



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM
MATRIZES MACROPOROSAS PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS
POR AFINIDADE**

Autora: Josiane Ferreira da Silva

Orientador: Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2018**

JOSIANE FERREIRA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM
MATRIZES MACROPOROSAS PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS
POR AFINIDADE**

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

Orientador: Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Co-orientadores: Prof^a. DSc. Cristiane Martins Veloso – UESB

Prof^a. DSc. Silmara Almeida de Carvalho - UESB

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2018**

543
S58o

Silva, Josiane Ferreira da

Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade. / Josiane Ferreira da Silva. - Itapetinga: UESB, 2018.

56p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof^a. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof^a. D.Sc. Silmara Almeida de Carvalho.

1. Purificação de lectinas. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Otimização. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Carvalho, Silmara Almeida de. V. Título.

CDD(21): **543**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Purificação de lectinas
2. Cromatografia de afinidade
3. Otimização



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM MATRIZES MACROPOROSAS PARA A PURIFICAÇÃO DE LECTINAS POR AFINIDADE.

Autor (a): JOSIANE FERREIRA DA SILVA

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

Coorientadores (a): Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Prof.^a Dr.^a Silmara Almeida de Carvalho

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. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)


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


Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo (UFLA)

Itapetinga-BA, 22 de fevereiro de 2018.

“Se não podes entender, crê para que entendas. A fé precede, o intelecto segue.”

Aurelius Augustinus Hipponensis (Santo Agostinho)

A Deus pela vida e refúgio nos momentos de angústia;

Aos meus pais João e Denair pelos ensinamentos e exemplo de perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, amparo e fortaleza.

Aos meus pais, João e Denair pelo apoio, segurança e ajuda em todos os momentos. Meus irmãos Rodrigo e em especial Daniela pelo exemplo de força, fé e superação e a todos os meus familiares.

Ao meu esposo Eder pela força, paciência, amor e apoio incondicional durante todo esse tempo. Obrigada por me dar segurança e abrigo.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Engenharia e Processos (LEP) pelo suporte, apoio no trabalho, alegrias e por ter me permitido fazer parte dessa família.

A todos os professores do programa de pós-graduação, exemplos de profissionais.

Ao professor Rafael Fontan pela orientação, paciência, contribuição intelectual, dedicação. Exemplo de perseverança e disponibilidade.

Aos professores Cristiane Veloso e Silmara pela co-orientação.

A todos do Laboratório de Processamento de Leites e Derivados, em especial Ben-Hur, Grazi e Dani pela ajuda.

Aos novos amigos que fiz e que tão bem me acolheram e se tornaram essenciais nesse caminho, em especial Débora, Annie, Malu, Thais, Mateus e Acsa (família).

Aos membros da banca examinadora por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade de realização desse curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse momento tanto de longe, em Salinas, quanto aqui em Itapetinga.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Lectinas.....	3
2.1.1 Atividade das lectinas.....	4
2.1.2 Interação lectina-carboidrato	5
2.1.3 Purificação de lectinas	6
2.2 Técnicas cromatográficas	7
2.3 Cromatografia de afinidade para purificação de proteínas	8
2.4 Criogeis poliméricos monolíticos.....	10
2.5 Modificações na superfície dos suportes cromatográficos	14
2.5.1 Método do Glutaraldeído.....	15
2.6 Planejamento e otimização de experimentos.....	16
3 OBJETIVO GERAL.....	18
3.1 Objetivos específicos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Materiais.....	19
4.2 Síntese dos criogeis	19
4.3 Imobilização de carboidratos pelo método do glutaraldeído.....	20
4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas	21
4.4.1 Delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1}	21
4.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional	22
4.5 Caracterização dos criogeis	24
4.5.1 Capacidade de inchamento	24
4.5.2 Grau de expansão.....	24
4.5.3 Porosidade dos criogeis	25
4.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Síntese dos criogeis	26
5.2 Avaliação da imobilização de D-GlcNAc pelo método do Glutaraldeído	26

5.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier	32
5.4 Características morfológica dos criogeis	34
6 CONCLUSÃO.....	36
7 REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lectinas e seus ligantes específicos.....	6
Tabela 2: Exemplos de sistemas para preparação de criogeis poliméricos	11
Tabela 3: Quantidade de monômeros utilizados para o preparo de 100 mL de solução	19
Tabela 4: Condições experimentais do Fatorial Fracionado 2^{4-1}	22
Tabela 5: Condições experimentais do DCCR aplicado.	23
Tabela 6: Resultados obtidos considerando o Fatorial Fracionado 2^{4-1}	27
Tabela 7: Análise de variância da regressão do modelo reduzido.....	28
Tabela 8: Ajustes dos parâmetros do modelo reduzido para as variáveis codificadas.	28
Tabela 9: Resultados obtidos nos experimentos do DCCR.	29
Tabela 10: Análise de variância da regressão do DCCR para as variáveis codificadas.	29
Tabela 11: Estimativa dos parâmetros do modelo completo no DCCR.	29
Tabela 12: Resultados da caracterização dos criogeis controle e D-GlcNAc ativado.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da inibição da hemaglutinação	5
Figura 2: Cromatografia de Afinidade para separação de biomoléculas	8
Figura 3: Efeito da concentração do polímero sobre a formação de poros nas colunas cromatográficas	11
Figura 4: Representação esquemática da produção de criogeis	12
Figura 5: Imagens da microscopia eletrônica de criogeis de poliacrilamida. (A) -10°C, (B) -20°C e (C) -30°C.....	13
Figura 6: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações em duas temperaturas (-20°C e 20°C).....	13
Figura 7: Método do glutaraldeído - imobilização de ligantes via ligação covalente para monólitos de afinidade.	15
Figura 8: Visão esquemática do provável mecanismo de imobilização de D-GlcNAc pelo método do glutaraldeído.	20
Figura 9: Criogeis controle (A) e ativado com D-GlcNAc (B).....	26
Figura 10: Gráfico de Pareto para os efeitos do modelo testado ($p = 0,05$).....	27
Figura 11: Gráfico de resíduos para o modelo ajustado no DCCR.....	30
Figura 12: Curva de contorno da quantidade de D-GlcNAc imobilizada em função da temperatura e da concentração D-GlcNAc	31
Figura 13: Espectros de FTIR dos criogeis não ativado(controle) e com D-GlcNAc imobilizado pelo método do glutaraldeído.	32
Figura 14: Espectros de FTIR dos criogeis não ativado (controle) e com D-GlcNAc imobilizado pelo método do glutaraldeído para a região de 1500-600 cm^{-1}	33

RESUMO

SILVA, J. F. **Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade.** Itapetinga, BA: UESB, 2018. 56 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos).*

O uso de estruturas monolíticas poliméricas com poros altamente interconectados na purificação de biocompostos é crescente e seu desenvolvimento é constante. Dentre estes, destacam-se os criogéis poliméricos, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização, e uma alternativa para seu melhor uso é transformar estes em adsorventes de afinidade específica. Assim, objetivou-se no presente trabalho a otimização da quantidade de carboidrato imobilizado, utilizando-se o método do glutaraldeído para inclusão de braços espaçadores, em adsorventes monolíticos macroporosos voltados para o processo de purificação por técnicas de cromatografia de afinidade. Para tanto, o teor de alil glicidil éter (AGE) na síntese do criogel, a concentração de glutaraldeído e a temperatura para sua inclusão e a concentração de N-acetil-D-glicosamina (D-GlcNAc) foram testadas por meio de ensaios conduzidos em um Delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} , seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional. Verificou-se que entre as variáveis estudadas apenas a temperatura de inclusão do glutaraldeído e a concentração de D-GlcNAc foram significativas ($p < 0,05$) obtendo-se as condições ótimas a $12,03^{\circ}\text{C}$ e $5,64 \text{ mg/mL}$ de D-GlcNAc. A condição ótima foi utilizada no processo experimental, com 1,1% de AGE e solução a 5% m/v de glutaraldeído, obtendo-se um valor médio de $160,39 \pm 26,38 \text{ mg}$ de D-GlcNAc imobilizada por grama de criogel seco, em concordância com o valor estimado ao se utilizar o modelo ajustado. Os criogéis produzidos após a otimização foram caracterizados quanto à capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade e frações constitutivas e neste último apenas a fração de água de apresentou diferença pelo teste t ($P < 0,05$). A análise da espectroscopia FTIR indicou que o processo de funcionalização foi bem sucedido, a partir da observação da redução de picos característicos de radicais epóxi das matrizes não ativadas. A matriz produzida apresenta potencial de uso na purificação de lectinas sendo necessários estudos comprobatórios nesse sentido.

Palavras chave: otimização, glutaraldeído, D-GlcNAc.

*Orientador: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-orientadores: Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB; Silmara Almeida de Carvalho, DSc., UESB.

ABSTRACT

JOSIANE, F. S. **The optimization of carbohydrates immobilization on macroporous matrix for the lectin purification by affinity techniques.** Itapetinga: BA: UESB, 2018. 56 p. Dissertation (Master in Food Engineering).*

The use of polymer monolithic structures with highly interconnected pores in the purification of biocompounds is increasing and their development is constant. Among these, the polymeric cryogels obtained from the freezing of a reactive mixture in polymerization stand out, and an alternative for their better use is to transform these into specific affinity adsorbents. Monolithic columns that have surface epoxy radicals are among the supports most used for the immobilization of specific binders. Thus, the objective of the present work was to optimize the amount of immobilized carbohydrate using the glutaraldehyde method to include spacer arms in macroporous monolithic adsorbents aimed at the purification process by affinity chromatography techniques. To that end, the content of allyl glycidyl ether (AGE) in the cryogel synthesis, the glutaraldehyde concentration and the inclusion temperature and the concentration of N-acetyl-D-glucosamine (D-GlcNAc) were tested by conducting assays in a Fractional Factorial Design 2^{4-1} , followed by a Central Composite Rotatable Design (CCRC). The optimum condition was used in the experimental process, with 1.1% AGE and 5% w / w glutaraldehyde, obtaining an average value of 160.39 ± 26.38 mg of D-GlcNAc immobilized per gram of dry cryogel, in agreement with the estimated value when using the adjusted model. Cryogels produced after the optimization were characterized for swelling capacity, expansion degree, porosity and constitutive fractions. Only the binding water fraction presented difference by t test ($P < 0.05$). The analysis of FTIR spectroscopy indicated that the functionalization process was successful, from the observation of the reduction of peaks characteristic of epoxy radicals of nonactivated matrices. The matrix produced has potential for use in the purification of lectins and it is necessary to prove this.

Keywords: optimization, glutaraldehyde, D-GlcNAc.

*Advisor(a): Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-advisors: Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB; Silmara Almeida de Carvalho, DSc., UESB.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que reconhecem e se associam a carboidratos ou glicoconjugados de forma reversível, com alta afinidade e especificidade. Em virtude dessa habilidade, tais biomoléculas apresentam importantes efeitos biológicos, como ação inseticida, bactericida, antitumoral, fungicida, além de ação inibitória sobre a protease HIV-I. Podem também ser utilizadas na produção de biossensores para a indústria de alimentos, verificando a presença de microrganismos, assegurando assim a qualidade de matérias primas e produtos industrializados. Devido as excelentes propriedades oferecidas pelas lectinas, o interesse na purificação das mesmas vem apresentando grande potencial e os métodos que utilizam as técnicas de adsorção podem ser utilizados (SUZUKI et al., 2015; SELVAPRAKASH; CHEN, 2018).

Os métodos adsorptivos são utilizados em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. Por essa razão a otimização dessas técnicas é de grande relevância, por trazer impacto direto no rendimento de tais processos (FONTAN, 2013).

A utilização de técnicas cromatográficas está entre os processos mais utilizados para purificação de proteínas. Porém, a presença de grandes biomoléculas e materiais muito concentrados desafiam os limites dos métodos cromatográficos tradicionais. Para superar essas dificuldades, vem ocorrendo o desenvolvimento das colunas monolíticas poliméricas supermacroporosas, que permitem a separação até mesmo de células inteiras e meios não clarificados (PFAUNMILLER et al., 2013).

Dentre os monólitos utilizados como colunas cromatográficas, os criogéis poliméricos vêm apresentando destaque. Estes possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, e essa característica traz consigo uma redução nos custos operacionais, pois elimina etapas de pré-preparo das amostras como pré-concentração, sem afetar a eficiência da purificação (ANDAÇ et al., 2016).

Outra característica que revela uma redução nos custos está na produção desses monólitos, que podem ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas com materiais que apresentam menor custo (GUIOCHON, 2007). Em contrapartida, a área superficial dessas colunas é menor do que as tradicionais colunas cromatográficas, possuindo uma menor capacidade de ligação, o que acaba diminuindo a eficiência da purificação. Para contornar esse problema, surge a necessidade de modificar quimicamente ou fisicamente tais colunas (KUMAR, 2016).

Uma alternativa viável é transformar os criogéis poliméricos em adsorventes de afinidade específica, por meio da enxertia do mesmo com grupos ligantes de interesse. O grupo ligante que será adicionado ao criogel no presente estudo será um carboidrato, devido à habilidade das lectinas se ligarem a esses compostos, o que favorecerá a adsorção na coluna produzida, aumentando assim a eficiência no processo de purificação (YUN et al., 2009; WANG et al., 2013). Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, diversas abordagens para a imobilização de ligantes de afinidade têm sido reportadas.

Os suportes contendo radicais epóxi disponíveis na superfície estão entre os mais utilizados para a imobilização de biomoléculas. Isso ocorre em razão de tais grupos poderem reagir facilmente com grupamentos amina, tiol ou hidroxila das moléculas, formando uma interação covalente estável (UYGUN et al., 2015). Dentre os métodos que utilizam como suporte uma matriz macroporosa contendo radicais epóxi reativo, destaca-se o método do glutaraldeído, que apresenta como vantagem principal a capacidade de formação de um longo braço espaçador entre o criogel e o ligante, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico, o que pode acarretar em uma maior capacidade de imobilização do ligante e de purificação da molécula alvo (GONÇALVES et al., 2016).

A utilização de colunas monolíticas poliméricas aplicadas na purificação de biomoléculas vem se mostrando muito promissora. Nesse sentido, a realização de pesquisas na área é de fundamental importância para aumentar o conhecimento e contribuir na otimização dessa técnica (FONTAN, 2013).

A otimização parte da escolha da melhor estratégia do planejamento experimental, visando maximização ou minimização da variável resposta. Para isso, deve ser levado em consideração principalmente o número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar, a partir do conhecimento inicial que se tem sobre o processo. Atualmente tem-se dado ênfase ao uso da metodologia de superfície de resposta para estudar esse tipo de processo (MYERS; MONTGOMERY, ANDERSON-COOK, 2009). Sob esse aspecto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a quantidade de carboidrato imobilizado utilizando-se o método do glutaraldeído em adsorventes monolíticos macroporosos voltados para o processo de purificação de lectinas por técnicas de cromatografia de afinidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lectinas

Conceitualmente, as lectinas são proteínas de origem não imune que possuem capacidade de aglutinar eritrócitos e devido a essa capacidade, são conhecidas também como aglutininas, ou seja, possui atividade hemaglutinante (AH). Essas glicoproteínas possuem massa molar que podem variar de 3,5 kDa até 480 kDa e foram descritas pela primeira vez pelo médico Hermann Stillmark em 1888, quando descreveu as propriedades aglutinantes de ricina, uma lectina tóxica extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Em 1972, Sharon e Lis listaram diferentes lectinas conhecidas naquele momento, começando a era moderna de lectinologia (JUAN et al., 2017).

Apresentam como característica o reconhecimento e a manutenção de ligações específicas e reversíveis a um mono ou oligossacarídeo e outras substâncias que contenham açúcares, mantendo a estrutura covalente desses ligantes glicosídicos. Ainda, possui capacidade de precipitar células, glicoconjugados e polissacarídeos de fontes animais, vegetais, vírus e bactérias (GAJBHIYE; GONG, 2013; HE et al., 2015).

A ligação das lectinas com açúcares é atribuída a um Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (DRC) dentro de sua estrutura de polipeptídios. A interação de lectinas com certos carboidratos podem ser tão específica como a interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima. Algumas são metaloproteínas, ou seja, necessitam da presença de cátions metálicos em seus sítios de ligação específicos para carboidratos para que ocorra a ligação com os mesmos, assemelhando-se as metaloproteases, porém as lectinas não apresentam atividade catalítica (JUAN et al., 2017; GAJBHIYE; GONG, 2013).

Caracterizadas inicialmente como proteínas que apresentavam toxicidade, as lectinas passaram a ser instrumento essencial nos diagnósticos de doenças, identificação de cepas de micro-organismos e estudos relacionados a tipos sanguíneos. As lectinas de plantas foram utilizadas em biologia celular e imunologia como diagnósticos e como agentes imunomoduladores, bem como para fins terapêuticos (GONDIM et al., 2017).

Em geral uma molécula de lectina apresenta pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos, que permitem ligações cruzadas entre as células por meio de combinações com açúcares em sua superfície ou entre açúcares contidos em macromoléculas, justificando sua capacidade de aglutinar partículas e de precipitar glicoconjugados. A ligação lectina-carboidrato é decorrente de ligações covalentes, onde moléculas de água, que estão associadas ao grupo polar das proteínas e também em torno do carboidrato, são deslocadas. Essa

modificação tem como resultado a formação de novas redes de ligação de hidrogênio, que junto com Forças de Van der Waals, estabilizam essa interação (OLVEIRA, 2012).

2.1.1 Atividade das lectinas

A estrutura das proteínas e sua atividade é fortemente influenciada por fatores ambientais, como pH e temperatura, além do fatores químicos como presença de íons (CARRILLO et al., 2016). Para as lectinas a temperatura é um fator considerável em relação à manutenção da atividade nativa de hemaglutinação. Singh e Saxena (2013) trabalhando com lectina de *Momordica charantia* (MCJ) observaram que a 30°C sua atividade foi mantida, no entanto o aumento da temperatura para 55°C reduziu sua atividade hemaglutinante em 50%, sendo esse percentual de atividade mantido por 12 minutos. A perda total da atividade da lectina ocorreu a 65°C, não havendo recuperação, mesmo após a redução da temperatura. Isso mostrou que a cinética de inativação da atividade de hemaglutinação da lectina nessa temperatura é um processo irreversível.

Assim como a temperatura, o pH é um fator bastante influente na atividade das lectinas. Testes de hemaglutinação com a lectina MCJ mostraram que ela é ativa em valores de pH entre 3 e 11. A atividade hemaglutinante da MCJ aumenta com o aumento do pH e a atividade se torna máxima na faixa de pH de 5 a 8. Com o aumento do pH, a atividade hemaglutinante da MCJ diminuiu, mantendo menos de 50% de atividade de aglutinação em pH entre 10 e 11. Valores extremos de pH alteram a carga líquida da proteína, provocando a repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio. (SINGH; SAXENA 2013).

A maioria das lectinas necessita de íons metálicos para apresentarem atividade aglutinante, como é o caso das lectinas de leguminosas que necessitam de Mn^{+2} e Ca^{2+} . Estudos realizados por Sharon e Lis, (1990) com concavalina A (ConA) indicaram que, em meio ácido houve uma remoção de íons metálicos da molécula de ConA, eliminando sua capacidade de se ligar a carboidratos. No entanto, tal reação pode ser contornada com a adição dos íons Mn^{+2} e Ca^{2+} , nessa ordem, considerando que os metais conferem um alto grau de estabilidade estrutural a ConA, protegendo as lectinas contra a inativação pelo calor (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

Por outro lado, esses mesmos íons em altas concentrações são capazes de aglutinar células, como foi observado por Silva et al. (2010) no estudo sobre a influência dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para a atividade hemaglutinante da lectina da folhas de mandioca. Desse modo, para garantir que a aglutinação está sendo mediada pela lectina e não pelos íons em excesso, exige-se que ocorra a inibição dessa atividade com a adição de carboidratos.

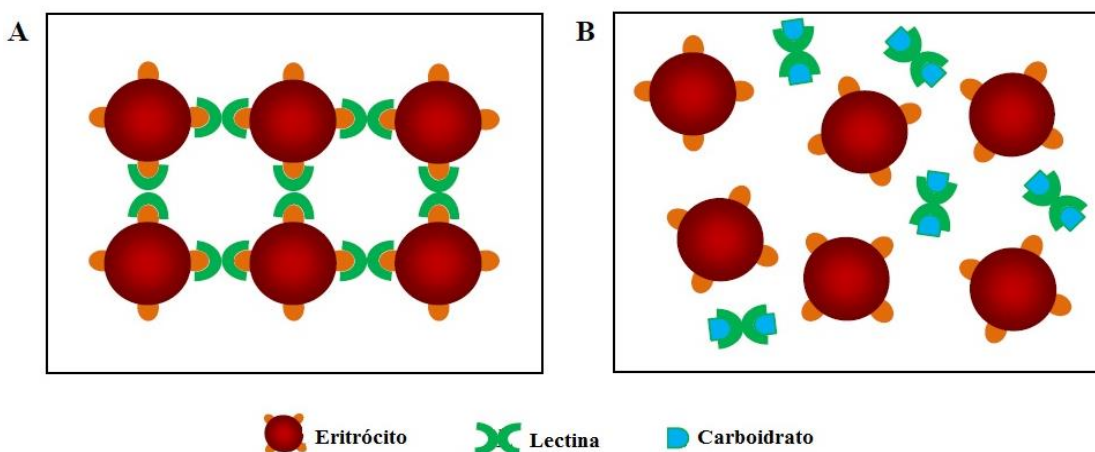
2.1.2 Interação lectina-carboidrato

O reconhecimento da especificidade das interações lectina-carboidrato envolve diferentes técnicas, tais como cromatografia de afinidade, eletroforese, espectroscopia na região do ultravioleta-visível, entre outras (LIMA et al., 2015).

Usualmente o método mais simples de identificação da presença de lectinas em um meio é através de ensaios de inibição de hemaglutinação (IH) e apesar da sua baixa precisão é o método mais utilizado. IH mede a quantidade de carboidrato necessário para inibir a aglutinação de eritrócitos causada pela lectina e pode ajudar a determinar o carboidrato específico para a lectina de interesse. A especificidade é dada em relação ao carboidrato que apresentar uma maior inibição da reação de aglutinação (MOROKUTTI et al., 2013).

Neste tipo de ensaio, são realizadas diluições seriadas da amostra em solução salina, seguida de incubação com eritrócitos humanos ou de animais. Assim, a lectina adicionada se liga aos carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, causando uma ligação cruzada entre as células, denominada de rede de hemaglutinação (Figura 1A). Quando existe uma inibição bem sucedida, a adição do carboidrato evita a formação da rede de hemaglutinação (Figura 1B). Neste caso, a falta de aglutinação é um resultado positivo, provando a atividade inibitória do carboidrato empregado. Utilizando diferentes concentrações de vários carboidratos, pode-se obter uma avaliação semi quantitativa da afinidade e especificidade de uma lectina (ADAMOVIĆ et al., 2014).

Figura 1: Representação da inibição da hemaglutinação



Fonte: Oliveira (2012).

A classificação mais comum para essas proteínas é baseada em suas fontes que são animais e plantas, bem como micro-organismos. Lectinas vêm sendo extraídas de fontes como o cogumelo *Shimeji* (SUZUQUI et al., 2015) e o feijão preto (HE et al., 2015). Alguns trabalhos ainda vêm sendo feitos com extração de lectinas de semente de jambo (BRUSTEIN

et al., 2012), sementes de quiabo (SOARES et al, 2012) além de gérmen de trigo (BAIELI et al., 2012). Na Tabela 1, são apresentadas algumas fontes de lectinas bem como seus ligantes específicos.

Tabela 1: Lectinas e seus ligantes específicos

Lectina	Fonte	Nome científico	Ligantes específicos
Con A	Feijão-de porco	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-manosil e α -D-glicosil
PNA	Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	N-acetilgalactosamina
WGA	Gérmen de trigo	<i>Triticum vulgare</i>	N-acetilglicosamina
Jacalina	Jaca	<i>Artocarpus integrifolia</i>	α -galactopiranosídeos e metil- α -D-galactopiranosídeo
Ricina	Mamona	<i>Ricinus communis</i>	β -D-galactosil
Emal	Jambo vermelho	<i>Eugenia malaccensis</i>	Glicose
PHA	Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	N-acetil-D-galactosamina

Fonte: Adaptado de Brustein et al. (2012) e Juan et al. (2017).

A relação lectina-carboidrato e a especificidade dessa interação são largamente estudadas e apesar da vasta quantidade dessas glicoproteínas na natureza, nem todos os processos que envolvem esse mecanismo estão totalmente compreendidos. Curiosamente, apesar da alta semelhança entre as lectinas de plantas, muitas apresentaram perfis biológicos notavelmente distintos, com uma vasta gama de atividades biológicas que incluem atividades anti-inflamatórias, antidepressivas e vasodilatadoras. Algumas lectinas foram identificadas recentemente como agentes antitumorais promissores, por exemplo, ConA e a lectina ML-I da planta Erva-de-passarinho estão em ensaios pré-clínicos e clínicos para câncer de fígado humano e melanoma maligno (GONDIM et al., 2017).

Além disso, as lectinas podem ser utilizadas na produção de biossensores para a indústria de alimentos, verificando a existência de certos grupos de analitos e/ou microrganismos, assegurando a qualidade de matérias-primas e produtos industrializados (RAHAIE; KAZEMI, 2010). A tecnologia de biorreconhecimento de lectinas por açúcares tem sido aplicada no diagnóstico clínico (GEMEINER et al., 2009) e na remoção de vírus do sangue (TULLIS et al., 2009). Este grupo de glicoproteínas é encontrado em muitos organismos, de bactérias a plantas e animais (PERÇIN; AKSÖZ, 2012).

2.1.3 Purificação de lectinas

A purificação de proteínas é fundamentada para os estudos das características físico-químicas, estruturais e propriedades biológicas, sendo estimulada pela sua potencial utilização em diversas áreas como a medicina clínica, pesquisa química, bioquímica e biológica

(BANERJEE et al., 2004). As lectinas podem ser purificadas através de métodos convencionais como precipitação com sal ou ácido, extração por sistema aquoso e separações cromatográficas, como por exemplo, troca iônica e exclusão molecular ou por afinidade (HE et al., 2015).

Dada a capacidade das lectinas em se ligar a carboidratos e outras glicoproteínas, a técnica mais utilizada na purificação deste grupo de proteínas é a cromatografia de afinidade (OLIVEIRA et al., 2002; ROY et al., 2005). Essa capacidade vem sendo amplamente explorada, sendo estudada a interação com de N-acetilglicosamina (GONÇALVES, 2016), derivados de galactose (OLIVEIRA et al. 2002), manose (OURTH; ROSE, 2011), proteínas (JUNG et al., 2003) entre outros.

2.2 Técnicas cromatográficas

Dentre os procedimentos mais utilizados para a purificação de proteínas estão as técnicas cromatográficas, como a troca iônica e afinidade que têm diferentes princípios de separação, como a diferença de carga e afinidade de ligação, respectivamente. São considerados os métodos mais eficientes para purificação e empregados com o objetivo de isolar a biomolécula de interesse em relação às demais, levando a pureza adequada para o uso a que se destina (NELSON; COX, 2011). O princípio de separação desse método físico-químico baseia-se na diferença de interação dos componentes da mistura com a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos compostos, permitindo assim separá-los. Durante o procedimento, as proteínas são ligadas em um material sólido poroso com características químicas apropriadas, denominada de fase estacionária, mantida em uma coluna pela qual é percolada uma solução tampão, caracterizada como fase móvel (PFAUNMILLER, 2013).

Entre os modos de operação dos vários processos cromatográficos, estão o leito fixo e o leito expandido. O leito fixo apresenta elevada eficiência, sendo uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos. Porém, a presença de grandes biomoléculas e materiais altamente concentrados desafiam sua capacidade e produtividade. A adsorção em leito expandido permite o uso de alimentação contendo material particulado, eliminando a necessidade de clarificação inicial do meio, reduzindo o número de etapas do processo e evitando a perda de atividade da biomolécula. Em contrapartida, esse método cromatográfico exige tipos especiais de colunas e acessórios que não podem ser instalados em sistemas tradicionais de cromatografia de leito empacotado (MACHADO et al., 2015; FIDELIS, 2011)

Para contornar esses problemas, em especial os problemas de transferência de massa, vem ocorrendo um maior interesse dos pesquisadores no estudo das colunas monolíticas

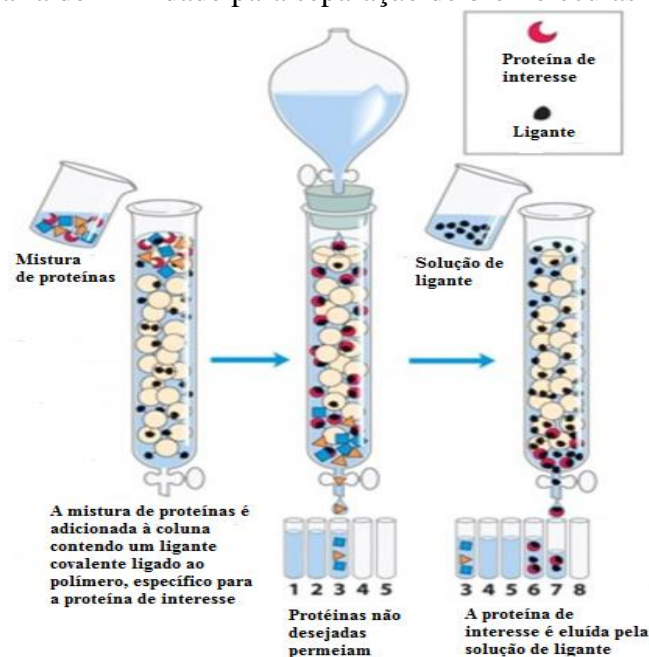
poliméricas supermacroporosas, pois estas permitem que o processo ocorra a uma velocidade superficial comparável a cromatografia líquida de alta eficiência tradicional e superior às utilizadas em leito expandido, utilizando baixas pressões (FIDELIS, 2011; PFAUNMILLER, 2013).

2.3 Cromatografia de afinidade para purificação de proteínas

A cromatografia de afinidade envolve técnicas de cromatografia líquida baseada em interações altamente específicas e reversíveis entre pares de materiais biológicos (enzima-substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo), garantindo uma maior seletividade, devido a características estereoquímicas e tipológicas específicas apresentadas pelas proteínas. O princípio deste método consiste em melhorar a capacidade de separação de biomoléculas a partir de ligações específicas não covalentes a suportes insolúveis, favorecendo a obtenção de biosseparações com elevada seletividade. Nessa técnica, um dos componentes dos pares de materiais biológicos é imobilizado em uma matriz porosa, funcionando como um adsorvente seletivo para a molécula complementar, obtendo uma maior eficiência (ARORA et al., 2016; HAGE et al., 2017)

Os processos em cromatografia de afinidade consistem basicamente em percolar uma amostra sobre uma fase estacionária adsorvente contendo os pares específicos de ligação previamente equilibrada pela fase móvel para se conseguir as melhores condições de interação, como ilustra a Figura 2.

Figura 2: Cromatografia de Afinidade para separação de biomoléculas



Fonte: Nelson; Cox (2011).

As moléculas do soluto presente na amostra interagem seletivamente com os pares imobilizados, sendo retidos na fase estacionária. Posteriormente, a mesma é lavada para a retirada de compostos não ligados ou fracamente ligados, sendo em seguida passada a fase móvel em condições dessortivas, revertendo a ligação específica que havia sido formada (HAGE, 2010).

Esta técnica é bastante utilizada para purificação de lectinas as quais se ligam a carboidratos ou glicoproteínas acoplados na matriz, de acordo com a especificidade. Essas moléculas são eluídas com carboidratos ou glicoproteínas em solução, por exemplo, a matriz Sephadex[®] G-50 retém lectinas com especificidade a glicose, D-frutose, D-manose, sucrose e metil- β -D-glicopiranosídeo; a matriz de quitina é específica para N-acetil-D-glicosamina e oligossacarídeos (GONÇALVES et al., 2017; ZHOU et al., 2014)

A cromatografia de afinidade emprega diferentes tipos de agentes de ligação (ligantes) e suportes de fase estacionária (matrizes). Ao aperfeiçoar várias propriedades, tais como especificidade, seletividade, reprodutibilidade, química de conjugação e custo-benefício desses componentes, este método pode ser aplicado para a purificação em larga escala para alcançar o rendimento desejado e a pureza do produto (ARORA, et al., 2016).

Um fator importante para garantir uma boa eficiência da cromatografia de afinidade é a escolha da fase móvel adequada para realizar a eluição. Essa etapa requer a completa dissociação do complexo adsorvente-adsorvato, obtendo uma alta pureza e utilizando o menor volume de solução possível. Os métodos de eluição utilizados podem ser seletivos ou não seletivos (HAGE et al, 2017).

Os métodos seletivos aproveitam as propriedades naturais das interações bioespecíficas das proteínas, utilizando uma solução contendo alta concentração de ligante livre, podendo ser o mesmo que foi ligado na superfície da matriz, ocorrendo assim, uma competição entre os ligantes solúveis e os imobilizados, onde o solúvel deve estar em excesso, e dessa maneira ocorrerá à dissociação e o adsorvato se deslocará para a fase solúvel (KAMIMURA; MAUGERI FILHO, 2005; HAGE, 2010). Os métodos não seletivos alteram as propriedades físicas do adsorvente por meio da variação de pH, efeito da temperatura ou utilização de proteínas desnaturantes, reduzindo a intensidade da ligação ligante-proteína, promovendo, desse modo, a dissociação do complexo (HAGE, 2010).

Outro fator a ser considerado é o tipo de ligante a ser imobilizado na fase estacionária. Existem diversos tipos de ligantes que podem ser imobilizados. Tais ligantes podem ser agrupados em duas categorias: ligantes de alta especificidade e ligantes gerais. Os ligantes de alta especificidade se ligam a um grupo mais restrito de moléculas, como por exemplo, antígenos para anticorpos e substratos de enzimas. Esses tipos de ligantes são

utilizados quando o objetivo é analisar ou purificar um soluto específico. Os ligantes gerais se ligam a uma família de solutos sem distinção entre compostos individuais. É o caso de metais quelatos, corante triazina, proteínas A e G e lectinas. Estes são utilizados quando se objetiva separar uma classe de compostos, e possuem ligações mais fracas com a molécula alvo do que os ligantes de alta especificidade (HAGE, 2017; PFAUNMILLER, 2013).

2.4 Criogeis poliméricos monolíticos

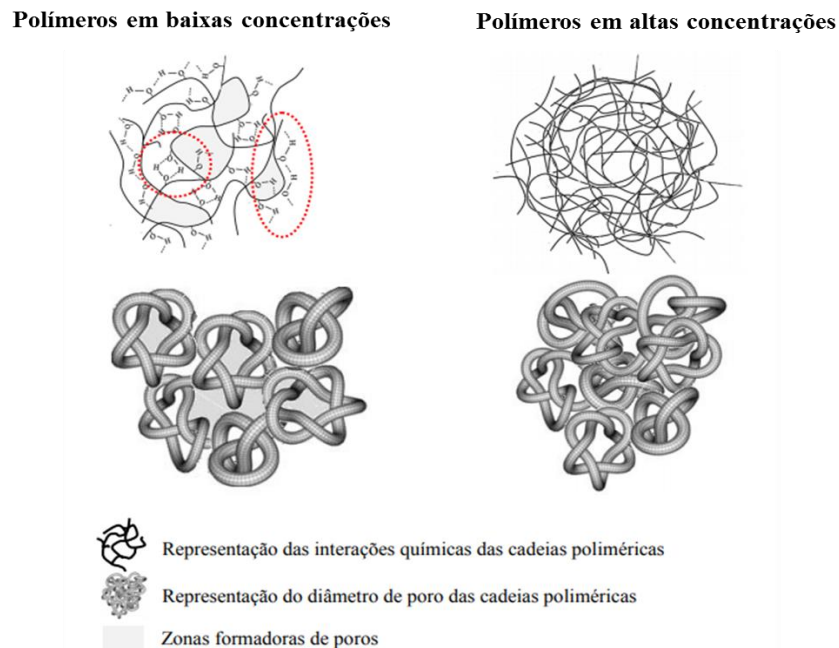
Apesar das estratégias de desenvolvimento de um processo de purificação cromatográfico de biomoléculas para escala industrial serem conhecidas, grandes estruturas biomoleculares e materiais muito concentrados desafiam os limites dos métodos cromatográficos convencionais em relação a sua capacidade de purificação. Por esse motivo surge o interesse no uso de monólitos macroporosos na cromatografia (PFAUNMILLER et al., 2013).

A introdução de colunas de leito fixo, como os monólitos macroporosos, para separação cromatográfica de biomoléculas tem despertado bastante interesse. Essas colunas monolíticas poliméricas são suportes com estrutura de poros grandes e interconectados, utilizados para separação e purificação de bioprodutos de meios ou soluções não clarificadas, contendo partículas ou mistura de células (PERÇIN et al., 2015; CARVALHO et al., 2014).

Os monólitos macroporosos, denominados criogeis, são produzidos a partir de solução de monômeros e polímeros hidrofílicos por técnicas de criocongelamento, anteriormente utilizada para aplicações biomédicas. A criogeificação é um tipo específico de síntese de géis poliméricos onde a formação tem início no tratamento criogênico de sistemas potencialmente capazes de formar géis (DAINIAK et al., 2010).

O processo de formação do gel em uma zona de semi congelamento permite a preparação de matrizes monolíticas mecanicamente estáveis, composta de macroporos interconectados de grandes dimensões, uma vez que os poros formados nesse processo são de 100 a 1000 vezes maior do que aqueles em outros géis, que tem poros na faixa de 0,03 - 0,4µm. Tal característica revela a atratividade e potencial desses materiais, pois o fluxo através dos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa, o que torna permeável a soluções aquosas de proteínas e até mesmo suspensão de células (PERÇIN et al., 2015; TAO; WANG; SUN, 2014; UNLUER, 2013). Na Figura 3, observa-se o esquema das redes poliméricas em diferentes concentrações, evidenciando o maior grau de entrelaçamentos físico-químicos entre as cadeias com o aumento da concentração de polímero e, conseqüentemente, diminuição do tamanho dos poros e da porosidade (conectividade entre os poros).

Figura 3: Efeito da concentração do polímero sobre a formação de poros nas colunas cromatográficas



Fonte: Fagundes (2011).

Os criogéis monolíticos exibem múltiplos poros que podem variar de 1 μ m a 100 μ m de diâmetro e essas dimensões podem ser controladas alterando os parâmetros de síntese incluindo a natureza e o tipo do polímero, a temperatura de síntese e a composição do agente de reticulação (SAVINA et al., 2011). Nesse contexto, diversos compostos poliméricos podem ser combinados na síntese dos criogéis, bem como o uso de diferentes temperaturas de congelamento, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de sistemas para preparação de criogéis poliméricos

Monômeros e reticulantes	Solvente	Catalisador	T (°C)
Ácido metacrílico + oligoetilenoglicol Diacrilato	Água	APS+ TEMED	-20
2-hidroxietilmetacrilato + N-vinil imidazol + etilenoglicol dimetacrilato	Água	APS+ TEMED	-16
N-isopropilacrilamida + ácido itacônico + N, N'-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-22
Acrilamida + N, N'-metileno-bis-acrilamida + Alil- glicidil éter	Água	APS+ TEMED	-12
N-isopropilacrilamida + ácido acrílico + N, N'-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-22

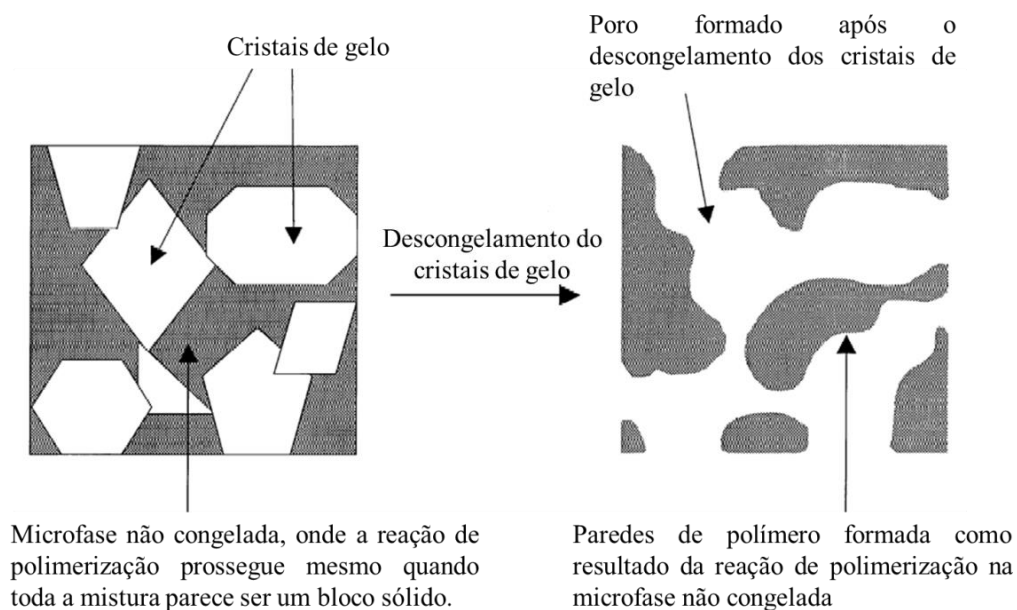
APS, Persulfato de amônio; TEMED, N,N,N,N-tetrametiletlenodiamino

Fonte: Adaptado de Okay (2014).

Entre os possíveis polímeros empregados na síntese desses compostos destaca-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 (BAam) adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento moderado (-10 °C a -20 °C), pela técnica conhecida como criogeificação (PLIEVA et al., 2004b). Os monólitos assim sintetizados são chamados de criogéis de poli(acrilamina) (pAam) e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores como Mól et al. (2017), Carvalho et al. (2014) e Gonçalves et al. (2016).

Durante o processo de criogeificação, os cristais de gelo em crescimento são os responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura macroporosa. Mais de 90% do monólito é composto de água e apenas 10% é a fase de gel (isto é, polímero com água fortemente unida). Por isso, os cristais de gelo desempenham o papel de modelos porogênicos, ou seja, a forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem durante a síntese do criogel, como ilustrado na Figura 4 (PLIEVA et al., 2008; PRIVAR et al., 2017; DRAGAN et al., 2012).

Figura 4: Representação esquemática da produção de criogéis

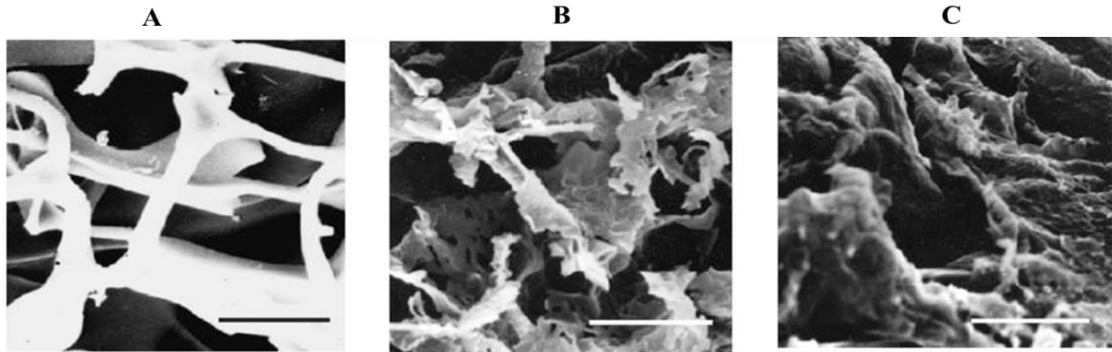


Fonte: Adaptado de Erturk e Mattiasson (2014).

Lozinsky (1986) estudou a dinâmica de formação dos criogéis utilizando temperaturas de congelamento de -10°C, -20°C e -30°C e percebeu que na temperatura de -10°C os poros formados foram maiores, como pode ser observado na Figura 5. Essa característica se dá devido ao fato de que quando temperaturas maiores são empregadas no processo de criogeificação, o congelamento ocorre mais lentamente, resultando no

desenvolvimento de cristais de gelo maiores, e neste caso, poros maiores são formados quando se utilizou maior temperatura.

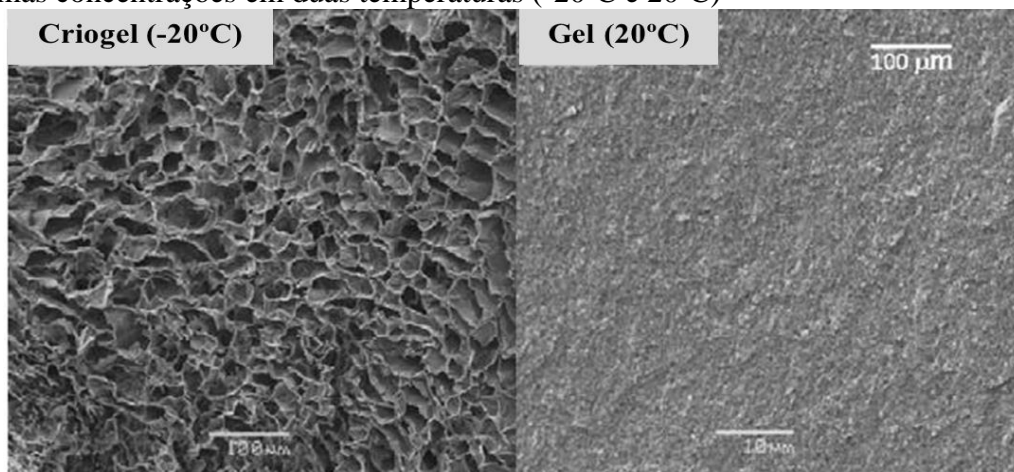
Figura 5: Imagens da microscopia eletrônica de criogeis de poliacrilamida. (A) -10°C , (B) -20°C e (C) -30°C



Fonte: Lozinsky (1986).

No entanto, temperaturas muito acima das de congelamento não permitem a formação de um gel macroporoso, como foi observado por Plieva et al., (2007) quando estudou criogeis com as mesmas concentrações, porém, submetidos a -20°C e 20°C . Na Figura 6 verifica-se que a estrutura do gel formado a 20°C é compacta e possui poros de menor tamanho, enquanto o criogel formado a -20°C apresenta poros grandes e interconectados variando de $10\ \mu\text{m}$ a $100\ \mu\text{m}$, o que reforça a importância da criogeificação na síntese desses compostos.

Figura 6: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações em duas temperaturas (-20°C e 20°C)



Fonte: Adaptado de Plieva et al. (2007).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogeis poliméricos, os grandes poros e a elevada porosidade de sua estrutura fazem com que sua área superficial seja menor do que a das colunas cromatográficas tradicionais, diminuindo a eficiência do processo de purificação.

Em contrapartida, as propriedades dos criogeis podem ser transformadas pós-fabricação com os processos chamados de funcionalização ou ativação, que consiste em modificar quimicamente ou fisicamente a superfície de tais colunas (KUMAR, 2016).

Uma alternativa viável é transformar os criogeis poliméricos em adsorventes de afinidade específica, por meio da enxertia do mesmo com soluções contendo grupos ligantes de interesse, proporcionando assim uma boa alternativa às tradicionais matrizes de cromatografia baseadas em afinidade (BIBI et al., 2013; YUN et al., 2009; WANG et al., 2013).

2.5 Modificações na superfície dos suportes cromatográficos

Posto que exista uma ampla variedade de suportes monolíticos que se encontram à disposição para fins de purificação das mais diversas biomoléculas existentes, não há um que seja uma solução universal. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, diversas abordagens para a imobilização de ligantes de afinidade têm sido reportadas (ANDAÇ; GALAEV; DENIZLI, 2016).

Os processos de adsorção, a conformação e a atividade aparente da biomolécula imobilizada ou purificada são influenciados pelas propriedades da coluna monolítica utilizada com suporte. Os grupos reativos, na maioria dos casos são inseridos na superfície da matriz polimérica para propiciar a formação de ligação covalente entre a biomolécula e o suporte. Cada método de imobilização apresenta uma diferente reação química para atingir o máximo de adsorção das biomoléculas percoladas. Como técnicas de funcionalização dos criogeis tem-se a imobilização via ligação covalente, adsorção bioespecífica, ativação catiônica, dentre outras (TALBERT; GODDARD, 2012; INGAVLE et al., 2015).

Nessas técnicas a funcionalização é realizada por intermédio da circulação de soluções contendo agentes reticulantes através da coluna monolítica ou por imersão do suporte na solução contendo os grupos ligantes. Os grupos reativos, como os grupamentos epóxi, são introduzidos na superfície do suporte para permitir a formação de ligação covalente entre a biomolécula e o suporte na etapa subsequente. A inserção de novas estruturas químicas na superfície permite obter fases estacionárias que tenham relação mais ou menos específica com uma proteína em particular (KIM; HAGE, 2005).

Nesse contexto, dentre as diversas matrizes existem diferenças notáveis com relação às propriedades químicas dos monômeros usados no processo de síntese das colunas. Tal fato deve ser considerado, principalmente em relação à presença de grupos funcionais específicos. O grupo funcional do monômero, como por exemplo, os grupos epóxi fornecido pelo

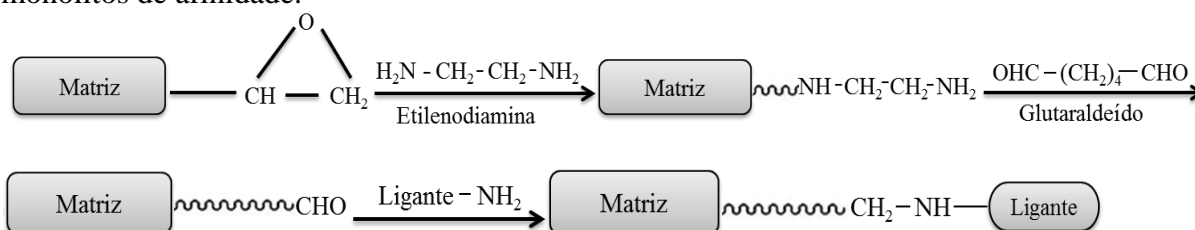
monômero AGE, podem ser usados em uma etapa futura da reação como grupo de ancoragem para imobilizar os ligantes específicos ou para melhorar propriedades específicas tais como hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, pH ou temperatura de ativação (ARRUA et al., 2009). Para aplicação adequada do monômero, monólitos com variadas atuações podem ser projetados, como foi observado por Ingavle et al. (2015) no uso de criogeis funcionalizados com grupos epóxi advindos do metacrilato glicidil (GMA) para remoção de biotoxinas usando o antígeno protetor da toxina do Antrax.

Na etapa de funcionalização devem ser observados alguns aspectos para melhorar as propriedades e evitar certos problemas no uso dessas colunas, como o impedimento estérico. Assim, a formação de braços espaçadores minimiza ou resolve o problema relacionado, ampliando as possibilidades de interação, uma vez que aumenta a acessibilidade a todos os centros de ligação disponíveis numa proteína. Em contra partida, os braços espaçadores pode promover interações não específicas de várias proteínas à matriz (GONÇALVES et al., 2017; ANDAÇ; GALAEV; DENZLI et al., 2016).

2.5.1 Método do Glutaraldeído

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. 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. Um dos métodos que utilizam como suporte uma matriz macroporosa contendo radicais epóxi reativo é o método do glutaraldeído, esquematizado na Figura 7 (MALLIK; HAGE, 2006; UYGUN et al., 2015).

Figura 7: Método do glutaraldeído - imobilização de ligantes via ligação covalente para monólitos de afinidade.



Fonte: Adaptado de Gonçalves (2016).

Nesse método, um monólito contendo grupamentos epóxi reativos (monólito epóxi-ativado) é inicialmente convertido para a forma amina (monólito amina-ativado) por meio da

reação dos grupos epóxi com reagentes contendo grupamento amina, como etilenodiamina. O monólito amina-ativado reage então com glutaraldeído, formando um monólito aldeído-ativado capaz de reagir com grupamento amina das moléculas (MALLIK; HAGE, 2006; GONÇALVES et al., 2017). A vantagem principal está na capacidade de formação de um longo braço espaçador entre o criogel e o ligante, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico, o que pode acarretar em uma maior capacidade de imobilização do ligante e de purificação da molécula alvo (GONÇALVES et al., 2016; LUO et al., 2002).

De fato, o método apresenta melhores resultados quando comparado a outros, como foi avaliado por Gonçalves et al. (2016) que obteve dados sobre a capacidade de imobilização de carboidrato em colunas monolíticas utilizando os métodos de Base de Schiff, Époxi, Etilenodiamina e o Glutaraldeído. Este último apresentou a maior capacidade de imobilização, com cerca de 147 mg de carboidrato por grama de criogel, sendo assim utilizado para se avaliar a imobilização de diferentes açúcares no criogel, visando a aplicação na purificação de lectinas com diferentes especificidades. Partindo dessa avaliação, a realização de mais pesquisas nessa área é de fundamental importância para ampliar o conhecimento e contribuir na otimização de tal processo.

2.6 Planejamento e otimização de experimentos

A condução de algumas pesquisas experimentais pode ser feita por meio da aplicação sucessiva de diferentes técnicas específicas de estatística, de acordo com objetivo principal do experimento. Quando esse objetivo é a otimização de uma ou mais variáveis em estudo, o uso de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos propicia a obtenção de um grande número de informações úteis, utilizando um número reduzido de ensaios (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2012).

A otimização consiste no emprego de métodos matemáticos para a determinação de valores para as variáveis em estudo que resultem numa condição de máximo ou mínimo da variável resposta. Esse método é uma ferramenta poderosa, com a qual vários objetivos específicos podem ser alcançados. Por exemplo, fabricar produtos com melhores características, diminuir seu tempo de desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos, minimizar a sensibilidade dos produtos às variações nas condições ambientais, dentre outros (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Em áreas diversas da pesquisa, como, por exemplo, agronomia, biologia, engenharia, o pesquisador se depara frequentemente com problema de relacionar a influência de variáveis quantitativas que afetam uma ou mais variáveis resposta. Em grande parte dos casos, o relacionamento desejado entre resposta e fatores é aquele que determina uma combinação dos

níveis dos fatores, que dão uma resposta ótima (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O processo de otimização parte da escolha da melhor estratégia do planejamento experimental, levando em consideração, principalmente, o número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar, a partir do conhecimento inicial que se tem sobre o processo. Atualmente tem-se dado ênfase ao uso da metodologia de superfície de resposta para estudar esse tipo de processo (MYERS; MONTGOMERY, ANDERSON-COOK, 2009).

A superfície de resposta consiste de uma metodologia que abrange várias técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolvimento, melhora e otimização de processos. Ela também tem aplicações importantes em planejamentos, desenvolvimento e formulação de novos produtos, e melhoria dos projetos e produtos existentes (COMPARINI et al., 2009). A maioria das aplicações da metodologia de superfície de resposta é de natureza sequencial. Nesse sentido, essa metodologia consiste em experimentos exploratórios em que se realiza uma primeira fase, em faixas mais amplas dos níveis dos fatores e depois se realizam novos experimentos, com faixas de valores das variáveis independentes mais próximas da região de otimização (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

Na primeira fase, quando o número de fatores é muito grande, é mais conveniente escolher inicialmente um delineamento fatorial fracionado. Este tem grande importância no início da pesquisa, onde normalmente se tem pouca informação das variáveis a serem consideradas. Os fatoriais fracionados permitem obter informações das variáveis com poucos ensaios possibilitando o descarte daquelas menos importantes. Ainda tem a possibilidade de se obter informações sobre os efeitos da interação entre as variáveis, ou seja, quando o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Depois de verificados quais parâmetros apresentam significância sob a variável resposta estudada, outra ferramenta estatística aplicada de forma eficiente, é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), e com este é possível explorar todo o espaço amostral com um número mínimo de ensaios. Este delineamento permite estimar uma equação de 2º grau, portanto é possível observar se as variáveis possuem comportamento de máximo ou de mínimo (RODRIGUES; IEMMA, 2005; (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

Após definida a combinação ótima dos níveis das variáveis independentes realiza-se um último ensaio com as condições encontradas com a finalidade de se comparar com os valores estimados da variável resposta e validar as condições encontradas como condições ótimas.

3 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo do presente trabalho foi otimizar a quantidade do carboidrato N-acetil-D-glicosamina imobilizado, utilizando-se o método do glutaraldeído, em adsorventes monolíticos macroporosos voltados para o processo de purificação por técnicas de cromatografia de afinidade.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de quatro variáveis na quantidade de açúcar imobilizada: Quantidade de AGE na síntese do criogel, concentração de glutaraldeído e temperatura de incorporação do mesmo e concentração de N-acetil-D-glicosamina.
- Determinar a condição ótima das variáveis significativas para imobilização do açúcar;
- Caracterizar os adsorventes produzidos, com relação a aspectos físicos, químicos e estruturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga.

4.1 Materiais

Para a realização deste trabalho foram utilizados acrilamida (AAm), bis-acrilamida (BAAm) e alil-glicidil-éter (AGE) para a produção dos criogeis que serviram de suporte para os grupos de afinidade. O carboidrato modificado utilizado para os ensaios de imobilização foi o N-acetil-D-glicosamina (D-GlcNAc). Os reagentes citados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os demais reagentes utilizados no experimento estão descritos ao longo da metodologia e todos possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS.

4.2 Síntese dos criogeis

Para a síntese dos criogeis, foram adaptadas as metodologias propostas por Gonçalves et al. (2016) e Mól et al. (2017). Soluções com diferentes formulações de criogeis, todas contendo 6% de monômeros totais, foram preparadas em banho de gelo mantendo-se a proporção de (AAm + AGE): BAAm em 4:1, alterando-se apenas a relação entre AAm e AGE conforme detalhado na Tabela 3.

Tabela 3: Quantidade de monômeros utilizados para o preparo de 100 mL de solução

Formulação	AAm	AGE	BAAm
1	4,1g	0,7g	1,2g
2	3,9g	0,9g	1,2g
3	3,7	1,1g	1,2g

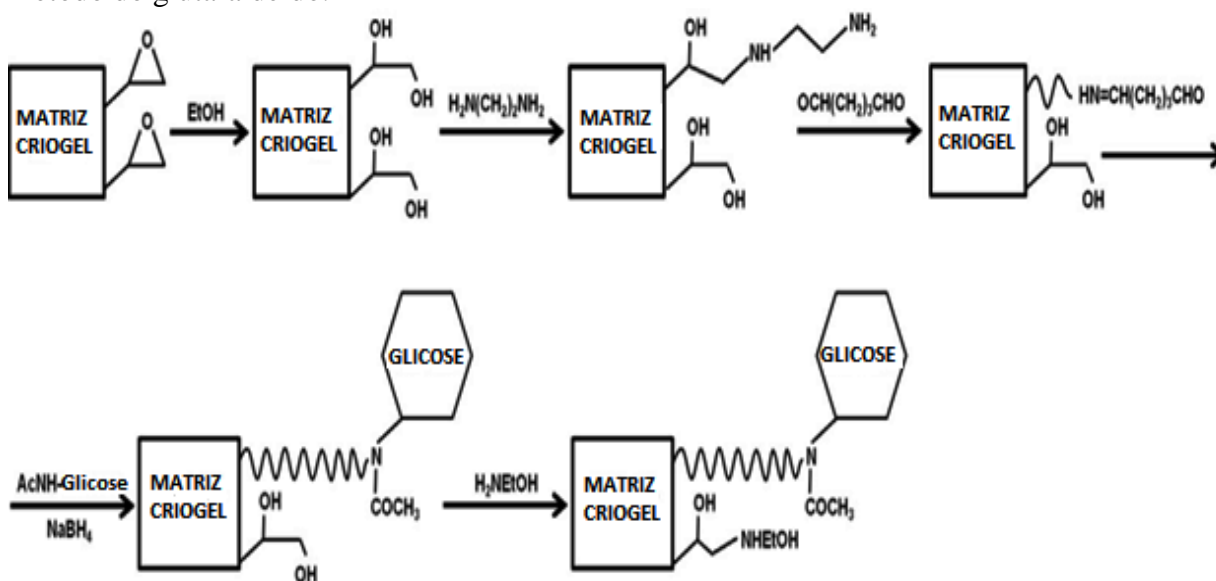
Em seguida foram adicionados 120 μ L de solução de persulfato de amônio (APS) na concentração de 0,5 g/mL e 78 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletenodiamino (TEMED) para cada 100 mL de solução de monômeros. A solução foi homogeneizada e imediatamente vertida em seringas plásticas de 5 mL e imersas em um banho termostático microprocessado com circulador (Q214M2) à temperatura de -12,0 °C por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram mantidas a temperatura de 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente e levadas para secagem em estufa a uma temperatura de 60°C. Após a secagem completa, cada criogel foi submetido ao corte das extremidades defeituosas e lavados com cerca de 170 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica a 6 rpm (vazão de

cerca de 1,5 mL/min), e novamente secos em estufa para posterior utilização no processo de imobilização dos carboidratos.

4.3 Imobilização de carboidratos pelo método do glutaraldeído

Para a imobilização de D-GlcNAc pelo método do glutaraldeído foi utilizada metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2016), sendo apresentado na Figura 8 um esquema com o provável mecanismo de imobilização do carboidrato.

Figura 8 - Visão esquemática do provável mecanismo de imobilização de D-GlcNAc pelo método do glutaraldeído.



Fonte: Adaptado de Gonçalves et al. (2016).

Para o processo de imobilização foi adotado o sistema em batelada, no qual os criogéis secos foram previamente pesados e colocados sob agitação à 25 rpm em todas as etapas do processo, utilizando-se seringas de 20 mL. A cada etapa realizada os criogéis sofriam uma leve compressão manual para a retirada do excesso de solução da etapa anterior.

Inicialmente, os criogéis foram pesados e colocados em contato com 20 mL de álcool etílico absoluto por 2 horas. Posteriormente, foram mantidos em contato com 20 mL de água destilada, seguido de contato com tampão carbonato 0,05 mol/L pH 9,5 (20 mL), ambos com tempo de contato de 1 hora. Em seguida, os mesmos foram imersos em 20 mL de etilenodiamina 0,05 mol/L em tampão carbonato e mantidos sob agitação por 14 horas à temperatura ambiente.

Após essa etapa os criogéis foram lavados com água destilada e depois imersos em 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,2, cada etapa com 1 hora de duração. Então, os criogéis foram postos em contato com 20 mL de soluções de glutaraldeído com

diferentes concentrações, à temperatura controlada, por 5 horas. Em seguida os criogeis foram enxaguados duas vezes com 20 mL água destilada por 30 minutos, para remoção do excesso de glutaraldeído. As concentrações de glutaraldeído e temperaturas de utilização estão descritas nas seções 4.4.1 e 4.4.2. Na sequência os criogeis aldeído-ativados foram postos em contato durante 17 horas à temperatura ambiente com soluções de D-GlcNAc de diferentes concentrações, conforme descrito nas seções 4.4.1 e 4.4.2, preparadas em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,2.

Feito isso, as colunas foram imersas em 20 mL de solução de borohidreto de sódio 0,1 mol/L em tampão carbonato, por 30 minutos e lavados com 20 mL de água destilada, seguido de 20 mL de etanolamina 0,1 mol/L no tampão carbonato e novamente 20 mL de água destilada, as três últimas etapas com 1 hora de duração cada. Após a ativação os criogeis foram colocados em estufa a 60°C e após a secagem foram armazenados à temperatura ambiente.

A quantidade D-GlcNAc imobilizada na superfície do criogel foi determinada por diferença a partir da concentração de carboidrato na solução inicial e após o contato com o criogel, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), e calculado pela Equação 1.

$$q = \frac{(C_0 - C)V}{m_d} \quad (1)$$

Onde q é quantidade D-GlcNAc imobilizada na superfície do criogel (mg/g), C_0 e C são as concentrações de D-GlcNAc inicial e final (mg/mL), respectivamente e m_d é a massa (kg) do criogel desidratado e V é o volume de solução (mL).

4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Visando a otimização do processo de imobilização da D-GlcNAc nos criogeis epóxi-ativados produzidos, foi avaliado o efeito de 4 variáveis do processo, a fim de se verificar quais apresentariam efeito significativo ($p < 0,05$). Para tanto, inicialmente foi conduzido um experimento em um Delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} e em seguida aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

4.4.1 Delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1}

Nessa etapa foi avaliada a influência dos seguintes fatores: quantidade de AGE na formulação dos criogeis (X_1), concentração de glutaraldeído (X_2), temperatura de

imobilização do glutaraldeído (X_3) e concentração de D-GlcNAc usada (X_4). As condições experimentais aplicadas no delineamento são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições experimentais do Fatorial Fracionado 2^{4+1}

Ensaio	Variáveis Originais				Variáveis codificadas			
	AGE	Glut.	Temp.	D-GlcNAc	X_1	X_2	X_3	X_4
1	0,7%	5%	5°C	2mg/mL	-1	-1	-1	-1
2	1,1%	5%	5°C	5mg/mL	+1	-1	-1	+1
3	0,7%	15%	5°C	5mg/mL	-1	+1	-1	+1
4	1,1%	15%	5°C	2mg/mL	+1	+1	-1	-1
5	0,7%	5%	35°C	5mg/mL	-1	-1	+1	+1
6	1,1%	5%	35°C	2mg/mL	+1	-1	+1	-1
7	0,7%	15%	35°C	2mg/mL	-1	+1	+1	-1
8	1,1%	15%	35°C	5mg/mL	+1	+1	+1	+1
9	0,9%	10%	20°C	3,5mg/mL	0	0	0	0

Os ensaios foram realizados com duas repetições para cada tratamento, tendo os criogeis utilizados uma massa média de $0,2160 \pm 0,019$ g. Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, adotando-se o modelo adequado ao delineamento em questão (Equação 2), de modo a identificar quais variáveis tem efeito sobre a quantidade de D-GlcNAc imobilizada, o que foi definido com base na significância do modelo e dos parâmetros ($p < 0,05$), falta de ajuste do modelo ($p > 0,05$) e coeficiente de determinação (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_1 X_2 + \beta_6 X_1 X_3 + \beta_7 X_1 X_4 + \varepsilon \quad (2)$$

Onde: Y é a variável de resposta (quantidade de D-GlcNAc imobilizada, mg/g), β_0 é intercepto do modelo, β_1 a β_4 são os coeficientes lineares, β_5 a β_7 são os coeficientes de interação, X_1 a X_4 são as variáveis independentes codificadas estudadas, e ε é o erro.

4.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional

Após a avaliação dos resultados obtidos no Fatorial Fracionado, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para dar sequência ao processo de otimização do método. Duas variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a quantidade de D-GlcNAc imobilizada: temperatura de imobilização do glutaraldeído (X_1) e

concentração de açúcar (X_2), conforme detalhado na seção de resultados. Estas variáveis foram reavaliadas e novos testes de imobilização foram feitos, a fim de se obter um ponto ótimo, ou seja, a condição na qual é possível obter a maior concentração de D-GlcNAc imobilizada. Para isso, os valores da quantidade de AGE na formulação do criogel e concentração glutaraldeído foram fixados em 1,1% e 5% respectivamente. As condições experimentais aplicadas no delineamento são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições experimentais do DCCR aplicado.

Ensaio	Variáveis Originais		Variáveis Codificadas	
	Temperatura	D-GlcNAc	X_1	X_2
1	5°C	3,5 mg/mL	-1	-1
2	5°C	6,5 mg/mL	-1	+1
3	19°C	6,5 mg/mL	+1	+1
4	19°C	3,5 mg/mL	+1	-1
5	2°C	5 mg/mL	-1,41	0
6	12°C	2,89 mg/mL	0	-1,41
7	22°C	5 mg/mL	+1,41	0
8	12°C	7,12 mg/mL	0	+1,41
9	12°C	5 mg/mL	0	0

Esse tipo de delineamento permite estimar uma equação de 2º grau, sendo possível observar se as variáveis possuem comportamento de máximo ou de mínimo (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Os ensaios foram realizados com criogéis com massa de $0,190 \pm 0,016$ g, com duas repetições nos pontos axiais e três repetições no ponto central. Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, adotando-se o modelo adequado ao delineamento em questão (Equação 3).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 + \varepsilon \quad (3)$$

Onde Y é a variável de resposta (quantidade de D-GlcNAc imobilizada, mg/g), β_0 é intercepto do modelo, β_1 e β_2 são os coeficientes lineares, β_3 e β_4 são os coeficientes quadráticos e β_5 de interação, X_1 a X_4 são as variáveis independentes codificadas estudadas, e ε é o erro.

4.5 Caracterização dos criogeis

A caracterização tem por objetivo conhecer as propriedades das matrizes produzidas antes e após o processo de ativação e com isso, determinar a melhor aplicação das mesmas. Assim, foram escolhidos 8 criogeis não ativados (controle) e outros 8 obtidos ao final do processo de otimização do método do glutaraldeído.

4.5.1 Capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento (S) foi determinada por meio da imersão das matrizes (com e sem imobilização do carboidrato) em recipientes contendo 30 mL de água à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, o excesso de água foi retirado e as massas (m_s) verificadas em balança analítica. O valor de S foi calculado de acordo com Savina et al. (2005), utilizando a Equação 4.

$$s = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (4)$$

Onde: m_s é a massa (kg) do criogel sem o excesso de água e m_d é a massa (kg) do criogel desidratado.

4.5.2 Grau de expansão

O grau de expansão (ED) dos criogeis é uma medida útil para a conversão entre a massa desidratada do criogel (quando armazenado) e o seu volume hidratado quando em uso (GONÇALVES et al., 2016). Primeiramente, os criogeis (com e sem funcionalização) foram secos em estufa a 60°C até massa constante e posteriormente, foram saturados com água por 24 horas. Após esse tempo, os criogeis saturados foram transferidos para uma proveta contendo um volume conhecido de água (V_1), e após a imersão dos criogeis saturados na proveta foi obtido um novo volume (V_2). O valor de ED foi calculado utilizando-se a Equação 5 (MONTGOMERY, 2001).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (5)$$

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

4.5.3 Porosidade dos criogeis

Para determinação da porosidade, criogeis desidratados (com e sem funcionalização) e com as massas conhecidas foram mantidos por sete dias em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permaneça em torno de 98% à temperatura ambiente (25°C) (GREENSPAN, 1977), registrando-se novamente as massas ao final desse período. Com essa medida foi determinada a quantidade de água de ligação do criogel.

Posteriormente os criogeis foram imersos em um recipiente contendo 30 mL de água, permanecendo durante 24 horas para completa saturação, registrando-se novamente as massas. Após, os criogeis foram delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. A fração de macroporos (φ_M , com diâmetro $\geq 1\mu\text{m}$), fração de meso e microporos (φ_m , com diâmetro $<1\mu\text{m}$), fração de água ligada (φ_{wb}), fração de polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogeis pAam foram calculadas utilizando as Equações 6 a 10, respectivamente (PLIEVA et al. 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (7)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wd} - m_d}{m_s} \quad (8)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (9)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (10)$$

Onde: m_s é a massa do criogel hidratado (kg), m_d é a massa do criogel desidratado (kg), m_e é a massa do criogel espremido (kg) e m_{wb} é a massa do criogel com água de ligação (kg).

4.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

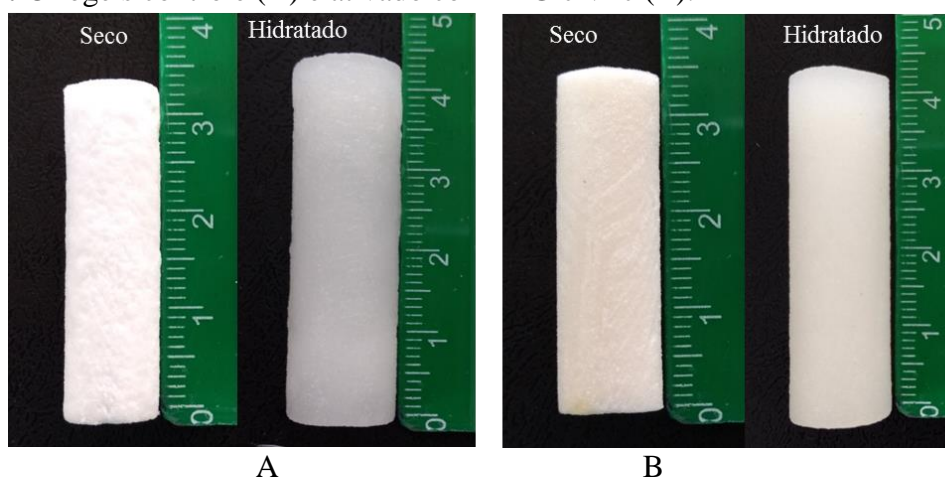
Os grupos funcionais dos criogeis produzidos foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), uma vez que todas as substâncias moleculares orgânicas e inorgânicas absorvem radiação na região do infravermelho (Gonçalves, 2016). As amostras de criogeis antes e após a imobilização foram desidratadas, transformadas em pó e lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro FTIR Agilent Cary 360.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos criogeis

O processo de criogeleificação das misturas de AAm, BAAM e AGE em diferentes concentrações resultou em criogeis de estrutura esponjosa, coloração esbranquiçada, forma cilíndrica, uniforme e rígida quando desidratados. Por se tratar de uma estrutura altamente porosa, quando hidratados apresentaram estrutura macia e elástica. Na Figura 9, são apresentados dos criogeis controle (9A) e o funcionalizado (9B).

Figura 9: Criogeis controle (A) e ativado com D-GlcNAc (B).



A elasticidade dos criogeis pôde ser testada no momento em que os mesmo puderam ser suavemente espremidos, para remoção do excesso de água livre no interior dos poros; e quando mergulhados em água retornaram à sua forma original com facilidade. O processo de síntese resulta da interação dos monômeros de AAm, BAAM e AGE o que confere ao criogel robustez mecânica, além da possibilidade de ser seco, para armazenamento e reidratados para o uso, sem que haja perda de suas propriedade originais, como foi observado por Gonçalves et al. (2016).

5.2 Avaliação da imobilização de D-GlcNAc pelo método do Glutaraldeído

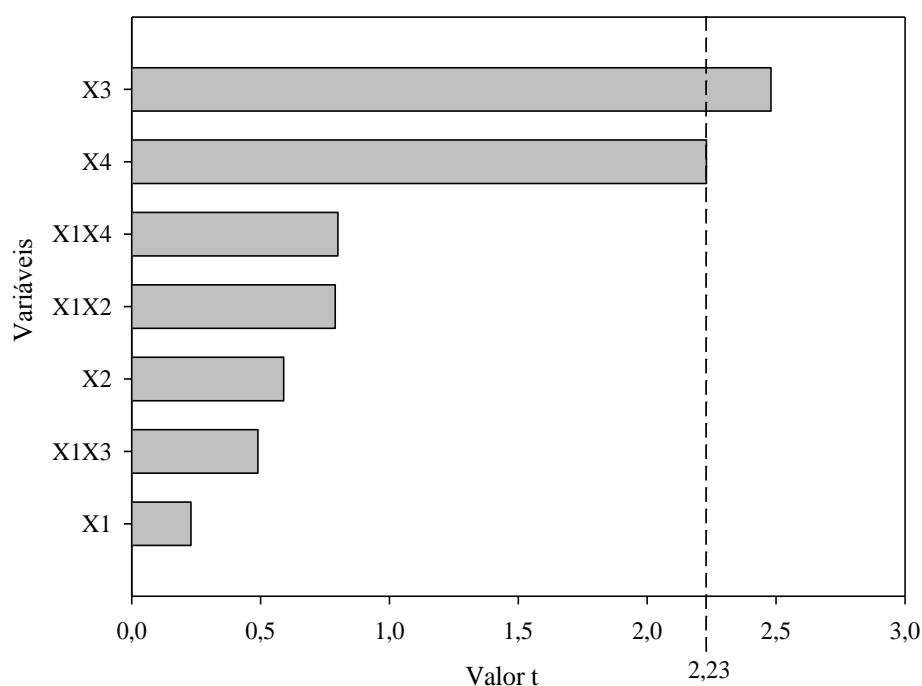
Nos ensaios conduzidos no Delineamento Fatorial Fracionado, a quantidade de D-GlcNAc imobilizada variou entre 32,47 a 85,77 mg de D-GlcNAc por grama de criogel seco (Tabela 6). Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear múltipla para a verificação da significância dos parâmetros pelo teste t ($p = 0,05$) onde foi possível avaliar quais variáveis (codificadas) apresentaram efeito sobre a quantidade de carboidrato imobilizado, bem como a interação entre as mesmas.

Tabela 6: Resultados obtidos considerando o Fatorial Fracionado 2^{4-1} .

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Imobilizado (mg/g)
1	-1	-1	-1	-1	44,41 ± 18,56
2	+1	-1	-1	+1	79,50 ± 31,36
3	-1	+1	-1	+1	85,77 ± 24,49
4	+1	+1	-1	-1	64,19 ± 5,27
5	-1	-1	+1	+1	54,15 ± 5,98
6	+1	-1	+1	-1	38,14 ± 4,09
7	-1	+1	+1	-1	38,65 ± 4,087
8	+1	+1	+1	+1	49,70 ± 21,68
9	0	0	0	0	32,47 ± 23,54

Variáveis codificadas: X₁ = AGE, X₂ = Glutaraldeído, X₃ = Temperatura e X₄ = D-GlcNAc.

O modelo ajustado foi significativo ($P < 0,0001$) e a partir do gráfico de Pareto apresentado na Figura 10, verificou-se que as variáveis: temperatura de imobilização do glutaraldeído (X₃) e concentração de D-GlcNAc (X₄) afetaram significativamente ($p \leq 0,05$) a quantidade de carboidrato imobilizado. Os demais fatores não apresentaram efeito significativo, bem como a interação entre o AGE e os demais fatores estudados (X₁X₂, X₁X₃, X₁X₄).

Figura 10: Gráfico de Pareto para os efeitos do modelo testado ($p = 0,05$).

Procedeu-se então à nova análise de regressão com o modelo reduzido apenas com as variáveis significativas, sendo o resultado apresentados nas Tabelas 7 e 8 a seguir.

Tabela 7: Análise de variância da regressão do modelo reduzido

FV	GL	SQ	QM	F	Prob.
Regressão	2	5056,660534	2528,330267	8,30	0,0037
Falta de Ajuste	5	721,419282	144,2838564	0,38	0,8547
Resíduo	10	3847,386964	384,7386964	-	-
Total	17	625,466780	-	-	-

Tabela 8: Ajustes dos parâmetros do modelo reduzido para as variáveis codificadas.

Parâmetro	Estimativa	valor-P
β_0 (intercepto)	57,38	<0,0001
β_1 (X_3)	-11,83	0,0120
β_2 (X_4)	10,64	0,0214

Verificou-se que o modelo foi significativo ($P < 0,05$), a falta de ajuste foi não significativa ($P > 0,05$) e todos os efeitos retidos no modelo foram significativos ($P < 0,05$), demonstrando que eles realmente afetaram a quantidade de D-GlcNAc imobilizada. Observa-se na Tabela 8 que a estimativa de parâmetro para o variável X_3 foi negativo, o que indica que valores menores de temperatura deverão ser testados. O inverso ocorreu com a variável X_4 , pois apresentou valores positivo, indicando que as concentrações de D-GlcNAc testados deverão ser maiores.

Como as variáveis, temperatura de imobilização do glutaraldeído (X_1) e concentração da D-GlcNAc (X_2), apresentaram efeito significativo, conduziu-se então um DCCR com o objetivo de se obter um ponto de máximo para o processo de imobilização de D-GlcNAc. Para essa próxima etapa o valor do AGE foi fixado em 1,1% pois, apesar de não ter apresentado significância estatística, ele é o fornecedor de grupos epóxi que dão início à formação dos braços espaçadores onde a D-GlcNAc será imobilizada, garantindo assim o maior número sítio de ligação para a mesma. Por outro lado, o valor da concentração do glutaraldeído foi mantida em 5%, menor valor estudado, pois o glutaraldeído, quando em grandes concentrações promove um processo de auto-reticulação, o que poderia reduzir a capacidade de imobilização dos carboidratos na superfície dos criogéis.

Os resultados obtidos, em relação à quantidade de D-GlcNAc imobilizada são apresentados na Tabela 9, e na Tabela 10 é apresentado o quadro da Análise de Variância (Anova) da análise de regressão realizada.

Tabela 9: Resultados obtidos nos experimentos do DCCR.

Ensaio	X ₁	X ₂	Imobilizado (mg/g)
1	-1	-1	83,34 ± 26,18
2	-1	+1	81,36 ± 29,45
3	+1	+1	119,39 ± 25,29
4	+1	-1	41,98 ± 23,50
5	-1,41	0	109,08 ± 2,34
6	0	-1,41	18,87 ± 1,09
7	+1,41	0	65,62 ± 6,87
8	0	+1,41	146,49 ± 26,39
9	0	0	156,43 ± 2,94

Variáveis codificadas: X₁ = Temperatura e X₂ = D-GlcNAc.

Tabela 10: Análise de variância da regressão do DCCR para as variáveis codificadas.

FV	GL	SQ	QM	F	Prob.
Regressão	5	34128,23871	6825,64774	12,36	0,0001
Falta de Ajuste	3	3664,22316	1221,40772	3,48	0,0584
Resíduo	10	3512,81642	351,28164	-	-
Total	18	41305,27829	-	-	-

Dos parâmetros testados, apenas o efeito linear da temperatura (X₁) foi não-significativo (P>0,05). No entanto, como o efeito quadrático e de interação desta variável foram significativos, ele permanece no modelo, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Estimativa dos parâmetros do modelo completo no DCCR.

Parâmetro	Estimativa	valor-P
β ₀ (Intercepto)	156,45	<0,0001
β ₁ (X ₁)	-8,10	0,1917
β ₂ (X ₂)	32,01	0,0001
β ₃ (X ₁ ²)	-35,52	0,0011
β ₄ (X ₂ ²)	-37,87	0,0007
β ₅ (X ₁ X ₂)	19,84	0,0327

O modelo para as variáveis codificadas é:

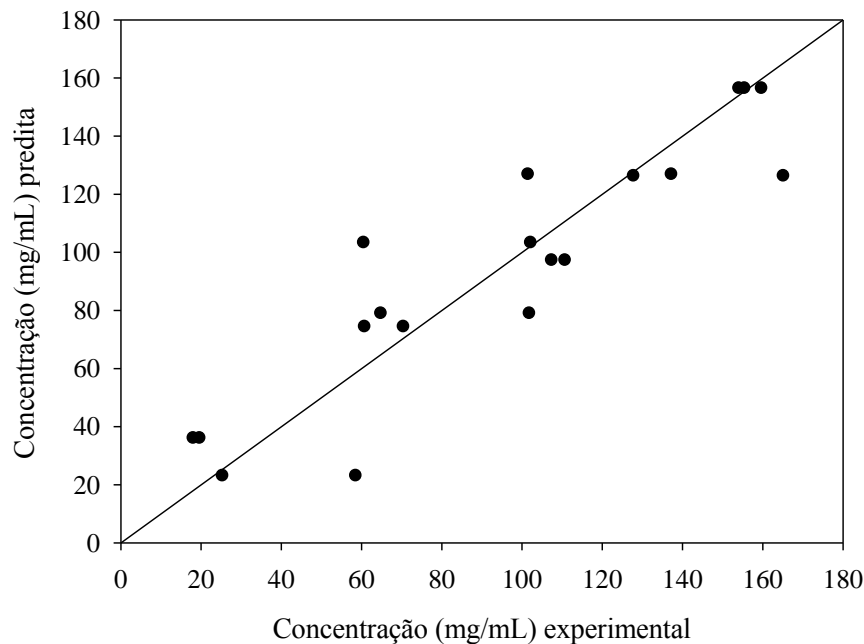
$$\hat{y} = 156,45 - 8,10X_1 + 32,01X_2 - 35,52X_1^2 - 37,87X_2^2 + 19,84X_1X_2 \quad (10)$$

Onde \hat{y} é a quantidade de D-GlcNAc imobilizada no criogel (mg/g), X_1 é a temperatura de imobilização do glutaraldeído (°C) e X_2 é a concentração de D-GlcNAc utilizada para imobilização (mg/mL).

O modelo foi significativo ($P=0,0001$), a falta de ajuste foi não significativa ($P>0,05$) e todos os efeitos retidos no modelo foram significativos ($P<0,05$) demonstrando que eles realmente afetaram a quantidade de D-GlcNAc imobilizada ($R^2=0,90$). Observa-se ainda, pela estimativa dos parâmetros, que o fator concentração de D-GlcNA (X_2) apresentou maior influencia no processo de otimização da quantidade de D-GlcNAc imobilizada no criogel, pois tanto efeito linear quanto no quadrático obteve os maiores valores de estimativa de parâmetros, quando comparado ao fator temperatura (X_1).

A normalidade da distribuição dos resíduos, do modelo em relação aos pontos experimentais foi testada graficamente (Figura 11), observando-se a proximidade e a distribuição dos pontos em torno da reta. Pressupondo que o modelo não é tendencioso ou não possui viés.

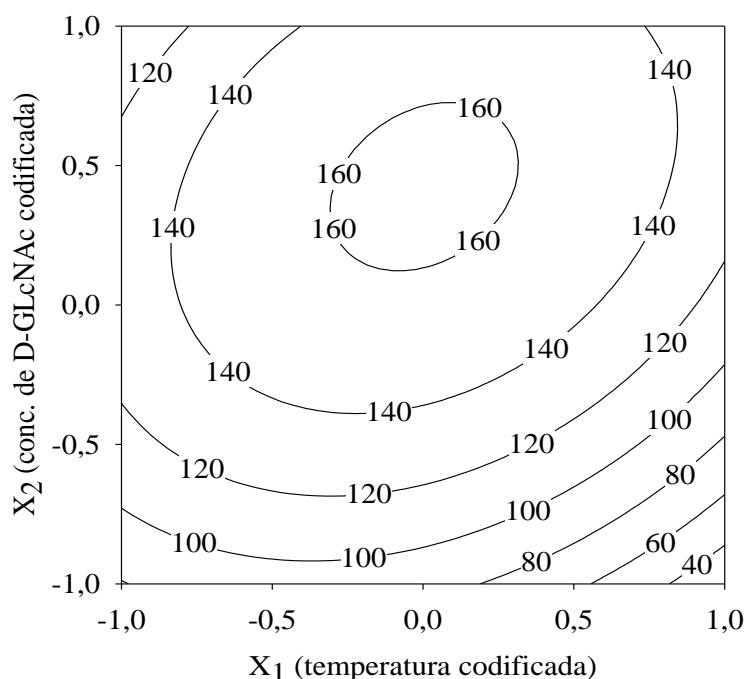
Figura 11: Gráfico de correlação para a concentração de D-GlcNAc imobilizada entre valores experimentais o preditos pelo modelo ajustado no DCCR.



Na Figura 11 observa-se que a boa correlação entre os resultados experimentais e preditos, representada pela distribuição aleatória em torno da reta no gráfico, indicando que o modelo ajustado pode ser utilizado para explicar o fenômeno em questão.

A utilização da metodologia de superfície de resposta (Figura 12), permitiu avaliar as condições experimentais otimizadas. Como os parâmetros ajustados para os termos quadráticos foram negativos, temos que a partir do modelo podemos estimar uma condição ótima, para uma máxima quantidade de D-GlcNAc imobilizada.

Figura 12: Curva de contorno da quantidade de D-GlcNAc imobilizada em função da temperatura e da concentração D-GlcNAc.



Na Figura 12 é apresentado o gráfico de curva de contorno do modelo ajustado para a quantidade de D-GlcNAc imobilizada (mg/g) em função da temperatura de inclusão do glutaraldeído ($^{\circ}\text{C}$) e da concentração de D-GlcNAc (mg/mL) utilizada. Foi estimada uma quantidade máxima de D-GlcNAc imobilizada de 163,21 mg/g, na condição de 12,03 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 5,64mg/mL D-GlcNAc, para as variáveis descodificadas. No gráfico acima é possível notar que, valores máximos para as variáveis resultaram em uma menor quantidade de D-GlcNAc imobilizada. No que diz respeito à temperatura de incorporação do glutaraldeído esse aumento de temperatura nas condições estudadas, pode ter favorecido o processo de auto-reticulação do glutaraldeído, resultando num menor número de grupos aldeído disponíveis para ligações. Em relação à máxima concentração de D-GlcNAc, pode ter ocorrido um processo de saturação no meio, ou seja, todos os braços espaçadores já haviam se ligado a uma quantidade determinada de açúcar.

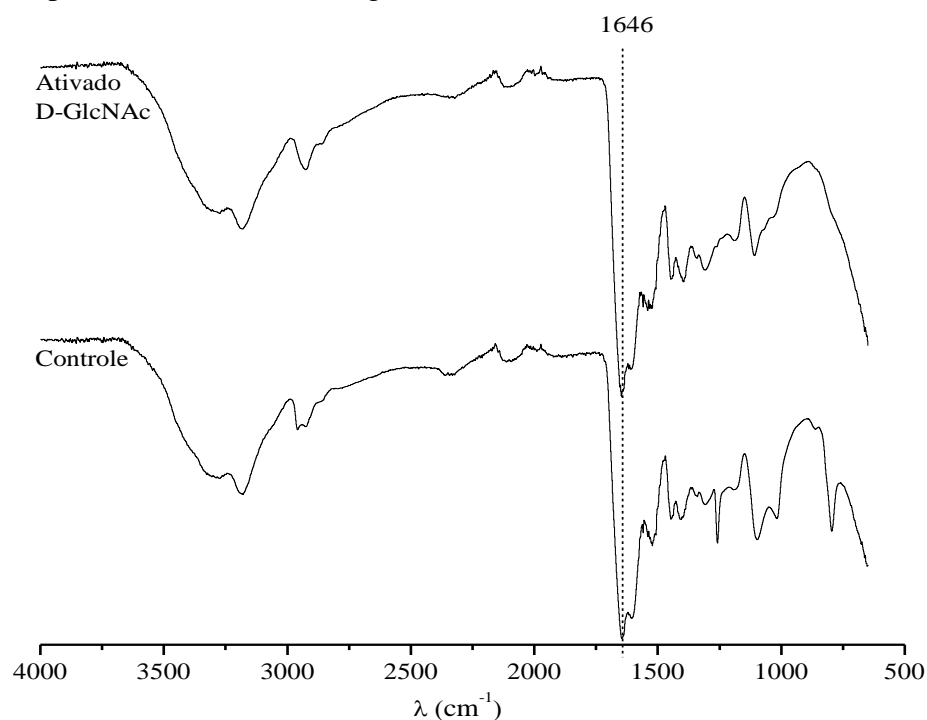
A partir desses resultados, foram produzidas então 20 unidades amostrais (criogeis) nas condições ótimas estabelecidas para que fosse feita a confirmação dessa condição e a caracterização do material produzido. Assim, para criogeis de poliacrilamida produzidos a

-12°C com 6% de monômeros totais, contando com 1,1% de AGE na síntese dos criogéis, a inclusão de braços espaçadores com solução a 5% de glutaraldeído e contato à temperatura de 12,03°C, com a solução do grupo ligante funcional contendo 5,64 mg/mL de D-GlcNAc, o resultado médio obtido foi de $160,39 \pm 26,38$ mg/g. Esse resultado indica que o processo de otimização conduzido foi eficiente, resultando em um ponto de máximo experimental em concordância com o valor previamente estimado ao se utilizar o modelo ajustado. Para efeito de comparação, Gonçalves et al. (2016) conseguiu imobilizar uma quantidade de D-GlcNAc em torno de 147mg/mL, ao utilizar o método do glutaraldeído de forma contínua, com criogéis com 0,8g de AGE e sintetizados a -20°C, D-GlcNAc a 2mg/mL e 5% de glutaraldeído, à temperatura ambiente.

5.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier

A análise da espectroscopia FTIR foi utilizada para obter informações sobre a presença dos grupos funcionais existentes e a intensidade de transmitância nos criogéis antes e após a ativação pelo método do glutaraldeído

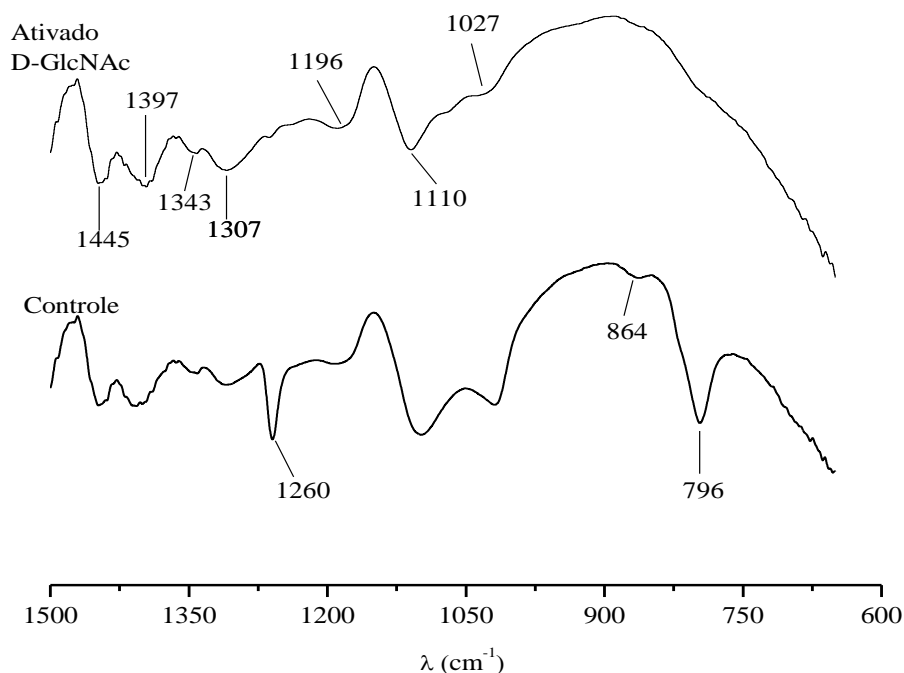
Figura 13: Espectros de FTIR dos criogéis controle e D-GlcNAc ativado.



Inicialmente é possível notar um pico acentuado no número de onda 1646 cm^{-1} e esta vibração formada é característica do grupamento amida, proveniente dos monômeros (AAM e BAAM) utilizados na síntese do criogel (INGAVLE et al., 2015). Perçin et al. (2015) e Gonçalves et al. (2016), trabalhando com criogéis de poliacrilamida, identificaram nos

espectros de FTIR a ocorrência de bandas fortes em torno desse mesmo número de onda, relatando que essa banda indica a presença do grupamento amida. Outra região de avaliação dos espectros de interesse foi a faixa em torno de $1500-600\text{ cm}^{-1}$ (Figura 14) onde se observou uma diferença mais perceptível dos picos resultantes nos espectros dos criogel D-GlcNAc ativado e o controle.

Figura 14: Espectros de FTIR com destaque para a região de $1500-600\text{ cm}^{-1}$



No destaque para o intervalo de comprimento de onda de $1500-600\text{ cm}^{-1}$ são observadas bandas correspondentes o grupo CH_2 com número de onda de 1445 cm^{-1} indicando uma flexão assimétrica e em 1307 cm^{-1} flexão simétrica deste mesmo grupo funcional. Esse mesmos grupos foram encontrados por Coli (2013) avaliando espectros de matrizes de hidrogéis de N-isopropilacrilamida (NIPAAm). Outras duas bandas, ainda no início da faixa avaliada, 1397 cm^{-1} e 1343 cm^{-1} indicam um flexão simétrica dos grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente. Também foram observadas as bandas 1260 cm^{-1} referente a estiramento axila da ligação C-O em álcoois, 1196 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} referentes aos grupos éter e álcoois primários, nessa ordem.

Outra banda importante é aquela em torno de 1100 cm^{-1} que indica o estiramento do grupo C-O devido à presença dos radicais epóxi advindos do AGE, agente iniciador dos braços espaçadores (ALCÂNTARA, 2013). Observa-se ainda uma redução na intensidade dessa mesma banda do criogel controle para o ativado, isso pode ser explicado, pois as demais moléculas presentes nos compostos utilizados na ativação se ligam ao grupo epóxi presente no

AGE para formar os braços espaçadores. Duas bandas ao final do espectro e que sofreram redução quando comparado ao espectro ativado foram as com número de onda de 864 cm^{-1} correspondente a estiramento do grupo C-C e 796 cm^{-1} deformação angular do grupo etila (balanço).

5.4 Características morfológica dos criogeis

Para a caracterização morfológica 8 criogeis com e sem D-GlcNAc imobilizada foram avaliados e os resultados obtidos para cada parâmetro são apresentados na Tabela 11.

Tabela 12: Resultados da caracterização dos criogeis controle e D-GlcNAc ativado

Parâmetro*	Controle	D-GlcNAc Ativado
<i>S</i> (kg/kg)	$20,77 \pm 0,95$	$21,66 \pm 0,81$
ED (L/kg)	$25,55 \pm 2,10$	$24,12 \pm 2,40$
Fração de macroporos	$0,828 \pm 0,019$	$0,816 \pm 0,022$
Fração de meso/microporos	$0,113 \pm 0,020$	$0,119 \pm 0,021$
Fração de água de ligação	$0,013 \pm 0,001^a$	$0,021 \pm 0,001^b$
Fração de polímero seco	$0,046 \pm 0,002$	$0,044 \pm 0,002$
Porosidade total	$0,941 \pm 0,003$	$0,935 \pm 0,002$

*os valores observados para os parâmetros estudados não diferiram pelo teste t ($P > 0,05$), exceto para a fração de água de ligação ($P < 0,05$).

A capacidade de inchamento (*S*), como o próprio nome sugere, é a medida da expansão do criogel, e quanto maior o seu valor maior é a massa de água retida na estrutura do criogel. Seu valor tem grande influência na resistência física do criogel, pois após o inchamento ele se torna mais maleável e provavelmente menos resistente a pressões antes de se deformarem (CARVALHO, 2014). Os valores obtidos para *S* foram de 20,77 e 21,66 kg/kg (massa de água por massa de criogel seco) para o criogel controle e o ativado, respectivamente, valores esses que refletem em uma alta capacidade dos criogeis em absorver água. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por alguns autores como Fontan et al. (2017) com valores próximos a 20kg/kg para criogeis de poli(acrilamida) com um radical trocador catiônico forte imobilizado. Mól et al. (2017) apresentaram um valor para *S* igual a 19,6 kg/kg para criogel de poli(acrilamida) funcionalizados com tris(hidroximetil)aminometano e Gonçalves et al. (2017) obtiveram valores para *S* entre 18 e 19 kg/kg, para criogeis de ativados com D-GlcNAc, também pelo método do glutaraldeído.

Outra característica avaliada foi o grau de expansão (ED), dado pela relação entre a massa do criogel seco quando armazenado e o volume que ocupa quando hidratado em uso.

Foram encontrados valores para ED iguais a 24,12 L/kg para o criogel que foi submetido ao processo de ativação e 25,55L/kg para o controle, demonstrando que o criogel ocupa um grande volume quando hidratado e esse parâmetro reforça a natureza porosa de sua estrutura, conforme descrito por Fontan et al. (2017). Tais valores foram superiores aos obtidos por Gonçalves et al. (2017) com valores variando entre 18 e 21,12 L/kg e próximos ao encontrado por Fontan et al. (2017) com cerca de 25 L/kg.

Os dados inerentes à porosidade e suas frações constituintes reafirmam a principal característica do criogel e aquela pela qual sua utilização se justifica, a sua natureza macroporosa. Dentre esses parâmetros, apenas a fração de água de ligação apresentou diferença do criogel controle para o D-GlcNAc ativado. Assim como a capacidade de inchamento, o aumento da fração de água de ligação pode ser devido ao aumento do caráter hidrofílico conferido ao criogel ativado, resultado do processo de imobilização da D-GlcNAc e da hidrofiliabilidade da mesma.

Os resultados observados em relação à porosidade total ficaram em torno de 94%, sendo a fração macroporosa superior a 80% o que deixa claro a predominância de macroporos. Os valores obtidos são superiores aos encontrados por Gonçalves et al. (2016) e Mól (2017). Tal característica tem destaque no uso dessas matrizes para purificação de soluções mais concentradas ou de natureza viscosa e até mesmo que contenham materiais particulados.

6 CONCLUSÃO

Foram produzidos criogéis poliméricos monolíticos macroporosos de poliacrilamida funcionalizados com D-GlcNAc via método do glutaraldeído e para a otimização do método foram avaliados os efeitos das variáveis: quantidade de AGE na síntese do criogel, concentração de glutaraldeído e temperatura de incorporação do mesmo e concentração de D-GlcNAc. Os fatores temperatura de incorporação do glutaraldeído e concentração de D-GlcNAc apresentaram efeito sobre a quantidade de D-GlcNAc imobilizada. A condição otimizada foi obtida com a temperatura de 12°C e concentração de 5,64 mg/mL, conseguindo-se uma quantidade de D-GlcNAc imobilizada igual a 160,39 mg/g. As análises de caracterização mostraram que o processo de ativação foi efetivo e manteve a estrutura macroporosa e as características físicas dos criogéis produzidos. Os resultados são promissores, mas são necessários mais estudos para testar o potencial dos criogéis produzidos para purificação de lectinas por afinidade.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMOVIĆ, L.; MALINOVSKEA, L.; WIMMWEOVA, M. New Sensitive Detection Method for Lectin Hemagglutination using Microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 841-849, 2014.
- ALCANTARA, A. P. **Imobilização de lipase em criogel supermacroporosos para síntese de lipídios estruturados**. 92f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.
- ANDAÇ, M.; GALAEV, I. Y.; DENZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 69-80, 2016.
- ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, B. V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84-94, 2017.
- 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.
- BAIELI, M. F.; URTASUN, N.; MIRANDA, M. V.; CASCONI, O.; WOLMAN F. J. Efficient wheat germ agglutinin purification with a chitosan based affinity chromatographic matrix. **Journal of Separation Science**, v. 35, p.231-238, 2012.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S., BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 125-134, 2004.
- BIBI, N. S.; SINGH, N. K.; DSOUZA, R. N.; AASIM, M.; FERNÁNDEZ-LAHOE, M. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 145-149, 2013.
- BRUSTEIN, V. P.; SOUZA-ARAÚJO, F. V.; VAZ, A. F. M.; ARAÚJO, R. V. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, C. B. B.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO CUNHA, M. G.; CORREIRA, M. T. S. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 315-322, 2012.
- CARRILLO, C.; CORDOBA-DIAZ, D.; CORDOBA-DIAZ, M.; GIRBÉS, T.; JIMÉNEZ, P. Effects of temperature, pH and sugar binding on the structures of lectins ebulin f and SELfd. **Food Chemistry**, v. 220, p. 324-330, 2017.
- CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.
- COLI, M. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata em Matrizes de Hidrogéis Eletro-termossensíveis**. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Materiais para Engenharia). Itajubá, 2013.

COMPARINI, A.; PASSOS, G.; GRAZIADEI, H.; FERREIRA-SILVA, P. H.; LOUZADA, F. Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares R E estatística. **São Carlos**, v. 1001, p. 14, 2009.

DAINIYAK, M. B.; ALLAN, I. U.; SAVINA, I.N.; CORNELIO, L.; JAMES, E. S.; JAMES S. L. Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and *in vitro* study. **Biomaterials**, v. 31, p. 67-76, 2010.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v.204-206, n.15, p.198-209, 2012.

ERTURK, G.; MATTIASSON, B.; Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**. v. 1357, p. 24-35, 2014.

FAGUNDES, F. P. **Estudo da imobilização de proteases para a síntese de oligolisinas**. 142 p. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2011.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2011.

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

FONTAN, R. d. C. I., BONOMO, R. C. F., GONÇALVES, G. R. F., MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. (2017), Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**. doi:10.1002/pen.24771.

GAJBHIYE, V; GONG, S. Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 5, p. 552-562, 2013.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n.1, p.1-15, 2009.

GONÇALVES, G. R. F. **Desenvolvimento de adsorventes supermacroporosos para a purificação de lectinas por afinidade com açúcares**. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

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

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN; R. C. Immobilization of sugars in

supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

GONDIM, A. C. S.; ROMERO-CANELÓN, I.; SOUSA, E. H. S.; BLINDAUER, C. A.; BUTLER, J. S.; ROMERO, M. J.; SANCHEZ-CANO, C.; SOUSA, B. L.; CHAVES, R. P.; NAGANO, C. S.; CEVADA, B. S.; SADLER, P. J. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 179-189, 2017.

GREENSPAN, L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. **Journal of Research of National Bureau of Standards A Physics and Chemistry**, v.81A, n.1, p.89-96, 1977.

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

HAGE, D.S., Affinity chromatography in: Cazes, J., **Enciclopeya da Chromatography**, third edition. Taylor & Francis Group, p. 2518, 2010.

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

HE, S.; SHI, J.; WALID, E.; ZHANG, H.; MA, Y.; XUE, S. J. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 166, p. 93-100, 2015.

INGAVLE, G. C.; BAILLIE, L. W. J.; ZHENG, Y.; LIS, E. K.; SAVINA, I. N.; HOWELL, C. A.; MIKHALOVSKY, S. V.; SANDEMAN, S. R. Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen. **Biomaterials**, v. 50, p. 140-153, 2015.

JUAN, L. L.; RECIO, V. G.; LÓPEZ, P. J.; JUAN, T. G.; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D. Pharmaceutical applications of lectins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, n.30, p. 126-133, 2017.

JUNG, W. K.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, n.2, p.255-265, 2003.

KAMIMURA; MAUGERI FILHO. **Cromatografia de afinidade**. Pessoa Jr. A. Kilikian, B. V. (Ed.) Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri, SP: Manole, 2005.

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

KUMAR, A., **Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications**, Boca Raton: CRC Press, 2016.

LIMA, L. R. A. **Quimiluminescência utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina na avaliação histoquímica de tumores cutâneos e da interação lectina-carboidrato**. 165 p.

Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2015.

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**, Vol. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.

LOZINSKY, V. I.; VAINERMAN, E. S.; IVANOVA, S. A.; TITOVA, E. F.; SHTIL'MAN, M. I.; BELAVTSEVA, E. M.; ROGOZHIN, S. V. Study of cryostructurization of polymer systems. **Acta polymerica**, v.37, n.3, p146-146, 1986.

MACHADO, A. P. F.; MINIM, L. A.; FONTAN, R. C. I.; MINIM, V. P. R.; GONÇALVES, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**. v. 40, p. 64-69, 2015.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography, **Journal of Separation Science**, Vol. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

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

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p, 2001.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 8th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 752p, 2012.

MOROKUTTI, A.; REDLBERGER-FRITZ, M.; NAKOWITSCH, S.; KRENN, B. M.; WRESSNIGG, N.; JUNGBAUER, A.; ROMANOVA, J.; MUSTER, T.; POPOW-KRAUPP, T.; FERKO, B. Validation of the modified hemagglutination inhibition assay (mHAI), a robust and sensitive serological test for analysis of influenza virus-specific immune response. **Journal of Clinical Virology**, v. 5, p. 6323-330, 2013.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3rd ed. New York: Wiley, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M.. **Lehninger: principles of biochemistry**, Porto Alegre: Artmed, 5, 1274p., 2011.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 4^a ed.; UNICAMP: Campinas, Brasil, 2010.

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

OLIVEIRA, A. P. S. **Torta de sementes de Moringa oleifera como fonte de compostos com efeitos deletérios na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti***. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2012.

OURTH, D. D.; ROSE, W. W. Purification, characterization and seasonal variation of mannose-binding C-type lectin in *Ictalurid catfish*. **Aquaculture**, v.321, n.3-4, p.191-196, 2011.

OKAY O., **Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties**, Springer International Publishing, v. 263, 2014.

PERÇIN, I.; AKSÖZ, E. PHEMA Based Cryogel For Lectin Purification From Soybean Flour. **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v. 40, n. 3. p. 303-308, 2012.

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

PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND, M. L.; DUPPER, C. M.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2133-2145, 2013.

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.

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.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007.

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.

POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F., The multiple functions of plant lectins. *Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, Sao Paulo, SP. , v.24, p.135-156, 2002.

PRIVAR, Y.; MALAKHOVA, I.; PESTOV, A.; FEDORETS, A.; AZAROVA, Y.; SCHWARZ, S.; BRATSKAYA, S. Polyethyleneimine cryogels for metal ions sorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 1392-1398, 2018.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based biosensor: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**, v.9, n.4, p.428-443, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Casa do Pão, Campinas, 2005.

ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M. N. Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n.3, p.193-198, 2005.

RUDIGER, H. & GABIUS, H.J., Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 589, n.18, 2001.

SAVINA I. N, GUN'KO V. M, TUROV V.V, DAINIAK M, PHILLIPS GJ, GALAEV I. Y. Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels. **Soft Matter**, v. 7, n. 42, p.76-83, 2011.

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

SELVAPRAKASH, K.; CHEN, Yu-Chie. Functionalized gold nanoparticles as affinity nanoprobe for multiple lectins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 60-68 2018.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU, C. M. P. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 103-107. 2010.

SINGH, A. P.; SAXENA, K. D. Effect of Temperature, pH and Denaturing Agents on Biological Activity of MCJ Lectin. **Chemical Science Transactions**, v. 2, n. 4, p. 1508-1512. 2013.

SOARES, G. S. F.; ASSREUY, A. M. S.; GADELHA, C. A. A.; et al., Purification and biological activities of *abelmoschus esculentus* seed lectin. **Protein Journal**, vol. 31, n. 8, p. 674–680, 2012.

SUZUKI, T.; ABE, T.; UMEHARA, K.; CHOI, J.; HIRAI, H.; DOHRA, H.; KAWAGISHI H. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Mycoscience**, v.56, p. 359-363, 2015.

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

TAO, S.; WANG, C.; SUN, Y. Coating of nanoparticles on cryogel surface and subsequent double-modification for enhanced ion-exchange capacity of protein. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 76–83, 2014.

TULLIS, R. H.; DUFFIN, R. P.; HANDLEY, H. H.; SODHI, P. et al. Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients. **Blood Purification**, v. 27, n.1, p. 64-69, 2009.

UYGUN M.; AKDUMAN, B.; ERGÖNÜL, B.; UYGUN, D. A.; AKGÖL, S. DENİZLİ A. Immobilization of Amyloglucosidase onto Macroporous Cryogels for Continuous Glucose Production from Starch. **Journal of Biomaterials Science**, v. 26, p. 1112-1125, 2015.

UNLUER, O. B.; ERSOZ, A.; DENİZLİ, A.; DEMİREL, R.; SAY, R. Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel. **Journal of Chromatography B**, v. 934, p. 46-52, 2013.

ZHOU, W.; GAO, Y.; XU, S.; YANG, Z.; XU, T. Purification of a mannose-binding lectin *Pinellia ternata* agglutinin and its induction of apoptosis in Bel-7404 cells. **Protein Expression and Purification**, v. 93, p. 11–17, 2014.

WANG, L.; WANG, L.; ZHANG, D.; LI, F.; WANG, M. et al. A novel C-type lectin from crab *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing cellular encapsulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 3, p. 832-842, 2013.

YUN, J.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Modeling of protein breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 15-16, p. 2601-2607, 2009.