



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



**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE
MACROPOROSO HIDROFÓBICO FUNCIONALIZADO COM RADICAL BUTIL**

Autora: Thainnane Silva Paiva

Orientador: Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Itapetinga – BA
Fevereiro de 2019

THAINNANE SILVA PAIVA

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE
MACROPOROSO HIDROFÓBICO FUNCIONALIZADO COM RADICAL BUTIL**

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

Orientador: Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Co-orientadores: Prof^a. DSc Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo- UFLA

Prof^a. DSc Cristiane Martins Veloso - UESB

Itapetinga – BA

Fevereiro de 2019

572.6
P171d Paiva, Thainnane Silva

Desenvolvimento e estudo termodinâmico de um adsorvente macroporoso hidrofóbico funcionalizado com radical butil. / Thainnane Silva Paiva. - Itapetinga: UESB, 2019.

54p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Área de Concentração: Engenharia de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof^a. D.Sc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo, e Prof^a. D.Sc. Cristiane Martins Veloso.

1. Adsorção de proteínas - Interação hidrofóbica. 2. Termodinâmica - Análise. 3. Cromatografia de interação hidrofóbica. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. IV. Veloso, Cristiane Martins. V. Título.

CDD(21): **572.6**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Adsorção de proteínas - Interação hidrofóbica
2. Termodinâmica - Análise
3. Cromatografia de interação hidrofóbica



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE MACROPOROSO HIDROFÓBICO FUNCIONALIZADO COM RADICAL BUTIL.

Autor (a): THAINNANE SILVA PAIVA

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

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

Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo

Aprovada 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.

Dr. Leonardo Milani Avelar Rodrigues
Membro UESB

Prof.^a Dr.^a Alexilda Oliveira de Souza
Membro UESB

Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 27 de fevereiro de 2019.

“Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos”.

(Albert Einstein)

A Deus, por nos permitir acreditar nos nossos ideais;

À minha família, em especial à minha avó, Nadir que sempre me guiou, e esteve ao meu lado, sem você eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo alento e força dados nos momentos de dificuldades.

Ao meu pai, Carlos, por me ensinar a ser persistente, a acreditar e lutar pelos meus objetivos.

Ao meu irmão, Thiago, por existir, isso me faz muito feliz, por sempre me dar apoio e ser um ótimo ouvinte.

A minha avó, Nadir, por todo apoio, confiança e incentivo ao estudo que sempre me proporcionou, por me motivar a lutar sempre em minha vida por tudo que acredito, apesar das dificuldades. Essa conquista também é sua!

A minha tia, Rita, pelo carinho, amor, dedicação, apoio, incentivo, por estar sempre ao meu lado.

Ao meu namorado, André Vinicius, por sua extensa paciência que apesar da distância está sempre disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios a sua família pelo acolhimento na etapa final, meu Obrigada!

Aos professores e colegas do Laboratório de Engenharia e Processos (LEP) pela colaboração e amizade e em especial a Rui, Yara, Annie e Mateus pelo suporte e apoio no trabalho.

Aos meus amigos, Josane, Keila, Amanda, Léo Milani, Jana, do mestrado pelo compartilhamento de dificuldades e alegrias durante toda essa jornada.

Ao meu orientador, Rafael Fontan, pelos ensinamentos, sabedoria, conselhos, amizade e confiança inculcada para que conduzisse este trabalho e por ter acreditado nas minhas possibilidades.

À Prof^a. Lizzy Veríssimo, por ter me recebido tão bem no Laboratório de Separação e Purificação de Biomoléculas (LSPB) em Lavras-MG, pelo ensinamento, apoio, colaboração em todos momentos solicitados e aceitação de ser minha co-orientadora.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência de Alimentos, em especial ao Professor Jaime Vilela de Resende, pela oportunidade da realização dos experimentos durante parte do mestrado e pelo auxílio nas análises.

Aos amigos do laboratório de Lavras, Giovanni, Vinicius, William, Ana, Adrise, Isabelle, Camilla, Amanda Umbelina e Ítalo, por compartilhar momentos bons e ruins, pela amizade conquistada e companheirismo durante minha estadia na UFLA.

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

À UESB, por ser a responsável pela minha formação desde a graduação.

Aos professores e ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade e todo conhecimento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e auxílio PROCAD.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, meus singelos agradecimentos.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Processos cromatográficos	3
2.1.1 Cromatografia de interação hidrofóbica	4
2.2 Criogeis monolíticos poliméricos	5
2.3 Processo de imobilização na superfície dos suportes cromatográficos	5
2.3.1 Método do Glutaraldeído	8
2.4 Isotermas de adsorção	9
2.4.1 Modelo de Langmuir	10
2.4.2 Termodinâmica do processo adsorptivo	11
2.5 Albumina do Soro Bovino (BSA).....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Reagentes	15
4.2 Síntese dos criogeis monolíticos	15
4.3 Ativação dos criogeis pelo método do glutaraldeído.....	16
4.4. Determinação das isotermas de adsorção	17
4.5 Análise termodinâmica	18
4.6 Caracterização dos criogeis.....	18
4.6.1 Capacidade de inchamento	18
4.6.2 Grau de expansão.....	18
4.6.3 Porosidade dos criogeis.....	19
4.6.4 Determinação dos grupos funcionais do criogel por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	20
4.6.5 Análise termogravimétrica (TGA)	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Síntese dos criogeis monolíticos	21
5.2 Caracterização dos criogeis.....	21

5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	23
5.4 Análise termogravimétrica (TG)	24
5.5 Isotermas de adsorção	26
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da caracterização dos criogeis ativados e controle.....	21
Tabela 2: Parâmetros do modelo de Langmuir para a adsorção da BSA.....	27
Tabela 3: Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH°_{ads} , ΔS°_{ads} e ΔG°_{ads}	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da produção do criogel.....	7
Figura 2: Método do glutaraldeído – imobilização do ligante.....	8
Figura 3: Classificação das isotermas.....	9
Figura 4: A representação da estrutura proteica da BSA.....	13
Figura 5: Representação esquemática do processo de polimerização	16
Figura 6: Criogel hidratado (A) e criogel seco (B)	21
Figura 7: Espectros de FTIR dos criogéis produzidos. (a) espectro de 650 a 4000 cm^{-1} . (b) destaque para a região de 650 a 1300 cm^{-1}	23
Figura 8: Curvas de TG/DTA dos criogéis ativado e controle.....	25
Figura 9: Isotermas de adsorção de BSA no criogel hidrofóbico em tampão fosfato 0,02M pH 7,2 adicionado de 2,0M de sulfato de sódio a diferentes temperaturas. (—) modelo de Langmuir.....	26
Figura 10: Gráfico de Van't Hoff – $\ln k$ versus $1/T$	27
Figura 11: Variação das propriedades termodinâmicas avaliadas em função da temperatura.....	28

RESUMO

PAIVA, T. S. **Desenvolvimento e estudo termodinâmico de um adsorvente macroporoso hidrofóbico funcionalizado com radical butil.** Itapetinga – BA: UESB, 2019. 52p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). *

Técnicas cromatográficas são comumente utilizadas na purificação de biomoléculas e para o desenvolvimento de novas matrizes cromatográficas é necessária a condução de ensaios adsorptivos utilizando moléculas padrão para se conhecer seu comportamento. A albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína de origem bovina amplamente utilizada como proteína modelo em ensaios teóricos e experimentais de purificação, devido ao seu baixo custo, disponibilidade comercial e por ter sua estrutura bastante conhecida. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver um adsorvente monolítico macroporoso hidrofóbico a partir da funcionalização de uma matriz polimérica com radical butil, imobilizado utilizando-se o método do glutaraldeído. Resultados de análises térmicas e espectrofotométricas indicaram que o processo de funcionalização obteve êxito. Verificou-se que a funcionalização não causou mudanças significativas ($p > 0,05$) nas propriedades morfológicas da matriz polimérica. De forma geral, a estrutura apresentou-se uniforme, esponjosa, com 68% de macroporos, capacidade de inchamento igual a 10,8 g/g e grau de expansão igual a 10,6 mL/g. Foram determinadas as isotermas de adsorção de BSA no adsorvente produzido para verificação de sua capacidade adsorptiva e estudos termodinâmicos. Foi utilizado tampão fosfato de sódio a 0,03 mol/L em pH 7,2, adicionado de 2,0 mol/L de sulfato de sódio. Foram obtidas quatro curvas de isotermas em temperaturas entre 25°C e 55°C e concentração de BSA variando de (0,1 a 15mg/mL). A capacidade adsorptiva reduziu com o aumento da temperatura, sendo obtido um valor experimental máximo de 1300 mg de BSA por grama de adsorvente a 25°C e concentração de equilíbrio em solução igual a 3,2 mg/mL. O modelo de Langmuir foi ajustado satisfatoriamente aos dados experimentais, procedendo-se à análise não-linear de van't Hoff. Verificou-se que o processo de adsorção foi espontâneo ($\Delta_{ads}G < 0$) e que ocorreu compensação entálpico-entrópica no processo de adsorção a diferentes temperaturas. A 25°C e 35°C a adsorção foi entropicamente dirigida e a 45°C e 55°C foi entálpicamente dirigida, indicando uma possível desnaturação da proteína devido ao aumento da temperatura associada à elevada concentração de sal. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que o adsorvente produzido tem potencial para a aplicação na adsorção de proteínas por interações hidrofóbicas.

Palavras-chave: BSA, isotermas de adsorção, cromatografia de interação hidrofóbica, van't Hoff.

* Orientador: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-orientadores: Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo, DSc, UFLA; Cristiane Martins Veloso, DSc, UESB.

ABSTRACT

PAIVA, T. S. **Development and thermodynamic study of a hydrophobic macroporous adsorbent functionalized with butyl radical**. Itapetinga - BA: UESB, 2019. 52 p. Dissertation (Master in Food Engineering). *

Chromatographic techniques are commonly used in the purification of biomolecules. To the development of new chromatographic matrices adsorptive assays using standard molecules are required. Bovine serum albumin (BSA) is a protein widely used as a model protein in theoretical and experimental purification assays due to its low cost, commercial availability and well-known structure. In this context, the objective of the work was to develop a hydrophobic macroporous monolithic adsorbent from the functionalization of a polymeric matrix by immobilization of butyl radical using the glutaraldehyde method. Results of the thermic and spectrophotometric assays indicated that the functionalization process was successful. The functionalization did not cause significant changes ($p > 0.05$) in the morphological properties of the polymer matrix. In general, the structure was uniform, spongy, with 68% macropores, swelling capacity equal to 10.8 g/g and degree of expansion equal to 10.6 mL/g. The adsorption isotherms of BSA were determined in the adsorbent produced to verify its adsorptive capacity and thermodynamic studies. A 0.03 mol/L sodium phosphate buffer at pH 7.2 was used, added with 2.0 mol/L sodium sulfate. Four isothermal curves were obtained at temperatures between 25 °C and 55 °C and BSA concentration ranging from (0.1 to 15mg/mL). The adsorptive capacity decreased with increasing temperature, with a maximum experimental value of 1300 mg BSA per gram adsorbent at 25 °C and equilibrium solution concentration of 3.2 mg/mL. The Langmuir model was satisfactorily adjusted to the experimental data, proceeding to the non-linear analysis of van't Hoff. It was verified that the adsorption process was spontaneous ($\Delta_{\text{ads}}G < 0$) and that enthalpy-entropy compensation occurred in the adsorption process at different temperatures. At 25 °C and 35 °C the adsorption was entropically driven and at 45 °C and 55 °C was enthalphically driven, indicating a possible denaturation of the protein due to the increase in temperature associated with the high salt concentration. From the obtained results it was possible to verify that the adsorbent produced has potential for the application in the adsorption of proteins by hydrophobic interactions.

Keywords: BSA, adsorption isotherms, hydrophobic interaction chromatography, van't Hoff.

* Advisor: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB. Co-advisers: Lizzy Ayra Alcântara, DSc, UFLA; Cristiane Martins Veloso, DSc, UESB.

1. INTRODUÇÃO

Para o desenvolvimento de novas matrizes cromatográficas, são necessários a realização de ensaios adsorptivos utilizando moléculas padrão, a fim de se avaliar a performance desses adsorventes na captura e purificação das mesmas (ELPÍDIO, 2016). Dessa forma, a otimização dessas técnicas tem grande importância, por trazer impacto direto no rendimento de tais processos (FONTAN, 2013).

O desenvolvimento de novas estratégias de bioseparação de produtos e processos biotecnológicos tem crescido bastante no campo industrial alimentício. A ampla aplicação de compostos de interesse tem se tornado uma necessidade contínua e os adsorventes surgiram como alternativas para tal. Entre os adsorventes existentes, estão as colunas monolíticas, também denominados de materiais cromatográficos de quarta geração, e esses têm sido testados numa vasta área da biotecnologia, e demonstrando importantes características na bioseparação de grandes biomoléculas (JUNGBAUER & HAHNA, 2008).

Géis poliméricos apresentam inúmeras aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, incluindo o uso em materiais cromatográficos, matrizes para eletroforese/imuno-difusão (FAGUNDES, 2011), assim como suportes de imobilização de moléculas e células (MATEO et al., 2000). Os criogeis são matrizes de géis formados como resultado do tratamento criogênico (congelamento, armazenamento no estado congelado por um tempo definido e descongelamento) de precursores de baixo ou alto peso molecular, gerando macroporos interconectados que permitem um escoamento facilitado (PLIEVA et al., 2004).

A gelificação criotrópica produz materiais poliméricos com morfologia essencialmente diferente em comparação com os géis obtidos em sistemas não congelados. Os criogeis podem ser de qualquer tipo químico - covalente, iônico ou não covalente. Os criogeis podem ser usados como polímeros puros (YAN et al., 2011; SAVINA et al., 2011), preenchidos com micro / nanopartículas sólidas ou modificados para obter grupos funcionais (SINGH et al., 2014). Os criogeis macroporosos são particularmente interessantes para o uso em processos de purificação de biocompostos macromoleculares, como proteínas, a partir de meios menos clarificados, levando à redução no número de etapas requeridas.

Para que os criogeis poliméricos sejam bons adsorventes é necessária uma enxertia através de grupos ligantes de interesse. Visando aprimorar o método das colunas monolíticas como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, várias metodologias para a imobilização de ligantes de afinidade têm sido reportadas (KUMAR et al., 2014).

A cromatografia de interação hidrofóbica é amplamente empregada na purificação de proteínas (CAPORALE, 2010). Utiliza fase móvel com alta concentração salina de concentração salina para induzir à inibição de efeitos iônicos e promover a interação entre uma matriz com radicais hidrofóbicos e aminoácidos hidrofóbicos expostos de uma proteína nativa. O gradiente salino decrescente diminui a interação hidrofóbica e permite que a proteína seja eluída de modo seletivo de uma da coluna cromatográfica. Proteínas que possuem parte hidrofílica têm tempos de retenção mais curtos em uma coluna de interação hidrofóbica do que proteínas com exteriores mais hidrofóbicos (CHEN et al., 2003).

Neste estudo foram obtidas isotermas de adsorção pelo método em batelada (MOREIRA, 2016). Quando uma determinada quantidade de um sólido, entra em contato com um dado volume de um líquido contendo um soluto adsorvível, a adsorção ocorre até que o equilíbrio seja alcançado (MELO et al., 2014). Estudos termodinâmicos também são importantes para se verificar o potencial de aplicação de um adsorvente. Alguns parâmetros termodinâmicos são usados para obter informações do processo de adsorção, como a quantificação da entalpia de adsorção, ΔH°_{ads} (CARVALHO, 2010).

Uma macromolécula adequada aos estudos com novos adsorventes hidrofóbicos é a Albumina de Soro Bovino (BSA). Essa proteína é abundante no plasma sanguíneo e corresponde a 60% do seu total de proteínas, contém 583 resíduos de aminoácidos, dentre os quais se destacam o triptofano 212 que está localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica da BSA no domínio II (GUO et al., 2014; SHAHABADI & HADIDI, 2014), possui ponto isoelétrico igual a 4,9 e massa molar de 66 kDa, sendo muito utilizadas como proteínas-modelo para diversos estudos de purificação (ASGARI et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi desenvolver um novo adsorvente monolítico hidrofóbico, funcionalizado com a inclusão de radicais butil pelo método do glutaraldeído e verificar o potencial de aplicação do mesmo a partir da avaliação do comportamento adsorptivo utilizando uma molécula padrão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica físico-química utilizada para a separação de biomoléculas e um dos objetivos das operações cromatográficas é o de isolar e purificar um composto de interesse em relação aos demais, levando à pureza adequada para o seu uso (COLLINS et al., 2013).

Os métodos cromatográficos têm vasta utilização na análise de proteínas, sendo empregados tanto na avaliação de sua homogeneidade, como em ensaios de caracterização e quantificação (PITTA et al, 2017). Existem alguns métodos cromatográficos industrialmente utilizados, no qual a adsorção de diferentes moléculas é utilizada sobre a matriz e, em seguida, a dessorção seletiva. Dentro deste grupo, apresentam-se as técnicas de adsorção baseadas em troca-iônica, interação hidrofóbica, afinidade e imunoafinidade (PESSOA JR. & KILIKIAN, 2005).

A cromatografia de troca iônica é geralmente empregada para purificação e separação de proteínas, ácidos nucleicos, polipeptídios e outras moléculas carregadas eletricamente, porque, comparada a outros métodos, ela apresenta simplicidade em sua aplicação, alta resolução, alta capacidade de adsorção e bastante versatilidade (PESSOA JR. & KILIKIAN, 2005). Neste método, ocorre o equilíbrio em que a fase estacionária apresenta forte interação resina-proteína, em função do pH e força iônica. A solução contendo a molécula alvo passa através de uma coluna de troca iônica, ocorrendo a adsorção das moléculas através de interações iônicas. Em seguida, são removidas as moléculas adsorvidas por um tampão de maior força iônica, tornando desfavorável a adsorção da proteína no suporte carregado (MALDANER et al., 2010).

Para identificação, purificação e separação de biomoléculas, a cromatografia de afinidade é considerada um processo bem consolidado (DENIZLI & PISKIN, 2001; GONDIM, 2012). Esse método consiste em imobilizar um composto químico ou bioquímico (ligante) na superfície de um material poroso, que é posto em contato com uma solução contendo a molécula alvo a ser adsorvida para permitir que as interações ocorram. Depois a coluna é equilibrada com o tampão inicial no qual os componentes não adsorvidos são removidos. Por fim, a biomolécula é recuperada e liberada do complexo adsorvido-ligante. Após estas etapas, ainda ocorre a regeneração desse adsorvente, processo que irá permitir a reutilização deste adsorvente em um novo ciclo (ELPIDIO, 2016).

A cromatografia de interação hidrofóbica possui vantagens em relação a outros tipos de cromatografia, pois alcança separações rápidas com pequenas degradações do produto e níveis de purificação muito bons (QUIERIOZ et al., 2011). É amplamente influenciada pelo tipo e concentração de sal. Nos sistemas de adsorção utilizando cromatografia de interação hidrofóbica, as proteínas são adsorvidas na presença de altas concentrações de sal, isto faz com que a proteína sofra a influência dos íons do meio sobre sua estrutura protéica, alterando sua solubilidade, devido à exposição dos grupos apolares existentes em sua cadeia de aminoácido e são eluídas com redução da concentração de sal (CHEN et al., 2007; ELPIDIO, 2016).

Diversos materiais têm sido adotados para serem utilizados na purificação de biomoléculas por técnicas cromatográficas. Essas substâncias possuem propriedades que permitem empregá-las como suportes insolúveis ou matrizes. Entre elas destacam-se: agarose, celulose, dextrana, poliacrilamida e outros polímeros, partículas porosas de alumina, sílica de porosidade controlada e algumas associações entre as substâncias citadas (SIERRA, 2014).

2.1.1 Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) é uma técnica de separação que usa as regiões hidrofóbicas das proteínas para separá-las umas das outras, baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície da proteína e o ligante hidrofóbico de uma resina cromatográfica (SIERRA, 2014). Quando o sal é adicionado à solução proteica, as regiões hidrofóbicas são expostas, devido a uma perturbação da camada de água de solvatação das proteínas. Dessa forma, as proteínas farão interação com a matriz hidrofóbica, que proporcionará um ambiente mais favorável para o sistema (CHEN et al, 2008).

Nesse tipo de cromatografia, grupos hidrofóbicos, como fenila, octila ou butila, são fixados à coluna estacionária. Proteínas que possuem cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos em suas superfícies são capazes de interagir e se ligar aos grupos hidrofóbicos encontrados na coluna durante o procedimento de separação (UNLER et al., 2013). Na CIH, o equilíbrio de fase estacionária é realizado adicionando sal à fase móvel para obter as condições iniciais desejadas, onde a ligação da proteína de interesse no protocolo por CIH é promovida por concentrações altas de sal. Em seguida, à carga da amostra com a coluna é carregado e quando concluído, a coluna é lavada de modo que

todas as proteínas que não foram ligadas passam a ser removidas pela eluição (CHEN, et al., 2007).

A eluição na CIH é realizada utilizando-se água, para recompor a camada de solvatação da proteína. Dessa forma, as proteínas menos hidrofóbicas são eluídas primeiro, recuperando sua água de hidratação e se desligando da matriz cromatográfica, ainda que na presença de algum sal. As proteínas mais hidrofóbicas recuperam mais lentamente a camada de solvatação das proteínas, precisando de mais água para se hidratarem, e conseqüentemente, são eluídas mais tardiamente na coluna (ANDAÇ et al., 2016). A seletividade da cromatografia de interação hidrofóbica na adsorção de proteínas é fortemente influenciada pela concentração de sal, tipo de sal empregado na solução tampão ou da fase estacionária utilizada (OSCARSSON E KÅRSNÅS, 1998). Em CIH, o uso de tampão de equilíbrio e solução da amostra com alta concentração de sal, promovem interações entre o ligante e proteína, aumentando a retenção das proteínas na fase estacionária. O aumento da força iônica ocasiona um aumento quase linear da quantidade de proteína adsorvida, aumentando-se conforme eleva-se a concentração de sal (GODDETTE et al, 1993).

2.2 Criogeis monolíticos poliméricos

O desenvolvimento de novos adsorventes é um segmento estratégico na separação de biocompostos. Dentre os materiais disponíveis capazes de alcançar alta eficiência de purificação está o criogel monolítico supermacroporoso, sendo introduzido como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação no final da década de 90 (LOZINSKY et al., 2010). Apresentam um elevado potencial para serem utilizados como suportes para imobilização enzimática (CARVALHO et al., 2015).

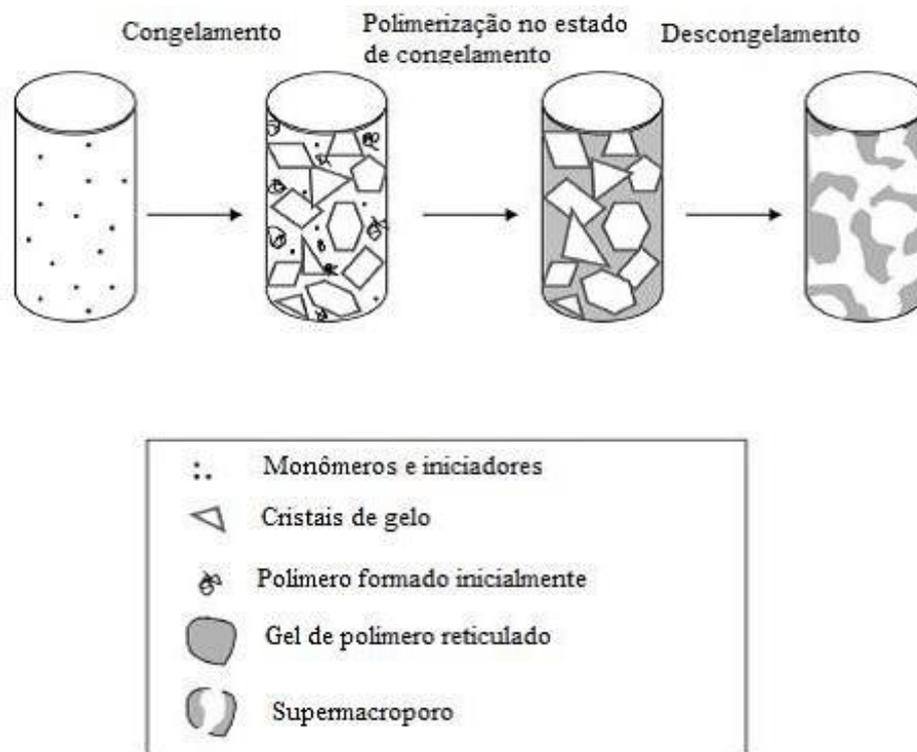
Os criogeis poliméricos são produzidos sob condições criogênicas, a partir de uma mistura reativa de monômeros, como por exemplo acrilamida e bis-acrilamida, seguido da adição de catalisadores. Apresentam uma estrutura com poros contínuos e interconectados, com tamanho que variam de 10-100 μm , o que resulta em alta permeabilidade, proporcionando uma baixa resistência ao fluxo e ao escoamento. Esses materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008; KUMAR et al., 2014).

Sobre as necessidades das condições de congelamento durante a polimerização do monólito, pode-se inferir que a forma e o tamanho dos cristais de gelo determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem após o descongelamento da água presente, como pode ser observado na Figura 1 (PLIEVA et al., 2008).

Apesar dos benefícios apresentados pelos criogeis monolíticos, os grandes poros fazem com que sua área superficial para adsorção e conseqüentemente a sua capacidade adsortiva, seja significativamente menor quando comparadas a um leito fixo tradicional. Por isso, o estudo das modificações na superfície dos criogeis é uma área promissora e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações químicas e/ou físicas podem ser feitas na matriz do criogel para aumentar a sua seletividade conforme o produto de interesse a ser purificado, visando aumentar a eficiência dos processos de separação (INGAVLE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016; KUMAR et al., 2014).

Os grupos hidrofóbicos, por vezes são introduzidos na superfície da matriz do suporte para permitir a ligação entre a proteína e o suporte no passo subsequente. Com a introdução de novas estruturas químicas na superfície é possível obter fases estacionárias que interajam mais ou menos especificamente com uma proteína em particular (JANSON e JÖNSSON, 1998). Cada método de imobilização apresenta uma diferente reação química para atingir o máximo de adsorção das biomoléculas percoladas. Unler et al., (2014), desenvolveram criogeis hidrofóbicos para a separação cromatográfica da lipase de suas soluções aquosas, incluindo proteína única e mistura de proteínas utilizando o éster metílico da *N* - metacrilóil - (L)-fenilalanina como o monômero que forneceu o caráter hidrofóbico. O estudo mostrou que os criogeis hidrofóbicos foi eficaz para a separação e purificação da lipase.

Figura 1 – Esquema da produção do criogel.



Fonte: Adaptado de PLIEVA et al. (2004).

2.3 Processo de imobilização na superfície dos suportes cromatográficos

Ampla variedade de suportes monolíticos existentes, encontram-se à disposição para fins de purificação das mais diversas biomoléculas. Visando aperfeiçoar a utilização dos criogéis como suportes para imobilização e purificação de biomoléculas, várias metodologias de funcionalização de sua superfície são apontadas (ANDAÇ et al., 2016). Essas funcionalizações são realizadas por meio da circulação de soluções contendo agentes reticulantes através da matriz polimérica ou por imersão do suporte (geralmente para criogéis em formato de disco) na solução contendo os grupos ligantes (KIM; HAGE, 2005).

A modificação química da superfície do material é feita pela inserção de grupos reativos, que apresentem uma interação com grupos amina (NH_2), tiol (SH) e hidroxila (OH). Cada método de imobilização apresenta uma diferente reação química para atingir o máximo de ligação entre as biomoléculas de interesse (SANTOS et al., 2016).

Diante disso, é importante à presença de grupos funcionais específicos na estrutura do material. Um exemplo a ser destacado desses grupos funcionais de monômeros, são os grupos epóxi fornecido pelo monômero (como o alil-glicidil éter, AGE), que podem

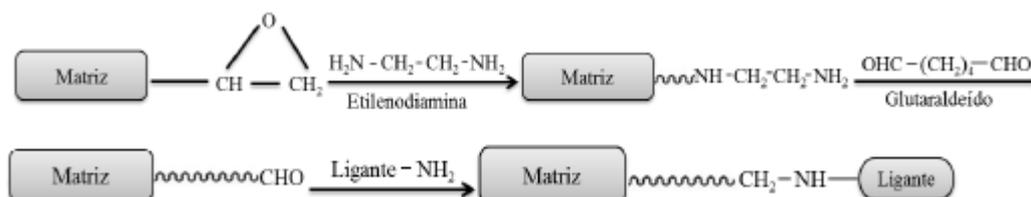
ser usados em uma etapa futura da reação como grupo de ancoragem para imobilizar os ligantes específicos ou para melhorar propriedades específicas tais como pH, hidrofilicidade, hidrofobicidade ou temperatura de ativação (ARRUA et al., 2009).

2.3.1 Método do Glutaraldeído

Uma técnica que tem sido adaptada para a imobilização de biomoléculas ou ligantes no criogel é o método da base de Schiff, que se baseia no acoplamento de um grupo amina ao criogel. Primeiramente, os grupos epóxis são convertidos em dióis e estes são então oxidados com ácido periódico formando grupos aldeídos que podem interagir com aminas primárias de proteínas e outros ligantes, formando uma base de Schiff (PARIZZI, 2015).

Uma abordagem estreitamente relacionada à técnica de base de Schiff é o método do glutaraldeído, que é representado na Figura 2. Neste método, um monólito contendo radicais epóxi, proveniente, por exemplo, do AGE, é inicialmente convertido em uma forma amino ativado a partir da reação dos radicais epóxi com radicais amina, como na etilenodiamina (PETRO et al., 1996) ou hexanodiamina (LUO et al., 2002). Este suporte amino ativado em seguida é convertido a uma forma aldeído ativada pela reação com glutaraldeído. Por fim o radical carbonila livre do glutaraldeído fica disponibilizado para a reação com um composto funcional de interesse que tenha em sua estrutura uma extremidade com um radical amina para nova reação. Esta abordagem tem muitas das mesmas vantagens que o método da Base de Schiff, entretanto, envolve mais etapas para a preparação do suporte. Por outro lado, resulta em um braço espaçador mais longo sendo colocado entre o suporte e o ligante, o que pode ser útil para evitar efeitos de impedimento estérico no processo de adsorção de macromolécula posteriormente (PETRO, 1996; LUO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2016).

Figura 2. Método do glutaraldeído – imobilização do ligante.



Fonte: Adaptado de MALLIK; HAGE, 2006.

2.4 Isotermas de adsorção

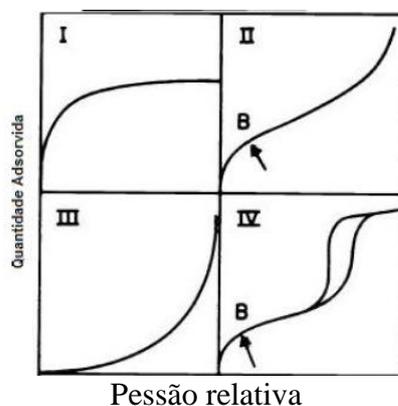
A isoterma de adsorção é uma ferramenta fundamental para a investigação dos processos de adsorção, descrevendo quantitativamente a distribuição de equilíbrio entre as duas fases envolvidas nos processos cromatográficos (NASCIMENTO et al., 2014). Uma isoterma de adsorção evidencia a quantidade de um determinado soluto adsorvida por uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto em solução (ALLEONI, et al., 1998).

O procedimento em batelada para a obtenção dos dados de adsorção é simples, com certas quantidades conhecidas do adsorvente sendo adicionadas a sistemas contendo uma quantidade conhecida de solução em diferentes concentrações iniciais de soluto, mantidos em contato até a condição de equilíbrio. Dessa forma, para cada concentração inicial, são obtidos os valores de q_e (quantidade de soluto adsorvido ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) no equilíbrio) e C_e (concentração de soluto em solução, também no equilíbrio ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)) e a partir desses valores, é possível obter-se a isoterma característica do sistema avaliado (FERREIRA et al., 2018)

As isotermas, geralmente não apresentam um caráter linear. De acordo com Giles *et al.* (1960) o comportamento inicial da isoterma tem uma característica linear devido a viabilidade de sítios ativos de adsorção disponíveis na fase estacionária. À medida que os sítios se tornam mais escassos ocorre a competição entre o adsorbato por sítios ativos ainda disponíveis, levando ao desvio da linearidade da isoterma (FREITAS, 2016).

A maioria das isotermas de fisissorção podem ser agrupadas em quatro grupos, segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), 1985. A Figura 3 ilustra, de maneira simplificada, a classificação das isotermas.

Figura 3. Classificação das isotermas.



Fonte: IUPAC, 1985.

A isoterma reversível do Tipo I ocorre comumente em sólidos microporosos como, carvão ativado, zeólitas, e em alguns óxidos porosos. É conhecida como isoterma de Langmuir, e baseia-se na aproximação gradual da adsorção limite que corresponde à monocamada completa. A isoterma reversível do Tipo II é obtida em adsorventes não-porosos ou macroporosos, e não apresenta restrição quanto à adsorção em monocamada. O ponto B representado nessa isoterma, em muitos casos, indica que a superfície da monocamada está saturada, e a partir deste ponto tem início à adsorção em multicamada (CARPINÉ, 2011; IUPAC, 1985).

As isotermas reversíveis do Tipo III são raras, a adsorção inicial é lenta em virtude das forças de adsorção pouco intensas. A característica da isoterma de adsorção do Tipo IV é a condensação capilar, comum em materiais mesoporosos. Nessa isoterma a adsorção ocorre em camadas, em superfície homogênea não porosa. Cada degrau da isoterma representa a saturação de uma monocamada adsorvida (CARPINÉ, 2011; IUPAC, 1985).

2.4.1 Modelo de Langmuir

O modelo de Langmuir é usado para representar a adsorção para a maioria das proteínas. Este modelo foi originalmente desenvolvido para representar a adsorção em monocamada sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos. (FONTAN, 2013).

Logo, assume-se os seguintes pressupostos:

- Existe um número definido de sítios.
- As moléculas adsorvidas não interferem na adsorção de sítios vizinhos
- A adsorção ocorre em uma monocamada.
- Cada sítio pode comportar apenas uma molécula adsorvida.

O modelo de Langmuir é apresentado abaixo na equação 1.

$$qe = \frac{q_{max}.KL.Ce}{1+KL.Ce} \quad (1)$$

Ou na forma linearizada como:

$$\frac{Ce}{qe} = \frac{1}{q_{max}.KL} + \frac{1}{q_{max}} Ce \quad (2)$$

Onde q_{\max} representa a capacidade de adsorção máxima do adsorvente ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), assumindo-se a formação de uma monocamada de adsorvato sobre o adsorvente; e K_L representa a constante de Langmuir ($\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$). Os parâmetros K_L e q_{\max} podem ser calculados a partir dos coeficientes linear e angular, respectivamente, da reta C_e/q_e em função de C_e .

2.4.2 Termodinâmica do processo adsorptivo

Além do parâmetro relacionado ao equilíbrio do processo de adsorção, o mesmo pode ser caracterizado por meio da determinação dos seus parâmetros termodinâmicos (SOUSA et al., 2014), tais como:

- A variação de energia livre de Gibbs ($\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$), que está relacionada à espontaneidade do processo;
- A variação da entalpia ($\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$), que indica se o processo é exotérmico ou endotérmico;
- A variação da entropia ($\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$), que está relacionada ao grau de organização de um sistema.

A variação de energia livre de Gibbs pode ser estimada de acordo com a seguinte expressão (ONAL et al., 2007):

$$\Delta G^{\circ}_{\text{ads}} = - RT \ln K_C \quad (3)$$

Onde $\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$ é a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$), R é a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K) e K_C é a constante de equilíbrio (adimensional) obtida do modelo de Langmuir.

A variação da entalpia e a variação da entropia no processo de adsorção podem ser estimadas empregando-se a relação de Van't Hoff (FONTAN, 2013).

$$\ln K_C = \frac{-\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}}{RT} + \frac{\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}}{R} + \theta \quad (4)$$

Onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta do sistema (K), $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$ e $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$, respectivamente, as mudanças de entalpia e entropia e θ uma constante do sistema que depende da razão entre as fases e é constante com a temperatura.

O coeficiente angular e linear da reta $\ln K_C$ versus $1/T$ pode ser usada para determinar o valor de $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$. Embora seja simples, este método tem uso restrito, pois os valores encontrados são uma média dos valores reais, nas temperaturas de estudo, o que

gera pequeno número de informações sobre ΔH°_{ads} em temperaturas específicas (FONTAN, 2013). No entanto, SOUSA et al. (2014) mostraram que quando a entalpia e entropia são dependentes da temperatura, a curva de $\ln Kc$ versus $1/T$ fornece uma relação não linear que pode ser aproximada por um polinômio de segundo grau de acordo com a expressão:

$$\ln Kc = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \theta \quad (5)$$

Onde a, b e c são parâmetros empíricos.

Assim, derivando a equação 4 em relação a $1/T$, obtém-se:

$$\left(\frac{\partial \ln Kc}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \right) = - \frac{\Delta H^{\circ}_{ads}}{R} \quad (6)$$

e, derivando-se a equação 5, em relação a $1/T$, tem-se:

$$\left(\frac{\partial \ln Kc}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \right) = b + 2 \cdot \frac{c}{RT} \quad (7)$$

Dessa forma, pode-se igualar as expressões (6) e (7) para fornecer a equação 8:

$$- \frac{\Delta H^{\circ}_{ads}}{R} = b + 2 \cdot \frac{c}{T} \rightarrow \Delta H^{\circ}_{ads} = -R \left(b + 2 \cdot \frac{c}{T} \right) \quad (8)$$

Através da equação 8, pode-se então determinar a entalpia de adsorção, em função da temperatura.

E então, a entropia de adsorção, ΔS°_{ads} , pode ser calculada pela relação de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G^{\circ}_{ads} = \Delta H^{\circ}_{ads} - T \cdot \Delta S^{\circ}_{ads} \quad (9)$$

2.5 Albumina do Soro Bovino (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína de origem bovina amplamente utilizada como modelo em ensaios de purificação, devido ao seu baixo custo, disponibilidade comercial e por ter sua estrutura bastante conhecida. A BSA é uma proteína globular, de massa molecular de 66,462 kDa e ponto isoelétrico de 4,9, apresentando um ótimo perfil de aminoácidos essenciais, possui uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios (ANTUNES, 2011; MONTEIRO et al., 2015; ASGARI et al., 2014).

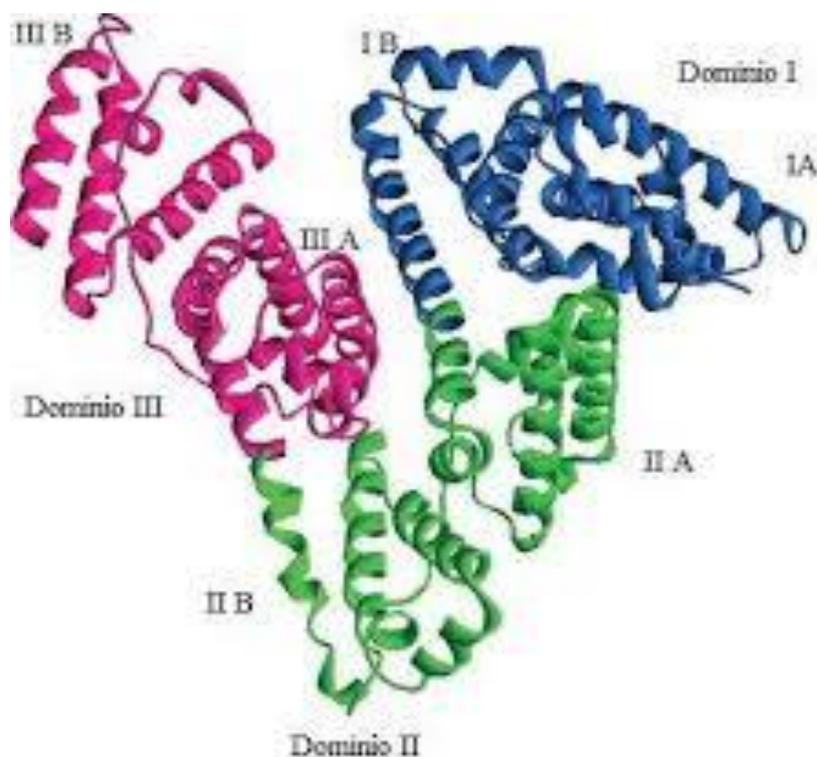
A albumina transporta vários compostos de importância biológica, como ácidos graxos, hematina, bilirrubina e vitaminas (BOURASSA et al., 2011) e possui uma grande

afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados (FERREIRA, 2009).

Por ter cavidades hidrofóbicas, a BSA fornece um aumento na solubilidade de substâncias hidrofóbicas no plasma sanguíneo e controla a sua distribuição pelo corpo. Alguns estudos indicaram que a distribuição e o metabolismo no sangue de um grande número de compostos biologicamente ativos, como drogas e alguns metabólitos, possuem afinidade com as albuminas do soro (CALLISTER et al., 1990; JAHANBAN-ESFAHLAN & PANAHI-AZAR, 2016).

A BSA é dividida em três domínios linearmente dispostos e estruturalmente distintos, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. As regiões responsáveis pelo armazenamento dos compostos nas albuminas estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, e são conhecidas como sítios I e II de Sudlow, como mostrado na Figura 4 (SILVA et al., 2014).

Figura 4. Representação da estrutura proteica da BSA (MOREIRA et al., 2014).



A BSA é utilizada como proteína modelo em ensaios de adsorção em diversos adsorventes, como criogeis de poli HEMA-co-DIPPER (AVCIBAŞI et al., 2010), carvão ativado (OLIVEIRA et al., 2015) e agarose em leito expandido (ELPÍDIO, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi desenvolver criogeis poliméricos supermacroporosos voltados para o processo de purificação de proteínas por cromatografia por interação hidrofóbica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver adsorventes monolíticos poliméricos supermacroporosos utilizando o processo de criogeificação e modificá-los quimicamente pela inclusão de radicais butil para serem utilizados em processos de cromatografia por interação hidrofóbica;

- Caracterizar os adsorventes produzidos, com relação a aspectos físicos, químicos e estruturais;

- Determinar as isotermas de adsorção da albumina do soro bovino em um monólito hidrofóbico;

- Obter curvas de isotermas de adsorção a diferentes temperaturas e avaliar o ajuste do modelo de Langmuir;

- Determinar parâmetros termodinâmicos do processo de adsorção em questão a partir do uso da relação não-linear de van't Hoff.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) e no Centro de Estudo em Leite (CEL) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga.

4.1 Reagentes

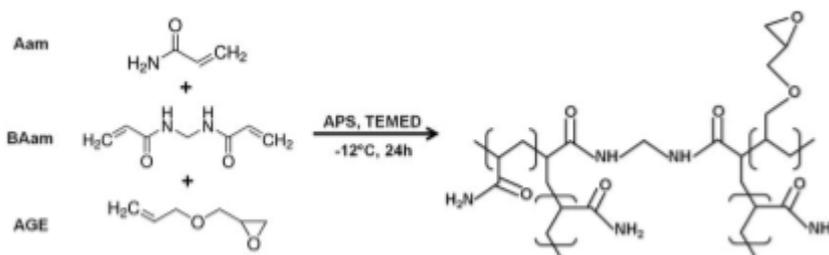
Para a realização deste trabalho foram utilizados acrilamida (AAm), bis – acrilamida (BAam), butilamina, N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina (TEMED), Persulfato de amônio (APS) e o alil-glicidil éter (AGE) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Os demais reagentes utilizados no experimento estão descritos ao longo da metodologia e todos possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS.

4.2 Síntese dos criogeis monolíticos

Para a síntese dos criogeis, foram utilizadas metodologias adaptadas de Gonçalves et al. (2016) e Yao et al. (2006). Para a produção dos criogeis foram pesados 4,4 g de AAm, 1,2 g de BAAM e 1,4 g de AGE, perfazendo uma concentração final de monômeros de 7% m/v para um volume final de solução de 100 mL.

A polimerização foi iniciada pela adição de 140 μL de APS (0,5 mg/mL) e 91 μL de TEMED como pode ser visto na Figura 5. Em seguida, a mistura foi agitada por alguns segundos, em banho de gelo, e vertidas em seringas plásticas de 5 mL. As seringas foram seladas em suas extremidades e imersa em um banho de álcool etílico a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após isto os criogeis formados foram descongelados à temperatura de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em seguida as seringas contendo os criogeis foram colocadas em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ até os criogeis serem completamente secos. Posteriormente, os criogeis tiveram as extremidades cortadas para retirar partes defeituosas e lavados com 150 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de $1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e foram novamente secos em estufa e as massas foram determinadas em balança analítica.

Figura 5. Representação esquemática do processo de polimerização.



Fonte: Fontan et al. (2017).

4.3 Ativação dos criogéis pelo método do glutaraldeído

Durante o processo de imobilização dos criogéis pelo método do glutaraldeído, foi adotado o sistema em batelada, utilizando a metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2016) no qual os monólitos de criogéis secos, com cerca de 3 cm de altura, 1 cm de diâmetro e peso médio de 0,30g foram colocados em 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 metílico por 2 horas. Posteriormente, foram mantidos em contato com 20 mL de água destilada, seguido de contato com tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L pH 6,0 (20 mL), ambos com tempo de contato de 1 hora. Em seguida, os mesmos foram imersos em 20 mL de etilenodiamina 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio 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 0,05 mol/L pH 6,0, cada etapa com 1 hora de duração. Então, os criogéis foram postos em contato com 20 mL de solução de glutaraldeído (concentração de 5%) em tampão fosfato pH 6,0, à temperatura controlada de 12°C, por 5 horas. Em seguida os criogéis foram enxaguados duas vezes com 20 mL água destilada por 30 minutos, para remoção do excesso de glutaraldeído.

Na sequência os criogéis foram postos em contato da solução butilamina a 10 mg/mL em tampão fosfato de sódio pH 6,0, *overnight* à temperatura ambiente, em agitação. Feito isso, os monólitos foram imersos em 20 mL de solução 0,1M de etanolamina no tampão fosfato pH 6,0 por 1h. Após essa etapa, os criogéis foram colocados em contato de 20 mL de solução de borohidreto de sódio 0,1 mol/L em tampão fosfato pH 6,0, por 1h em frasco sem tampa, agitado manualmente a cada 15 min e então

lavados com 20 mL de tampão fosfato pH 6,0 por 1h. Em seguida foram enxaguados com 20 mL de água destilada duas vezes por 30 minutos cada. Após a ativação os criogéis foram colocados em estufa a 60°C e após a secagem foram armazenados à temperatura ambiente.

4.4. Determinação das isothermas de adsorção

Para obtenção das isothermas de adsorção, foram utilizados 12 pontos experimentais, com concentração inicial de BSA variando de 0,1 mg/mL a 15 mg/mL, com três repetições cada no tampão fosfato de sódio a 0,03 mol/L em pH 7,2, adicionado de 2,0 mol/L de sulfato de sódio e variando em quatro temperaturas (25°C, 35°C, 45°C e 55°C), mantidas constantes.

Foi utilizado tampão fosfato de sódio a 0,03 mol/L em pH 7,2, adicionado de 2,0 mol/L de sulfato de sódio. Foram obtidas quatro isothermas em temperaturas entre 25°C e 55°C e concentração de BSA variando de (0,1 a 15mg/mL).

Para cada ponto experimental, em tubos plástico de centrifuga com tampa foram adicionados 30 mg de criogel e 4 mL da solução de BSA na concentração desejada. Os tubos foram deixados sob agitação por 24 h, à temperatura constante, mantida utilizando-se uma estufa BOD. Decorrido o tempo desejado, a solução foi separada do sobrenadante e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. Para quantificação da proteína na solução inicial e no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976) com leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A quantidade de BSA adsorvida foi determinada de acordo com a Equação 10:

$$q = \frac{(C_0 - C) \cdot V}{m} \quad (10)$$

Em que q é a capacidade adsortiva do adsorvente ($\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{criogel}}$); C_0 e C são respectivamente as concentrações inicial e final de proteínas em solução (mg/mL); V é o volume de solução tratada (mL); m é a massa de criogel seco utilizado (g).

A determinação dos parâmetros do modelo de Langmuir, q_{max} e K_c , foram estimados por meio de regressão não-linear, utilizando-se o *software* SigmaPlot®.

4.5 Análise termodinâmica

Partindo dos dados de equilíbrio de adsorção, obtidos pelo modelo de Langmuir, o método não linear de Van't Hoff foi utilizado para descrever o comportamento adsorptivo da BSA no criogel. Dessa forma, os parâmetros termodinâmicos ΔH°_{ads} , ΔS°_{ads} e ΔG°_{ads} , foram determinados empregando as Equações 8 e 9.

4.6 Caracterização dos criogéis

Para a caracterização dos adsorventes produzidos foram realizadas as caracterizações de capacidade de inchamento, grau de expansão, porosidade, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TG).

4.6.1 Capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento (S) foi determinada por meio da imersão dos criogéis ativados e controle, em duplicata, em recipientes contendo 50 mL de água a temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os criogéis foram espremidos delicadamente e as massas (m_s) foram verificadas em balança analítica. Em seguida, os criogéis foram secos em estufa a 60 °C, sendo as massas registradas até se tornarem constantes. O valor de S foi calculado utilizando a Equação 11.

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (11)$$

Em que m_s é a massa (kg) do criogel hidratado e m_d é a massa (kg) do criogel desidratado.

4.6.2 Grau de expansão

O grau de expansão (ED) dos criogéis 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). Os criogéis ativados e controle, em duplicata, foram secos em estufa a 60°C até massa constante. Posteriormente, foram saturados com água por 24 horas. Após esse tempo, os criogéis saturados foram transferidos para uma proveta contendo um volume conhecido de água (V_1), e após a imersão dos criogéis saturados na

proveta foi obtido um novo volume (V_2). O valor de ED foi calculado utilizando-se a Equação 12 (FONTAN, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_d} \quad (12)$$

Em que 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 m_d é a massa do criogel desidratado (kg).

4.6.3 Porosidade dos criogeis

Para determinação da porosidade, foram utilizadas metodologias de Plieva et al. (2004 e 2004a) e Erzenjin et al., (2011). Os criogeis ativados e controle, em duplicata, foram desidratados e com as massas conhecidas (m_d) foram mantidos por sete dias em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar de equilíbrio do ambiente permanecesse em torno de 98% a temperatura ambiente (25 °C) (GREESPAN, 1977), registrando novamente as massas ao final desse período. Com essa medida foi determinada a quantidade de água de ligação do criogel (m_{wb}).

Posteriormente, os criogeis foram imersos em um recipiente contendo 30 mL de água, permanecendo durante 24 horas para completa saturação, registrando novamente as massas (m_s). Em seguida, os criogeis foram delicadamente comprimidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas (m_e). As frações de macroporos (φ_M), com tamanho $\geq 1\mu\text{m}$, fração de meso e microporos (φ_m), com tamanho $<1\mu\text{m}$, fração de água ligada (φ_{wb}), fração de polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogeis foram calculadas utilizando as Equações 13 a 17, respectivamente.

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (13)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (14)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (15)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (16)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (17)$$

Em que 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).

4.6.4 Determinação dos grupos funcionais do criogel por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais dos criogéis foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. As amostras avaliadas foram desidratadas, transformadas em pó e lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500 cm^{-1} em um espectrofotômetro Cary 630, marca Agilent (Santa Clara - USA) realizada no Centro de Estudo em Leite (GOMES, 1976).

4.6.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é utilizada na determinação de ganhos ou perdas de massa associada à absorção ou liberação de gás em função da temperatura enquanto essa é submetida a uma programação controlada. Nesta técnica, analisamos a massa da amostra introduzindo-a em um recipiente acoplado a uma balança analítica. Toda variação de massa é registrada em função da temperatura com aquecimento à taxa constante. As variações de massa são relacionadas a reações que acontecem na amostra, como oxidação, redução, hidratação ou desidratação e a processos físicos como evaporação (LIU et al. 2010; JUNIOR, 2012).

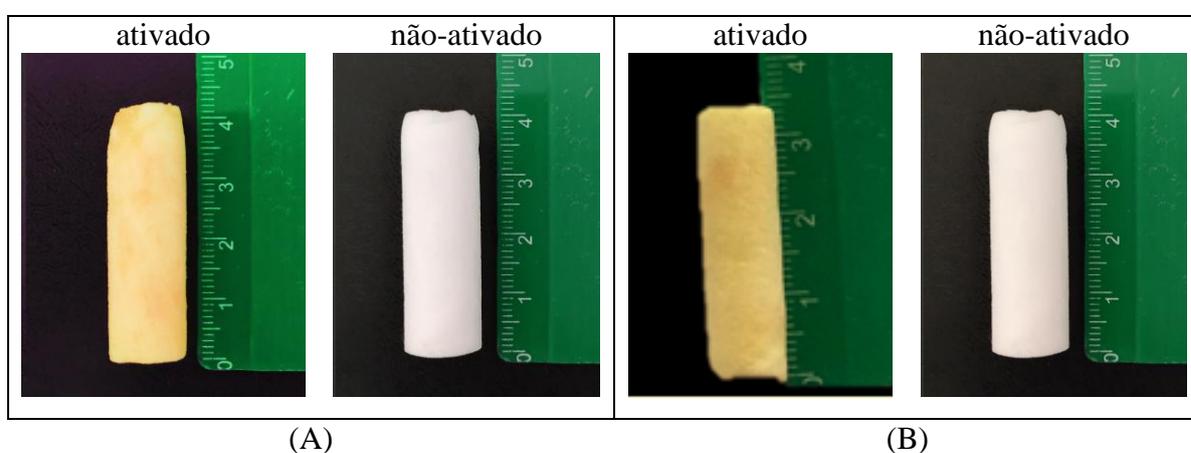
A análise TGA dos criogéis foi feito usando-se um termoanalisador STA Pt-1000 (Linseis, Alemanha), onde a amostra foi analisada da temperatura ambiente (cerca de 20 °C) até 700°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C min^{-1} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos criogeis monolíticos

Ao final do processo de criogeleificação das matrizes poliméricas, as mesmas apresentaram uma estrutura rígida, esponjosa, de forma cilíndrica conforme molde da seringa e uniforme, com coloração amarelada para o criogel ativado (Figura 6). Foi verificado que quando o criogel assume a forma hidratada, exibe características desejáveis, tais como alta porosidade (Yao et al., 2006; Moreira, 2016). Após serem secos e reidratados, os criogeis mantiveram suas características estruturais.

Figura 6. Criogel hidratado (A) e criogel seco (B).



5.2 Caracterização dos criogeis

Os resultados obtidos na caracterização estrutural dos criogeis são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da caracterização dos criogeis ativados e controle.

Parâmetro	Controle	Ativado
Capacidade de inchamento (kg/kg)	10,89 ± 0,31	10,75 ± 1,43
Grau de expansão (L/kg)	10,87 ± 1,87	10,40 ± 3,93
Fração de macroporos*	0,688 ± 0,006	0,647 ± 0,005
Fração de meso e microporos*	0,183 ± 0,005	0,216 ± 0,005
Fração de água de ligação	0,045 ± 0,009	0,051 ± 0,020
Fração de polímero seco	0,084 ± 0,002	0,086 ± 0,010
Porosidade total	0,871 ± 0,011	0,863 ± 0,010

*diferença significativa entre os tratamentos no teste t ao nível de significância de 5%.

De acordo com os resultados da Tabela 1, a capacidade de inchamento dos criogeis produzidos não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$), indicando que a ativação não promoveu modificação na estrutura do criogel na habilidade de hidratar-se. A incorporação de monômero hidrofóbico em rede criogênica aumentou a hidrofobicidade dos criogeis preparados, ou seja, a hidrofobicidade dos criogeis preparados diminuiu. Portanto, a capacidade de penetração das moléculas de água na rede criogênica reduziu, o que, por sua vez, causou uma diminuição tanto na capacidade de inchamento quanto no grau de expansão do criogel preparado. Os resultados obtidos para esse parâmetro variaram entre 10,75 kg/kg e 10,89 kg/kg demonstrando que os criogeis produzidos possuem uma alta capacidade de absorção de água, diferente de valores encontrados por Unler et al., (2014) de 3 kg/kg usando criogeis hidrofóbicos sintetizados com éster metílico de N-metacrilóil - (L) – fenilalanina.

O grau de expansão expressa a relação entre a massa do criogel seco quando armazenado e o volume que este ocupa quando hidratado. Os valores obtidos para o grau de expansão foi 10,87 L/kg para o controle e 10,40 L/kg para o ativado. Valores superiores a esse foi obtido por Gonçalves et al. (2016) que também utilizou o método do glutaraldeído e obteve valor de 18,16 L/kg, indicando que quando o monólito é hidratado, o mesmo apresenta um volume maior em sua estrutura.

Para a porosidade total os criogeis ativado e o de controle não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, com valores de 86% e 87%, respectivamente, indicando uma distribuição da água dentro de todos os poros do criogel. Esses valores foram próximos ao de Plieva et al. (2004 e 2004a) que encontraram uma porosidade total em cerca de 90% e também utilizou criogeis monolíticos contendo 7% de monômeros. Para a fração de polímero seco não houve variação entre os tratamentos, apresentando valores entre 8,4% e 8,6%.

A fração de água ligada indica o quanto o criogel é constituído por água. O criogel ativado apresentou valor superior em relação ao controle, esse comportamento pode ser justificado pelo aumento de água durante o processo de ativação do criogel. Resultados semelhantes foram reportados na literatura por Plieva (2004).

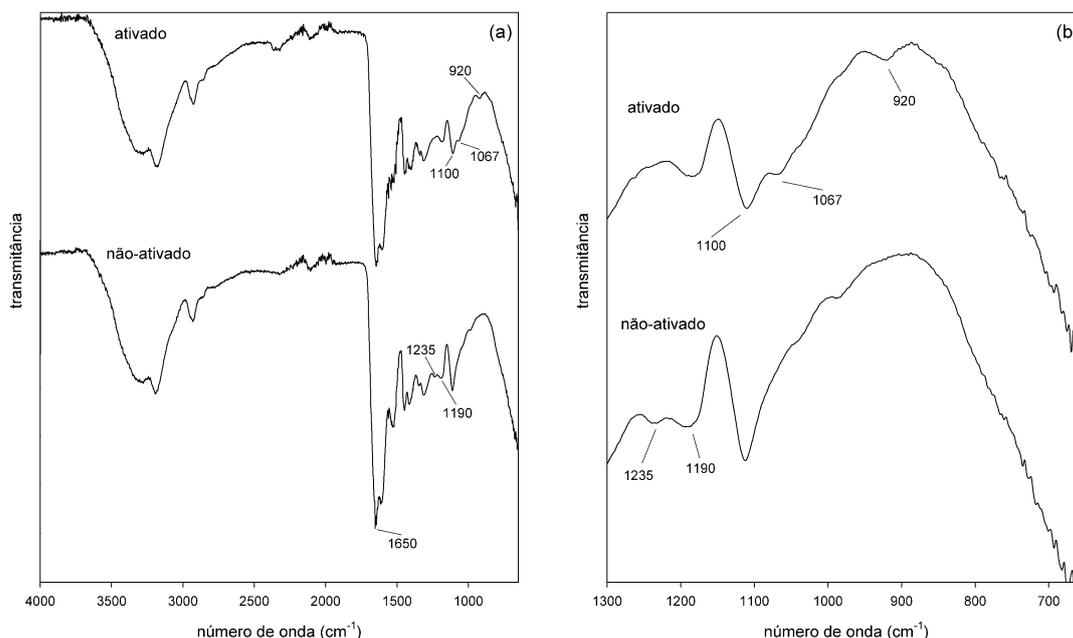
Dentre os parâmetros analisados, apenas frações de macroporos e microporos apresentaram diferença do criogel. Esse fator é importante, pois a presença de macroporos no criogel permite um escoamento facilitado do fluido. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que a maior parte da estrutura do criogel monolítico é formada por

macroporos, revelando o fato de que a ativação não prejudicou o processo de criopolimerização, nem afetou as características de macroporosidade dos criogéis, possuindo assim boas características para serem utilizados em processos de ativação (ARVIDSSON et al., 2003). Valores esses que foram próximos ao encontrado Yao et al. (2006) e Gonçalves et al. (2016) que foi cerca de 70%.

5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho FTIR, foi utilizada no intuito de fornecer informações a respeito da presença de grupos funcionais existentes nos criogéis produzidos sem e com ativação pelo método do glutaraldeído. Na Figura 7 são apresentados os espectros obtidos para os criogéis controle e ativado separados em duas regiões, elevado número de onda e baixo número de onda.

Figura 7. Espectros de FTIR dos criogéis produzidos. (a) espectro de 650 a 4000 cm^{-1} . (b) destaque para a região de 650 a 1300 cm^{-1} .



As bandas observadas na região de 920 cm^{-1} e 1067 cm^{-1} do criogel ativado sugerem a presença de grupamentos funcionais aminas, decorrente da presença de moléculas de butilamina imobilizada no criogel. A banda em 1100 cm^{-1} , sugerem à presença de C-O presente em radicais epóxi advindos do AGE, responsáveis pelos braços espaçadores (ALCÂNTARA, 2013). Observa-se nos espectros que houve uma redução na intensidade da banda em 1650 cm^{-1} , do criogel ativado em relação ao controle, esse

comportamento tem característica de compostos que são usados durante o processo de ativação e que se ligam ao grupo epóxi, dessa forma diminuindo o braço espaçador.

Na faixa entre 1190 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} do criogel não-ativado havia uma banda em 1235 cm^{-1} que desapareceu após a ativação. A banda em referência pode estar associada à presença de C-O presente em álcoois ou de ligações C-N de grupos amins (GONÇALVES et al., 2016; COATES, 2000).

Na região do infravermelho (1650 cm^{-1}), percebe-se uma banda forte característica dos estiramentos do grupo C=O oriundo da AAm e BAAM usadas no processo de síntese do criogel (INGAVLE et al., 2015). Em alguns trabalhos usando criogel de poliacrilamida, nota-se nos espectros de FTIR a ocorrência de bandas fortes na mesma região de comprimento de onda (GONÇALVES et al., 2016; TAO et al., 2014; SILVA, 2014).

5.4 Análise termogravimétrica (TG)

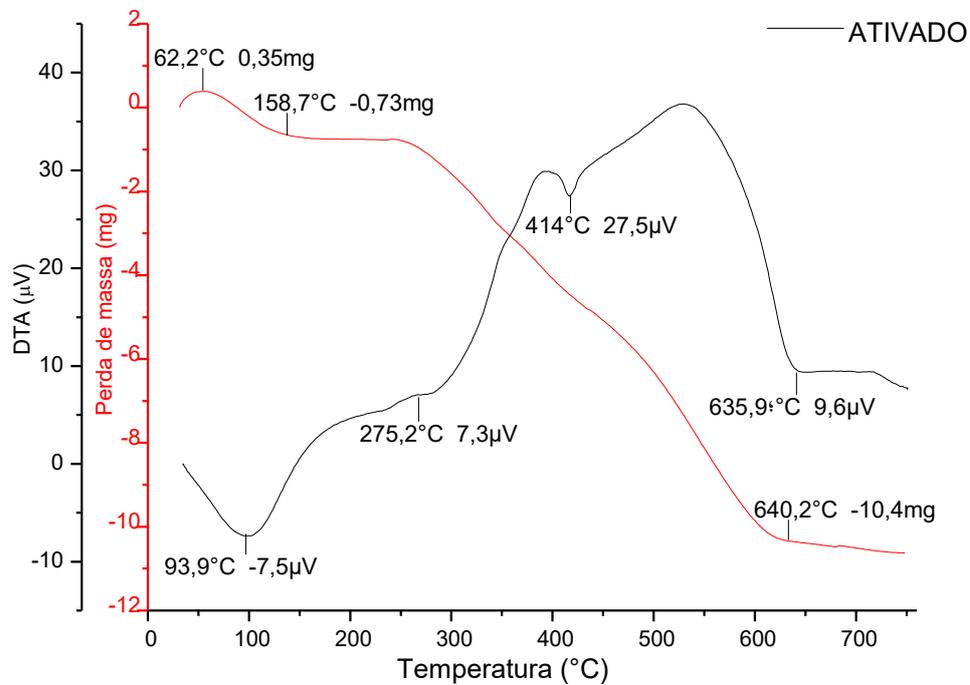
Na Figura 8 são apresentados os dados das curvas termogravimétricas dos criogeis ativado e controle. As propriedades térmicas dos criogeis foram investigadas por termogravimetria. Os termogramas do criogel permitiram acompanhar as modificações advindas durante o processo de degradação dos compostos presentes no monólito de poliacrilamida.

Durante a degradação térmica dos componentes nos criogeis ativados e controle, observou-se um pico endotérmico nas temperaturas inferiores a 100°C , atribuído a perda de água ligada ao polímero e outras espécies voláteis (SILVA et al., 2000; SHANMUGASUNDARAM et al., 2001; XIA et al., 2005). Acima de 200°C , observa-se um amplo pico exotérmico entre 270°C e 400°C , mostrando a degradação da poliacrilamida tanto para o criogel ativado quanto para o criogel controle (KUMAR et al., 2014). Um pico exotérmico foi observado entre a temperatura 415° e 580°C , esse comportamento pode ser atribuído ao criogel que está imobilizado pelo glutaraldeído, uma vez que o grupamento amina seja muito mais estável do que cadeias poliméricas sem imobilização (RIMDUSIT et al., 2012).

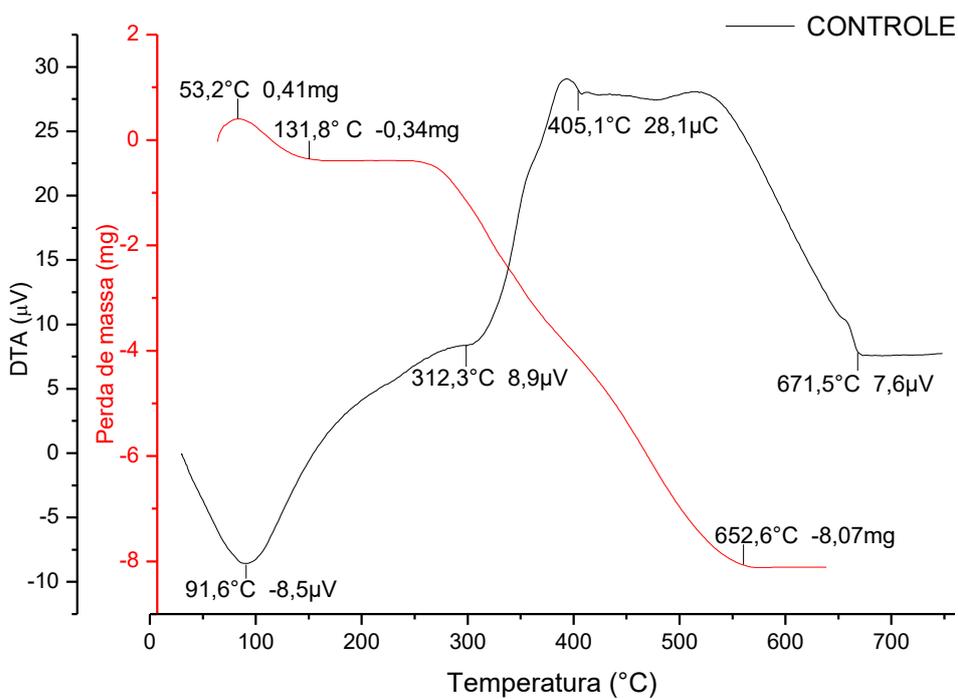
Um total de três eventos térmicos pode ser observado entre as duas matrizes poliméricas. Nas temperaturas entre 50° e 250°C , ocorre uma perda de peso, isto é atribuído à evaporação da água, cujo conteúdo é função da morfologia e cristalinidade dos polímeros, demonstrando que o criogel contém uma grande quantidade de água ligada

ao polímero (SILVA et al., 2000) e em aproximadamente 652°C a estrutura estabiliza termicamente.

Figura 8. Curvas de TG/DTA dos criogeis ativado e controle.



(a)

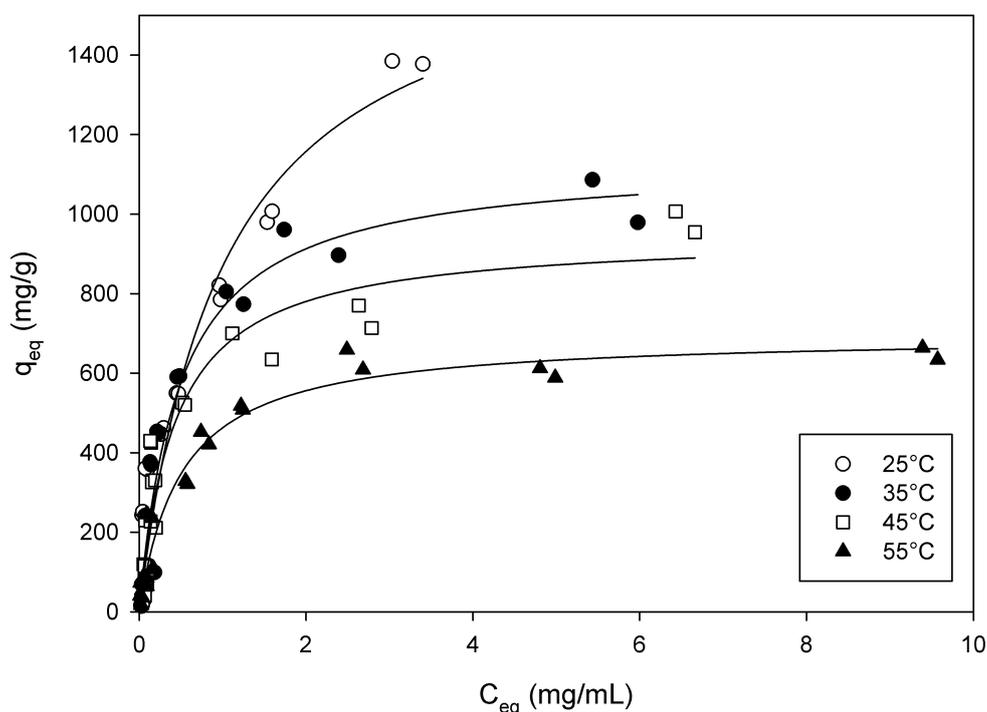


(b)

5.5 Isotermas de adsorção

Na Figura 9 são apresentadas as isotermas de adsorção da BSA no criogel hidrofóbico nas temperaturas 25°C, 35°C, 45°C e 55°C. Para construção da isoterma foi definido a concentração do fosfato de sódio e então variou-se a concentração da proteína.

Figura 9 - Isotermas de adsorção de BSA no criogel hidrofóbico em tampão fosfato 0,02M pH 7,2 adicionado de 2,0M de sulfato de sódio a diferentes temperaturas. (____) modelo de Langmuir.



A capacidade adsorptiva da proteína diminuiu com o aumento da temperatura. Esse fato pode ser atribuído à conformação e atividade da proteína que variam significativamente com a temperatura que pode afetar a solubilidade e o potencial químico do adsorvato. Desta forma, a alteração na temperatura de um processo conduz a uma mudança na capacidade de adsorção (NASCIMENTO et al., 2014). Os efeitos do sal em solução na interação da proteína com adsorventes têm sido amplamente investigados ao longo de várias décadas (DRAGAN et al., 2017). Esses estudos indicam que os compostos salinos aumentam a tensão superficial da solução, aumentando a exposição das regiões hidrofóbicas do núcleo da proteína interna na solução salina mais alta, proporcionando maior interação com os ligantes hidrofóbicos (CHEN et al., 2003).

Verificou-se então o ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais. Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros ajustados.

Ao analisar os parâmetros obtidos pela isoterma de Langmuir observa-se que a capacidade máxima apresenta uma diminuição com o aumento da temperatura e a constante K_L indicando uma afinidade da BSA pelo adsorvente.

Tabela 2. Parâmetros do modelo de Langmuir para a adsorção da BSA

Temperatura (°C)	q_{\max} (mg/g)	K_L (mL/mg)	R^2
25	1735,56	1,001	0,95
35	1133,65	2,067	0,94
45	946,34	2,350	0,91
55	696,28	1,981	0,96

A partir do ajuste do modelo de Langmuir, procedeu-se então a análise não-linear de van't Hoff, sendo o gráfico da mesma apresentado na Figura 10. A variação das propriedades termodinâmicas estudadas são apresentadas na Tabela 3.

Figura 10. Gráfico de Van't Hoff – $\ln k$ versus $1/T$.

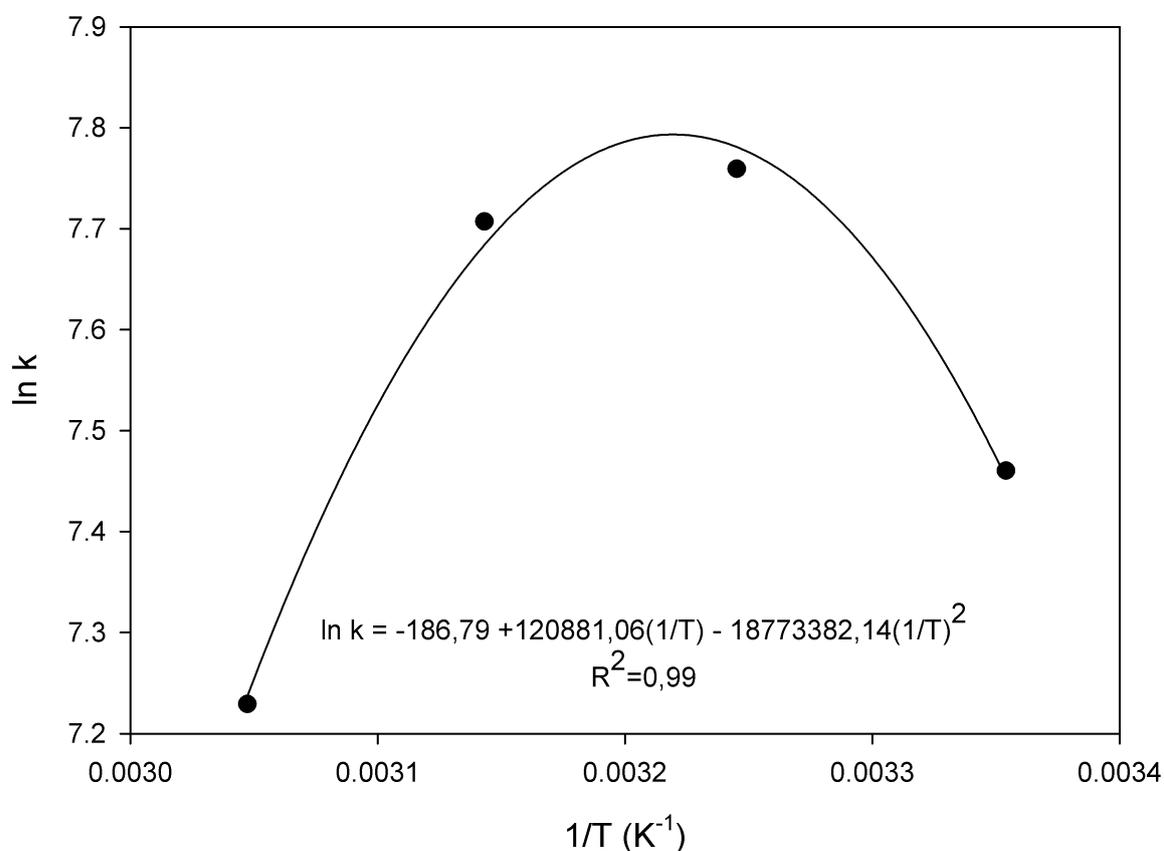
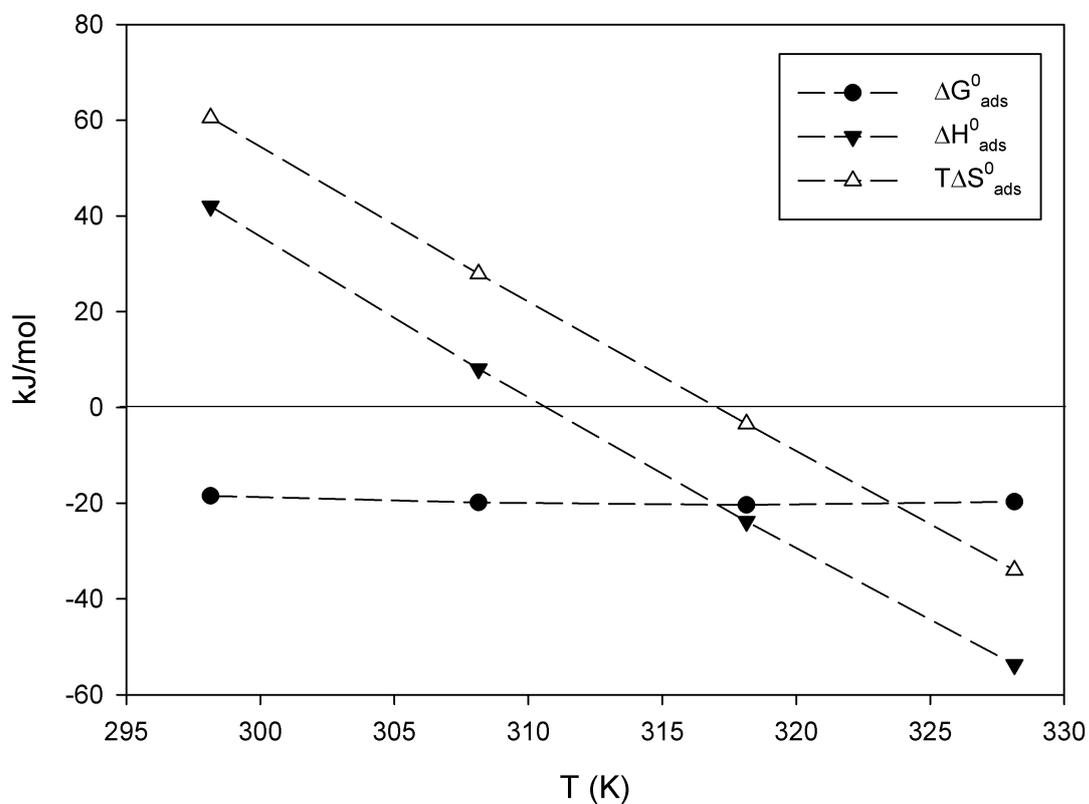


Tabela 3. Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH°_{ads} , ΔS°_{ads} e ΔG°_{ads}

Temperatura (K)	ΔH°_{ads} (kJ/mol)	ΔS°_{ads} (kJ/mol/k)	ΔG°_{ads} (kJ/mol)	T. ΔS°_{ads} (kJ/mol)
298,15	42,00	0,203	-18,49	60,49
308,15	8,02	0,091	-19,88	27,90
318,15	-23,82	-0,011	-20,39	-3,43
328,15	-53,72	-0,104	-19,72	-34,00

Pode se observar a partir dos resultados apresentados na Figura 11 que o processo de adsorção em questão foi espontâneo ($\Delta G^{\circ} < 0$) em todas as temperaturas estudadas. Houve uma tendência a ocorrer compensação entálpico-entrópica no processo, em especial acima de 35°C (308,15K).

Figura 11: Variação das propriedades termodinâmicas avaliadas em função da temperatura.

O processo de adsorção avaliado tende a se tornar exotérmico com o aumento da temperatura. Nas duas temperaturas mais baixas avaliadas (25°C e 35°C) o processo foi entropicamente dirigido, passando a ser entálpicamente dirigido nas outras temperaturas avaliadas (45°C e 55°C). Isso sugere que mudanças conformacionais na proteína nas temperaturas mais baixas promoveram uma maior exposição de grupos hidrofóbicos para que ocorresse a adsorção, apesar do processo não ser entálpicamente vantajoso, requerendo energia. Nas temperaturas mais elevadas, apesar do processo de adsorção se tornar interessante do ponto de vista entálpico, possivelmente as moléculas de BSA adquiriram uma configuração em tal nível de desnaturação que, mesmo com a exposição de grupos hidrofóbicos para a adsorção, causaram um impedimento espacial maior sobre os sítios ativos do adsorvente reduzindo a entropia configuracional do sistema e consequentemente a quantidade adsorvida de BSA.

Esse comportamento é contrário ao relatado em diversos trabalhos envolvendo interação hidrofóbica (CHEN et al., 2006; UNLER et al., 2013). No entanto, em todos eles a concentração do sal adicionado não foi tão elevada quanto neste trabalho, para que o aumento do efeito hidrofóbico fosse conseguido. Possivelmente a combinação da elevada concentração de sulfato de sódio com o aumento da temperatura promoveu tal característica.

A temperatura é outro fator que influencia a adsorção hidrofóbica em uma determinada concentração de sal. Em geral, pode-se afirmar que a elevação da temperatura aumenta a retenção de proteínas enquanto que a sua diminuição promove a eluição da proteína. Este comportamento é explicado pelo fato de a retenção das proteínas em CIH ser um processo conduzido entropicamente (Energia de Gibbs (ΔG) dada por $\ln k' = \ln \phi - (\Delta G^\circ/RT)$). Contudo, a temperatura também pode afetar o estado conformacional das biomoléculas e a sua solubilidade (NUNES, 2008; SIERRA, 2014). Dessa forma, pesquisadores vem desenvolvendo tradicionalmente análises termodinâmicas baseadas na dependência de van't Hoff (BOYSEN et al., 1999) e, ultimamente, está se usando a calorimetria para estudar a interação entre a proteína e a superfície hidrofóbica sólida.

6. CONCLUSÃO

Foi produzido um adsorvente com potencial de uso em técnicas cromatográficas baseadas em interação hidrofóbica voltadas para o processo de purificação e captura de proteínas. Foi realizada a caracterização desse adsorvente para aplicação em processos cromatográficos e verificou-se que o processo de funcionalização não levou às diferenças significativas nos parâmetros analisados, com exceção da fração de macroporos e microporos que apresentou diferença entre os tratamentos.

Baseado nos dados experimentais de equilíbrio verificou-se que com o aumento da temperatura a capacidade adsortiva de proteína decaiu. Os parâmetros ajustados do modelo de isoterma de Langmuir foram satisfatórios e partir deles procedeu-se então à análise não-linear de van't Hoff, onde verificou-se que o processo de adsorção foi espontâneo ($\Delta_{\text{ads}}G < 0$).

Pode-se concluir que o criogel hidrofóbico produzido poderá ser um meio de separação alternativo, de baixo custo, seletivo e eficaz para proteínas, com potencial para aplicação em técnicas cromatográficas.

7. REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, 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.

ALLEONI, L. R. F., CAMARGO, O. A., CASAGRANDE, J. C. Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*. Vol. 55 n. 3. Piracicaba, 1998.

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.

ANTUNES. M. Utilização do bagaço da uva Isabel para a remoção de diclofenaco de sódio em meio aquoso. 92p. Dissertação. Universidade de Caxias do Sul. 2011.

AVCIBAŞI, N., UYGUN. M., ÇORMAN, M. E., AKGÖL, S., DENIZLI, A. Application of Supermacroporous Monolithic Hydrophobic Cryogel in Capturing of Albumin. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 162:2232–2243. DOI 10.1007 /s12010-010-8997.

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

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

ASGARI, S.; JAHANSHAHI, M.; RAHIMPOUR, A. Cost-effective nanoporous Agar-Agar polymer / Nickel powder composite particle for effective bio-products adsorption

by expanded bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1361, p 191–2028, 2014.

BOURASSA, P. HASNI, I. TAJMIR-RIahi, H.A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry* 129, (2011) 1148–1155.

BOYSEN, R. I., WANG, Y., KEAH, H. H., HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments. *Biophysical chemistry*. V. 77, p. 79-97, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248-254, 1976.

CALLISTER, S. M., CASE, K. L., AGGER, W. A., SCHELL, R. F., JOHNSON, R. C., & ELLINGSON, J. L. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28 n 2, 363–365, 1990.

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

CARVALHO, B. M., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, v. 38. n. 3, São Paulo, 2015.

CAPORALE, G.M.M. Purificação de subunidades do vírus da raiva por meio de cromatografia. 2010. Universidade de São Paulo. 74p. Tese (Doutorado). São Paulo-SP.

CARPINÉ, D.; ZUIM, D. R.; DISTLER, G.; SCHEER, A.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Adsorption of two coffee aromas from synthetic aqueous solution onto

granular activated carbon derived from coconut husks. *Journal of Food Engineering* (2011), DOI 10.1016 /j.jfoodeng.2010.12.019.

CHEN, W.Y, HUANG, H.M., LIN, C. C, LIN, F. Y., CHAN, Y. C. Effect of Temperature on Hydrophobic Interaction between Proteins and Hydrophobic Adsorbents: Studies by Isothermal Titration Calorimetry and the van't Hoff Equation. *Chemical and Materials Engineering*. 19, 9395-9403, 2003.

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

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

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. *Princípios básicos de cromatografia: Introdução a métodos cromatográficos*. 7ed. Campinas, São Paulo, Editora UNICAMP, 2013, p. 11-27.

DENIZLI, A. PISKIN, E. Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.49, p. 391-416, 2001.

DRAGAN, E. S., HUMELNICU, D., DINU. M. V., OLARIU, R. I. Kinetics, equilibrium modeling, and thermodynamics on removal of Cr(VI) ions from aqueous solution using novel composites with strong base anion exchanger microspheres embedded into chitosan/poly(vinyl amine) cryogels. *Chemical Engineering Journal*. 2017. DOI 10.1016/j.cej.2017.08.004.

ELPÍDIO, C. M. A. Síntese e caracterização de adsorvente pelicular para Adsorção em Leito Expandido (ALE). 2016. 89p. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN. CDU 661.18 (043.3).

FAGUNDES, F. P. Estudo da imobilização de proteases para a síntese de oligolisinas. 2011. 142p. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FERREIRA, S. E. Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos. 2009. 150p. Tese. Universidade de São Paulo, SP.

FERREIRA, A., CASTRO, G. F. C., TOLEDO, M. L., SILVA, O. A. S., MARCONDES, V. Isotermas de adsorção de Langmuir, BET e Gibbs. Fenômenos de Superfície e Eletroquímica. Universidade de São Paulo, 2018.

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., 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.

FREITAS, E. D. Adsorção competitiva de íons prata e cobre em argila bentonítica. 133p. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, SP. 2016.

GILES, C. H.; KRUSKI, R. W.; RISGLRE, T.O. A system of classification of solution adsorption isotherms. *J. Chem. Soc.*, v. 111, n.1, p. 3973-3993, 1960.

GODDETTE, D. W., CHRISTIANSON, T., LADIN. B. F., LAU, M., MIELENZ, J. R., PAECH, C. REYNOLDS, R. B. YANG, S. S., WILSON, C. R. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *Journal of Biotechnology*, 28 (1993) 41-54.

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.

GONDIM, D. R. Quitosana/Alginato epoxilado com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do Soro Humano. 2012. 100f. Dissertação. Centro de tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GUO, X., LI, X., JIANG, Y., YI, L., WU, Q., CHANG, H., ... ZHOU, N. A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 149, 353–360, 2014.

GREENSPAN, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of research of the national bureau of standards*, 81(1), 89-96.

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.

IUPAC Recommendations. *Pure and Applied Chemistry*, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A., & PANAHI-AZAR, V. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. *Food Chemistry*, v. 202, p. 426–431, 2016.

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

JUNGBAUER, A & HAHNA, R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies, *Journal of Chromatography A*, 1184: 62 79, 2008.

JUNIOR, C. W. Síntese de aerogéis e xerogéis de sílica com troca de solvente e secagem a pressão ambiente. 86f. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, SP. 2012.

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

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2014. ISSN 0021-9673.

LIU, M.-L; YANG, D.-A; QU, Y.-F. *Journal of Exp. Nanoscience*, 5, 83 – 91, 2010.

LOZINSKY, V., PLIEVA, F., GALAEV, I. e MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2010. ISSN 0923-179X.

LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p.1559, São Paulo. 2010.

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

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

MELO, C. B., RAULINO, G. S. C., NASCIMENTO, R. F., LIMA, A. C. A., VIDAL, D. Q. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. 256p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2014 ISBN: 978-85-7485-186-0.

MONTEIRO, K. A.; BORGES, J. F.; OLIVEIRA, T. P.; BRITO, M. J. P.; ANDRADE, S.N.; VELOSO, C. M. Adsorção das proteínas albumina do soro bovino e α -lactoalbumina em carvão ativado obtido a partir do endocarpo do coco. In: XXXVII Congresso brasileiro de sistemas particulados, 2015, São Paulo. Artigo completo. São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, ISSN 2359-1757. Volume 2, p 1259-1266.

MOREIRA, C., M.; MELO, D. Q. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata em Matrizes de Hidrogéis Eletro-termossensíveis. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Materiais para Engenharia). Itajubá, 2014.

MOREIRA, J. V. Estudo termodinâmico da região linear das isotermas de adsorção em sílica C₁₈ para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper Hispidinervum* C. DC. 2016. 117p. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, SP.

NASCIMENTO, R. F., LIMA, A. C. A., VIDAL, C. B., MELO, D. Q., RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. 256p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2014 ISBN: 978-85-7485-186-0.

NUNES, N. S. I. O efeito da temperatura em diferentes licopenos sobre o estresse oxidativo. Dissertação de mestrado do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Florianópolis, 2008. 92p.

OLIVEIRA, T.P. BORGES, J. F. MONTEIRO, K. A. BRITO, M. J. P. VELOSO, C. M. SILVA, T. B. Adsorção de albumina do soro bovino (BSA) em carvão ativado obtido a partir do caroço do cajá. XXXVII ENEMP. Universidade Federal de São Carlos, 2015.

ÖNAL, Y.; et al. Textural development of sugar beet bagasse activated with ZnCl₂. *Journal of Hazardous Materials*, v. 142, p. 138-143, 2007.

OSCARSSON S, KÅRSNÄS P. Salt-promoted adsorption of proteins onto amphiphilic agarose-based adsorbents. II. Effects of salt and salt concentration. *J Chromatography A* 803:83–93, 1998.

PARIZZI, P. C. Imobilização de Beta-galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise de lactose. Dissertação. p. 56. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2015.

PESSOA, Jr. A; KILIKIAN, B.V. Introdução. In: Pessoa Jr. A, Kilikian B.V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. 1ed. São Paulo: Manole; p.1-5 2005.

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

PITTA, D. F., WALDMAN, E. A., TORRADO, S. Separações em colunas abertas: Cromatografia por bioafinidade. *Science Chromatographica*. V. 3, n. 2, pp. 107-114, 2017.

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, 2004.

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, 2004a.

PLIEVA, F. M. et al. Cryogel applications in microbiology. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008. ISSN 0966-842X.

QUIERIOZ, M. E. C., OLIVEIRA, E. B., BRETON, F., PAWLISZYN, J., *Journal of Chromatography A.*, 2011, 1174, 72-77.

SANTOS. C. M. S. Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a imobilizada para a purificação de lectinas. 2016. 78p. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BA. CDD(21): 543.

SAVINA, I. N.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,Ndimethylaminoethyl-methacrylate. *Journal of Chromatography A*, v. 1092, n. 2, p. 199-205. ISSN 0021-9673, 2011.

SHAHABADI, N.; & HADIDI, S. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 100–106, 2014.

SHANMUGASUNDARAM, N., RAVICHANDRAN, P., REDDY, P. N., RAMAMURTY, N., PAL, S., RAO, K. P. *Biomaterials* 22, 1943, 2001.

SIERRA, O. A. P. Adsorção de glicomacropéptido por interação hidrofóbica em leito expandido. 2014. 91f. Tese. Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade federal de Viçosa, Viçosa.

SINGH, M.P.; SINGH, R.K.; CHANDRA, S. Ionic liquids confined in porous matrices: Physicochemical properties and applications. *Progress in Materials Science*, v. 64, p. 73–120, 2014.

SILVA, M.E.S.R., DUTRA, E.R., MACHADO, V.M. J.C. *Polym. Degrad. Stabil.* 67,491, 2000.

SILVA, R.E., TOLEDO, K.C.F, JORGE, H.B., NETO, B.M., SOUZA, V.R., NAKATANI, H.S. Interação de Complexo de Rutênio com Albumina de Soro Bovino para Detecção Amperométrica de Ácido Ascórbico. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 10, 1633-1638, 2014.

SOUSA, R. C S., COIMBRA, J. S. R., AUGUSTO, L. L., REIS, L. S. T. Adsorção de alfa-lactalbumina do soro de leite em hidroxiapatita: efeito do pH e da temperatura e análise termodinâmica. *Química Nova*, v. 37. N. 6, 950-955, 2014.

RIMDUSIT, S., SOMSAENG, K., KEWSUWAN, P. JUBSILP, C., TIPTIPAKORN, S. Comparison of Gamma Radiation Crosslinking and Chemical Crosslinking on Properties of Methylcellulose Hydrogel. *Engineering Journal*. v. 16, Issue 4, DOI:10.4186/ej.2012.16.4.15, 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.

UNLER, O. B. Preparation of a Novel Hydrophobic Affinity Cryogel for Adsorption of Lipase and Its Utilization as a Chromatographic Adsorbent for Fast Protein Liquid Chromatography. *AIChE*, Published online December 28, 2013. DOI 10.1002/btpr.1863.

ÜNLER, Ö.B., ERSÖZ, A., DENIZLI, A., DEMIREL, R., SAY, R.: Separation and purification of hyaluronic acid be embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel. *J. Chromatogr. B*, 934, 2014, 46-52.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. *Chinese journal of chemical engineering*, v.19, 876-880, 2011.

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

XIA. Y-Q., GUO, T-Y., SONG, M-D., ZHANG, B-H., ZHANG B-L. *Biomacromolecules* 6, 2601, 2005.