



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

## Curvas de Ruptura em Diferentes Graus de Expansão para Adsorção de Peroxidase em Resina de Troca Iônica

**Gabrielle Victoria Gautério<sup>1</sup>, Laís Reginatto<sup>1</sup>, Jaqueline Garda Buffon<sup>1</sup> e Susana Juliano Kalil<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos  
Caixa Postal 474 – CEP 96203-900 Rio Grande – RS - E-mail: gabriellevgauterio@gmail.com

### RESUMO

*As peroxidases pertencem à família das oxidorredutases, e têm por função catalisar a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora. Inúmeras técnicas são utilizadas na purificação de peroxidases incluindo a cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, a qual apresenta vantagens como maior produtividade de processo e interação adsorvente-molécula alvo. Este trabalho teve como objetivo determinar as curvas de ruptura em três diferentes graus de expansão, visando à posterior purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. Neste estudo, foi verificado que o uso do grau de expansão 2,5 proporcionou maior  $Q_{10\%}$  (0,1851 U/mL de resina) frente às demais condições estudadas, se mostrando o mais adequado para posterior purificação de peroxidase por esta técnica.*

**Palavras-chave:** capacidade dinâmica de adsorção, leito expandido, Streamline™ SP.

### INTRODUÇÃO

As peroxidases são enzimas presentes em todos os organismos capazes de catalizar reações de óxido-redução, graças a vários peróxidos que atuam como receptores de elétrons (FAWAL et al., 2013). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser extraídas de vegetais, tecidos animais e alguns fungos (BALASUBRAMANIAN; BOOPATHY, 2013). Considerando sua natureza oxidativa, especificidade e atuação em condições moderadas, inúmeras aplicações são atribuídas às peroxidases em áreas como biomédica, clínica, biotecnológica e industrial (SONTÜRK; RAMAZAN; ÖZDEMIR, 2014). O uso final das peroxidases irá definir se estas necessitam ser submetidas a um processo de purificação.

Dentre as técnicas utilizadas na purificação de peroxidases destaca-se cromatografia de troca iônica, a qual se baseia na competição dos íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária (PESSOA & KILIKIAN, 2005). A utilização desta técnica em modo expandido tem se mostrado como alternativa na obtenção de peroxidases purificadas (GAUTÉRIO et al., 2015), apresentando vantagens como obtenção do produto purificado em grandes volumes, maior interação adsorvente-molécula alvo e possibilidade de aumento de escala (TOLEDO et al., 2007). O comportamento do processo de adsorção em função da expansão do leito pode ser verificado através das curvas de ruptura, as quais indicam a quantidade do produto de interesse que pode se ligar ao trocador iônico (NAYAK; PONRATHNAM; RAJAN, 2001). De forma prática, a curva de ruptura serve como indicativo do volume que deve ser alimentado à coluna cromatográfica sem que haja perda do composto durante a alimentação.



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

O presente trabalho teve por objetivo determinar as curvas de ruptura em três diferentes graus de expansão (2,0, 2,5 e 3,0), visando à posterior purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido.

### MATERIAL E MÉTODOS

A extração de peroxidase foi realizada a partir de farelo de arroz integral (granulometria inferior a 0,425 mm) e solução tampão fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10, respectivamente. O extrato permaneceu sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C, durante 60 min. Após, o extrato foi centrifugado (3300xg) a 4°C por 10 min, e filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato clarificado de peroxidase (FELTRIN, 2013).

Para a determinação das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão, foram utilizadas a coluna Streamline™ 25 (2,5 cm de diâmetro x 100 cm de altura) e a resina Streamline™ SP, ambas da GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suécia). A coluna foi preenchida com 10 cm de resina e equilibrada com solução tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5, de modo a obter os graus de expansão 2,0 (20 cm), 2,5 (25 cm) e 3,0 (30 cm). Em seguida, o extrato clarificado de peroxidase ajustado em pH 4,5 e diluído 1:1 (extrato: água destilada) foi alimentado na velocidade estabelecida pelo comportamento hidrodinâmico para obtenção de cada grau de expansão, conforme Gautério et al. (2015). Em todos os experimentos, a atividade de peroxidase foi determinada nas frações de alimentação e de saída da coluna (adaptado de KALIL; MAUGERI-FILHO; RODRIGUES, 2005).

Após o procedimento experimental, foi construído o gráfico da razão entre a atividade enzimática em determinado ponto (A) e a atividade enzimática inicial da amostra de entrada ( $A_0$ ) *versus* o volume coletado. A área sob a curva para  $A/A_0 = 0,10$  foi integrada para obter o volume a ser alimentado de extrato enzimático para que não haja perda deste na saída da coluna. A capacidade dinâmica de adsorção ( $Q_{10\%}$ ) para  $A/A_0 = 0,10$  foi calculada conforme a Equação 1:

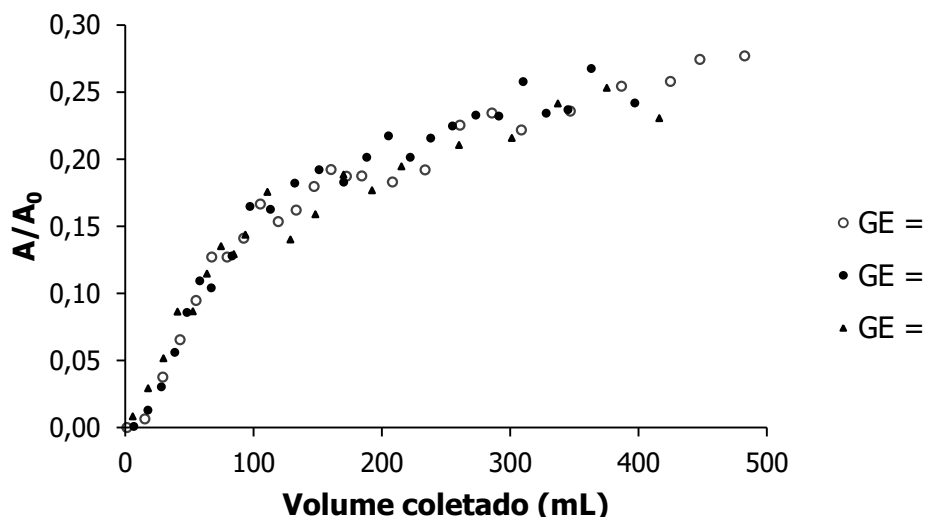
$$Q_{10\%} = \frac{A_0 \cdot (V_i - V_m) - \int_{V_m}^{V_i} A dV_{10\%}}{V_r} \quad (1)$$

onde  $A_0$  (U/mg) é a atividade específica de entrada, A (U/mg) é a atividade específica de saída,  $V_i$  (mL) é o volume de extrato correspondente a  $A/A_0 = 0,10$ ,  $V_m$  (mL) é o volume morto do sistema e  $V_r$  (mL) é o volume de resina adicionado à coluna.

A atividade enzimática de peroxidase foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. A 1 mL de extrato enzimático clarificado, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. A mistura reacional permaneceu em banho termostático a 25°C por 20 min. Em seguida, a transmitância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade da atividade de peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1  $\mu$ mol de guaiacol ( $\epsilon = 26600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) em 1 min.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em colunas cromatográficas de leito expandido, o grau de expansão do leito influencia no formato da curva de ruptura e, conseqüentemente, na capacidade de adsorção e no volume que deve ser alimentado à coluna. A Figura 1 apresenta as curvas de ruptura obtidas nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0, já considerando o volume morto do sistema, enquanto que os valores de  $Q_{10\%}$  para as três condições estudadas estão dispostos na Tabela 1.



**Figura 1** - Curvas de ruptura para adsorção de peroxidase em resina de troca iônica nos graus de expansão de 2,0, 2,5 e 3,0. Altura inicial do leito igual a 10 cm.

Conforme mostra a Tabela 1, o uso do grau de expansão 2,5 proporcionou maior capacidade dinâmica de adsorção da peroxidase em coluna de leito expandido. Este resultado indica que, para o caso específico da peroxidase, o maior tempo de interação entre enzima-adsorvente pode desfavorecer a posterior purificação da enzima devido à desnaturação da mesma durante sua passagem pela coluna. Apesar do grau de expansão 3,0 ter proporcionado  $Q_{10\%}$  próxima à obtida em grau de expansão 2,5, a operação da purificação nestas condições se torna difícil, visto que o leito apresenta certa instabilidade quando aplicadas vazões mais elevadas.

**Tabela 1** – Valores de  $Q_{10\%}$  obtidos a partir das curvas de ruptura nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0.

	<b>GE = 2,0</b>	<b>GE = 2,5</b>	<b>GE = 3,0</b>
Atividade inicial de peroxidase (U/mL)	0,136	0,145	0,160
$Q_{10\%}$ (U/mL de resina)	0,1521	0,1851	0,1764

GE = Grau de expansão.  $Q_{10\%}$  = Capacidade de adsorção para  $A/A_0 = 0,10$ .

Os valores de  $Q_{10\%}$  para os graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0 representam 5,7%, 6,9% e 6,6%, respectivamente, da capacidade máxima de adsorção ( $q^*$ , 2,68 U/mL de resina) obtido em ensaios prévios de adsorção em resina de troca iônica, nas mesmas condições de tampão e pH (dados não mostrados). Du et al. (2013) obtiveram curvas de ruptura em três graus de expansão (2,0, 2,2 e 2,4) através da alimentação da coluna com solução de 1 mg/mL de



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

lactoferrina. Os autores verificaram que a capacidade dinâmica de adsorção para  $A/A_0 = 0,10$  foi cerca de 13,9% a 56,2% do correspondente valor de  $q^*$ , na mesma concentração de proteína. No estudo de Du et al. (2014), curvas de ruptura foram construídas em três diferentes graus de expansão (1,8, 2,0 e 2,2), a partir da alimentação da coluna com imunoglobulina G na concentração de 0,025 mg/mL. Os autores relataram que o valor de  $Q_{10\%}$  foi cerca de 14,3% a 18,7% do correspondente  $q^*$  para a mesma concentração de imunoglobulina G. Morais et al. (2013) obtiveram curvas de ruptura nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0 através da alimentação da coluna com 1,5 mg/L de extrato bruto de C-ficocianina. O estudo revelou que, para os graus de expansão 2,0 e 2,5, os valores de  $Q_{10\%}$  corresponderam a 29,3% e 20%, respectivamente, dos valores de  $Q_{80\%}$  (saturação de 80%). Com base nestas discussões, os valores de  $Q_{10\%}$  obtidos neste trabalho apresentaram comportamento semelhante ao observado na literatura científica citada acima.

### CONCLUSÕES

Através deste estudo, foi possível concluir que o uso do grau de expansão 2,5 proporcionou maior  $Q_{10\%}$  (0,1851 U/mL de resina) frente às demais condições estudadas, se mostrando a condição mais adequada para posterior purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. **Agências de Fomento:** Capes e CNPq.

### REFERÊNCIAS

- BALASUBRAMANIAN, M.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos mucifera* (L.): biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 33-42, 2013.
- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- DU, Q.; LIN, D.; ZHANG, Q.; YAO, S. An integrated expanded bed adsorption process for lactoferrina and immunoglobulin G purification from crude sweet whey. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 201-207, 2014.
- DU, Q.; LIN, D.; XIONG, Z.; YAO, S. One-step purification of lactoferrina from crude sweet whey using cation-exchange expanded bed adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2693-2699, 2013.
- FAWAL, N.; LI, Q.; SAVELLI, B.; BRETTE, M.; PASSAIA, G.; FABRE, M.; MATHE, C.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 441-444, 2013.
- FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 153-164, 2015.
- KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an intracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 581-586, 2005.
- MORAES, C.C.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F.; KALIL, S.J. Modeling of ion exchange expanded-bed chromatography for the purification of C-phycoyanin. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 73-78, 2013.
- NAYAK, D.P.; PONRATHNAM, S.; RAJAN, C.R. Macroporous copolymer matrix: IV. Expanded bed adsorption application. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 63-76, 2001.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**, Editora Manole, Barueri, 2005.
- SOMTÜRK, B.; KALIL, R.; ÖZDEMİR, N. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) by affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1815-1828, 2014.
- TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of  $\alpha$ -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.