a</sup>	0,77±0,06 <sup>a</sup>
<i>Fração de meso/microporos</i>	0,10±0,04 <sup>a</sup>	0,08±0,02 <sup>a</sup>	0,07±0,03 <sup>a</sup>
<i>Fração de água ligada</i>	0,02±0,00 <sup>c</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,06±0,00 <sup>a</sup>
<i>Fração de polímero seco</i>	0,06±0,00 <sup>b</sup>	0,07±0,01 <sup>ab</sup>	0,08±0,02 <sup>a</sup>
<i>Porosidade total</i>	0,92±0,00 <sup>a</sup>	0,88±0,01 <sup>b</sup>	0,85±0,02 <sup>c</sup>

As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente, entre si pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Valores médios ± desvio padrão

A capacidade de inchamento é uma medida de expansão do criogel e quanto maior o seu valor, mais flexíveis são as matrizes e menos resistentes a pressões antes de sofrerem deformações.

O grau de expansão é importante, pois fornece a relação entre a massa do criogel seco e o volume que o mesmo ocupa quando hidratado em condições operacionais (Gonçalves et al., 2016; Fontan et al., 2017). Os valores reduzidos de S e ED obtidos para os criogéis modificados podem ter ocorrido devido a redução do espaço entre os poros e o fortalecimento das ligações cruzadas após a funcionalização, tornando-os menos maleáveis (Gonçalves et al., 2016).

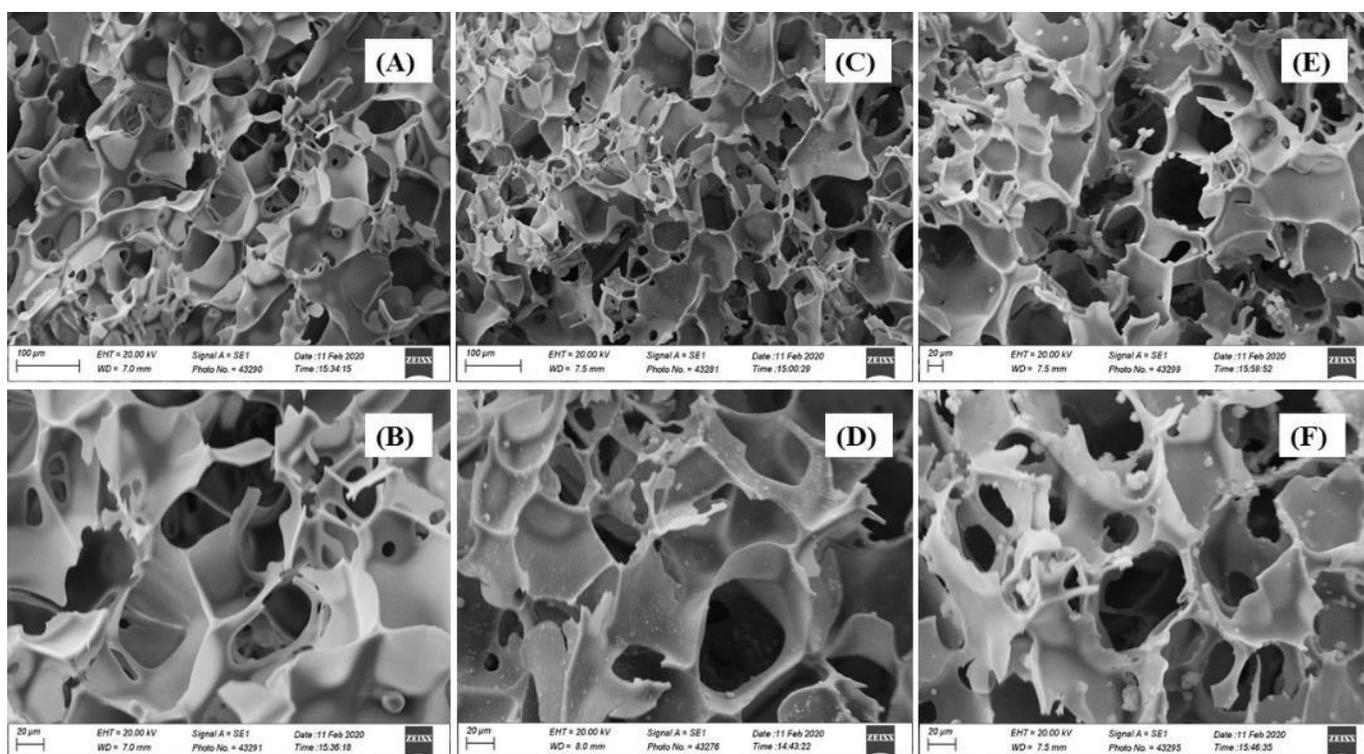
Os valores obtidos demonstram que os adsorventes ocupam um grande volume quando hidratado e reforçam a natureza porosa de sua estrutura, conforme descrito por Fontan et al. (2017). Os resultados encontrados estão de acordo com o reportado para criogéis de poliacrilamida em diversos estudos da literatura em que os autores relatam valores que variam entre 11,18 a 21,66 kg/kg para a capacidade de inchamento, e uma faixa de 12,7 a 25,30 L/kg para o grau de expansão (Fontan et al., 2017; Gonçalves et al., 2017; Nascimento et al., 2019; Silva et al., 2019; Farías et al., 2020; Neves et al., 2020).

A partir da metodologia adotada, foi possível avaliar duas frações de poros distintas nas matrizes. A fração de macroporos com diâmetro acima de 1  $\mu\text{m}$  em que dominam processos convectivos de transferência de massa. E a fração de micro e mesoporos com diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  que dominam processos difusos de transferência de massa (Gonçalves et al., 2016). A estrutura macroporosa possibilita que a interação entre as fases estacionária e móvel seja superficial, permitindo um maior contato das soluções com todo o adsorvente, permitindo o escoamento desobstruído de soluções viscosas e não clarificadas, predominando a transferência de massa por convecção. Assim, os monólitos produzidos apresentam uma grande fração de macroporos, que formam canais interconectados entre si, por onde a fase móvel é deslocada, causando menor perda de carga e elevada permeabilidade quando comparados às colunas cromatográficas tradicionais (Kartal e Denizli, 2020).

Com o processo de funcionalização, observou-se que houve uma redução da porosidade total ( $p < 0,05$ ), e que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para as frações de poros. A alteração na distribuição de poros indica que provavelmente os espaços contidos inicialmente nos poros foram reduzidos, devido à inclusão dos braços espaçadores no processo de funcionalização. Apesar dos criogéis modificados diferirem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) para a porosidade total, e aquele ativado com clorofila apresentar menor valor, ainda assim, a porosidade manteve-se elevada com valores em torno de 85%, e a maior parte da estrutura dos criogéis é composta por macroporos interconectados (igual ou superior a 77%), o que potencializa a sua utilização em processos de purificação de macromoléculas a partir de meios menos clarificados.

A fração de água ligada e a fração de polímero seco juntos formam as paredes dos poros, os resultados demonstram que a ativação e posterior imobilização podem influenciar na fração total de água e porosidade das matrizes. Os resultados obtidos para a porosidade e suas frações são compatíveis com os de outros estudos que reportam um intervalo de 71 a 94% ao trabalharem com criogéis de poliacrilamida (Carvalho et al., 2014; Gonçalves et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Guven et al., 2018; Nascimento et al., 2019; Silva et al., 2019).

A avaliação morfológica dos adsorventes produzidos foi realizada através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens (Figura 6) dos criogéis mostram a estrutura porosa com poros grandes interconectados com diâmetro variando entre 15  $\mu\text{m}$  e 96  $\mu\text{m}$ , uniformemente distribuídos, com paredes lisas e finas, estando de acordo com o reportado por diversos autores (Fontan et al., 2017; Gonçalves et al., 2017; Acet et al., 2018; Acet et al., 2019; Silva et al., 2019; Farías et al., 2020).



**Figura 6**-Imagem de MEV das matrizes controle (A e B), funcionalizadas com clorofila (C e D) e com IDA (E e F). Aumento: 350x (A, C); 400x (E); 750x (B, D e F).

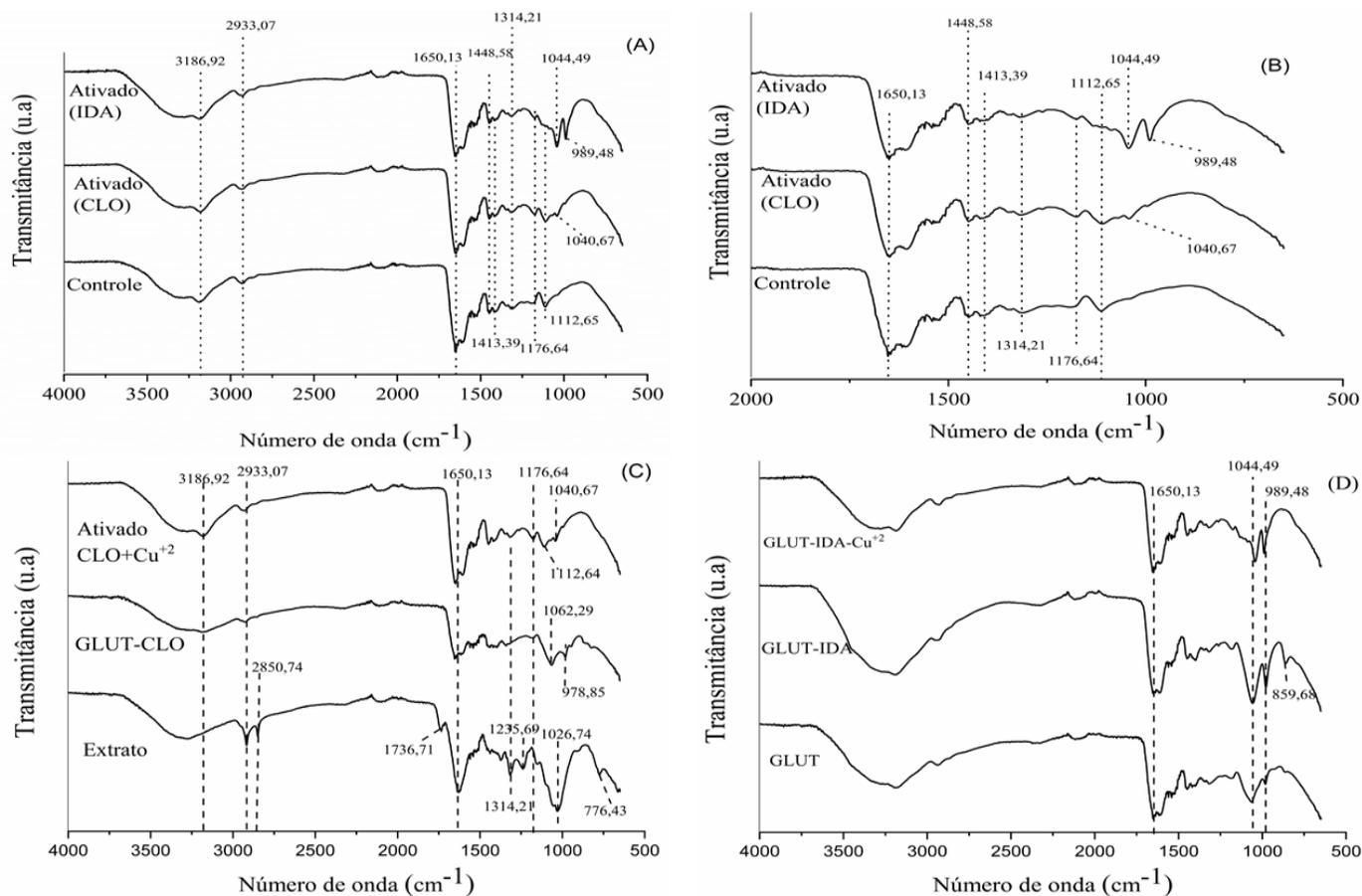
Os poros observados permitem a passagem tanto de macromoléculas, como de fragmentos celulares, células microbianas, e também de soluções concentradas e não clarificadas, o que facilita

os processos de purificação reduzindo o número de etapas (Yavuz e Denizli, 2015; Mourão et al., 2019).

Observa-se também a diferença entre as imagens das matrizes controle (A e B) para as ativadas com CLO (C e D) e IDA (E e F). Nas matrizes funcionalizadas verificam-se a presença de pontos de rugosidades nas superfícies dos poros, que pode ser relacionado com a inserção dos braços espaçadores de glutaraldeído nos sítios epóxi ativados da superfície dos criogéis e posterior funcionalização com os agentes quelantes e íons de cobre, indicando que o processo de modificação dos adsorventes foi bem-sucedida.

### 3.5.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A análise de espectroscopia FTIR foi utilizada para obter informações sobre os grupos funcionais inseridos durante o processo de funcionalização, na superfície dos monólitos produzidos. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 7.



**Figura 7-** Espectros de FTIR dos criogéis produzidos. (A): 500-4000 cm<sup>-1</sup>; (B): 500-2000 cm<sup>-1</sup>; (C): espectros do extrato de espinafre, e etapas da funcionalização com clorofila antes e após a

imobilização do metal; (D) etapas da funcionalização com IDA antes e após a imobilização do metal. CLO+Cu<sup>+2</sup>: criogel funcionalizado com clorofila e imobilizado com íons de cobre; GLUT-CLO: criogel ativado até a etapa de imobilização da clorofila; GLUT\_IDA+Cu<sup>+2</sup>: Adsorvente funcionalizado com IDA e imobilizado com íons de cobre; GLUT-IDA: adsorvente ativado com IDA isento do metal.

Em ambas as matrizes (Figuras 7a e 7b) foi observada uma banda de vibração na região de 1650 cm<sup>-1</sup> atribuída ao grupamento carbonila (C=O), proveniente da amida presente nos monômeros (AAM e BAAM) utilizada no processo de síntese do criogel (Gonçalves et al., 2017). Em diversos trabalhos na literatura observa-se a ocorrência de uma forte banda vibracional nessa região do espectro para os criogéis de poliacrilamida (Gonçalves et al., 2017; Nascimento et al., 2019; Silva et al., 2019; Kartal e Denizli, 2020; Yang et al., 2020). A mesma região também foi verificada no extrato (figura 7c) proveniente dos grupos ésteres da clorofila, entretanto é verificado uma diminuição dessa banda quando comparado com o adsorvente funcionalizado, o que pode indicar a interação dos grupamentos carbonilas da clorofila com a superfície aminada do criogel (Kang et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Verificou-se ainda outras vibrações atribuídas ao grupamento amida na região 3186 cm<sup>-1</sup> referente ao alongamento das ligações N-H e O-H (Inanan, 2019; Aryee et al., 2020). Observou-se bandas na região de 2933 cm<sup>-1</sup> e 1448-1413 cm<sup>-1</sup> atribuídas às vibrações assimétricas do grupo CH<sub>2</sub>, alongamento e flexão, respectivamente, do grupamento C-H, provenientes da estrutura polimérica (Kang et al., 2019; Dhafina et al., 2020; Yang et al., 2020).

Outra banda importante é observada em torno de 1112 cm<sup>-1</sup> que indica o estiramento do grupo C-O devido à presença do grupamento éter e dos radicais epóxi, respectivamente, provenientes do AGE (Mól et al., 2017; Mourão et al., 2019; Silva et al., 2019). Uma redução nessa banda foi observada para as matrizes funcionalizadas indicando a interação do anel epóxi com grupamentos aminas dos compostos utilizados na ativação a alteração da estrutura molecular com a inclusão dos braços espaçadores. É possível verificar bandas referentes ao estiramento C-O em regiões próximas em torno de 1026 cm<sup>-1</sup> no extrato e que se deslocou para 1062 cm<sup>-1</sup> no criogel imobilizado com clorofila (Figura 7c), entretanto é observado que com a inclusão dos íons de cobre essa banda sofreu um deslocamento para 1112 cm<sup>-1</sup>, o que pode justificar o fato da redução dessa banda ter sido mais intensa no criogel imobilizado com IDA (Dhafina et al., 2020).

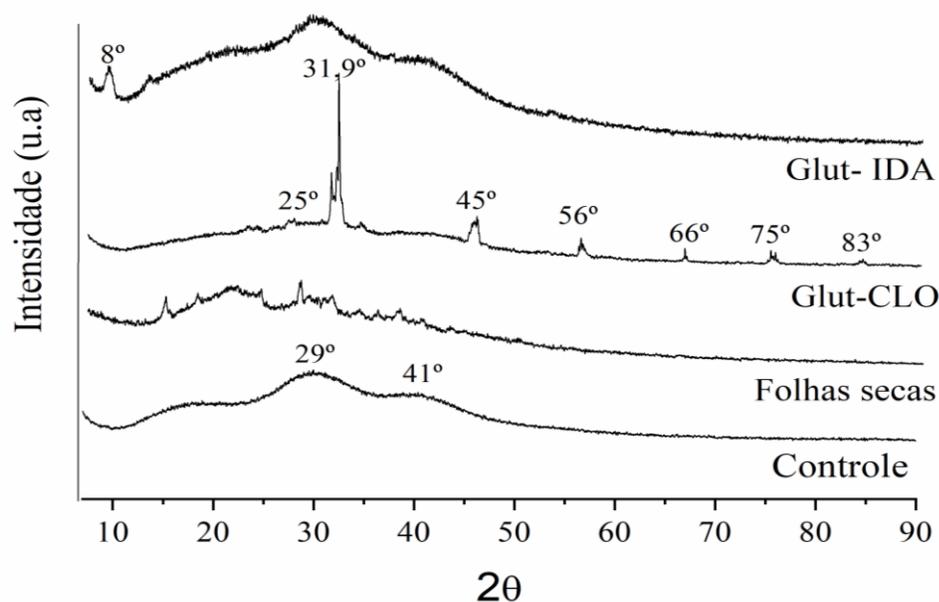
As vibrações na região de  $1176\text{ cm}^{-1}$ , podem estar associadas a ligação carbono-nitrogênio (C-N) tanto que ocorreu um aumento dessa banda nos criogéis modificados (Figura 7b), oriundo da adição da clorofila ou do ácido iminodiacético (Nascimento et al., 2019), tanto que é verificado na figura 7d o aumento dessa banda na etapa em que o IDA é imobilizado no criogel. Essa região também é observada no extrato de espinafre (figura 7c), indicando a ligação C-N proveniente da clorofila (Zhang et al., 2019), essa banda se mostrou mais acentuada nos criogéis CLO, justamente pela clorofila apresentar quatro átomos de nitrogênio, enquanto o ácido iminodiacético possui apenas um. A banda observada para ambas as matrizes funcionalizadas em torno de  $1040\text{-}1044\text{ cm}^{-1}$  pode estar associada ao grupo C-O de álcoois e éteres, no criogel imobilizado com IDA é observado uma redução dessa banda após a inclusão dos íons de cobre (figura 7d), enquanto que para o adsorvente com clorofila é notado um deslocamento de  $978\text{ cm}^{-1}$  para  $1040\text{ cm}^{-1}$  (figura 7c), as mudanças nas bandas indicam a quelação do  $\text{Cu}^{+2}$  (Gonçalves et al. 2017; Aryee et al., 2020; Inanan, 2022).

Para o criogel ativado com IDA, ainda surgiu uma forte banda em torno de  $989\text{ cm}^{-1}$ , característico das vibrações de alongamento C-O e da deformação da ligação N-H, é observado que a banda na região de  $859\text{ cm}^{-1}$  associada a ligação N-H (figura 7d) desapareceu após a imobilização do metal, o que indica que a complexação dos íons metálicos ao criogel (Inanan, 2022). Valores próximos aos números de onda verificados nas matrizes obtidas foram reportados por Kang et al. (2019), Zhang et al. (2019), Aryee et al. (2020) e Farías et al. (2020) tanto para clorofila quanto para o ácido iminodiacético. O alongamento da banda na região de  $1176\text{ cm}^{-1}$  para as matrizes funcionalizadas também pode estar associado à coordenação do átomo de nitrogênio com o íon metálico  $\text{Cu}^{+2}$ . A formação da ligação  $\text{Cu}^{+2}\text{-N}$  ocorre por doação do par eletrônico e os aspectos sinérgicos de retrodoação que se manifestam nesse tipo de ligação levam a um aumento na ordem de ligação C-N (Erdem et al., 2017). Essas observações também foram relatadas por Erden et al. (2017), Aryee et al. (2020), Monier et al. (2020), Manimohan et al. (2020), indicando que a inclusão dos agentes quelantes e do íon metálico no adsorvente polimérico foi bem-sucedida.

### **3.5.3. Difração de raios-X**

A técnica de difração de raios-X foi utilizada a fim de verificar a morfologia estrutural dos criogéis, principalmente após a funcionalização (Figura 8). De acordo com os difratogramas obtidos verificou-se uma estrutura não cristalina para o criogel controle (não funcionalizado),

indicando que a estrutura formada não apresenta ordenamento à média e longa distância, com halos amorfos centrado em  $2\theta$  em torno de  $29^\circ$  e  $41^\circ$ .



**Figura 8-** Espectro de DRX dos adsorventes não funcionalizado (Controle), ativado com clorofila extraída de vegetais (Glut-CLO), ativado com ácido iminodiacético (Glut-IDA) e das folhas de espinafre secas.

O adsorvente ativado com o agente quelante (IDA), apesar de apresentar os mesmos halos amorfos do controle, exibiu ainda linhas de difração mais estreitas em  $2\theta = 8^\circ$ , associadas ao quelato IDA- $\text{Cu}^{+2}$  indicando uma fase cristalina no material. Andrade et al. (2021) observou linhas de reflexão na mesma região ao avaliar polímeros imobilizados com IDA- $\text{Cu}^{+2}$ .

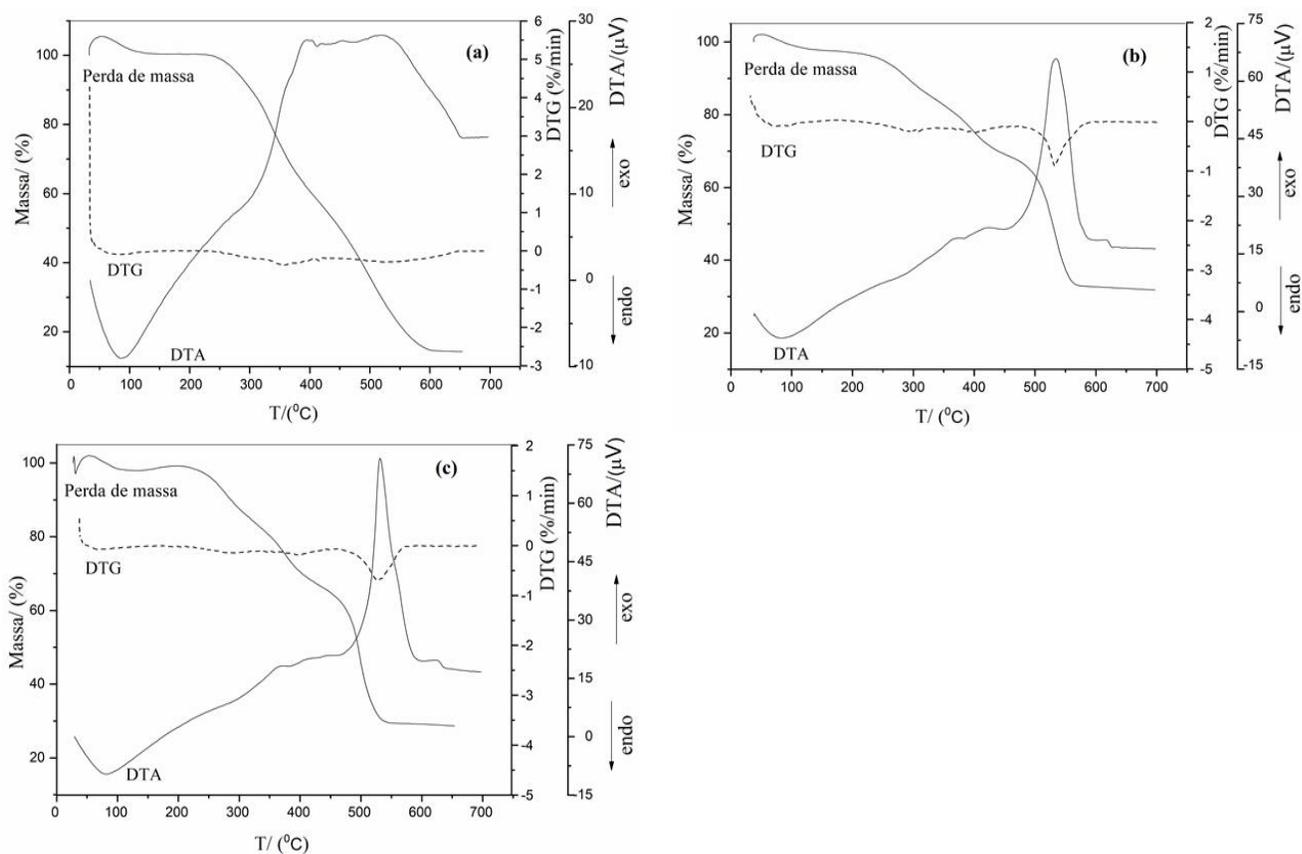
O difratograma para o criogel ativado com clorofila indicou uma estrutura mais cristalina deste, sendo observadas diversas linhas de difração a partir de  $30^\circ$ . Ao comparar com o difratograma das folhas secas de espinafre é observado um comportamento similar na região de  $2\theta$  ( $25^\circ$  a  $35^\circ$ ). As outras linhas de difração não são observadas nos suportes cromatográficos, isso pode estar relacionado ao fato dos constituintes agregados nas folhas do espinafre terem sido removidos durante o processo de extração do pigmento. Zhang et al. (2017) também observaram linhas de difração na região entre  $23^\circ$  e  $49^\circ$  ao estudarem o pigmento extraído de folhas de espinafre. Linhas de difração entre  $30^\circ$  e  $60^\circ$  são características da clorofila, estando de acordo com observado por Zhang et al. (2019), Zhang et al. (2020), Soltaninejad e Maleki (2021) e Yilmaz et al. (2021),

que verificaram linhas de difração nessa região de  $2\theta$  ( $31^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $56^\circ$ ) ao trabalharem com materiais contendo clorofila.

Linhas de difração mais acentuada são observadas em  $2\theta = 31,9^\circ$  para o criogel imobilizado com clorofila que pode estar associado a concentração de clorofila por unidade de área do criogel durante a funcionalização, além de caracterizar o quelato de íons de cobre formado com o pigmento. Altuwirqi et al. (2020) também observaram linhas de difração acentuadas na região entre  $30^\circ$  e  $40^\circ$  ao trabalharem com extratos de folhas de espinafre adicionados de cobre. Tais observações indicam que houve a modificação da estrutura do criogel com a inclusão da clorofila. Verificou-se também linhas de difração mais fracas centradas em  $2\theta$  em torno de  $66^\circ$ ,  $75^\circ$  e  $83^\circ$ , que podem estar associadas as partículas de cobre (Suresh et al., 2016; Du et al., 2018).

### 3.5.4. Análise Termogravimétrica

As propriedades térmicas dos criogéis foram investigadas por termogravimetria (TGA), cujos resultados são apresentados na Figura 9.



**Figura 9-** Curvas de TG dos criogéis controle (a), IDA- $\text{Cu}^{2+}$  (b) e CLO- $\text{Cu}^{2+}$  (c).

Observa-se nas curvas de TGA para os criogéis (controle e ativados) uma perda de massa inicial, em temperaturas até cerca de 120 °C a 150 °C associada à evaporação das moléculas de água adsorvidas na superfície porosa das matrizes.

Nas temperaturas de 260 °C a 600 °C para o criogel controle é verificada uma taxa de perda de massa atribuída a degradação dos compostos poliméricos da estrutura das matrizes, que ocorre de forma quase homogênea.

Nos criogéis funcionalizados, entretanto, são observados dois estágios. O primeiro, numa faixa de temperatura entre 260 °C a 460 °C, indica a ruptura da cadeia polimérica e o início da degradação da poli(acrilamida). Nas temperaturas entre 460 °C e 550 °C, o evento observado é atribuído à degradação dos ligantes quelantes e a finalização da decomposição da estrutura polimérica. É possível observar que a perda de massa foi inferior quando comparada ao controle, sugerindo que essas matrizes são mais estáveis à decomposição térmica. Este resultado pode ser atribuído a presença das moléculas dos braços espaçadores presentes na superfície do criogel (Neves et al., 2020). Após esse evento a curva tende a se estabilizar não ocorrendo mais degradações, restando cerca de 25% da sua massa, que pode estar associado ao resíduo do  $\text{Cu}^{+2}$ -agente quelante não degradado, possivelmente a formação do complexo metálico, torne-os mais resistentes a decomposição. Eventos similares foram reportados por Gu et al. (2018), Khaparde e Tetala (2020), Andrade et al. (2021) para quelatos com Cu.

Para a análise de degradação térmica dos componentes, observou-se para todas as matrizes um pico endotérmico em temperaturas inferiores a 100 °C devido a remoção das moléculas de água ligadas ao polímero (Zhang et al., 2017; Selvan et al., 2020). Os monólitos funcionalizados apresentaram um evento exotérmico maior que o observado para o controle, com um pico em 530 °C, o que pode estar relacionado à degradação dos ligantes quelantes e ao rompimento da ligação dos quelantes com a molécula do íon de cobre, permanecendo o resíduo do íon  $\text{Cu}^{+2}$  (Zienkiewicz-Machnik et al., 2016). Eventos exotérmicos em temperaturas próximas (500-580 °C) foram encontrados por Zienkiewicz-Machnik et al. (2016), Selvan et al. (2020), Silva e Pinto (2020) ao analisarem a estabilidade térmicas de complexos com íons de cobre.

Os resultados mostram a diferença entre a matriz controle e as que foram modificadas, e indicam que a imobilização da clorofila na superfície do adsorvente não alterou o processo de degradação do monólito quando comparado àquele imobilizado com o agente quelante comercial.

### 3.5.5. Potencial de utilização das matrizes

A partir dos ensaios da capacidade de ligação da bromelina, verificou-se que os adsorventes apresentaram uma capacidade adsortiva de  $(46,95 \pm 2,91$  e  $45,88 \pm 2,95$  mg de proteína/g de criogel), para o criogel funcionalizado com clorofila e ácido iminodiacético, respectivamente, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre eles, o que indica que a inserção da clorofila vegetal como agente para imobilização dos íons metálicos e posterior adsorção de proteínas foi eficiente. Os resultados obtidos estão de acordo com o reportado em outros estudos com criogéis IMAC em que os autores relatam valores de capacidade de adsorção que variaram entre 20 e 72 mg de proteína/g da matriz, como na adsorção de álcool desidrogenase através de criogel GMA-IDA-Zn (Akduman et al. 2013); de catalase com criogel AAm-GMA-IDA-Cu (Uygun et al., 2015); imunoglobulina G utilizando criogel poli(hidroxietil-metacrilato) com IDA-Cu (Bakhshpour et al., 2016); adsorção de tirosina utilizando criogéis incorporados de microesferas magnéticas de sílica (Öztürk et al., 2021); lactase com criogel a base de AAm-BAAm (Inanan, 2022). Outros estudos também obtiveram resultados entre 6,9 a 117 mg/g ao utilizarem outros tipos de matrizes poliméricas, como Han et al. (2019) ao usarem microesferas magnéticas (GMA-IDA-Ni<sup>+2</sup>) para purificação de bromelina; Inanan (2019) ao utilizar nanoestruturas de quitosana co-polimerica para adsorção de catalase; Trang et al., 2019 ao trabalharem com fibras de nylon-GMA-IDA na adsorção de lisozima.

Devido à impureza da enzima utilizada para os testes e para comprovar a eficiência dos adsorventes, foi avaliado o potencial das matrizes em termos de atividade enzimática, apresentado na Tabela 4.

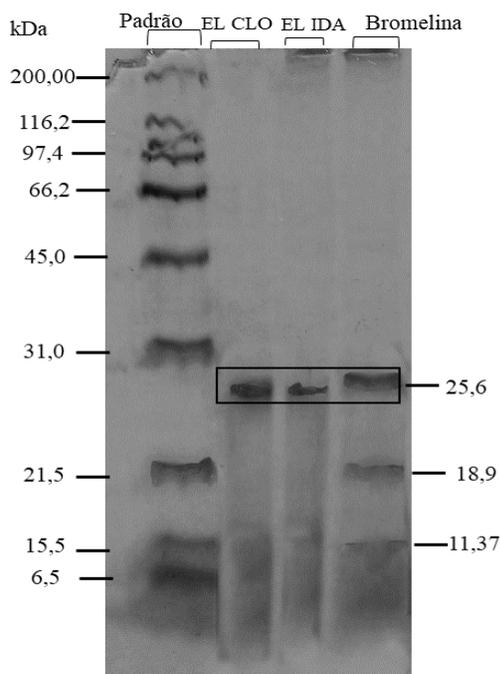
Observou-se que os criogéis apresentaram diferença significativa para a atividade enzimática específica e conseqüentemente para o fator de purificação, com destaque para aquele ativado com clorofila. Verificou-se um aumento da atividade enzimática específica para as frações eluidas quando comparada à solução de alimentação, o que indica que os adsorventes produzidos foram capazes de separar, ao menos parcialmente, uma enzima específica do total de proteínas existentes na solução. Os fatores de purificação, neste caso, indicaram que o produto final obtido apresenta aproximadamente duas vezes mais pureza do que a solução de alimentação, resultados que indicam o potencial para aplicação desses adsorventes em processos de purificação de bromelina, mais uma vez demonstrando que esse pigmento pode ser utilizado como agente quelante em matrizes de afinidade IMAC.

**Tabela 4-** Características da solução de proteína recuperada após o processo de adsorção

Matriz	Criogel CLO		Criogel IDA
	Solução de bromelina	Eluído	Eluído
Concentração de proteína (mg/mL)	0,91±0,02	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>
Atividade enzimática (U/mL)	3,75±0,00	1,86±0,03 <sup>a</sup>	1,90±0,05 <sup>a</sup>
Atividade específica (U/mg)	4,16±0,00	9,31±0,18 <sup>a</sup>	8,26±0,25 <sup>b</sup>
Fator de purificação		2,23±0,04 <sup>a</sup>	1,98±0,04 <sup>b</sup>

As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente, entre si pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Valores médios  $\pm$  desvio padrão

Tais observações podem ser comprovadas ao analisar as imagens dos géis de eletroforese da solução de bromelina e dos extratos eluídos (Figura 10).

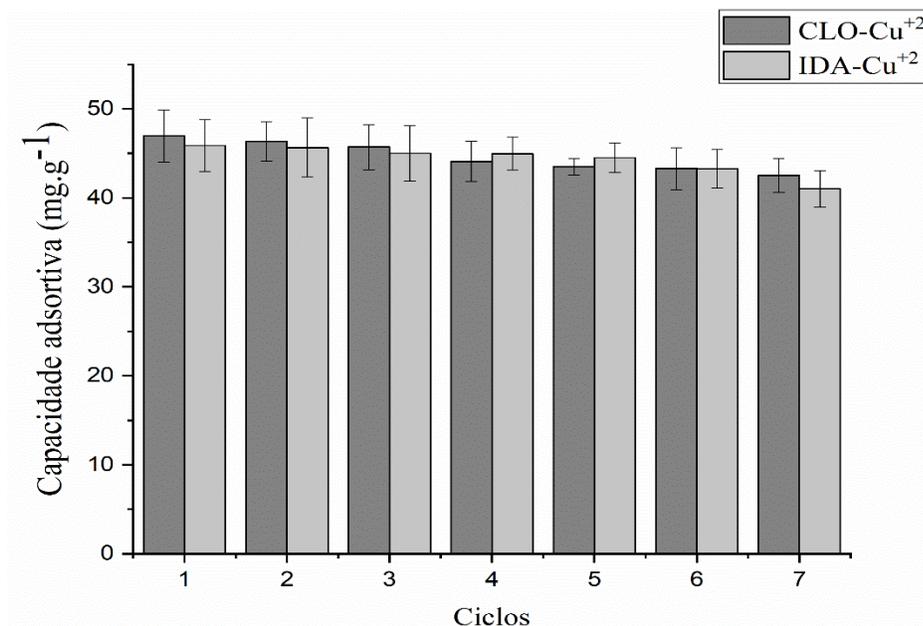


**Figura 10-** Gel de eletroforese de proteínas das eluições dos criogéis imobilizados com clorofila (EL CLO) e imobilizados com o agente ácido iminodiacético (EL IDA).

Na imagem verifica-se que ambas matrizes aparentemente, foram capazes de adsorver a bromelina (25,6 kDa). Segundo Damodaran et al. (2018) a bromelina apresenta massa entre 20-35 kDa o que indica que as matrizes foram seletivas e não adsorveram algumas proteínas de menor massa presentes na solução enzimática modelo, comprovando o potencial de utilização em processos de purificação de proteases.

### 3.5.5.1. Reutilização das matrizes

Do ponto de vista do uso prático a reutilização dos adsorventes é de grande importância, principalmente em relação à economia de tempo e material (Erdem et al., 2017; Demirci et al., 2019). Por isso, estudos de adsorção-dessorção foram realizados com o objetivo de descobrir quantas vezes os criogéis produzidos poderiam ser reutilizados nas condições usadas aqui, resultados apresentados na Figura 11.



**Figura 11-** Capacidade adsortiva durante a reutilização dos criogéis produzidos funcionalizados com clorofila (CLO-Cu<sup>+2</sup>) e com ácido iminodiacético (IDA-Cu<sup>+2</sup>).

Observou-se que após 7 ciclos de utilização os criogéis ativados com clorofila e com IDA apresentavam cerca de 88% e 87% da capacidade adsortiva inicial, respectivamente, indicando que ambos possuem boa estabilidade. Uygun et al. (2015) produziram criogéis ativados com IDA e

funcionalizados com  $\text{Fe}^{+3}$  para a adsorção de catalase, observaram que a capacidade de adsorção diminuiu apenas 3,3% no final de 40 ciclos de utilização. Outros trabalhos da literatura também descrevem boa estabilidade para criogéis poliméricos ao longo de 5 a 8 ciclos de reutilização (Gonçalves et al., 2016; Erdem et al., 2017; Dermici et al., 2020; Kartal e Denizli, 2020). Os resultados obtidos indicam que é possível a utilização dessas matrizes cromatográficas em processos de purificação de biomoléculas.

#### **4. CONCLUSÃO**

Foram produzidas matrizes poliméricas macroporosas ativadas com clorofila extraída de folhosas ou com agente quelante IDA, funcionalizadas com diferentes íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) para interação de afinidade. A imobilização da clorofila foi bem-sucedida, confirmada a partir das análises de FTIR, DRX, TGA e imagens de MEV. Verificou-se que o pH e a concentração de sal possuem um efeito significativo na capacidade de adsorção das proteases a depender do íon imobilizado na matriz, além do tipo de quelante utilizado influenciar na capacidade de imobilização dos metais e adsorção de proteínas. Entretanto, o pH ótimo de adsorção foi 7,0 para os dois adsorventes. As matrizes funcionalizadas com íons de cobre destacaram-se entre as demais com maior capacidade adsortiva, em pH neutro isento da adição de NaCl. Os criogéis funcionalizados apresentaram menor grau de expansão e capacidade de inchamento quando comparados ao controle. No entanto, mantiveram elevada porosidade, superior a 85%. Os resultados demonstraram a similaridade entre os adsorventes funcionalizados com os diferentes agentes quelantes, indicando que a clorofila extraída de folhosas não alterou as características físicas. As matrizes produzidas com os diferentes agentes quelantes não diferiram quanto a capacidade adsortiva e apresentaram estáveis ao longo do tempo de utilização, com possível aplicação para separação de biomoléculas. A clorofila poderá ser uma alternativa de ligante quelante de baixo custo para funcionalização de colunas IMAC, com potencial para utilização em processos de purificação de proteases de afinidade com íons metálicos.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACET, O.; BARET, T.; ORDONEZ, D.; AKSOY, N.S.; ALACABEY, I.; MENTEŞ, A.; ODABAŞI, M. O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes as affinity ligands for

immobilized metal-ion affinity chromatography of lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v.1550, p.21-27, 2018.

ACET, O.; ÖNAL, B.; SANZ, R.; SANZ-PÉREZ, E.S.; ERDÖNMEZ, D.; ODABAŞI, M. Preparation of a new chromatographic media and assessment of some kinetic and interaction parameters for lysozyme. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 480-487, 2019.

AKDUMAN, B.; UYGUN, M.; UYGUN, D.A.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Purification of yeast alcohol dehydrogenase by using immobilized metal affinity cryogels. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, p. 4842-4848, 2013.

ALTUWIRQI, R.M.; ALBAKRI, A.; AL-JAWHARI, H.; GANASH, E.A. Green synthesis of copper oxide nanoparticles by pulsed laser ablation in spinach leaves extract. **Optik**, v. 219, 2020.

ANDRADE, J.C.D. DE; SILVA, L.A.T.; LIMA JÚNIOR, C.G.; CHOJNACKI, J.; VASCONCELLOS, M.L.A.A.; SILVA, R.B.; JÚNIOR, S.A.; SILVA, F.F. Copper and copper manganese 1D coordination polymers: Synthesis optimization, crystal structure and preliminary studies as catalysts for Baylis–Hillman reactions. **Inorganica Chimica Acta**, v. 514, p. 119985, 2021.

ARYEE, A.A.; MPTANI, F.M.; ZHANG, X.; KANI, A.N.; DOVI, E.; HAN, C.; LI, Z.; QU, L. Iron (III) and iminodiacetic acid functionalized magnetic peanut husk for the removal of phosphate from solution: Characterization, kinetic and equilibrium studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 268, 2020.

BAKSHPOUR, M.; DERAZSHAMSHIR, A.; BERELI, N.; ELKAK, A.; DENIZLI, A. [PHEMA/PEI]–Cu (II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 26, p. 824-831, 2016

BANERJEE, S.; ARORA, A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PATTI, A.F. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318-326, 2020.

BOHN, T.; WALCZYK, T.; LEISIBACH, S.; HURREL, R.F. Chlorophyll-bound magnesium in commonly consumed vegetables and fruits: relevance to magnesium nutrition. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 347-350, 2004.

BORSOI-RIBEIRO, M.; BRESOLIN, I.T.L.; VIJAYALAKSHMI, M.; BUENO, S.M.A. Behavior of human immunoglobulin G adsorption onto immobilized Cu (II) affinity hollow-fiber membranes. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p. 514-520, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA Jr., W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; Da 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.

CARVALHO, B.M.A.; SILVA JÚNIOR, W.F.; CARVALHO, L.M.; MINIM, L.A.; CARVALHO, G.G.P. Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.33, p. 215-223, 2016.

CHANG, Y.-Y.; SUN, L.H. **Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for metalloproteomics and phosphoproteomics**. Inorganic and organometallic transition metal complexes with, Biological Molecules and living cells, chapter nine, p. 329-342, 2017.

CHEEKS, M.C.; KAMAL, N.; SORREL, A.; QUERIDO, D.; FARZANEH, F.; SLATER, N.KH. Immobilized metal affinity chromatography of histidine-tagged lentiviral vectors using monolithic adsorbents. **Journal Chromatography A**, v.1216, p. 2705-2711, 2009.

COUTINHO, T.C.; TARDIOLI, P.W.; FARINAS, C.S. Hydroxyapatite nanoparticles modified with metal ions for xylanase immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 344-354, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

DHAFINA, W.A.; DAUD, M.Z.; SALLEH, H. The sensitization effect of anthocyanin and chlorophyll dyes on optical and photovoltaic properties of zinc oxide-based dye-sensitized solar cells. **Optik**, v. 207, 2020.

DEMIRCI, S.; SAHINER, S.; YILMAZ, S.; KARADAG, E.; SAHINER, N. Enhanced enzymatic activity and stability by in situ entrapment of  $\alpha$ -Glucosidase within super porous p(HEMA) cryogels during synthesis. **Biotechnology Reports**, v. 28, 2020.

DERRIEN, M.; BADR, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; ANGERS, P. Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). **LTW- Food Science and Technology**, v. 79, p. 170-177, 2017.

DERRIEN, M.; BADR, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; ANGERS, P. Optimization of a sustainable purification protocol for lutein and chlorophyll from spinach by-products by a saponification procedure using Box Behnken design and desirability function. **Food and Bioproducts Processing**, v. 116, p. 54-62, 2019.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; TJORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 259-264, 2009.

DU, J.; HUANG, Y.; XIAO, C.; LIU, Y. Building metallurgical bonding interfaces in an immiscible Mo/Cu system by irradiation damage alloying (IDA). **Journal of Materials Science & Technology**, v. 34, p. 689-694, 2018.

ELDIN, MS.M.; ABDEL, R.S.; FAWAL, G.F.EL. Novel immobilized  $\text{Cu}^{+2}$  ion grafted cellophane membranes for affinity separation of His-Tag Chitinase. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. s3652-s3663, 2017.

ERDEM, A.; NGWABEBHOH, F.A.; ÇETINTAŞ, S.; BINGÖL, D.; YILDIZ, U. Novel macroporous cryogels with enhanced adsorption capability for the removal of Cu (II) ions from aqueous phase: Modelling, kinetics and recovery studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 1269-1280, 2017.

EROL, B.; EROL, K.; GÖKMEŞE, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 104-113, 2019.

FARÍAS, T.; HAJIZADEH, S.; YE, L. Cryogels with high cisplatin adsorption capacity: Towards removal of cytotoxic drugs from wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 235, p. 116203, 2020.

FERNANDES, A.S.; NOGARA, G.P.; MENEZES, C.R.; CICHOSKI, A.J.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Identification of chlorophyll molecules with peroxy radical scavenger capacity in microalgae *Phormidium autumnale* using ultrasound-assisted extraction. **Food Research International**, v. 99, part 3, p. 1036-1041, 2016.

FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F.; GONÇALVES, G.R.F.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 85, p. 1717-1725, 2017.

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

GONÇALVES, G.R.F.; GANDOLFI, O.R.R.; SANTOS, L.S.; BONOMO, R.C.F.; VELOSO, C.M.; VERÍSSIMO, L.A.A.; FONTAN, R.C.I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.1068-1069, p. 71-77, 2017.

GU, Y-J.; ZHU, M-L.; LI, Y-L.; XIONG, C-H. Research of a new metal chelating carrier preparation and papain immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.112, p. 1175-1182, 2018.

GUVEN, H.; GEZICI, O.; BAYRAKCI, M.; MORBIDELLI, M. Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1558, p. 59-68, 2018.

HAN, L.; WANG, L.; WANG, Y.; CAI, Y.; MAO, Y.; NIE, L.; XIE, X.; Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 253-262, 2019.

HAN, J.; CAI, Y.; WANG, L.; MAO, Y.; NI, L.; WANG, Y. A high efficiency method combining metal chelate ionic liquid-based aqueous two-phases flotation with two-step precipitation process for bromelain purification. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.

HARTSHORN, R.M.; CONSTABLE, E.C. The Nomenclature of Coordination Compounds—A Necessary Evil and a Pleasant Journey, **Comprehensive Coordination Chemistry III (Third Edition)**, cap. 9.24, p. 787-804, 2021.

INANAN, T. Chitosan *Co*-polymeric nanostructures for catalase immobilization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 135, p. 94-102, 2019.

INANAN, T. Cryogel disks for lactase immobilization and lactose-free milk production. **LTW**, v.154, p.112608, 2022.

JURAJ, N.P.; KIRIN, S.I. Inorganic stereochemistry: Geometric isomerism in bis-tridentate ligand complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 44, p. 215051, 2021.

KANG, YU-RA; JOON, P.; JUNG, S.K.; CHANG, Y.H. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins and zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943-950, 2018.

KANG, YU-RA; LEE, Y.-K.; KIM, Y.J.; CHANG, Y.H. Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum Arabic and maltodextrin. **Food Chemistry**, v. 272, p. 337-346, 2019.

KARAKUS, C.; USLU, M.; YAZICI, D.; SALIH, B.A. Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant Cag A protein. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 182-187, 2016.

KARTAL, F.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted cryogel beads for cholesterol removal from milk samples. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 190, 2020.

KHAPARDE, A.; TETALA, K.K.R. Simplification of affinity macroporous monolith microfluidic column synthesis and its ability for protein separation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 181, p. 113099, 2020.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-695, 1970.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 362–385, 1987.

MANIMOHAN, M.; PAULPANDYAN, R.; PULGAMANI, S.; SITHIQUE, M.A. Biologically active Co (II), Cu (II), Zn (II) centered water soluble novel isoniazid grafted O-carboxymethyl chitosan Schiff base ligand metal complexes: Synthesis, spectral characterisation and DNA nuclease activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 801-816, 2020.

MANJREKAR S., WADEKAR T., SUMANT O. Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027, março 2021. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em janeiro, 2022.

MÓL, P.C.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; ELLER, M.R.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.

MÓL, P.C.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; MINIM, L.A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; Da SILVA, R. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v.89, p.75-83, 2019.

MONIER, M.; BUKHARI, A.A.H.; ELSAYED, N.H. Designing and characterization of copper (II) ion-imprinted adsorbent based on isatin functionalized chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.155, p. 795-804, 2020.

MORATO, A.E.F. **Purificação e imobilização simultânea de enzimas recombinantes para fins industriais: Lipase B de *Pseudozyma antarctica* como modelo.** 86p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador-Ba, 2014.

MOURÃO, C.A.; MARCUZ, C.; HAUPT, K.; BUENO, S.M.A. Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolithic cryogels: Purification of IgG from human serum. **Journal of Chromatography B**, v.1129, p. 559-567, 2019.

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

NEVES, I.C.O.; RODRIGUES, A.A.; VALENTIM, T.T.; MEIRA, A.C.F.O.; SILVA, S.H.; VERÍSSIMO, L.A.A.; RESENDE, J.V. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1161, p. 122435, 2020.

ÖZTÜRK, G.; SAYLAN, Y.; DENIZLI, A. Designing composite cryogel carriers for tyrosine adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 254, p. 117622, 2021.

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.

QIU, X.; XIANG, X.; LIU, T.; HUANG, H.; HU, Y. Fabrication of an organic–inorganic nanocomposite carrier for enzyme immobilization based on metal–organic coordination. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 47-54, 2020.

QU, J-B.; HUANG, Y-D.; JING, G-L.; ZHOU, W-Q.; ZU, H.; LU, J-R. A novel matrix derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed immobilized-metal affinity chromatography. **Journal Chromatography B**, v. 879, p. 1043-1048, 2011.

RAMLI, A.N.M.; AZNAN, T.N.T.; ILLIAS, R.M. Bromelain: From production to commercialization. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed. 5, v. 97, 2017.

RIGUERO, V.; CLIFFORD, R.; DAWLEY, M.; DICKSON, M.; GASTFRIEND, B.; THOMPSON, C.; WANG, S-C.; O'CONNOR, E. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1629, 2020.

RODRIGUEZ, E.L.; PODDAR, S.; IFTEKHAR, S.; SUH, K.; WOOLFORK, A.G.; OVBUDE, S.; PAKAREK, A.; WALTERS, M.; LOTT, S.; HAGE, D.S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, 2020.

ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BASSAL, A.; LEONARDI, C.; GIUFFRIDA, F.; COLLA, G. Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. **Journal of Food Agriculture and Environmet**, v.10, p. 680-688, 2012.

SELVAN, P.; SATHIYAKUMAR, S.; SRINIVASAN, K.; PREMKUMAR, T. Effect of alkyl substituent on molecular configuration in a Cu (II) complex: Synthesis of Cu and CuO nanoparticles using a single, solid-source precursor. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, p. 129011, 2020.

SHARMA, S.; AGARWAL, G.P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 37, p. 3491-3511, 2012.

SHI, Y.; YAN, Z.; XU, T.; QU, R.; YUAN, J.; CAI, F.; WANG, Y.; WANG, X. An environmentally friendly deproteinization and decolorization method for polysaccharides of *Typha angustifolia* based on a metal ion-chelating resin adsorption. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 160-167, 2019.

SILVA, A.P.G.; BORGES, C.D.; MIGUEL, A.C.A.; JACOMINO, A.P; MENDONÇA, C.R.B. Physicochemical characteristics of commom and European chives. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, p. 293-298, 2015.

SILVA, J.F. Da; SILVA, D.L. Da; NASCIMENTO, R.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, p. 1-9, 2019.

SILVA, L.R.C.; PINTO, R.M. Thermoanalytical characterization of copper sulphate pentahydrate. **Cadernos UniFOA**, v. 43, p.25-31, 2020.

SINGH, J.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. An optimized solvent extraction and characterization of unidentified flavonoid glucuronide derivatives from spinach by UHPLC-HR QTOF-MS. **Talanta**, v. 188, p. 763-771, 2018.

SOLTANINEJAD, V.; MALEKI, A. A green, and eco-friendly bionanocomposite film (poly (vinyl alcohol)/TiO<sub>2</sub>/chitosan/chlorophyll) by photocatalytic ability, and antibacterial activity under visible-light irradiation. **Journal of Photochemistry, A: Chemistry**, v. 404, p. 112906, 2021.

SURESH, S.; KARTHIKEYAN, S.; JAYAMOORTHY, K. FTIR and multivariate analysis to study the effect of bulk and nano copper oxide on peanut plant leaves. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 1, p. 343-350, 2016.

TRANG, H.K.; JIANG, L.; MARCUS, R.K. Grafting polymerization of glycidyl methacrylate onto capillary-channeled polymer (C-CP) fibers as a ligand binding platform: Applications in immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) protein separations. **Journal of Chromatography B**, v. 1110-1111, p. 144-154, 2019.

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.

VERA-AVILES, M.; VENTANA, E.; KARDINASARI, E.; KOH, N.L.; LATUNDE-DADA, D.O. Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.11, p.111, 2018.

YANG, X.; DEBELI, D.K.; SHAN, G.; PAN, P. Selective adsorption and high recovery of La<sup>3+</sup> using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122335, 2020.

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

YILMAZ, C.; GÖKMEN, V. Chlorophyll. Reference Module in Food Science **Encyclopedia of Food and Health**, p. 37-41, 2016.

YILMAZ, D.D.; DEMIREZEN, D.A.; MIHÇIOKUR, H. Colorimetric detection of mercury ion using chlorophyll functionalized green silver nanoparticles in aqueous medium. **Surfaces and Interfaces**, v. 22, 2021.

YOU, C-X.; HUANG, P-H.; LIN, S-C. Concomitant selective adsorption and covalent immobilization of a His-tagged protein switch with silica-based metal chelate-epoxy bifunctional adsorbents. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 179-186, 2020.

ZHANG, C.; ZHAO, W.; SASAKI, S-I.; TAMIYAKI, H.; WANG, X-F. A chlorophyll derivative-based bio-solar energy conversion and storage device. **Electrochimica Acta**, v. 347, p.136283, 2020.

ZHANG, T.; YUE, X.; ZHANG, K.; ZHAO, F.; WANG, Y.; ZHANG, K. Synthesis of Cu (II) ion-imprinted polymers as solid phase adsorbents for deep removal of copper from concentrated zinc sulfate solution. **Hydrometallurgy**, v. 169, 599-606, 2017.

ZHANG, Z-H.; PENG, H.; MA, H.; ZENG, X.-A. Effect of inlet air drying temperatures on the physicochemical properties and antioxidant activity of whey protein isolate-kale leaves chlorophyll (WPI-CH) microcapsules. **Journal of Food Engineering**, v. 245, p. 149-156, 2019.

ZHANG, Z-H.; PENG, H.; WOO, M.W.; ZENG, X-A.; BRENNAN, M.; BRENNAN, C.S. Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll microcapsules by spray drying: Effect of WPI ratios on the physicochemical and antioxidant properties. **Journal of Food Engineering**, v. 267, p. 109729, 2020.

ZHANG, Z-H.; WANG, L-H.; ZENG, X-A.; HAN, Z.; WANG, M-S. Effect of pulsed electric fields (PEFs) on the pigments extracted from spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Inovate Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 26-34, 2017.

ZIENKIEWICZ-MACHNIK, M.; MASTERNAK, J.; KAZIMIERCZUK, K.; BARSZCZ, B. Structural analysis and physico-chemical characterization of mononuclear manganese (II) and

polynuclear copper (II) complexes with pyridine-based alcohol, **Journal of Molecular Structure**,  
v. 1126, p. 37-46, 2016.

---

ARTIGO

*PURIFICAÇÃO DE BROMELINA DE POLPA DE ABACAXI POR CROMATOGRÁFIA  
DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS UTILIZANDO MATRIZES  
FUNCIONALIZADAS COM CLOROFILA E COBRE*

---

Sugestão periódicos:

Journal of Chromatography A

## RESUMO

Neste estudo investigou-se a purificação da bromelina obtida a partir do fruto do abacaxi utilizando-se um novo adsorvente para cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), tendo a clorofila obtida de folhas vegetais como agente quelante. As matrizes apresentaram baixa dispersão axial entre  $6,58 \cdot 10^{-8}$  a  $1,52 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , baixa resistência ao fluxo ( $K_w = 1,69 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ ) e pequena variação (0,72 a 0,86 cm) da altura equivalente a pratos teóricos (HETP) com a velocidade de escoamento. A purificação de bromelina foi avaliada em batelada a partir do extrato bruto da polpa do abacaxi (EXT) e do extrato precipitado com sulfato de amônia a 50% (EXT.PR) como soluções de extração, sendo analisados o tampão imidazol (200 mM, pH 7,2) e tampão acetato de sódio, pH 5,0 +1,0 NaCl como soluções de eluição. As frações eluídas com tampão acetato obtiveram maior fator de purificação, 3,42 e 5,09 a partir do EXT e EXT.PR, respectivamente. Todos os métodos testados foram capazes de separar formas da bromelina com pesos moleculares entre  $\pm 21$  a 25 kDa, corresponde ao relatado na literatura. Apesar do método utilizando o EXT.PR ter se destacado quanto à pureza, o número de etapas tende a aumentar os custos do processo, por isso foi avaliado o processo de purificação em leito monolítico a partir do extrato bruto. O produto final obtido a partir da captura em leito monolítico acoplado ao sistema cromatográfico apresentou fator de purificação igual a 6, sendo observado apenas uma banda na análise de eletroforese SDS-PAGE, indicando que a matriz produzida é capaz de separar proteínas específicas da fração total existente na matéria-prima. A matriz IMAC imobilizada com clorofila mostrou-se promissora e viável para aplicação em processos de purificação de proteases.

**Palavras chave:** Criogel, agente quelante, enzimas, protease, viabilidade, redução de custos.

## 1. INTRODUÇÃO

A bromelina (EC 3.4.22.33) é uma cisteíno-protease presente no abacaxi com alta atividade proteolítica e amplo potencial de aplicação industrial. Na indústria alimentícia é utilizada no amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, panificação, produção de hidrolisados proteicos (Novaes et al., 2016; Nwagu e Ugwuodo, 2019), além de ser utilizada na produção de fármacos, no tratamento de digestivos, feridas e inflamações (Nwagu e Ugwuodo, 2019).

Devido aos benefícios a saúde humana mencionados, comercialmente a bromelina atinge um preço alto, sendo comercializada por cerca de USD 4000 por Kg. De acordo o relatório da Grand

View Research, Inc. (2022), o mercado global da bromelina foi estimado em US\$ 24,24 milhões em 2021 e espera-se que registre uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,1% de 2022 a 2030, devendo atingir US\$ 56,5 milhões até 2028. A crescente inclusão do produto nos segmentos farmacêuticos, saúde e suplementos alimentares, além da conscientização dos consumidores quanto aos benefícios das enzimas provenientes das frutas, deverá alimentar o crescimento do mercado global da bromelina (Transparency Market Research, 2019).

Neste cenário estudos sobre tecnologias alternativas de purificação e extração de enzimas, são de grande interesse, visando sempre obter processos economicamente viáveis (Han et al., 2019a). A utilização da cromatografia nos protocolos de purificação de proteínas é uma estratégia para eliminar algumas etapas, aumentando o rendimento e reduzindo os custos do processo (Ramli et al., 2017). Com isso, colunas monolíticas poliméricas supermacroporosas são desenvolvidas, com destaque para os criogéis, que possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, permitindo o uso de soluções mais viscosas. Essa característica traz consigo uma redução nos custos operacionais, pois elimina etapas de preparo das amostras, podendo aumentar a escala de produção (Kartal e Denizli, 2020). Visando aperfeiçoar a utilização dos criogéis como matrizes cromatográficas para purificação de biomoléculas, são realizadas modificações em sua estrutura, como a imobilização de ligantes de afinidade, aumentando a especificidade e capacidade de purificação (Rodriguez et al., 2020).

Dentre os diversos métodos utilizados tem-se a funcionalização com íons metálicos, para a utilização dessas matrizes na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), que tem sido considerada, como uma das técnicas mais eficientes para separação e enriquecimento de proteases. Baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por grupos doadores de elétrons (tais como o anel imidazol de histina, o tiol da cisteína e indol do triptofano) expostos na superfície das proteínas (Han et al., 2019a).

A seletividade e a capacidade adsorptiva na cromatografia de afinidade IMAC depende das condições cromatográficas, dos íons metálicos e do agente quelante. Portanto, a identificação de novos agentes quelantes que possam aumentar a capacidade de adsorção e seletividade da matriz, proporcionar condições brandas de eluição da molécula adsorvida, tornando a purificação mais eficiente, além de provavelmente reduzir os custos do processo de produção dos adsorventes de separação, é de grande interesse (Rodriguez et al., 2020).

A clorofila pode ser um ligante em potencial, visto que possui o quelato de magnésio presente em sua estrutura, além de formar complexos metal-clorofila, substituindo os íons de  $Mg^{+2}$

por íons metálicos como cobre ou zinco, que são mais estáveis a mudanças de pH, temperatura e luz (Kang et al., 2019). Ainda, possui em sua estrutura grupos carbonilas que são capazes de interagir com o suporte formando bases de Schiff, podendo atuar como braços espaçadores, devido ao tamanho da sua molécula, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico que podem favorecer o processo de adsorção, além de ser facilmente extraída das folhas das plantas, reduzindo os custos das matrizes.

Assim sendo, objetivou-se com esse trabalho avaliar a purificação da bromelina presente no fruto do abacaxi utilizando criogéis de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) funcionalizados com clorofila.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes**

Acrilamida (AAm, Sigma CAS: 79-06-1, 99%), bis- acrilamida (BAAm, NEON, CAS: 110-26-9, 99%), alil-glicidil-éter (AGE, Sigma, CAS: 106-92-3, 99%), persulfato de amônio (APS, NEON, CAS: 7727-54-0, 98%), N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino -TEMED (NEON, CAS: 110-18-9, 98,5%), borohidreto de sódio (Sigma, CAS: 16940-66-2, 98%), N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) -HEPES (Êxodo científica, CAS: 75277-39-3, 98%), imidazol (Êxodo científica, CAS: 288-32-4, 99%), fosfato de sódio monobásico (Sigma, CAS: 7558-807-7, 99%), fosfato de sódio bibásico (Sigma, CAS 7558-79-4, 99%), bromelina (Sigma, CAS: 37189-34-7,  $\geq 3$  unidades/mg de proteína), etanolamina (Sigma, CAS: 141-43-5, 99%), glutaraldeído (Dinâmica Química Científica, CAS: 111-30-8, 25% em H<sub>2</sub>O), etilenodiamina (Sigma, CAS: 107-15-3, 99%), caseína bovina (Sigma CAS 9000-71-9, 95%), albumina sérica bovina (Sigma, CAS 9048-46-8, 98% ), Quimosina (HA-LA, 75 IMCU ),  $\beta$ -lactoglobulina (Sigma, CAS 9045-23-2, 98%),  $\alpha$ -lactoalbumina (Sigma, CAS 9051-29-0, 85%), água deionizada. Todos os outros reagentes necessários para o desenvolvimento do trabalho possuíam, no mínimo, grau analítico PA-ACS, sendo descritos ao longo do detalhamento das metodologias.

### **2.2. Preparo dos extratos bruto de clorofila**

As clorofilas foram extraídas das folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) adquiridos em feira livre do município de Itapetinga-Bahia. O extrato foi obtido a partir de métodos adaptados descrito por Fernandes et al. (2016), Derrien et al. (2017) e Singh et al. (2018). Os ramos de espinafre (~700

g) foram lavados e higienizados com água clorada a 100 ppm por 15 min e então as folhas foram separadas das hastes. Posteriormente foi realizada a secagem das folhas em estufa com circulação de ar (Solab Científica, SL 102, Brasil) a 45 °C por 24 h. Depois de seco o material foi triturado em moinho de facas (Willye, Marconi, Brasil). Para a extração do pigmento, pesou-se 0,5 g do material seco que foi misturado com 10 mL de solução de álcool metílico: água destilada (70:30 v.v<sup>-1</sup>). A mistura foi colocada em banho ultrassônico Sanders, Soniclean 6, Minas Gerais, Brasil) por 30 min a 37 °C e decorrido esse período, filtrou-se o extrato em papel filtro Whatman nº 1, sendo o resíduo reextraído mais duas vezes com o solvente para garantir extração completa. Todos os extratos foram reunidos e centrifugados a 2630 g por 10 min, e então concentrados em evaporador rotativo (IKA<sup>®</sup>HB Digital, RV8, USA) a 40 °C até a eliminação do álcool. Posteriormente foram acondicionados em frascos âmbar, e armazenados a -18 ±1 °C, até a utilização dos mesmos.

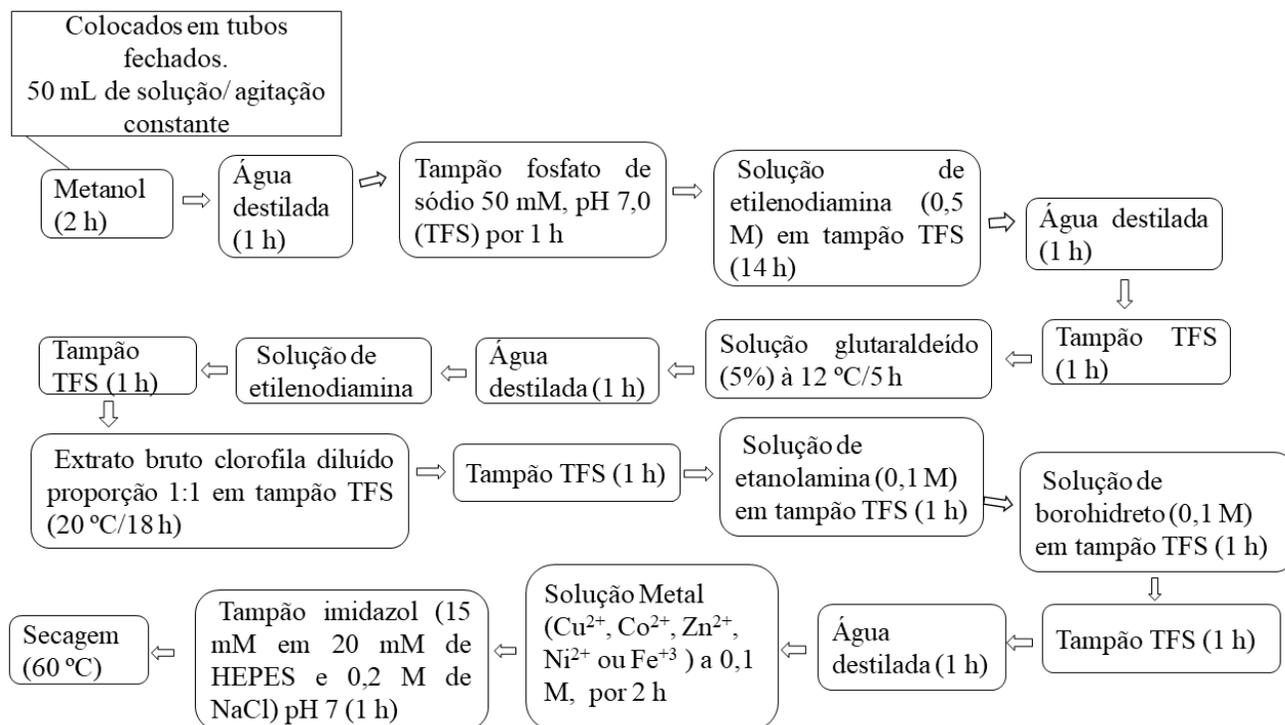
### **2.3. Síntese e funcionalização dos criogéis**

Para a síntese dos criogéis foram adaptadas metodologias propostas por Gonçalves et al. (2016), Nascimento et al. (2019) e Silva et al. (2019). A matriz de criogel base foi preparada a partir de uma solução contendo 7% de monômeros de acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida e alil glicidil éter em meio aquoso. O processo de polimerização foi catalisado pela adição de persulfato de amônio (140 µL) e N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina (91 µL). A solução foi vertida em tubos de aço inoxidável com 7,2 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro, depois foram selados e colocados em banho termostático à -12 °C por 24 h e posteriormente secos em estufa a 60 °C.

Para o processo de modificação da superfície e funcionalização com clorofila, foi adotada a metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2016) e Silva et al. (2019), utilizando-se o método do glutaraldeído (Figura 1).

Os monólitos poliméricos de criogéis secos, com cerca de 6,2 cm de altura, 2 cm de diâmetro, e peso médio de 2,25 g, foram colocados em tubos fechados de 50 mL e submetidos a agitação rotativa a 15 g em todas as etapas do processo. Foi solicitada a proteção intelectual das matrizes desenvolvidas junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, Brasil), a partir da solicitação do depósito de patente de invenção, registro número BR 10 2021 009055 3 (em anexo). As matrizes foram colocadas em contato com a solução do extrato bruto de clorofila (CLO) em tampão fosfato de sódio sob ausência de luz e à temperatura controlada (20±0.5) °C. Na etapa em que os criogéis estão em contato com a solução de borohidreto os frascos permanecem abertos

devido a formação de gases. Decorrido a funcionalização os adsorventes foram colocados em estufa a 60°C até serem completamente secos e armazenados em frascos herméticos em temperatura ambiente até o seu uso.



**Figura 1-** Esquema das etapas de funcionalização do criogel

Após o processo de funcionalização foram obtidos monólitos com 209,15  $\mu\text{M}$  de Cu por grama de criogel e porosidade de 85%, como determinados no artigo anterior. As matrizes foram denominadas como CLO-Cu, neste estudo.

#### 2.4. Caracterização hidrodinâmica do leito monolítico utilizado

Uma coluna monolítica foi produzida utilizando-se um tubo de aço inoxidável com adaptadores em suas extremidades preenchido com uma peça com 2,18 g do criogel funcionalizado, obtendo-se um leito com 6,6 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro. A coluna produzida foi adaptada a um sistema cromatográfico preparativo Äkta Pure 25 L (GE Healthcare, Upsalla, Suécia) e equilibrada com 20 volumes de coluna (VC) de água deionizada a  $25 \pm 2$  °C.

Para a determinação do coeficiente de dispersão axial (Dax) da matriz, a distribuição do tempo de residência (DTR), a altura equivalente a um prato teórico (HETP), permeabilidade hidráulica (Kw) e a porosidade total foi utilizado o método dos momentos usado para leitos fixos

empacotados (Ueberbacher et al., 2010; Mól et al., 2017). Com a coluna produzida adaptada ao sistema cromatográfico, utilizou-se pulsos de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetona (10% v.v<sup>-1</sup> em água), a  $25 \pm 2$  °C, injetados em triplicata. A fase móvel (água deionizada) foi injetada no sistema em diferentes vazões que variaram de 1 mL.min<sup>-1</sup> a 8 mL.min<sup>-1</sup>, e o sinal do pico foi monitorado na saída da coluna por um detector UV a 280 nm. Para a determinação da porosidade total do leito, foi calculado então o tempo de retenção (ou primeiro momento estatístico) para os pulsos injetados (equação 1). Para a injeção dos pulsos de acetona no tempo de corrida igual a zero, o tempo de retenção é definido pela equação 2.

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

Onde:  $M_1$  é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento,  $t_R$  é o tempo de retenção (s),  $t_i$  é o tempo (s) em que a  $i$ -ésima observação foi registrada,  $\Delta t_i$  é o intervalo de tempo (s) entre a  $i$ -ésima e a  $(i-1)$ -ésima observação (para  $i \geq 2$ ) e  $A_i$  é a absorvância registrada no tempo  $t_i$ .

$$t_R = \frac{L}{U} \varepsilon_t \quad (2)$$

Onde:  $L$  é o comprimento da coluna (m),  $U$  é a velocidade de escoamento da fase móvel (m.s<sup>-1</sup>) e  $\varepsilon_t$  é a porosidade total

Para a determinação das curvas de DTR e dos coeficientes de dispersão axial, além dos tempos de retenção foram determinados também as variâncias ( $\sigma_t^2$ ) apresentada na equação 3, utilizando os dados da curva do DTR plotadas pela equação 4, a partir do qual foi possível obter o coeficiente de dispersão axial (equação 5) para diferentes taxas de fluxo por regressão não linear, utilizando-se a ferramenta solver do software MS-Excel® 2019 (Microsoft, Redmond, EUA), bem como determinar a altura dos pratos teóricos equivalente (equação 6).

$$\sigma_t^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n t_i A_i} - t_R^2 \quad (3)$$

Onde:  $\sigma^2$  é a variância do pulso observado ( $s^2$ ),  $t_i$  é o tempo ( $s$ ) em que a  $i$ -ésima observação foi registrada,  $\Delta t_i$  é o intervalo de tempo ( $s$ ) entre a  $i$ -ésima e a  $(i-1)$ -ésima observação (para  $i \geq 2$ ),  $A_i$  é a absorvância registrada no tempo  $t_i$  e  $t_r$  é o tempo de retenção do pulso observado ( $s$ ).

$$E_\theta = t_R \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (4)$$

Onde:  $E_\theta$  é a função de distribuição de tempo de residência normalizada ( $s^{-1}$ ) e  $Abs$  é a absorvância registrada em função do tempo.

$$\frac{\sigma^2}{t_r^2} = 2 \left( \frac{Dax}{uL} \right) - 2 \left( \frac{Dax}{uL} \right)^2 \left[ 1 - \exp \left( - \frac{uL}{Dax} \right) \right] \quad (5)$$

Onde:  $Dax$  é o coeficiente de dispersão axial aparente ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ),  $L$  é a altura ( $m$ ) do leito,  $u$  é a velocidade ( $m \cdot s^{-1}$ ) intersticial da fase móvel ( $u = U \epsilon T$ ),  $t_r$  é o tempo de retenção do pulso ( $s$ ) e  $\sigma^2$  é a sua variância ( $s^2$ ).

$$HETP = L \frac{M_2}{M_1^2} = L \frac{\sigma^2}{t_r^2} \quad (6)$$

Onde:  $L$  é a altura do leito ( $m$ ),  $t_r$  é o tempo de retenção do pulso ( $s$ ) e  $\sigma^2$  é a sua variância ( $s^2$ ).

A permeabilidade ao escoamento foi determinada utilizando-se o método baseado na equação de Darcy (equação 7), onde o criogel foi submetido a diferenças de pressão hidrostática que variaram entre 0,01 MPa e 0,14 Mpa, sendo a vazão volumétrica registrada na saída do leito.

$$\Delta P = \frac{\eta L}{AK_p^1} Q \quad (7)$$

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

## **2.5. Preparo das soluções de alimentação**

### **2.5.1. Obtenção do extrato bruto**

O extrato bruto enzimático foi obtido a partir da polpa dos frutos do abacaxi (*Ananas Comosus*) adquiridos em mercados locais da cidade de Itapetinga-Bahia. Utilizando-se metodologia adaptada de Debnath et al. (2019) e Han et al. (2019b). A polpa foi separada da casca e então triturada em liquidificador juntamente com uma solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, na proporção 1:1 (polpa: tampão m.v<sup>-1</sup>). A mistura resultante foi filtrada em tecido voil para remoção do material fibroso e particulados em suspensão, posteriormente foi centrifugado (Centrifuga refrigerada, SPLabor, modelo SP-701, São Paulo, Brasil) a 2630 g por 20 min a 4 °C pra remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato bruto) foi armazenado a -18 °C até seu uso.

### **2.5.2. Precipitação do extrato enzimático**

Para o processo de precipitação com sulfato de amônio seguiu-se a metodologia descrita por Chaurasiya e Hebbar, 2013. O sulfato de amônio sólido foi adicionado em pequenas quantidades a 50 mL de extrato bruto mantido em banho de gelo até atingir 50% de saturação a 0 °C, definido através de testes preliminares. Após a adição completa do sulfato de amônio as amostras foram incubadas por 10 min para garantir a precipitação completa e em seguida foram centrifugadas a 2630 g por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado obtido de 50 mL do extrato bruto foi ressuspendido com cerca de 5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0. As soluções foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio sob refrigeração por cerca de 18 horas, trocando a solução pelo menos 3 vezes. Após a diálise o extrato foi centrifugado por 10 min a 2630 g a 4 °C para remoção de qualquer precipitado.

## **2.6. Purificação da bromelina**

### **2.6.1. Purificação em batelada**

A purificação com os adsorventes de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) produzidos foi conduzida em batelada, utilizando-se tubos Falcon de 50 mL. Nos tubos, 450 mg da matriz CLO-Cu cortados em discos com cerca 1,4 cm de espessura foram colocados em contato com 40 mL do extrato bruto (EXT) ou do extrato após a precipitação (EXT.PR), mantidos sob

agitação a 15 g por cerca de 2 h à temperatura ambiente ( $25\pm 2$ ) °C. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e avaliada a concentração de proteína (Bradford, 1976) e atividade enzimática (Devakate et al.,2009 e Mohan et al.,2016). As matrizes foram colocadas em contato com solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 por 30 min sob agitação constante para remoção das proteínas não adsorvidas. Então, foram avaliados dois agentes para a eluição da proteína capturada. 1) 10 mL de solução tampão imidazol (200 mM, pH 7,2) durante 3 h e sob agitação rotativa constante. 2) 10 mL de solução-tampão acetato (20 mM pH 4,0) adicionado de 1,0 M de cloreto de sódio (NaCl), sob as mesmas condições de tempo e agitação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As soluções eluidas foram avaliadas quanto à concentração de proteínas, atividade enzimática e eletroforese em gel SDS-PAGE. A presença das bromelinas foi confirmada por zimograma e cromatografia de filtração em gel. As frações eluidas com solução tampão de acetato adicionado de NaCl foram dialisadas para retirada do sal, utilizando-se tubos de diálise de 2 cm previamente ativados imersos em tampão por 5 h sob refrigeração, e posteriormente seguiu-se para as análises realizadas.

### **2.6.2. Purificação em leito monolítico**

O uso potencial da matriz produzida na purificação de bromelina também foi avaliado em leito monolítico. O extrato bruto da bromelina foi obtido de acordo com o descrito no item 2.4.1. Os ensaios de purificação foram realizados utilizando-se um sistema cromatográfico Äkta Pure 25 L (GE Healthcare, Upsalla, Suécia), em uma vazão de  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a 25 °C, utilizando-se uma coluna de 6,6 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro do criogel. A coluna foi equilibrada com quatro volumes de coluna (VC) de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0. A solução de alimentação (extrato bruto) foi passada através da coluna criogel (7 VC) e a curva de ruptura monitorada utilizando-se um detector UV a 280 nm. Após isso, a coluna foi lavada com cerca de 4 VC do tampão de equilíbrio para retirada do material não-adsorvido. A eluição do material adsorvido utilizando-se 5 VC de solução-tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,0 contendo 1,0 M de NaCl. O pico de eluição observado foi coletado manualmente, logo após o detector, determinando-se o seu início e fim no valor de 0,060 de  $\text{Abs}_{280\text{nm}}$  (60 mAU). Terminada a eluição, a coluna foi lavada com 4 VC de água deionizada e novamente equilibrada com tampão fosfato. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Os picos coletados na etapa de eluição foram dialisados e submetidos às mesmas análises descritas no item 2.6.1.

### 2.6.3. Avaliação do extrato e frações eluídas

#### 2.6.3.1. Determinação da concentração de proteína e atividade enzimática proteolítica

A concentração de proteínas foi determinada de acordo o método descrito por Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina como proteína padrão para a construção da curva de calibração.

O ensaio da atividade proteolítica (AP) foi realizado pelo método da caseína, utilizando-se metodologias adaptadas de Devakate et al. (2009) e Mohan et al. (2016). O extrato e/ou os picos coletados (0,5 mL) foram adicionados a 5 mL de solução de caseína 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0). A mistura foi incubada a 37 °C em banho termostático (Tecnal, modelo Te-184) por 10 min. A reação foi interrompida com a adição de 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético a 30%, sendo a mistura centrifugada a 2000 g por 10 min para remoção do precipitado. A absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de tirosina equivalente em 1 mL de meio reacional por minuto, calculada de acordo com a equação 8.

$$AP(U/mL) = \frac{(\mu\text{mol/mL de tirosina}) * \text{fator de diluição} * \text{volume reacional}(mL)}{\text{Volume da amostra}(mL) * \text{tempo de reação} (\text{min})} \quad (8)$$

#### 2.6.3.2. Cálculo do fator de purificação e rendimento

O fator de purificação (FP) dado pela equação 10, que compara atividade enzimática específica (equação 9) no material purificado com a atividade enzimática específica (AE) do material bruto, e o rendimento (R) determinado de acordo a equação 11.

$$\text{Atividade específica } (U.mg^{-1}) = \frac{\text{Atividade enzimática } (U.mL^{-1})}{\text{Concentração de proteína } (mg.mL^{-1})} \quad (9)$$

$$FP = \frac{\text{Atividade específica da eluição (U. mg}^{-1})}{\text{Atividade específica do extrato bruto (U. mg}^{-1})} \quad (10)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade enzimática total da eluição (U)}}{\text{Atividade enzimática total do extrato (U)}} * 100 \quad (11)$$

### 2.6.3.3. Cromatografia de filtração em gel

Para avaliação da massa molecular da bromelina nas amostras analisadas, utilizou-se uma coluna de filtração em gel SRT-C SEC 150Å, MW range 500 ~ 150,000 (Delaware Technology Park, USA) (4,6x300 mm, 5 µm), conectada ao sistema HP Agilent 1260 Infinity II. Uma alíquota de 5 µL dos extratos ou frações eluídas foram injetadas e as proteínas foram separadas por eluição isocrática utilizando tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 a uma vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e tempo de análise de 30 min, monitorados a 280 nm em um detector UV. Uma curva de calibração com padrões de peso molecular conhecidos foi preparada com albumina sérica bovina (66,4 kDa), Quimosina (35,6 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa), α-lactoalbumina (14,2 kDa). A relação linear entre o tempo de retenção e o logarítmico do peso molecular (MW) foi estabelecida para estimativa da identificação da bromelina (Jin et al., 2015).

### 2.6.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada segundo metodologia proposta por Laemmli (1970), com modificações. Para isso, utilizou-se gel de separação com 12% de concentração e gel de empilhamento com 5% de concentração de poliacrilamida. Alíquotas de 30 µL das amostras desnaturadas foram transferidas para cada poço do gel, de modo que a quantidade aplicada foi de aproximadamente 10 µg de proteína, e as corridas realizadas a uma tensão constante de 100 V (Loccus, LPS 300V, Brasil). Foram usados como padrões de peso molecular (Bio-rad, Hercules, CA, EUA): Miosina (200 kDa), β-galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,5 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Após a corrida, o gel foi colocado em uma solução fixadora (10% metanol (v.v<sup>-1</sup>), 5% de ácido acético (v.v<sup>-1</sup>)) por 4 h, e posteriormente as proteínas foram coradas usando solução de 0,1% (m.v<sup>-1</sup>) de Coomassie Blue G-250 e descorado com solução 30% (v.v<sup>-1</sup>) de álcool etílico e 7,5% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido acético.

A atividade proteolítica foi detectada por zimograma de acordo metodologia adaptada proposta por Andrade et al. (2019). Alíquotas das amostras: 100  $\mu\text{L}$  da solução de alimentação ou 200  $\mu\text{L}$  das eluições foram adicionados a 300  $\mu\text{L}$  e 200  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, contendo 5 % (m.v<sup>-1</sup>) de SDS, 1% de glicerol (v.v<sup>-1</sup>) e 0,05% (m.v<sup>-1</sup>) de azul de bromofenol. Trinta microlitros da mistura foram transferidas para os poços dos géis SDS-PAGE preparados conforme descrito anteriormente, adicionados de 1% (m.v<sup>-1</sup>) de gelatina. Após a migração eletroforética, o gel foi lavado por duas vezes com uma solução de Triton-x a 2% (v.v<sup>-1</sup>) por 30 min. A reação de hidrólise foi realizada incubando-se o gel a 37 °C por 48 h em solução contendo tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e CaCl<sub>2</sub> 15 mM. A atividade enzimática foi observada pela revelação de bandas translúcidas, após a coloração do gel com solução de Coomassie R-250 por 24 h, seguido pela descoloração com uma solução contendo 30% (v.v<sup>-1</sup>) de etanol e 7,5% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido acético através de várias lavagens.

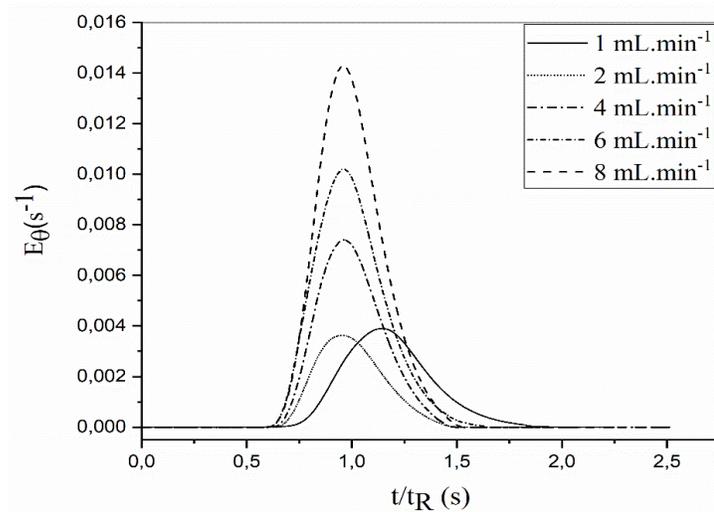
## **2.7. Delineamento experimental**

Os testes de purificação relativos à atividade enzimática, atividade enzimática específica, fator de purificação, foram conduzidos utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de significância de ( $p < 0,05$ ). O experimento de caracterização hidrodinâmica do leito foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Caracterização das matrizes**

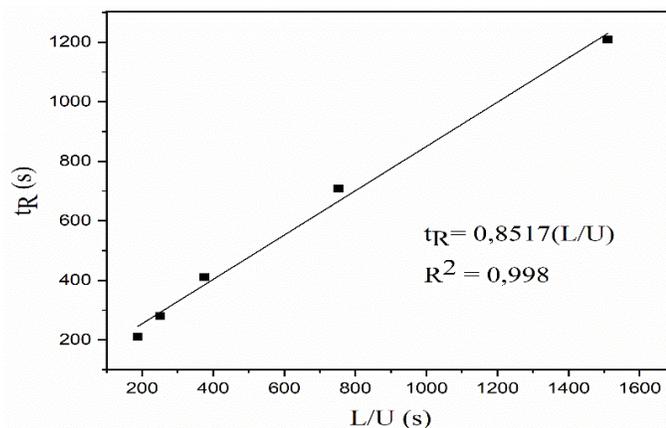
As curvas de distribuição do tempo de residência (DTR) a várias velocidades superficiais de escoamento estão apresentadas na Figura 2. Observou-se que as curvas se apresentam mais dispersas com a diminuição da velocidade de escoamento do líquido e que os picos se tornam mais estreitos com o aumento da vazão. Comportamento semelhante foi verificado em outros estudos na literatura ao trabalharem com criogéis funcionalizados com íons metálicos como Carvalho et al. (2014) e com matrizes de afinidade de poliácridamida como Machado et al. (2015) e Neves et al. (2020).



**Figura 2-** Curvas de distribuição do tempo de residência em várias velocidades de fluxo na coluna

Verificou-se ainda que as curvas foram assimétricas, obtendo a formação de caudas estendidas, o que pode ser atribuído a não-homogeneidade da estrutura dos poros das matrizes ou a falta de uniformidade na distribuição desses poros que são formados durante o processo de produção dos criogéis, promovendo uma mistura dentro da coluna (Yao et al., 2006; Fontan et al., 2017).

A partir das curvas de DTR foi possível obter os dados experimentais pelo método dos momentos com pulsos de acetona para avaliar a porosidade no criogel produzido, apresentados na Figura 3.

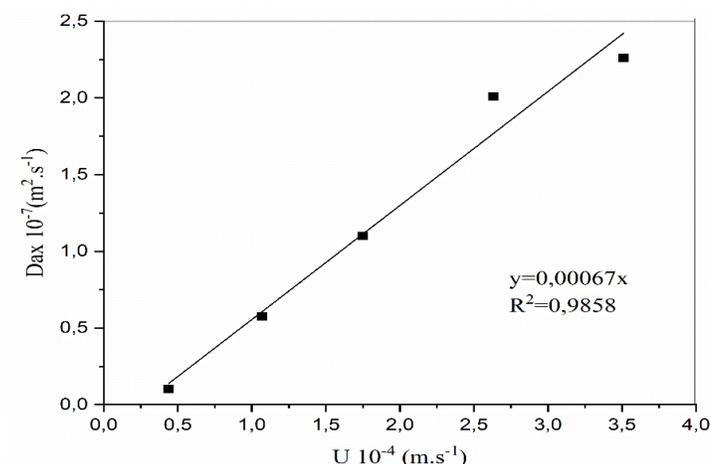


**Figura 3-** Dados experimentais e equações ajustadas na determinação da  $\epsilon_T$  com pulsos de acetona

A porosidade total do leito de 85% foi a mesma obtida pelo método já difundido na análise de criogéis poliméricos que se baseia na medida de água livre presente nos adsorventes. Fontan et

al. (2017) também observaram valores próximos para porosidade do criogel ao comparar as duas técnicas, mostrando que o método baseado na injeção de pulsos, utilizada para leitos fixos empacotados, também pode ser usada para determinar a porosidade dos monólitos poliméricos. Os resultados encontrados estão de acordo com o reportado para criogéis de poli(acrilamida) IMAC por outros autores que relatam valores que variam entre 58 a 88% (Carvalho et al., 2014; Yang et al., 2020; Inanan, 2022).

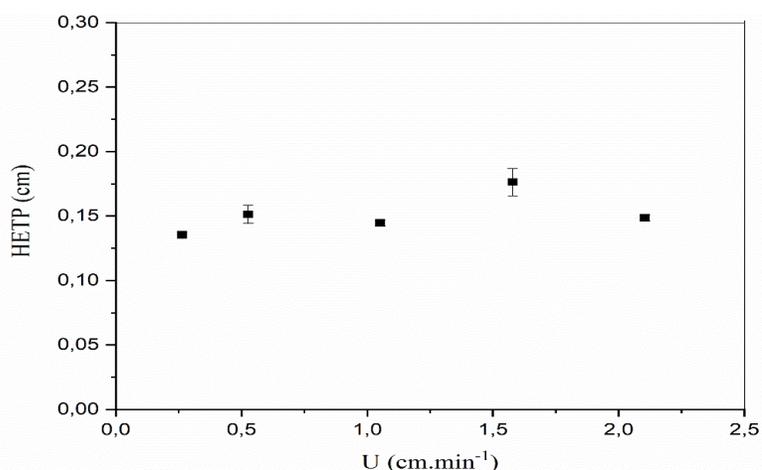
O tempo médio de residência e a variância foram calculados pelo método dos momentos a partir do qual foram determinados os coeficientes de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) e o HETP. Os coeficientes de  $D_{ax}$  em função da vazão da fase móvel estão apresentados na Figura 4.



**Figura 4-** Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito utilizado.

Pode-se observar que nas presentes condições os coeficientes de dispersão axial apresentaram valores entre  $1,01 \cdot 10^{-8}$  a  $2,26 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , aumentando com o incremento da vazão do fluxo. Os resultados obtidos são próximos aos citados na literatura por Carvalho et al. (2014), Machado et al. (2015), Fontan et al. (2017), Mól et al. (2017), Neves et al. (2020) e Coimbra et al., 2022 para criogéis de poli(acrilamida). Os valores de  $D_{ax}$ , as estreitas distribuições de tempo de residência e o pequeno alargamento de banda, são consequência da mistura dispersiva e rápida transferência de massa em meios porosos (Coimbra et al., 2022).

Os valores estimados para a altura equivalente a pratos teóricos (HETP) da coluna de criogel utilizada estão na faixa de 0,12 a 0,18 cm com baixa variação em função da vazão de escoamento do líquido, apresentados na Figura 5.

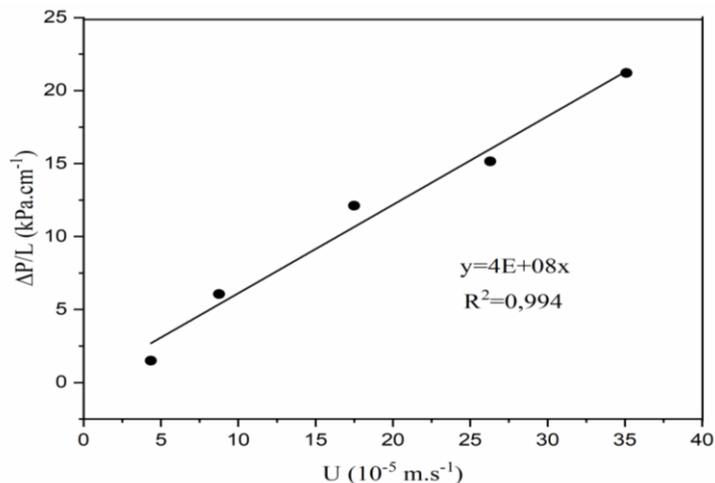


**Figura 5-** Valores de HETP em função da vazão de escoamento para pulsos de acetona

Os resultados demonstram que a velocidade de escoamento da fase móvel exerce um efeito pequeno sobre a altura equivalente dos pratos teóricos. Outros autores também relatam um pequeno efeito da vazão sobre HETP para criogéis de poliacrilamida imobilizado com íons de cobre, entretanto, os valores reportados foram superiores (entre 0,19 a 0,44 cm) ao observado no presente trabalho (Bibi et al., 2013; Nascimento, 2021). Carvalho et al. (2014) verificaram valores inferiores (0,061-0,071 cm) quando utilizaram criogéis de acrilamida IDA-Cu para purificação de lactoferrina. Resultados superiores foram obtidos por Fontan et al. (2017), Mól et al. (2017) e Neves et al. (2020) que verificaram valores entre 0,21 a 0,63 cm para criogéis de afinidade de poliacrilamida. De modo geral, os resultados encontrados indicam que a coluna irá comportar um alto número de pratos teóricos, melhorando o desempenho da coluna, além disso, a baixa variação de HETP implica que a transferência de massa ocorre predominantemente por convecção durante a etapa de adsorção (Neves et al., 2020; Coimbra et al., 2022).

Diversos fatores podem afetar a HETP e a Dax em criogéis por alterar sua estrutura porosa, como a composição, as condições de síntese, bem como o tamanho da coluna, o que pode justificar a variação dos resultados com os existentes na literatura (Fontan et al., 2017).

Na Figura 6 estão apresentados os dados experimentais da resistência ao fluxo em função da velocidade, apresentando uma tendência linear entre a queda de pressão e a vazão.



**Figura 6-** Dados experimentais da variação de pressão em diferentes velocidades superficiais de escoamento da fase móvel no leito de CLO-Cu produzido.

A permeabilidade ao escoamento calculada e obtida no leito do criogel monolítico foi de  $1,69 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ . Este valor foi próximo ao encontrado por Carvalho et al. (2014)  $K_w$  igual a  $4,7 \times 10^{-13} \text{ m}^2$  para criogéis IMAC. Mól et al. (2017) encontraram valor de  $K_w$  de  $5,9 \times 10^{-13} \text{ m}^2$  e Neves et al. (2020) obtiveram  $K_w$  igual a  $2,51 \times 10^{-13} \text{ m}^2$  ambos ao trabalharem com criogéis de afinidade. De modo geral, a resistência ao escoamento pelos criogéis supermacroporosos é baixa, o que permite a passagem de solutos com baixa resistência ao fluxo, atribuído aos poros altamente interconectados e grandes da estrutura do criogel, permitindo que as matrizes supermacroporosas sejam utilizadas como fase estacionária em técnicas cromatográficas, podendo ainda ser empregadas altas vazões sem que elevados valores de pressão sejam atingidos, portanto os resultados obtidos são desejáveis (Neves et al., 2020).

### 3.2. Purificação da bromelina em batelada

Os resultados obtidos para o processo de purificação em batelada, utilizando o extrato obtido da polpa do abacaxi estão apresentados na Tabela 1. Com o processo da precipitação foi possível concentrar o teor de proteínas totais, aumentando cerca de 2 vezes e conseqüentemente houve um aumento da atividade enzimática. A precipitação é uma das estratégias utilizadas para eliminar substâncias que possam interferir nas etapas posteriores de purificação. Outros autores como Chaurasya e Hebbar (2013), Banerjee et al. (2020) também utilizaram essa técnica na purificação da bromelina extraída do abacaxi e verificaram o mesmo comportamento, aumento dos teores de

proteínas e atividade enzimática, o que pode explicar o fato desse método ser utilizado como uma das etapas de pré-purificação.

**Tabela 1-** Características das soluções de alimentação e eluição

Amostra	Extrato			Extrato precipitado			
	<i>Extrato</i>	<i>EL. Imidazol</i>	<i>EL. tampão acetato</i>	<i>Extrato</i>	<i>Extrato precipitado</i>	<i>EL. Imidazol</i>	<i>EL. tampão acetato</i>
<b>Volume</b>	40	30	30	400	40	30	30
<b>C<sub>pt</sub> (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	0,47±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00		1,02±0,04	0,11±0,00	0,08±0,02
<b>Massa proteína (mg)</b>	18,80	1,23	0,91	188,00	40,8	3,33	2,15
<b>AP (U.mL<sup>-1</sup>)</b>	4,74±0,26	0,97±0,05	0,95±0,09		10,92±0,23	3,39±0,33	3,37±0,07
<b>Atividade total (U)</b>	189,68±0,10	29,12±0,24	28,53±0,15	1896±0,10	436,80±0,58	101,71±0,58	101,12±0,33
<b>AE (U.mg<sup>-1</sup>)</b>	9,95±0,22	24,29±1,50 <sup>c</sup>	31,78±0,67 <sup>b</sup>		10,75±0,72	30,82±1,72 <sup>b</sup>	42,15±1,02 <sup>a</sup>
<b>FP</b>		2,44±0,29 <sup>c</sup>	3,21±0,74 <sup>b</sup>		1,08±0,52 <sup>d</sup>	3,09±0,31 <sup>b</sup>	4,23±0,12 <sup>a</sup>
<b>Recuperação (%)</b>		15,33	15,04		23,03	5,36	5,31

C<sub>pt</sub>=Concentração de proteínas totais; EL.= Eluído. AP= atividade proteolítica; AE= atividade enzimática específica; FP= Fator de Purificação. As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente, entre si pelo teste Tukey (p >0,05). Valores médios ± desvio padrão

Ao analisar separadamente os ensaios utilizando as diferentes soluções de alimentação, verificou-se que apenas para atividade enzimática específica e fator de purificação, houve diferença significativa entre as frações eluídas com imidazol e tampão acetato. Notou-se ainda, uma redução na concentração de proteínas nas frações eluídas, quando comparadas ao extrato, entretanto detiveram atividade enzimática, sendo observado um aumento da atividade enzimática específica. Os resultados obtidos indicam que é possível separar, ainda que parcialmente, as proteínas de interesse das impurezas do extrato bruto utilizando-se as matrizes monolíticas de afinidade por íons metálicos produzidas.

A técnica IMAC explora a adsorção de proteínas que possuem afinidade com os íons metálicos, resultante de ligações de coordenação reversíveis formadas entre estes e determinados

resíduos de aminoácidos presentes em algumas proteínas. No caso da bromelina os resíduos de aminoácidos, tais como, o tiol da cisteína, o imidazol da histidina e indol do triptofano, são os que doam elétrons para o íon metálico, atuando como base de Lewis, estabelecendo a interação entre o adsorvente e a molécula de interesse (Uygun et al., 2015; Qiu et al., 2020). Em outros estudos, como os realizados por Hashim et al. (2011), Balaraman e Rathnasamy (2019), Han et al. (2019a), Han et al. (2019b) observaram o mesmo comportamento, aumento da atividade e redução do teor de proteínas, para processos de purificação de proteases vegetais por matrizes IMAC.

As frações eluídas por diferença de pH (tampão acetato + NaCl) apresentaram maior fator de purificação quando comparadas àquelas recuperadas com tampão imidazol, obtendo fatores iguais a 3,21 e 4,23 para soluções de alimentação utilizando o extrato bruto e o extrato após etapa de precipitação, respectivamente. O processo de purificação em que o extrato foi previamente precipitado com sulfato de amônio, destacou-se em relação a atividade enzimática específica e fator de purificação. De acordo com Jamir e Seshagirirao (2018) ao se utilizar mais de uma etapa para purificação, tende-se a aumentar a pureza da enzima, o que foi verificado pelos mesmos ao utilizarem três etapas de purificação de proteases extraídas do gengibre. A mesma tendência foi obtida por Han et al. (2020) ao utilizarem duas etapas para purificação da bromelina, sendo uma delas um método com quelato de metal.

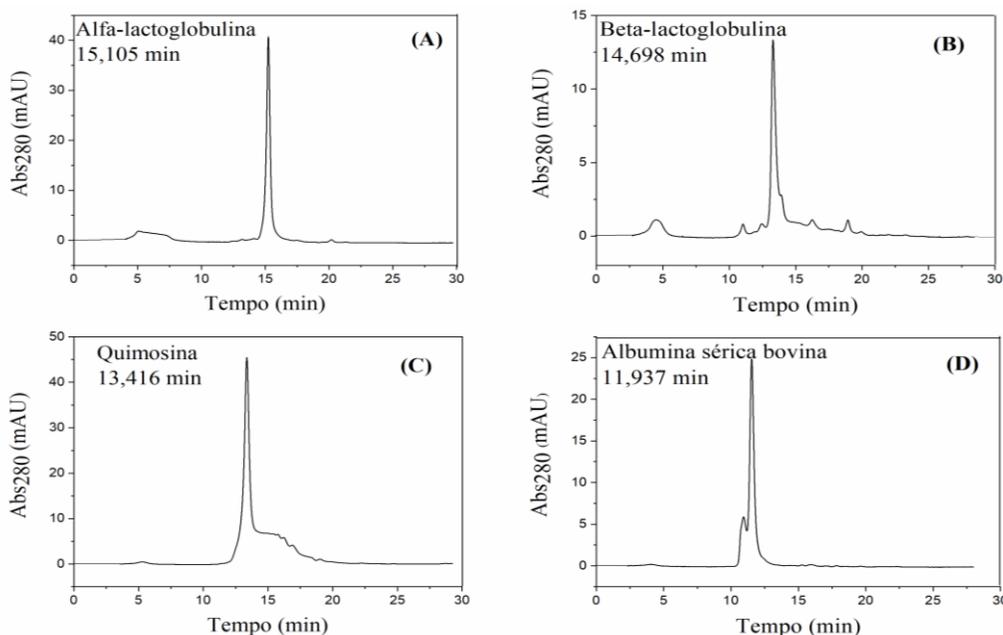
Entretanto, os FP obtidos no processo de purificação utilizando o extrato bruto como alimentação, em que o produto final obtido apresenta cerca de 3 vezes mais pureza do que a alimentação foi superior a outros estudos em que se utilizou a cromatografia IMAC na separação de proteases como Han et al. (2019b) que obtiveram um valor de 1,85 ao utilizarem esferas magnéticas de afinidade por íons metálicos na purificação da bromelina extraída da casca de abacaxi e Han et al. (2019a) que encontraram fator de purificação de 1,68 para a separação de proteases obtidas do abacaxi utilizando esferas poliméricas imobilizadas com íons de níquel. Os resultados obtidos neste trabalho ainda foram próximos aos de outros autores como Chaurasya e Hebbar (2013), Nor et al. (2016), Yu et al. (2019) que conseguiram um FP em torno de 3,0 para processos de purificação de proteases em única etapa. Portanto, a utilização direta do extrato bruto, ausente de etapa de pré-purificação se mostrou eficiente e é uma alternativa para purificação da bromelina, pois reduz os custos do processo e obtém um produto final com pureza significativa.

Verificou-se um rendimento em torno de 15% e 5% para as eluições a partir da alimentação com extrato bruto e extrato precipitado, respectivamente. Os resultados foram próximos ao verificado por Gamarra et al. (2022) que encontram uma recuperação em torno de 17% ao

utilizarem membranas poliméricas para a purificação da bromelina do suco de abacaxi e Nascimento (2021) que obteve 28% de rendimento ao utilizarem criogéis de acrilamida IMAC para a purificação da bromelina, enquanto que Nor et al. (2016) conseguiu recuperar 39,9% da bromelina utilizando membranas poliméricas. Wu et al. (2017) obteve um rendimento de 55,6% ao purificar a bromelina utilizando sistema aquoso bifásico. Valores superiores de recuperação relatados podem ser justificadas devido a diferença de métodos utilizados, utilização de soluções de alimentação mais concentradas. Com a utilização de mais de uma técnica de purificação, tende-se a uma redução da recuperação, devido a cada etapa eliminar componentes que não são de interesse, aumentando a seletividade, essa tendencia também foi observada por outros autores ao utilizarem mais de um método para purificar proteases (Liu et al., 2013; Balaraman e Rathnasamy, 2019; Han et al., 2020), portanto, os resultados obtidos demonstram o potencial da utilização do criogel de afinidade imobilizado com clorofila para purificação de proteases.

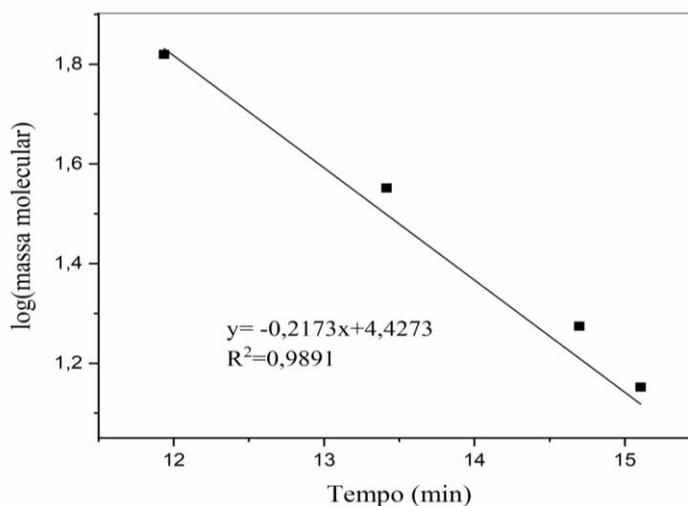
### 3.2.1. Cromatografia de filtração em gel, eletroforese e zimograma SDS-PAGE

Para confirmar a presença da protease adsorvida pela matriz IMAC e verificar os perfis de eluições realizou-se a análise de cromatografia por filtração em gel. Os cromatogramas dos padrões de albumina sérica bovina, Quimosina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina estão apresentados na figura 7.



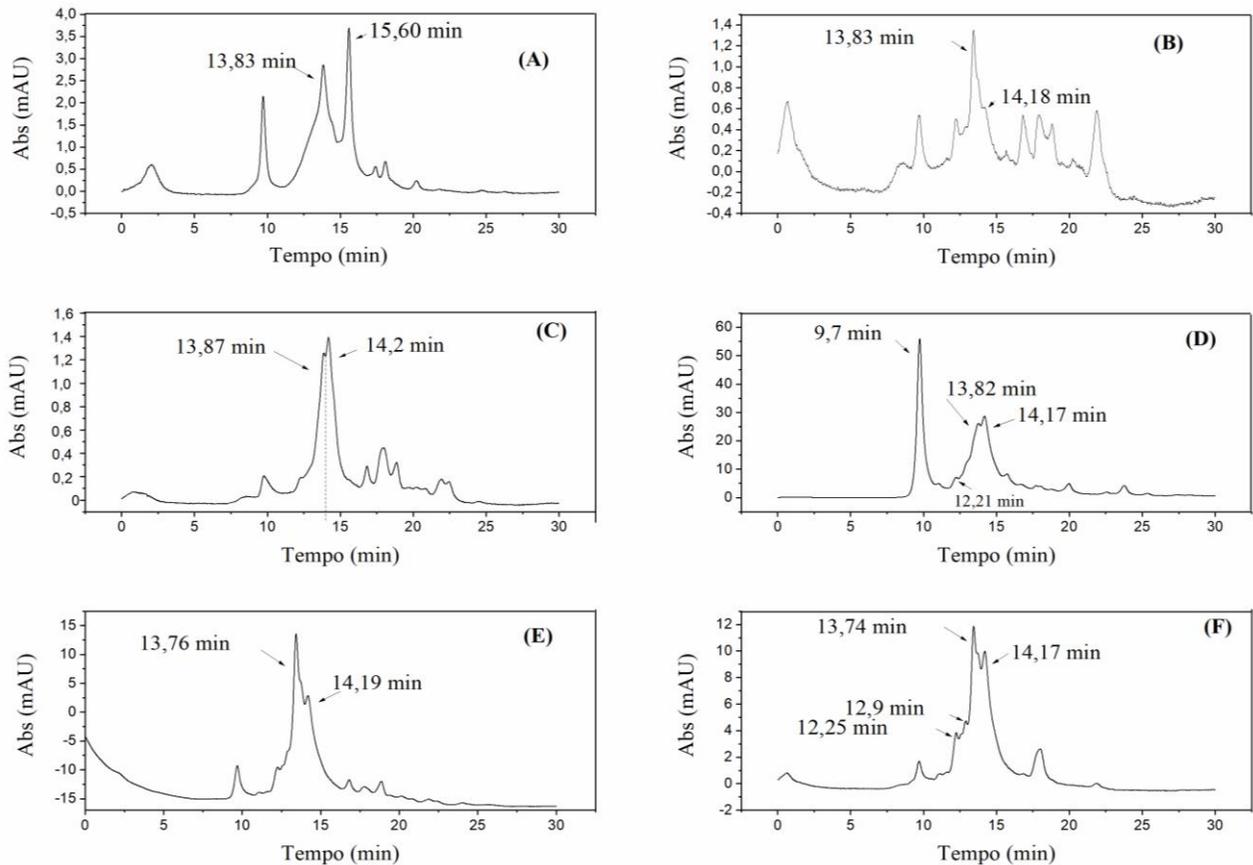
**Figura 7-** Cromatogramas dos padrões de  $\alpha$ -lactoalbumina (A),  $\beta$ -lactoglobulina (B), Quimosina (C), albumina sérica bovina (D).

A relação linear entre o tempo de retenção e o logarítmico do peso molecular (MW) estabelecida para estimar a identificação da bromelina está apresentada na figura 8.



**Figura 8-** Relação tempo de retenção X logaritmo da massa molecular das proteínas padrões

A Figura 9 apresenta os cromatogramas das soluções de alimentação e eluições. Observa-se que picos intensos presentes na solução do extrato (Figuras 9 a, d) no tempo de 9,72 e 15,60 min não aparecem com intensidade nos perfis cromatográficos das soluções eluídas (Figuras 9 b, c, e, f), o que sugere uma seletividade da matriz cromatográfica. Para o extrato bruto (Figura 9a) verificou-se a presença de três picos principais. O pico em 13,83 min representa um tamanho molecular ( $\pm 25,0$  kDa) compatível ao intervalo ( $\pm 21-35$  kDa) relatado na literatura para o peso molecular da bromelina (Damodaran et al., 2018; Guo et al., 2018). Outros picos podem ser relativos a impurezas do extrato. O valor de massa molecular obtido neste estudo também foi próximo ao verificado por Campos et al. (2019) ao analisarem a protease obtida dos sucos brutos da polpa e casca do abacaxi ( $\pm 25$  kDa) por cromatografia de filtração em gel, o que comprova que o pico identificado é característico da bromelina.



**Figura 9-** Cromatogramas de filtração em gel das soluções de alimentação e eluição da purificação da bromelina em batelada. (A) extrato bruto; (B) eluição com solução imidazol do extrato bruto; (C) eluição com tampão acetado +1,5 NaCl do extrato bruto; (D) extrato após precipitação; (E) eluição com tampão imidazol da solução precipitada; (F) eluição com tampão acetado +1,5 NaCl do extrato precipitado

Após a etapa de precipitação do extrato com sulfato de amônio (Figura 9d), gerou também o pico no mesmo intervalo de tempo relatado anteriormente, porém é observado a definição de um pico bem próximo (14,17 min) que apresenta um peso molecular de  $\pm 23,6$  kDa, podendo representar uma das formas enzimáticas da fração proteolítica ativa presente na polpa do abacaxi. Segundo Matagne et al., 2017, a fração proteolítica do abacaxi é conhecida por consistir de múltiplas formas enzimáticas que são comumente referidas como bromelina.

Nos cromatogramas de todas as frações eluídas (Figura 9 b, c, e, f) também é possível observar os dois picos na região característica da presença da bromelina, o que indica que o criogel IMAC foi capaz de adsorver a fração proteolítica presente nas soluções de alimentação. Observou-se ainda um aumento da intensidade desses picos nas eluições a partir do extrato precipitado

(Figuras e, f) ao comparar com as eluições do extrato bruto (Figuras b, c) que pode estar relacionado ao aumento dos teores de proteínas e atividade enzimática, comprovando os resultados relatados anteriormente.

Segundo Novaes et al. 2016 e Gross et al., 2020 a bromelina é uma mistura de diferentes tiol endopeptidases e durante processos de separação já foi possível isolar até seis componentes proteolicamente ativos. Alnajjar et al., 2022 também verificaram dois compostos proteicos, indicados como bromelina ( $\pm 22-27$  kDa), ao utilizarem a cromatografia de filtração em gel para bromelina a partir do suco da polpa do abacaxi. Outros autores relatam identificar mais de uma forma enzimática com pesos moleculares ( $\pm 28$  a  $\pm 21$  kDa) que coincidem com da bromelina ao trabalharem com o extrato do abacaxi (Costa et al., 2014; Matagne et al., 2017; Rojas et al., 2018; Gross et al., 2020) portanto, os resultados obtidos estão de acordo ao reportado na literatura.

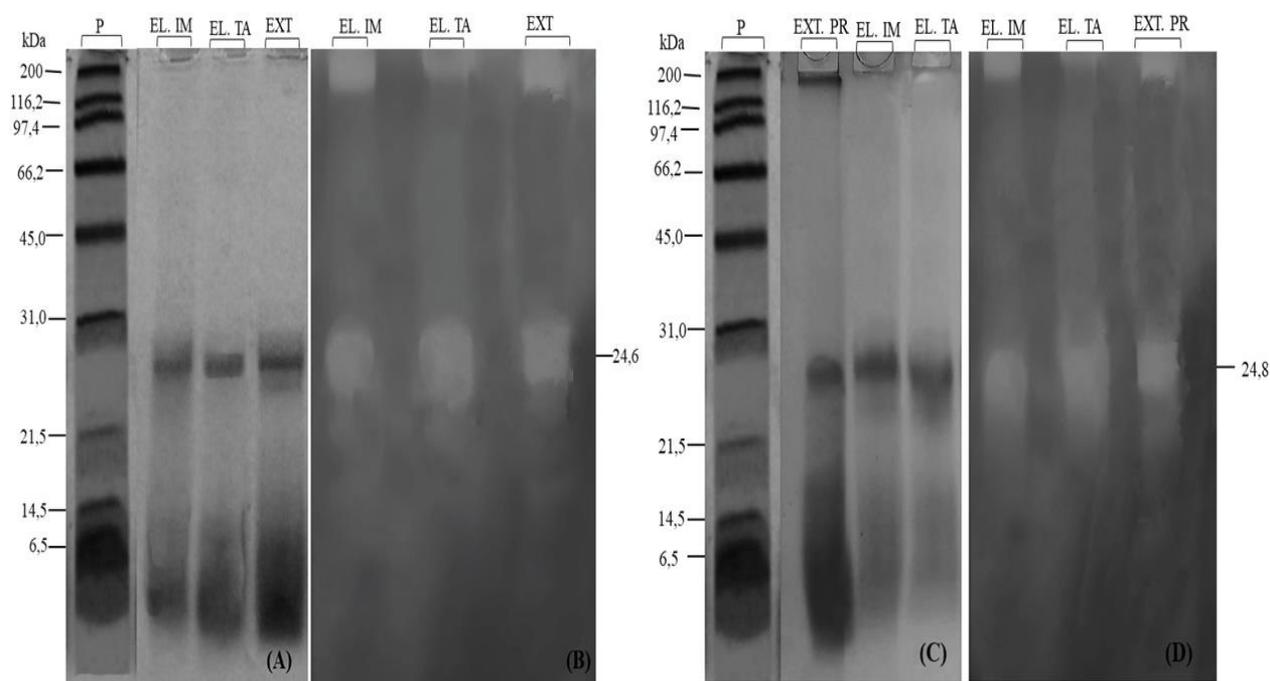
Nos produtos obtidos a partir da eluição com imidazol (Figura 9 b, e) e com tampão acetato + sal (Figura 9c, f) é observado a presença de outros componentes, sendo verificado no cromatograma a presença de outros picos além do característico da bromelina, isso pode ser devido à degradação proteica pela bromelina sobre outras enzimas (glicosidases, fosfatases, celulases, peroxidases, glicoproteínas) nas condições utilizadas durante o processo de eluição, gerando peptídeos que também podem ser detectados na absorbância utilizada (Novaes et al., 2016; Varilla et al., 2021). De acordo com Costa et al., 2014, durante a extração e purificação as peptidases são suscetíveis a oxidação e autólise. Com destaque para o produto obtido a partir da eluição com imidazol, pois, o imidazol é um eluente forte e, ao competir com a enzima pelo adsorvente, remove os íons metálicos, desfazendo o complexo metálico e carreando componentes da coluna, trazendo impurezas para a fração eluída, o que comprova os resultados obtidos anteriormente em que as soluções eluídas por diferença de pH obtiveram maior fator de pureza.

Os perfis cromatográficos dos produtos obtidos do processo de purificação utilizando extrato previamente precipitado, demonstram que as frações eluídas apresentaram um menor número de componentes ao comparar com aquelas obtidas a partir do extrato bruto, o que já era esperado visto que a solução de alimentação foi pré-purificada. Observa-se também uma maior intensidade dos picos referentes a bromelina, o que comprova os resultados obtidos para atividade enzimática, em que as soluções recuperadas desse processo se destacaram ao comparar com aquelas obtidas a partir do extrato bruto.

Portanto, os resultados obtidos indicam que a eluição por diferença de pH utilizando tampão acetato (pH 5,0 + 1,0 NaCl) foi mais branda e aparentemente proporcionou maior pureza, além de

apresentar menor custos para o processo, visto que o tampão imidazol também remove os íons metálicos da coluna, sendo necessário quelar os íons novamente para o uso repetido da matriz, o que aumenta os custos do processo.

O perfil eletroforético no extrato bruto e nas soluções de eluição analisadas em SDS-PAGE em condições desnaturantes estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10-** Géis de proteínas SDS-PAGE- Solução de alimentação e eluições extrato bruto: (A) gel de eletroforese, (B) gel do zimograma; Solução de alimentação e eluição do extrato após precipitação: (C) gel de eletroforese, (D) gel do zimograma. P: padrão; EXT: extrato bruto; EL.TA: eluição com tampão acetato; EL.IM: eluição com tampão imidazol; EXT.PR: extrato após precipitação.

Tanto as soluções purificadas a partir do extrato do abacaxi bruto (Figura 10a) quanto as frações separadas a partir do extrato purificado com sulfato de amônio (Figura 10c) apresentaram uma banda mais intensa com peso molecular em torno de 24,6 kDa e 24,8 kDa, respectivamente. Os valores são semelhantes aos encontrados na cromatografia de filtração em gel, e dentro da faixa (23-30 kDa) verificada por outros autores (Wan et al., 2016; Guo et al., 2018; Campos et al., 2019; Han et al., 2019b). Entretanto, foi identificado apenas uma banda, não sendo observada outra forma enzimática da fração proteolítica, possivelmente por apresentarem pesos moleculares muito

próximos, não foi possível identificar a separação dos dois componentes, sendo visualizado como se fosse apenas forma enzimática.

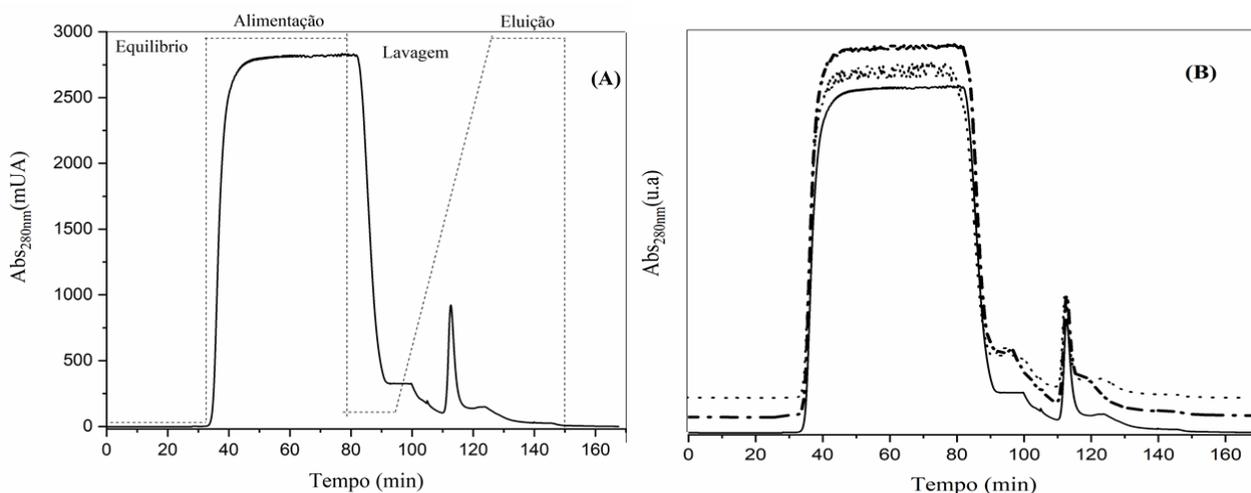
A zimografia (Figura 10b e 10d) indicam que foi possível purificar a bromelina obtida a partir do extrato do abacaxi, e que todas as frações recuperadas mantiveram atividade proteolítica, pois as mesmas conseguiram digerir a gelatina presente na composição do gel, que é constatado através da diminuição da coloração do gel, excluindo o início do gel, em que a descoloração se deve ao tempo inicial que a proteína ficou em contato com o gel antes de iniciar a corrida eletroforética, e por não estarem desnaturadas acabaram degradando a gelatina.

As frações eluídas a partir do extrato bruto precipitado (Figura 10d) destacaram-se entre as demais eluições, o que corrobora com os resultados relatados anteriormente. A mesma justificativa relatada para os resultados do perfil eletroforético, adequa-se para as imagens de zimografia, devido os dois componentes identificados na cromatografia de filtração em gel serem próximos, nos géis acabam sendo identificados como único produto. Portanto, os resultados indicam que os protocolos utilizados foram eficientes, e que a matriz IMAC imobilizada com clorofila foi capaz de adsorver a enzima alvo, apresentando potencial de utilização em processos de separação da bromelina.

### **3.3. Purificação da bromelina em leito monolítico**

Após a obtenção dos resultados da purificação em batelada realizou-se a captura das proteínas utilizando-se um leito monolítico acoplado a um sistema cromatográfico Akta Pure, utilizando o extrato bruto do abacaxi e a etapa de eluição por diferença de pH com tampão acetato de sódio + NaCl.

O perfil de captura e eluição na purificação da bromelina obtidas a partir do extrato bruto do abacaxi é apresentado na Figura 11. Foram observadas três etapas principais: o carregamento, lavagem e eluição da matéria-prima. Verificou-se a presença de um único pico de eluição e que entre as triplicatas o comportamento foi o mesmo, o que pode ser atribuído a especificidade do criogel IMAC imobilizado com clorofila, além de demonstrar que a condição de eluição usada foi eficiente na remoção do material adsorvido.



**Figura 11-** (A) Perfil de adsorção da purificação de bromelina a partir do extrato do abacaxi para o criogel IMAC em sistema cromatográfico Akta Pure; (B) Perfil de reuso da coluna para a purificação de bromelina

Os valores obtidos para as concentrações de proteína total e atividade enzimática na solução de alimentação e pico coletado, bem como o fator de purificação e a recuperação da atividade conseguidos para as frações purificadas são apresentados na Tabela 2.

Observou-se uma diminuição nos teores de concentração de proteínas, atividade enzimática e um aumento de cerca de 6 vezes para atividade específica, indicando que a matriz foi capaz de separar proteínas específicas da fração total de proteínas do suco de abacaxi.

**Tabela 2-** Resultados da purificação parcial cromatográfica da bromelina em leito monolítico

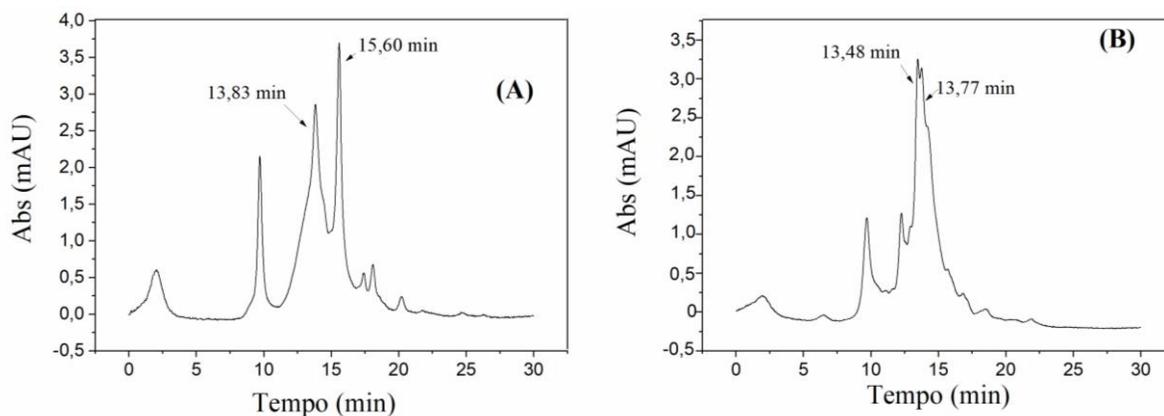
Determinações	Extrato	Eluído
$C_{pt}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,53±0,00	0,07±0,01
Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )	5,01±0,04	4,18±0,02
Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> )	9,48±0,09	59,61±0,00
<b>FP</b>		6,2±0,30

$C_{pt}$ =Concentração de proteínas totais; FP= Fator de Purificação.

O fator de purificação obtido indica que se conseguiu um produto final cerca de 6 vezes mais puro que a alimentação, com apenas uma etapa de purificação, indicando alta pureza, visto que a maioria das aplicações industriais não requerem elevado nível de pureza, principalmente a indústria de alimentos. Entretanto, os resultados demonstram que o produto obtido é passível de aplicações

que requerem uma enzima com alta pureza, com por exemplo, em aplicações medicinais (antibióticos, e outros medicamento orais), outros estudos como Han et al. (2019a) e Han et al. (2019b) obtiveram um fator de purificação inferior não superior a 2,0 ao utilizarem adsorventes de afinidade por íons metálicos para purificação de bromelina. O valor obtido neste estudo está de acordo com o reportado na literatura para processos de purificação de bromelina em que os autores relatam valores de fator de purificação não superior a 7 ao utilizarem até duas etapas de purificação (Nor et al., 2016; Wu et al., 2018; Han et al., 2020; Abbas et al., 2021), o que demonstra o potencial do método empregado, com o adsorvente podendo ser aplicado em ciclos de reutilização sem a necessidade da ativação subsequente, ou seja, não sendo preciso reequilibrá-lo com íons metálicos.

Os perfis cromatográficos obtidos a partir da cromatografia de filtração em gel (Figura 12), indicam que o pico do eluído coletado (Figura 12b) apresenta uma redução do número de compostos quando comparado à solução de alimentação (Figura 12a), não sendo verificado, por exemplo, picos ( $\pm 15,6$  min) que apareciam com intensidade no suco bruto do abacaxi, e que outros compostos presentes no extrato foram poucos adsorvidos pelo criogel, sendo verificado picos ( $\pm 9,7$  min) de baixa intensidade nas soluções eluídas.



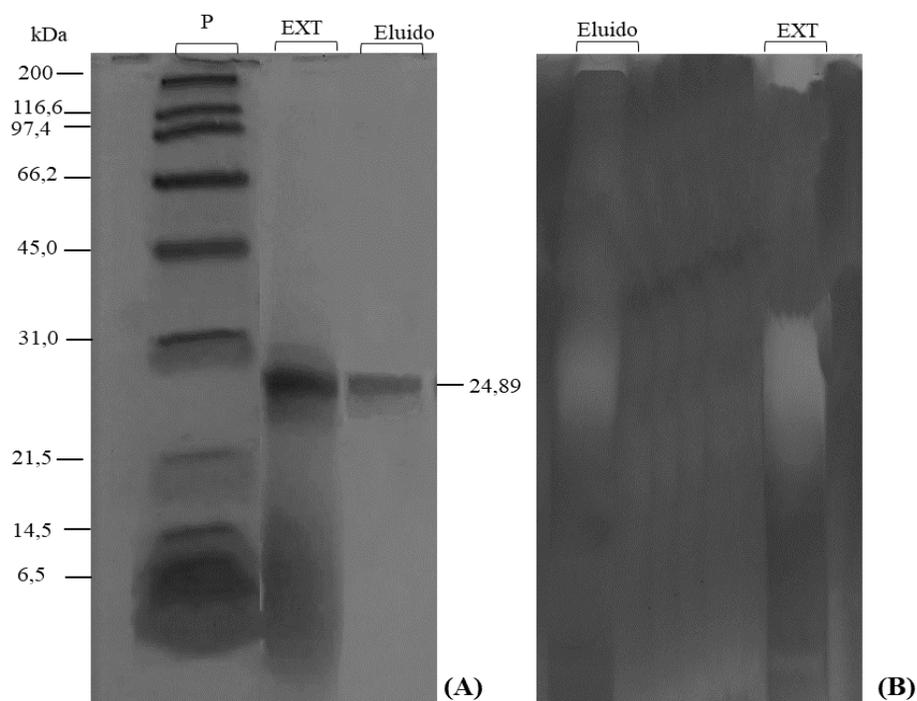
**Figura 12-** Perfil cromatográfico de filtração em gel das soluções de alimentação e eluição da purificação em sistema cromatográfico. (A) Extrato bruto do abacaxi; (B) eluição coletada do cromatógrafo Akta pure.

Observa-se que a fração purificada apresenta um particionamento com picos nos tempos de 13,48 min e 13,77 min, cujo pesos moleculares correspondem a  $\pm 26,4$  kDa e  $\pm 24,5$  kDa, respectivamente, próximo ao peso molecular relatado para a bromelina, indicando que com a purificação foi possível separar a fração proteolítica presente na solução de alimentação. Os valores

de peso molecular obtidos estão dentro do intervalo ( $\pm 23$ -30 kDa) que é relatado na literatura por outros autores ao trabalharem com a protease obtida do abacaxi (Costa et al., 2014; Guo et al., 2018; Campos et al., 2019).

O resultado corrobora com o que foi verificado para os perfis cromatográficos dos produtos obtidos na purificação em batelada, entretanto, nota-se que aparentemente o produto final obtido através do sistema de captura em leito monolítico se apresentou mais puro, com menor número de picos observado no cromatograma, o que demonstra a eficiência do método utilizado neste trabalho para a separação de proteases em etapa única.

A análise de eletroforese em SDS-PAGE (Figura 13a) revelou a eficiência do protocolo utilizado para purificar a bromelina obtida a partir do extrato bruto do abacaxi, sendo identificado apenas uma banda no produto eluido ( $\pm 24,89$  kDa) que corrobora com o peso relatado para bromelina do fruto.



**Figura 13-** Imagens dos géis de eletroforese SDS-PAGE (A) e do Zimograma (B) da purificação em cromatógrafo. P: padrão; EXT: extrato bruto do abacaxi.

Assim como na purificação em batelada não foi observada outra forma da bromelina como verificado na cromatografia de filtração em gel, possivelmente pelas mesmas justificativas já relatadas anteriormente. A verificação da atividade proteolítica usando o gel SDS (zimograma) é

apresentado na Figura 13b, as imagens demonstram que a fração recuperada manteve atividade proteolítica, sendo observada uma zona descolorida no gel SDS-PAGE, indicando que as enzimas presentes na eluição conseguiram digerir a gelatina presente, comprovando que o criogel foi capaz de adsorver as proteases presente no extrato bruto.

#### **4. CONCLUSÃO**

Neste estudo observou-se a separação de proteases obtida a partir da polpa do abacaxi utilizando um novo adsorvente de afinidade por íons metálicos tendo como agente quelante a clorofila extraída de folhas de espinafre. O adsorvente apresentou propriedades promissoras relacionadas a matriz cromatográfica, como porosidade total do leito de 85%, baixa variação de HETP, indicando que não é dependente da velocidade do fluxo, baixa resistência ao fluxo, podendo ser empregadas a altas vazões sem que elevados valores de pressão sejam atingidos. Os protocolos de purificação utilizando eluição por diferença de pH (tampão acetato de sódio, pH 5,0 +1,0 NaCl) apresentaram eluição mais brandas, com perfis cromatográficos com menores números de componentes e maior fator de pureza. Os perfis cromatográficos de filtração em gel demonstraram que o criogel foi capaz de adsorver a bromelina presente no suco do abacaxi, apresentando picos que correspondem ao peso molecular ( $\pm 23$  a 25 kDa) relatado para bromelina. A utilização do extrato previamente precipitado com sulfato de amônio aumenta o teor de pureza, entretanto, o número de etapas utilizada tende a aumentar os custos do processo de purificação. Os resultados indicaram que a utilização do extrato bruto como solução de alimentação e a realização da eluição com tampão acetato é uma alternativa para diminuir os custos do processo, visto que o tampão imidazol remove os íons metálicos imobilizados na matriz, sendo necessário reequilibrá-las com íons metálicos para o uso repetidamente, além de carrear contaminantes para o produto final obtido. Com a utilização do criogel IMAC em sistema cromatográfico conseguiu-se um produto com pureza cerca de 6 vezes maior do que a alimentação em uma etapa única de purificação. O adsorvente IMAC produzido mostrou-se viável e promissor para isolar proteases presente no fruto do abacaxi, reduzindo o número de etapas do processo e os custos envolvidos. Mais estudos são demandados visando otimizar as condições operacionais e consequentemente aumentar o rendimento e grau de pureza da enzima obtida.

#### **5. REFERÊNCIAS**

ABBAS, S.; SHANBHAG, T.; KOTHARE, A. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 28, p. 1001-1009, 2021.

ALNAJAR, L.A.N.; ABID, K.Y.; SADIK, W.M. Isolation and purification of bromelain enzyme from pineapple juice and study cytotoxic activity against cancer cells. **International Journal of Applied Sciences and Technology**, v. 4, p. 10-20, 2022. <http://dx.doi.org/10.47832/2717-8234.11.2>

ANDRADE, I.R.A.; CÂNDIDO, M.J.D.; POMPEU, R.C.F.F.; FEITOSA, T.S.; BONFIM, M.A.D.; SALLES, H.O.; EGITO, A.S. Inactivation of lectins from castor cake by alternative chemical compounds. **Toxicon**, v. 160, p. 47-54, 2019.

BALARAMAN, H.B.; RATHNASAMY, S.K. Selective purification of protease from ginger and sodom apple by ultrasound assisted liquid-liquid microextraction using natural deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104132, 2019.

BANERJEE, S.; ARORA, A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PATTI, A.F. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318-326, 2020.

BIBI, N.S.; SINGH, N.K.; DSOUZA, R.N.; AASIM, M.; FERNÁNDEZ-LAHOURE, M. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 145-149, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, D.A.; COSCUETA, E.R.; VALETTI, N.W.; PASTRANA-CASTRO, L.M.; TEIXEIRA, J.A.; PICÓ, G.A.; PINTADO, M.M. Optimization of bromelain isolation from pineapple byproducts by polysaccharide complex formation. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 792-804, 2019.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA Jr., W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; Da 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.

CHAURASIYA, R.S.; HEBBAR, U.H. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. **Separation and Purification Technology**, v. 111, p.90–97, 2013.

COIMBRA, J.C.; MARTINS, M.A.; MINIM, L.A. A simplified CFD model to describe fluid dynamics, mass transport and breakthrough curves performance in cryogel supports for chromatographic separation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 179, p. 56-69, 2022.

COSTA, H.B.; FERNANDES, P.M.B.; ROMÃO, M.; VENTURA, J.A. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies, **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 163-168, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

DEBNATH, R.; CHATTERJEE, N.; DAS, S.; MISHRA, S.; BOSE, D.; BANERJEE, S.; DAS, S.; SAHA, K.; GOSH, D.; MAITI, D. Bromelain with pineapple peroxidase is more potent to achieve Leukemia Growth Inhibition - A Comparison Just With bromelain. **Toxicologia in vitro**, v. 55, p. 24-32, 2019.

DERRIEN, M.; BADR, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; ANGERS, P. Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). **LTW- Food Science and Technology**, v. 79, p. 170-177, 2017.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; TJORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 259-264, 2009.

FERNANDES, A.S.; NOGARA, G.P.; MENEZES, C.R.; CICHOSKI, A.J.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Identification of chlorophyll molecules with peroxy

radical scavenger capacity in microalgae *Phormidium autumnale* using ultrasound-assisted extraction. **Food Research International**, v. 99, part 3, p. 1036-1041, 2016.

FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F.; GONÇALVES, G.R.F.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 85, p. 1717-1725, 2017.

GAMARRA, F.M.C.; SANTANA, J.C.C.; LLANOS, S.A.V.; PÉREZ, J.A.H.; FLAUSINO, F.R.; QUISPE, A.P.B.; MENDOZA, P.C.; VANALLE, R.M.; CARREÑO-FARFAN, C.; BERSANETI, F.T. High Retention and Purification of Bromelain Enzyme (*Ananas comosus* L. Merrill) from Pineapple Juice Using Plain and Hollow Polymeric Membranes Techniques. **Polymers**, 2022, 14, 264. <https://doi.org/10.3390/polym14020264>

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

GRAND VIEW RESEARCH, Bromelain Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Healthcare, Meat & Seafood, Dietary Supplements), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030, **Market Analysis Report**, p. 120, 2022. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bromelain-market> Acesso em: 30 jul. 2022

GROSS, P.; SEELERT, H.; MEISER, P.; MULLER, R. Characterization of bromelain indicates a molar excess of inhibitor vs. enzyme molecules, a Jacalin-like lectin and Maillard reaction products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 181, p. 113075, 2020.

GUO, J.; MIAO, Z.; WAN, J.; GUO, X. Pineapple peel bromelain extraction using gemini surfactant-based reverse micelle – Role of spacer of gemini surfactant. **Separation and Purification Technology**, v. 190, p. 156-164, 2018.

HAN, J.; WANG, L.; WANG, L.; LI, C.; MAO, Y.; WANG, Y. Fabrication of a core-shell-shell magnetic polymeric microsphere with excellent performance for separation and purification of bromelain. **Food Chemistry**, v. 283, p.1-10, 2019a.

HAN, J.; CAI, Y.; WANG, L.; MAO, Y.; NI, L.; WANG, Y. A high efficiency method combining metal chelate ionic liquid-based aqueous two-phases flotation with two-step precipitation process for bromelain purification. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.

HAN, L.; WANG, L.; WANG, Y.; CAI, Y.; MAO, Y.; NIE, L.; XIE, X.; Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 253-262, 2019b.

HASHIM, M.M.; MINGSHENG, D.; IQBAL, M.F.; XIAOHONG, C. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. **Phytochemistry**, v. 72, p. 458-464, 2011.

INANAN, T. Cryogel disks for lactase immobilization and lactose-free milk production. **LTW**, v.154, p.112608, 2022.

JAMIR K.; SESHAGIRIRAO K. Purification, biochemical characterization and antioxidant property of ZCPG, a cysteine protease from *Zingiber montanum* rhizome. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 719-729, 2018.

JIN, J.; MA, H.; ZHOU, C.; LUO, M.; LIU, W.; QU, W.; YAGOUB AEL, G. Effect of degree of hydrolysis on the bioavailability of corn gluten meal hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, V. 95, p. 2501–2509, 2015.

KANG, YU-RA; LEE, Y.-K.; KIM, Y.J.; CHANG, Y.H. Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum Arabic and maltodextrin. **Food Chemistry**, v. 272, p. 337-346, 2019.

KARTAL, F.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted cryogel beads for cholesterol removal from milk samples. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 190, 2020.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-695, 1970.

LIU, K.; SUN, S.; PIAO, M.; YANG, J.Y. Purification and Characterization of a Protease Produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from Gut of *Octopus vulgaris*, **Prev Nutr Food sci**, v. 4, p. 273-279, 2013. [10.3746/pnf.2013.18.4.273](https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.4.273)

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

MATAGNE, A.; BOLLE, L.; MAHYAOUI, R.E.; BAEYENS-VOLANT, D.; AZARKAN, M. A simplified CFD model to describe fluid dynamics, mass transport and breakthrough curves performance in cryogel supports for chromatographic separation. **Phytochemistry**, v.138, 29-51, 2017.

MÓL, P.C.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; ELLER, M.R.; MINIM, V.P.R.; MINIM, L.A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.

MOHAN, R.; SIVAKUMAR, V.; RANGASAMY, T.; MURALIDHARAN C. Optimisation of Bromelain Enzyme Extraction from Pineapple (*Ananas Comosus*) and Application in Process Industry. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 12, p. 188-195, 2016.

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

NASCIMENTO, R.G. Desenvolvimento e Caracterização de adsorventes monolíticos macroporosos para purificação de bromelina. 134f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). UESB: Itapetinga, 2021.

NEVES, I.C.O.; RODRIGUES, A.A.; VALENTIM, T.T.; MEIRA, A.C.F.O.; SILVA, S.H.; VERÍSSIMO, L.A.A.; RESENDE, J.V. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1161, p. 122435, 2020.

NOR, M.Z.M.; RAMCHANDRAN, L.; DUKE, M.; VASILJEVIC, T. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a twostage ceramic ultrafiltration process, **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p.142-150, 2016.

NOVAES, L.C.L.; JOZALA, A.F.; LOPES, A.M.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; MAZZOLA, P.G.; JUNIOR, A.P. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. **Biotechnology Progress**, v. 32, p. 5-13, 2016.

NWAGU, T.N.; UGWUODO, C.J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 406-414, 2019.

QIU, X.; XIANG, X.; LIU, T.; HUANG, H.; HU, Y. Fabrication of an organic–inorganic nanocomposite carrier for enzyme immobilization based on metal–organic coordination. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 47-54, 2020.

RAMLI, A.N.M.; AZNAN, T.N.T.; ILLIAS, R.M. Bromelain: From production to commercialization. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed. 5, v. 97, 2017.

RAMLI, A.N.M.; MANAS, N.H.A.; HAMID, A.A.A.; HAMID, H.A.; ILLIAS, R.M. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas Comosus*. **Food Chemistry**, v. 266, p. 183-191, 2018.

ROJAS, L.F.; CORTÉS, C.F.; ZAPATA, P.; JIMÉNEZ, C. Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale. **Waste Management**, v. 78, p. 58-68, 2018.

RODRIGUEZ, E.L.; PODDAR, S.; IFTEKHAR, S.; SUH, K.; WOOLFORK, A.G.; OVBUDE, S.; PAKAREK, A.; WALTERS, M.; LOTT, S.; HAGE, D.S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, 2020.

SILVA, J.F. Da; SILVA, D.L. Da; NASCIMENTO, R.G.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, p. 1-9, 2019.

SINGH, J.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. An optimized solvent extraction and characterization of unidentified flavonoid glucuronide derivatives from spinach by UHPLC-HR QTOF-MS. **Talanta**, v. 188, p. 763-771, 2018.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, Bromelain Market (Source: Stem and Fruit; and Application: Food & Beverages, Healthcare & Pharmaceuticals, Cosmetics, and Other Industries) – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2020-2030, Bromelain Market, p. 152, 2019. <https://www.transparencymarketresearch.com/bromelain-market.html>  
Acesso em: 30 jul.2022

UEBERBACHER, R.; RODLER, A.; HAHN, R.A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins: Thermodynamic analysis of conformational changes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.184-190, 2010.

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.

VARILA, C.; MARCONE, M.; PAIVA, L.; BAPTISTA, J. Bromelain, a Group of Pineapple Proteolytic Complex Enzymes (*Ananas comosus*) and Their Possible Therapeutic and Clinical Effects. A Summary. **Foods**, v. 10, p. 2249, 2021.

WAN, J.; GUO, J.; MIAO, Z.; GUO, X. Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple peel – Effect of surfactant structure. **Food Chemistry**, v. 197A, p. 450-456, 2016.

WU, W-C.; NG, H.S.; SUN, I-M.; LAN, J.C-W. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 158-162, 2017.

YANG, X.; DEBELI, D.K.; SHAN, G.; PAN, P. Selective adsorption and high recovery of La<sup>3+</sup> using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122335, 2020.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamidebased supermacroporous monolith C1H cryogel beds under freezing temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006

YU, L.; ZHANG, H.; YANG, L.; TIAN, K. Optimization of purification conditions for papain in a polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system using quaternary ammonium ionic liquids as adjuvants by BBD-RSM. **Protein Expression and Purification**, v. 156, p. 8-16, 2019.

---

**Depósito pedido de patente**

***PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO DE UTILIDADE, CERTIFICADO DE  
ADIÇÃO DE INVENÇÃO E ENTRADA NA FASE NACIONAL DO PCT***

---



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021009055-3 A2



(22) Data do Depósito: 10/05/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2022

(54) **Título:** ADSORVENTE MACROPOROSO COM IONS METÁLICOS IMOBILIZADOS, FUNCIONALIZADO COM EXTRATO DE CLOROFILA VEGETAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO

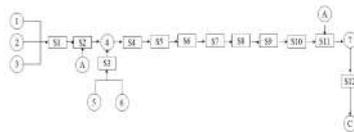
(51) **Int. Cl.:** B01J 20/26; B01J 20/28; B01J 20/285; B01J 20/32; C08F 2/44; (...).

(52) **CPC:** B01J 20/26; B01J 20/261; B01J 20/262; B01J 20/265; B01J 20/28042; (...).

(71) **Depositante(es):** AUTARQUIA UNIVERSIDADE DO SUDOESTE.

(72) **Inventor(es):** MARJORIE CASTRO PINTO PORFÍRIO; RAFAEL DA COSTA ILHÉU FONTAN.

(57) **Resumo:** ADSORVENTE MACROPOROSO COM IONS METÁLICOS IMOBILIZADOS, FUNCIONALIZADO COM EXTRATO DE CLOROFILA VEGETAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO. Modificação da superfície de um adsorvente monolítico macroporoso polimérico a partir da imobilização da clorofila extraída de folhas vegetais para aplicação em processos de separação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. O adsorvente é obtido a partir de uma base constituída de acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, alil glicidil éter e persulfato de amônio previamente produzida por criogelificação, e funcionalizada, empregando-se a solução do extrato metanólico (EC) de folhas vegetais (clorofila), e posteriormente soluções contendo o sal do metal de interesse. A obtenção do adsorvente monolítico macroporoso polimérico funcionalizado com clorofila se dá em três fases: a primeira corresponde à síntese do criogel, a fase de obtenção do pigmento da clorofila e a fase da funcionalização da matriz, a qual, resumidamente se dá a partir da formação de bases de Schiff sequenciais.



ADSORVENTE MACROPOROSO COM IONS METÁLICOS  
IMOBILIZADOS, FUNCIONALIZADO COM EXTRATO DE CLOROFILA  
VEGETAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO

[001] A presente invenção se situa no campo das operações, mais especificamente das separações físico-químicas, exatamente adsorventes macroporosos com íons metálicos imobilizados, funcionalizados com extrato de clorofila vegetal, seu processo de obtenção e usos.

[002] Técnicas adsorptivas são utilizadas em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. Diversos princípios podem ser usados para a separação de compostos por técnicas adsorptivas, dentre eles a cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC). Tais técnicas se baseiam na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução.

[003] O desenvolvimento de novas estratégias de separação de biomoléculas e purificação de compostos é uma necessidade crescente de diversas indústrias. A demanda, em especial das indústrias de alimentos e a farmacêutica por biocompostos ativos é contínua, o que gera a necessidade de novas técnicas e materiais capazes de manter ao máximo a bioatividade desses compostos (GUIOCHON; BEAVER, 2011). Os processos de purificação, geralmente, constituem uma porcentagem importante do custo total de produção, especialmente quando se deseja alto grau de pureza. Devido a maioria das biomoléculas serem purificadas por técnicas cromatográficas, a necessidade de purificação dos compostos em larga escala de maneira eficaz e de baixo custo resultou na evolução de técnicas que proporcionam protocolos rápidos, eficiente e econômicos (AMRITKAR; KAMAT; LALI, 2004). Nessa vertente, vem ocorrendo o desenvolvimento das colunas monolíticas poliméricas supermacroporosas, que permitem a separação de grandes biomoléculas e até mesmo de células inteiras em materiais não clarificados (PFAUNMILLER et al.,

2013). Os monólitos poliméricos são considerados o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas. Caracterizam-se por uma estrutura em corpo único e inseridos em um suporte cromatográfico, usualmente conhecidos como materiais cromatográficos de quarta geração (MACHADO et al., 2015).

[004] Dentre os monólitos utilizados como colunas cromatográficas, os criogeis poliméricos vêm apresentando destaque. Estes possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, e essa característica traz consigo uma redução nos custos operacionais, pois elimina etapas de pré-preparo das amostras como pré-concentração, sem afetar a eficiência da purificação (ANDAÇ et al., 2016). Em contrapartida, a área superficial dessas colunas é menor do que as tradicionais colunas cromatográficas, possuindo uma menor capacidade de ligação, o que acaba diminuindo a eficiência da purificação. Para contornar esse problema, surge a necessidade de modificar quimicamente ou fisicamente tais colunas, visando aumentar sua capacidade de purificação (KUMAR, 2016; SILVA, et al., 2018).

[005] Alternativas viáveis é transformar os criogeis poliméricos em adsorventes de afinidade específica, através da funcionalização dos criogéis com íons metálicos, para a utilização destas matrizes na chamada cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC). Essa técnica baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos complexados em um agente quelante imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. A seletividade na IMAC depende do agente quelante, em geral o ácido iminodiacético, e dos íons metálicos complexados, sendo os mais comuns o  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  (KARAKUS et al., 2016). Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, ou seja, atuam como base de Lewis. O íon metálico,

por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante (BLOCK et al., 2009).

[006] Como o pigmento da clorofila estruturalmente é formado porfirinas compostas por quatro anéis pirrólicos substituído por um átomo de magnésio ( $Mg^{+2}$ ) de ligação central, e apesar da instabilidade desses pigmentos a ácidos, luz e calor, os mesmos podem ser quimicamente modificados como, por exemplo, substituindo o átomo de magnésio por íons metálicos como  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ou  $Zn^{+2}$ , formando um composto metal-clorofila, tornando-os mais estáveis (KANG et al., 2018). Devido a estas características, a clorofila pode ser utilizada como agente quelante para a funcionalização dos criogeis, em substituição aos quelantes tradicionalmente utilizados como ácido iminodiacético (IDA) e o ácido nitrilotriacético (NTA), possibilitando uma adsorvente economicamente viável, além de uma melhor eficiência na separação e purificação de biomoléculas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.

[007] A utilização de colunas monolíticas poliméricas aplicadas na purificação de biomoléculas vem se mostrando muito promissora. Nesse sentido, pesquisas para aumentar o conhecimento e contribuir na otimização e eficiência dessa técnica vêm sendo realizadas:

[008] O documento WO2003041830, intitulado “Macroporous gel, its preparation and its use”, relata a produção de adsorventes poliméricos monolíticos macroporosos obtidos por criogeleificação, sua modificação e aplicação. O mesmo descreve uma série de reagentes que podem ser utilizados para a produção dos monólitos, incluindo os usados na presente invenção, a acrilamida, N,N'-metileno bisacrilamida e o alil glicidil éter, sendo abordados três aspectos da funcionalização da matriz polimérica para o seu uso: i) copolimerização direta do agente funcional (síntese direta já com o ligante de interesse), ii) funcionalização posterior em uma ou mais etapas e iii) utilizar um agente externo à polimerização do monólito (que os inventores se referem como ‘filler’) que já está funcionalizado ou que nele

ocorrerá a funcionalização (similar à i ou ii), para tanto destacam que o monólito macroporoso pode ser funcionalizado com radicais iônicos, açúcares, substratos de enzimas, radicais hidrofóbicos e metais entre outros, com a possibilidade de uso de agentes químicos que se polimerizam quando a funcionalização posterior (item ii) ocorre, como é o caso do etilenodiamina e do glutaraldeído. É importante destacar que, apesar dos inventores apresentarem um processo de funcionalização, para purificação por metal quelato immobilizado (IMAC), difere do relatado na presente invenção. A anterioridade utilizou ácido trinitrobenzóico, borato de sódio e divinil sulfona (DVS) para funcionalizar o monólito, soluções essas que não foram usadas na presente invenção. Além disso, o agente quelante utilizado para imobilizar os íons de cobre foi o ácido iminodiacético (IDA), diferindo totalmente da funcionalização desta invenção. Ressalta-se ainda, que apesar de utilizarem etilenodiamina (EDA), o modo de inclusão do etilenodiamina (EDA) foi diferente da utilizada na presente invenção, na anterioridade, é feita a inclusão direta na matriz de poliacrilamida, mantendo-se a solução de EDA em contato com a matriz em temperatura elevada (90°C) por longo tempo (etapa em que o EDA se liga aos radicais hidroxila da poliacrilamida). Na presente invenção, o EDA é ligado à matriz polimérica nos radicais epóxi existentes devido ao uso de alil glicidil éter e o processo de ligação do EDA ocorre à temperatura ambiente.

[009] A anterioridade WO2006121396, intitulada “Process for adsorption-based separation of bioparticles from an aqueous suspension”, descreve um adsorvente macroporoso em criogel monolítico a ser utilizado na separação de biopartículas de suspensões aquosas, nos processos de purificação de biopartículas (células, vírus, organelas e bactérias), na captura e eluição das mesmas. Destacam que o monólito macroporoso pode ser funcionalizado com diversos grupos ligantes como grupos de troca iônica, proteínas, ligantes de afinidade de metal immobilizados, entre outros. O protocolo adotado para preparação do monólito de criogel de afinidade de metal immobilizado, difere do descrito no presente patente, pois é utilizado o ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, além das

concentrações das soluções de sulfato de cobre e zinco serem inferiores ao descritos no presente pedido. Apesar, da anterioridade descrever o uso de EDA e glutaraldeído, os protocolos adotados tais como, concentrações, tipos de soluções, tempo de contato são diferentes dos descritos, e ainda, cabe ressaltar que neste caso o agente ligante final de funcionalização é uma proteína para uso por afinidade e não afinidade de afinidade por metais como o empregado na presente invenção.

[010] O documento CN107141403B, intitulado “A kind of  $\text{Cu}^{+2}$  Chelate the preparation method of polyhydroxypropyl methacrylate super-macroporous crystal gel medium”, se refere a preparação de um gel super-macroporoso de metacrilato de poli- hidroxipopril funcionalizado com íons de cobre, a ser utilizado na separação de biopolímeros. Portanto, o adsorvente é a base de monômero éster hidroxipropílico (HPMA) e metacrilato de glicidila (GMA), diferindo do monólito macroporosos dessa invenção. A anterioridade descreve alguns agentes que podem ser utilizados para imobilizar os íons metálicos, como polietilenoimina (PEI), etilenodiamina (EDA) ou ácido iminodiacético (IDA). Apesar da presente invenção também relatar o uso do EDA, o objetivo foi a formação de braços espaçadores para evitar o impedimento espacial, já que o agente quelante nesse protocolo é a clorofila. Ressalta-se ainda, que apesar de utilizarem sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), os protocolos adotados tais como, concentração, tempo e temperatura de contato são diferentes do descrito no presente pedido.

[011] O documento CN101003016A intitulado “Zinc contained chelating a nity super-macro-porosity crystal gel medium used column-chromatography” que se refere ao processo de preparação de adsorventes macroporosos, produzidos a partir da criogeleificação, e funcionalizados com zinco para serem utilizados como coluna cromatográfica nos processos de separação por cromatografia de afinidade por íons metálicos. A invenção descreve vários protocolos de obtenção do adsorvente a partir da polimerização de monômeros que contem grupos amina ou amida como: acrilamida, N,N'-metileno bisacrilamida, e metacrilato de dimetilaminoetil, N',N'- dieno-propiono etilenodiamina, e posterior métodos de

funcionalização como soluções de agentes quelantes como ácido iminodiacético (IDA), etilenodiamina (EDT), metil etilenodiamina tricarbóxico (TED), e sais de zinco como cloreto de zinco, sulfato de zinco, nitrato de zinco. Apesar da anterioridade descrever o uso de etilenodiamina os protocolos adotados tais como o monólito polimérico base, concentrações, tempo de contato, tipos de soluções são diferentes do descrito no presente pedido. Além disso, na presente invenção o EDT é utilizado como função de braços espaçadores e não como principal agente quelante. Apesar da invenção descrever várias soluções como possíveis agentes de imobilização de íons metálicos, em nenhum protocolo relata o uso da clorofila, portanto, trata-se de um material totalmente distinto do proposto no presente pedido.

[012] A anterioridade US 20110117596A1 intitulada “Composite sorbent material, its preparation and its use” descreve um material adsorvente composto i) de um suporte para alocação do gel e ii) preparação de um gel polimérico alocado dentro do referido suporte. Também são relatados processos para a preparação de materiais adsorventes por criogeificação, bem como o uso do material adsorvente para remoção de poluentes de gases ou líquidos, para o enriquecimento ou separação de biomoléculas. Dentre os diversos protocolos descritos, o que relata sobre a produção de um adsorvente de afinidade por íons metálicos, utiliza um método de funcionalização totalmente diferente do descrito na presente invenção, pois utiliza soluções de carbonato de sódio e ácido iminodiacético para imobilização dos íons de cobre, soluções essas que não fazem parte do processo de ativação do monólito do presente pedido. Apesar da anterioridade relatar o uso da solução tampão imidazol em solução HEPES similar ao utilizado na presente invenção, o objetivo do pedido está voltado para a imobilização da clorofila como agente quelante para posteriormente fixar os íons metálicos na matriz cromatográfica. Portanto, o invento proposto abrange diferentes características daquelas já mencionados na referida anterioridade.

[013] O documento WO2004087285A1 intitulada “Chromatographic separation of substancies contained in a liquid sample” descreve processos para a preparação de monólitos a serem utilizados para um método de separação cromatográfica de substâncias contidas em uma amostra líquida. Na patente apresentada são listados uma série de reagentes que podem ser usados para a produção dos monólitos, incluindo a acrilamida, N, N'-metileno bisacrilamida e o alil glicidil éter, apesar das proporções diferentes, ainda assim é similar ao esqueleto polimérico produzido no presente pedido. Entretanto, o esqueleto polimérico não é o objeto deste invento, destaca-se ainda que as produções dos monólitos poliméricos já são reportadas previamente na literatura. Apesar de um dos protocolos presente na anterioridade relatar a funcionalização do adsorvente para afinidade com íons metálicos, o método se difere do descrito na presente invenção, visto que a referida patente utiliza ácido iminodiacético, e carbonato de sódio. A imobilização dos íons de cobre é realizada em concentrações e tempo de contato diferente do protocolo descrito nesta invenção. Portanto, não compromete o requisito de atividade inventiva do presente pedido.

[014] Também estão presentes no atual estado da técnica, as anterioridades WO2006121395, intitulada “Macroporous hydrogels, their preparation and use thereof”, a preparação de criogéis macroporosos de acrilamida que transportam grupos amino quaternários e terciários, a serem empregados em cromatografia de RNA e gDNA; a WO2003031014, intitulada “Separation medium, its preparation and its use” relata um processo de obtenção de criogel macroporoso, a ser empregado na separação de misturas; e a US9587009B2 intitulada “Media for affinity chromatographic” refere-se aos suportes sólidos para cromatografia de afinidade, juntamente com métodos, sistemas e kits que utilizam os mesmos.

[015] Ainda estão presentes no atual estado da técnica alguns documentos científicos que discorrem sobre matrizes monolíticas, sua obtenção e uso para purificação de espécimes de interesse. Os artigos “Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation Immobilized metal affinity chromatographic

purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line” (Kumar et al., 2006), “Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds” (Wang et al., 2008), “Immobilized metal affinity chromatography of histidine-tagged lentiviral vectors using monolithic adsorbents” (Cheeks et al., 2009), “Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions” (Carvalho et al., 2014), descrevem monólitos poliméricos macroporosos (Criogel) para purificação por metal quelato imobilizado (IMAC), constituídos da poli(acrilamida com alil glicidil éter como na presente invenção, no entanto em proporções diferentes, quanto ao protocolo de funcionalização todos os artigos mencionados utilizam o ácido imonodiacético (IDA) como agente quelante, e não descrevem o emprego de EDA e glutaraldeído previamente à inclusão do ligante funcional, além disso nenhum deles relata a imobilização da clorofila para afinidade por metais. Destaca-se que os ligantes da funcionalização diferem do descrito na presente invenção, o que torna o produto distante panteabilidade do pedido.

[016] Os estudos “Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars” (Gonçalves et al., 2016), “Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography” (Gonçalves et al., 2017) e “Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture” (Silva et al., 2019); as dissertações “Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a imobilizada para a purificação de lectinas” (Santos, 2016); “Desenvolvimento de adsorventes supermacroporosos para a purificação de lectinas por afinidade com açúcares” (Gonçalves, 2016) e “Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosos para a purificação de lectinas por afinidade” (Silva, 2018), descrevem monólitos macroporosos (criogeis) constituídos da poli(acrilamida com alil glicidil éter como na presente invenção, no entanto em proporções diferentes, quanto ao modo de

funcionalização, elas descrevem o emprego de EDA e glutaraldeído previamente à inclusão do ligante funcional, no entanto, o uso de tais reagentes se dá sob diferentes condições de concentração, pH, temperatura e tempo, o que influencia totalmente nas características do produto obtido. Destaca-se ainda que nos artigos e dissertações mencionadas os monólitos foram funcionalizados com ligantes para o uso em técnicas de afinidade, a saber: açúcares aminados e uma lectina, a concanavalina A, cujos princípios de atuação diferem enormemente daqueles da afinidade por íons metálicos da presente invenção, o que associado aos ajustes de parâmetros, corrobora com a patenteabilidade da matéria do presente pedido.

[017] Fontan et al. (2018), em “Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns”, descreve um criogel constituído de poliacrilamida e alil glicidil éter, cuja funcionalização se deu por ativação com diperiodato cuprato de potássio, um princípio diferente do empregado na presente invenção. O artigo “Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel” (Nascimento et al., 2019) e a dissertação “Purificação de lectinas de sementes de jaca utilizando trocadores iônicos monolíticos supermacroporosos” (Nascimento, 2017) relatam sobre criogéis de poliacrilamida (sem uso de alil glicidil éter) funcionalizados por ativação com diperiodato cuprato de potássio, em que houve a inclusão de quatro diferentes tipos de agentes iônicos, dois aniônicos e dois catiônicos, produto bastante distante do pleiteado no presente pedido.

[018] Diante do exposto, nota-se o caráter inovativo da presente invenção tendo em vista que, apesar do grande número de anterioridades recuperadas, nenhuma delas envolve a produção de adsorventes monolíticos macroporosos por criogeificação e posterior funcionalização para o uso na captura, separação e/ou purificação de compostos por afinidade por metais quelatados a partir da imobilização de clorofila, como o presente pedido, assim, é nítida sua contribuição à arte. A presente invenção apresenta uma nova abordagem na metodologia de

mudança de superfície de coluna cromatográfica, visando a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, a qual apresenta vantagens consideráveis frente ao estado da técnica. Sua principal vantagem é apresentar ao mercado, um inédito modelo de adsorvente macroposo com menor custo, inovador e adequados à purificação de biocompostos macromoleculares, em especial as proteínas, além de se conseguir obtê-las com elevado rendimento e grau de pureza.

[019] Assim, o adsorvente proposto pode ser empregado em processos de separação baseado em interações de coordenação entre um grupo de íons metálicos imobilizados e doadores de elétrons localizados na superfície dos biocompostos, podendo ser utilizado para a purificação de proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, hormônios e enzimas.

[020] A invenção trata da modificação da superfície de um adsorvente monolítico macroporoso polimérico a partir da imobilização da clorofila extraída de folhas vegetais para aplicação em processos de separação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). O adsorvente é obtido a partir de uma base constituída de acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, alil glicidil éter e persulfato de amônio previamente produzida por criogelificação, e funcionalizada, empregando-se a solução do extrato metanólico de folhas vegetais (clorofila), e posteriormente soluções contendo o sal do metal de interesse.

[021] A obtenção do adsorvente monolítico macroporoso polimérico funcionalizado com clorofila se dá em três fases: a primeira corresponde à síntese do criogel (I), ver Figura 1, a qual, resumidamente, se dá a partir da preparação de uma matriz base a partir da criogelificação de uma mistura de acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida e alil glicidil éter em meio aquoso, com o processo de polimerização catalisado pela adição de persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina; a segunda, que é a fase de obtenção do pigmento da clorofila (II), ver Figura 2, o qual, é extraído a partir de folhas de vegetais secas, homogeneizadas com solução de álcool metílico e água, sendo posteriormente

concentrados para a eliminação do álcool; a terceira que é a fase da funcionalização da matriz (III), ver Figura 3, a qual, resumidamente se dá a partir da formação de bases de Schiff sequenciais, inicialmente, entre os radicais epóxi existentes na matriz base devido ao uso de alil glicidil éter e radicais amino de etilenodiamina em solução, posteriormente, entre radicais amino da etilenodiamina e radicais carbonila de glutaraldeído em solução, depois entre os radicais carbonila do glutaraldeído e os radicais amino da etilenodiamina em solução e, finalmente, entre os radicais amino da etilenodiamina e os radicais carbonila presente no pigmento da clorofila em solução. Como as ligações na molécula de clorofila são não-covalentes, e, portanto, se rompem com facilidade, possivelmente durante o processo de extração houve a remoção da cadeia fitol, expondo assim o radical carbonila, e possibilitando a imobilização do pigmento no criogel.

[022] O uso de etilenodiamina e glutaraldeído visa à formação de braços espaçadores para a funcionalização com clorofila, para evitar o impedimento espacial ao se purificar/separar macromoléculas. Os radicais epóxi residuais que não tenham reagido são bloqueados pela reação com a etanolamina, para se evitar interações indesejáveis nos processos de separação. Por fim, os íons metálicos são imobilizados na ligação central dos quatro anéis pirrólicos da clorofila.

[023] Assim, o processo de obtenção do adsorvente monolítico macroporoso polimérico funcionalizado com clorofila se inicia, conforme apresentado na Figura 1, com a pesagem (S1) de acrilamida (1), N,N'-metilenobisacrilamida (2) e de alil glicidil éter (3), na proporção de 3,67:1:1,17, respectivamente, para a obtenção de uma solução com 7% de solutos. Para exemplificar, para 100mL de solução pesa-se 4,4g de acrilamida; 1,2g de N,N'-metilenobisacrilamida; e, 1,4g de alil glicidil éter. Em seguida, esses componentes são solubilizados (S2) com água destilada (A), 80% do volume final desejado, à temperatura ambiente, homogeneizados por 15 minutos sob agitação a 150 rotações por minuto, completando-se com água destilada (A) o volume final desejado em um balão volumétrico; em seguida, à solução (4) em banho de gelo (S3) são adicionados: 0,14% em relação ao volume

da solução (4), ou 2% em relação à massa de solutos da solução (4), de uma solução 0,5 g/mL de persulfato de amônio (5) e 0,091%, em relação ao volume da solução (4) ou 1,3% em relação à massa de solutos da solução (4), de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (6), sendo, novamente homogeneizada por 30 segundos, em banho de gelo (S4) e, então, vertida em moldes (S5), sendo esses fechados e colocados em banho termostático (S6), à -12°C, por 24h. Após esse período, a vedação dos moldes é aberta (S7) e os mesmos são deixados (S8) à 4°C, pelo período de 4h, e depois são levados para secagem (S9) a 60°C até peso constante, obtendo-se um material monolítico sólido de aspecto branco e poroso. Após a secagem (S9), o material é removido dos moldes e as extremidades são cortadas com uma lâmina fina para padronização do formato cilíndrico dos monólitos e retirada de defeitos (S10). Então os monólitos são lavados (S11) com 600 mL de água destilada (A) para cada grama de material sintetizado e desidratado. O material (7) é novamente levado para secagem (S12) a 60°C, sendo o criogel monolítico (C) obtido, sendo, assim, finalizada a fase de síntese do criogel (I).

[024] O processo de obtenção do extrato do pigmento da clorofila (II), conforme apresentado na Figura 2, inicia-se com a retirada (E1) das folhas dos talos dos vegetais, em seguida as folhas (F) são lavadas (E2) com água (AT), e imersas (E3) em uma solução clorada (8) a 100 ppm, por 15 min. Após esse período são lavadas (E4) com água (AT), e colocadas (E5) em peneiras para escorrer e eliminar o excesso de água. Em seguida, são colocadas em estufa com circulação de ar para secagem (E6) a 45 °C por 48 horas. Depois desse período, o material é triturado (E7) até obter um pó (P). E então são homogeneizados (E8) com uma solução de álcool metílico (9) a 70% na proporção 1:3 (pó das folhas (P) vegetais: álcool metílico (9) 70%, v/v). Em seguida, o material é colocado em banho ultrassônico (E9) por 30 minutos, e então é coletado o sobrenadante (10), que é separado (E10) do material sólido por filtração. Depois, é acrescentado a mesma proporção inicial da solução de álcool metílico (9) 70% ao material em pó (11) retido na filtração, e colocado (E9) novamente em banho ultrassônico pelo mesmo período de tempo, e

então coletado o sobrenadante (11), esse processo é repetido três vezes. Os sobrenadantes coletados (10, 11, 12) e filtrados são centrifugados (E11) a 400 rpm por 10 min, em seguida foram concentrados (E12) em rotaevaporador rotativo a 40°C até a eliminação do solvente, obtendo cerca de 30% de extrato do volume inicial. Assim, o extrato obtido (EC) é armazenado (E13) em frascos âmbar, à temperatura de congelamento (-18°C).

[025] Para a funcionalização da matriz (III), conforme apresentado na Figura 3, nas etapas de contato, para cada 0,1 grama de criogel monolítico (C) (suporte polimérico), desidratado e obtido na fase I, são utilizados 8mL de solução (descritas individualmente para cada etapa), com a qual são colocados em contato em tubos fechados, mantendo-se agitação a 25 rotações por minuto (rpm), com exceção da etapa de contato com uma solução borohidreto de sódio (19), a qual ocorre sem agitação em tubo aberto. É importante ressaltar que, entre uma etapa e outra, a solução anterior é drenada, mantendo-se no recipiente apenas o criogel hidratado (úmido).

[026] Para tanto, o criogel monolítico (C) é colocado (F1) em contato com álcool metílico (14), à temperatura ambiente (25°C), sob agitação constante, por 2h, sendo, em seguida, colocado em contato (F2) com água destilada (A) à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação. Após esse período, é então imerso (F3) em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação. Em seguida, o material é colocado (F4) em contato com uma solução de etilenodiamina (16) 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente (25°C), por 14h, sob agitação; após esse período, o criogel (C) é mantido em contato (F5) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação e, em seguida, mantido em contato (F6) com tampão fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação. Depois desse período, o material é posto em contato (F7) com uma solução de glutaraldeído (17), com concentração de 5% em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à 12°C, por 5h, sob agitação;

após esse período, o material foi mantido em contato (F8) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e, em seguida, é mantido (F9) novamente em contato com uma solução (16) de etilenodiamina 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente (25°C), por 14h, sob agitação; após esse período, o criogel é mantido em contato (F10) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação e, em seguida, mantido em contato (F11) com tampão fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação. Depois desse período o material é mantido (F12) em contato com o extrato da clorofila (EC), obtido na fase (II), diluído na proporção 1:1 (extrato (EC): tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L pH 7), por 18 horas à 20 °C, sob agitação e em ausência de luz. Após esse período, o material é mantido em contato (F13) com uma solução de tampão de fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e, em seguida, mantido em contato (F14) com uma solução de etanolamina (18), 0,1 mol/L no tampão de fosfato de fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente, por 1h, sob agitação; Após esse período é mantido (F15) em contato com uma solução borohidreto de sódio (19), 0,1 mol/L em tampão de fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente, por 1h sem agitação e em frasco aberto (sem tampa). Depois disso, o material é mantido (F16) em contato com uma solução de tampão de fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e em seguida, em contato (F17) com água destilada (A) à temperatura ambiente (25°C), por uma hora, sob agitação; depois desse período, o material é mantido em contato (F18) com uma solução de sulfato de cobre (20) ( $\text{Cu}^{+2}$ ) 0,1 mol/L em água destilada (A), por 2 horas, à temperatura ambiente (25°C), sob agitação; após esse período, é feito contato (F19) do material com água destilada (A), à temperatura ambiente, por 1h, sob agitação; e em seguida, é mantido em contato (F20) com uma solução tampão de imidazol (23) (15 mMol/L em 20 mMol/L de HEPES (21) e 0,2 mol/L de NaCl (22)), pH 7, por 2 horas à temperatura ambiente (25°C), sob

agitação. Decorrido esse período, o material é colocado em estufa para secagem (F21) a 60°C, até que esteja totalmente seco (cerca de 72h), sendo assim finalizada a fase de funcionalização da matriz (III) e o adsorvente monolítico macroporoso polimérico funcionalizado com clorofila obtido (CF), estando pronto para ser empregado em processos de separação de biomoléculas, baseada em afinidade por íons metálicos.

[027] A invenção pode ser mais bem compreendida com o auxílio das figuras.

[028] A figura 1 apresenta um fluxograma de produção de um suporte monolítico macroporoso de poliacrilamida com alil glicidil éter por criogeificação (criogel).

[029] A figura 2 mostra o fluxograma de obtenção do extrato de clorofila usado no processo de funcionalização.

[030] A figura 3 demonstra um fluxograma do processo de funcionalização do adsorvente, com a ligação de clorofila ao suporte (base de cálculo considerando monolitos de 0,25g para uso de 20mL de soluções).

[031] Em síntese, o inédito procedimento da modificação de adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos é economicamente viável e propicia a produção de material adsorvente de menor custo, comparado aos materiais comerciais existentes, barateando os insumos para as indústrias e mantém ao máximo a bioatividade dos mesmos. Também, se baseia em fonte renovável e favorece os princípios da química verde.

[032] Esta invenção não se limita às representações aqui comentadas ou ilustradas, devendo ser compreendida em seu amplo escopo. Muitas modificações e outras representações da invenção virão à mente daquele versado na técnica à qual essa invenção pertence, tendo o benefício do ensinamento apresentado nas descrições anteriores e desenhos anexos. Além disso, é para ser entendido que a invenção não está limitada à forma específica revelada, e que modificações e outras formas são entendidas como inclusas dentro do escopo das reivindicações anexas.

Embora termos específicos sejam empregados aqui, eles são usados somente de forma genérica e descritiva e não como propósito de limitação.

## REIVINDICAÇÕES

1. ADSORVENTE MONOLÍTICO MACROPOROSO POLIMÉRICO **caracterizado por** ser dotado de íons metálicos imobilizados e funcionalizado com extrato de clorofila vegetal.
2. PROCESSO DE OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** se dar em três fases, sendo a primeira correspondente à síntese do criogel (I), Figura 1, a partir da preparação de uma matriz base a partir da criogeleificação de uma mistura de acrilamida (1), N,N'-metilenobisacrilamida (2) e alil glicidil éter (3) em meio aquoso, com o processo de polimerização catalisado pela adição de persulfato de amônio (5) e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (6), que se inicia com a pesagem (S1) de acrilamida (1), N,N'-metilenobisacrilamida (2) e de alil glicidil éter (3), na proporção de 3,67:1:1,17, respectivamente, para a obtenção de uma solução com 7% de solutos; a seguir, esses componentes são solubilizados (S2) com água destilada (A), a 80% do volume final, à temperatura ambiente, homogeneizados por 15 minutos sob agitação a 150 rotações por minuto, completando-se com água destilada (A) o volume final; em seguida, à solução em banho de gelo (S3) são adicionados 0,14% em relação ao volume da solução (4), ou 2% em relação à massa de solutos da solução (4), de uma solução 0,5 g/mL de persulfato de amônio (5) e 0,091%, em relação ao volume da solução (4) ou 1,3% em relação à massa de solutos da solução (4), de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (6), sendo, novamente homogeneizada por 30 segundos, em banho de gelo (S4) e, então, vertida (S5) nos moldes, sendo esses fechados e colocados (S6) em banho termostático, à -12°C, por 24h; após esse período, a vedação dos moldes é aberta (S7) e os mesmos são deixados (S8) à 4°C, pelo período de 4h, e depois são levados para secagem (S9), em estufa à 60°C até peso constante; após a secagem (S9), o material é removido dos moldes e as extremidades são cortadas com uma lâmina fina (S10); então os monólitos são lavados (S11) com água destilada (A); a seguir o material (7) é novamente levado para secagem (S12) a 60°C até peso constante; a segunda fase, a de obtenção do

pigmento da clorofila (II), Figura 2, que é extraído a partir de folhas de vegetais secas (P), homogeneizadas com solução de álcool metílico (9) e água (A), sendo posteriormente concentrados (E12) para a eliminação do álcool (9), inicia-se com a retirada das folhas (E1) dos talos dos vegetais e em seguida as folhas (F) são lavadas (E2) com água (AT) e imersas (E3) em uma solução clorada (8) a 100 ppm, por 15 min; após esse período são lavadas (E4) com água (AT) e colocadas em peneiras para escorrer e eliminar o excesso de água (E5); em seguida, são colocadas em estufa com circulação de ar para secagem (E6) a 45 °C por 48 horas; depois desse período, o material é triturado (E7) até obter um pó (P) e então são homogeneizados (E8) com uma solução de álcool metílico (9) a 70% na proporção 1:3 (pó das folhas vegetais (F): álcool metílico (9) 70%, v/v); em seguida, o material é colocado no banho ultrassônico (E9) por 30 minutos e então coleta-se o sobrenadante (10), separando-o (E10) do material sólido por filtração; depois, acrescenta-se a mesma proporção inicial da solução de álcool metílico (9) 70% ao material (11) em pó recolhido e coloca-se novamente no banho ultrassônico (E9) pelo mesmo período de tempo, e então coleta-se o sobrenadante (12), sendo esse processo repetido por três vezes; os sobrenadantes coletados (10, 12, 13) e filtrados são centrifugados (E11) a 400 rpm por 10 min, e a seguir são concentrados (E12) em rotaevaporador rotativo a 40°C até a eliminação do solvente e o extrato obtido (EC) é armazenado (E13) em frascos âmbar, à temperatura de -18°C; e a terceira, a fase da funcionalização da matriz (III), Figura 3, que se dá a partir da formação de bases de Schiff sequenciais, na qual para cada 0,1 grama de criogel monolítico (C) (suporte polimérico), desidratado e obtido na fase I, são utilizados 8mL de solução - descritas individualmente para cada etapa, com a qual são colocados em contato em tubos fechados, mantendo-se agitação a 25 rotações por minuto (rpm), com exceção da etapa de contato com uma solução borohidreto de sódio (19), a qual ocorre sem agitação em tubo aberto, sendo que, entre uma etapa e outra, a solução anterior é drenada, mantendo-se no recipiente apenas o criogel hidratado (úmido) e para tanto, o criogel monolítico (C) é colocado em contato (F1) com

álcool metílico (14), à temperatura ambiente (25°C), sob agitação constante, por 2h, sendo, em seguida, colocado (F2) em contato com água destilada (A) à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; após esse período, é então imerso (F3) em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; em seguida, o material é colocado (F5) em contato com uma solução de etilenodiamina (16) 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente (25°C), por 14h, sob agitação; após esse período, o criogel é mantido em contato (F6) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação e, em seguida, mantido em contato com tampão fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; depois desse período, o material é posto em contato (F7) com uma solução de glutaraldeído (17), com concentração de 5% em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à 12°C, por 5h, sob agitação; após esse período, o material é mantido em contato (F8) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e, em seguida, é mantido novamente em contato (F9) com solução uma solução de etilenodiamina (16) 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente (25°C), por 14h, sob agitação; após esse período, o criogel é mantido em contato (F10) com água destilada (A), à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação e, em seguida, mantido em contato (F11) com tampão fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; depois desse período o material é mantido em contato (F12) com o extrato da clorofila (EC), obtido na fase (II), diluído na proporção 1:1 (extrato (EC): tampão fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L pH 7), por 18 horas à 20 °C, sob agitação e em ausência de luz; após esse período, o material é mantido em contato (F13) com uma solução de tampão de fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e, em seguida, mantido em contato (F14) com uma solução de etanolamina (18), 0,1 mol/L no tampão de fosfato de fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente, por 1h, sob agitação; após esse período é

mantido em contato (F15) com uma solução borohidreto de sódio (19), 0,1 mol/L em tampão de fosfato de sódio (15) 0,05 mol/L, pH 7 à temperatura ambiente, por 1h sem agitação e em frasco aberto (sem tampa); depois disso, o material é mantido em contato (F16) com uma solução de tampão de fosfato de sódio (15), 0,05 mol/L, pH 7, à temperatura ambiente (25°C), por 1h, sob agitação; e em seguida, em contato (F17) com água destilada (A) à temperatura ambiente (25°C), por uma hora, sob agitação; depois desse período, o material é mantido em contato (F18) com uma solução (20) de sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) 0,1 mol/L em água destilada (A), por 2 horas, à temperatura ambiente (25°C), sob agitação; após esse período, é feito contato (F19) do material com água destilada (A), à temperatura ambiente, por 1h, sob agitação; e em seguida, é mantido em contato (F20) com uma solução tampão de imidazol (23) (15 mMol/L em 20 mMol/L de HEPES (21) e 0,2 mol/L de NaCl (22)), pH 7, por 2 horas à temperatura ambiente (25°C), sob agitação; decorrido esse período, o material é colocado em estufa para secagem (F21) a 60°C, até que esteja totalmente seco.

3. USO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** se dar em processos de separação de biomoléculas, baseados em afinidade por íons metálicos.

FIGURAS

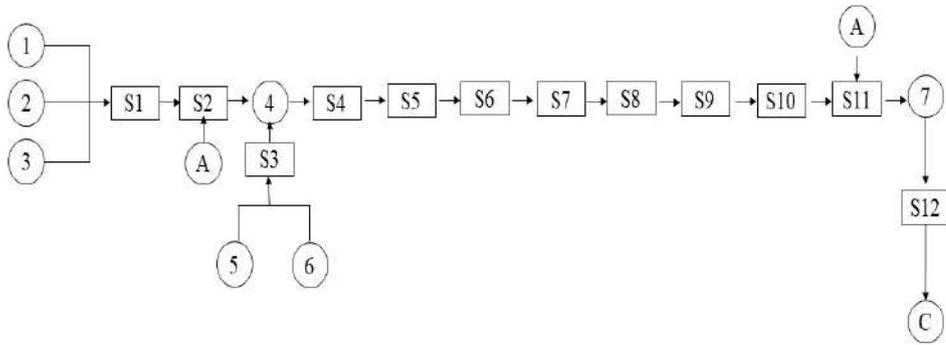


Figura 1

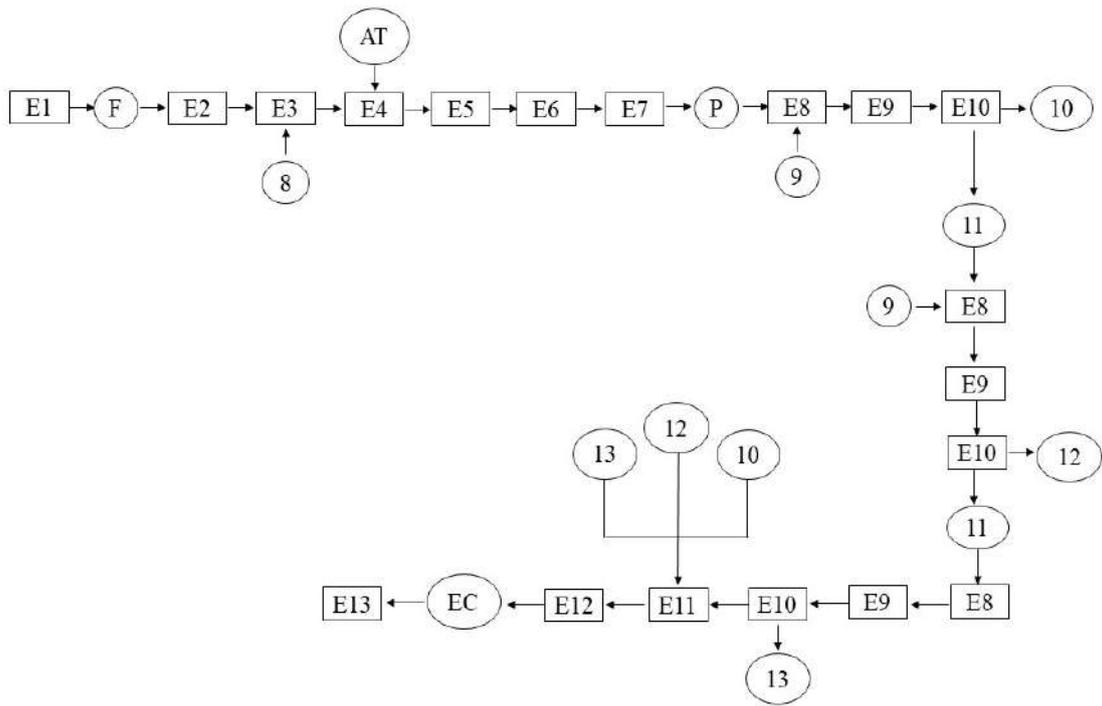


Figura 2

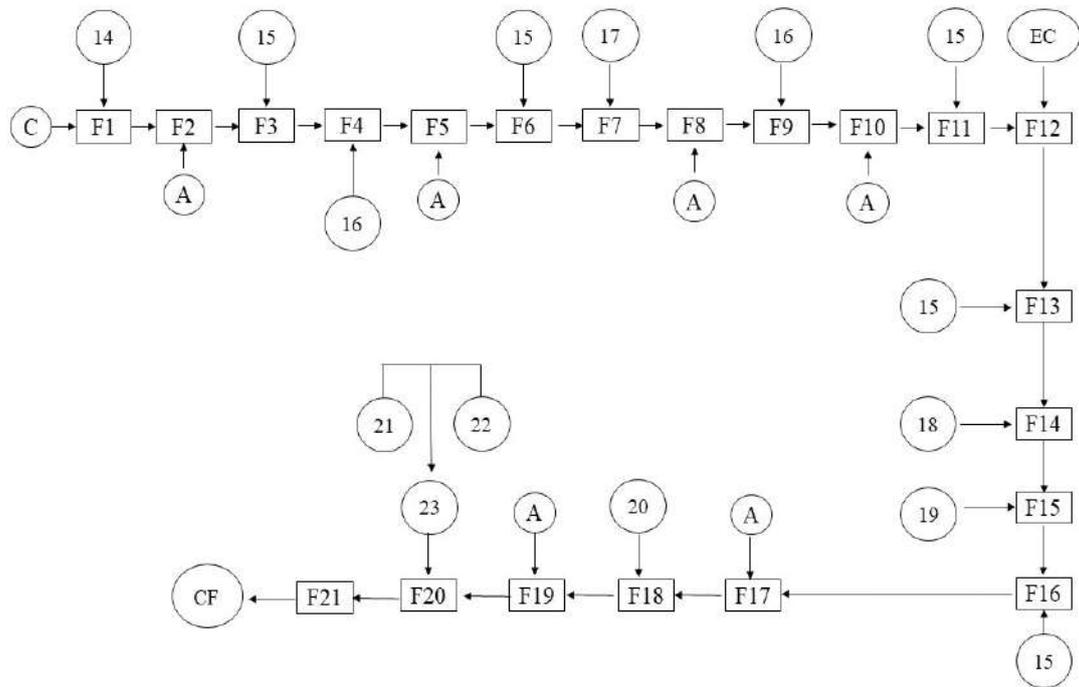


Figura 3

## RESUMO

ADSORVENTE MACROPOROSO COM IONS METÁLICOS  
IMOBILIZADOS, FUNCIONALIZADO COM EXTRATO DE CLOROFILA  
VEGETAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO

Modificação da superfície de um adsorvente monolítico macroporoso polimérico a partir da imobilização da clorofila extraída de folhas vegetais para aplicação em processos de separação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. O adsorvente é obtido a partir de uma base constituída de acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, alil glicidil éter e persulfato de amônio previamente produzida por criogelificação, e funcionalizada, empregando-se a solução do extrato metanólico (EC) de folhas vegetais (clorofila), e posteriormente soluções contendo o sal do metal de interesse. A obtenção do adsorvente monolítico macroporoso polimérico funcionalizado com clorofila se dá em três fases: a primeira corresponde à síntese do criogel, a fase de obtenção do pigmento da clorofila e a fase da funcionalização da matriz, a qual, resumidamente se dá a partir da formação de bases de Schiff sequenciais.