



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

ADSORÇÃO DE LISOZIMA POR INTERAÇÃO ESPECÍFICA EM UM
CRIOGEL SUPERMACROPOROSO

Fernanda Spagnol Paganoto

Itapetinga
Bahia – Brasil
Outubro / 2014

FERNANDA SPAGNOL PAGANOTO

**ADSORÇÃO DE LISOZIMA POR INTERAÇÃO ESPECÍFICA EM UM
CRIOGEL SUPERMACROPOROSO**

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

Orientador:

Prof. D.Sc. Luis Antonio Minim

Co-orientadores:

Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

D.Sc. Lizzy Ayra Pereira Alcântara

**Itapetinga
Bahia – Brasil
Outubro / 2014**

664.9398 P148a	<p>Paganoto, Fernanda Spagnol.</p> <p>Adsorção de lisozima por interação específica em um criogel supermacroporoso. – Fernanda Spagnol Paganoto. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2014. 71 fl.</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Luis Antonio Minim e co-orientação dos Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilheu Fontan; D. Sc. Lizzy Ayra Pereira Alcântara.</p> <p>1. Ovos de galinha – Cromatografia Líquida de Afinidade (CLAF). 2. Lisozima – Proteína - Criogel. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Minim, Luis Antonio. III. Fontan, Rafael da Costa Ilheu. IV. Alcântara, Lizzy Ayra Pereira. V. Título.</p> <p>CDD(21): 664.9398</p>
-------------------	--

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Ovos de galinha
2. Cromatografia Líquida de Afinidade (CLAF)
3. Lisozima
4. 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: ADSORÇÃO DE LISOZIMA POR INTERAÇÃO ESPECÍFICA EM UM CRIOGEL SUPERMACROPOROSO.

Autor (a): Fernanda Spagnol Paganoto

Orientador (a): Prof.º Dr. Luis Antonio Minim

Co-orientador (a): Prof.º Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan
Prof.ª Dr.ª Lizzy Ayra Pereira Alcântara

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.º Dr. Luis Antonio Minim (UFV)


Prof.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Bonomo (UESB)


Prof.ª Dr.ª Luana Pereira de Moraes (UFV)

Itapetinga-BA., 23 de outubro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir a realização de mais esta etapa em minha vida, por sempre me amparar, por seu amor incondicional.

À Nossa Senhora e meu fiel anjo da guarda pela proteção constante.

À minha mãe pelo apoio, palavras de incentivo, por enxugar minhas lágrimas mesmo à distância.

À meus irmãos pela confiança e amor para comigo.

A meu namorado André Luis pelo companheirismo, amor e compreensão.

A família Spagnol Paganoto pela preocupação e orações.

Às meninas do LADESP pelo acolhimento, ajuda e coleguismo ao longo de todo o experimento.

Aos amigos de perto e de longe.

Ao professor Luis Antônio Minim pela orientação e por permitir a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Lizzy que se mostrou altamente capaz cumprindo mais que seus deveres profissionais, sendo amiga, prestativa e confiante em meu trabalho;

Ao meu co-orientador Rafael Fontan pelas orientações. Aos professores que ao longo do mestrado contribuíram para meu crescimento profissional.

À Capes pelo recurso financeiro e a bolsa concedida.

À UESB e a UFV pelo convênio realizado permitindo a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta realização pessoal, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	5
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO GERAL.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Clara do ovo de galinha e suas proteínas.....	12
3.2 Lisozima	13
3.3 Cromatografia líquida de afinidade (CLAF)	15
3.3.1 Estudo adsortivo	19
3.4 Tipos de suportes.....	21
3.5 Criogel monolítico supermacroporoso	23
3.6 Alterações na superfície dos suportes cromatográficos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Materiais	30
4.2. Produção da coluna monolítica	30
4.2.1 Ativação do criogel.....	31
4.3 Caracterização morfológica e hidrodinâmica da coluna monolítica de criogel....	31
4.3.1 Avaliação física e morfológica	32
4.3.1.1 Porosidade do leito	32
4.3.1.2 Capacidade de inchamento	32
4.3.1.3 Estrutura dos poros	32
4.3.2 Caracterização hidrodinâmica	33
4.3.2.1 Permeabilidade ao escoamento.....	33
4.3.2.2 Distribuição do tempo de residência (DTR) e do coeficiente de dispersão axial aparente.....	33
4.4 Experimentos adsortivos	35
4.4.1 Adsorção da lisozima pura	35
4.4.2 Caracterização das amostras dos eluídos.....	36

4.4.3 Especificidade da coluna	37
4.4.4 Isotermas de adsorção.....	37
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)....	38
4.6 Delineamento experimental e análises estatísticas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Caracterização morfológica e hidrodinâmica do criogel.....	42
5.1.1 Porosidade e capacidade de inchamento do leito	42
5.1.2 Estrutura dos poros por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
5.1.3 Permeabilidade ao escoamento.....	46
5.1.4 Distribuição do Tempo de Residência e do Coeficiente de Dispersão Axial Aparente.....	47
5.2 Análises cromatográficas.....	49
5.2.1 Adsorção de lisozima pura por cromatografia de afinidade	49
5.2.2 Especificidade da coluna	53
5.3 Isotermas de adsorção.....	55
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas e químicas das proteínas da clara do ovo de galinha.....	13
Tabela 2 – Atividade biológica das proteínas da clara do ovo de galinha.....	13
Tabela 3 – Exemplos de interações biológicas usadas em CLAF.....	16
Tabela 4 – Exemplos de classificação dos suportes.....	22
Tabela 5 – Parâmetros aplicáveis ao processo adsortivo.....	36
Tabela 6 – Programação do gradiente da fase móvel do método cromatográfico.....	36
Tabela 7 – Valores obtidos para porosidade e capacidade de inchamento.....	42
Tabela 8 – Influência dos fatores temperatura (°C) de ativação do adsorvente, força iônica (mol L^{-1}) e pH sobre o rendimento de adsorção da lisozima (Y).....	49
Tabela 9 – Capacidade adsortiva (mg proteína mL) do criogel em função do conteúdo de lisozima em tampão fosfato pH 7,0, força iônica $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.....	57
Tabela 10 – Parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência reproduzida de aminoácidos da lisozima da clara do ovo.....	15
Figura 2 – Etapas da purificação por afinidade.....	18
Figura 3 – Esquema de produção do criogel.....	25
Figura 4 – Perfil obtido no experimento de análise frontal.....	38
Figura 5 – Reação de crio-copolimerização dos monômeros AAm, AGE e MBAAm para o preparo do criogel.....	41
Figura 6 – Imagens dos criogéis produzidos no presente trabalho, por crio-copolimerização.....	42
Figura 7 – Micrografias de MEV dos criogéis produzidos. (A) a (D) criogéis puros, e de (E) a (H) criogéis ativados com o Tris.....	45
Figura 8 – Dados experimentais e equações ajustadas para a vazão volumétrica em função da queda de pressão relativos à coluna de criogel ativada (●) e ao criogel puro (o).	46
Figura 9 – Curva de distribuição do tempo de residência em diferentes velocidades para o criogel puro (A) e o criogel ativado (B).....	47
Figura 10 – Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais para o criogel puro (A) e o criogel ativado (B).....	48
Figura 11 – Comportamento adsorptivo da solução de lisozima pura em pH 7,0, força iônica $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ e temperatura de ativação do criogel em $60 \text{ }^\circ\text{C}$. (—) Adsorção da amostra; (—) Injeção da amostra; (—) Eluição da amostra.....	51
Figura 12 – Perfil cromatográfico da lisozima pura (A) antes do processo adsorptivo e solução de lisozima eluída (B).....	52
Figura 13 – Perfil cromatográfico da solução da mistura de proteínas, α -lactoalbumina, BSA e pancreatina suína.....	53
Figura 14 – Gel de eletroforese da solução padrão de proteínas (P); mistura das proteínas puras (1) e do eluído da mistura de proteínas (2). Massas moleculares: α -lactoalbumina (14 KDa), BSA (66 KDa) e pancreatina suína (complexo enzimático).....	54
Figura 15 – Isotherma de adsorção da lisozima em pH 7,0 e $0,0 \text{ M}$ de NaCl, à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (—) modelo de Langmuir.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância registrada no tempo t_i
TCA	Ácido tricloroacético
AAM	Acrilamida
BSA	Albumina de soro bovina
CHO	Aldeído
AGE	Alil glicidil éter
NH ₂	Amino
A	Área da seção transversal da coluna (m ²)
S	Capacidade de inchamento (g H ₂ O / g criogel seco)
q _{max}	Capacidade máxima de adsorção (mg mL ⁻¹ criogel)
COOH	Carboxila
NaCl	Cloreto de sódio
R ²	Coefficiente de determinação múltipla
D _{ax}	Coefficiente de dispersão axial (m ² s ⁻¹)
L	Comprimento da coluna (m)
K _d	Constante de equilíbrio de adsorção (mol L ⁻¹)
CLAF	Cromatografia líquida de afinidade
CO ₂	Dióxido de carbono
DTR	Distribuição do tempo de residência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
OH	Hidroxila
m _s	Massa da amostra desidratada (kg)
m _e	Massa da amostra espremida (kg)
m _w	Massa da amostra saturada com água (kg)
MM	Massa molecular
m/v	Massa por volume
μL	Microlitro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino
MBAAM	N,N'- metileno-bis-acrilamida
β _i	Parâmetro do modelo

K_w	Permeabilidade ao escoamento (m^2)
APS	Persulfato de amônio
pI	Ponto isoelétrico
ϕ	Porosidade do criogel
pH	Potencial hidrogeniônico
q	Quantidade de soluto adsorvido ($mol L^{-1}$)
ΔP_w	Queda de pressão através da coluna (Pa)
SH	Tiol
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
KDa	Unidade de massa molecular: 10^3 Danton
σ^2	Variância do pulso observado (s^2)
Q_w	Vazão volumétrica ao escoamento (m^2)
u	Velocidade intersticial ($m s^{-1}$) da fase móvel
U	Velocidade superficial do líquido ($m s^{-1}$)
μ_w	Viscosidade da água ($Pa s^{-1}$)
VPE	Volume parcial específico
VC	Volume de coluna

RESUMO

PAGANOTO, Fernanda Spagnol. **Adsorção de lisozima por interação específica em um criogel supermacroporoso**. Itapetinga-BA: UESB, 2014, 71 p. (Dissertação-Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Engenharia de Alimentos). Orientador: Luis Antonio Minim. Co-Orientadores: Rafael da Costa Ilhéu Fontan e Lizzy Ayra Pereira Alcântara.

A lisozima da clara do ovo de galinha apresenta propriedades antimicrobianas, nutricionais e tecnológicas que lhe confere aplicação em diversos campos, sendo de grande interesse sua purificação. Dentre as técnicas utilizadas para obtenção desta proteína, a Cromatografia Líquida de Afinidade (CLAF) se destaca pelo alto nível de pureza do produto final. No presente trabalho foi desenvolvido um criogel monolítico supermacroporoso de poliacrilamida modificado com a inserção de moléculas de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) em sua superfície, objetivando a adsorção da lisozima pura por meio de CLAF. Tanto as colunas de criogel puro quanto as ativadas apresentaram estrutura uniforme, esponjosa, com supermacroporos interconectados e de tamanhos de 10 a 100 μm . Determinou-se suas propriedades morfológicas e hidrodinâmicas e observou-se que a ativação dos criogéis não alterou significativamente ($p > 0,05$) as mesmas. Na adsorção da lisozima na coluna monolítica verificou-se que a maior capacidade adsortiva foi obtida em pH 7,0, força iônica $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ e temperatura de ativação da coluna monolítica à $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Nessa condição experimental, foi avaliada a especificidade da coluna monolítica em relação a uma mistura de proteínas (α -lactoalbumina, albumina de soro bovino - BSA e pancreatina suína). As amostras eluídas da coluna foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, por meio da qual constatou-se a especificidade da coluna ativada com Tris para com a lisozima. Isotermas de adsorção também foram determinadas na condição experimental de melhor capacidade adsortiva, empregando diferentes concentrações de lisozima pura ($0,005$ a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$). O modelo de Langmuir foi ajustado satisfatoriamente aos dados experimentais, obtendo-se as constantes q_m (capacidade máxima de adsorção) e K_d (constante de dissociação) de $51,5667$ e $0,4206$, respectivamente.

Palavras chave: lisozima, cromatografia líquida de afinidade, isotermas de adsorção.

ABSTRACT

PAGANOTO, Fernanda Spagnol. **Adsorption of lysozyme by specific interactions in a supermacroporous cryogel.** Itapetinga-BA: UESB, 2014, 71 p. (Dissertação-Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Engenharia de Alimentos). Advisor: Luis Antonio Minim. Co-advisors: Rafael da Costa Ilhéu Fontan and Lizzy Ayra Pereira Alcântara.

Lysozyme from hen egg white has antimicrobial, nutritional and technological properties supporting its applications in different fields and demanding efforts to its purification. Among the techniques used to obtain this protein, affinity liquid chromatography (AC) stands out for the high level of purity of the final product.

In this work a supermacroporous monolithic polyacrylamide cryogel modified by insertion of molecules of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) to its surface has been developed, aiming the adsorption of pure lysozyme by AC. Both bare and activated cryogel columns showed uniform sponge-like structure, with interconnected supermacroporous of sizes ranging from 10 to 100 μm . Morphological and hydrodynamic properties were determined and did not change significantly ($p > 0.05$) before and after the activation. In the adsorption of lysozyme on the monolithic column, the highest adsorption capacity was achieved at pH 7.0, ionic strength of 0.0 mol L^{-1} and temperature of activation of the monolithic column of $60 \text{ }^\circ\text{C}$. These experimental conditions were then used to the following experiments. The specificity of the monolithic column was evaluated using a mixture of proteins (α -lactalbumin, bovine serum albumin (BSA) and porcine pancreatin). The samples eluted from the column were subjected to SDS-PAGE electrophoresis, confirming the specificity of the Tris-column to lysozyme. Adsorption isotherms were also determined using different concentrations of pure lysozyme (0.005 to 0.3 mg L^{-1}). The Langmuir model satisfactorily fitted to the experimental data, obtaining constants q_m (maximum adsorption capacity) and K_d (dissociation constant) of 51.57 and 0.42, respectively.

Keywords: Lysozyme, affinity liquid chromatography, adsorption isotherms.

1. INTRODUÇÃO

Purificação de proteína é um pré-requisito vital para a caracterização de sua função, estrutura, propriedades físico-químicas e aplicação industrial das proteínas de interesse (ZHANG et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de proteínas tornou-se fator essencial para os avanços em diversos campos como para o industrial, investigação biotecnológica, farmacêutico, biomédico, alimentício, entre outros. Dentre a grande variedade de técnicas de purificação disponíveis, os diferentes tipos de cromatografia tornaram-se dominante devido ao seu elevado poder de resolução (UZUN et al., 2004).

A Cromatografia Líquida de Afinidade (CLAF) é uma das técnicas mais eficazes para a purificação de macromoléculas biológicas, sendo considerada uma das mais versáteis subdivisões da cromatografia líquida (CARDOSO et al., 2009). Separações por afinidade são caracterizadas pela formação de uma interação bioquímica específica reversível entre a molécula alvo (o adsorbato) e uma molécula imobilizada (o ligante) (HAMEL e HUNTER, 1990). Como essa definição sugere, as interações que ocorrem nesta técnica cromatográfica são as mesmas que ocorrem em muitos sistemas biológicos tais como a ligação de uma enzima com o substrato ou de um anticorpo com um antígeno (CARDOSO et al., 2009).

Um fator importante a ser aplicado na distinção entre os métodos de afinidade de baixa e de alta eficiência é o material usado como suporte. Dentre os materiais disponíveis capazes de alcançar alta eficiência na purificação está o criogel monolítico supermacroporoso, sendo considerado o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas. Estes criogéis são produzidos sob condições criogênicas, apresentam uma estrutura com poros contínuos e interconectados com tamanho de 10-100 μm , o que leva a apresentar alta permeabilidade proporcionando uma baixa resistência ao fluxo e ao escoamento, permitindo a captura e a separação de biomoléculas inteiras e até mesmo não clarificadas, reduzindo assim as etapas do processo de purificação (PLIEVA et al., 2004b; KUMAR et al., 2006; ARVIDSSON et al., 2003; YAO et al., 2006a).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis monolíticos, os grandes poros fazem com que sua área superficial para adsorção e conseqüentemente a sua capacidade, seja significativamente menor quando comparadas a um leito fixo empacotado. Por isso, o estudo das modificações na superfície dos criogéis é uma área promissora e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações químicas e/ou físicas podem ser feitas na matriz do criogel para aumentar a sua seletividade conforme o produto de interesse a ser

purificado, visando aumentar a eficiência dos processos de separação (ARVIDSSON et al., 2002; BABAC et al., 2006; KUMAR et al., 2006; YAO et al., 2007b). Assim, a caracterização das propriedades físico químicas de tais criogéis é de grande importância para se adquirir conhecimento a respeito de seu comportamento de interação com outras moléculas presentes em solução, o escoamento dos fluidos em seu interior, e se há necessidade ou não de introduzir compostos para modificação de sua matriz, que possam assim otimizar sua capacidade adsortiva.

Uma das proteínas bastante estudadas dentre todas as conhecidas é a lisozima. O uso desta proteína abrange aplicações na indústria de alimentos, medicina clínica, farmacologia, bioengenharia, além de um grande interesse em estudos científicos. Uma grande quantidade desta proteína pura é usada em laboratórios de pesquisa como proteína modelo para estudos bioquímicos e biofísicos, tendo tido importante papel na investigação até mesmo de outras proteínas (SOUZA-SOARES e SIEWERDT, 2005; GHOSH e CUI, 2000; KUBIAK-OSSOWSKA e MULHERAN, 2010).

Diante ao potencial da lisozima e ao fato de ser encontrada em baixo teor na clara do ovo (cerca de 3,4 % das proteínas presentes), a sua purificação torna-se um desafio tecnológico devido à quantidade substancial de proteínas que necessitam ser processadas para se obter uma quantidade razoável de lisozima pura, existindo a necessidade do desenvolvimento de técnicas simples e efetivas para a sua purificação (GHOSH e CUI, 2000). Várias técnicas têm sido relatadas na literatura, no entanto, os processos cromatográficos se destacam devido à ausência de desnaturação da proteína e a sua elevada seletividade, tendo evidência para a CLAF (GUÉRIN-DUBIARD et al., 2005; QUAN et al., 2009).

Assim, ao considerar as características favoráveis das colunas monolíticas supermacroporosas e o alto nível de pureza alcançado pela CLAF, no presente trabalho foi produzido um criogel supermacroporoso de poli(acrilamida) modificado pela inserção de moléculas de tris(hidroximetil)aminometano, visando a sua aplicação na purificação da lisozima da clara do ovo por cromatografia líquida de afinidade.

2. OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar um novo criogel monolítico supermacroporoso e posterior modificação de sua estrutura com a inclusão de grupos ligantes de moléculas de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) para proceder com a purificação de lisozima por meio da técnica de CLAF.

2.1 Objetivos específicos

1. Produzir um adsorvente monolítico supermacroporoso por meio de criopolimerização utilizando os monômeros de acrilamida, bis-acrilamida e alil glicidil éter;
2. Ativar quimicamente o monólito produzido com a inclusão de grupos ligantes compostos de moléculas de Tris;
3. Caracterizar o monólito produzido em termos de suas propriedades morfológicas (porosidade, capacidade de inchamento, estrutura dos poros formados) e hidrodinâmicas (permeabilidade ao escoamento e dispersão axial).
4. Determinar as condições ótimas para a captura e purificação da lisozima utilizando a coluna monolítica produzida;
5. Determinar as isotermas de adsorção da lisozima na coluna monolítica produzida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Clara do ovo de galinha e suas proteínas

O ovo de galinha é um dos alimentos mais completos da dieta humana, pois fornece uma porção elevada de nutrientes para todas as faixas etárias e contribui significativamente para as necessidades diárias individuais em nutrientes essenciais, enquanto fornece uma baixa proporção de calorias, sendo um ingrediente essencial em muitos produtos alimentares ao combinar seus valores nutricionais e funcionais, contendo substâncias promotoras de saúde e preventiva de doença (ALCÂNTARA, 2012; SOUSA, 2008; SOUZA-SOARES e SIEWERDT, 2005).

As proteínas do ovo apresentam características desejáveis à indústria de alimentos devido as suas propriedades físico-químicas de emulsificação, aeração, formação de espumas, dentre outras, tornando-se ingrediente de diversas preparações alimentícias (FENNEMA, 1993; SOUSA, 2008; SGARBIERI, 1996). Além disto, o valor proteico do ovo é tão importante que a Organização Mundial da Saúde (FORS e COMSTOCK, 1983) o sugeriu como padrão de referência para determinar a qualidade proteica de outros alimentos. Essas proteínas são completas, porque contêm os oito aminoácidos essenciais da dieta humana: lisina, metionina, triptofano, valina, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina e treonina. Esses aminoácidos estão distribuídos em todos os componentes do ovo, sendo a maioria, encontrados na clara e em menor proporção na gema (KOVACS-NOLAN et al., 2005).

A clara do ovo representa aproximadamente 60% do peso total do ovo (BAUNGARTNER, 1994) e seus dois maiores constituintes são a água (85 a 90%) e as proteínas (13,5%), apresentando também pequenos traços de gorduras (apenas 0,1 a 0,2%), o que resulta em baixo valor calórico, pequenas quantidades de glicoproteínas e glicose (menos de 1%) e sais minerais (MULLER e TOBIN, 1996; MADRID et al., 1996; FAO, 2010). O pH da clara no ovo fresco é de 7,6 a 7,9, aumentando para até 9,7 durante o armazenamento de acordo com a temperatura e a difusão do dióxido de carbono (CO₂) através da casca (BELITZ e GROSH, 1997; LINDEN e LORIENT, 1996).

Na Tabela 1 são apresentadas algumas proteínas presentes em maior quantidade na clara do ovo e suas características físicas. Já a Tabela 2, aponta informações referentes à suas atividades biológicas.

Tabela 1 – Características físicas e químicas das proteínas da clara do ovo de galinha.

Proteína	Porcentagem da clara	pI	MM (kDa)	VPE (cm³ g⁻¹)	Carboidrato (%)
Ovalbumina	54,0	4,5	45,000	0,750	3,2
Ovotransferrina	12,0	6,0	76,600	0,732	2,2
Ovomucóide	11,0	4,1	28,000	0,685	20,0-25,0
Ovomucina	3,5	4,5-5,0	110,000	-	-
Lisozima	3,4	10,7	14,307	0,703	-
Avidina	0,5	10,0	68,300	0,730	-

Fonte: SGARBIERI, 1996.

pI: ponto isoelétrico; MM: massa molecular; VPE: volume parcial específico.

Tabela 2 – Atividade biológica das proteínas da clara do ovo de galinha.

Proteína	Atividade biológica
Ovalbumina	Atividade antibacteriana, anti-hipertensiva e imunomoduladora.
Ovotransferrina	Atividade antimicrobiana, antibacteriana e imunomoduladora.
Ovomucóide	Inibidor da protease serina, imunomoduladora e ligante bioespecífica.
Ovomucina	Atividade antibacteriana, propriedades anti-adesiva e atividade antitumoral.
Lisozima	Atividade antibacteriana, antiviral, imunomoduladora e imunoestimulante, antitumoral.
Avidina	Atividade antibacteriana, ligante bioespecífico.

Fonte: KOVACS-NOLAN et al., 2005.

3.2 Lisozima

Segundo Fennema (1993), a lisozima (EC 3.2.1.17) tem este nome devido à sua ação sobre *Micrococcus lysodeikticus*, sendo um dos poucos agentes antimicrobianos naturais aprovados por agências reguladoras para uso em alimentos. Além de ser uma fonte segura para o consumo humano, não causa problemas de poluição ambiental (SILVA et al., 1999).

A lisozima é uma glicoproteína com alto valor comercial, produzida por bactérias, plantas, insetos, aves e mamíferos (MACAK, 1995), sendo utilizada, por exemplo, como componente no preparo de colírios, pomadas, tratamento de úlceras, câncer e infecção por HIV. Já na indústria de alimentos, é utilizada em produtos lácteos

e cárneos, alimentação infantil e animal e em processos de produção de vinho (GHOSH et al., 2000; YILMAZ et al., 2005; LEE-HUANG et al., 1999; GHOSH, 2003; BAYRAMOĞLU e ARICA, 2002). Sua fonte comercial mais significativa é a clara de ovo de galinha que é uma mistura de proteínas, o que torna sua purificação um procedimento desafiador, visto que sua concentração na clara do ovo é de apenas 3,4% das proteínas totais (GHOSH et al., 2000, QUAN et al., 2009; MACAK, 1995).

Vários estudos têm sido realizados em relação às potenciais aplicações desta enzima na indústria de alimentos e ao seu efeito antimicrobiano (PADGETT et al., 1998; CHUNG e HANCOCK, 2000; CALLEWAERT et al., 2011). A lisozima hidrolisa as cadeias de polissacarídeos na ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) que une os resíduos de açúcares aminados entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, componentes do peptidoglicano da parede celular de bactérias gram-positivas, especialmente *Clostridium tyrobutyricum*. Além da atividade glicosídica esta enzima possui também atividade de transglicosidase e de esterase exercendo uma ação antimicrobiana (FENNEMA, 1993; SGARBIERI, 1996; POMBO, 2008; CUNNINGHAM et al, 1991; MACAK, 1995).

A lisozima é uma proteína pequena, de cadeia única, formada de um único polipeptídeo com 129 resíduos de aminoácidos, cuja estrutura primária é mostrada na Figura 1. Apresenta massa molecular mais baixa (14,3 a 18,8 kDa) e o pI mais alto (10,7) dentre todas as proteínas da clara. Em valores de pH entre 5,0 e 9,0 ocorre agregação de monômeros formando dímeros (POMBO, 2008; SGARBIERI, 1996, FENNEMA, 1993). Possui quatro ligações dissulfeto, não possuindo radicais sulfidrila livres. Dada sua natureza básica, afeta as propriedades de outras proteínas por interagir com elas (LI-CHAN et al., 1995).

Na superfície de sua molécula a lisozima apresenta cadeias laterais acídicas e básicas, grupos terminais e cadeia polar, sendo que a maioria das cadeias não polares (hidrofóbicas) estão localizadas no interior da molécula, tendo um dos grupos hidrofóbicos em sua superfície, exatamente onde se encontra o sítio ativo da proteína (LI-CHAN e NAKAI, 1989). Outra característica importante é a alta porcentagem de histidina, lisina, arginina e leucina (MEYER, 1976; SGARBIERI, 1996) presentes na molécula de lisozima, o que lhe confere capacidade de ligação com outras moléculas.

Essa definição sugere que as interações que ocorrem na CLAF são as mesmas que ocorrem em muitos sistemas biológicos tais como a ligação de uma enzima com o substrato, de um anticorpo com um antígeno, cofator ou inibidor, ou de um mensageiro e receptor. Exemplos de tais sistemas de afinidade são listados na Tabela 3. A natureza específica dessas interações é responsável pela alta seletividade desse tipo de cromatografia, tornando possível o isolamento seletivo de um analito ou grupo de analitos em amostras complexas (CHASE, 1984; CARLSSON et al., 1998).

Tabela 3 – Exemplos de interações biológicas usadas em CLAF.

Ligante	Molécula alvo
Anticorpo	Antígeno, vírus, célula.
Inibidor	Enzima (ligantes são frequentemente substratos análogos ou cofatores análogos).
Lectina	Polissacarídeo, glicoproteína, receptor da superfície celular, proteína da membrana, célula.
Ácido nucléico	Ligação ácido nucléico-proteína (enzima ou histona).
Hormônio, vitamina	Receptor, proteína transportadora.
Açúcar	Lectina, enzima, ou outra proteína de ligação de açúcar.

Fonte: CARLSSON et al., 1998.

Embora o termo “cromatografia de afinidade” não tenha sido utilizado até os anos 60, o uso de ligantes de afinidade em cromatografia data de quase 100 anos atrás sendo esta uma das mais antigas formas de cromatografia líquida. O primeiro relato aconteceu em 1910, quando Emil Starkenstein utilizou colunas para examinar a ligação de amido insolúvel com a enzima α -amilase. Este é também o primeiro caso conhecido em que a cromatografia líquida foi usada para uma separação envolvendo uma proteína (STARKENSTEIN, 1910; HAGE e RUHN, 2005). Inicialmente, a cromatografia de afinidade foi utilizada quase que exclusivamente para isolamento e purificação de micro ou macromoléculas em misturas biológicas complexas, mas nos últimos tempos tem se revelado como uma poderosa ferramenta para monitorar interações biomoleculares específicas (BAILON et al., 2000; CARDOSO et al., 2009).

A ampla aplicabilidade desta técnica baseia-se no fato de que qualquer biomolécula que se pretenda purificar tem normalmente um local de reconhecimento inerente por meio do qual ela pode ser ligada por uma molécula natural ou artificial. As

proteínas não fogem a essa característica, apresentando um sítio de reconhecimento peculiar o qual é utilizado para selecionar o ligante de afinidade apropriado. A ligação entre a proteína de interesse e o ligante deve ser específica e ao mesmo tempo reversível (MAGDELDIN e MOSER, 2012).

Uma propriedade que necessita de uma atenção especial é a força de associação entre o ligante e a molécula alvo. Se esta atração for muito fraca não haverá adsorção, enquanto que se for demasiadamente forte será difícil para eluir a proteína adsorvida. É sempre importante encontrar condições tais como pH e concentração de sal, inclusão de detergentes ou outras substâncias que promovam a dissociação do complexo e, ao mesmo tempo, não destruam a proteína ativa. Muitas vezes é neste ponto que se encontram as principais dificuldades com métodos de afinidade (CARLSSON et al., 1998).

Assim, o tipo de ligante utilizado na coluna se torna um fator chave na determinação do sucesso de qualquer separação de afinidade. O ideal é que o ligante imobilizado imite o mesmo ligante no seu estado nativo. O suporte usado para a imobilização do ligante de afinidade deve ter uma ligação com fácil modificação em sua fixação, ter uma baixa ligação não específica para com os outros componentes da amostra e ser estável sob as condições de operação a serem empregadas com a coluna (KATZ et al., 1998; MALLIK e HAGE, 2006; MALLIK et al., 2004).

A purificação por afinidade envolve três passos principais (Figura 2), sendo o contexto do processo realizado geralmente em cromatografia em coluna (MAGDELDIN e MOSER, 2012; HAMEL e HUNTER, 1990).

- a) Em primeiro lugar, as amostras são aplicadas nas colunas sob condições que favorecem a ligação máxima com o ligante de afinidade.
- b) Posteriormente é realizada uma lavagem para remover os componentes da amostra não-ligados especificamente, deixando a molécula desejada ainda ligada ao suporte de afinidade.
- c) A eluição (dissociação e recuperação) da molécula alvo do ligante imobilizado pode ser realizada alterando as condições do tampão de modo que a interação de ligação não ocorra. Como a eluição é realizada, a proteína purificada pode ser coletada em uma forma concentrada.

Substâncias mais fortemente retidas podem ser eluídas por alteração das condições da fase móvel e/ou alterações da coluna. Isto pode ser conseguido, por exemplo, através de um tampão de eluição em separado em que o pH, força iônica ou

polaridade sejam alterados a partir das condições utilizadas durante a aplicação da amostra (KATZ et al., 1998; WALTERS, 1985).

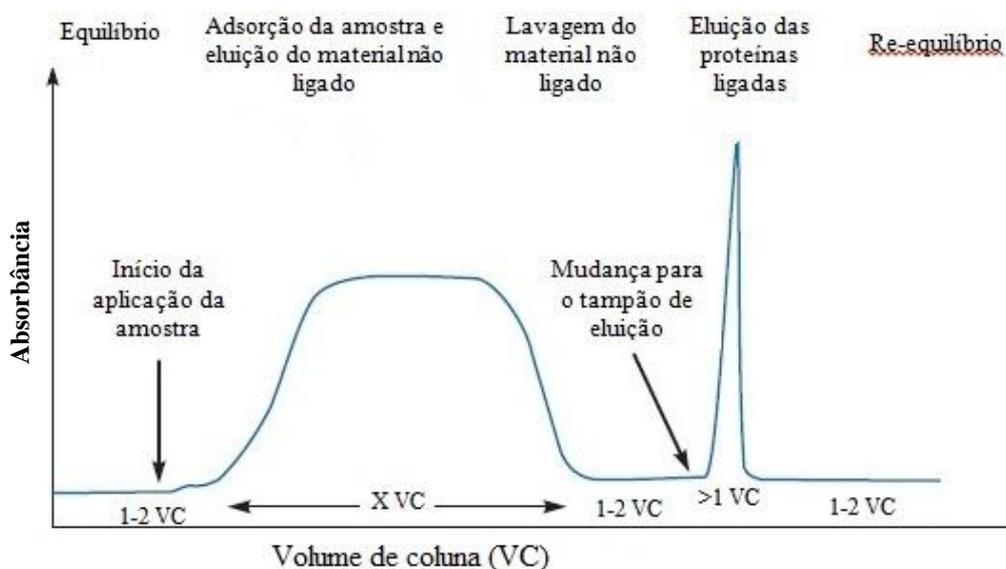


Figura 2 – Etapas da purificação por afinidade. Fonte: (adaptado de MAGDELDIN e MOSER, 2012).

Em muitos casos a CLAF é um método muito eficiente, até mesmo quando a proteína de interesse é um componente em menor concentração na mistura complexa (CARLSSON et al., 1998). Em comparação com outras técnicas de purificação de lisozima, as vantagens proeminentes da cromatografia de afinidade são a contínua separação on-line, seleção e detecção específica da molécula alvo em tempo real (QUAN et al., 2009), velocidade, facilidade de automação, capacidade de usar o mesmo ligante por várias aplicações (MALLIK et al., 2004), redução das etapas para a purificação da biomolécula e aumento no rendimento final do processo (LABROU, 2003).

No entanto, mesmo a CLAF sendo uma das técnicas mais eficazes para a purificação de macromoléculas biológicas, como no caso da lisozima, esta não é igualmente empregada como outras técnicas. Isto pode ser devido ao elevado custo da tecnologia envolvida neste tipo de cromatografia. Os ligantes de afinidade são caros ou instáveis e as colunas de afinidade sintetizadas com os ligantes de afinidade correspondentes também apresentam elevado custo, além de baixa estabilidade e reprodutibilidade. Estes inconvenientes limitam a aplicação desta técnica cromatográfica na produção industrial da lisozima (QUAN et al., 2009).

A fim de expandir a aplicação da CLAF na produção industrial desta proteína, novos ligantes são necessários para o desenvolvimento de colunas de afinidade que sejam reprodutíveis, de baixo custo e estáveis (QUAN et al., 2009). Alguns dos mais recentes avanços nesta área implicam em estudos racionais com métodos combinatórios para a concepção de ligantes de afinidade sintético altamente seletivos e estáveis (LABROU, 2003).

3.3.1 Estudo adsortivo

Diante as possibilidades de alterações na estrutura do suporte, é necessário conhecer o equilíbrio da adsorção da biomolécula de interesse para com os compostos avaliados. A capacidade máxima de um adsorvente não é completamente utilizada na prática devido aos efeitos de transferência de massa envolvidos no processo de contato fluido-sólido. Para estimar a capacidade de adsorção prática ou dinâmica é essencial a informação do equilíbrio adsortivo. Assim, o estudo da interação de proteínas sobre superfícies sólidas envolve aspectos físico-químicos complexos como a cinética de adsorção, as forças de interação enzima-superfície e as eventuais mudanças conformacionais que alteram a atividade da enzima a ser purificada (SUZUKI, 1990; CASTRO, 2008).

A maioria das versões de cromatografia usadas para a separação de proteínas (à exceção da cromatografia de gel filtração) podem ser mais ou menos tratadas em conjunto sob o termo cromatografia de adsorção. Isto implica que as moléculas da amostra são adsorvidas sobre a superfície (ou em uma fina camada superficial) da fase estacionária (JANSON e JÖNSSON, 1998). Técnicas adsortivas são utilizadas em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos. A otimização dessas técnicas é de grande interesse por trazer impacto direto no rendimento de tais processos.

O tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio é o primeiro passo para a investigação do seu comportamento, podendo ser verificado por meio do estudo da cinética de adsorção (SUZUKI, 1990). O comportamento no equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que relacionam a concentração da proteína em solução e na superfície de um sólido adsorvente (o suporte) ao longo de uma faixa de concentração de interesse (CRUZ, 1997). A isoterma determina a quantidade aproximada de adsorvente necessária para alcançar um determinado grau de pureza e a sensibilidade do processo de purificação na concentração do soluto (DECHOW, 1989).

A adsorção do soluto, desprezando mudanças de volume da solução, é dada pela diferença entre massas de adsorbato inicial e final do adsorbato na solução, $v(c_0 - c)$, onde v é o volume da solução, c_0 é a concentração inicial e c é a concentração no equilíbrio. Essa relação é satisfatória para soluções diluídas, quando a fração de solvente a ser adsorvida é muito pequena. À medida que a concentração do soluto na solução aumenta, também irá aumentar a quantidade adsorvida até atingir um valor (capacidade adsorptiva máxima), a partir do qual não há mais alteração (GEANKOPLIS, 1993).

Esses estudos geralmente são realizados à temperatura e pressão constante, obtendo-se assim as isotermas de adsorção, sendo o modelo de Langmuir o mais simples para o ajuste dos dados experimentais obtidos (DALLA-VECCHIA et al., 2004; JACOBSON et al., 1987). O modelo proposto por Langmuir, em 1916, para adsorção em um sistema gás sólido (LANGMUIR, 1916) considera-se a adsorção em monocamada, sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos (GUIOCHON et al., 1994; GRITTI et al., 2003).

O modelo de isoterma de Langmuir pode ser considerado como a base da maioria dos tratamentos teóricos do fenômeno de adsorção. Essa isoterma corresponde a um modelo de adsorção altamente idealizado, baseado nas seguintes hipóteses:

1. Moléculas da fase fluida são adsorvidas em sítios discretos da superfície, denominados sítios de adsorção, em que cada sítio pode acomodar apenas uma única espécie;
2. A energia de cada sítio de adsorção da superfície é igual e independente da população das espécies adsorvidas. Portanto, todos os sítios têm a mesma entalpia de adsorção e independem do grau de cobertura da superfície;
3. A quantidade máxima da espécie adsorvida corresponde à formação da monocamada;
4. A adsorção é localizada e ocorre pela colisão das moléculas da fase fluida com sítios vagos da superfície;
5. A velocidade de dessorção depende apenas da quantidade de material adsorvido na superfície.

Esses pressupostos podem vir a não ser totalmente aplicáveis em todos os casos como, por exemplo, na adsorção em sistemas sólido-líquidos, especialmente em altas concentrações de adsorbato (GUIOCHON et al., 1994), quando os sítios de adsorção

possam ser desiguais, podendo haver ligações de vários sítios e assim ter interações (por exemplo, de repulsão) entre as moléculas adsorvidas (JANSON e JÖNSSON, 1998).

Na prática, a isoterma de Langmuir adequa-se aos dados experimentais de adsorção em uma faixa relativamente extensa de concentrações de adsorvato, levando esse modelo a ser a primeira escolha de equação teórica para o ajuste matemático aos resultados experimentais, em que se considera a adsorção de um componente (GUIOCHON et al., 1994).

3.4 Tipos de suportes

A escolha do suporte cromatográfico é um ponto crucial para a obtenção de bons resultados em processos de purificação diversos, 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. Além de ser hidrofílico, um suporte ideal para processos cromatográficos de proteínas não deve conter grupos que se liguem espontaneamente as moléculas destas, porém devem conter grupos funcionais que permitam a síntese controlada de uma ampla variedade de adsorventes da proteína (JANSON e JÖNSSON, 1998).

Ademais, o suporte deve ser química e fisicamente estáveis a fim de resistir a condições extremas ao longo dos processos, regeneração e manutenção; ser suficientemente rígido para permitir elevadas taxas de fluxo linear (5 cm min^{-1} ou mais) em colunas cheias com partículas com diâmetro inferior a alguns microns (JANSON e JÖNSSON, 1998) e 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); apresentar presença de cargas e ser viável financeiramente (DALLA-VECCHIA et al., 2004; CARDOSO et al., 2009; VILLENEUVE et al., 2000; FREITAS et al., 2007; GIRELLI e MATTEI, 2005).

Os suportes cromatográficos podem ser classificados em orgânicos (naturais ou sintéticos) ou inorgânicos (minerais ou sintéticos) (Tabela 4). Já em relação à sua morfologia classificam-se como materiais porosos, não porosos e de estrutura em gel (VILLENEUVE et al., 2000; FREITAS et al., 2007).

A base do suporte desempenha um papel decisivo na estabilidade mecânica, química e térmica dos materiais empacotados. A clássica CLAF também apresenta

suportes destes dois tipos, orgânicos e inorgânicos, e podem ser usados para imobilizar ligantes peptídicos (TOZZI et al., 2003).

Tabela 4 – Exemplos da classificação dos suportes.

Orgânico
Polímeros Naturais
<ul style="list-style-type: none">• Polissacarídeos: celulose, dextrana, agar, agarose, alginato, quitina• Proteínas: colágeno, albumina
Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none">• Poliestireno• Outros polímeros: poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, vinil e alil-polímeros
Inorgânico
<ul style="list-style-type: none">• Minerais naturais: bentonita, sílica• Materiais processados: vidro (não poroso e com poros controlados), metais, óxidos metálicos com poros controlados

Fonte: Adaptado de BRENA e BATISTA-VIERA, 2006.

Características como elevada força mecânica, resistência a solventes orgânicos, estabilidade frente a variações de pressão, temperatura e pH, e fácil regeneração por processo de pirólise tornam os suportes inorgânicos os mais adequados para o uso industrial, no entanto são de elevado custo (CASTRO et al., 2000). Já os suportes orgânicos oferecem grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser adicionados e/ou ativados nos suportes (HEINZE e LIEBERT, 2001) contribuindo para que a maioria das proteínas purificadas disponíveis comercialmente sejam obtidas com matrizes orgânicas.

Os suportes orgânicos naturais apresentam baixo custo, não causam danos ao meio ambiente, são estáveis a uma ampla faixa de pH (pH 3-13) e possuem alto conteúdo de grupos hidroxila disponíveis para ativação. Sua superfície hidrofílica geralmente não interage com proteínas e mostram baixa adsorção não específica. A desvantagem deste tipo de suporte é a baixa resistência mecânica relacionada à capacidade de inchamento e o fato de serem facilmente degradados. Já os suportes orgânicos sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que

podem ser combinadas para formar um suporte ideal e são mais resistentes à pressão do que os polissacarídeos, que mesmo em comparação com materiais inorgânicos, mostram uma tolerância de pressão inferior (DALLA-VECCHIA et al., 2004; TOZZI et al., 2003).

Ao analisar a influência dos parâmetros morfológicos quanto à escolha do tipo de suporte, os materiais com estrutura em gel são utilizados nos casos em que a rede formada seja de tamanho suficiente, de modo a reter a proteína sem ocasionar restrições difusionais ao substrato. Já os parâmetros de porosidade e distribuição dos poros determinam a área de superfície total disponível para que a purificação possa ocorrer, afetando efetivamente a capacidade de ligação da enzima. Os materiais porosos apresentam como vantagem a existência de uma grande área interna disponível para a purificação protegendo a biomolécula das condições externas, sendo geralmente os preferidos (GONÇALVES, 1996). No entanto, devem ter a distribuição dos poros controlada a fim de aperfeiçoar a capacidade e propriedades de fluxo (GEMEINER, 1992).

3.5 Criogel monolítico supermacroporoso

Criogéis são géis poliméricos monolíticos formados em condições de congelamento (LOZINSKY et al., 2001b). Apresentam estrutura esponjosa em corpo único com poros contínuos e interconectados, com dimensões que variam de 10 a 100 µm, de natureza hidrofílica, os quais são grandes o suficiente permitindo a livre passagem através do leito até mesmo de células inteiras, tais como células microbianas ou fragmentos de células, mesmo estas não sendo clarificadas, proporcionando uma maior permeabilidade devido à baixa resistência ao escoamento dos fluidos. Também configuram uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho e uma menor queda de pressão quando comparado a um leito empacotado convencional (PLIEVA et al., 2008; GUIOCHON, 2007; CHEN et al., 2008).

Como em toda cromatografia de adsorção, um adsorvente com uma grande área superficial por unidade de volume da coluna é desejável para maximizar a capacidade do adsorvente de afinidade. Géis hidrofóbicos com uma elevada relação de volume/superfície são muito adequados como matrizes (CARLSSON et al., 1998). Cromatografia utilizando como suporte o criogel monolítico supermacroporoso destaca-se como uma nova matriz de separação e purificação de proteínas e outras biomoléculas

(ARVIDSSON et al., 2003; ARVIDSSON et al., 2002; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2006; PLIEVA et al., 2004a).

Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel, apresentando uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008). São versáteis no seu uso, podendo ser elaborado em forma de colunas, discos ou membranas, sendo de baixo custo se comparados a matrizes tradicionais utilizadas em cromatografia (GUIOCHON, 2007).

Entre os possíveis polímeros empregados na síntese dos criogéis pela técnica da criogeleificação, destacam-se os monólitos macroporosos de poli(acrilamida), obtidos da polimerização de moléculas de acrilamida (AAm) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAm), adicionados ou não de outros monômeros, como o alil glicidil éter (AGE), sob condições de congelamento moderado (-10 °C a -20 °C) (PLIEVA et al., 2004a).

A taxa de reação para uma polimerização do radical livre não é uma simples função da temperatura do processo, que é constituído por várias reações consecutivas (SVEC e FRÉCHET, 2003). A formação de criogéis por crio-copolimerização é um processo complexo, que envolvem variáveis como a concentração dos monômeros, o controle da temperatura (abaixo de -10 °C), velocidade do congelamento da mistura, quantidade do agente de reticulação e a copolimerização do monômero. Esses parâmetros por sua vez estão diretamente ligados à morfologia do criogel formado. Quando a mistura aquosa dos monômeros é mantida congelada abaixo do seu ponto de congelamento, a cristalização dos monômeros e iniciadores se concentra em micro zonas ainda não congeladas enquanto que cristais de gelo são formados no restante do sistema. Dessa forma, um maior número de ligações entre os monômeros é realizado, formando-se um gel resistente (ARVIDSSON et al., 2003; YAO et al., 2006a). Os cristais de gelo formados irão então dar espaço aos supermacroporos interligados, ao se fundirem durante a etapa de descongelamento (Figura 3).

Tipicamente, a etapa de iniciação tem a maior energia de ativação, sendo assim a mais dependente da temperatura. Quanto mais baixa for a temperatura, maiores são os poros formados. A taxa de decomposição do iniciador, o número de radicais em crescimento, bem como a taxa global de polimerização é mais elevada a altas temperaturas. Portanto, a temperaturas mais elevadas, mais núcleos são formados ao mesmo tempo e todos eles competem para crescer com os monômeros remanescentes. A

taxa de nucleação é mais rápida que o inchamento, e a disponibilidade de monômeros fica esgotada depois de um curto período de tempo. Uma vez que o número de núcleos que crescem para o tamanho globular é grande, mas as suas dimensões permaneçam relativamente pequenas, os espaços vazios intersticiais entre pequenos glóbulos também são pequenos. Assim, o tamanho dos poros está inversamente relacionado com a temperatura de ambos os grânulos e monólitos. No entanto, uma vez que os efeitos dinâmicos não são afetados por temperatura, as diferenças nos perfis de porosidade entre as duas formas persisti (SVEC e FRÉCHET, 2003).

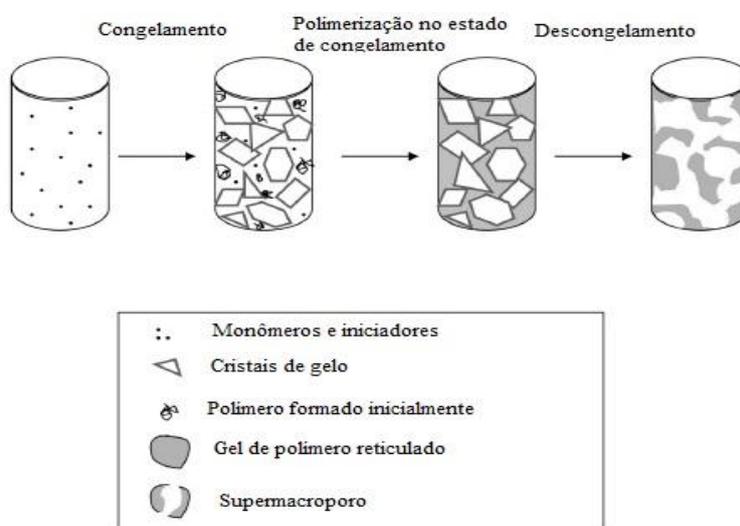


Figura 3 – Esquema da produção do criogel. Fonte: PLIEVA et al., 2004a.

Durante a produção do criogel sob condições de congelamento, os cristais de gelo que vão sendo formados atuam como agentes porogênicos (agente formador de poros), sendo que, após o derretimento desses cristais são formadas as cavidades dos criogéis, acarretando em uma estrutura monolítica supermacroporosa (LOZINSKY et al., 2001a; ARVIDSSON et al., 2003). O tamanho e a forma dos poros e a espessura das paredes de polímero entre os poros serão determinados pela forma e tamanho dos cristais de gelo formados durante o processo, assim como pela relação entre a solução não congelada e o solvente congelado (PLIEVA et al., 2008; ARVIDSSON et al., 2002, 2003). A presença desses poros nos criogéis é essencial, garantindo que o escoamento através do material ocorra a uma pressão menor quando comparado a leitos fixos empacotados, bem como apresentem condições favoráveis à transferência de massa de substratos e solutos (LOZINSKY et al., 2001b; ARVIDSSON et al., 2003; YAO et al., 2006a).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos criogéis poliméricos, a elevada porosidade de sua estrutura faz com que sua área superficial para adsorção seja significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, levando a uma menor eficiência teórica. Por isso o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área promissora e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações químicas ou físicas podem ser feitas, visando aumentar a eficiência dos processos de separação (ARVIDSSON et al., 2002; BABAC et al., 2006; KUMAR et al., 2006; YAO et al., 2007b).

3.6 Alterações na superfície dos suportes cromatográficos

Mesmo com a ampla variedade de suportes disponíveis, não há um que seja uma solução universal, visto que cada tipo de biomolécula e cada sistema apresentam suas peculiaridades. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos criogéis como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, várias metodologias de ativação de sua superfície são apontadas. As modificações da superfície do criogel são normalmente realizadas por meio da circulação das soluções contendo os agentes de ativação através da matriz polimérica ou por imersão do suporte (geralmente para criogéis em formato de disco) na solução contendo os grupos ligantes (KIM e HAGE, 2005).

As propriedades do material do suporte irão influenciar os processos de adsorção, a conformação e a atividade aparente das enzimas imobilizadas ou purificadas, bem como o tamanho e superfície química de impacto da natureza da enzima e do substrato na interface do material (TALBERT e GODDARD, 2012). Os grupos reativos são geralmente introduzidos na superfície da matriz do suporte para permitir a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte no passo subsequente. Com a introdução de novas estruturas químicas na superfície é possível obter fases estacionárias que interajam mais ou menos especificamente com uma proteína em particular (JANSON e JÖNSSON, 1998). Suportes com grupos epóxi sobre a superfície estão entre os mais utilizados devido ao fato de os grupos epóxi poderem facilmente reagir com grupos amina (NH_2), tiol (SH) ou hidroxila (OH) das proteínas e formar uma ligação covalente bem 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.

Entre as variadas matrizes existem diferenças notáveis com relação às propriedades químicas dos monômeros usados no processo, sendo este outro fator de considerável importância, principalmente em relação à presença de grupos funcionais específicos. O grupo funcional do monômero pode ser usado em uma etapa futura da reação como grupo de ancoragem para imobilizar os ligantes específicos ou para melhorar propriedades específicas tais como hidrofobicidade, hidrofobicidade, pH ou temperatura de ativação. Para aplicação adequada do monômero, monólitos com variadas atuações podem ser projetados. A maioria dos métodos de imobilização depende da presença de grupos hidroxilas na matriz e tem sido adaptado para o uso em soluções aquosas (ARRUA et al., 2009; CARLSSON et al., 1998).

Especificamente à cromatografia de afinidade, para a preparação do adsorvente o ligante deve ser compatível com os solventes usados durante o procedimento de acoplamento. Possuir pelo menos um grupo funcional através do qual possa ser imobilizado para a matriz (os grupos comumente usados incluem amina, tiol, hidroxila carboxila (COOH), e aldeído (CHO)) (CARLSSON et al., 1998).

O grupo funcional utilizado deve permitir a formação de uma ligação covalente estável de modo que o ligante não seja libertado a partir da matriz. Outro ponto também essencial é que o ligante permaneça intacto durante o processo de imobilização e que seja suficientemente estável permitindo a realização de uma cromatografia de afinidade eficiente. Isto pode ser difícil de obter quando as proteínas são acopladas a um pH elevado. É essencial que o reagente do ligante seja tão puro quanto possível e, em particular, não contenha substâncias com grupos funcionais que possam reagir de forma competitiva na imobilização (CARLSSON et al., 1998).

Dentre as modificações já avaliadas tem-se a imobilização na matriz polimérica, de derivados do ácido acrílico, metais, proteínas, entre outros, aumentando significativamente a capacidade de retenção dos compostos desejados (ARVIDSSON et al., 2002; BABAC et al., 2006; KUMAR et al., 2006; YAO et al., 2007b). Como metodologias de ativação da superfície dos criogéis tem-se a imobilização via ligação covalente, adsorção bioespecífica ou confinamento, braços espaçadores, ativação catiônica, dentre outras (KIM e HAGE, 2005; MALLIK e HAGE, 2006).

Entre tais modificações, uma técnica de grande interesse é a enxertia sobre o esqueleto polimérico utilizando um agente iniciador (técnica conhecida por *grafting from*), em que a ligação de grupos de interesse ocorre em regiões pré-ativadas da superfície do criogel. A enxertia usualmente é realizada de modo estático, com a

solução com o grupo a ser enxertado sendo deixada estagnada em contato com o criogel por um determinado período de tempo (SAVINA et al., 2005a; SAVINA et al., 2005b; YAO et al., 2007b; CHEN et al., 2008). Outro exemplo de destaque é o método da base de Schiff que utiliza a ligação covalente (LUO et al., 2002; MALLIK et al., 2004), a qual tende a ter uma taxa de reação mais rápida e resulta em maior atividade das biomoléculas do que muitos outros métodos baseados no acoplamento de grupos amina.

Vários estudos têm sido realizados com modificações na estrutura do suporte e/ou melhor utilização dos monômeros. Hahn et al. (2001) desenvolveu um suporte monolítico de afinidade com uma nova estratégia de imobilização, que consistiu em uma polimerização *in situ* do ligante. Neste estudo, o modelo do ligante (um peptídeo) foi reativado para um monômero da mistura de polimerização, antes que esta ocorresse. Depois do processo de polimerização, com o conjugado, um monômero foi formado e testado para acoplar à lisozima. O resultado mostrou uma afinidade alta e constante quando comparada com o obtido com o solvente convencional.

Outro estudo interessante foi o realizado por Quan et al. (2008), o qual relatou a interação específica entre lisozima e o composto tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Os autores confirmaram a interação específica através de cromatografia de afinidade entre lisozima e Tris imobilizado em uma coluna de sílica, determinando a constante de dissociação (K_d) com valor da ordem de 10^{-5} mol L⁻¹. Foi demonstrado que a força desta interação é suficiente para reter a lisozima, ao mesmo tempo que permite a eluição da proteína em condições moderadas, tal como solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,6 mol L⁻¹, de forma a manter a estrutura nativa da proteína e evitar a perda de atividade. Este trabalho revelou que o Tris é um bom candidato como ligante de afinidade para com a lisozima (QUAN et al., 2009).

A ligação específica da lisozima ao Tris se deve a sua sequência de aminoácidos, a sua estrutura molecular a qual pode ser catiônica em valores de pH abaixo de 11,2 (YILMAZ et al., 2005), apresentando grupos amina (NH₂) que se ligam especificamente as hidroxilas (OH) presentes na estrutura do Tris. Quan et al. (2008) observou ainda que os três grupos hidroxila da molécula de Tris formaram ligações de hidrogênio com Asp52, Glu35 e Ala107 da lisozima.

Zhang et al. (2011) baseado em estudos anteriores, que comprovaram a interação específica entre o Tris e a lisozima preparou novas microesferas magnéticas revestidas com sílica com alta magnetização e afinidade específica para com a lisozima, utilizando o Tris como o ligante de afinidade para funcionalizar as microesferas magnéticas

sintetizadas pelo método solvotérmico. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que as microesferas possuíam capacidade de ligação específica para a lisozima e que a lisozima extraída a partir da clara do ovo apresentou pureza semelhante à lisozima comercial. A reprodutibilidade e repetitividade do processo foram satisfatórias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa - MG.

4.1 Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED, 99%), acrilamida (AAM) (99%), N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAM) (99%), alil glicidil éter (AGE) (99%), persulfato de amônio (APS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), lisozima, pancreatina suína, α -lactoalbumina e albumina de soro bovina (BSA), todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Também foram necessários tampão fosfato de potássio, fosfato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), solução de Tris-HCl, borohidreto de sódio, carbonato de sódio, acetona, acetonitrila, ácido tricloroacético (TCA), dodecil sulfato de sódio (SDS), β -mercaptoetanol, metanol, azul de Coomassie, etanol e ácido acético. Todos os reagentes químicos utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura (Sistema Milli-Q, Millipore EUA) para o preparo das soluções.

4.2. Produção da coluna monolítica

A produção do criogel foi adaptada da metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). A matriz do criogel supermacroporoso de poli(acrilamida) foi produzida pela crio-copolimerização dos radicais livres de AAM, MBAAM e AGE, sendo iniciada pelo TEMED e APS, sob condições controladas de temperatura de congelamento à -12 °C. Os monômeros foram pesados em balança analítica (Ohaus Adventurer Pro, EUA) e a mistura reativa com concentração final de 10% m/v de monômeros (1,185 g de AAM, 0,3175 g de MBAAM e 1 mL de AGE) foi dissolvida em água ultrapura resfriada. Para melhor solubilização, a referida mistura de monômeros foi desgaseificada em banho ultrassom (Brason 1510R-MT, EUA) por cerca de 5 minutos. A polimerização foi iniciada pela adição de 0,055 g de APS solubilizado em 200 μ L de água miliQ, sendo retirado 100 μ L desta solução e acrescentado à solução de monômeros, e em seguida foi adicionado 23,8 μ L de TEMED para cada 25 mL de solução de monômeros. A mistura com todos os componentes já homogeneizados foi então rapidamente vertida em seringas plásticas de 3 mL e em uma coluna

cromatográfica de vidro HR 5/5, de 5 mm de diâmetro (Pharmacia Biotech, Suécia), as quais por sua vez foram seladas e imersas em um banho termostático (Ultracriostato Quimis Q214S, São Paulo, Brasil) contendo etanol à $(-12 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ por 18 h para a cristalização da água e polimerização dos monômeros. Decorrido este tempo, as colunas foram submetidas em temperatura de refrigeração para o descongelamento da água cristalizada presente em sua estrutura e posteriormente foram lavadas cada uma com 300 mL de água deionizada utilizando uma bomba peristáltica (Masterflex Easy-Load, Cole-Parmer Instrument Company, EUA) à vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (KUMAR et al., 2006; YAO et al., 2006a). Após a lavagem, os criogéis foram secos em estufa a $50 ^\circ\text{C}$ e armazenados em ambiente seco até o seu uso, onde foram hidratados com água destilada.

4.2.1 Ativação do criogel

Após o preparo dos criogéis, esses foram ativados através da ligação dos grupos amino das moléculas de Tris sobre os grupos epóxi do criogel, conforme metodologia adaptada por Quan et al. (2008). Tris (1 g) foi dissolvido em 20 mL de tampão fosfato de potássio ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,9) sendo essa solução bombeada através dos criogéis em modo reciclo por 48 h. Decorrido este tempo, 20 mL de solução de Tris-HCl ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,9) foi bombeada através da coluna por 3 h, para bloquear os sítios reativos residuais (grupos epóxi) sobre a superfície do criogel. Ambas as soluções foram bombeadas por meio da bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company, 7553-71, EUA) a uma vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, em modo reciclo e em dois valores de temperatura 50 e $60 ^\circ\text{C}$ mantida constante em uma estufa BOD (Eletrolab, EL 202). Posteriormente, foi bombeado 20 mL de água miliQ em temperatura ambiente seguida de 25 mL de borohidreto de sódio 1 mol L^{-1} em banho de gelo. Por fim, novamente em temperatura ambiente, a coluna foi lavada com mais 20 mL de água miliQ, sendo todas bombeadas a uma vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3 Caracterização morfológica e hidrodinâmica da coluna monolítica de criogel

Todas as caracterizações morfológicas e hidrodinâmicas foram realizadas em triplicada nos criogéis puros e ativados à temperatura de $60 ^\circ\text{C}$ com os grupos Tris.

4.3.1 Avaliação física e morfológica

4.3.1.1 Porosidade do leito

A porosidade do criogel (φ) com e sem ativação foi determinada com base na medida do conteúdo de água livre dos criogéis monolíticos, de acordo a metodologia proposta por Plieva et al. (2004b). O criogel produzido em seringa plástica teve retirado de sua região longitudinal uma fração de amostra de aproximadamente 2,5 cm, sendo desprezadas suas extremidades. A amostra retirada foi saturada com água deionizada em um béquer à temperatura ambiente.

A massa da amostra saturada com água foi então medida em balança analítica, sendo os criogéis posteriormente comprimidos delicadamente com as próprias mãos, para que fosse retirada a água livre do seu interior. Por fim, a amostra foi novamente pesada para a determinação da massa da amostra sem água livre. A partir destes dados a porosidade foi calculada (Equação 1) (PLIEVA et al., 2004b).

$$\varphi = \frac{m_w - m_e}{m_w} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: m_w é a massa da amostra saturada com água (kg); m_e é a massa da amostra espremida (kg).

4.3.1.2 Capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento (S (g H₂O / g criogel seco)) do criogel com e sem ativação foi determinada utilizando-se pedaços de criogel produzidos em seringas plásticas, secos em estufa a 50 °C até peso constante. Posteriormente as amostras foram resfriadas em dessecador e suas massas foram obtidas em balança analítica. Em seguida, as amostras foram reidratadas por imersão em 50 mL de água deionizada à temperatura ambiente por 24 h e suas massas foram medidas novamente. Para este cálculo foi utilizada a Equação 2 (SAVINA et al., 2005b):

$$S = \frac{m_w - m_s}{m_s} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: m_w é a massa da amostra saturada com água (kg); m_s é a massa da amostra desidratada (kg).

4.3.1.3 Estrutura dos poros

Para a determinação da estrutura dos poros do criogel produzido foi realizada a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Três pequenas porções da parte

central longitudinal da coluna monolítica do criogel com e sem ativação foram secas em BOD a 50 °C até apresentarem peso constante, sendo cortadas manualmente. Posteriormente, as amostras foram fixadas com auxílio de uma fita adesiva em suportes apropriados (stub) e metalizadas com uma camada de 20 nm de ouro (modelo 550X, SEM Electron Microscopy Sciences, Kent, Inglaterra). Após este procedimento, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo 1430 VP (LEO, Zeiss, Jena, Alemanha), operado a 10 kV.

4.3.2 Caracterização hidrodinâmica

4.3.2.1 Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento foi determinada por meio da medida da vazão volumétrica da fase móvel na saída da coluna contendo o criogel em função da variação da pressão na coluna. Para tanto, a coluna cromatográfica HR 5/5, de 5 mm de diâmetro (Pharmacia Biotech, Suécia) foi acoplada ao sistema ÄKTA (ÄKTA pure 25M, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia), um cromatógrafo líquido preparativo. Água destilada foi bombeada em diferentes vazões para determinação das pressões correspondentes.

Os dados de pressão versus vazão do fluido foram ajustados empregando a Equação de Darcy (Equação 3), para escoamento em meios porosos, a partir dos dados experimentais obtidos.

$$K_w = -\frac{\mu_w L}{A} \cdot \frac{Q_w}{\Delta P_w} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: K_w é a permeabilidade ao escoamento (m^2); Q_w é a vazão volumétrica de água pela coluna ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$); μ_w é a viscosidade da água (Pa s^{-1}); L é o comprimento da coluna (m); A é a área da seção transversal da coluna (m^2); ΔP_w é a queda de pressão através da coluna (Pa).

4.3.2.2 Distribuição do tempo de residência (DTR) e do coeficiente de dispersão axial aparente

Para a determinação das curvas de DTR e do coeficiente de dispersão axial aparente em função da velocidade de escoamento da fase móvel foi utilizado o método do pulso traçador (YAO et al., 2006a; YAO et al., 2006b). Pulsos de 0,1 mL de uma solução de acetona 1,0% (em volume) foram injetados na coluna cromatográfica contendo o criogel, a temperatura constante de 25 °C, com a vazão da fase móvel

variando de 0,049 mL min⁻¹ a 0,884 mL min⁻¹. O efluente foi monitorado continuamente determinando sua absorvância a 280 nm.

Os tempos de retenção e as variâncias para os pulsos observados foram calculados utilizando-se o método dos momentos utilizado para leitos fixos empacotados (FURUSAWA et al., 1976). O primeiro momento estatístico que fornece o tempo de retenção t_R foi calculado a partir da Equação 4, na forma discretizada.

$$M_1 = t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: M_1 é o primeiro momento estatístico (s); t_R é o tempo de retenção (s) da curva de DTR; t_i é o tempo (s) em que a i -ésima observação foi registrada; Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$); Abs é a absorvância registrada no tempo t_i . Sendo a concentração diretamente proporcional à medida de absorvância observada (dentro dos limites da Lei de Lambert-Beer), podemos utilizar os valores de absorvância diretamente.

O segundo momento estatístico que representa a variância da distribuição do tempo de residência centrada no valor do tempo de retenção calculado no primeiro momento, é dado por:

$$M_2 = \sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad \text{Eq. 5}$$

Onde: M_2 é o segundo momento estatístico (s²), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento; σ^2 é a variância do pulso observado (s²).

Uma vez determinados esses valores, o coeficiente de dispersão axial em cada vazão foi calculado a partir da solução numérica da Equação 6, utilizando-se o método iterativo de Newton.

$$\frac{\sigma_t^2}{t_R^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(\frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad \text{Eq. 6}$$

Onde: σ^2 é a variância de residência média da curva de DTR; D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial (m² s⁻¹); L é a altura do leito (m); u é a velocidade intersticial (m s⁻¹) da fase móvel.

Tendo que ($u = U \cdot \varphi$), φ é o valor da porosidade do leito (calculada no item 4.3.1.1 pela Eq. 1) e U a velocidade superficial do líquido (m s⁻¹). Os experimentos foram realizados no sistema ÄKTA, com três repetições.

4.4 Experimentos adsortivos

4.4.1 Adsorção da lisozima pura

O estudo adsortivo da solução de lisozima foi realizado utilizando-se o sistema ÄKTA a 25 °C, com leitura em 280 nm e vazão de 0,5 mL min⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata com os criogéis ativados em coluna cromatográfica HR 5/5 em duas diferentes temperaturas 50 e 60 °C variando o pH e força iônica do tampão de equilíbrio para assim avaliar o efeito destas variáveis sobre o processo adsortivo. Todas as soluções aplicadas no sistema cromatográfico foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade e desgaseificadas em banho ultrassom (Brason 1510R-MT, EUA), para remover partículas e agregados que por ventura poderiam vir a possuir.

Para o processo adsortivo, foram aplicadas as seguintes fases móveis: solução-tampão de fosfato de sódio 0,02 mol L⁻¹ e solução tampão de fosfato de sódio 0,02 mol L⁻¹ + NaCl 1 mol L⁻¹. Ambas foram preparadas nos valores de pH, 6,0, 7,0 e 8,0, a partir da mistura em proporções adequadas de fosfato de sódio monobásico e bibásico, sendo o valor final do pH conferido e ajustado com uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ utilizando-se um potenciômetro de bancada (precisão de 0,01, Modelo Q400A, Quimis, São Paulo, Brasil). A solução de lisozima foi preparada nos tampões correspondentes à fase móvel.

Primeiramente, a coluna do criogel foi equilibrada com o tampão fosfato de sódio 0,02 mol L⁻¹ com 5 VC, em seguida injetado uma solução da lisozima pura de 0,5 mg mL⁻¹. Após sua adsorção, a coluna foi lavada com 5 VC de tampão de equilíbrio fosfato de sódio 0,02 mol L⁻¹, seguindo da eluição da proteína com 5 VC do mesmo tampão contendo NaCl 1 mol L⁻¹, sendo coletada frações de 5 mL do eluído para posterior análise. Por fim, a coluna foi regenerada com o tampão de equilíbrio em 10 VC, para novas análises. O mesmo procedimento foi realizado para todas as fases móveis nos diferentes valores de pH. Na Tabela 5 são apresentados os valores dos parâmetros utilizados neste processo.

Tabela 5 – Parâmetros aplicáveis ao processo adsortivo.

Variáveis	Valores correspondentes
Temperatura de ativação	50 e 60 °C
pH	6,0; 7,0 e 8,0
Tampão de equilíbrio	Fosfato de sódio 0,02 mol L ⁻¹ e Fosfato de sódio 0,02 mol L ⁻¹ + NaCl 0,1 mol L ⁻¹
Tampão de eluição	Fosfato de sódio 0,02 mol L ⁻¹ + NaCl 1 mol L ⁻¹

4.4.2 Caracterização das amostras dos eluídos

As amostras dos eluídos obtidos a partir da adsorção da lisozima foram analisadas em um cromatógrafo líquido (SHIMADZU, modelo LC-10AD VP, detector UV-Visível e integrador Shimadzu SCL-10^a VP), sendo utilizada uma coluna de fase reversa apHeraTM C18 Polymer (25 cm x 4,6 mm; 5 µm), Supelco.

A metodologia utilizada nas análises de proteína foi adaptada de Liao et al. (2001). A análise foi conduzida a temperatura de 30°C com uma vazão de 0,5 mL min⁻¹, fase móvel composta por um gradiente de acetonitrila e solução aquosa de ácido trifluoracético (0,1% v/v), seguindo a programação sumarizada na Tabela 6. Uma amostra de 50 µL foi injetada e a detecção se deu em comprimento de onda de 220 nm. As amostras foram previamente filtradas em filtros de nylon de 0,22 µm e as soluções foram degaseificadas e filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Millipore, Bedford MA, EUA).

Tabela 6 – Programação do gradiente da fase móvel do método cromatográfico.

Tempo (min)	Percentual de Acetonitrila (%)
0-40	10-40
40-45	40
45-50	40-80
50-55	80
55-60	80-10
60-70	10

Fonte: LIAO et al., 2001

4.4.3 Especificidade da coluna

A análise da especificidade da coluna monolítica para com a lisozima foi realizada no sistema ÄKTA, sendo utilizadas outras três proteínas, α -lactoalbumina, BSA e a pancreatina suína. Soluções destas proteínas, em concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, foram preparadas na condição que se apresentou com maior nível de purificação da solução de lisozima e assim realizou-se o mesmo procedimento adsortivo aplicado a solução de lisozima pura para estas três proteínas, como descrito previamente para adsorção da lisozima.

4.4.4 Isotermas de adsorção

A partir dos resultados obtidos com o processo adsortivo da solução de lisozima pura foi escolhida a condição onde se apresentou o maior nível de purificação da proteína para ser aplicado à determinação da capacidade da coluna (isoterma de adsorção), variando apenas a concentração da proteína.

Para a determinação das isotermas de adsorção da lisozima foi empregado o método de análise frontal (FONTAN, 2005). Esta metodologia se baseia na análise de diferentes valores de q (quantidade de soluto adsorvido) e das concentrações de soluto no equilíbrio correspondente (C).

Os ensaios consistiram inicialmente em equilibrar a coluna monolítica com 30 mL de solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, a uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Em seguida, a solução de lisozima em concentração de $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ foi bombeada através do leito a mesma vazão, até a completa formação da curva de ruptura. Subsequentemente, a concentração de proteína era aumentada para outro valor até que ocorresse a formação e estabilização da nova curva de ruptura. Tal procedimento foi executado sucessivamente até a concentração de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. O perfil de curva obtido durante os ensaios está representado na Figura 4.

Após cada experimento, a coluna foi regenerada com 30 mL de tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo NaCl (1 mol L^{-1}) e, em seguida, com 30 mL de tampão fosfato de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl.

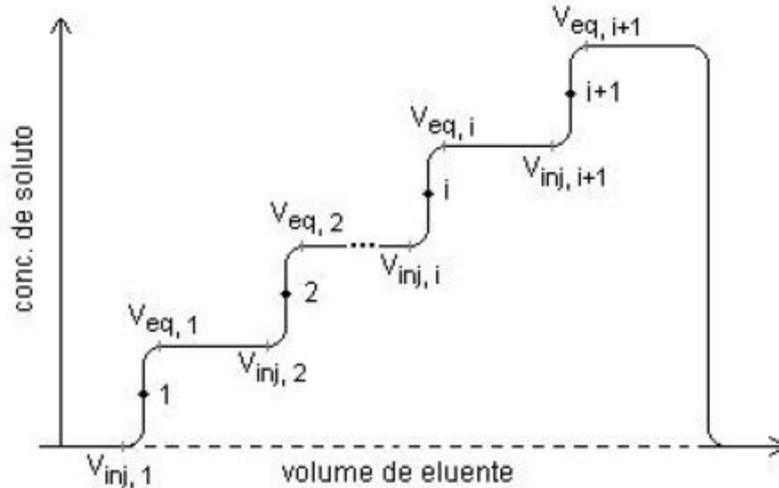


Figura 4 – Perfil obtido no experimento de análise frontal. Fonte (FONTAN, 2005).

A área entre o ponto em que a concentração de soluto foi modificada e o ponto de inflexão da curva de ruptura produzida forneceu o valor da quantidade de soluto adsorvido neste estágio determinado através da Equação 7 (GUIOCHON et al., 1994).

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(C_{i+1} - C_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad \text{Eq. 7}$$

onde q_i e q_{i+1} são as quantidades de soluto adsorvido por volume de adsorvente (expressas em mg mL^{-1}) no i -ésimo e no $(i+1)$ -ésimo passo, respectivamente, quando no equilíbrio com as concentrações C_i (mg mL^{-1}) e C_{i+1} (mg mL^{-1}). A variável $V_{F,i+1}$, é o volume (mL) entre o ponto de inflexão da i -ésima e a $(i+1)$ -ésima curva de ruptura, V_0 é o volume (mL) não-preenchido da coluna, e V_a é o volume (mL) de adsorvente na coluna.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE das amostras da mistura de proteínas (BSA, α -lactoalbumina e pancreatina suína) foi realizada para avaliar a especificidade da coluna de criogel em relação a essas proteínas. Foi preparado um sistema vertical de eletroforese em gel (E-C Apparatus Corporation), mediante o uso de géis de empilhamento com concentração de 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8) e géis de separação com 15% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,8), contendo 0,4% (m/v) de dodecilssulfato de sódio (SDS).

As amostras foram dissolvidos em 250 μL de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidos a

90°C por 10 min, e volumes de 40 µL das amostras desnaturadas foram aplicados nos géis. Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel com 12% de TCA durante 12 h e coradas com 0,1% de azul de Coomassie dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 18 h. A descoloração foi realizada durante a noite com uma solução 30% de etanol e 7,5% de ácido acético (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada em 110 V.

4.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Visando determinar a influência dos fatores temperatura (°C) de ativação do adsorvente, força iônica (mol L^{-1}) e pH sobre o rendimento de adsorção da lisozima (Y), foi realizado um experimento num esquema fatorial $2 \times 2 \times 3$, com três repetições, sendo utilizados os níveis de temperatura de 50 e 60 °C, força iônica de 0,0 mol L^{-1} e 0,1 mol L^{-1} (em relação ao NaCl adicionado no tampão) e pH de 6,0, 7,0 e 8,0 em um total de 36 unidades experimentais.

Os resultados experimentais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância ($p=0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (Tabela 8) utilizando o software SAS v.9. Neste caso, os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os resultados experimentais também foram submetidos à Análise de Regressão e a adequação do modelo foi avaliada por meio do teste de Fischer (F-test), testando a significância da regressão, a falta de ajuste do modelo e o coeficiente de determinação múltipla (R^2). Cada parâmetro do modelo (β_i) foi submetido ao teste t de Student. Parâmetros com menos de 95% de significância ($p>0,05$) foram reunidas dentro do termo de erro.

Para a obtenção da isoterma foram utilizados 19 pontos experimentais, com concentração inicial de lisozima variando de 0,005 mg mL^{-1} a 0,3 mg mL^{-1} , com três repetições cada. A fase móvel foi composta de solução-tampão de fosfato de sódio 0,02 mol L^{-1} com concentração fixa de NaCl de 0,0 mol L^{-1} . Os experimentos foram realizados no sistema ÄKTA, com temperatura mantida constante a 25 °C.

O modelo de Langmuir (1916), Equação 8, foi ajustado aos resultados experimentais da isoterma.

$$q = \frac{q_{max} \cdot C}{K_d + C} \quad \text{Eq. 8}$$

onde q é a quantidade de soluto adsorvido (mol L^{-1}); q_{max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente (mol L^{-1}); K_d é relacionada à constante de equilíbrio de

adsorção (mol L^{-1}); C é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio (mol L^{-1}).

Os parâmetros q_{max} e K_d foram estimados por meio de uma regressão não-linear, utilizando o *software* SAS v.9 (SAS Institute Inc., v. 9.0, Cary, NC, USA). A avaliação do ajuste do modelo foi feita com base no coeficiente de determinação (R^2), nos testes de significância dos parâmetros e descrição do fenômeno observado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz contínua supermacroporosa do criogel monolítico foi produzida a partir da crio-copolimerização (polimerização com temperaturas abaixo de zero) dos monômeros de AAm (principal co-monômero), MBAAm e AGE dissolvidos em solução aquosa como descrito previamente (Figura 5). O TEMED foi adicionado para acelerar a taxa de polimerização e o AGE para ser doador dos grupos epóxi reativos na estrutura do criogel, os quais foram usados posteriormente para a imobilização covalente do ligante de afinidade. A polaridade desses grupos serve para criar forças de interação entre a molécula epóxi e a superfície adjacente a ela (CARVALHO, 2010; NOPPE et al., 2007).

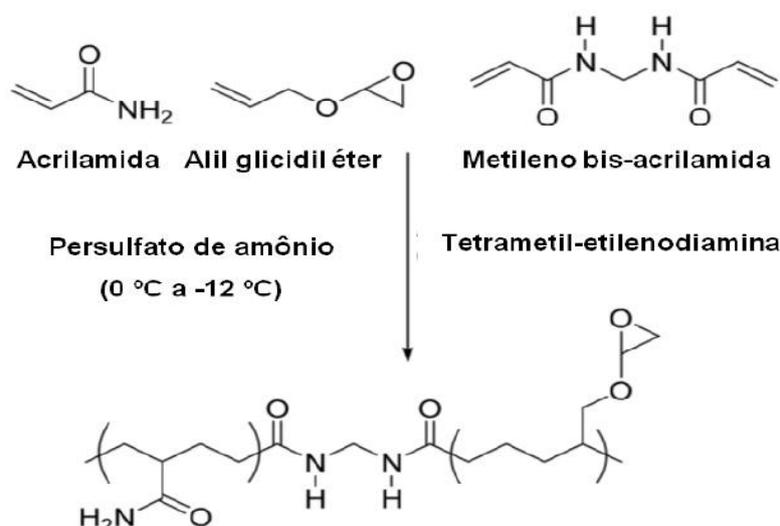


Figura 5 - Reação de crio-copolimerização dos monômeros AAm, AGE e MBAAm para o preparo do criogel. Fonte: MALLIK e HAGE, 2006.

Sendo os criogéis preparados sob condições de temperatura de congelamento constante, suas microestruturas e propriedades são influenciadas tanto pela temperatura, quanto pela concentração de monômeros e quantidade de agente de reticulação. Em geral, a produção do criogel é um processo relativamente simples e altamente reprodutível.

Os criogéis apresentaram estruturas consistentes, cilíndricas, esponjosas, lisas, porosa e de cor esbranquiçada (Figura 6), como relatada em outros trabalhos encontrados na literatura para outros criogéis (PERSSON et al., 2004; ARVIDSSON et al., 2002; YAO et al., 2006a). A quantidade adicionada de AGE proporcionou uma estrutura mais rígida ao criogel, quando comparado a outros feitos com menor concentração deste composto. Ao serem retirados das colunas, os criogéis puderam ser

facilmente comprimidos com as mãos, sendo removido o excesso de água livre no interior dos poros sem terem sua estrutura danificada (esta água retirada do criogel corresponde ao volume de seus poros) e ao serem mergulhados em água sua estrutura foi rapidamente restaurada à forma original. O mesmo ocorreu após o processo de desidratação (quando os criogéis foram colocados em estufa BOD) e reidratação dos mesmos.

Após o preparo da coluna do criogel, a molécula do Tris foi ligada quimicamente à sua superfície. Os grupos amino do Tris ligaram-se diretamente aos grupos epóxi do criogel por ligações covalente, deixando a superfície da coluna adequada para posterior ligação específica com as moléculas da lisozima.

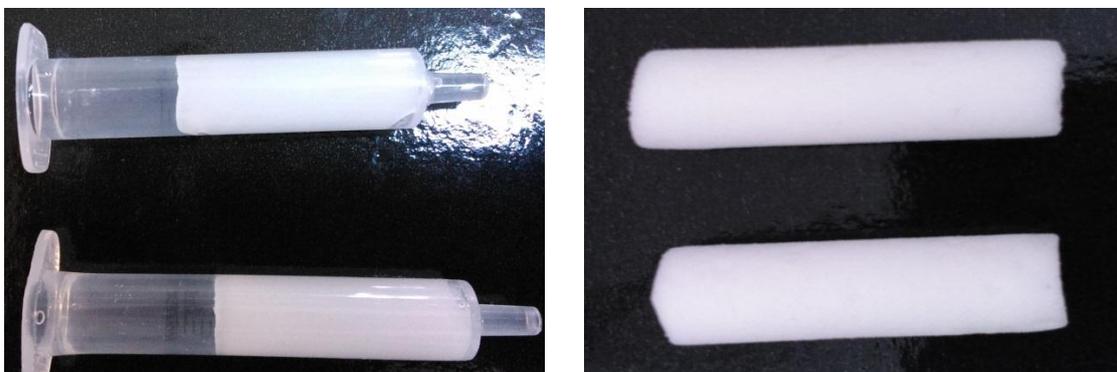


Figura 6 – Imagens dos criogéis produzidos no presente trabalho, por criocopolimerização.

5.1 Caracterização morfológica e hidrodinâmica do criogel

5.1.1 Porosidade e capacidade de inchamento do leito

Os criogéis foram caracterizados e os resultados médios obtidos para porosidade e a capacidade de inchamento são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores obtidos para porosidade e capacidade de inchamento.

Parâmetro	Criogel puro	Criogel Ativado
Porosidade (%)	0,866 ± 0,021	0,824 ± 0,014
Capacidade de inchamento (kg/kg)	13,820 ± 0,612	13,732 ± 0,575

A partir destes resultados, observa-se que a porosidade dos criogéis sem e com ativação foram de 86,6 e 82,4%, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro da faixa de 70 a 85% encontrada por outros autores que trabalharam com criogéis

preparados com os mesmos compostos, no entanto com concentrações diferentes (YAO et al., 2006a; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007a; YAO et al., 2007b; CARVALHO, 2010; YAN et al., 2011). Valores superiores foram reportados na literatura para criogéis monolíticos com 7% de monômeros totalizando cerca de 91% dos poros totais (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2004b).

Quanto à capacidade de inchamento, a diferença nos valores encontrados para o criogel puro e ativado também foi pequena tendo o criogel puro valor um pouco superior ao do ativado. A avaliação da capacidade de inchamento é uma medida de expansão da matriz de criogel, assim quanto maior esse valor, mais maleáveis são as matrizes (após inchamento) e, provavelmente, menores pressões suportariam (CARVALHO, 2010).

Foi observado valor de capacidade de inchamento para o criogel sem e com ativação, de cerca de 13,82 kg e 13,73 kg de água para cada quilograma de criogel desidratado, respectivamente. Savina et al. (2005b) observou que após a ativação do criogel produzido, a capacidade de inchamento foi menor para o criogel ativado quando comparado ao criogel puro até determinado valor de pH. No entanto, este mesmo autor obteve valores superiores ao do presente estudo, o qual foi próximo a $18 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$, para criogéis supermacroporoso puros com 6% de monômeros. Outros autores relatam valores menores para a capacidade de inchamento dos criogéis produzidos, com concentrações de monômeros também menores, variando entre 2,8 a $6 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ARVIDSSON et al., 2003; ARVIDSSON et al., 2002; ERGÜN et al., 2007; DERAZSHAMSHIR et al., 2008). Esta grande variação pode ocorrer devido à variação dos cálculos realizados, onde esses autores não consideram a água livre no interior dos macroporos, retirando-a do seu interior por meio do vácuo (FONTAN, 2013), o que não foi realizado no presente trabalho.

Em média, o polímero seco, com água de ligação constitui apenas 5 - 6% do peso total de um criogel completamente inchado. Cerca de 6 - 7% do peso é composto de água fortemente ligada pelo polímero. Juntos, polímero e água fortemente ligada, formam as paredes dos poros. O restante, cerca de 88% do peso do criogel, é devido à água no interior dos poros. Mais de 50% da água pode ser espremida mecanicamente a partir das amostras monolíticas inchadas, indicando que a maior parte do volume do criogel é composta de grandes poros interligados (PLIEVA et al., 2004a).

5.1.2 Estrutura dos poros por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 7 são apresentadas as micrografias obtidas pelo MEV dos criogéis preparados a partir da crio-copolimerização antes e após o processo de ativação com o Tris.

A partir destas micrografias é possível observar que o processo de ativação não afetou significativamente a estrutura macroporosa do criogel, a qual se apresentou de forma homogênea, bem distribuída, interconectada, com poros largos, paredes lisas e elásticas, variando o diâmetro de 10 μm a 100 μm , com ausência de poros fechados, característica também observada por outros autores (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2004b; YAO et al., 2006a; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007b; ARVIDSSON et al., 2002, CHEN et al., 2008). Este tamanho dos poros confirma que a estrutura do criogel supermacroporoso permite a passagem de macromoléculas como células microbianas, fragmentos celulares, soluções contendo partículas até mesmo sem serem clarificadas (PLIEVA et al., 2008; GUIOCHON, 2007).

No caso da proteína lisozima, sua passagem pelos poros do criogel pode ser facilmente realizada, pelo de conhecimento de dados da literatura, sobre seu tamanho molecular de 3.0 x 3.0 x 4.6 nm e diâmetro de 27,3 Å . Tendo fluxo convectivo da solução através dos poros, a resistência à transferência de massa é praticamente negligenciável (DERAZSHAMSHIR et al., 2008).

A MEV é usada para caracterizar a fina estrutura do material poroso apenas em seu estado seco. Para muitos materiais macios e altamente hidratados esta técnica pode ser dificilmente usada para amostras preparadas para o MEV. No caso dos criogéis, o MEV pode ser confiavelmente usado devido a excelente estabilidade mecânica do material do criogel produzido a partir da acrilamida (ARVIDSSON et al., 2002; PLIEVA et al., 2004b; PLIEVA et al., 2006).

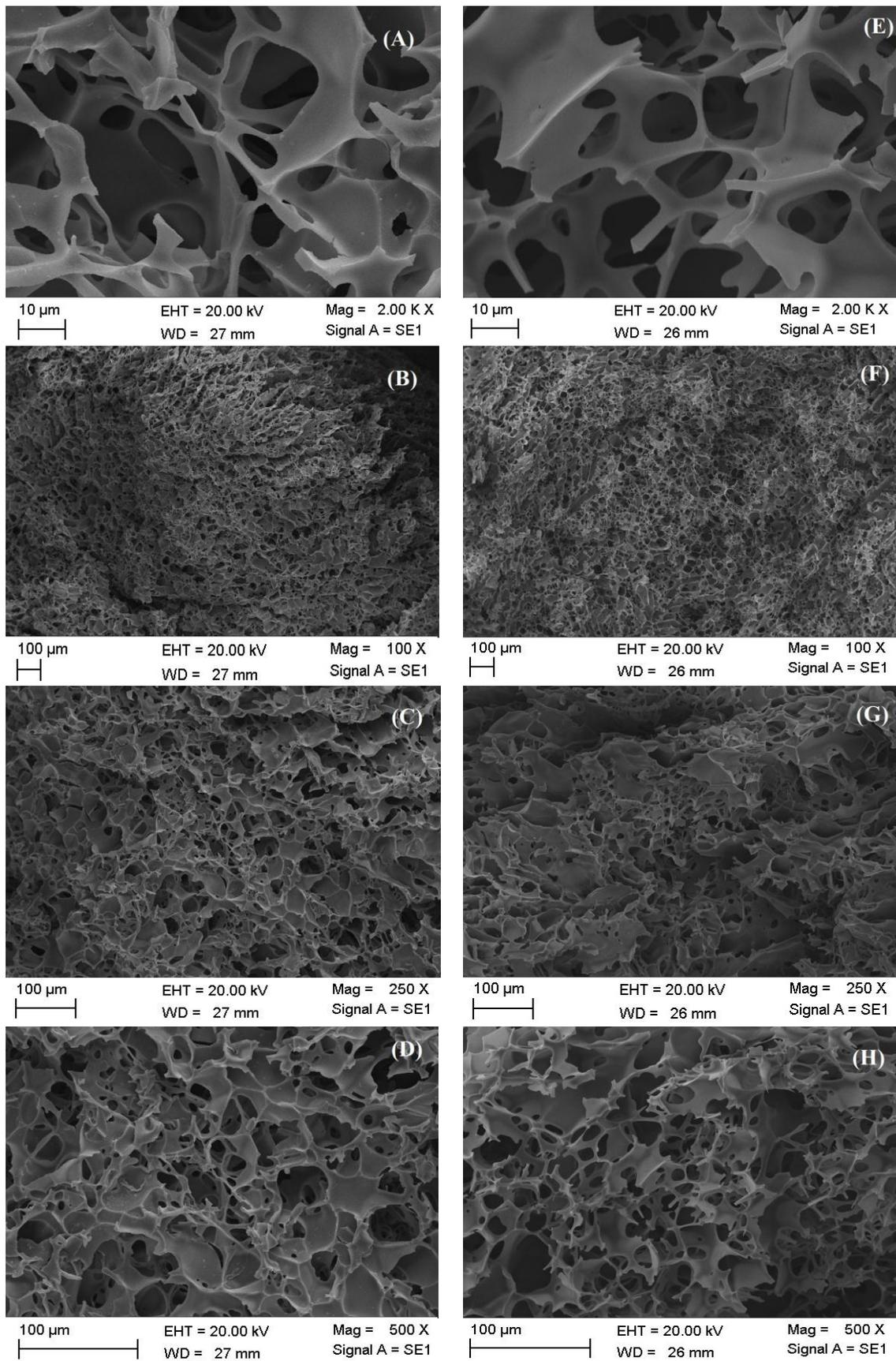


Figura 7 – Micrografias de MEV dos criogéis produzidos. (A) a (D) criogéis puros, e de (E) a (H) criogéis ativados com o Tris.

5.1.3 Permeabilidade ao escoamento

A partir dos resultados experimentais de vazão em função da diferença de pressão (Figura 8) os coeficientes angulares das retas foram ajustados estimando-se assim a constante de permeabilidade. É possível observar que no inicialmente, a uma mesma vazão a queda de pressão através das duas colunas dos criogéis foi próxima. Com o aumento da vazão, a queda de pressão se elevou proporcionalmente para ambas as colunas, sendo que a partir de uma vazão de aproximadamente $0,3 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, o criogel ativado apresentou maior queda de pressão do que o criogel puro.

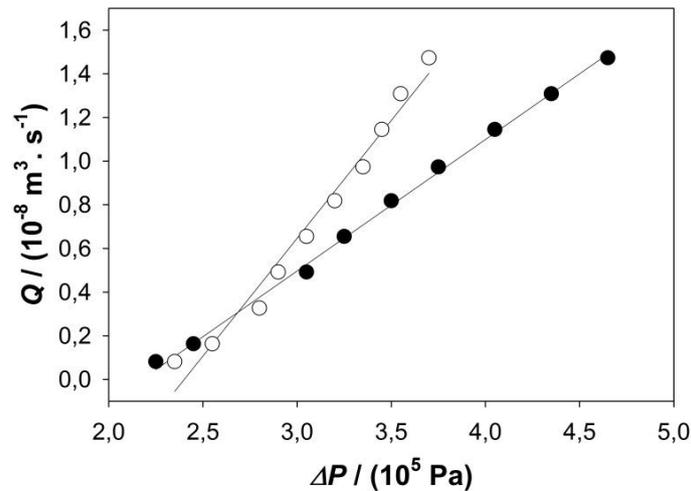


Figura 8 - Dados experimentais e equações ajustadas para a vazão volumétrica em função da queda de pressão relativos à coluna de criogel ativada (●) e ao criogel puro (○).

Os valores de permeabilidade para o criogel puro e ativado foram de $K_w = 3,084 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ e $K_w = 2,074 \times 10^{-14} \text{ m}^2$, respectivamente, evidenciando assim que o processo de ativação não proporcionou grandes alterações sobre a permeabilidade dos criogéis. Estes valores são inferiores aos encontrados por outros autores, ao caracterizarem criogéis de acrilamida tanto puros como ativados, que se apresentaram na faixa de ordem de 10^{-11} m^2 a 10^{-13} m^2 (CARVALHO, 2010; FONTAN, 2013; CHEN et al., 2008; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007b; YAO et al., 2007a; YAN et al., 2011). Isto pode ter ocorrido pelo fato de que os criogéis produzidos no presente trabalho possuem cerca de 10% de monômeros, valor superior a concentração usada por estes autores (cerca de 4 a 7% de monômeros), o que sugere que quanto maior a concentração de monômeros, menor será a permeabilidade apresentada pelo criogel. Isto pode ser explicado que a área efetiva total para o escoamento do fluido dentro do criogel, reduz as cadeias do

polímero ativado sobre a parede do poro o qual leva a um aumento da resistência do fluxo e a diminuição da permeabilidade (CHEN et al., 2008).

De acordo a Equação de Darcy (Equação 4) é possível observar que a vazão é diretamente proporcional ao coeficiente de permeabilidade (k_w) assumindo-se mesma estrutura geométrica, mesma diferença de pressão e mesmas propriedades do fluido. Assim, a permeabilidade da coluna pode ser definida como a sua capacidade de permitir o fluxo do fluido através de seus poros.

5.1.4 Distribuição do Tempo de Residência e do Coeficiente de Dispersão Axial Aparente

As curvas de DTR foram medidas em velocidades superficiais do líquido de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$. As curvas apresentaram variações aparentes para coluna de criogel puro e ativada, como pode ser observado na Figura 9. Em ambas, observa-se que houve um alargamento do pico com a redução da velocidade superficial, sugerindo um aumento da dispersão axial com a diminuição da velocidade, logo, o tempo de retenção da amostra injetada no interior da coluna adsorvente é inversamente proporcional à velocidade superficial do líquido. Comportamento semelhante foi obtido por outros autores com criogéis ativados (YAO et al., 2006b; YAO et al., 2006a; CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2007).

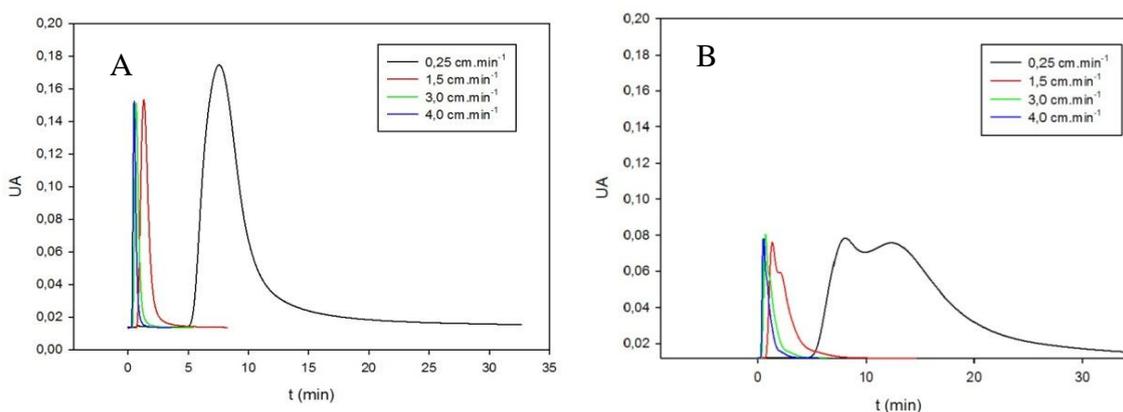


Figura 9 – Curva de distribuição do tempo de residência em diferentes velocidades para o criogel puro (A) e o criogel ativado (B).

Uma diferença no comportamento das curvas entre as colunas dos criogéis analisados foi observada. O criogel puro apresentou picos mais altos e com menores larguras, quando comparado ao criogel ativado. Além disto as curvas da DTR do criogel

puro se mantiveram mais uniforme, ao contrário do criogel ativado onde algumas de suas curvas apresentaram ligeiras deformações. Isto pode ser explicado pela possível distribuição não uniforme dos poros presentes na estrutura do criogel ativado, o que levou a um maior tempo da amostra injetada dentro do criogel ativado do que no puro. Esta característica também foi reportada por Chen et al. (2008), ao comparar seus criogéis puros e ativados.

De acordo com a estrutura dos monólitos, o transporte de soluto dentro da coluna do criogel monolítico procede principalmente por convecção e dentro dos poros presentes na coluna do criogel, ocorre por difusão (HAHN et al., 2002).

Os coeficientes de dispersão axial, calculados de acordo a equação 6, são mostrados na Figura 10 em função das velocidades superficiais do líquido de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 cm.min⁻¹. Os valores encontrados estão na faixa de 10⁻⁸ a 10⁻⁶ para o criogel puro, e de 10⁻⁸ a 10⁻⁵ para o criogel ativado. Estes resultados estão próximos a outros trabalhos encontrados na literatura (YAO et al., 2006^a; YAO et al., 2006b).

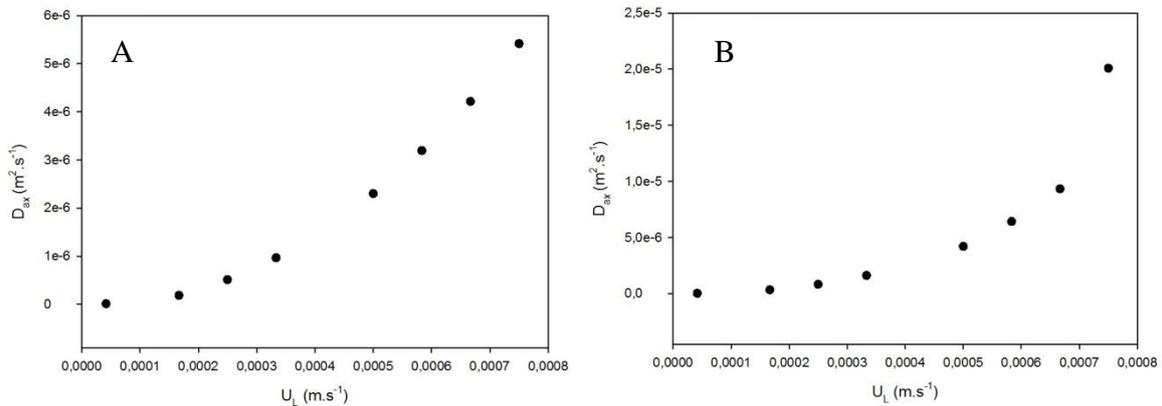


Figura 10 – Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais para o criogel puro (A) e o criogel ativado (B).

Em ambos criogéis, os coeficientes são proporcionais as velocidades superficiais aplicadas e, ao se elevar a velocidade superficial do líquido injetado, o transporte convectivo do soluto dentro dos poros é favorecido, levando a um aumento dos coeficientes de dispersão axial de forma exponencial. Esta relação pode ser expressa pelas equações 9 e 10 para o criogel puro e ativado, respectivamente.

$$D_{ax} = 103111U^{2,1638} \quad \text{Eq. 9}$$

$$D_{ax} = 900204U^{2,3023} \quad \text{Eq. 10}$$

5.2 Análises cromatográficas

5.2.1 Adsorção de lisozima pura por cromatografia de afinidade

Para verificação da adsorção da lisozima na coluna monolítica, foram avaliados três parâmetros, pH do meio, força iônica e a temperatura da etapa de ativação das colunas. Assim as análises foram realizadas em 12 tratamentos, os quais são retratados na Tabela 8. Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento 8 apresentou melhor rendimento no processo adsortivo da lisozima, mostrando que a interação desta proteína com o ligante imobilizado no suporte foi influenciada pelos três parâmetros analisados.

Tabela 8 – Influência dos fatores temperatura (°C) de ativação do adsorvente, força iônica (mol L⁻¹) e pH sobre o rendimento de adsorção da lisozima (Y).

Tratamento	Temperatura de ativação (°C)	pH	Força iônica (mol L ⁻¹)	Y (%)
1	50	6,0	0	4,264 ^c ± 0,083
2	50	7,0	0	5,531 ^c ± 0,214
3	50	8,0	0	0,242 ^c ± 0,007
4	50	6,0	0,1	0,330 ^c ± 0,020
5	50	7,0	0,1	0,232 ^c ± 0,019
6	50	8,0	0,1	0,064 ^c ± 0,002
7	60	6,0	0	13,482 ^b ± 0,245
8	60	7,0	0	33,704 ^a ± 3,055
9	60	8,0	0	13,661 ^b ± 0,045
10	60	6,0	0,1	0,221 ^c ± 0,020
11	60	7,0	0,1	0,178 ^c ± 0,003
12	60	8,0	0,1	1,153 ^c ± 0,031

*Valores médios com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pela ANOVA teste de Tukey ($p=0,05$).

Foram realizadas análise de regressão linear, no entanto os modelos lineares ajustados não apresentaram bons coeficientes de determinação, R², sendo estes menores que 0,68 tanto para os criogéis ativados a 50 °C quanto para os criogéis ativados a 60 °C. A partir desta análise também foi verificado que somente o fator força iônica foi significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste t, entretanto, observou-se que nos diferentes valores de pH os valores de rendimento de adsorção foram bastante

distintos, o que pode ser notado nos resultados da Tabela 8. Assim, sugere-se a realização de mais experimentos para a verificação da significância ou não do fator pH.

A capacidade adsorptiva realizada em pH 7,0, na temperatura de 60 °C e força iônica 0,0 mol L⁻¹ apresentou maior rendimento, sendo reduzido com a elevação ou redução do valor de pH. A alcalinidade do meio é um importante fator que influencia as interações entre o adsorvente e a molécula alvo a ser purificada, bem como entre o ligante e a molécula alvo, a qual foi bombeada através da coluna. Isto se deve ao fato de que a depender do valor do pH as interações entre as moléculas podem vir a ser mais ou menos favorecidas, podendo até mesmo não se realizarem, visto que as cargas superficiais das moléculas são influenciadas pelo pH do meio em que se encontram. Quanto mais próximo ao ponto isoelétrico da proteína, menor será sua carga líquida disponível para sua interação com outras moléculas.

Outros trabalhos realizados com a adsorção da lisozima em diferentes suportes ativados com o Tris, também observaram maiores níveis de purificação em pH 7,0 (ZHANG et al., 2011; QUAN et al., 2008) e até mesmo em outros tipos de suportes com diferentes tipos de ativação (ERGÜN et al., 2007; YILMAZ et al., 2005; DERAZSHAMSHIR et al., 2008).

Em relação à adição de sal, foi possível observar que a força iônica influencia a capacidade do criogel em adsorver a lisozima. Os resultados sugerem que o aumento da força iônica do meio para 0,1 mol L⁻¹ de NaCl reduz a interação eletrostática entre a molécula de lisozima e as moléculas de Tris imobilizadas na coluna do criogel, o que também foi observado em outros estudos (YILMAZ et al., 2005; TONG et al., 2002).

Efeito semelhante foi constatado por Lira et al. (2009) ao estudar o efeito da concentração de NaCl na adsorção da proteína glicomacropéptídeo. Os autores explicam o fato de que quando existe uma elevação na densidade de cargas de interação eletrostática das moléculas envolvidas no processo há um fenômeno de repulsão entre as moléculas da proteína e do ligante imobilizado no adsorvente na dupla camada elétrica e a elevação da concentração salina não favorece a adsorção.

Ao se adicionar NaCl 1 mol L⁻¹ ao tampão de equilíbrio, em mesmo valor de pH, foi alcançado a completa dessorção da lisozima da estrutura do criogel. Isto ocorre devido ao fato de que com a elevação da força iônica do meio, as interações eletrostáticas da solução são reduzidas resultando assim na liberação das moléculas de lisozima as quais estavam adsorvidas na coluna de criogel (ERGÜN et al., 2007), mostrando que o agente de dessorção aplicado foi eficiente.

Por fim, o terceiro fator analisado foi à temperatura aplicada durante o processo de ativação do criogel, onde foi observado que a 60 °C foram obtidos melhores níveis adsorptivos da lisozima. Isto pode ser justificado, pelo fato de que em temperatura elevada a molécula de Tris apresentou conformação mais susceptível à imobilização na coluna do criogel, tendo maior ligação entre seus grupos amino (NH₂) e os grupos epóxi presentes na estrutura do criogel.

A partir do cromatograma obtido no tratamento 8, através do sistema AKTÄ (Figura 11), foi possível observar que este tratamento realmente apresentou boa adsorção da proteína em questão.

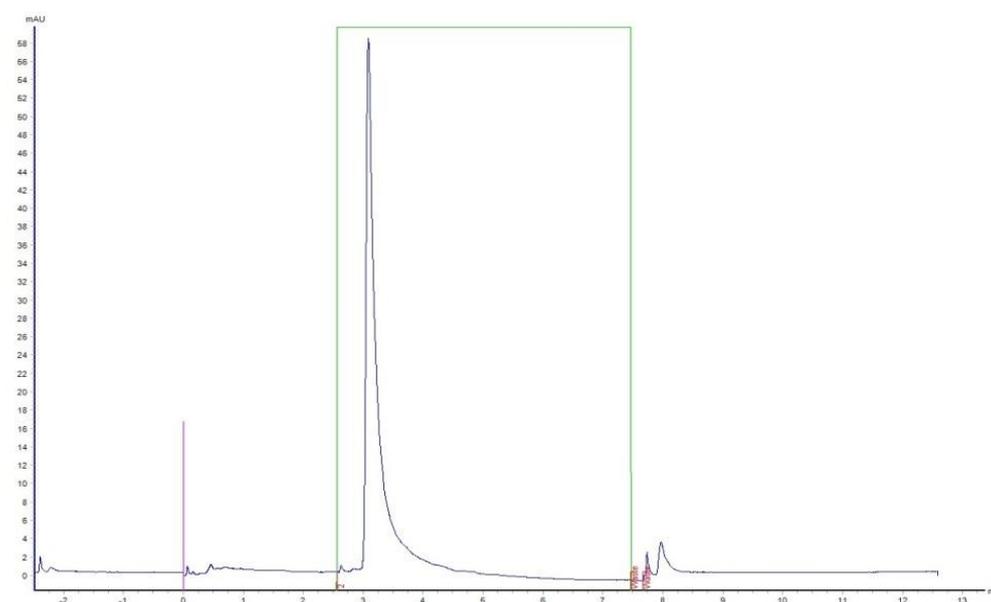


Figura 11 – Comportamento adsorptivo da solução de lisozima pura em pH 7,0, força iônica 0,0 mol L⁻¹ e temperatura de ativação do criogel em 60 °C. (—) Adsorção da amostra; (—) Injeção da amostra; (—) Eluição da amostra.

Nota-se que ao se injetar a amostra de lisozima 0,5 mg mL⁻¹, em pH 7,0 e força iônica 0,0 mol L⁻¹, essa foi adsorvida na coluna monolítica do criogel ativado a 60 °C, não apresentando elevação no nível de absorbância. Ao se elevar a força iônica da fase móvel (fosfato de sódio 0,02 mol L⁻¹ + NaCl 1 mol L⁻¹), observou-se a eluição completa da lisozima.

A amostra do eluído obtido foi então analisada em cromatógrafo líquido, HPLC, que nos apontou outra evidência para a capacidade adsorptiva da coluna de criogel com a lisozima. Ao se verificar os cromatogramas (Figura 12) da lisozima pura padrão em

concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ antes do processo adsortivo e a do eluído desta mesma proteína, é possível se observar uma elevação de pico em aproximadamente 47 - 48 minutos em ambos os cromatógrafos, o que pode-se concluir por meio de comparação entre os dois cromatogramas que a amostra eluída também apresentou presença de lisozima. Nota-se que o pico presente no cromatógrafo da solução eluída apresentou menor altura, com menor absorvância. Este comportamento pode ser justificado pelo fato de que a massa de lisozima injetada no processo adsortivo foi de apenas $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, e o volume coletado da solução eluída foi de cerca de 5 mL estando este bem diluído, o que levou a uma menor leitura de absorvância.

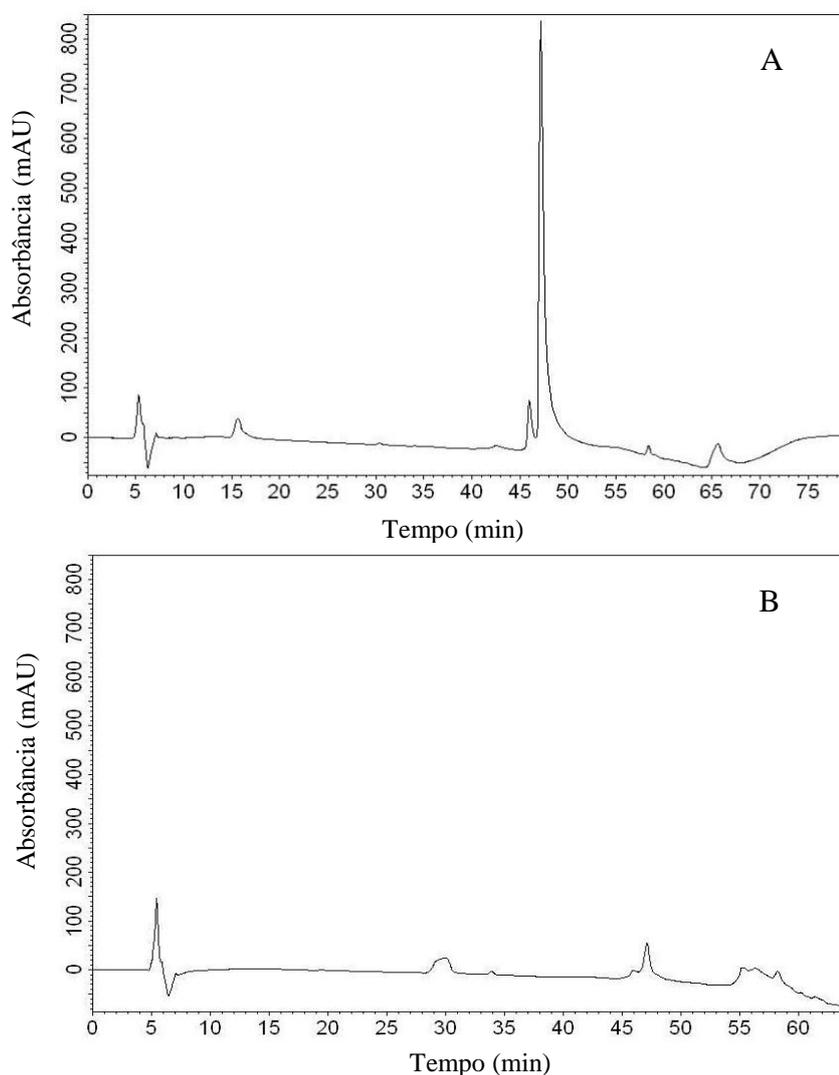


Figura 12 – Perfil cromatográfico da solução de lisozima pura antes do processo adsortivo (A) e solução de lisozima eluída (B).

5.2.2 Especificidade da coluna

Para confirmar a especificidade da coluna monolítica com o Tris imobilizado, três proteínas, α -lactalbumina, BSA e pancreatina suína, foram aplicadas à coluna na condição que apresentou maior nível de captura da solução de lisozima pura (pH 7,0; força iônica $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ e temperatura de ativação da coluna de criogel em $60 \text{ }^\circ\text{C}$).

A partir do cromatograma obtido da Figura 13 observa-se que a mistura com as três proteínas injetadas com mesma concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, não apresentaram comportamento adsorptivo satisfatório na coluna do criogel ativado com as moléculas de Tris. Foi observado um pico após 1 VC, evidenciando que estas proteínas não foram totalmente adsorvidas na coluna.

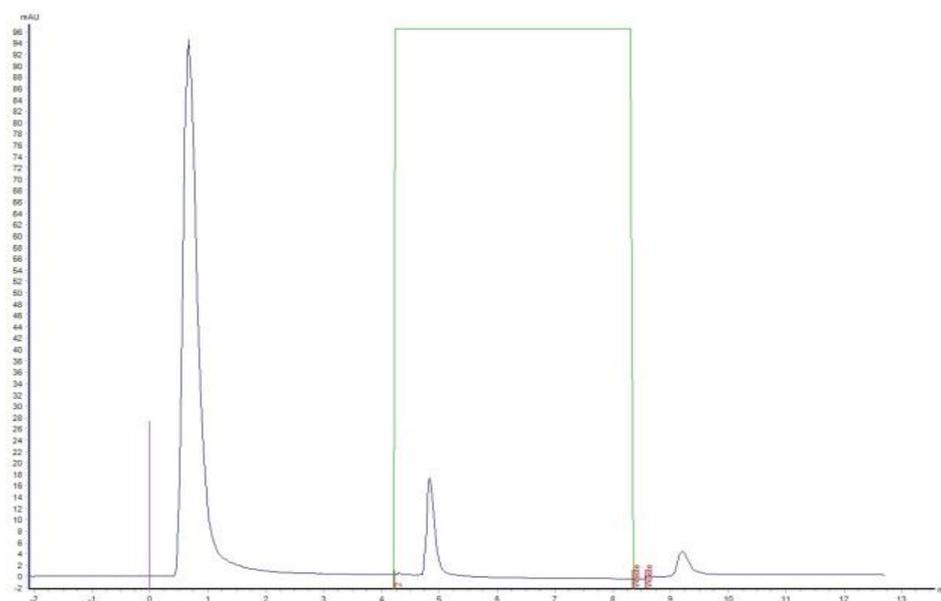


Figura 13 – Perfil cromatográfico da solução da mistura de proteínas, α -lactalbumina; BSA e pancreatina suína.

Já ao serem eluídas com tampão fosfato contendo 1 mol L^{-1} de NaCl, foi detectado um pequeno sinal, podendo estar relacionado a uma pequena quantidade de α -lactalbumina, BSA e pancreatina suína, ou até mesmo mais de uma delas, que por ventura ficaram retidas na coluna monolítica de criogel. Um fator importante que pode ter contribuído para a pequena adsorção observada é a sequência de aminoácidos existente na superfície destas proteínas, a qual pode ter semelhança com a sequência existente de aminoácidos na estrutura da lisozima, levando assim a pequena retenção de uma ou mais das proteínas analisadas.

Resultados obtidos por eletroforese (Figura 14) também apontam a falta de interação entre as moléculas de Tris presente na superfície ativada com as proteínas α -lactalbumina, BSA e pancreatina suína presentes na mistura. Ao se aplicar a solução do eluído da mistura de proteínas no gel de eletroforese, observa-se que não aparecem bandas detectáveis (Figura 14, coluna 2), mostrando que as proteínas aplicadas não ficaram retidas na coluna. A coluna P visualizada no gel de eletroforese corresponde as proteínas padrão, sendo possível observar a coloração no gel exatamente no local correspondente as massas moleculares das proteínas analisadas, o que se iguala a coluna 1, onde foi aplicada a mistura das mesmas proteínas puras.

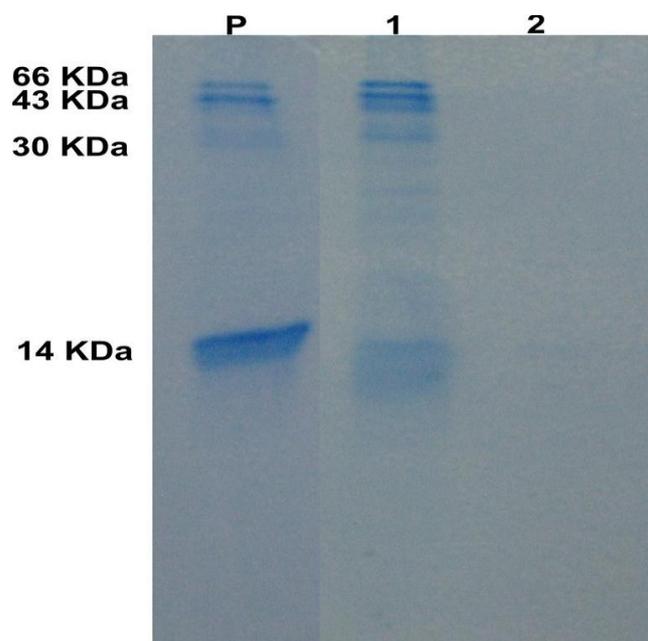


Figura 14 – Gel de eletroforese da solução padrão de proteínas (P); mistura das proteínas puras (1) e do eluído da mistura de proteínas (2). Massas moleculares: α -lactalbumina (14 KDa), BSA (66 KDa) e pancreatina suína (complexo enzimático).

Assim, é evidente que a lisozima apresentou nível de interação com a coluna ativada do criogel bem maior do que as outras proteínas, sendo possível afirmar que a ligação entre a lisozima e o Tris imobilizado na superfície do criogel é específica, porém não é uma ligação forte, pois pode ser facilmente interrompida pelo aumento da força iônica do meio na fase móvel, o que proporcionou a eluição da lisozima.

Resultado semelhante foi obtido por Quan et al. (2008) que provaram que a interação entre o Tris com a lisozima foi específica, porém fraca, podendo a proteína ser eluída sob condições moderadas, sem alterar sua estrutura natural evitando a perda de

atividade e evidenciando que o Tris é um ligante com alta afinidade para com a lisozima.

Como pequena molécula orgânica, o Tris tem uma estrutura química estável e simples que pode facilitar a síntese, o uso e armazenamento na coluna de afinidade. No presente trabalho, as condições aplicadas para imobilização do Tris, com tampão fosfato de potássio $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram para formar uma ligação covalente entre os grupos epóxi da coluna do criogel e os grupos amino do Tris. A ligação covalente promove uma imobilização estável dos ligantes na matrix. A coluna de afinidade com pequenas moléculas usadas como ligante pode ser também utilizada e armazenada sem proteção especial como solução específica ou baixas temperaturas (QUAN et al., 2009).

5.3 Isotermas de adsorção

A isoterma de adsorção (Figura 15) foi obtida nas condições de pH 7,0, força iônica de $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e temperatura de ativação do criogel em $60 \text{ }^\circ\text{C}$. O objetivo da construção da isoterma de adsorção é a determinação dos parâmetros q_{max} (capacidade máxima de adsorção) e K_d (constante de dissociação) que caracterizam o sistema estudado em termos da capacidade máxima de adsorção e velocidade com a qual o equilíbrio é atingido, respectivamente (CRUZ, 1997).

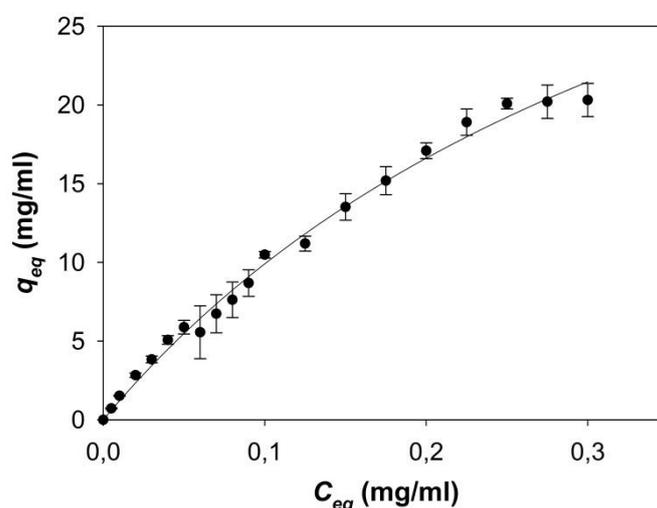


Figura 15 - Isoterma de adsorção da lisozima em pH 7,0 e força iônica de $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (—) modelo de Langmuir.

O modelo da isoterma de Langmuir foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais. Este modelo é baseado na suposição de homogeneidade, superfície da monocamada de cobertura, e a falta de interação entre espécies de adsorbato (YILMAZ

et al., 2005). Segundo informações da literatura, as moléculas são adsorvidas em um número fixo de locais bem definidos, cada um dos quais pode conter apenas uma molécula, sendo os sítios considerados energeticamente equivalentes e distantes uns dos outros de modo que não se tenha interação entre as moléculas adsorvidas em sítios adjacentes (DERAZSHAMSHIR et al., 2008), o que garante a formação da monocamada.

Os resultados experimentais (Tabela 9) foram submetidos a uma análise de regressão não-linear no software SAS v.9 (SAS Institute Inc., v. 9.0, Cary, NC, USA), obtendo-se assim os valores dos coeficientes $q_{máx}$ e K_d do modelo de Langmuir. Os parâmetros ajustados do modelo de Langmuir são apresentados na Tabela 10. A escolha do melhor modelo foi baseada nos testes de significância dos parâmetros e coeficiente de determinação. O coeficiente de determinação (R^2) foi maior que 0,99 demonstrando que o modelo de Langmuir teve boa adequação aos dados experimentais.

A partir dos resultados, é possível se obter a seguinte relação:

$$q = \frac{51,5667C}{0,4206 + C} \quad \text{Eq. 11}$$

em que q é a massa de lisozima adsorvida por volume de criogel (mg mL^{-1}) e C é a concentração de lisozima na fase líquida (mg mL^{-1}) no equilíbrio.

A quantidade de lisozima ligada ao suporte aumentou com o aumento da concentração inicial de lisozima. Zhang et al. (2011), ao estudar a capacidade de ligação da lisozima em microesferas magnéticas modificadas com Tris, avaliou uma faixa de concentração de lisozima de 0,1 a 0,5 mg mL^{-1} e observou que quando a concentração inicial da lisozima foi abaixo que 0,3 mg mL^{-1} , a quantidade de lisozima ligada aumentou com o aumento da concentração inicial da proteína.

A vazão de 0,5 mL min^{-1} , aplicada ao processo foi satisfatória, permitindo que as moléculas de lisozima tivessem tempo suficiente para se difundirem pelas paredes dos poros do criogel, e se ligarem aos sítios ativos dos ligantes imobilizados em sua estrutura.

Tabela 9 - Capacidade adsorviva (mg proteína·mL⁻¹) do criogel em função do conteúdo de lisozima em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 0,0 mol L⁻¹ de NaCl.

Concentração de lisozima no equilíbrio (mg mL ⁻¹)	q adsorvido no equilíbrio (mg mL ⁻¹)
0,005	0,7238 ± 0,0360
0,010	1,5250 ± 0,0286
0,020	2,8336 ± 0,1449
0,030	3,8369 ± 0,2127
0,040	5,0707 ± 0,2710
0,050	5,8814 ± 0,4315
0,060	5,5584 ± 1,6743
0,070	6,7358 ± 1,2114
0,080	7,6212 ± 1,1331
0,090	8,6887 ± 0,8442
0,100	10,4856 ± 0,2027
0,125	11,1951 ± 0,4730
0,150	13,5195 ± 0,8376
0,175	15,1919 ± 0,8892
0,200	17,0881 ± 0,4997
0,225	18,9052 ± 0,8329
0,250	20,0842 ± 0,3459
0,275	20,2051 ± 1,0564
0,300	20,3109 ± 1,0566

Tabela 10 - Parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir.

Parâmetro	Coefficiente	Desvio padrão	P - valor
<i>q_{máx}</i>	51,5667	4,5787	<0,0001
<i>k_d</i>	0,4206	0,0547	<0,0001
<i>R</i> ²	0,9927		

6. CONCLUSÃO

Criogéis monolíticos apresentam-se como uma matriz cromatográfica atrativa permitindo a captura direta de proteínas e outras biomoléculas de extratos brutos não processados. Sua caracterização é uma análise essencial para a sua posterior aplicação em processos cromatográficos, visto que podem apresentar variações de acordo a compostos utilizados como ativadores, ligantes, dentre outros. No presente trabalho, observou-se que a ativação da coluna do criogel com moléculas de Tris, não apresentou alterações significativas quanto à porosidade, capacidade de inchamento, estrutura dos poros, permeabilidade e distribuição do tempo de residência. Em geral, a ativação elevou um pouco os valores obtidos, não tendo efeitos negativos na característica da estrutura da coluna e seus poros.

Quanto ao processo de purificação proposto, este foi relativamente simples e o ligante utilizado na cromatografia de afinidade, o Tris, demonstrou eficiência e seletividade para com a molécula de lisozima, nas condições avaliadas. A interação entre o Tris e a lisozima foi facilmente desestruturada por moderadas alterações do meio na fase móvel, ponto este favorável ao processo de purificação, pelo fato de não ter sido necessária a aplicação de métodos complexos para a liberação da lisozima, garantindo a fácil recuperação da proteína, economia de tempo e de custos.

Nas condições experimentais avaliadas, pH, força iônica e temperatura de ativação da coluna, observou-se que estes três parâmetros influenciaram na capacidade adsorptiva da lisozima na coluna monolítica do criogel. A partir da condição experimental que obteve maior nível de adsorção, o modelo de Langmuir foi ajustado aos dados observados, verificando-se que com o aumento na concentração da lisozima pura, a capacidade de adsorção da coluna aumentou até o valor de concentração analisado.

Portanto, conclui-se que é possível empregar a coluna monolítica supermacroporosa ativada com moléculas de Tris para purificação específica da lisozima em condições cromatográficas. É de interesse que estudos sejam realizados para avaliar a eficiência e seletividade do Tris com a lisozima purificada da própria clara do ovo, bem como avaliar a repetibilidade e estabilidade da coluna de afinidade proposta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, J. B. D. **Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade**. 2012. 36 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia) Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

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. ISSN 1996-1944.

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. ISSN 0021-9673.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; YU. GALAEV, I.; MATTIASSON, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002. ISSN 0021-9673.

BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I.; PISKIN, E.; DENIZLI, A. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. **Reactive & Functional Polymer**, v. 66, p. 1263-1271, 2006.

BAILON, O.; EHRLICH, G. K.; FUNG, W.-J.; BERTHOLD, W. **Methods in Molecular Biology: Affinity Chromatography-Methods and Protocols**. In: TOTOWA, H. P. I. (Ed.), v.147, 2000.

BAUNGARTNER, J. Japanese quail production, breeding and genetics. **World's Poultry Science**, v. 50, p. 228-235, 1994.

BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Procion Green H-4G immobilised on a new IPN hydrogel membrane composed of poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan: preparation and its application to the adsorption of lysozyme. , 202, 41–52. **Colloid and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspect**, v. 202, p. 41-52, 2002.

BELITZ, H. D.; GROSH, W. **Química de los alimentos**. 2º ed. Zaragoza: Acribia. , 1087p. 1997.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of Enzymes**. In: (Ed.), v.22, p.15-30. 2006.

CALLEWAERT, L.; WALMAGH, M.; MICHIELS, C. W.; LAVIGNE, R. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 164-171, 2011.

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. **Affinity Chromatography**. In: JAN-CHRISTER JANSON e RYDÉN., L. (Ed.). Protein Purification - Principles, High-Resolution Methods, and Applications. New York, 1998.

CARVALHO, B. M. A. D. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre**. 2010. 125 Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

CASTRO, H. F.; SILVA, M. L. C. P.; SILVA, G. L. J. P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 849-858, 2000. ISSN 0104-6632.

CASTRO, L. B. R. D. **Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos**. 2008. 114 p. Dissertação (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

CHASE, H. A. Scale-up of immunoaffinity separation proceses. **Journal Biotechnology**, v. 1, p. 67-80, 1984.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008. ISSN 0009-2509.

CHEN, W.; LIU, Z.; LIN, P.; FANG, C.; YAMAMOTO, S. The hydrophobic interactions of the ion-exchanger resin ligands with proteins at high salt concentrations by adsorption isotherms and isothermal titration calorimetry. **Separation and Purification Technology**, v. 54, p. 212-219, 2007.

CHUNG, W.; HANCOCK, R. E. W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 25-32, 2000.

CRUZ, J. M. **Adsorção de insulina em resina trocadora de íons utilizando leitos fixos e expandidos**. 1997. 118 p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004. ISSN 0100-4042.

DECHOW, F. J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology**. Noyes Publications, Cap. 2, 65-162 1989.

DERAZSHAMSHIR, A.; ERGÜN, B.; PESINT, G.; ODABASI, M. Preparation of Zn²⁺-Chelated Poly(HEMA-MAH) Cryogel for Affinity Purification of Chicken Egg Lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2905-2913, 2008.

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.

FAO. **Agribusiness handbook - Poultry Meat e eggs 2010**, [online]: Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/al175e/al175e.pdf>. Acesso em 01 dez 2013. 2010.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia: 1095 p. 1993.

FONTAN, R. C. I. **Termodinâmica e modelagem da adsorção em sistemas mono e multicomponentes compostos por α - lactoalbumina e β - lactoglobulina**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

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.

FORS, S.; COMSTOCK, M. J. **The Maillard Reaction in Foods and Nutrition**. 185 1983. ISBN null.

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.

FURUSAWA, T.; SUZUKI, M.; SMITH, J. M. Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques. **Catalysis Review Science Engineering**, v. 13, p. 43-76, 1976.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and unit operations**. 3rd edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 921p. 1993.

GEMEINER, P. **Materials for enzyme engineering**. In: GEMEINER, P. (Ed.). Enzyme Engineering. Ellis Horwood, New York, NY, p.13-119. 1992.

GHOSH, R. Purification of lysozyme by microporous PVDF membrane-based chromatographic process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 109-116, 2003.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 191-203, 2000. ISSN 1097-0290.

GHOSH, R.; SILVA, S. S.; CUI, Z. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal** v. 6, p. 19-24, 2000.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 3-16, 2005. ISSN 1570-0232.

GONÇALVES, L. R. B. **Estudo do processo de obtenção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismos coimobilizados em gel de pectina.** 1996. 114 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GRITTI, F.; PIATKOWSKI, W.; GUIOCHON, G. Study of the mass transfer kinetics in a monolithic column. **Journal of Chromatography A**, v. 983, n. 1–2, p. 51-71, 2003. ISSN 0021-9673.

GUÉRIN-DUBIARD, C.; PASCO, M.; HIETANEN, A.; QUIROS DEL BOSQUE, A.; NAU, F.; CROGUENNEC, T. Hen egg white fractionation by ionexchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 58-67, 2005.

GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1–2, p. 101-168, 2007. ISSN 0021-9673.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography.** Academic Press. Boston: 700p. 1994.

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

HAHN, R.; PANZER, M.; HANSEN, E.; MOLLERUP, J.; JUNGBAUER, A. Mass transfer properties of monoliths. **Separation Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 1545-1565, 2002/05/28 2002. ISSN 0149-6395.

HAHN, R.; PODGORNIK, A.; MERHAR, M.; SCHALLAUN, E.; JUNGBAUER, A. Affinity Monoliths Generated by In Situ Polymerization of the Ligand. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5126-5132, 2001/11/01 2001. ISSN 0003-2700.

HAMEL, J.-F. P.; HUNTER, J. B. **Modeling and Applications of Downstream Processing.** In: HAMEL, J.-F. P.; HUNTER, J. B. e SIKDAR, S. K. (Ed.). Downstream Processing and Bioseparation - Recovery and Purification of Biological Products. Washington, cap. 1, 1990.

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Unconventional methods in cellulose functionalization. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1689-1762, 2001. ISSN 0079-6700.

JACOBSON, J. M.; FRENZ, J. H.; HORVATH, C. G. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 26, n. 1, p. 43-50, 1987/01/01 1987. ISSN 0888-5885.

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

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

KATZ, E.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N., Eds. **Handbook of HPLC**. New Yorked. 1998.

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

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005/11/01 2005. ISSN 0021-8561.

KUBIAK-OSSOWSKA, K.; MULHERAN, P. A. Mechanism of Hen Egg White Lysozyme Adsorption on a Charged Solid Surface. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 15954-15965, 2010/10/19 2010. ISSN 0743-7463.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006. ISSN 0021-9673.

KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1-2, p. 185-194, 2003. ISSN 0022-1759.

LABROU, N. E. Design and selection of ligands for affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 67-78, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**, v. 30, p. 2263-2295, 1916.

LEE-HUANG, S.; HANG, P. L.; SUN, Y.; KUNG, H. F.; BLITHE, D. L.; CHEN, H. C. Lysozyme and RNAses as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 96, p. 2.678-2.681, 1999.

LENHOFF, A. M. Protein adsorption and transport in polymer-functionalized ion-exchangers. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8748-8759, 2011.

LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Biochemical basis for properties of egg white. **Critical Review Poultry Biology**, v. 2, n. 1, p. 21-57, 1989.

LI-CHAN, E. C.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. **The chemistry of eggs and egg products (chapter 6)**. In: STADELMAN, W. J. e COTTERILL, O. J. (Ed.). *Egg science and technology*: Food Product Press, Binghamton, p.105-175. 1995.

LIAO, Y.-H.; BROWN, M. B.; MARTIN, G. P. Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 549-554, 2001. ISSN 2042-7158.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica Agroindustrial. Revalorización Alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acribia, 43-163 1996.

LIRA, R. A.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, V. P. R.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropeptide on anion-exchange chromatography adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 20, p. 4440-4444, 2009. ISSN 0021-9673.

LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001a. ISSN 0923-179X.

LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4-5, p. 163-188, 2001/05/01 2001b. ISSN 0923-179X.

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. ISSN 1097-0290.

MACAK, G. **Antibacterial effect of some modern substrata on presence of *Clostridium sp* in processed cheese**. 1995. (Doctoral Thesis). Faculty of Technology, Novi Sad, Yugoslavia.

MADRID, A. V.; CENZANO, J.; VICENTE, J. M. **Manual de Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 489-495 1996.

MAGDELDIN, S.; MOSER, A. **Affinity Chromatography: Principles and Applications**. In: MAGDELDIN, S. (Ed.). Affinity Chromatography, p.3-28. 2012.

MALLIK, R.; 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, 2004/12/01 2004. ISSN 0003-2700.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, 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.; GUISAN, 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.

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.

MEYER, L. **Food Chemistry**. Westport: Van Nostrand Reinhold: 143-146 1976.

MULLER, H. G.; TOBIN, G. **Nutrición y Ciencia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 221-226 1996.

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.

PADGETT, T.; HAN, I.; DAWSON, P. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal Food Prot.**, v. 61, n. 10, p. 1330-5, 1998.

PERSSON, P.; BAYBAK, O.; PLIEVA, F.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; NILSSON, B.; AXELSSON, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 224-236, 2004. ISSN 1097-0290.

PHILLIPS, D. C. The hen egg-white lysozyme molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 57, n. 3, p. 483-495, 1967.

PLIEVA, F.; HUITING, X.; GALAEV, I. Y.; BERGENSTAHL, B.; MATTIASSON, B. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 41, p. 4065-4073, 2006. ISSN 0959-9428.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004a. ISSN 1615-9314.

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.

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004b. ISSN 1570-0232.

POMBO, C. R. **Influência do tratamento térmico e da temperatura de armazenamento nas características funcionais e qualidade interna de ovos inteiros**.

2008. 103 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ.

QUAN, L.; CAO, Q.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Highly efficient and low-cost purification of lysozyme: A novel tris(hydroxymethyl)aminomethane immobilized affinity column. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 7, p. 594-598, 2009. ISSN 1570-0232.

QUAN, L.; WEI, D.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F.; LAI, L. Resurveying the Tris buffer solution: The specific interaction between tris(hydroxymethyl)aminomethane and lysozyme. **Analytical Biochemistry**, v. 378, n. 2, p. 144-150, 2008. ISSN 0003-2697.

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, 2005a. ISSN 0021-9673.

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, 2005b. ISSN 0032-3861.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. São Paulo: Varela, p.57-172 1996.

SHIBUSAWA, Y.; KIHIRA, S.; ITO, Y. One-step purification of proteins from chicken egg white using counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 709, n. 2, p. 301-305, 1998. ISSN 0378-4347.

SILVA, M. E. D.; KULA, M.-R.; FRANCO, T. T. Uso de Polietilenoglicol Modificado para Purificação de Lisozima em Sistemas de duas Fases Aquosas. **Revista de Ciência & Tecnologia**, p. 105-112, 1999.

SOUSA, R. D. C. S. D. **Separação da lisozima, cobalbumina e ovalbumina presentes na clara do ovo: aspectos tecnológicos e termodinâmicos**. 2008. 117 p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

SOUZA-SOARES, L. A. D.; SIEWERDT, F., Eds. **Aves e Ovos**. Pelotas-RS, p.138ed. 2005.

STARKENSTEIN, E. Ferment action and the influence upon it of neutral salts. **Biochem. Z.**, v. 24, p. 210-218, 1910.

SUZUKI, M. **Adsorption Engineering**. 1 ed. Amsterdam, 295 p. 1990.

SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. **Rigid Macroporous Organic Polymer Monoliths Prepared by Free Radical Polymerization**. In: SVEC, F.; TENNIKOVA, T. B. e

- DEYL, Z. (Ed.). *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*. Amsterdam: Elsevier Science B. V., v.67, cap. 2, p.19-50. 2003.
- 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.
- TONG, X.-D.; DONG, X.-Y.; SUN, Y. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 117-124, 2002. ISSN 1369-703X.
- TOZZI, C.; ANFOSSI, L.; GIRAUDI, G. Affinity chromatography techniques based on the immobilisation of peptides exhibiting specific binding activity. **Journal of Chromatography B**, v. 797, p. 289-304, 2003.
- UZUN, L.; YAVUZ, H.; SAY, R.; ERSÖZ, A.; DENIZLI, A. Poly(ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) Monolith as a Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatography. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 43, p. 6507-6513, 2004.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000. ISSN 1381-1177.
- WALTERS, R. R. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1099A - 1114A, 1985.
- 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. ISSN 1004-9541.
- YAO, K.; SHEN, S.; JUNXIANYUN; 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. ISSN 0009-2509.
- 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, 2007a. ISSN 1369-703X.
- 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, 2007b. ISSN 0021-9673.
- 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.
- YILMAZ, M.; BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Separation and purification of lysozyme by Reactive Green 19 immobilised membrane affinity chromatography. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 11-18, 2005. ISSN 0308-8146.

ZHANG, G.; CAO, Q.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Tris(hydroxymethyl)aminomethane-modified magnetic microspheres for rapid affinity purification of lysozyme. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1515-1520, 2011. ISSN 0039-9140.