

## Adsorção de Lisozima em Criogéis de Poliacrilamida-Quitosana Funcionalizados como Matrizes de Troca Iônica

Ester R. Santos<sup>1</sup>; Jonathan B. Santos<sup>2</sup>; Márjorie C. P. Porfirio<sup>2</sup>; Rafael C. I. Fontan<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Química- Bacharel com atribuições tecnológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; Laboratório de Engenharia de Processos.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Engenharia de Processos.

<sup>3</sup> Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Palavras-Chave:** Funcionalização polimérica; Proteínas catiônicas; Purificação

### Introdução

A demanda contínua das indústrias farmacêutica, química e alimentícia por biocompostos ativos segue crescendo. As enzimas destacam-se em vários setores industriais devido à sua seletividade, especificidade e atuação sob condições brandas (Porfirio et al., 2024). No entanto, desafios como baixa estabilidade, dificuldade de recuperação e alto grau de pureza dos produtos durante a aplicação em escala industrial elevam os custos e reduzem a eficiência (Abellanas-Perez et al., 2023). Técnicas de adsorção surgem como alternativas promissoras para imobilização, separação e purificação, e vêm evoluindo com o desenvolvimento de novos tipos de adsorventes e suportes (Pérez-Botella et al., 2022). Investigar tipos de suportes específicos, incluindo suas preparações e propriedades, é essencial para turbinar a eficácia industrial, especialmente em biocatálise (Pour et al., 2025).

Segundo Tao et al. (2023), fatores críticos no processo de adsorção incluem características do suporte (porosidade, grupos funcionais, área superficial, estabilidade) e condições operacionais (pH, temperatura, solvente). Dentre os tipos de suportes, os criogéis tem se destacado, devido a sua estrutura macroporosa, apresentando baixa resistência ao escoamento e permitindo o uso de soluções mais viscosas, diminuindo os custos dos processos de separação de biomoléculas (Kartal e Denizli, 2020).

Além disso, diversos estudos têm mostrado que suportes poliméricos como os criogéis aumentam a estabilidade térmica e operacional das enzimas, facilitando sua reutilização e a obtenção de produtos mais puros (Zdarta et al, 2018; Tadesse et al, 2025).

Outro destaque são as matrizes de troca iônica, que atuam por interações eletrostáticas entre grupos carregados do suporte e biomoléculas. Essa estratégia tem sido amplamente aplicada em cromatografia e purificação de proteínas, e, quando associada a criogéis macroporosos, resulta em elevada capacidade adsorptiva, baixo gradiente de pressão e boa seletividade para enzimas como a lisozima ( Dragan et al, 2022). No caso da quitosana, a possibilidade de introdução de grupos ionizáveis ou de formação de complexos polieletrólitos amplia a afinidade e a reusabilidade desses suportes, configurando uma rota promissora em biocatálise (Altunbaş et al., 2022).

Suportes à base de quitosana apresentam elevada razão área superficial, volume, porosidade aprimorada e maior reatividade, características que favorecem a eficiência na imobilização ou purificação de enzimas ou outras biomoléculas (Ahmad et al.,2021). Na abordagem atual, utilizou-se lisozima comercial como modelo enzimático. A lisozima, reconhecida por sua ação antibacteriana e estabilidade, também é relevante em pesquisa e

aplicações biotecnológicas (Ferraboschi et al., 2021). Quando combinada com quitosana a imobilização melhora sua estabilidade térmica e reusabilidade, resultando em maior atividade residual e eficácia antibacteriana (Wang et al. 2020)

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial adsortivo dos criogéis de quitosana funcionalizados com lisina para adsorção de lisozima comercial em diferentes pH , buscando mostrar a potencialidade desse suporte para processos de separação ou imobilização de enzimas.

## Material e Métodos

### Materiais

Os reagentes utilizados no trabalho possuíam grau analítico PA-ACS. Acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio (APS), N,N,N',N'-tetrametilelenodiamina (TEMED), tampão fosfato de sódio pH 6, tampão carbonato de sódio pH 10, ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), quitosana (95 % de desacetilação) e lisozima comercial. Os demais reagentes utilizados estão descritos ao longo do trabalho.

### Síntese do criogel com quitosana

Para a síntese dos criogéis, 1,0 g de acrilamida (AAm) e 0,3 g de N,N'-metilenobisacrilamida (MBAAm) foram dissolvidos em 20,0 mL de água destilada sob agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi resfriada a 4°C. Paralelamente, preparou-se uma solução de quitosana a 1,0% (p/v) em solução de ácido acético (1%). Após a solubilização completa, 2,5 mL da solução de quitosana foram adicionados à solução resfriada de AAm e MBAAm. A polimerização foi pela adição de 30 mg de persulfato de amônio (APS), seguida de 30 µL de N,N,N',N'- tetrametilelenodiamina (TEMED) como ativador. A solução obtida foi transferida para seringas plásticas de 10 mL, seladas, garantindo a ausência de bolhas de ar. As seringas contendo a solução polimérica foram submetidas a um processo de congelamento a -12°C por 24 horas para a formação dos criogéis. Após esse período, os criogéis foram descongelados a 4 °C por 4 horas e secos em estufa a 60°C.

### Funcionalização dos criogéis de quitosana com fosfato e carbonato

Os criogéis de quitosana foram submetidos inicialmente a um processo de lavagem em etanol por 2 horas, e logo após esse tempo foram lavados com água destilada durante 1 hora. Em seguida, foram preparadas soluções de lisina a 10 mg/mL em dois diferentes tampões: tampão fosfato de sódio (pH 6) e tampão carbonato de sódio (pH 10) ambos 50 mmol. Os criogéis foram colocados em contato com a solução de lisina por 14 horas, em temperatura ambiente. Após este período, os criogéis foram novamente lavados em água destilada em duas etapas consecutivas de 30 minutos cada. Depois desse processo, foram secos na estufa a 60° C.

### Adsorção da lisozima

O processo adsortivo foi realizado utilizando a lisozima comercial. Para isso , 30 mg de cada suporte foram colocados em tubos de 15 mL e foram adicionados 4 mL de uma solução de lisozima 4 mg/mL preparada em tampão fosfato de sódio pH 8,5 (50 mmol), ficando em contato por 12 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi lido a 595 nm pelo método de Bradford (1976), para quantificação da capacidade adsorptiva. Para verificação da eficiência do processo, foi construída uma curva de calibração analítica utilizando albumina do soro bovino (BSA) como proteína padrão, nas concentrações de 0,1 a 1 mg/mL; assim, a capacidade adsorptiva foi calculada segundo a equação (1).

$$q = \frac{(C_o - C) \times V}{M} (l)$$

Na qual  $q$  é a concentração de enzima retida ao suporte (mg/g de suporte);  $C_o$  e  $C$  são as concentrações iniciais e finais de enzima (mg/mL) respectivamente;  $M$  é a massa de suporte seco; e  $V$  é o volume de solução de enzima utilizada (mL).

### Análise de ponto de carga zero (PCZ)

O pH do ponto de carga zero (pH<sub>PCZ</sub>) é definido como o pH em que um suporte possui carga neutra. A metodologia empregada para sua determinação é denominada “Experimento dos 11 Pontos” (MÓL et al., 2019). O procedimento consistiu em condicionar 50 mg de criogel controle ou funcionalizado, em contato com 50 mL de soluções de cloreto de sódio (0,1 mol/L) em diferentes valores de pH (1-11), sendo deixados sob agitação orbital a 25 rpm durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de HCl (0,5 mol·L<sup>-1</sup>) ou NaOH (0,5 mol·L<sup>-1</sup>). Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus o pH inicial. O pH do PCZ corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

### Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os criogéis de quitosana- poliacrilamida funcionalizados.

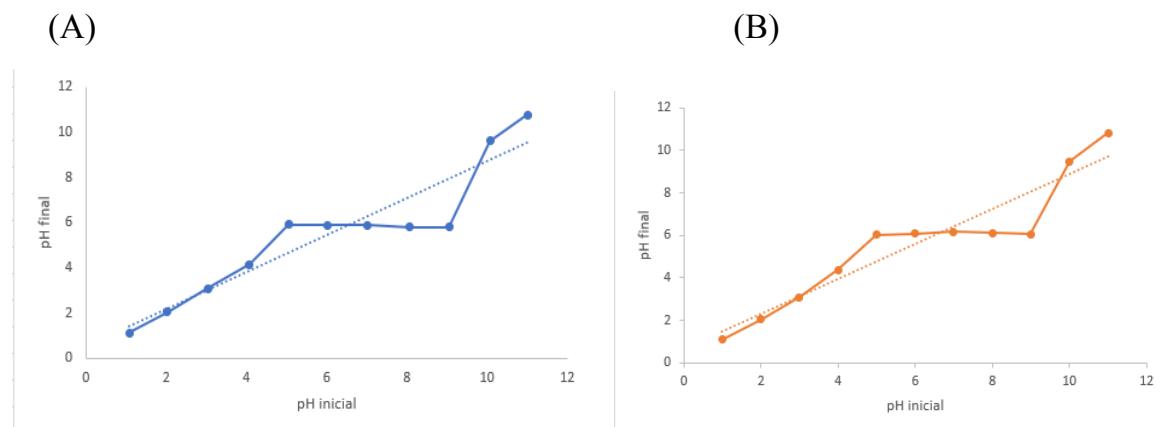


**Figura 1.** Criogéis de quitosana funcionalizados.

Os criogéis sintetizados de quitosana apresentaram coloração branca após os processos de congelamento e secagem, indicando a formação adequada da matriz polimérica sem sinais de degradação (Figura 1). Apresentaram estrutura cilíndrica devido ao molde usado, rígida quando desidratados, uniforme e porosa característica que favorece a difusão de biomoléculas e a interação enzimática. A literatura aponta que os criogéis obtidos a partir da quitosana e acrilamida apresentam poros interconectados, elevada área superficial e boa estabilidade mecânica, aspectos que os tornam suportes promissores para processos de adsorção enzimática (Oliveira et al, 2019). A incorporação da quitosana contribuiu para a estabilidade estrutural e funcionalização da superfície dos criogéis, uma vez que a quitosana apresenta grupos aminas em sua estrutura o que é essencial em processos de adsorção e imobilização, tornando-os promissores para aplicações biotecnológicas e ambientais (Oliveira; Lago, 2019).

A funcionalização dos criogéis foi realizada com lisina, o que caracteriza a matriz como um sistema de troca iônica, capaz de interagir eletrostaticamente com a enzima lisozima, a qual apresenta caráter catiônico em pH fisiológico (Liu et al. 2020).

Na Figura 2 estão os gráficos do ponto de carga zero do criogel de quitosana funcionalizado com lisina no (A) tampão fosfato pH 6 e no (B) tampão carbonato pH 10.



**Figura 2.** Gráfico do ponto de carga zero dos criogéis produzidos (A) criogel funcionalizado pH 6. (B) criogel funcionalizado pH 10.

Para os criogéis funcionalizados em pH 6,0, observa-se que, independentemente do pH inicial das soluções na faixa de 5,0 a 9,0, os valores finais se estabilizaram em uma faixa de 5,80 a 5,91, evidenciando a estabilização do material em torno de pH 5,8–5,9. O comportamento indica que, nessa faixa, a superfície do criogel apresentou carga líquida nula, ou seja, o pH<sub>pcz</sub>.

A análise do ponto de carga zero (pH<sub>pcz</sub>) dos criogéis aponta para uma eficiência na funcionalização com lisina, pela alteração no comportamento de protonação da matriz. Diferentemente da quitosana pura, cujo pH<sub>pcz</sub> é reportado entre 6,2 e 6,5 (Mazur et al., 2021), o criogel estudado é constituído por uma rede quitosana, acrilamida e bis-acrilamida, de modo que a contribuição das diferentes unidades poliméricas também influencia na presença de cargas superficiais. A lisina, por apresentar grupos amino e carboxila ionizáveis, pode alterar o pH<sub>pcz</sub>, tornando a matriz mais positiva ou negativa conforme o pH do meio (Munim et al., 2020). Assim, o deslocamento observado no pH<sub>pcz</sub> está associado não apenas à natureza polimérica do criogel, mas também ao comportamento ácido-base da lisina incorporada, que regula a densidade de cargas disponíveis para interação com biomoléculas.

No contexto das interações eletrostáticas, quando o pH da solução é superior ao pH<sub>pcz</sub> (~5,9), a superfície do criogel passa a apresentar predominância de cargas negativas, o que favorece a adsorção de proteínas com carga líquida positiva, como a lisozima, devido às forças de atração eletrostática. Em contrapartida, em valores de pH abaixo do pH<sub>pcz</sub>, ocorre a protonação dos grupos amino da quitosana, resultando em uma superfície majoritariamente carregada positivamente, o que pode gerar repulsão em relação a proteínas que também apresentam excesso de cargas positivas.

Para o pH<sub>pcz</sub> dos criogéis funcionalizados em pH 10 (Figura 2 B) é possível observar uma alteração dos valores inicialmente ajustadas entre 5,0 e 9,0, para a faixa de 6,0 a 6,1. Esse resultado define o ponto de carga zero (pH<sub>pcz</sub>) do material, demonstrando que, nessa condição, as cargas positivas e negativas da superfície encontram-se em equilíbrio.

Do ponto de vista das interações com biomoléculas, a determinação de um pH<sub>pcz</sub> em torno de 6,0 implica que, em condições levemente ácidas ou neutras (pH > 6,0), a superfície do criogel passa a apresentar caráter aniônico, favorecendo a retenção de proteínas básicas como a lisozima, que possui ponto isoelétrico elevado ( $pI \approx 11$ ) e, portanto, permanece carregada positivamente em pH fisiológico. Além das forças eletrostáticas, estudos recentes

destacam que interações secundárias, como liberação de contra-íons e efeitos hidrofóbicos, também contribuem para estabilizar o processo de adsorção.

Os resultados reforçam que a modificação em pH básico é capaz de conferir ao suporte uma superfície mais negativa, tornando-o mais adequado para a adsorção de proteínas catiônicas, tornando o criogel funcionalizado um candidato competitivo para aplicações em bioprocessos.

A Tabela 1 apresenta os resultados acerca do processo adsortivo.

Suportes	Capacidade adsortiva (mg/g)
CQ.pH 6	19,05± 0,35
CQ.pH 10	24,38±0,44

CQ.pH 6: Criogéis de quitosana funcionalizados com lisina a uma solução de pH 6 /CQ.pH 10: Criogéis de quitosana funcionalizados com lisina a uma solução de pH 10

De acordo com os resultados obtidos, o criogel funcionalizado em pH 10 apresentou uma maior capacidade adsortiva, quando comparado ao criogel funcionalizado em pH 6. Por mais que a funcionalização em pH 6 promova uma maior densidade de cargas negativas na superfície do material, sua estabilidade pode ser prejudicada pela faixa neutra de pH que se encontra o meio. Logo, a funcionalização do material com lisina em pH 10, pode ter fornecido um ambiente com cargas negativas mais favorável entre os grupos aniónicos disponíveis na superfície do criogel e os grupos catiônicos da enzima, o que contribui para maior estabilidade e eficiência do processo adsortivo.

Esse comportamento foi descrito por Qin et al. (2021), que observaram que a adsorção de lisozima em suportes polissacarídicos não dependem apenas do valor do pHpcz, mas também da densidade e acessibilidade dos grupos carregados na superfície.

Assim, a maior capacidade adsortiva observada nos criogéis básicos pode ser atribuída à maior densidade de cargas negativas efetivamente disponíveis na superfície em pH neutro (Alves et al., 2021).

## Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que foi possível produzir os criogéis de quitosana-poliacrilamida e realizar sua funcionalização com lisina, possibilitando sua aplicação em processos de adsorção e purificação de enzimas. A determinação do ponto de carga zero evidenciou que ambos os suportes se encontravam carregados negativamente nas condições experimentais, favorecendo a interação eletrostática com a lisozima. No entanto, a maior capacidade adsortiva observada para os criogéis básicos (pH 10) em relação aos criogéis tendendo a neutralidade (pH 6,0) indica que a funcionalização em pH mais elevado confere uma superfície mais estável e com maior densidade de cargas aniónicas disponíveis, o que potencializa a eficiência do processo adsortivo. Esses estudos ressaltam a relevância da modificação química da quitosana na modulação de suas propriedades de superfície e apontam os criogéis funcionalizados em pH 10 (básico) como suportes promissores para aplicações biotecnológicas e industriais. Estudos futuros deverão avaliar a estabilidade operacional, a reutilização e a performance desses materiais em diferentes condições e com outras biomoléculas de interesse.

## Agradecimentos

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e o Laboratório de Engenharia de Processos pela oportunidade e condições de realização do trabalho ao CNPq, CAPES e a FAPESB pelo apoio financeiro.

## Referências

- ABELLANAS-PEREZ, M. et al. Enzyme immobilization for industrial applications: challenges and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, v. 61, p. 108079, 2023.
- AHMAD, R. et al. Chitosan-based hydrogels: recent developments, challenges and prospects for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 183, p. 1935-1951, 2021.
- ALTUNBAS, A. et al. Cryogels as versatile scaffolds for biotechnological applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 287, p. 119307, 2022.
- ALVES, L. A. et al. Advances in chitosan-based supports for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, v. 110, p. 107-118, 2021.
- DRAGAN, E. S. Design and applications of chitosan-based hydrogels. *Reactive and Functional Polymers*, v. 179, p. 105361, 2022.
- FERRABOSCHI, P. et al. Lysozyme: a benchmark enzyme in biocatalysis. *Molecules*, v. 26, n. 13, p. 3871, 2021.
- KARTAL, F.; DENIZLI, A. Cryogels for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 8, p. 10700-10718, 2020.
- LIU, B-L.; O, C. W.; NG, I-S.; SHOW, P. L.; CHANG, Y-K. Effective purification of lysozyme from chicken egg white by tris(hydroxymethyl)aminomethane affinity nanofiber membrane. *Food Chemistry*, v. 327, p. 1-12, 2020.
- MAZUR, O.; MICHALSKA-SIONKOWSKA, M.; ŁUKOWICZ, K.; OSYCZKA, A. M. The preparation and characterization of chitosan-based hydrogels cross-linked by glyoxal. *Materials*, v. 14, n. 9, p. 2449, 2021.
- MÓL, A. R. et al. Determinação experimental do ponto de carga zero de adsorventes por meio da metodologia dos 11 pontos. *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 3, p. 818-829, 2019.
- MUNIM, S. A.; MUHAMMAD; SADDÍQUE, M. T.; RAZA, Z. Fabrication of cellulose-mediated chitosan adsorbent beads and their surface chemical characterization. *Polymer Bulletin*, v. 77, n. 1, p. 1-15, 2020.
- OLIVEIRA, L. C. A.; LAGO, R. M. Síntese de nanopartículas de magnetita por coprecipitação. *Anais do 74º Congresso Anual da ABM – Internacional*, 2019.
- PÉREZ-BOTELLA, M. et al. Polymer-based supports for enzyme immobilization: advances and perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 222, p. 2465-2477, 2022.

PORFIRIO, M. C. P. et al. Enzyme immobilization: progress and prospects in industrial bioprocesses. *Catalysts*, v. 14, p. 118, 2024.

POUR, M. S. et al. Advances in the design of polymer-based enzyme supports for sustainable biocatalysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 13, n. 2, p. 1234-1247, 2025.

QIN, J. et al. Adsorption of lysozyme on polysaccharide-based supports: influence of charge density and pH<sub>pzc</sub>. *Carbohydrate Polymers*, v. 264, p. 118048, 2021.

TADESSE, B.; LIU, Y. Advances in biopolymer-based supports for enzyme stabilization. *Polymers*, v. 17, p. 1023, 2025.

TAO, Y. et al. Key factors affecting protein adsorption on polymer-based materials. *Journal of Molecular Liquids*, v. 385, p. 122067, 2023.

WANG, Y. et al. Chitosan-lysozyme composites: stability and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 150, p. 1030-1037, 2020.

ZDARTA, J. et al. Enzyme immobilization on chitosan-based supports: stability and reusability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, p. 455-464, 2018.