



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**  
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES MONOLITICOS MACROPOROSOS**  
**COM CONCANAVALINA A IMOBILIZADA PARA A PURIFICAÇÃO DE**  
**LECTINAS**

Autora: Carilan Moreira Souza Santos

Orientador: Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Fevereiro de 2016

**CARILAN MOREIRA SOUZA SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES MONOLITICOS MACROPOROSOS  
COM CONCANAVALINA A IMOBILIZADA PARA A PURIFICAÇÃO DE  
LECTINAS**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

**Orientador:** Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Co-orientadores:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

**ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Fevereiro de 2016**

543

S234d Santos, Carilan Moreira Souza

Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a immobilizada para a purificação de lectinas. / Carilan Moreira Souza Santos. - Itapetinga: UESB, 2016.

78p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos.

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

CDD(21): 543

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Lectinas
2. Cromatografia de afinidade
3. Criogel



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Programa de Pós-Graduação  
**Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** DESENVOLVIMENTO DE ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS COM CONCANAVALINA IMOBILIZADA PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS

**Autor (a):** CARILAN MOREIRA SOUZA SANTOS

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

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

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

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

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

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

**Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2016.**

“O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância. Todo o meu saber consiste em saber que nada sei. E o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa.”

*Sócrates*

Aos meus pais Joice e Carlos e a  
minha irmã Suian pelo incentivo e orações.

**Dedico!**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, poder supremo sobre mim, pelas suas misericórdias infinitas em minha vida, por me amparar em seus braços, iluminar meus caminhos e permitir-me superar todos os obstáculos para o alcance dessa vitória e a minha rainha, minha mãezinha Maria que me amparou em seu colo maternal nos momentos em que as forças me faltavam, intercedendo ao Pai para que Suas graças me alcançassem.

Aos meus pais, Carlos e Joice, e a minha irmã Suian, pelo apoio integral, pelas orações e por manter nossa relação sempre tão especial. Muito do que faço e tudo o que sou, é alicerçado nesse amor.

A todos da família e aos amigos, pelo incentivo e confiança depositada, entendendo minhas ausências e compartilhando as alegrias.

À Associação Nossa Senhora das Dores, por terem honrado o título de amigos, se tornando minha família em Itapetinga; Vocês foram essenciais nessa trajetória, obrigada por transformar minhas dores em sorrisos e me ensinar a prática de amar a Jesus Cristo.

Por motivos que não caberiam aqui descrevê-los, agradeço imensamente ao meu orientador Rafael Fontan por todo suporte, paciência, confiança, pela sabedoria compartilhada, pelo apoio e orientação, deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos.

Às professoras Renata Bonomo e Sibelli Passini, agradeço de todo coração por terem me amparado com tanto zelo nos momentos difíceis, e por todo apoio concedido.

À turma do LEP pelo companheirismo e amizade, tornando essa jornada mais leve e prazerosa.

A todos os funcionários do módulo de laboratório, por me acolherem sempre com muito carinho e um sorriso terno!

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela oportunidade e condições de realização do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

À Fapesb e ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Lizzy Veríssimo pelo suporte nas análises de microscopia eletrônica, pela prestatividade e disponibilidade de participação na banca;

À Prof<sup>a</sup> Cristiane Veloso pelas contribuições ao longo do trabalho, pelas sugestões, colaboração e participação nas bancas de qualificação e defesa da dissertação

Ao CETENE pelas análises de espectroscopia FTIR

Finalmente quero agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para essa conquista. Deixo aqui o meu muito obrigada.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”*

Isaac Newton

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1 Glicoproteínas: Lectinas.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1.1 Concanavalina A .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Métodos de purificação.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1 Método adsortivo.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1.1 Cromatografia líquida de afinidade (CLAF) .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Monólitos Poliméricos orgânicos.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.1 Criogel monolítico supermacroporoso .....</b>	<b>32</b>
<b>1.4.2 Criogel de poliacrilamida .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5 Alteração na superfície dos suportes cromatográficos para imobilização de proteínas.....</b>	<b>36</b>
<b>1.6 Funcionalização dos criogéis .....</b>	<b>38</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Produção da coluna monolítica.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Ativações dos monólitos.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1 Método Epóxi.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2 Método da Base de Schiff.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.3 Método do Glutaraldeído.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.4 Método do Etilenodiamina .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.5 Método da Dihidrazida Adípica .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.6 Incremento dos grupos epóxi.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Avaliação física, química e hidrodinâmica.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.1 Capacidade de Inchamento .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2 Grau de expansão .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.3 Porosidade.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.5 Espectroscopia FTIR .....</b>	<b>46</b>

3.3.6 Permeabilidade ao escoamento .....	46
3.4 Potencial de uso das colunas produzidas.....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
4.1 Caracterização das matrizes de criogel.....	50
4.1.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão .....	52
4.1.2 Porosidade.....	52
4.1.3 Estrutura dos poros por MEV.....	55
4.1.4 Espectroscopia FTIR .....	55
4.1.5 Permeabilidade ao escoamento .....	57
4.1.6 Capacidade adsortiva de reutilização das colunas .....	59
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
AAm	Acrilamida
BSA	Albumina de soro bovina
AGE	Alil glicidil éter
A	Área da seção transversal da coluna ( $m^2$ )
S	Capacidade de inchamento ( $g\ H_2O \cdot g^{-1}$ criogel seco)
$q_{max}$	Capacidade máxima de adsorção ( $mg \cdot mL^{-1}$ criogel)
L	Comprimento da coluna (m)
CLAF	Cromatografia líquida de afinidade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$M_d$	Massa da amostra desidratada (kg)
$M_c$	Massa da amostra comprimida (kg)
$M_w$	Massa da amostra saturada com água (kg)
MM	Massa molecular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino
MBAAm	N,N'- metileno-bis-acrilamida
$\beta_i$	Parâmetro do modelo
$K_w$	Permeabilidade ao escoamento ( $m^2$ )
APS	Persulfato de amônio
$\varphi$	Porosidade do criogel
pH	Potencial hidrogeniônico
$q$	Quantidade de soluto adsorvido ( $mol \cdot L^{-1}$ )
$\Delta P_w$	Queda de pressão através da coluna (Pa)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
kDa	$10^3$ Dalton (Unidade de massa molecular)
$Q_w$	Vazão volumétrica ao escoamento ( $m^2$ )
VC	Volume de coluna

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação das lectinas quanto à estrutura.....	20
<b>Figura 2:</b> Representação estrutural da ConA.....	23
<b>Figura 3:</b> Representação do monômero de Concanavalina .....	24
<b>Figura 4:</b> Etapas da cromatografia de afinidade em suportes contendo lectina imobilizada	29
<b>Figura 5:</b> Efeito da concentração do polímero sobre a formação de poros nas colunas cromatográficas. ....	32
<b>Figura 6:</b> Representação da produção do criogel .....	34
<b>Figura 7:</b> Imagem por microscopia eletrônica de varredura .....	35
<b>Figura 8:</b> Reação de crio-copolimerização dos monômeros AAm, AGE e MBAAm para o preparo do criogel.....	36
<b>Figura 9:</b> Criogel de pAAm-AGE.....	49
<b>Figura 10:</b> Micrografias dos criogéis.....	55
<b>Figura 11:</b> Criogel com ConA imobilizada utilizando-se o método com epicloridrina.....	56
<b>Figura 12:</b> Espectro FTIR dos criogéis não ativados e com ConA imobilizada pelo método com epicloridrina.....	57
<b>Figura 13:</b> Capacidade adsortiva em função dos ciclos de uso da coluna avaliada .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação das lectinas de plantas quanto à ocorrência.....	21
<b>Tabela 2:</b> Denominação de algumas lectinas.....	21
<b>Tabela 3 -</b> Técnicas de separação usadas nas diferentes etapas de purificação de biocompostos.....	26
<b>Tabela 4:</b> Lectinas comumente usadas como ligantes em colunas cromatográficas por afinidade.....	30
<b>Tabela 5:</b> Resultados de ativações das colunas monolíticas supermacroporosas.....	49
<b>Tabela 6:</b> Capacidade de inchamento e grau de expansão das colunas.....	51
<b>Tabela 7:</b> Porosidade total e demais frações constituintes dos monólitos produzidos.....	52

## RESUMO

SANTOS, C. M. S. **Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina A imobilizada para a purificação de lectinas.** Itapetinga – BA: UESB, 2016. 78 p. dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos).\*

Técnicas cromatográficas estão entre as mais importantes nas estratégias de purificação de biocompostos, sendo constante o desenvolvimento de novos adsorventes para tal uso. Nesse sentido, ganha destaque a produção de monólitos, estruturas porosas, interconectadas, em corpo único. Monólitos poliméricos podem ser produzidos a partir da mistura de monômeros e um agente porogênico, polimerizada *in situ* em um molde. A ampla variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície permite que os monólitos se adequem a diversos processos cromatográficos de separação. Na presente pesquisa foi avaliada a modificação de suportes monolíticos macroporosos de poliacrilamida por seis distintos métodos de ativação, baseados na reatividade de radicais epóxi presentes na estrutura dos criogéis e na formação de ligações covalentes, para a imobilização de concanavalina A (ConA) visando ao seu uso na purificação de lectinas por cromatografia. Foi avaliada a capacidade de imobilização de ConA e aspectos físicos e químicos dos monólitos, além do seu potencial de uso para a adsorção de lectinas. Verificou-se que o incremento de radicais epóxi utilizando-se epícloridrina e a adição de braços espaçadores com o uso do glutaraldeído aumentaram a quantidade de ConA imobilizada, sendo que os monólitos funcionalizados mantiveram a estrutura macroporosa predominante e baixa resistência ao escoamento. A capacidade adsortiva na melhor condição estudada foi superior a 100 mg de lectina por grama de monólito desidratado, mantendo-se constante após cinco ciclos de uso, demonstrando a estabilidade do mesmo. Os resultados obtidos sugerem que os monólitos desenvolvidos são promissores na purificação de lectinas por cromatografia de afinidade, sendo necessários mais estudos visando a sua otimização.

**Palavras –chave:** Lectinas, cromatografia de afinidade, criogel.

---

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

## ABSTRACT

SANTOS, Carilan Moreira Souza, M.S. **Development of monolithic macroporous adsorbents functionalized with concanavalin A for lectin purification.** Itapetinga - BA: UESB, 2016. 78 p. (Master's of Engineering and Food Science, Concentration Area in Food Engineering) \*.

Chromatographic techniques are important in biocompounds purification strategies. It has been observed the development of new adsorbents for such use, including the production of monoliths, porous structures, interconnected in a single body. Polymer monoliths are produced from a monomer mixture and a porogenic agent, polymerized *in situ* in a mold. A wide variety of monomer combinations and surface-modifying reagents makes monoliths suited to almost any kind of separation. In the present study it was evaluated the modification of macroporous polyacrylamide monolithic supports by six different activation methods, based on the reactivity of epoxy radical present in their structures and the formation of covalent bonds, for the immobilization of concanavalin A (Con A) in order to their application in lectins purification by affinity techniques. It was evaluated ConA immobilization capacity and physical and chemical aspects of the monoliths, besides its potential use for the lectins adsorption. It was found that the increase of epoxy radicals using epichlorohydrin and the addition of spacer arms using glutaraldehyde increased the amount of immobilized ConA, and the functionalized monolithic maintained predominantly macroporous structure and low flow resistance, desirable characteristics for the macromolecules purification. The adsorptive capacity of the activated monoliths by the most effective method was superior to 100 mg of lectines per g of dried monolith, keeping constant after five consecutive cycles of use, demonstrating the stability of the column. The results suggest that developed monoliths are promising in lectin purification by affinity techniques, requiring more studies to its optimization.

**Key words:** Lectins, affinity chromatography, cryogel.

---

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

# 1. REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 INTRODUÇÃO

A demanda da indústria de alimentos e farmacêutica por biocompostos ativos é crescente, buscando-se o emprego de técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade desses compostos (GUIOCHON; BEAVER, 2011). O desenvolvimento de novas estratégias de biosseparação e purificação de compostos de interesse tem se tornado uma necessidade contínua e os adsorventes e trocadores iônicos surgiram como alternativas para tal. Entre os adsorventes existentes estão os monólitos poliméricos, estruturas porosas altamente interconectadas formadas em corpo único, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (JUNGBAUER; HAHNA, 2008). Essas estruturas são versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e apresentam baixo custo se comparados a matrizes tradicionais na cromatografia (GUIOCHON, 2007).

As lectinas constituem um grupo de glicoproteínas encontradas em muitos organismos, tais como bactérias, plantas e animais (PERÇIN; AKSÖZ, 2012). Uma das lectinas mais estudadas é a concanavalina A, isolada da leguminosa *Canavalia ensiformes*. Essa proteína liga-se a moléculas que contem a  $\alpha$ -D-manopiranosil,  $\alpha$ -D-glicopiranosil (anômeros  $\alpha$  de manose e glicose) e estruturas estericamente relacionadas, além de se complexar com uma série de substâncias que contenham esses açúcares. Imobilizações com Concanavalina A tem sido utilizada para o isolamento, fracionamento, caracterização estrutural e imobilização de glicoproteínas e outros glicoconjugados biologicamente importantes (CARLSSON et al., 1998).

As funções biológicas dessas proteínas ainda não são devidamente conhecidas, contudo, estudos realizados revelam que lectinas de diferentes especificidades, imobilizadas sobre suportes cromatográficos podem ser usadas como matrizes de afinidade para fins variados. Assim, elas têm sido utilizadas para caracterização e análise de glicoconjugados (OLAJOS, 2010; CERRADA et al., 2010) podendo ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolipídeos (GHAZARIAN et al., 2011; NUNES et al., 2012). Várias lectinas têm demonstrado possuir atividade imunomoduladora e antitumoral *in vivo* e *in vitro*; elas têm sido utilizadas como agentes terapêuticos, sendo capazes de se ligar a membrana celular ou seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento tumoral (GONZÁLEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005).

Para a obtenção de lectinas purificadas, alguns métodos vêm sendo avaliados, como a precipitação com etanol, filtração em gel e troca iônica (SANTANA et al., 2008), contudo, a

cromatografia por afinidade é a mais efetiva quando se deseja obter um grau de pureza mais elevado, além de manter a bioatividade da molécula (PERÇIN; AKSÖZ, 2012). Para a purificação de lectinas por cromatografia de afinidade, é muito explorado o uso de interações que se baseiam na capacidade destas se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (GERLACH et al., 2002). A propriedade de ligação das lectinas à carboidratos facilita a purificação através de suportes cromatográficos, por exemplo, a imobilização de lectinas para o isolamento de glicoconjugados (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Géis monolíticos poliméricos apresentam inúmeras aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, incluindo o uso em materiais cromatográficos, matrizes para eletroforese/imuno-difusão, assim como suportes de imobilização de moléculas e células. Criogéis são matrizes de géis formados a partir de soluções de polímeros submetidas a temperaturas inferiores ao ponto de cristalização do solvente, gerando macroporos interconectados que permitem que não ocorra problemas de difusão de solutos, na ordem de micrômetros à nanômetros.

Apesar das vantagens apresentadas pelos referidos suportes cromatográficos poliméricos (criogéis), sua estrutura física possui uma área superficial significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, razão pela qual sua eficiência pode ser diminuída. Por isso, o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área essencial e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações químicas ou físicas, podem ser feitas visando aumentar a eficiência dos processos de separação (YAO et al., 2007; YUN et al., 2007; WANG et al., 2008). As modificações da matriz polimérica são normalmente realizadas por meio da circulação de soluções contendo os reagentes de ativação (grupos ligantes), ou por imersão do suporte na referida solução, tornando conseqüentemente, o monólito em uma estrutura quimicamente ativada (KIM; HAGE, 2005). Essas modificações são realizadas objetivando alcançar maiores índices adsorptivos quando soluções aquosas são difundidas sobre essas superfícies macroporosas para retenção dos compostos de interesse.

Tem-se então adotado alguns métodos de imobilização de ligantes e biomoléculas para serem empregados nesses criogéis. O método de imobilização tem como princípio a interação física das biomoléculas ao longo do suporte com retenção de sua atividade biológica. Essa tecnologia tem por finalidade facilitar a separação entre a biomolécula e os demais constituintes da solução aquosa, além de melhorar a estabilidade do suporte para seu reuso em aplicações contínuas, com efeito positivo no processo econômico (QIU et al., 2010; JÁRZEBSKI et al., 2007).

Entre os métodos de imobilização estudados, estão o Método Epóxi, Método da Base de Schiff, Método do Carbonildiimidazol, Método do Dissuccinimidil Carbamato, Método de

Troca Catiônica, Método do Glutaraldeído (LUO et al., 2002), dentre outros. (MALLIK; JIANG; HAGE, 2004; HAGE; RUHN, 2005).

O criogel ativado pelo método do glutaraldeído tende a ter uma taxa de imobilização maior do que o suporte ativado pelo método epóxi e alguns dos demais métodos, devido à um maior espaçamento entre a biomolécula imobilizada e a superfície do criogel, por meio da formação de braços espaçadores (LUO et al., 2002). A introdução destes braços espaçadores contribui para prevenção dos efeitos de impedimento estérico e limitações difusionais, proporcionando uma melhor posição para ação biológica após imobilização (LUO et al., 2002; KNEZEVIC et al., 2006).

A grande aplicabilidade dos monólitos poliméricos para purificação de biocompostos justifica o interesse da presente pesquisa, uma vez que estes possuem superfícies passíveis de modificações para introdução de funcionalidades, adaptando-se às necessidades de cada processo. Foi percebido que a imobilização de um ligante à superfície do monólito melhorou sua capacidade adsortiva. Contudo, é necessário que o ligante seja compatível com as soluções usadas durante o processo de imobilização, que possuam no mínimo um grupo funcional através do qual ele será acoplado à matriz (-NH<sub>2</sub>, amino; -COOH, carboxílico; -CHO aldeído; -SH, tiol; -OH, hidroxílico) e que este grupo funcional não seja essencial para a sua função biológica, ou seja, sua capacidade de ligação não deve ser afetada pela imobilização (JANSON; RYDÉN, 1989). As proteínas possuem um número grande de grupos reativos e podem ser imobilizadas sem a destruição de sua estrutura ou função. A capacidade de lectinas imobilizadas interagirem especificamente com carboidratos as torna excelentes ferramentas para a purificação de glicoproteínas, solúveis ou derivadas de membranas. Desta forma, o desenvolvimento e caracterização de novos adsorventes de menor custo, com lectinas imobilizadas, para a purificação de biocompostos, constitui uma potencial iniciativa para a expansão do seu processamento e utilização nos diversos segmentos industriais.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Glicoproteínas: Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que reconhecem, de forma reversível, carboidratos livres ou conjugados à superfícies celulares, através de seus sítios de ligação (CORREIA, COELHO e PAIVA, 2008). Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos, desde animais à plantas, vírus, bactérias e fungos (BRANCO et al., 2004). Entre as plantas, têm sido relatadas ocorrências em folhas, frutos, raízes, tubérculos e rizomas (COSTA et al., 2010; YAN et al., 2010), sendo especialmente purificadas a partir de sementes, onde constituem até 10% do conteúdo total de proteínas dos extratos (PAZ et al., 2010; SANTOS et al., 2009).

O termo lectina, originado do latim “legere”, que significa selecionar (LAM; NG, 2011) é empregado para nomear todas as proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico capaz de ligarem-se seletivamente e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (SHARON; LIS, 2002), o que permite às lectinas distinguirem açúcares semelhantes (LAM; NG, 2011).

O primeiro relato sobre lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark observou que extratos de *Ricinus communis* (mamona) aglutinava eritrócitos devido à presença de uma proteína extraída, a ricina (KENNEDY et al., 1995). Em 1891, Hellin descobriu que extratos tóxicos de sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) também produziam aglutinação de células vermelhas. À medida que aumentavam os fatores aglutinantes e começavam a ser descobertos em outras plantas, o termo hemaglutinina, que fora introduzido anteriormente, foi se tornando constante e comum para todas as substâncias que exibiam esta propriedade biológica particular (ELFSTRAND, 1898). Todavia, com a descoberta de que algumas hemaglutininas aglutinavam seletivamente eritrócitos de um grupo sanguíneo humano particular dentro do sistema ABO, o termo começou a ser introduzido para ressaltar este aspecto de escolha (BOYD; REGUERE, 1949). Posteriormente foi percebido que as propriedades de aglutinação das lectinas estavam baseadas no reconhecimento específico e ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952; MILHOME, 2003).

Movidos por este novo conhecimento, pesquisadores passaram a definir lectinas como proteínas de origem não imune, ligantes a carboidratos que aglutinam células ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN et al., 1980) e não modificam bioquimicamente os carboidratos ligantes (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Somente com o desenvolvimento biotecnológico, que resultou na purificação das lectinas, foi possível um melhor entendimento da estrutura, ação e emprego destas moléculas.

Presentes nos variados tecidos, elas parecem atuar como proteínas de reserva vegetal (MACEDO et al., 2011); de reconhecimento, de defesa contra fitopatógenos e predadores (SÁ et al., 2008; KAUR et al., 2006); de regulação e sinalização celular (JIANG et al., 2006); estão envolvidas no estabelecimento de simbiose entre organismos (KVENNEFORS et al., 2008), podendo ainda serem específicas para eritrócitos de diferentes origens animais ou tipagens (JUNG et al., 2007; WU et al., 2009) ou podem ser não específicas para grupos sanguíneos (LIU et al., 2008). Elas atuam na comunicação entre células, na interação entre hospedeiro-patógeno, na embriogênese, na metástase do câncer, no desenvolvimento de tecidos, na apoptose (LI et al., 2011), na detecção, purificação, caracterização e análise de glicoconjugados (OLAJOS, 2010; CERRADA, et. al., 2010) onde podem ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolípídeos (GHAZARIAN et al., 2011).

Com base na estrutura das subunidades das lectinas, mais precisamente, nos produtos primários da tradução dos genes, Peumans et al. (2001) classificaram-nas em quatro grupos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, apresentadas na Figura 1.

As **merolectinas** são proteínas pequenas, formadas exclusivamente por um único domínio ligante aos carboidratos. Por definição são monoméricas e estruturalmente simples, e devido à sua natureza monovalente, não apresentam atividade hemaglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. Poucas merolectinas foram descobertas, talvez pelo fato de não apresentarem atividade hemaglutinante. Exemplos bem conhecidos são as heveínas, lectinas de látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira), e as proteínas ligantes monoméricas de orquídeas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

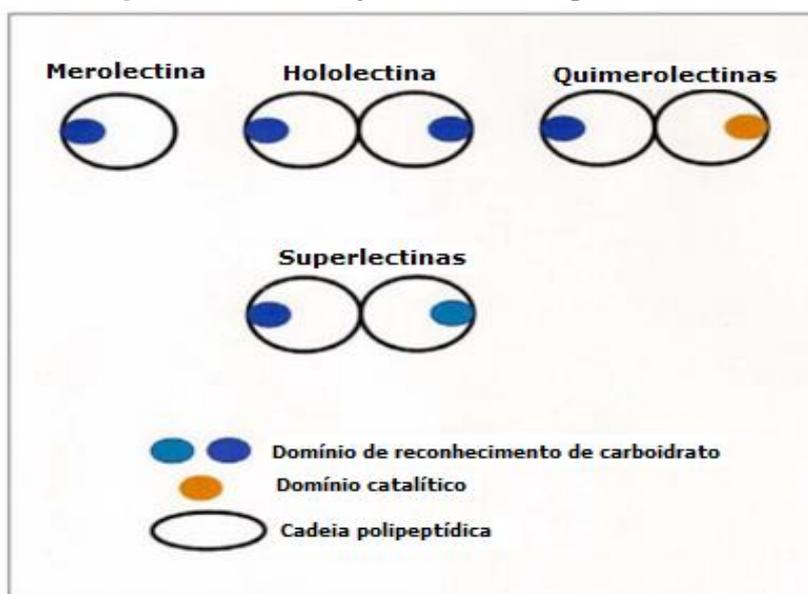
As **hololectinas** são proteínas oligoméricas, formadas por um único tipo de domínio ligante, mas contém dois ou mais desses domínios que podem ser idênticos ou muito homólogos e se ligam ao mesmo carboidrato ou a um outro estruturalmente similar. São capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Ocorrem normalmente na forma de dímeros ou tetrâmeros. Diversas lectinas extraídas de plantas são classificadas como hololectinas, pode-se citar como exemplo a Concanavalina A (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

As **quimerolectinas** são fusões de proteínas tendo um ou mais sítios de ligação para carboidratos, todavia, um destes sítios deve conter um açúcar com atividade biológica definida, agindo de forma independente dos demais sítios, e o segundo domínio pode ter uma atividade catalítica ou uma outra atividade biológica independente do domínio de ligantes a carboidratos. Tais proteínas geralmente apresentam dupla função, mas que se complementam,

como por exemplo, proteínas envolvidas na invasividade celular, que utilizam o domínio de reconhecimento para açúcar como ponto de ancoragem e subsequentemente age com o outro domínio para efetivar a entrada na célula ou até mesmo demolição de membranas. Com relação direta ao número de sítios de ligação, quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. As proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo II e as quitinases tipo I de plantas exemplificam respectivamente os dois casos citados (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

As **superlectinas** são proteínas formadas por dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, porém com especificidades a carboidratos diferentes. Seu domínio catalítico pode reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados. São encontradas com menos frequência do que as hololectinas, porém novas estruturas para esse grupo vêm sendo elucidadas, como a lectina da banana que possui dois sítios distintos de reconhecimento a carboidratos e a lectina de bulbos de tulipa (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

**Figura 1:** Classificação das lectinas quanto à estrutura



Fonte: Adaptado de PEUMANS e VAN DAMME, 1998.

Monteiro e Oliveira (2002) ampliaram essa classificação criando o termo **Multilectinas**, ao mostrar a existência de lectinas que possuem dois ou mais domínios ligantes de carboidratos, idênticos, mas que podem se ligar a carboidratos diferentes. É o caso da jacalina, lectina de sementes *Artocarpus intergrifolia* (MOREIRA; AINOZ, 1977), e da frutalina, lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (MOREIRA et al., 1998), que se ligam tanto a D-galactose quanto a D-manose.

Devido a grande diversidade estrutural, especificidade sacarídica e ocorrência, não se justifica esperar por uma função comum a todas as lectinas de plantas. Mesmo uma lectina particular pode assumir diferentes funções dependendo de onde e quando é expressa (RÜDIGER et al., 2000). Em grande parcela das lectinas de plantas estudadas, nota-se semelhança em aspectos estruturais, como a sequência primária, os sítios de ligação para carboidratos e a função biológica. Tais semelhanças, embora não sejam exatas, resultam em diferentes atividades biológicas (CAVADA et al., 2001). Esses compostos são utilizados como importantes ferramentas em processos biotecnológicos.

As lectinas podem ser classificadas não só em razão da função que desempenham, como quanto à ocorrência, como pode ser verificado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação das lectinas de plantas quanto à ocorrência.

<b>Grupo</b>	<b>Número de Lectinas Identificadas</b>
Lectina de Leguminosas	>100
Ligantes à Quitina	>100
Inativadoras de ribossomos (RIPs)	> 20
Relacionadas a Jacalina	<10
Monocotiledôneas ligantes de Manose	>50
Floema de Curcubitáceas	<10
Família das Amarantáceas	<10

Fonte: Adaptado de PEUMANS & VAN DAMME, 1998.

Lectinas originárias de plantas, em particular, têm sido usadas no reconhecimento proteína-carboidrato. Muitas aplicações biomédicas têm sido desenvolvidas aos longo dos anos a partir da descoberta dessas lectinas, algumas encontram-se citadas na Tabela 2 com as respectivas fontes e ano de descoberta (SHARMA; SUROLLA, 1997).

**Tabela 2:** Denominação de algumas lectinas

<b>Lectina</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>Referência</b>
Abrina	<i>Abrus precatorius</i>	Jequiriti	Erlich, 1881
Con A	<i>Canavalia ensiformes</i>	Feijão de porco	Somner e Howell, 1936
Croatina	<i>Croton tiglium</i>	—	Stillmark, 1888
Favina	<i>Vicia faba</i>	Fava	Boyd e Reguera, 1949
Frutalina	<i>Arthocarpus incisa</i>	Fruta pão	Moreira et al., 1998
Heveina	<i>Hevea brasiliensis</i>	Seringueira	Van Parijs et al., 1991
Jacalina	<i>Arthocarpus integrifolia</i>	Jaca	Young et al., 1989
PHA	<i>Phaseolus vulgares</i>	Feijão comum	Nowel, 1960
Ricina	<i>Ricinus communis</i>	Mamona	Stillmark, 1888

Fonte: Adaptado de SHARON; LIS, 1987.

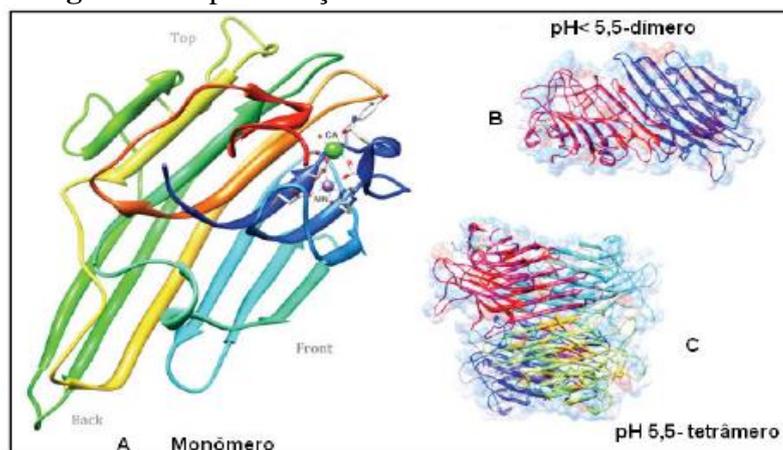
O interesse dos pesquisadores pelas lectinas foi intensificado consideravelmente a partir das décadas de 80 e 90 do século XX, devido à propriedade aglutinante e ligante dessas

biomoléculas. Desta forma, estas passaram a ser usadas como ferramentas para a detecção, isolamento e caracterização parcial de glicoconjugados (SILVA et al., 2011) assim como possibilitaram estudos de mudanças que ocorrem em superfícies celulares durante processos fisiológicos a partir do reconhecimento aos diferentes carboidratos (PETROSSIAN, BANNER e OPPENHEIMER, 2007). Algumas lectinas têm sido estudadas também como mediadoras de drogas (GAO et al., 2007), outras como marcadores taxonômicos de microorganismos diferentes (SLIFKIN; DOYLE, 1990). Há aquelas com atividade antibacteriana podendo ser úteis em aplicações terapêuticas e microbiologia clínica (HOLANDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Estudos têm empregado lectinas como potenciais anticarcinogênicos (DE MEIJA et al., 2003), conjugadas a agentes quimioterápicos úteis no tratamento de tumores induzidos em animais (HASEENABEEVI et al., 1991) ou como uma sonda alternativa em imagens celulares e biomarcadores (WENG et al., 2006).

### 1.2.1.1 Concanavalina A

A concanavalina (ConA) é uma lectina extraída de leguminosas, mais precisamente do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Isolada pela primeira vez em 1916 (LI et al., 2011), foi a primeira lectina a ter sua estrutura cristalina determinada por difração de raios-X em 1972 por Gerald M. Edelman et al., e por Karl D. Hardman e Clinton F. Ainsworth. O estudo de sua interação específica com carboidratos foi detalhadamente realizado por Z. Derewenda et al., em 1989, por difração de raios-X a uma resolução de 2,9 Å, da lectina complexada a metil- $\alpha$ -D-manopiranosil (DEREWENDA et al., 1989). É a lectina mais amplamente estudada para cromatografias de afinidade e separação de glicoenzimas, devido à sua capacidade de formar complexos com moléculas que contêm resíduos  $\alpha$ -D-manopiranosil e  $\alpha$ -D-glicopiranosil. Os estudos mostram que a ligação de afinidade é baseada principalmente em ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (WEN; NIEMEYER, 2007). Concanavalina A é uma proteína que apresenta mudança na conformação de sua estrutura quaternária, em solução aquosa, com variação do pH, temperatura e força iônica da solução (McKENZIE; SAWYER e NICHOL, 1972). A estrutura dessa lectina é altamente sensível ao pH, favorecendo ou não a agregação de seus dímeros em tetrâmeros. Em pH > 5,5 ela adquire forma de tetrâmero, mantendo-se na forma de dímero em pH < 5,5 (LI et al., 2011), como pode ser verificado na Figura 2. A subunidade monomérica é constituída por 237 resíduos de aminoácidos, de massa molecular 26,5 kDa, cuja agregação de dois monômeros, forma um dímero de MM ~53 kDa (pH < 5,5), conhecido como dímero canônico. A mudança do pH a valores superiores a 7,0, resulta na agregação de dois dímeros em um tetrâmero (MM = 104 kDa; pH > 7,0), chamado de dímero de dímeros (NAEEM; KHAN; KHAN, 2005).

**Figura 2:** Representação estrutural da Concanavalina A.



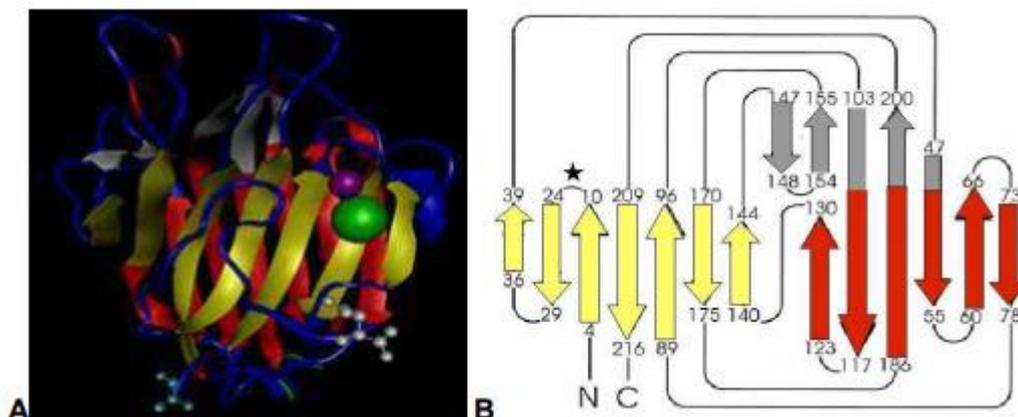
(a) Monômero; (b) Estrutura quaternária dimérica da Con A em pH < 5,5; (c) Tetramerização da estrutura quaternária da Con A em pH > 5,5.

Fonte: LI *et al.*, 2011.

A conformação da estrutura quaternária da Con A também exerce influência sobre sua atividade biológica. Na conformação tetramérica (pH 7,0) a constante de associação,  $K_a$  ( $M^{-1}$ ), à oligomanoses semelhantes a glicopeptídios, é cerca de quatro a dez vezes maior quando comparada a sua forma dimérica (pH 5,5) e a seus derivados diméricos irreversíveis, succinil- e acetil-Con A (pH 7,0) (GUNTHER *et al.*, 1973). Maior capacidade hemaglutinante, indução do capeamento por receptores glicoprotéicos e inibição do capeamento dos receptores de imunoglobulinas, em linfócitos, também são atividades melhor observadas para a conformação tetramérica. Estudos recentes sobre câncer têm empregado esta lectina em marcações histoquímicas de variados tipos teciduais e como agente indutor da apoptose (morte celular programada do tipo I) em diversas linhagens celulares (LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2009).

O enovelamento dos monômeros formam uma estrutura com 2 folhas  $\beta$  anti-paralelas, superiormente cobertas por uma terceira folha- $\beta$ : uma folha dorsal com seis fitas, uma folha frontal com sete fitas e uma folha superior com cinco fitas, Figura 3, estabilizadas por dois cátions divalentes: o íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e o íon de um metal de transição ( $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ), ligados à proteína através das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (CHATTERJEE; MANDAL, 2003). O íon  $Ca^{2+}$  é responsável pela coordenação e fixação das cadeias laterais dos aminoácidos que interagem com o açúcar (1ª camada de coordenação) e das posições dos elementos estruturais dos aminoácidos que estão em contato com estes (2ª camada), estabilizando a arquitetura geral do sítio de ligação. O íon  $Mn^{2+}$  não coordena nenhuma interação direta com a proteína, entretanto sua função é fixar a posição do íon cálcio (WEISS; DRICKAMER, 1996).

**Figura 3: Representação do monômero da concanavalina A.**



- (A) Diagrama em fitas de Con A. Os íons cálcio (roxo) e manganês (verde) estão indicados. A folha dorsal com 6 fitas, em vermelho, a folha frontal com 7 fitas, em amarelo e a folha superior com 5 fitas, em cinza. O primeiro e o último resíduo de aminoácido estão destacadas em ciano e cinza.
- (B) Diagrama topológico do enovelamento do monômero representado em (A). A estrela indica a posição onde os cátions divalentes interagem com o monômero.

Fonte: Protein Data Banking: 2CNA (LORIS et al.,1998).

### 1.3 Métodos de purificação

O isolamento e purificação de proteínas é alicerçado pelos estudos das características físico-químicas, estruturais, bem como suas propriedades biológicas e é estimulado pela sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (BANERJEE et al., 2004; VAN DAMME et al., 1996; SPILATRO et al., 1996). Tratam-se de técnicas específicas, que devem ser projetadas para cada proteína individualmente, uma vez que faz-se necessário aplicar estratégias cada vez mais sensíveis para alcançar a separação desejada em pequenas diferenças, afim de se obter proteínas extremamente puras.

A separação e purificação de uma determinada proteína, presente numa dada amostra, pode ser feita com base em uma ou mais características da sua molécula que as diferenciem dos restantes constituintes da amostra. Assim, pode-se recorrer a diferentes métodos, tais como: precipitação – com base em diferenças de solubilidade em função do pH, força iônica e constante dielétrica do solvente; filtração em gel e centrifugação em gradiente de densidade – com base em diferenças de dimensão molecular; cromatografia de troca iônica – com base em diferenças de carga molecular; cromatografia de afinidade – com base nas interações específicas entre as moléculas; cromatofocagem e focagem isoeétrica – com base em diferenças nos pontos isoeletricos; eletroforese de zona em gel – com base em diferenças de

carga e dimensão molecular. Para se conseguir graus elevados de purificação, torna-se, geralmente, necessária a utilização sequencial de mais do que um método, baseados em critérios de separação diferentes (ACTAS BIOQUÍMICA, 1991)

Métodos convencionais utilizados na purificação de biomoléculas têm sido aplicados para lectinas. Extrações podem ser feitas a partir de soluções salinas, como no isolamento da lectina das sementes de *Erythrina speciosa* (KONOZY et al., 2003) ou usando tampões, como na obtenção das lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA et al., 2002), dos tubérculos de *Helianthus tuberosus* (SUSEELAN et al., 2002) e da entrecasca de *Hevea brasiliensis* (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), *Sambucus sieboldiana* (ROJO et al., 1997) e *Morus nigra* (ROUGÉ et al., 2003).

A purificação de biomoléculas exige o uso de muitas técnicas para cada estágio de separação, uma vez que o uso dos métodos convencionais é aplicado apenas para que seja conseguido uma extração parcial dos compostos presente na solução aquosa. As técnicas cromatográficas estão presentes ao longo de todos os processos de purificação. Por essa razão, Niven (1995) afirmou que a cromatografia representava o estado da arte na purificação de proteínas. A disponibilidade de diferentes técnicas cromatográficas com diferentes propriedades fornece combinação poderosa para a purificação de qualquer biomolécula (PHARMACIA BIOTECH, 1999).

Dentre os métodos cromatográficos citados anteriormente, Collins et al. (1997), afirmam em seus estudos que as lectinas podem ser purificadas através de cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica ou cromatografia de filtração em gel. O que varia, são as matrizes que são utilizadas nestas técnicas, cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da proteína (cromatografia de filtração em gel).

No esquema proposto por Belter (1986), a purificação de biomoléculas exige o emprego de vários métodos devendo-se buscar o mais apropriado para cada estágio de separação. Assim, são empregados procedimentos diferentes na remoção de compostos insolúveis ou clarificação, no isolamento do produto ou captura, na purificação intermediária e no polimento (Tabela 3). A quantidade e a variação nas metodologias usadas dependerão da natureza e das características das amostras, assim como o grau de pureza desejado no produto final (PASECHNIK; PHLS, 1995).

**Tabela 3 - Técnicas de separação usadas nas diferentes etapas de purificação de biocompostos.**

Técnicas de separação	Estágios ou etapas			
	Clarificação	Captura ou 1º purificação	Purificação intermediária	Polimento
Precipitação	*	*	*	
Centrifugação	*			
Homogeneização	*			
Filtração	*			
Cristalização			*	
Sistemas aquosos bifásicos	*	*	*	
Cromatografia de troca iônica		***	***	***
Cromatografia com ligante específico (afinidade)		***	***	**
Cromatografia por interação hidrofóbica		**	***	*
Cromatografia por exclusão molecular			*	***
Diafiltração				*
Ultrafiltração				*
Cromatografia em fase reversa			**	***

Fonte: Adaptado de MATEJTSCHUK et al., (1998); BROCKLEBANK (1990); PHARMACIA BIOTECH (1999).

Apesar do longo histórico de imobilização de biomoléculas (STRAATHOF; PANKE e SCHMID, 2002) estima-se serem poucos e novos os testes com lectinas. A tecnologia de imobilização de lectinas para utilização em processos químicos e físicos têm despertado atenção devido suas aplicabilidades e o uso em processos industriais tradicionais. Nesta vertente utilizar-se-á uma lectina pura, para purificar outras presentes em extratos aquosos, a partir do método de adsorção e afinidade química pelo radical livre, tornando-se atrativo no setor industrial por se tratar de um método simples, eficiente, com capacidade de reutilização do sistema, condução do processo em modo contínuo e facilidade de separação do ligante para com a biomolécula adsorvida.

Com as propriedades relatadas anteriormente, tais como, atuam na comunicação entre células, na metástase do câncer, no desenvolvimento de tecidos, como proteínas de reserva vegetal, dentre outras, aliadas à estabilidade geralmente elevada, lectinas de diferentes especificidades foram imobilizadas sobre suportes inertes e usadas como matrizes de afinidade para diversos fins. Assim, elas têm sido utilizadas em cromatografia de afinidade não só para o isolamento, como para a demonstração da natureza glicoproteica de receptores de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

### **1.3.1 Método adsortivo**

A purificação de uma determinada biomolécula, além de envolver uma série de etapas convenientemente ordenadas, visando a obtenção do máximo de rendimento e pureza, devem gerar custos compatíveis com os de mercado. O estudo adsortivo biosseletivo torna-se uma alternativa atraente por ser um método que apresenta alta seletividade e que vem sendo usado com muito sucesso na purificação de diversas enzimas e proteínas (TEOTIA et al., 2001)

A escolha do suporte cromatográfico é um ponto crucial para a obtenção de bons resultados em processos de purificação, podendo influenciar na distinção da alta ou baixa eficiência do método (MENDES et al., 2011). São muitas as características requeridas para tal suporte ser considerado ideal para determinado processo de purificação. Um suporte ideal para processos cromatográficos de proteínas não deve conter grupos que se liguem de forma não seletiva as moléculas destas, porém devem conter grupos funcionais que permitam a reação controlada de uma ampla variedade de adsorventes da proteína (JANSON e JÖNSSON, 1998).

Ademais, a coluna cromatográfica deve ser química e fisicamente estável a fim de resistir a condições extremas ao longo dos processos, regeneração e manutenção sem perder a capacidade de inchamento de sua estrutura, ser reativo para a introdução de braços espaçadores quando de interesse, resistente ao ataque microbiano, ser permeável (sendo analisada sua área superficial e distribuição dos poros) e ser viável financeiramente (CARDOSO et al., 2009; FREITAS et al., 2007).

#### **1.3.1.1 Cromatografia líquida de afinidade (CLAF)**

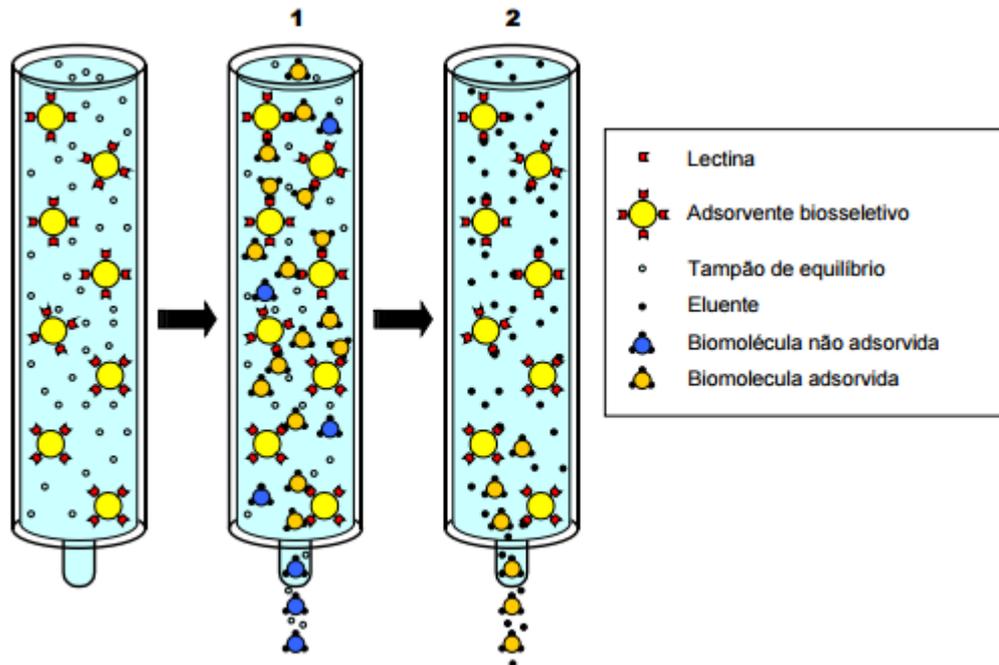
A forma mais comum de efetuar separações biosseletivas é por cromatografia de afinidade, sendo esta, a segunda técnica de purificação mais usada, dentre os métodos cromatográficos existentes, devido ao alto grau de resolução, capacidade e seletividade que se pode obter. O princípio deste método consiste em melhorar a capacidade de separação de biomoléculas a partir de ligações específicas, não covalentes à suportes insolúveis, favorecendo a obtenção de biosseparações com elevada seletividade (NIVEN, 1995; PHARMACIA BIOTECH, 1999).

A técnica consiste no processo de separação de biomoléculas com base nas suas interações específicas com ligantes acoplados a uma fase sólida (JANSON et al., 2011). Pesquisas sobre o isolamento e purificação de proteínas usaram cromatografia de partição como o último passo no processamento, no entanto, estratégias recentes mudaram esse padrão no sentido de usar a cromatografia de afinidade como um processo de etapa única para

detecção e separação molecular (MOSER; HAGE, 2010; DUHITA, et al., 2009). A cromatografia de afinidade utilizando lectinas como ligantes tem sido utilizada para a purificação de glicoconjugados, devido à sua especificidade de ligação por carboidratos (ANIULYTE, et al., 2006; WEN, NIEMEYER, 2007). Nessa técnica, os compostos (com afinidade pelo ligante) são adsorvidos mediante ligação seletiva reversível do ligante com a molécula de interesse presente na solução aquosa (NIVEN, 1995). É ideal para a captura ou purificação intermediária de biomoléculas, podendo ser usada sempre que houver ligantes adequados para a proteína de interesse (PHARMACIA BIOTECH, 1999). A seletividade do método é garantida pela especificidade única bio-inerente à interação molécula e alvo. A dependência absoluta da interação de afinidade em reconhecimento biológico, em vez de propriedades físico-químicas, implica que esta técnica preserva as atividades biológicas e imunológicas dos produtos isolados (NARAYANAN, 1994).

As características que o ligante deve ter, incluem ser compatível com as soluções usadas durante o processo de imobilização, possuir no mínimo um grupo funcional através do qual ele será acoplado à matriz (-NH<sub>2</sub>, amino; -COOH, carboxílico; -CHO aldeído; -SH, tiol; -OH, hidroxílico) e que este grupo funcional não seja essencial para a sua função biológica, ou seja, sua capacidade de ligação não deve ser afetada pela imobilização (JANSON & RYDÉN, 1989). Assim, a proteína desejada é obtida com alto grau de pureza alterando-se apenas as condições de pH (KENNEDY et al., 1995), força iônica (FREIRE et al., 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (KONOZY et al., 2003; BANERJEE et al., 2004). O esquema de adsorção e eluição é representado na Figura 4.

**Figura 4:** Etapas da cromatografia de afinidade em suportes contendo lectina imobilizada.



(1) Adsorção da biomolécula: amostra contendo glicoproteínas é aplicada à coluna; o contato adsorvente x biomolécula resulta em interações não covalentes via o sítio de ligação para carboidrato da lectina. As biomoléculas não retidas à coluna são coletadas no tampão de equilíbrio como frações não adsorvidas. (2) Eluição da biomolécula: glicoproteína é obtida através da dessorção biosseletiva ou não específica.  
 Fonte: Adaptado de SANTOS FILHO, 2001.

Contudo um problema observado na cromatografia de afinidade contendo proteínas imobilizadas é a baixa eficiência de ligação da matriz, decorrente de impedimento estérico que inviabiliza o acesso da molécula a ser isolada ao ligante. O uso de braços espaçadores em várias matrizes cromatográficas, minimiza ou resolve este problema, ampliando as possibilidades de interação, uma vez que aumenta a acessibilidade a todos os centros de ligação disponíveis numa proteína. Por outro lado, a incorporação de braços espaçadores pode promover interações não-específicas de várias proteínas à matriz (DEMARTINO, 1989; KARMALI, 2001). Como as lectinas interagem especificamente com carboidratos, esse grupo de proteínas se constitui em excelentes ferramentas para a purificação de glicoproteínas solúveis (SANTOS FILHO, 2001). Na Tabela 4 estão listadas algumas das lectinas mais usadas, bem como suas especificidades monossacarídicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

**Tabela 4:** Lectinas comumente usadas como ligantes em colunas cromatográficas por afinidade.

<b>Lectina</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Matriz</b>
<i>Canavalia ensiformis</i>	Glc/Man	Sepharose-4B
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc	Agarose
<i>Hellix pomatia</i>	GalNAc	Agarose
<i>Lens culinaris</i>	Glc/Man	Sepharose-4B
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc	Agarose
<i>Pisum sativum</i>	Glc/Man	Agarose
<i>Arachis hypogea</i>	Gal/GalNAC	Agarose
<i>Glycine max</i>	GalNAc	Agarose
<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc	Agarose

Man, manose; Glc, glicose; GlcNAc, N-acetilglicosamina; Gal, galactose; GalNAc, N-acetilgalactosamina.

Fonte: Catálogo Sigma, 2000.

Dentre os diferentes radicais encontrados na estrutura de proteínas, os radicais amina tem sido os radicais usados para a sua imobilização. No método mais amplamente empregado a imobilização da proteína é feita por reação entre o grupo amino da lectina e o resíduo imidocarbonato da Sepharose-CNBr ativada. Dentre os suportes que foram largamente utilizados para imobilização de lectinas, podem ser citados a Sepharose e a agarose que são resinas comerciais utilizadas em técnicas cromatográficas (YOSHIDA et al., 1997).

Vários tipos de suporte podem ser usados para aumentar a seletividade de técnicas com baixa resolução na separação de biomoléculas, mediante a introdução de elementos de afinidade. Nos monólitos poliméricos, por exemplo, um dos métodos de imobilização do ligante no suporte é por meio da adsorção. Resumidamente este método é descrito em dois estágios, o primeiro, onde a solução a ser purificada é misturada com o adsorvente, e as biomoléculas que não se ligarem ao suporte serão descartadas, enquanto o complexo proteína-ligante permanece adsorvido. No segundo estágio, a proteína é eluída e recuperada no final do processo. Desta forma, torna-se possível o isolamento seletivo de uma biomolécula ou grupo de biomoléculas em amostras complexas.

#### **1.4 Monólitos Poliméricos orgânicos**

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado e que foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação (LOZINSKY et al., 2001). Os monólitos poliméricos orgânicos são sintetizados

a partir da mistura de monômeros, agentes reticulantes e solvente formador de poros (agente porogênico), que são polimerizados *in situ* em um molde. A imensa variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície permite que os monólitos se adequem a quase qualquer tipo de separação (GUIOCHON, 2007).

A superfície do monólito pode ser modificada a fim de funcionalizar a coluna. Essa modificação pode ser obtida pela copolimerização de monômeros funcionais (WIEDER et al., 2006; LI et al., 2009), pela modificação dos grupos funcionais da superfície (ADRIANO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; MENDES et al., 2011) ou imobilização de monômeros funcionais na superfície após a polimerização (SAVINA et al., 2005a; HANORA et al., 2006; YAO et al., 2007).

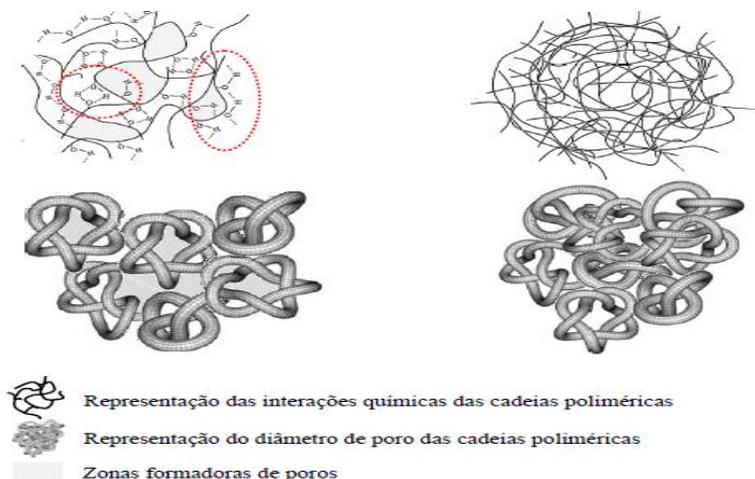
Devido à estrutura de poros interconectados de grandes dimensões, o fluxo escoa através destes de forma puramente convectiva e a resistência à transferência de massa é baixa (HAHN et al., 2002; PODGORNİK et al., 2000), tornando os monólitos uma fase estacionária muito atrativa para cromatografia, principalmente no processamento de grandes biomoléculas como proteínas, DNA e outras possíveis nano partículas. Além disso, podem ser usados diretamente na captura de biomoléculas a partir de soluções concentradas ou contendo partículas.

Na Figura 5 é mostrado esquematicamente redes poliméricas em diferentes concentrações, evidenciando o maior grau de entrelaçamentos físico-químicos entre as cadeias com o aumento da concentração de polímero e, conseqüentemente, diminuição do tamanho dos poros e da porosidade (conectividade entre os poros).

**Figura 5:** Efeito da concentração do polímero sobre a formação de poros nas colunas cromatográficas.

**Polímero em baixas concentrações**

**Polímeros em altas concentrações**



Fonte: Adaptado de FAGUNDES, 2011.

#### 1.4.1 Criogel monolítico supermacroporoso

Os criogéis, são géis poliméricos formados em condições de congelamento moderado (temperatura entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Estes foram introduzidos como nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação no final da década de 90 (LOZINSKY et al., 2001). Possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho que varia de 10 a  $100\ \mu\text{m}$  e se diferenciam das demais matrizes de separação por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solução.

Em decorrência de possuir a parede dos poros mecanicamente fortes, os criogéis podem suportar altas vazões sem praticamente nenhuma compressão, permitindo assim o transporte de massa convectivo dos solutos e de partículas de pelo menos  $10\ \mu\text{m}$  de tamanho (PLIEVA et al., 2004 e PERSSON et al., 2004).

Os criogéis consistem em um sistema ‘polímero-solvente imobilizado’ em que macromoléculas conectadas via ligações químicas formam uma rede tridimensional (por ligações que, na grande maioria das vezes, permanecem inalteradas com o tempo). A conformação das cadeias é determinada pela natureza das ligações e o método de produção do gel. Tendo por base a natureza intermolecular das ligações nas uniões das cadeias de polímeros, os géis podem ser divididos em dois grandes grupos: géis químicos quando macromoléculas são ligadas por interações eletrostáticas e géis físicos quando macromoléculas são ligadas por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (LOZINSKY et al., 2003).

Os géis poliméricos podem ser produzidos por duas principais vias: na primeira via, o inchamento limitado devido à ligações não-cruzadas de polímeros, ou via inchamento de um xerogel (produzido por evaporação simples do solvente dentro do gel). A segunda e, mais comumente usada, parte da formação em um sistema líquido. Neste caso, o sistema inicial consiste de uma solução de monômeros em que a geleificação acontece como resultado da polimerização ramificada, ou de uma solução de polímeros em que a formação do gel é resultado das ligações químicas-cruzadas (LOZINSKY, 2002).

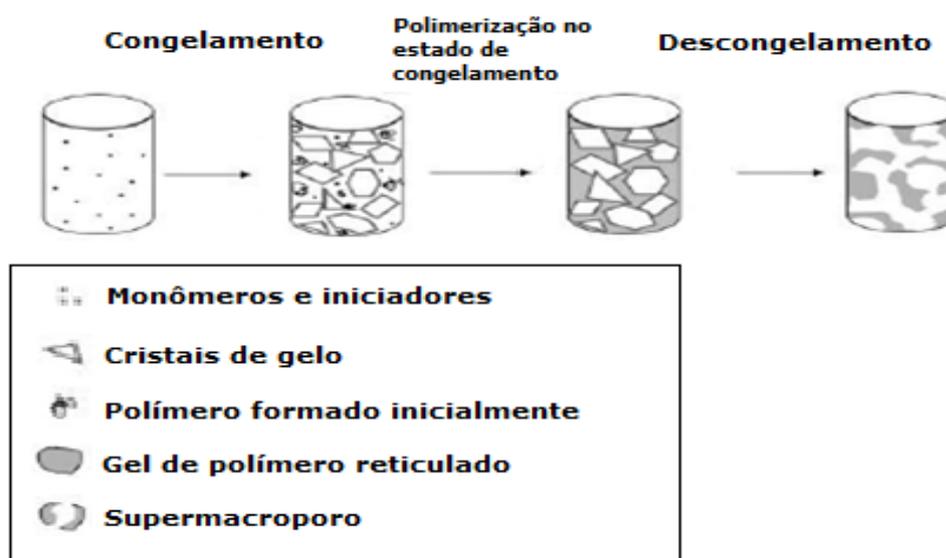
A geleificação criotrópica (também conhecida como criogeificação ou crioestruturação) é um tipo específico de síntese de géis poliméricos onde a formação deriva-se do tratamento criogênico de sistemas potencialmente capazes de formar géis. Os produtos dessa criogeificação obtidos sob condições de congelamento podem ser chamados de criogéis. A cristalização do solvente é o principal fator de diferenciação entre a criogeificação com a geleificação induzida por refrigeração. Os produtos deste último são os géis psicrotrópicos, isto é, géis formados em condições de temperaturas mais baixas, por exemplo, a gelatinização da gelatina, sem que ocorra transição de fase do solvente. Estes géis

são termoreversíveis diferenciando assim dos criogéis formados sob condições de congelamento (PLIEVA et al., 2004b).

Dois métodos principais para produção de criogéis tem sido utilizados: (a) reticulação de polímeros, tais como álcool polivinílico, dissolvidos em água (PLIEVA et al., 2005) e (b) polimerização de monômeros dissolvidos na água. Em ambos casos a solução deve ser congelada antes da reação. Usando o último método, uma grande variedade de criogéis foi preparada a partir de monômeros, incluindo 2-hidroxietil metacrilato (PLIEVA et al., 2007), acrilamida (PLIEVA et al., 2004a; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007; CHEN et al., 2008), dimetilacrilamida (KUMAR et al., 2003), N-isopropilacrilamida (GALAEV et al., 2006; PEREZ et al., 2007), e N- N-vinilcaprolactama (PETROV et al., 2009).

Sobre as necessidades das condições de congelamento durante a polimerização do monólito, pode-se inferir que os cristais de gelo em crescimento atuam como agentes porogênicos. A forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem após o descongelamento da água presente, como pode ser observado na Figura 6. Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008).

**Figura 6:** Representação da produção do criogel.



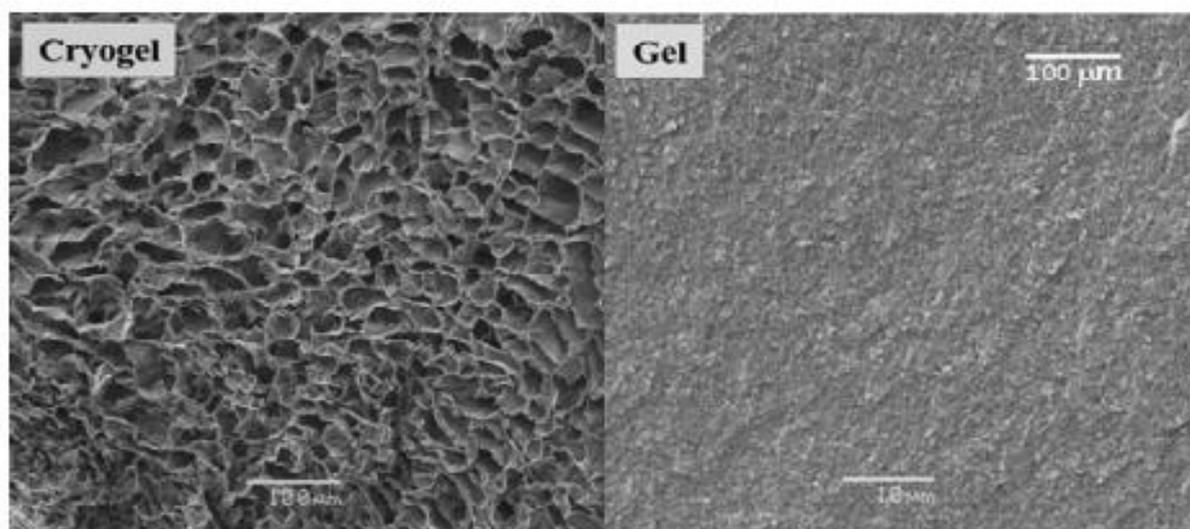
Fonte: Adaptado de PLIEVA et al., 2004a.

Plieva et al. (2007) fizeram uma análise comparativa através da microscopia eletrônica de varredura de criogéis preparados a partir de uma mesma composição, mas submetidos a reação de polimerização em diferentes temperaturas (-20 e 20° C), e observaram que, enquanto a estrutura do material preparado à temperatura ambiente (20° C), é compacta e

praticamente sem funcionalidade para cromatografia, o criogel ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), apresenta grandes poros interconectados, separados por paredes sólidas poliméricas, que permitem o fluxo de fluídos por sua estrutura, como pode ser observado na micrografia apresentada na Figura 7.

Esta característica porosa vai ao encontro com o que foi observado por Carvalho et al. (2014) ao produzirem criogéis com semelhantes concentrações de monômeros poliméricos para avaliar o processo de adsorção da proteína lactoferrina nos referidos suportes. Estas colunas cromatográficas com poros suficientemente grandes, permitem que soluções contendo fragmentos celulares e materiais particulados em geral possam ser escoados sem provocar sua obstrução (LOZINSKY et al., 2002.).

**Figura 7:** Imagem por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e (B) gel de dextrana convencional preparado em temperatura ambiente.



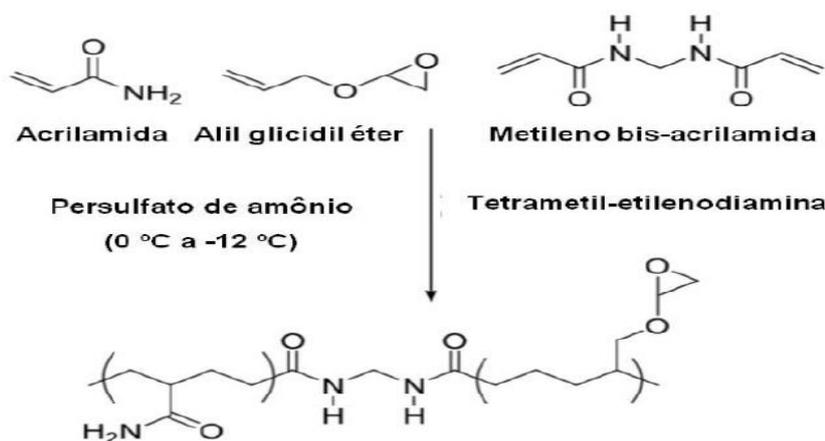
Fonte: PLIEVA et al., 2007

#### 1.4.2 Criogel de poliacrilamida

Por sua acessibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, hidrogéis de pAAM constituem uma das matrizes mais utilizada na preparação de hidrogéis semi-interpenetrante, que consiste em uma combinação de dois polímeros, sendo um deles em forma de rede sintetizado ou reticulado em presença imediata de outro. Essa característica é conseguida através da ligação cruzada da polimerização de acrilamida na presença de monômeros sintéticos ou naturais. Tais hidrogéis têm inúmeras aplicações, como sistemas de administração de fármacos (RISBUD; BHONDE, 2000; EKICI; SARAYDIN, 2004), condicionadores de solo e de remediação de águas residuárias (ZOHURIAAN et al., 2010).

Na produção de géis poliméricos de poli(acrilamida), os componentes comumente utilizados para a construção das matrizes são acrilamida, N,N'-metileno-bis(acrilamida), tetrametilenodiamina, também chamado de TEMED, e persulfato de amônio, também conhecido por APS (Figura 8).

**Figura 8:** Reação de crio-copolimerização dos monômeros AAm, AGE e MBAAm para o preparo do criogel.



Fonte: MALLIK e HAGE, 2006

Yao et al. (2006) propuseram um criogel contínuo supermacroporoso com partículas de ferro imobilizadas durante a criopolimerização para a utilização de proteínas (BSA) em cromatografia. A síntese dos criogéis foi feita pela co-polimerização criogênica dos radicais de uma solução de Acrilamida (AAm), N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAm), alil glicidil éter (AGE) e nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sob temperatura de congelamento. A matriz, além de alta porosidade (poros 10-50 μm), possuiu alta permeabilidade e baixo coeficiente de dispersão axial em uma ampla faixa de velocidade do fluido. A capacidade de adsorção da proteína (BSA) na matriz de criogel foi superior quando comparada com a mesma matriz de criogel (reportada em trabalhos anteriores do referido autor) sem as nanopartículas imobilizadas.

A combinação única das propriedades dos criogéis, tais como sua estrutura macroporosa, biocompatibilidade e robustez química e mecânica, abrem novas oportunidades para a concepção desses materiais macroporosos. Condições moderadas para a imobilização aliada a elevada estabilidade mecânica dos criogéis permitem a preparação de colunas cromatográficas eficientes para serem empregadas em soluções aquosas ou pouco viscosas, podendo ser utilizados para a detecção analítica e captura seletiva de células específicas.

## **1.5 Modificações de funcionalização nos suportes cromatográficos para imobilização de proteínas**

Embora já exista uma ampla variedade de suportes monolíticos disponíveis, não há um que seja uma solução universal, visto que cada tipo de biomolécula e cada sistema apresentam suas peculiaridades. Visando aperfeiçoar a utilização desses criogéis como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, várias metodologias de funcionalização de sua superfície são apontadas. Essas funcionalizações são realizadas por meio da circulação de soluções contendo agentes reticulantes através da matriz polimérica ou por imersão do suporte (geralmente para criogéis em formato de disco) na solução contendo os grupos ligantes (KIM; HAGE, 2005). Os grupos reativos são introduzidos na superfície do suporte para permitir a formação de ligação covalente entre a biomolécula e o suporte na etapa subsequente. Com a introdução de novas estruturas químicas na superfície do monólito é possível obter fases estacionárias que interajam mais ou menos especificadamente com um composto em particular, garantindo assim a imobilização do mesmo, para que a partir de então, ele possa adsorver a biomolécula de interesse presente na fase móvel (JANSON; JÖNSSON, 1998).

Cada método de imobilização apresenta uma diferente reação química para atingir o máximo de adsorção das biomoléculas percoladas. Como técnicas de funcionalização dos criogéis tem-se a imobilização via ligação covalente, adsorção bioespecífica, ativação catiônica, dentre outras (KIM; HAGE, 2005; MALLIK; HAGE, 2006).

Suportes poliméricos com grupos epóxi sobre a superfície estão entre os mais utilizados devido ao fato destes grupos poderem facilmente reagir com grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), tiol ( $\text{SH}$ ) ou hidroxila ( $\text{OH}$ ) das proteínas e formar uma ligação covalente estável (MATEO et al., 2000; MATEO et al., 2003). Além disso, grupos epóxi são muito estáveis em valores de pH próximo ao neutro, o que torna o suporte contendo esses grupos adequados para longos períodos de armazenamento.

## **1.6 Modificações para funcionalização da superfície do criogel**

Com fins comparativos diferentes métodos de ativação foram utilizados para testar a estabilidade química da lectina imobilizada, capaz de obter menor lixiviação da mesma, a modificação química e física do suporte, a redução do tamanho de seus poros e a maior média de reticulação da lectina no interior dos poros (HE et al., 2006; REIS; WITULA; HOLMBERG, 2008).

Os protocolos para a imobilização da lectina diferem entre si, na modificação da superfície do suporte por meio das reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-

FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Durante o processo de interação da lectina com o suporte pode acontecer da região do sítio ativo se tornar menos acessível ao ligante, ocasionando um impedimento estérico (MATEO et al., 2007), ou a forte fixação da lectina ao suporte dificulte a ativação da mesma, caso essa possua conformações distintas quando ativada e não ativada (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009). Por tais motivos foram estudados 6 distintos métodos de imobilização, em relação a grupos reativos presentes na superfície, para que fosse possível estabelecer um comparativo entre a partir das médias de imobilização obtidas por ambos e o melhor dentre eles pudesse ser aplicado para o processo adsorptivo.

O método da Base de Schiff, utiliza o grupo amina da proteína e a forma aldeído ativada do suporte, via ligação covalente. Primeiramente, os grupos epóxidos do criogel são convertidos em dióis e estes são oxidados formando grupos aldeídos, que podem interagir com as aminas primárias das proteínas, formando a base de Schiff, que por sua vez é obtida por meio de reações de redução empregando um agente redutor.

Outro método de imobilização via ligação covalente é o da dihidrazida adípica. Neste método os grupos aldeídos das biomoléculas reagem com os grupos hidrazidas do suporte para formar uma ligação hidrazona estável (RUHN; GARVER; HAGE, 1994).

Contudo, ressalta-se que as propriedades do material do suporte macroporoso irão influenciar os processos de adsorção, a conformação e a atividade aparente das proteínas imobilizadas ou purificadas, bem como o tamanho e superfície química da natureza da proteína e do substrato na interface do material (TALBERT; GODDARD, 2012).

Um suporte ideal deve imobilizar a lectina de forma que seja conservada sua estrutura secundária e terciária, além de apresentar um mínimo de dessorção das biomoléculas durante a reação (HENZLER et al., 2008). A eficiência da lectina imobilizada depende fortemente da estratégia de imobilização e do material utilizado como suporte. Nesse contexto, há um crescente interesse no entendimento e controle das estratégias de imobilização para purificação (ABBAS et al., 2009).

Inúmeros métodos de imobilização têm sido reportados na literatura, dentre os quais se destacam: adsorção (KILONZO et al., 2011), imobilização por ligação covalente (KANNOUJIA et al., 2009), aprisionamento em géis poliméricos (NICHELE et al., 2011; QUIROGA et al., 2011) e utilização de nanopartículas magnéticas como matrizes (SONG et al., 2011). Dentre esses, o método por adsorção tem sido considerado um dos mais simples e econômicos para a imobilização de proteínas. A imobilização de uma lectina por adsorção oferece uma enorme faixa de aplicabilidade em virtude de haver uma mínima perturbação na estrutura nativa da mesma (KUMAR et al., 2009).

## **2 OBJETIVO GERAL**

O escopo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de adsorventes monolíticos supermacroporosos funcionalizados por diferentes métodos para a purificação de lectinas, por meio da modificação estrutural dessas colunas monolíticas com a inclusão de grupos ligantes constituídos da lectina ConA.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Sintetizar adsorventes poliméricos supermacroporosos por criogeificação utilizando monômeros de acrilamida, bis-acrilamida e alil glicidil éter;
- Avaliar diferentes métodos de funcionalização dos criogéis produzidos para a imobilização da ConA como agente ligante;
- Caracterizar os criogéis, com relação a aspectos físicos, químicos, morfológicos e operacionais;
- Avaliar o potencial de uso das colunas produzidas, estudando a captura de uma lectina modelo e a capacidade de reutilização das colunas produzidas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes utilizados durante os experimentos estão descritos ao longo das metodologias. Todos os reagentes possuem, no mínimo, grau de pureza PA-ACS, e a água utilizada foi ultrapura (sistema Milli-Q plus).

#### 3.1 Produção da coluna monolítica

A produção das colunas monolíticas foi adaptada das metodologias propostas por Kumar et al., (2006) e Yao et al., (2006), cujo procedimento consistiu em produzir criogéis por crio-copolimerização dos monômeros de Acrilamida (AAm), N,N'-Metileno-bis-acrilamida (MBAAm) e Alil Glicidil Éter (AGE), sendo iniciada pelo N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) e Persulfato de Amônio (APS), sob condições controladas de temperatura de congelamento à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os monômeros foram pesados individualmente em balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) seguindo a proporção mássica de 4:1 (AAm + AGE):MBAAm e 5:1 (AAm):(AGE). A mistura de polimerização foi preparada dissolvendo-se todos os componentes em água ultrapura (MilliQ, Millipore) até concentração final de 6% (m/v) de monômeros (AAm + AGE + MBAAm). Para garantir a completa solubilização, a mistura foi sonicada em um banho ultrassônico (SoniClean 6, Sanders medical) por 5 minutos. A polimerização dos radicais livres foi iniciada após adição em banho de gelo do APS solubilizado em água ultrapura e TEMED, ambos em quantidade igual a 1% m/m em relação à massa de monômeros. A solução homogeneizada foi rapidamente vertida em seringas plásticas de 5,0 mililitros, seladas e imersas em banho termostático (Banho ultratermostático, Quimis) à  $(-20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  e mantidas nesta temperatura por 24 horas. Decorrido esse tempo, as colunas foram removidas do banho e levadas à temperatura de refrigeração de  $4^{\circ}\text{C}$  por 4 horas para o descongelamento da água cristalizada no interior da estrutura. Logo após, as colunas foram colocadas em estufa à  $(60 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  e mantidas por aproximadamente 7 dias, até alcançar peso constante e então finalizar a etapa de formação da estrutura porosa.

Posteriormente, as colunas foram reidratadas e lavadas com 200 mL de água deionizada utilizando uma bomba peristáltica (Minipuls Evolution, Gilson) à vazão constante de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para remoção dos monômeros que não reagiram durante a formação da coluna, e foram novamente secas em estufa à  $(60 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas em dessecador e pesadas em balança analítica, para que fosse verificado por diferença a massa de monômeros não polimerizada.

Logo após, as colunas tiveram as extremidades cortadas, o tamanho padronizado e foram identificados individualmente, com os novos pesos registrados para dados de análises posteriores.

### **3.2 Ativações dos monólitos**

Os criogéis produzidos foram ativados utilizando-se 5 metodologias distintas, por meio da circulação e enxertia de soluções contendo grupos ligantes através das colunas. Para cada metodologia testada foram utilizados pelo menos oito monólitos previamente preparados.

#### **3.2.1 Método Epóxi**

O método de imobilização seguiu procedimentos semelhantes ao apresentado por Mallik, Jiang e Hage (2004), com adaptações.

A ativação foi iniciada lavando-se o criogel com 30 mL de etanol na vazão de 2,0 mL.min<sup>-1</sup> (foi passado 15 mL do solvente, aguardou-se 10 minutos em repouso e foi continuada a lavagem com os 15 mL restantes). Em seguida, o etanol foi diluído em água na proporção 1:1 seguindo-se a mesma sequência. Por fim, a coluna foi lavada com 30 mL de água. Logo após, passou-se 40 mL de tampão carbonato 50 mmol. L<sup>-1</sup> (pH 9,5) em recirculação por 30 minutos, com uma pausa de 30 minutos e recirculou novamente pelo mesmo tempo. Em seguida foi preparada uma solução 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> de concanavalina A (ConA, Sigma) no tampão carbonato adicionado de Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), Cloreto de Manganês (MnCl<sub>2</sub>) e Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cofatores necessários para a atividade da concanavalina, todos na concentração de 0,1 mmol. L<sup>-1</sup> e 1% de glicose, para prevenir a imobilização das lectinas pelo sítio de ligação aos carboidratos. 20 mL dessa solução foi recirculada na coluna por 16 horas. Após essa etapa, a lectina imobilizada foi quantificada por diferença da solução antes e após a recirculação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm. Em seguida, a coluna foi lavada com 30,0 mL de tampão carbonato, seguido de 40 mL da solução de etanolamina no tampão (0,1 M) à vazão de 2,0 mL.min<sup>-1</sup>, que foi passado também de forma gradativa, escoou 20 mL da solução, repousou por 30 minutos e foi continuado o fluxo com os 20 mL restantes, essa solução foi usada para bloquear os grupos epóxi que não reagiram. Ao término, a coluna foi lavada com 30 mL do tampão carbonato para retirada do excesso da etanolamina. Após a ativação, a coluna foi lavada com 40 mL de água ultrapura e 40 mL do tampão fosfato 20 mmol (pH 7,2).

### 3.2.2 Método da Base de Schiff

O segundo método de imobilização via ligação covalente, foi o método da base Schiff, que seguiu a metodologia proposta por Luo et al. (2002) e Mallik et al. (2004) com adaptações.

Neste método a coluna foi inicialmente hidratada e enxertada com 30 mL de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a coluna foi lavada com 30 mL de água ultrapura na vazão de  $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ . Posteriormente foi passado 40 mL de ácido periódico ( $\text{HIO}_4$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em água destilada com baixa vazão ( $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ) por 1 hora. O criogel foi novamente lavado com 30 mL de água ultrapura. Foi preparado uma solução tampão de citrato de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 6,4), e 30 mL desta circulou na coluna. Logo após, foi preparada uma solução  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ConA (Sigma) no tampão, adicionado de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ) e cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), todos na concentração de  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 1% (m/m) de glicose e cianoborohidreto de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  que é um agente redutor seletivo. 20 mL dessa solução foram recirculados na coluna em temperatura ambiente por 16 horas. Após essa etapa, a lectina imobilizada foi quantificada por diferença na solução de ConA antes e após a recirculação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. Em continuidade, a coluna foi lavada com 30 mL do tampão citrato. Sequencialmente circulou solução de etanolamina ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no tampão citrato adicionado de cianoborohidreto de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  para bloquear os grupos aldeídos restantes (passou-se 20 mL, a solução ficou em repouso na coluna por 30 minutos, e então passou-se os 20 mL restantes). Posteriormente, a coluna foi lavada com 30 mL do tampão citrato (pH 6,4), 30 mL de água destilada, e por fim 30 mL do tampão fosfato (pH 7,2).

### 3.2.3 Método do Glutaraldeído

Para a imobilização da ConA utilizando o método do glutaraldeído, foram utilizadas metodologias adaptadas propostas por Kumar et al., (2003) e Petro et al., (1996).

O procedimento de lavagem inicial da coluna cromatográfica seguiu o mesmo princípio da ativação pelo método epóxi citado anteriormente para sequência etanol, etanol-água e água. Finalizada essa etapa, circulou-se 30 mL de tampão carbonato  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 9,5). Tendo sido escoado esse fluido, foi aplicado 40 mL de etilenodiamino  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  no tampão carbonato em recirculação forçada por 2 horas, repouso por 30 minutos e recirculado por mais 2 horas. A coluna foi então lavada com água deionizada até pH neutro. Posteriormente, foi aplicado 30,0 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,2). A sequência foi continuada com solução de glutaraldeído 5% (m/v) em tampão fosfato, onde 40 mL foi

recirculada por 2,5 horas, pausada por 30 minutos e recirculada novamente por 2,5 horas. Findada esta etapa, 20 mL de solução 2mg.mL<sup>-1</sup> de ConA (Sigma) no tampão fosfato, adicionado de CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>, todos na concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 1% de glicose foram recirculadas por 16 horas. Após essa etapa, a lectina imobilizada foi quantificada nas mesmas condições de análise citadas nas metodologias anteriores. Em continuidade a ativação, a coluna cromatográfica foi lavada com 40 mL de tampão carbonato, seguido de 30 mL de solução de borohidreto de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em tampão carbonato, sendo submetido a recirculação por 1,5 horas, repousada na coluna por 30 minutos e recirculada por mais 1,5 horas, mantendo a vazão constante de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Logo após, a coluna foi lavada com 100 mL de água deionizada, 40 mL de etanolamina 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em tampão carbonato, e novamente lavada com água para remoção do excesso da etanolamina, finalizando a ativação com 30 mL de tampão fosfato.

### **3.2.4 Método do Etilenodiamina**

Para esse método de imobilização da lectina, repetiu-se a terceira metodologia, excluindo a etapa de adição do glutaraldeído, para que fosse observado a capacidade adsortiva da coluna macroporosa sem a inclusão de braços espaçadores. O criogel epóxi-ativado é convertido a uma forma amina-ativado pela reação dos grupos epóxi com o reagente etilenodiamina (PETRO et al., 1996) e assim os radicais carboxila da ConA são adsorvidos na matriz sólida por meio dos grupos ligantes. Trata-se de um método de aminação química a partir da ativação dos grupos carboxílicos presentes na superfície da proteína por meio da reação com o etilenodiamina.

### **3.2.5 Método da Dihidrazida Adípica**

O método de imobilização pela dihidrazida do ácido adípico seguiu metodologia descrita por Ruhn et al., (1994) com adaptações. O procedimento foi iniciado lavando a coluna monolítica com 30 mL de etanol anidro na vazão de 2 mL.min<sup>-1</sup> (foi passado 15 mL do solvente, aguardou 10 minutos em repouso e a lavagem foi continuada com as 15 mL restantes), na sequência, o solvente foi diluído em água na proporção 1:1 sob as mesmas condições, finalizando a lavagem com 30mL de água. Logo após, circulou-se na coluna 40 mL de tampão citrato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 3,0), seguido de 40 mL da solução do agente reticulante dihidrazida adípica à 0,2 mol.L<sup>-1</sup> no referido tampão com recirculação contínua por 4 horas. Feito isso, os criogéis foram mantidos imersos na solução em repouso à 50 °C por 16 horas. Transcorrido o tempo, a solução foi removida da coluna com o auxílio da bomba peristáltica e o criogel foi lavado com 100 mL de água, seguido de 40 mL do tampão fosfato 0,1M (pH

7,2). Posteriormente foi aplicado na coluna 20 mL da solução de proteína com sais no tampão fosfato com recirculação. A solução foi composta de ConA ( $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) na solução tampão, adicionado de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ , todos na concentração de  $0,1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 1% de glicose, por 16 horas. Decorrido o tempo, a coluna foi lavada com 40 mL do tampão carbonato  $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 9,5). Foi preparada então uma solução de borohidreto de sódio ( $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no referido tampão e 40 mL desta foi percolada ao longo da coluna à vazão de  $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com reciclo por 1,5 horas, repouso por 30 minutos e reciclo por mais 1,5 horas. Ao findar, a coluna foi lavada novamente com 100 mL de água e 40mL do tampão carbonato com etanolamina ( $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Finalizando a ativação, a coluna foi novamente lavada com mais 100 mL de água para retirar o excesso da etanolamina, e por fim, com 40mL do tampão fosfato  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,2). Os criogéis foram então guardados imersos no tampão fosfato em condições de refrigeração, até a caracterização.

### **3.2.6 Incremento dos grupos epóxi**

Após testar as 5 metodologias acima descritas, e avaliar a que obteve maior taxa de imobilização de ConA, foi avaliada uma última metodologia, que consistiu em incrementar a quantidade de radicais epóxi na coluna monolítica. Para tanto, o procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna macroporosa com 100 mL de água destilada, seguida de 40 mL de solução de borohidreto de sódio  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  em tampão carbonato pH 9,5 (passou-se 20 mL da solução na vazão de  $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , esta foi mantida em repouso por 30 minutos, logo após passou-se os 20 mL restantes). Feito isso, a coluna foi lavada com  $\text{NaOH}$   $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  em água destilada nas mesmas condições de escoamento da solução anterior. Em seguida, foi misturada à solução de  $\text{NaOH}$  0,5 M e epicloridrina em concentração igual a 2%. A epicloridrina é o agente de reticulação que irá aumentar os grupos epóxi na coluna. Esta solução foi aplicada em recirculação contínua por 16 horas. Finalizou-se esta etapa lavando a coluna com água até alcançar pH neutro, para então se iniciar a etapa de ativação com a metodologia que apresentou melhores resultados.

### **3.3 Avaliação física, química e hidrodinâmica dos criogéis funcionalizados**

A análise dos aspectos físicos (porosidade e tamanho de poros), hidrodinâmicos (permeabilidade ao escoamento e distribuição de tempos de residência) e químicos (grau de enxertia, número de sítios ativos) dos criogéis vem sendo relatada por diversos autores, e os resultados discutidos com relação às modificações nos processos de obtenção das colunas supermacroporosas, bem como os métodos de enxertia testados em relação à interação dos mesmos (SAVINA et al., 2005a e 2005b; YAO et al., 2006a; CHEN et al., 2008).

Para a caracterização das colunas supermacroporosas produzidas, foram selecionados 8 criogéis ativados, de cada uma das 6 distintas metodologias de enxertia conforme as metodologias descritas a seguir.

### 3.3.1 Capacidade de Inchamento

A capacidade de inchamento do criogel ( $S_{w/w}$ ), que corresponde à quantidade da água absorvida por massa de criogel desidratado, foi determinada utilizando os criogéis produzidos, secos em estufa à  $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , até peso constante e resfriados em dessecador. Essas amostras tiveram as massas determinadas em balança analítica. Em seguida, os monólitos poliméricos foram hidratados por imersão em 50 mL de água deionizada à temperatura ambiente por 24 horas e suas massas foram novamente registradas. Para este cálculo foi utilizada a Equação 1 (SAVINA et al., 2005a):

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

Onde S é a capacidade de inchamento (g H<sub>2</sub>O/ g de criogel seco) e  $m_w$  e  $m_d$  são as massas (g) da amostra em peso úmido e desidratado, respectivamente.

Para essa análise foram utilizados 2 monólitos ativados por cada técnica, sendo os resultados obtidos submetidos à ANOVA e teste Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

### 3.3.2 Grau de expansão

Os criogéis enxertados foram desidratados em estufa à  $(60 \pm 2 ^\circ\text{C})$  e resfriados em dessecador. Estes tiveram seus pesos determinados em balança analítica. Posteriormente foram saturados com água deionizada durante 24 horas para subsequente análise, que consistiu em imergir o criogel saturado em uma proveta graduada contendo água deionizada de volume  $V_1$ , previamente conhecido, e após imersão da amostra na proveta, o novo volume,  $V_2$ , foi registrado. O grau de expansão (ED) foi calculado utilizando-se a Equação 2.

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

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

Para essa análise também foram utilizados dois monólitos ativados por cada técnica, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância e teste Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

### 3.3.3 Porosidade

A porosidade do monólito ( $\varphi$ ) foi estimada através da determinação do conteúdo de água livre presente e do volume do criogel em uma dada amostra (PLIEVA et al., 2004a e 2004b; ERZENGIN et al., 2011). Os criogéis enxertados, foram desidratados em estufa à ( $60 \pm 2$  °C), resfriados em dessecador e tiveram suas massas verificadas por meio da pesagem. Logo após, estes monólitos foram colocados em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio, onde foram mantidos durante 15 dias, para que a umidade relativa do ar permanecesse próxima a 98% à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) (GREENSPAN, 1977). Ao fim desse período, as massas foram novamente registradas. Posteriormente, estes foram imersos em béqueres contendo 100 mL de água deionizada por 24 horas, para que fosse alcançada a completa saturação para subsequente análise. Transcorrido esse tempo, os monólitos tiveram suas massas registradas novamente. A presente análise objetiva determinar a quantidade de água de ligação do criogel (PLIEVA et al., 2004a e 2004b).

Em seguida, os criogéis foram delicadamente comprimidos com as mãos e secos através de sucessivas rolagens em lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, então suas massas foram novamente determinadas.

A fração de macroporos,  $\varphi_M$  (poros com tamanho  $> 1$   $\mu\text{m}$ ), fração de meso e microporos,  $\varphi_m$  (poros com tamanho  $< 1$   $\mu\text{m}$ ), fração de água ligada ( $\varphi_{wb}$ ), fração do polímero seco ( $\varphi_d$ ) e porosidade total ( $\varphi_T$ ) dos criogéis de pAAm foram calculadas a partir das respectivas Equações 3 a 7.

A massa do criogel hidratado  $m_w$  (kg), a massa do criogel comprimido  $m_c$  (kg), a massa do criogel desidratado  $m_d$  (kg) em estufa até peso constante, e a massa do criogel com água de ligação  $m_{wb}$  (kg), foram determinadas em balança analítica, e utilizadas nas equações que seguem:

$$\varphi_M = \frac{(m_w - m_c)}{m_w} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{(m_c - m_{wb})}{m_w} \quad (4)$$

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

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

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

Para essa análise foram utilizados dois monólitos ativados por cada técnica, sendo os resultados obtidos submetidos à ANOVA e teste Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

### **3.3.4 Determinação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura**

Com o intuito de avaliar a morfologia dos criogéis produzidos, foram realizados ensaios de Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) das colunas cromatográficas antes e após a enxertia. A microscopia eletrônica de varredura possibilita a visualização da microestrutura de polímeros, sendo um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de materiais sólidos (DEDAVID et al., 2007). As superfícies para análise foram retiradas a partir de um corpo de prova de cada método de ativação, estas foram seccionadas manualmente e coladas com fitas adesivas no suporte de porta-amostras do microscópio (*stub*) e metalizadas com uma fina camada de ouro. Em seguida foram levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, Modelo DSM940).

### **3.3.5 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier**

Os espectros na região do infravermelho, por apresentar grande potencial para determinação dos grupos funcionais, foi utilizado para avaliar a imobilização da ConA nas colunas macroporosas produzidas, uma vez que todas as substâncias moleculares orgânicas e inorgânicas absorvem radiação na região do infravermelho (GOMES, 1986). Colunas modificadas por todas as técnicas avaliadas foram desidratadas, transformadas em pó e lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  em um espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo Vertex 70.

### **3.3.6 Permeabilidade ao escoamento**

A permeabilidade ao escoamento das colunas produzidas foi estimada baseando-se na Lei de Darcy. A análise consistiu em equilibrar as colunas (5,5cm de altura e 1,2 cm de diâmetro) com 50 VC de água deionizada e submetê-lo à diferenças de pressão hidrostática dentro da coluna entre 8,8 kPa e 15,6 kPa (a altura da coluna de água sobre o monólito variou entre 90 e 160 cm, com precisão de  $\pm 0,5$  cm).

Os dados de pressão *versus* vazão do fluido foram ajustados à equação de Darcy para escoamento em meios porosos (GUIOCHON, 2007), a partir dos dados experimentais obtidos das duas repetições e três replicatas.

Desta forma, a permeabilidade hidráulica,  $k_w$ , foi determinada usando a lei de Darcy, representada pela Equação 8.

$$k_w = \frac{Q_w \mu_w L}{\Delta P_w A} \quad (8)$$

Onde:  $K_w$  é a permeabilidade hidráulica ( $m^2$ );  $Q_w$  é a vazão volumétrica da água através da coluna ( $m^3.s^{-1}$ ),  $\mu_w$  é a viscosidade da água ( $Pa.s^{-1}$ ),  $L$  é o comprimento da coluna (m),  $A$  é a área da secção transversal da coluna ( $m^2$ ) e  $\Delta P_w$  é a queda da pressão hidrostática sobre a coluna (Pa).

### 3.4 Potencial de uso das colunas produzidas

A fim de se avaliar o potencial de uso das colunas produzidas para a purificação de lectinas, foram selecionadas aquelas cujo método de ativação apresentou os melhores resultados para ensaios de adsorção e reutilização.

Os ensaios de adsorção foram conduzidos com soluções de ConA a 2,0 mg/mL em tampão fosfato 20 mol/L pH 7,2. As colunas afinidade foram lavadas com água, e condicionadas com solução tampão fosfato. Logo após, foram percoladas pelos extratos aquosos em recirculação *overnight* à temperatura ambiente. Em seguida, as colunas foram lavadas com tampão para a retirada do material não-adsorvido, seguido da eluição do material adsorvido, de modo isocrático, com solução de glicose ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão. Terminada a eluição, a coluna foi reequilibrada com a solução tamponante, reiniciando-se o processo. Este procedimento foi repetido por cinco vezes nas mesmas colunas (foram analisadas duas colunas), a fim de se verificar perda ou não da eficiência da coluna com o tempo de uso.

A capacidade adsorptiva das colunas testadas foi medida a partir da diferença da ConA quantificada nas soluções que passaram por elas. As soluções de proteína tiveram suas concentrações determinadas por leitura direta em espectrofotômetro a 280 nm.

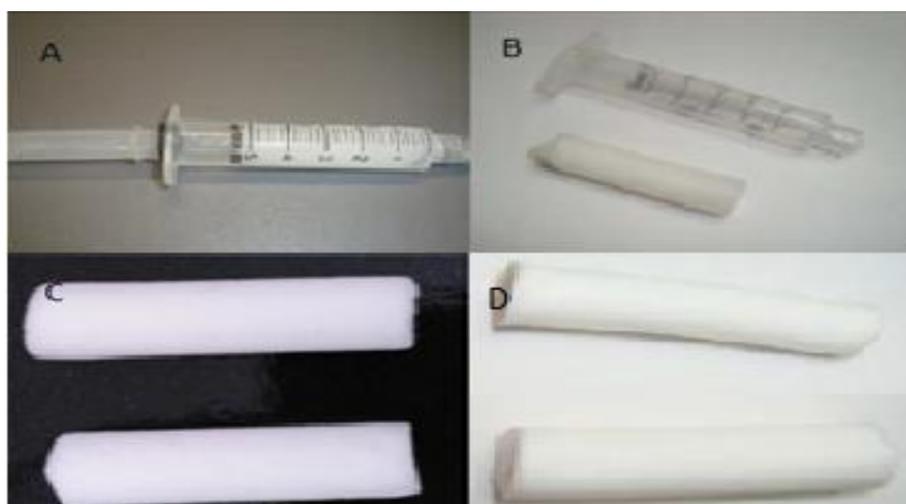
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criogéis produzidos a partir do processo de criogeleificação da mistura de monômeros reticulantes com o agente porogênico apresentaram uma estrutura esponjosa, rígida e uniforme quando seco, elástica e de aspecto gelatinoso quando hidratados, com coloração esbranquiçada e forma cilíndrica (assumindo a forma do molde utilizado), como pode ser verificado na Figura 9. A partir das análises realizadas, verificou-se que este apresentou também características desejáveis, tais como alta porosidade e alta permeabilidade, como foi observado também na literatura por pesquisadores em criogéis

obtidos com diferentes formulações (ARVIDSSON et al., 2002; PERSSON et al., 2004; YAO et al., 2006).

Os criogéis podem ser secos (condição de armazenamento) e reidratados (condição de uso) sem perder suas propriedades originais. A interação dos monômeros de acrilamida conferiu ao suporte boa biocompatibilidade e robustez mecânica, abrindo novas perspectivas para a concepção desses materiais macroporosos para utilização em detecção analítica e captura seletiva de moléculas de interesse.

**Figura 9:** Criogel de pAAm-AGE produzido (A) Congelado, (B) Refrigerado (C) Hidratado (D) Desidratado.



Fonte: Imagens da pesquisa.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados experimentais obtidos para a imobilização da ConA utilizando-se os diferentes métodos de ativação. Verifica-se inicialmente que entre os primeiros cinco métodos avaliados, exceto para o método do glutaraldeído, os demais não apresentaram diferenças estatísticas entre si para a quantidade de ConA imobilizada ( $p > 0,05$ ). Assim sendo, no método da epícloridrina para o incremento de radicais epóxi, a ativação foi continuada seguindo-se a mesma metodologia utilizada no método do glutaraldeído. Neste sentido, verificou-se que o uso da epícloridrina permitiu que a quantidade de ConA imobilizada fosse maior que utilizando-se apenas o método do glutaraldeído, diferindo significativamente dele. Tais resultados indicam a eficácia do uso de braços espaçadores no processo de ativação.

**Tabela 5:** Resultados de ativações das colunas monolíticas supermacroporosas

<b>Ativações</b>	<b>Médias (mg de Conc/ g de criogel)</b>
Método Époxi	20,34 <sup>b</sup> ± 6,81
Método da Base de Schiff	26,54 <sup>b</sup> ± 8,90
Método da Etilenodiamina	28,95 <sup>b</sup> ± 3,43
Método da Dihidrazida Adípica	19,46 <sup>b</sup> ± 2,69
Método do Glutaraldeído	130,83 <sup>a</sup> ± 18,84
Método da Epicloridrina*	170,77 ± 17,79

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

\* Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de Student quando comparado ao método do glutaraldeído.

Fonte: Dados da pesquisa.

No método do epóxi, que envolve o ataque nucleofílico dos grupos amins das proteínas diretamente sobre os grupos epóxi do criogel, a imobilização é dada por ligação covalente, que promove uma imobilização estável dos ligantes na matriz. Embora a quantidade de ligantes tenha sido pequena quando comparado com os outros métodos de imobilização amina-disponíveis, este método ainda é bastante usado por ser simples e de rápida execução (GUPALOVA et al., 2002; OSTRYANINA et al., 2002; JIANG et al., 2005; MALLIK; HAGE, 2006; KALASHNIKOVA; TENNIKOVA, 2007).

O método da Base de Schiff obteve maior quantidade de ConA imobilizada, quando comparado ao método do epóxi, porém observa-se a partir da análise estatística que a diferença foi não significativa. Contudo, este método tem como inconveniente a necessidade dos agrupamentos amina na superfície da biomolécula e o uso de agentes redutores que podem reduzir alguns grupos sulfidrilos (-SH) da proteína imobilizada.

Entre os processos de imobilização de proteínas, um dos grupos funcionais mais utilizados é o etilenodiamina devido a sua funcionalidade (SILVA et al., 2012). O uso deste reagente promove a ligação de um grupo amino da etilenodiamina aos grupos aldeídicos gerados no suporte (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996), reação que se assemelha ao princípio da base de Schiff. Desta maneira, foi verificado que, assim como os métodos já mencionados, este também apresentou baixa capacidade de imobilização da ConA nas condições estudadas. O que pode ser justificado pelo alto efeito de impedimento estérico.

Outro método de imobilização testado foi o da dihidrazida adípica. A partir dos resultados obtidos utilizando-se esse método de ativação, verificou-se que a quantidade de ConA foi muito baixa, semelhante ao método epóxi.

Diferente dos outros métodos testados, a ativação da coluna polimérica com a inclusão do glutaraldeído, mostrou-se eficiente, sendo a quantidade de ConA imobilizada

significativamente superior aos métodos já mencionados, apresentando valores em acordo com outros pesquisadores encontrados na literatura (PETRO et al., 1996; LUO et al., 2002), revelando-se desta forma como uma alternativa potencial. Os resultados encontrados com esse método de ativação indicaram que o uso de braços espaçadores promove melhorias na funcionalização do suporte monolítico. O glutaraldeído é uma pequena molécula com alta reatividade, que promove ligação estável entre os grupos amina de suportes e resíduos de amina de proteínas (ELKAOUTIT et al., 2011). O fato do glutaraldeído poder reagir com os grupos amina terminal, grupos hidroxilas e sulfetos, beneficiou significativamente o grau de imobilização da lectina estudada, sendo justificado pela reação com o radical reativo. A ativação do criogel pelo referido agente reticulante converte o suporte da estrutura epóxi-ativado para amina-ativado, pela reação dos grupos epóxi com o reagente etilenodiamina (PETRO et al., 1996), este por sua vez reagiu com o aldeído (glutaraldeído) e produziu uma coluna supermacroporosa aldeído ativada que se ligou aos grupos aminas das lectinas, formando nova base de Schiff. Em seguida, ocorreu a redução e estabilização dessa base de Schiff por meio do uso de um agente redutor. Devido a um maior espaçamento entre a macromolécula imobilizada e a superfície do criogel, este método de imobilização revelou-se útil para evitar efeitos de impedimento estérico (LUO et al., 2002). Em outras palavras, o uso dos braços espaçadores durante ativação do criogel beneficiou a adsorção, uma vez que este permitiu novas possibilidades de sítios de ligação, com maiores distância entre eles, não comprometendo desta forma, a ligação das biomoléculas de interesse na coluna supermacroporosa.

O uso da epícloridrina para o aumento de radicais epóxi na superfície dos criogéis antes da utilização de um método de ativação, foi benéfica nas condições estudadas. Com sua utilização antes do ativação pelo método do glutaraldeído, foi possível verificar que a quantidade de ConA imobilizada aumentou significativamente, o que ocorreu devido a um maior número de agrupamentos epóxi disponíveis na superfície do monólito, para reagirem com o os aldeídos da solução, formando mais braços espaçadores, o que reduz consequentemente os efeitos de impedimento estéricos.

#### **4.1 Caracterização das matrizes de criogel**

##### **4.1.1 Capacidade de Inchamento e Grau de expansão**

Os resultados obtidos para as análises de caracterização das colunas monolíticas supermacroporosas produzidas a partir dos diferentes métodos de ativação são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Capacidade de inchamento e grau de expansão das colunas

<b>Método de ativação</b>	<b>S (kg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ED (L.kg<sup>-1</sup>)</b>
Epóxi	13,96 <sup>b</sup> ± 2,57	15,72 <sup>b c</sup> ± 3,10
Base de Schiff	17,51 <sup>a</sup> ± 2,76	19,16 <sup>a</sup> ± 3,16
Etilenodiamina	18,64 <sup>a</sup> ± 2,09	15,36 <sup>b c</sup> ± 1,86
Dihidrazida Adípica	15,11 <sup>b</sup> ± 1,22	16,79 <sup>a b</sup> ± 1,55
Glutaraldeído	14,26 <sup>b</sup> ± 1,00	15,36 <sup>b c</sup> ± 0,97
Epicloridrina	7,70 <sup>c</sup> ± 0,81	13,38 <sup>c</sup> ± 1,19

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Fonte: Dados da pesquisa.

Verificou-se que os criogéis apresentaram uma massa quando hidratados quase 20 vezes superior ao seu peso desidratado, indicando grande capacidade de retenção de água devido à sua estrutura porosa, com muitos espaços vazios em seu interior.

Constatou-se que os resultados obtidos para a capacidade de inchamento, que reflete o grau de hidratação da matriz polimérica, esteve dentro da faixa observada na literatura para criogéis ativados por diferentes métodos, entre 3 a 15 kg<sub>de água</sub> /kg<sub>de criogel desidratado</sub> (BERELI et al., 2012; ÇIMEN; DENIZLI, 2012; UYGUN et al., 2012). Os criogéis ativados com os métodos da Base de Schiff e Etilenodiamina apresentaram médias um pouco superiores às demais, sendo estas semelhantes ao encontrado por Savina et al. (2005) em um suporte cromatográfico de poliacrilamida produzido também com 6% de monômeros. Alguns autores relatam ainda valores menores para a capacidade de inchamento dos criogéis produzidos, contudo torna-se válido ressaltar que nestes, as concentrações de monômeros também foram inferiores, variando entre 2,8 a 6 g·100g<sup>-1</sup> (ARVIDSSON et al., 2003; ARVIDSSON et al., 2002; ERGÜN et al., 2007; DERAZSHAMSHIR et al., 2008). Ressalta-se, ainda, que quanto maior for a capacidade de inchamento, maior a tendência das colunas serem mais maleáveis (após hidratadas) e, provavelmente, com menor resistência mecânica (CARVALHO, 2010), ou seja, o fato de ter uma capacidade de inchamento baixa após ativação, beneficia o suporte cromatográfico com relação à sua resistência mecânica, principalmente em pressões mais altas de escoamento. Desta maneira, verifica-se que o método da epicloridrina apresentou o menor valor para a capacidade de inchamento quando comparado aos demais métodos de ativação, proporcionando maior estabilidade operacional. Tal característica possivelmente é justificada pelo aumento da hidrofobicidade do monólito com o incremento dos grupos epóxi, repelindo moléculas de água, dificultando a sua absorção pelos monólitos.

Verificou-se que para o grau de expansão, relação entre a massa do criogel desidratado em condição de armazenamento e o volume que o mesmo ocupa em condições operacionais

(quando hidratado), que os métodos de ativação não tiveram tanta variação quanto a capacidade inchamento afetaram. Dada a natureza porosa dos monólitos produzidos, estes apresentam, mesmo desidratados, uma elevada razão entre o volume ocupado e sua massa, daí os valores de ED sempre superiores a  $10 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$  (ou uma densidade relativa sempre menor que  $0,1 \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os monólitos com maior capacidade de inchamento são mais maleáveis e flexíveis, apresentando conseqüentemente maior aumento de volume ao serem hidratados, por isso apresentando também maiores valores para o grau de expansão, sendo o contrário também verdadeiro.

#### 4.1.2 Porosidade

A análise dos aspectos físicos dos criogéis foi realizada para melhor entendimento sobre a distribuição da porosidade e do tamanho dos poro. Os resultados encontrados para cada método de ativação aparece discriminado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Porosidade total e demais frações constituintes dos monólitos produzidos.

Métodos	$\varphi_M$	$\varphi_m$	$\varphi_{wb}$	$\varphi_d$	$\varphi_T$
<b>Epóxi</b>	$0,727^a \pm 0,03$	$0,195^c \pm 0,02$	$0,009^{bc} \pm 0,005$	$0,057^{bc} \pm 0,008$	$0,932^a \pm 0,007$
<b>B. de Schiff</b>	$0,764^a \pm 0,05$	$0,160^c \pm 0,02$	$0,020^b \pm 0,015$	$0,055^{bc} \pm 0,017$	$0,925^a \pm 0,031$
<b>Etilenod.</b>	$0,719^a \pm 0,02$	$0,217^{bc} \pm 0,02$	$0,011^{bc} \pm 0,003$	$0,045^c \pm 0,005$	$0,941^a \pm 0,003$
<b>D. Adípica</b>	$0,675^b \pm 0,03$	$0,256^{ab} \pm 0,03$	$0,005^c \pm 0,001$	$0,062^{bc} \pm 0,005$	$0,921^a \pm 0,006$
<b>Glutarald.</b>	$0,639^b \pm 0,05$	$0,270^{ab} \pm 0,05$	$0,009^{bc} \pm 0,002$	$0,065^b \pm 0,004$	$0,911^a \pm 0,004$
<b>Epíclorid.</b>	$0,498^c \pm 0,02$	$0,303^a \pm 0,02$	$0,082^a \pm 0,007$	$0,115^a \pm 0,011$	$0,801^b \pm 0,018$

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.  
 $\varphi_M$ : fração de macroporos;  $\varphi_m$ : fração de meso e microporos;  $\varphi_{wb}$ : fração de água ligada;  $\varphi_d$ : fração do polímero seco;  
 $\varphi_T$ : Porosidade total

Fonte: Dados da pesquisa.

A fração de macroporos dos criogéis ativados pelos diferentes métodos variou em torno de 49% à 76%. Por esses poros passa a maior parte do fluido que escoar pelos canais interligados dos criogéis. Estes valores encontram-se próximos aos reportados na literatura para criogéis e outros monólitos orgânicos (LI et al., 2009, GUAN e GUIOCHON, 1996). No entanto, encontra-se ainda autores que referenciam a faixa padrão variando entre 70 à 85% para criogéis preparados com os mesmos compostos, porém, por vezes, com concentrações diferentes e métodos de ativação diferentes (YAO et al, 2006a; YAO et al, 2006b; YAO et al, 2007a; YAO et al, 2007b; CARVALHO, 2010; YAN et al, 2011). Esta variação percentual pode ocorrer devido à diferença dos cálculos realizados para tal parâmetro, onde esses autores consideram a água presa no interior dos microporos e a água livre nos macroporos como uma

única análise de porosidade. Estes retiram a água dos macroporos de forma mecânica (comprimindo o criogel) e a do interior dos microporos por meio do vácuo, (BERELI et al., 2012; ÇIMEN e DENIZLI, 2012; UYGUN et al., 2012), o que não foi realizado no presente trabalho.

Verifica-se que os métodos que obtiveram maior fração de macroporos, foram os que tiveram menor taxa de imobilização de biomoléculas, tais como o método da base de Schiff, método épxi, estando dessa forma os poros desobstruídos. Os criogéis que obtiveram maior taxa de imobilização de biomoléculas, método da epiclóridrina e do glutaraldeído, tiveram seus macroporos em grande parte preenchidos com as macromoléculas reticuladas,

Com relação a fração de mesoporos e microporos verifica-se que a média geral não variou muito entre os métodos testados. Entretanto, os dados dessa análise merecem uma devida atenção, pois muitos autores ao fazerem análise de porosidade de criogel desconsideram essa fração de meso e microporos, caracterizando a porosidade apenas pela fração de macroporos (YAO et al., 2007; LOZINSKY et al., 2003). Tal consideração não é errada, dada a importância dos macroporos para os criogéis e suas aplicações com macromoléculas, células inteiras e fluidos não clarificados, contudo, por ter apresentado médias relevantes, é válido dar uma atenção a essas demais frações de porosidades, uma vez que ao se trabalhar com moléculas de dimensões menores, estas podem ter acesso a essas regiões, o que pode gerar dúvidas nesse perfil de caracterização.

Quanto à análise de água ligada, verifica-se que o percentual em geral foi baixo, porém houve significativa variação entre os métodos de ativação, portanto, pode-se inferir que para os métodos onde a fração de água ligada foi muito baixa (< 2%), é provável que os pequenos poros tenham sido obstruídos durante a ativação de forma que a passagem do líquido circulante se tornou quase inexistente, o que não ocorreu no método da epiclóridrina, onde foi obtida uma média de 8% de água ligada, valor muito próximo aos reportados na literatura em criogéis de poliácridamida também, onde a média foi de 9,6% (FIDELIS, 2011).

Para o criogel seco, verifica-se que houve também uma equivalência entre os métodos testados, existindo uma divergência apenas para o método da epiclóridrina, que pode ser explicado baseado no fato de que alguns poros podem ter sido completamente preenchidos durante a ativação, fazendo com que este apresente uma maior fração de sítios preenchidos e conseqüentemente, um maior percentual de massa de polímero seco. O processo de imobilização de monômeros aumenta consideravelmente a densidade dos grupos funcionais de superfície, gerando uma maior capacidade adsorptiva para a coluna. Além disso, ocorre um aumento de área superficial a medida que esses ligantes formam estruturas em forma de cerdas ou tentáculos (ARRUA et al., 2009).

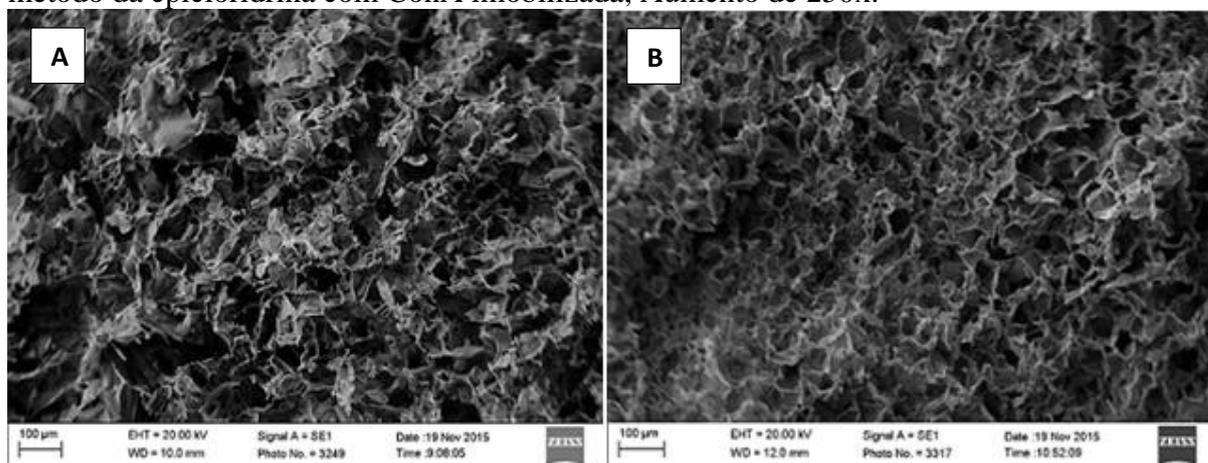
Verificou-se ainda que, o valor obtido para a porosidade total foi próximo, entretanto, na ativação com o glutaraldeído, a estrutura dos poros foi mais preenchida quando comparada com os demais métodos de ativação, e este obteve os poros mais obstruídos após ser incrementado com a epiclorigrina.

#### 4.1.3 Estrutura dos poros por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das colunas macroporosas produzidas são apresentadas na Figura 9. A microscopia eletrônica de varredura é a técnica mais recorrente para se avaliar a distribuição e formação dos poros no interior da coluna cromatográfica (UYGUN et al.,2012)

A partir das micrografias apresentadas na Figura 10 infere-se que o processo de ativação dos criogéis não afetou sua estrutura macroporosa, o que é uma característica positiva, uma vez que é desejável que a coluna mantenha sua estrutura porosa com distribuição de poros uniformes, paredes lisas, e variação de diâmetro entre 10  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ . Este tamanho dos poros confirma que a estrutura do criogel supermacroporoso permite a passagem de macromoléculas como células microbianas, fragmentos celulares, bem como soluções não clarificadas (PLIEVA et al., 2008; GUIOCHON, 2007).

**Figura 10:** Micrografias dos criogéis. (A) criogel sem ativação; (B) coluna ativada pelo método da epiclorigrina com ConA imobilizada; Aumento de 250x.

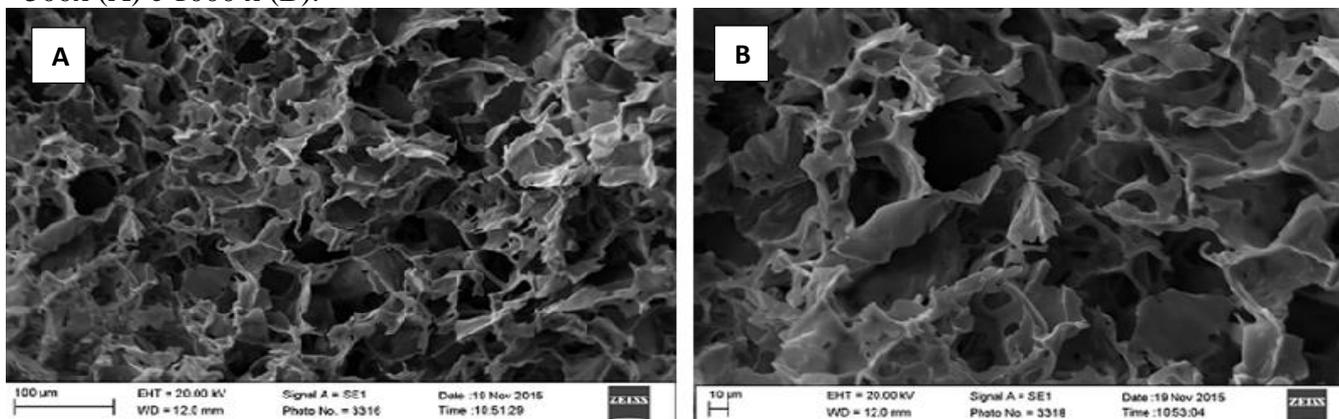


Fonte: Dados da pesquisa

As micrografias apresentadas na Figura 11 mostram a estrutura do criogel com ConA imobilizada. Os entrelaçamentos físicos da lectina imobilizada com o polímero proporcionam favoráveis características adsorptivas sem comprometer a estrutura primária do criogel, contudo, é válido ressaltar que a concentração de biomoléculas imobilizadas é um fator importante na análise das micrografias e disposição dos poros, uma vez que aumentada a concentração destas biomoléculas, há formação de particulados sobre a estrutura dos poros,

reduzindo consequentemente a distribuição de zonas porogênicas, a quantidade de microporos, que por sua vez, pode ser obstruído, o diâmetro médio dos meso e macroporos, bem como a conectividade entre eles e a estrutura das paredes, que podem se alargar.

**Figura 11:** Criogel com ConA imobilizada utilizando-se o método com epiclorigrina. Aumento de 500x (A) e 1000 x (B).



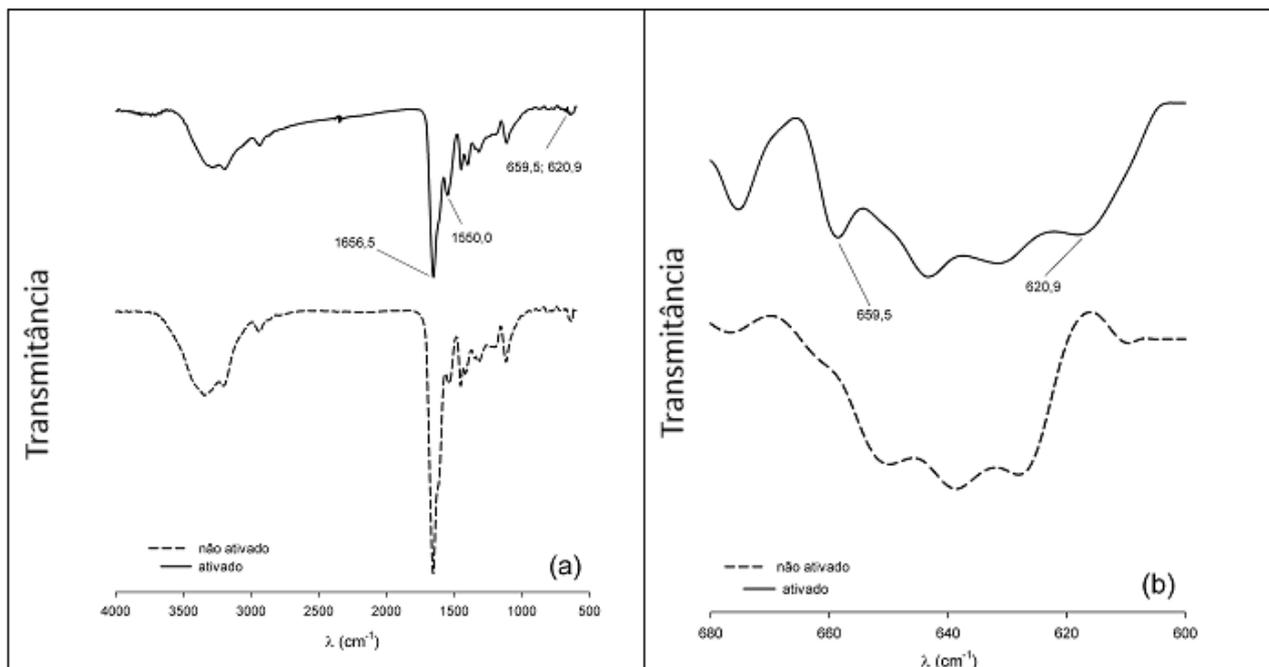
Fonte: Dados da pesquisa.

Durante a produção do criogel sob condições de congelamento, os cristais de gelo formados atuaram como agentes porogênicos, e estes foram de grande importância para o tamanho e distribuição dos poros ao longo da coluna. A presença desses poros é essencial para permitir o escoamento de fluidos através do material sob uma pressão controlada. Além disso, apresentam condições favoráveis à transferência de massa de substratos e solutos (ARVIDSSON et al., 2003; YAO, K. et al., 2006). As micrografias apresentadas, permitem-nos verificar a estrutura dos criogéis com formação de poros bem distribuídos e interconectados com predominância de macroporos, estando em acordo com o observado por outros autores (YAO et al., 2006b e 2007).

#### 4.1.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

Na Figura 12 é apresentado o espectro de FTIR do criogel ativado pelo método com epiclorigrina com ConA imobilizada comparado ao criogel sem ativação. Pode-se observar que a mais intensa banda de vibração formada é característica do grupamento amida, observada próximo à região de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , sendo característica do gel de poli(acrilamida). Já a banda observada na região de  $1550\text{ cm}^{-1}$  na coluna ativada pode se referir aos grupos amina da ConA imobilizada (estiramento  $\text{-NH}_2$ ). Tal evidencia é reforçada pelas bandas observadas em  $620,9\text{ cm}^{-1}$  e  $659,5\text{ cm}^{-1}$  que podem estar associadas às ligações dissulfídicas (estiramento C-S) do aminoácido metionina existente na estrutura da ConA.

**Figura 12:** Espectro de FTIR dos criogéis não ativado e com ConA imobilizado pelo método com epicloridrina. (a) Espectro completo: região de comprimento 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) Destaque para a região do espectro de 680-600  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.1.5 Permeabilidade ao escoamento

A partir do ajuste da equação da lei de Darcy aos resultados experimentais da vazão, foram obtidos dos coeficientes angulares os valores de permeabilidade ao escoamento das colunas produzidas. Estes estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Permeabilidade ao escoamento para as colunas produzidas pelos diferentes métodos de ativação.

Métodos	$k_w$ ( $\times 10^{11} \text{ m}^2$ )
Epóxi	1,38
Base de Schiff	3,32
Etilenodiamino	1,04
Dihidrazida	0,35
Glutaraldeído	0,92
Epicloridrina	1,46

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os 6 métodos analisados, a ativação da coluna pelo método da Dihidrazida, foi o que obteve menor média de permeabilidade, o que pode ser justificado pela formação de muitos micro e mesoporos e estes tenham sido inativados durante a imobilização das lectinas

por efeito dos impedimentos estéricos das biomoléculas nos sítios de ligação dos macroporos, o fato dos poros estarem preenchidos ao longo do criogel não permitiu que a água pudesse fluir de forma mais rápida, o que justifica a maior resistência ao escoamento deste, dentre todos os métodos.

Estabelecendo uma relação entre a porosidade para com a permeabilidade ao escoamento, justifica-se também os resultados encontrados para os métodos epóxi e etilenodiamina, ambos tiveram médias de permeabilidade superiores ao método da Dihidrazida, e portanto menor resistência ao escoamento, assim como também tiveram grande formação de macroporos e baixa formação de meso e microporos ao longo do suporte, tendo facilitada a dispersão do fluído ao longo da coluna. O método da base de Schiff foi o que apresentou o melhor resultado para permeabilidade, indo ao encontro das relações anteriores, este apresentou a maior fração de macroporos e menor fração de meso e microporos ao longo da sua estrutura.

O método do glutaraldeído apresentou resultados para a permeabilidade que justifica o método de ativação, uma vez que a inserção de braços espaçadores aumentou os sítios de ligação e resultou em maiores possibilidades de imobilização da lectina, comprometendo a fração de meso e microporos, que foi a mais alta dentre os métodos testados. Assim, estes poros com impedimento estérico apresentam alta resistência ao escoamento e baixa permeabilidade.

O método de ativação por epiclorigrina, que não diferente dos demais, também apresentou correlação com o perfil de porosidade, obteve a maior média de imobilização de lectina, a menor formação de macroporos e a maior formação de micro e mesoporos ao longo da coluna monolítica, o que é justificado pelo maior número de biomoléculas aderidas à superfície do suporte. Contudo, como a imobilização dessas biomoléculas foi favorecida pelos braços espaçadores, esta coluna sofreu menos impedimentos estéricos e comprometimento dos sítios ativos, apresentando médias de permeabilidade e resistência ao escoamento próximas aos métodos epóxi e etilenodiamino.

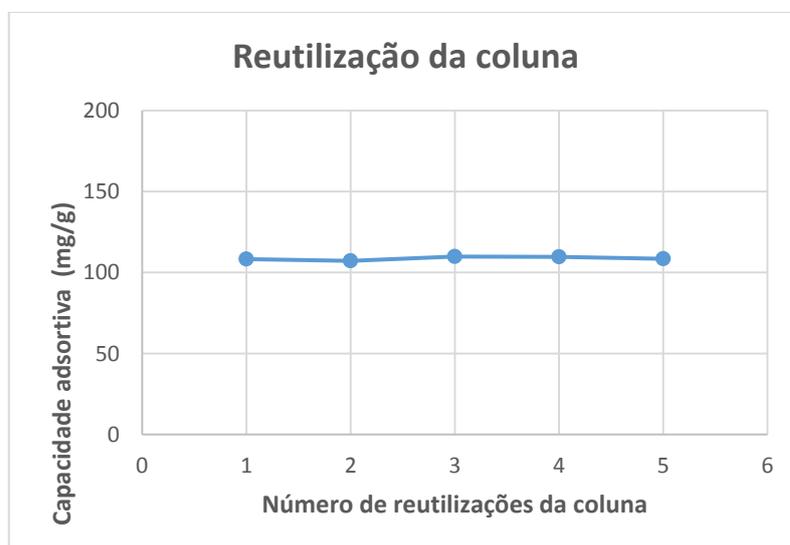
A partir dos resultados encontrados, verifica-se que a taxa de permeação da água no interior das colunas, de uma forma geral foi baixa, corroborando com autores encontrados na literatura, que caracterizaram criogéis de acrilamida ativadas e sem ativação, e encontraram  $k_w$  na faixa de ordem de  $10^{-11} \text{ m}^2$  á  $10^{-13} \text{ m}^2$  (CARVALHO, 2010; FONTAN, 2013; CHEN et al., 2008; YAO et al., 2007b; YAO et al., 2007a; YAN et al., 2011).

#### 4.1.6 Capacidade adsortiva e de reutilização das colunas produzidas

Foram realizados ensaios de capacidade adsortiva das colunas produzidas a partir do método que obteve maior média de imobilização da ConA (o método com epiclorigrina). Para tanto foi utilizada a própria ConA como lectina modelo nos ensaios, em condições já descritas previamente. Foi verificado que a capacidade adsortiva da coluna foi de  $108,67 \pm 1,0$  mg de ConA /g criogel, resultado satisfatório para o presente teste, tornando possível inferir que o pH de 7,2 favoreceu a adsorção da concanavalina, pois a maioria dos aminoácidos de cadeias laterais polares positivas tem pKa acima deste valor, tendo beneficiado as interações entre a concanavalina livre e a lectina imobilizada no suporte.

Após testar a capacidade adsortiva da coluna, o mesmo procedimento foi realizado 5 vezes consecutivas, a fim de verificar se a capacidade adsortiva era mantida com a reutilização da coluna. Os resultados obtidos com cinco ciclos consecutivos de uso são apresentados na Figura 13. Verificou-se que a capacidade adsortiva da coluna permaneceu praticamente constante, comprovando a estabilidade da coluna para o uso em técnicas de isolamento e purificação de lectinas em extratos aquosos, bem como o benefício de reutilização do suporte cromatográfico.

**Figura 13:** Capacidade adsortiva em função dos ciclos de uso da coluna avaliada.



Fonte: Dados do experimento.

## 5. CONCLUSÃO

O preparo de colunas monolíticas supermacroporosas de poliacrilamida com ConA imobilizada pelo método do glutaraldeído com utilização prévia de epicloridrina mostra-se promissora para o uso na purificação de lectinas. A epicloridrina conferiu características positivas a coluna, bem como potencializou a capacidade adsortiva, apresentando resultados satisfatórios para o uso da coluna em técnicas de purificação. Além disso, o incremento dos grupos epóxi aumentou a rigidez, a estabilidade operacional e a capacidade de reutilização, sem comprometer sua estrutura macroporosa.

A imobilização de bioligantes em criogéis revela-se uma alternativa viável na biotecnologia, por provocar pouca alteração na estrutura conformacional das biomoléculas, conservar sua bioatividade, uma vez que esta é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável.

O incremento com grupos epóxi ao suporte cromatográfico, seguido da inserção de braços espaçadores, resultou em um aumento da quantidade de ConA imobilizada na coluna produzida, elevando a capacidade de ligação dos biocompostos a serem purificados.

## 6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; VERCAIGNE-MARKO, M.; BOCQUET B.; VIVIEN, C.; GUILLOCHON, D. Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 315–324, 2009.

ACTAS BIOQUÍMICA. 1991, 5: 97-109

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2170-2179, 2008.

ANIULYTE, J.; LIESIENE, J.; NIEMEYER, B. **Journal of Chromatography B** 831, 24, 2006.

ARRUA, R. D.; STRUMIA, M. C.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 2429-2466, 2009.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v.977, 27-38, 2002.

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

BANERJEE, S.; CHAKI, S., BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 125-134, 2004.

BERELI, N.; TÜRKMEN, D.; KÖSE, K.; DENIZLI, A. Glutamic acid containing supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel disks for UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> removal. **Materials Science and Engineering C**, v.32, 2052-2059, 2012.

BOYD, W.C.; REQUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **Journal of Immunology**. v. 62, p. 333-339, 1949.

BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; SOUZA-FILHO, G. A. Expression and purification recombinant lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein Expression & Purification** 33: 34-38, 2004.

BROCKLEBANK, M.P. Downstream processing plant and equipment. In: SEPARATION processes in **Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 617-740, 1990.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009. ISSN 0100-4042.

CARLSSON, J.; JANSON, J.-C.; SPARRMAN, M.; Em: J.-C. JANSON, L. RYDEN (Eds.), **Purificação de proteínas, Princípios, alta resolução e Aplicações**, p. 375, 1998.

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

CARVALHO, B. M. A. D. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre**. Tese. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.

CATÁLOGO SIGMA. Biochemicals and Reagents for Life Science research. Sigma-Aldrich Co. p. 2040 – 2066, 2000.

CAVADA, B; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T.B; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectina structure matter in biological activity. Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci**, v.2, n 2, p.123-35, Jun 2001.

CERRADA, M. L.; SÁNCHEZ-CHAVES, M.; RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Specific lectin interactions and temperature-induced reversible gels in novel watersoluble glycopolymers bearing maltotriolactone pendant groups, **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 48:719–729, 2010.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1648:174–183, 2003.

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

ÇIMEN, D.; DENIZLI, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.93, 29-35.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Siddique, Y.H. (Ed.), **Recent Trends in Toxicology**, 37:47-59, 2008.

COSTA, R.M.P.B., VAZ, A.F.M., OLIVA, M.L.V., COELHO, L.C.B.B., CORREIA, M.T.S., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, 45: 526–533, 2010.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

DAINIYAK, M.B, GALAEV, IY, KUMAR, A, PLIEVA, F.M AND MATTIASSON, B. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 106, 101–127, 2007.

DE MEIJA, E.G.; BRADFORD, T.; HASTER, C. (2003) The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasi nutri **Rev.** 61 (7): 239-46.

DEDAVID, Berenice A.; GOMES, Carmem I.; MACHADO, Giovanna. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: edipucrs, 2007.

DEMARTINO, G. N. Purification of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes**. New York: IRL Press, p. 15-23, 1989.

DERAZSHAMSHIR, A.; ERGÜN, B.; PESINT, G.; ODABASI, M. Preparation of Zn<sup>2+</sup> - Chelated Poly (HEMA-MAH) Cryogel for Affinity Purification of Chicken Egg Lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2905-2913, 2008.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1989.

DUHITA, N.; HIWASA-TANASE, K; YOSHIDA, S.; EZURA, H. Single-step purification of native miraculin using immobilized metal-affinity chromatography, **J. Agric. Food Chemistry**. 57, 5148–5151, 2009.

EKICI, S; SARAYDIN, D. **Synthesis, characterization and evaluation of IPN hydrogels for antibiotic release Drug Delivery**, 11 (6): 381–388 2004.

ELFSTRAND, M. In **Gorbersdorfer Veröffentlichungen** (R. Kobert, ed.), pp, 1-159. Enke, Stuttgart, 1898.

ELKAOUTIT, M.; NARANJO-RODRIGUEZ, I.; DOMÍNGUEZ, M.; HIDALGOHIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 24, p. 10926- 10935, 2011.

ERGÜN, B.; DERAZSHAMSHIR, A.; ODABASI, M. Preparation of Fe(III)-Chelated Poly(HEMA-MAH) cryogel for lysozyme adsorption. **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v. 35, n. 2, 2007.

ERZENGIN, M.; ÜNLÜ, N.; ODABAŞI, M. A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu<sup>2+</sup>- attached sporopollenin particles. **Journal of Chromatography A**, v.1218, 484-490, 2011.

FAGUNDES, F. P. Estudo da imobilização de proteases para a síntese de oligolisinas. 2011. 142 p. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. CDU 577.151.5(043)

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v., n. in press, p., 2012.

FIDELIS, P.C. Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite. 2011. 87p. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, MG. CDD 22 ed. 664.022

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

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; SIMONE, S.G.; characterization of a lectin from *Talisia sculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. D. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, 2007. ISSN 0103-5053.

GALAEV, I. Y. et al. Effect of Matrix Elasticity on Affinity Binding and Release of Bioparticles. Elution of Bound Cells by **Temperature-Induced Shrinkage of the Smart Macroporous Hydrogel**†. *Langmuir*, v. 23, n. 1, p. 35-40, 2007/01/01 2006. ISSN 0743-7463.

GAO, X.; CHEN, J.; TAO, W.; ZHU, J.; ZHANG, Q.; CHEN, H.; JIANG, X. (2007) UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**. 340 (1-2): 207-215, 2007.

GERLACH, D.; WAGNWR, M.; SCHHLOTT, B. et al. (2002) Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *cepaea hortensis*. **FEMS microbiology letters**. 10579: 61-68, 2002.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, 113:236–247, 2011.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., AND SHARON, N. What should be called a lectin. **Nature** 285: 66, 1980

GOMES, C. F. Argilas: o que são e para que servem. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, p. 7-16, 24, 25, 96, 186, 271, 374, 1986.

GONZÁLEZ DE MEJÍA & PRISECARU, V.I., 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 45:425-445.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry*, v.81A, 89-96, 1977.

GUAN, H.; GUIOCHON, G. Study of physico-chemical properties of some packing materials: I. Measurements of the external porosity of packed columns by inverse sizeexclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 731, n. 1-2, p. 27-40, 1996. ISSN 0021-9673.

GUIOCHON, G.; BEAVER, L. A. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8836-8858, 2011.

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

GUNTHER, G. R.; WANG, J. L.; YAHARA, I.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. Concanavalin A derivatives with altered biological activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 70 (4): 1012-1016, 1973.

GUPALOVA, T. V.; LOJKINA, O. V.; PÀLÀGNUK, V. G.; TOTOLIAN, A. A.; TENNIKOVA, T. B. Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 949, n. 1-2, p. 185-193, 2002.

HAGE, D.; RUHN, P. An Introduction to Affinity Chromatography. In: Hage, D. S. (Ed.). *Handbook of Affinity Chromatography*. Boca Raton: CRC Press, Chromatographic Science Series, p.3-13, 2005.

HAHN, R, PANZER, M, HANSEN, E, MOLLERUP, J & JUNGBAUER, A. Mass transfer properties of monoliths, *Separation Science and Technology*, 37(7): 1545 1565, 2002.

HANORA, A.; SAVINA, I.; PLIEVA, F. M.; IZUMRUDOV, V. A.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. *Journal of Biotechnology*, v.123, 343-355, 2006.

HASEENABEEVI, V.M.; REMANI, P.; ANIL, S.; VIAJAYAKUMAR, T. (1991) Plant lectinshistochemical and cytochemical applications in oncology. *Idian Journal of Dental Research*. 2(3-4):45-53.

HE, J.; SONG, Z.; MA, H.; YANG, L.; GUO, C. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 44, p. 4307-4315, 2006.

HENZLER, K.; HAUPT, B.; BALLAUFF, M. Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 378, p. 184–189, 2008.

HOLANDA, M.L.; MELO, V.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N.; PEREIRA, M.G. BENEVIDES, N.M.B. (2005) Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 38: 1769-1773

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, SP, Brasil, 1985

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. Protein Purification. Principles, High resolution methods, and applications. **VCH Publishers**, 1989.

JANSON, J.-C.; JÖNSSON, J.-A. **Introduction to Chromatography**. In: JANSON, J.-. e RYDÉN, L. (Ed.). Protein Purification - Principles, High-Resolution Methods, and Applications. Second edition. New York, cap. 2, 1998.

JANSON, H. W., PENELOPE J. E. DAVIES, AND H. W. JANSON. JANSON'S History of Art: The Western Tradition. Upper Saddle River, NJ: **Prentice Hall**, 2011.

JARZEBSKI, A. B.; SZYMAŃSKA, K.; BRYJAK, J.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J. Covalent immobilization of trypsin on to siliceous mesostructured cellular foams to obtain effective biocatalysts. **Catalysis Today**, v. 124, p. 2-10, 2007.

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

JIANG, J-F; Han, Y; Xing, L-J; Xu, Y-Y; Xu, Z-H; Chong, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. *Toxicon*, v. 47, p. 133-9, 2006.

JUNG, E.C.; KIM, K.D.; BAE, C.H.; KIM, J.C.; KIM, D.K.; KIM, H.H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:833–8, 2007.

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

KALASHNIKOVA, IV, IVANOVA, ND, EVSEEVA, TG, MENSHIKOVA, AY , VLAKH, EG , TENNIKOVA, TB , **J. Chromatogr. A**, 1.144, 40 47, 2007.

KANNOUJIA et al., 2009

KARMALI, A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. **Boletim de Biotecnologia** 1-7, 2001.

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

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3662-3672, 2011.

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

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 269-278, 2006.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. Archives of **Biochemistry and Biophysics**. v. 410, p. 222-229, 2003.

KUMAR, A, PLIEVA, F.M, GALAEV, I. Y AND MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel. **J. Immunol. Methods** 283, 185– 194, 2003.

KUMAR, A, BANSAL, V, ARVIDSSON, P, ROYCHOUDHURY, P.K, MATTIASSON, B, Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line, **Journal of Chromatography A** 1103 35–42, 2006.

KUMAR AK FAU - GOSWAMI, P.; GOSWAMI, P. Dissociation and reconstitution studies of a broad substrate specific multimeric alcohol oxidase protein produced by *Aspergillus terreus*. **J Biochem**, v. 145, n. p. 259-265, 2009.

KVENNEFORS, E.C.E.; LEGGAT, W.; HOEGH-GULDBERG, O.; DEGNAN, B.M.; BARNES, A.C. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. **Developmental and Comparative Immunology**, 32:1582–1592, 2008.

LAM SK & NG TB. Produção de lectinas e aplicações práticas. **Appl Microbiol Biotechnol**. 89; 45-55, 2011.

LI, Y.; GU, B.; DENNIS TOLLEY, H.; LEE, M. L. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 29, p. 5525-5532, 2009.

LI, W.W.; YU, J.Y.; XU, H.L.; BAO, J.K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 414:282–286, 2011.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T.S.; CECHINEL, Y. M.N.; SAMPAIO, C. A.M.; OWEN, J. S.; COELHO, L.C.B.B. (2007) Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*. 33: 27-32.

LIU, C; ZHAO, X; XU, X-C; LI, L-R; LIU, Y-H; ZHONG, S-D; BAO, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 42:138-44, 2008.

LIU, Y.; GU, B.; DENNIS TOLLEY, H.; LEE, M. L. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 29, p. 5525-5532, 2009.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1383: 9–36, 1998.

- LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001.
- LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 445-451, 2003.
- LOZINSKY, V. I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v.71, 489-511, 2002.
- LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, n. 1–3, p. 334-340, 2009.
- MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., KUBO, C.E.G., PARRA, J.R.P. Bioinsecticidal activity of Talisia esculenta reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of Anticarsia gemmatalis. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 153:24–33, 2011.
- MALLIK, R.e HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006. ISSN 1615-9314.
- 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.
- MARUSKA, A.e KORNYSOVA, O. Continuous beds (monoliths): stationary phases for liquid chromatography formed using the hydrophobic interaction-based phase separation mechanism. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 59, n. 1, p. 1-48, 2004. ISSN 0165-022X.
- MATEJTSCHUK, P.; BAKER, R.M.; CHAPMAN, G.E. Purification and characterization of monoclonal antibodies. In: SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and bioprocessing**. New York: Wiley-VCH Verlag, v.2, p. 234-253, 1998.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment☆. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000. ISSN 0141-0229.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C.; GUIBAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy- Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003. ISSN 1525-7797.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

McKENZIE, G. H.; SAWYER, W. H.; NICHOL, L. W. The molecular weight and stability of concanavalin A. **Biochemica et Biophysica Acta**. 263: 283-293, 1972

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MILHOME, M.V. Frutalina, Lectina  $\alpha$ -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L., no estudo do câncer de tireóide humana. Análise comparativa com a galectina-3. Tese para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará, 2003.

MONTEIRO-MOREIRA, ANA CRISTINA DE OLIVEIRA. **Caracterização Estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa* L.)**. Fortaleza, 117p. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Ceará, 2002.

MOREIRA, R.A. Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. Tese para Professor Titular da Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 1998.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plants lectins, chemical and biological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, Suppl II, p. 211- 218, 1977.

MOSER, A. C.; HAGE, D.S. Cromatografia de imunoafinidade: uma introdução para aplicações e desenvolvimentos recentes. **Bioanalysis**. 2010 abril; 2 (4). 769-790 doi: 10,4155 / bio.10.3. Disponível em PMC 2011 01 de fevereiro;

NAEEM, A.; KHAN, A.; KHAN, R. S. Partially folded intermediate state of concanavalin A retains its carbohydrate specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 331: 1284–1294, 2005.

NARAYANAN, S. Preparative affinity chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**. 658: 237-258, 1994

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDINI, E.  $\beta$ -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p.10-15, 2011.

NIVEN, G.W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: **Food processing: recent developments**. New York: Elsevier Science, p. 143-195, 1995.

NOPPE, W.; PLIEVA, F. M.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H.; TUNCEL, M.; TUNCEL, A.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 293-299, 2007.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; COELHO, L. C. B. B.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; GUARNIERI, M. C.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; CORREIA, M. T. S. Inactivation and fragmentation of lectina from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 81, p. 484-487, 2012.

OLAJOS, M.; SZEKRÉNYES, Á.; HAJOS, P.; GJERDE, D.T.; GUTTMAN, A. Boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) Temperature dependence of glycoprotein isolation and enrichment. **Anal Bioanal Chem**, 397:2401–2407, 2010

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M. et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 3, p. 301-310, 2002.

OLIVEIRA, M.D.; ANDRADE, C.A.; SANTOS-MAGALHAES, N.S.; COELHO, L.C.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T. (2008) Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. 46(3):371- 6.

OSTRYANINA, N. D.; VLASOV, G. P.; TENNIKOVA, T. B. **Journal of Chromatography A**, v.949, 163-171, 2002.

PASECHNIK, V.A.; PHLS, J.M. Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins. In: **HANDBOOK of enzyme biotechnology**. New York: Wiseman, p.31-82, 1995.

PAZ, NATHALIA VAREJÃO NOGUEIRA DA; MARCIUS DA SILVA ALMEIDA; NUCCIA N.T. DE CICCO; GEÓRGIA C. ATELLA; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica e Biophysica Acta**. Proteins and Proteomics,1804:1917-1924, 2010

PERÇIN, I.; AKSÖZ, E. Hacettepe **Journal of Biology & Chemistry**, v.40, 303-308, 2012.

PEREZ-MATEOS, M, BUSTO, M.D, MEZA, V, ORTEGA, N,. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. **Food Chemistry** 104 1177–1182, 2007

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

PETRO, M. SVEC. RÉCHET, J. M. J. Immobilization of trypsin onto “molded” macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 355-363, 1996.

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

- PETROV, P. et al. UV-assisted synthesis of super-macroporous polymer hydrogels. **Polymer**, v. 50, n. 5, p. 1118-1123, 2009. ISSN 0032-3861.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109:347-352, 1995.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Chapter 7: Plant lectins versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.15, 199-228, 1998.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: **The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**, (Wu A. M. ed.), p. 27-54. Kluwer Academic, 2001.
- PHARMACIA BIOTECH. **Protein purification handbook**. Sweden, P.97, 1999.
- PLIEVA, F.M, GALAEV, I Y, MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**. 30, 1657– 1671, 2007.
- PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-83. ISSN 1615-9314, 2004a.
- PLIEVA, F.M, SAVINA, I.N, DERAZ, S, ANDERSSON, J, GALAEV, I.Y, MATTIASSON, B, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, **Journal of Chromatography B** 807 129–137, 2004b.
- PLIEVA, F. M. et al. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, v. 1, n. 4, p. 303-309, 2005. ISSN 1744-683X
- PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008. ISSN 0966-842X.
- PODGORNIK, A, BARUT, M & TRANCAR, A. Construction of Large-Volume Monolithic Columns, **Analytical Chemistry**, 72 (22): 5693 5699, 2000.

QIU, H.; LU, L.; HUANG, X.; ZHANG, Z. QUB, Y. Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9415– 9420, 2010.

QUIROGA, E.; PRIOLO, N.; OBREGON, D.; MARCHESE, J.; BARBERIS, S. Peptide synthesis in aqueous–organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (*Asclepiadaceae*) fruits. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 115–120, 2011.

RABINOVICH, G.A. (2007) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death & Differentiation**. 6(8):711-21.

REIS, P.; WITULA, T.; HOLMBERG, K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 110, n. 2–3, p. 355-362, 2008.

RISBUD, M.V.; BHONDE, R.R. Polyacrylamide-chitosan hydrogels: in vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies, **Drug Deliv.** 7, 69–75, (2000).

RODRIGUES, S. D.; MENDES, A. A.; ADRIANO, S. W.; GONÇALVES, B. R. L.; GIORDANO, C. L. R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109, 2008.

ROJO, M. A.; YATO, M.; ISHII-MINAMI, N.; MINAMI, E.; KAKU, H.; CITORES, L.; GIRBÉS, T.; SHIBUYA, N. Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of siebolding-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 340, n. 2, p. 185-194, 1997.

ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 91-97, 2003.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate J.* 18, 589-613. 2001.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H-C.; SOLIS, D.; BARBERO, J.J.; ROMERO, A.; LIETH, C.W.; MAURINO, T.D.; GABIUS, H-J. (2000) Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code:

Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets. **Current Medicinal Chemistry**. 7: 389-416

RUHN, P. F.; GARVER, S.; HAGE, D. S. **Journal of Chromatography A**, v.669, 9-19, 1994.

SÁ R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; GOMES, F.S.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B., BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62:460–464, 2008.

SANTANA, M. A.; SANTOS, A. M. C.; OLIVEIRA, M. E.; OLIVEIRA, J. S.; BABA, E. H. et al. (2008). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, 352-358.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane–polyvinyl alcohol prepared by sol–gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42–44, p. 4823-4826, 2009.

SANTOS FILHO, T. G. Isolamento de glicoproteínas através de cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas. 2001.56p. Dissertação. Universidade Federal do Pernambuco. Departamento de Bioquímica / CCB/ UFPE.

SAVINA, I. N.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005a. ISSN 0032-3861.

SAVINA, I. N.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 2, p. 199-205, 2005b. ISSN 0021-9673.

SHARMA, A. SUROLIA, Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity, **J. Mol. Biol.** 267 (1997) 433e445.

SHARON, N. & LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50:6586-6591, 2002.

SHARON, N. & LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; MENTELE, R.; FERREIRA, R. S.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, R. A. et al. **Process Biochemistry**, v.47, 1049-1059, 2012.

SILVA, Maria C. C. P. Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio. 2011. 79p.[s.n.], Campina Grande, 2011.

SLIFKIN, M. & DOYLE, R. J. (1990) Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**. 3(3): 197-218

SONG, Y. S.; LEE, H. U.; LEE, J. H.; PARK, C.; KIM, S. W. Enzyme-catalyzed resolution of racemate using enzyme functionalized silica nanoparticles in the presence of surfactants. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 817–820, 2011.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R.E.; CABLISH, K. L.; BITTNER, C. C.; Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

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

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 8-19, 2012. ISSN 0927-7765.

TEOTIA, S.; KHARE, S.K.; GUPTA, M.N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 792–795, 2001.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. **Journal of Chromatography B**, v.887-888, 73-78, 2012

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. The NeuAc(2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry** 235: 128-137, 1996.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v.183, p.258-262, 1991.

VETRI, V.; CARROTTA, R.; PICONE, P.; DI CARLO, M.; MILITELLO, V. Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. ***Biochimica et Biophysica Acta***. 1804: 173-183, 2010.

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

WATKINS, WM, E MORGAN, WTJ, ***NATURE*** , **169** , 825 (1952). PMID: 14941057

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. ***Annual Reviews in Biochemistry***, v. 65, p. 441 – 473, 1996.

WEN, Z., NIEMEYER, B. Evaluation of two different Concanavalin A affinity adsorbents for the adsorption of glucose oxidase. ***Journal of Chromatography B***, 857 149–157, 2007.

WENG, J.; SONG, X.; LI, L.; QIAN, H.; CHEN, K.; XU, X.; CAO, C.; REN, J. (2006) Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. ***Talanta***. p.1-6.

WIEDER, W. et al. monolithic poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) capillary columns functionalized to strong anion exchangers for nucleotide and oligonucleotide separation. ***Journal of Separation Science***, v.29, n.16, p.2478-2484, 2006. ISSN 1615-9314

WU, A.M., WU, J.H., SINGH, T., SINGHA, B., SUDAKEVITZ, D., GILBOA-GARBER, N. **Multivalent human blood group ABH and Lewis glycotopes are key recognition factors for a LFucNMan binding lectin from phytopathogenic *Ralstonia solanacearum***. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:249–259, 2009.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. ***Chinese Journal of Chemical Engineering***, v. 19, n. 5, p. 876-880, 2011.

YAN, Q., ZHU, L., KUMAR, N., JIANG, Z., HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. ***Food Chemistry***, 122:589–595, 2010.

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

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103-110, 2006b. ISSN 0021-9673.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1-2, p. 246-251, 2007a. ISSN 0021-9673

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; CHEN, F.; YU, X. Protein adsorption in supermacroporous cryogels with embedded nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 139-146, 2007b. ISSN 1369-703X

YAO, K, YUN, J, SHEN, S, WANG, L, HE, X, YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1109 103–110, 2006.

YOSHIDA, M., Roth, R. I., Grunfeld, C., Feingold, K. R., & Levin, J. Pharmacokinetics, biological effects, and distribution of (1→3)- $\beta$  in blood and organs in rabbits. **Mediators of inflammation**, 6, 279-283, 1997.

YUN, KW; MAUN, A; KIM, JH. Effects of the aqueous extract from *Artemisia campestris* ssp caudata on mycorrhizal fungi colonization and growth of sand dune grasses. **Journal of plant biology**. 50(3):358-361, 2007.

ZOHURIAAN-MEHR, M.J.; OMIDIAN, H.; DOROUDIANI, S.; KABIRI, K. Advances in nonhygienic applications of superabsorbent hydrogel materials, **J. Mater. Sci.** 45, 2010, 5711–5735.