



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

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



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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**PRODUÇÃO DE UM ADSORVENTE MONOLÍTICO TROCADOR CATIONICO E ESTUDO
TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO DE LISOZIMA**

Autora: Yara Gomes de Souza

Orientador: Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

**Itapetinga
Bahia – Brasil
2020**

YARA GOMES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE UM ADSORVENTE MONOLÍTICO TROCADOR CATIONICO E ESTUDO
TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO DE LISOZIMA**

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. Renata Cristina Ferreira Bonomo – UESB

Prof^a. DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo – UFLA

**Itapetinga
Bahia – Brasil
2020**

543.089
S719p

Souza, Yara Gomes de

Produção de um adsorvente monolítico trocador catiônico e estudo termodinâmico da adsorção de lisozima. / Yara Gomes de Souza. - Itapetinga: UESB, 2020.

56f.

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 do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Prof^a. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof^a. D.Sc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.

1. Proteínas – Adsorção - Adsorvente monolítico. 2. Cromatografia - Purificação de proteínas - Criogéis. 3. Termodinâmica - Análise. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. V. Título.

CDD(21): 543.089

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Adsorção - Curvas isotermas
2. Adsorvente monolítico macroporoso - Produção



ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Reconhecida pelo Decreto Estadual
N.º 16.825, de 04.12.2016



UESB



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: PRODUÇÃO DE UM MONÓLITO TROCADOR CATIONICO E ESTUDO TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO DE LISOZIMA.

Autor (a): YARA GOMES DE SOUZA

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

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcantara Verissimo
Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

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.


Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior
UESB


Prof.ª Dr.ª Alexilda Oliveira Souza
UESB


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

Itapetinga-BA, 17 de fevereiro de 2020.

“O sábio que tudo sabe é aquele que sabe que nada sabe”

- Platão

A Deus e à minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu infinito amor, por me dar a graça de acreditar que Ele sempre está comigo independente de qualquer situação, por me dar força e coragem para enfrentar todos os obstáculos que a vida apresenta.

Aos meus pais, Jovercy e Rozeli, que sempre me incentivaram a não desistir dos meus objetivos. Obrigada pelas orações e apoio durante essa jornada.

Aos meus irmãos, Yane e Jonas por todo incentivo e cuidado.

Ao Mateus Neto, por todo carinho, apoio e incentivo. Obrigada por TUDO! Por fazer muito para que esse momento chegasse, sem você provavelmente essa conquista eu não teria.

Às minhas tias por todo apoio e cuidado.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, principalmente o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade.

Ao professor Rafael Fontan, pela orientação, acompanhamento, paciência, compreensão e contribuição na minha formação profissional e pessoal durante todo esse tempo. Obrigada!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Renata Bonomo pela coorientação, auxílio e participação da banca de qualificação.

À Alexilda e Evaldo por aceitarem participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições.

Ao pessoal do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) que me acolheu durante esses dois anos, em especial Rui e Márjorie, que me ensinaram muito. Vocês são maravilhosos!!

Aos meus amigos que mesmo de longe me apoiaram com muito amor e zelo.

À Carolina que esteve do meu lado esses dois anos com muito amor e compreensão.

As companheiras de casa Carolina, Caroline e Ionara pelos momentos de que passamos juntas.

A todas as pessoas que conheci e passaram na minha vida em Itapetinga-BA durante esses dois anos.

Aos funcionários da UESB, em especial Jamilles pelas conversas e carinho.

Enfim, a todos que contribuíram para essa conquista!

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Técnicas Cromatográficas	3
2.2 Criogéis monolíticos poliméricos.....	4
2.3 Modificações na superfície dos suportes cromatográficos.....	7
2.4 Caracterização de criogéis.....	8
2.4.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR.....	8
2.4.2. Análise Termogravimétrica (TGA).....	8
2.4.3. Difração de raio-X.....	9
2.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	9
2.5 Proteínas.....	10
2.5.1. Lisozima.....	11
2.6 Isotermas de Adsorção.....	13
2.7 Propriedades Termodinâmicas	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Reagentes.....	18
4.2 Síntese dos criogéis.....	18
4.3 Solução de Diperiodatocuprato de Potássio	18
4.4 Ativação e Enxertia.....	18

4.5	Caracterização dos Criogéis	19
4.5.1	Capacidade de inchamento e grau de expansão	19
4.5.2	Porosidade dos criogéis	20
4.5.3	Capacidade de troca iônica (CTI).....	20
4.5.4	Análise de ponto de carga zero (PCZ).....	21
4.5.5	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	22
4.5.6	Análise termogravimétrica.....	22
4.5.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
4.5.8	Difração de raios-X	22
4.6	Determinação das Isotermas de Adsorção	22
4.7	Determinação das Propriedades Termodinâmicas	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Síntese dos criogéis.....	24
5.2	Caracterização dos Criogéis	25
5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
5.4	Análise do ponto de Carga Zero.....	27
5.5	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	28
5.6	Difração de Raio X.....	29
5.7	Análise Termogravimétrica.....	31
5.8	Isotermas de adsorção	33
5.9	Propriedades termodinâmicas.....	34
6.	CONCLUSÃO	38
7.	REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

SOUZA, Y. G. Produção de um Adsorvente Monolítico Trocador Catiônico e Estudo Termodinâmico da Adsorção de Lisoizima Itapetinga-BA: UESB, 2020. 56p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos) ¹

As técnicas cromatográficas estão presentes e se destacam em processos de purificação de proteínas para aplicações farmacêuticas, médicas e na área de alimentos devido à sua eficiência. O desenvolvimento de novas matrizes cromatográficas para essa finalidade é constante e a produção de monólitos macroporosos poliméricos por criogeificação mostra-se uma alternativa por sua versatilidade e custo reduzido comparado às matrizes usuais. Conhecidas por criogéis, essas matrizes podem ser modificadas para a purificação/captura de compostos por diferentes princípios. A troca iônica é um destes princípios e vem sendo empregada na purificação de proteínas, por permitir a operação em condições próximas as fisiológicas, causando menor dano aos compostos. Essa técnica baseia-se na adsorção de moléculas com uma carga elétrica líquida em uma superfície contendo radicais com cargas elétricas opostas. Para a melhoria dos processos de adsorção é necessário o conhecimento acerca do material utilizado e dos fenômenos envolvidos. As análises de caracterização do adsorvente permitem o dimensionamento adequado e o entendimento sobre a morfologia e estrutura química, bem como os processos de transferência de massa. O estudo termodinâmico é importante para maior compreensão do fenômeno da adsorção e em geral passa pela determinação das curvas isotermas de adsorção. Quando se quer estudar uma nova matriz adsorvente é usual o uso de solutos-modelo nesses estudos, sendo a lisoizima uma proteína amplamente usada em estudos envolvendo a troca catiônica de macromoléculas, além do interesse industrial que a mesma desperta devido seu desempenho antimicrobiano. Portanto, objetivou-se nesse trabalho a produção e caracterização um adsorvente monolítico macroporoso voltado ao processo de purificação de compostos por troca catiônica e verificar o efeito da temperatura no processo de adsorção de lisoizima. A matriz adsorvente foi feita a partir da polimerização de uma solução contendo acrilamida e bis-acrilamida, catalisada por persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino, em condições criogênicas (24 h/-12 °C) e posterior ativação com diperiodato cuprato de potássio e enxertia do ácido acrílico. O trocador foi caracterizado quanto à porosidade, grau de expansão (ED), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) capacidade de inchamento (S), capacidade de troca iônica (CTI), ponto de carga zero (PCZ), espectrofotometria no infravermelho FTIR, análise termogravimétrica (TGA) e difração de raios-X (DRX). As isotermas de adsorção da lisoizima no trocador produzido foram determinadas em batelada, na faixa de temperatura de 10 °C a 50 °C, ajustando-se o modelo de Langmuir aos dados. Foi conduzida a análise não-linear de van't Hoff, determinando-se as variações-padrão da energia livre de Gibbs, entalpia e entropia para o processo. O adsorvente produzido apresentou ED igual 15,08 L·kg⁻¹, S de 11,99 kg·kg⁻¹, 90% de porosidade total, CTI de 371,44 10⁻³ mol_{Na⁺}·kg⁻¹_{criogel seco}. O valor de PCZ igual a 4,5 confirma que o adsorvente possui natureza catiônica. Os resultados dos espectros de FTIR e perfil do TGA indicam diferenças entre a matriz controle e funcionalizada, demonstrando que conseguiu-se obter o trocador catiônico. A partir da análise de DRX não apresentou alteração na estrutura cristalina da matriz após a funcionalização, que permaneceu amorfa. A partir das isotermas de adsorção verificou-se o aumento na capacidade adsorptiva com o aumento da temperatura até 40°C, com máximo observado de 1055,87 mg·g⁻¹, sendo observada uma queda na capacidade adsorptiva de 40 °C a 50 °C, possivelmente devido a alterações conformacionais da lisoizima. O processo de adsorção foi espontâneo, sendo dirigido entalpicamente em temperaturas mais baixas e entropicamente dirigido para temperaturas mais elevadas.

Palavras-Chave: troca iônica, ácido acrílico, isoterma, van't Hoff.

¹ Orientador: Fontan, R.C.I. DSc. UESB. Coorientadores: Bonomo, R.C.F. DSc. UESB; Veríssimo. L.A.A. DSc. UFLA.

ABSTRACT

SOUZA, Y. G. Production of a Monolithic Cationic Exchanger and Thermodynamic Study of Lysozyme Adsorption Itapetinga-BA: UESB, 2020. 56p. (Dissertation - Master in Food Engineering) ¹

Chromatographic techniques are present and stand out in protein purification processes for pharmaceutical, medical and food applications due to their efficiency. The development of new chromatographic matrices for this purpose is constant and the production of polymeric macroporous monoliths by cryogelification is an alternative due to its versatility and reduced cost compared to the usual matrices. Known as cryogels, these matrices can be modified for the purification/capture of compounds by different principles. Ion exchange is one of these principles and has been used in the purification of proteins, as it allows the operation in conditions close to physiological, causing less damage to the compounds. This technique is based on the adsorption of molecules with a net electrical charge on a surface containing radicals with opposite electrical charges. To improve the adsorption processes, knowledge about the material used and the phenomena involved is necessary. The characterization analyzes of the adsorbent allow for adequate sizing and understanding of the morphology and chemical structure, as well as the mass transfer processes. The thermodynamic study is important for a better understanding of the adsorption phenomenon and in general, it involves the determination of the adsorption isotherm curves. When one wants to study a new adsorbent matrix, it is usual to use model solutes in these studies, lysozyme being a protein widely used in studies involving the cation exchange of macromolecules, in addition to the industrial interest that it arouses due to its antimicrobial performance. Therefore, the objective of this work was the production and characterization of a macroporous monolithic adsorbent aimed at the process of purifying compounds by cation exchange and verifying the effect of temperature on the lysozyme adsorption process. The adsorbent matrix was made from the polymerization of a solution containing acrylamide and bis-acrylamide, catalyzed by ammonium persulfate and N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, under cryogenic conditions (24 h /-12 ° C) and subsequent activation with potassium cuprate diperiodate and acrylic acid grafting. The exchanger was characterized in terms of porosity, degree of expansion (ED), scanning electron microscopy (SEM) swelling capacity (S), ion exchange capacity (CTI), zero charge point (PCZ), FTIR infrared spectrophotometry, thermogravimetric analysis (TGA) and X-ray diffraction (XRD). The lysozyme adsorption isotherms in the produced exchanger were determined in batches, in the temperature range from 10 ° C to 50 ° C, adjusting the Langmuir model to the data. Van't Hoff nonlinear analysis was conducted, determining the standard variations of Gibbs free energy, enthalpy and entropy for the process. The adsorbent produced showed ED equal to 15.08 L · kg⁻¹, S of 11.99 kg · kg⁻¹, 90% of total porosity, CTI of 371.44 10⁻³ molNa⁺ · kg⁻¹ dry cryogen. The PCZ value equal to 4.5 confirms that the adsorbent has a cationic nature. The results of the FTIR spectra and TGA profile indicate differences between the control and functionalized matrix, demonstrating that it was possible to obtain the cationic exchanger. From the XRD analysis, there was no change in the crystalline structure of the matrix after functionalization, which remained amorphous. From the adsorption isotherms, there was an increase in adsorptive capacity with an increase in temperature up to 40 °C, with an observed maximum of 1055.87 mg · g⁻¹, with a decrease in adsorptive capacity from 40 °C to 50 °C, possibly due to conformational changes in lysozyme. The adsorption process was spontaneous, being directed enthalpically at lower temperatures and entropically directed at higher temperatures.

Keywords: ion exchange, acrylic acid, isotherm, van't Hoff.

¹ Advisor: Fontan, R.C.I. DSc. UESB. Co-advisers: Bonomo, R.C.F. DSc. UESB; Veríssimo. L.A.A. DSc. UFLA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do mecanismo de adsorção pelos tipos de troca iônica.	4
Figura 2. Exemplo dos quatro tipos de estrutura segundo a classificação de Flory.	5
Figura 3. Reação de formação de ligações cruzadas das cadeias de acrilamida.	6
Figura 4. Representação da criogelificação: (a) Preparo da solução (b) processo de congelamento (c) descongelamento e desenvolvimento de poros interconectos.	6
Figura 5. Representação da fórmula molecular do ácido acrílico.	7
Figura 6. Níveis estruturais das proteínas.	10
Figura 7. Estrutura da lisozima.	12
Figura 8. Classificação das isotermas de adsorção segundo a IUPAC.	13
Figura 9. Modelos de isotermas de adsorção: Linear, Freundlich e Langmuir.	14
Figura 10. (A) Criogel desidratado sem ativação; (B) Criogel Hidratado sem ativação; (C) Criogel desidratado ativado; (D) Criogel hidratado ativado.	24
Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura dos criogéis controle e ativado. a) Controle com zoom de 200x; b) Controle 800x; c) Ativados 200x; d) Ativados 800x.	26
Figura 12. Análise de Ponto de Carga Zero.	27
Figura 13. Espectros de FTIR dos criogéis elaborados. (a) Todo espectro. (b) Parte do Espectro de FTIR de 500 – 2000 cm ⁻¹	28
Figura 14. Difratoogramas dos criogéis controle e ativado.	29
Figura 15. Análise de TG e DTA dos criogéis elaborados. (a) criogéis sem enxertia (b) criogéis com o processo de enxertia.	32
Figura 16. Isotermas de adsorção de Lisozima no trocador catiônico produzido.	33
Figura 17. Figura 16. Gráfico de Van't Hoff para análise não linear.	35
Figura 18. Propriedades termodinâmicas em função da temperatura no processo de adsorção da Lisozima.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físicos obtidos pela caracterização da síntese dos criogeis.....	25
Tabela 2. Parâmetros ajustados do modelo de Langmuir na adsorção de Lisozima.	34
Tabela 3. Propriedades termodinâmicas do processo de adsorção.	35

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia consiste em um conjunto de métodos que permitem a separação de compostos muito semelhantes em misturas complexas. As técnicas cromatográficas exercem fundamental papel para procedimentos de purificação de biomoléculas, estão em crescente desenvolvimento e são utilizadas por diversos setores, como indústrias farmacêuticas e alimentícia (NASCIMENTO et al., 2014).

Dentre os vários métodos de separação por cromatografia, aqueles que incluem técnicas adsorptivas são os mais utilizados, encontrando maior diversidade de aplicações. Entre esses métodos destaca-se cromatografia por troca iônica, que se baseia no equilíbrio de troca entre íons em solução e íons de mesma carga na superfície de um sólido insolúvel (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2008). É usualmente utilizada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas. A separação por cromatografia é também utilizada com efetividade pelas indústrias bioquímicas e farmacêuticas para o escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (ZUÑIGA et al., 2003; FONTAN 2013).

Para a separação cromatográfica de biomoléculas, têm-se propagado o uso de monólitos macroporosos, pois possuem a vantagem de, devido à estrutura macroporosa, permitir o uso de alimentação fluida contendo material particulado, retirando a necessidade de clarificação inicial do meio, reduzindo assim o número de etapas do processo (SILVA, 2018). Entre os tipos de adsorventes monolíticos usados estão os criogéis, caracterizados por possuírem um corpo único e elástico como uma esponja em condições operacionais. Os criogéis monolíticos poliméricos, são matrizes cromatográficas com estrutura de poros grandes e interconectados formados quando submetidos a temperaturas de criogelificação (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; GONÇALVES et al., 2017; PRIVAR et al., 2018).

Essas matrizes podem ser utilizadas em vários processos de separação e podem ser produzidas com uma diversidade de formatos, que incluem colunas, discos, capilares, microchips. Possuem porosidade, estabilidade mecânica e química. Sua superfície pode, além disso, ser quimicamente modificada por acoplamento de diferentes ligantes, permitindo sua funcionalização para diferentes usos na área de biosseparação (PFAUNMILLER; PAULEMOND; DUPPER, 2013).

O conhecimento dessas matrizes cromatográficas é necessário para otimização dos processos de adsorção. A caracterização dos criogéis permite avaliar a dinâmica de escoamento em seu interior, o processo de interação dos sítios ativos com as moléculas presentes na solução a ser purificada, visando a predição desse comportamento e padronização da purificação de biocompostos (FONTAN, 2013).

Para determinar a capacidade de adsorção e os fenômenos que ocorrem durante esse processo, é necessário utilizar métodos que avaliam quantitativamente todo processo. A determinação das

isotermas de adsorção e o posterior ajuste a um modelo teórico, como o modelo de Langmuir, permite explicar o fenômeno da adsorção. A partir desse modelo é possível determinar os parâmetros termodinâmicos que ocorrem na adsorção, pois são importantes para compreensão da performance e potencial de aplicação de um adsorvente. Portanto, conhecendo os parâmetros termodinâmicos, é possível a obtenção de informações sobre os fenômenos que ocorrem no processo de adsorção (CARVALHO, 2010; TADINNI, 2016).

Dentro deste contexto, foi produzida e caracterizada uma matriz adsorvente polimérica monolítica funcionalizada com ácido acrílico, para aplicação como um trocador catiônico e avaliou-se o comportamento termodinâmico da adsorção de lisozima em função da temperatura, visando compreender os fenômenos envolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Técnicas Cromatográficas

As técnicas cromatográficas estão presentes na maioria dos processos de purificação e se destacam por apresentarem alta resolução comparadas a outras técnicas. As separações por cromatografia consistem na partição do soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Usualmente, a fase estacionária é sólida, formada por uma matriz de partículas empacotadas em coluna de forma tubular. A fase móvel que contém a mistura de componentes a serem separados, passa através da coluna e dependendo da técnica cromatográfica utilizada, interação hidrofóbica, por troca iônica entre outros, haverá separação dos componentes desejados (ZUÑIGA et al., 2003).

Para procedimentos de purificação, seja para fins farmacêuticos ou alimentícios, as técnicas cromatográficas exercem um importante papel e estão em constante desenvolvimento. A adsorção como método de separação e purificação tem por fundamento a concentração de substâncias presentes em fluidos na superfície de alguns sólidos (NASCIMENTO et al., 2014). As forças atrativas presentes na superfície dos adsorventes, sólidos utilizados para o processo de adsorção, irão capturar o adsorvato, que são moléculas de interesse, presentes na solução na fase fluida. Esta operação também se destaca por seu alto grau de recuperação dos compostos adsorvidos e elevada especificidade para separação de moléculas (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016).

A cromatografia por troca iônica baseia-se na adsorção de moléculas com carga líquida em uma superfície de cargas elétricas opostas. Essa técnica tem grande importância ao se trabalhar com macromoléculas, devido à seletividade, capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas e causar menos danos aos compostos (ZUÑIGA et al., 2003; FONTAN 2013).

Na cromatografia de adsorção por troca iônica, a separação ocorre por atração eletrostática, podendo ser utilizados três tipos de trocadores: Aniônico, catiônico e anfótero (Figura 1). Os trocadores aniônicos são caracterizados por ter na superfície cargas positivas permitindo capturar os íons negativos contidos em fase móvel. De forma contrária ao trocador aniônico, os trocadores catiônicos têm a capacidade de reter compostos com cargas positivas presentes no fluido, devido à presença de ânions na sua superfície. Os trocadores anfóteros têm em sua superfície cargas tanto positivas quanto negativas, podendo assim adsorver tanto cátions quanto ânions (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016).

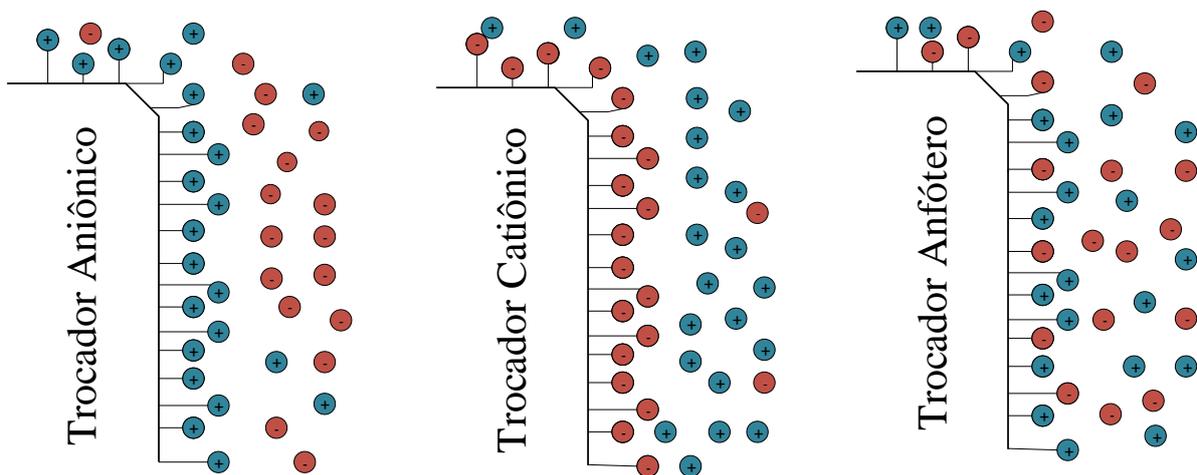


Figura 1. Representação do mecanismo de adsorção pelos tipos de troca iônica.

Fonte: Modificado de Fontan; Bonomo e Coimbra, (2016).

2.2 Criogéis monolíticos poliméricos

O gel é definido como uma estrutura de partículas, sejam elas coloidais ou cadeias poliméricas que imobiliza a fase líquida em seus interstícios. Géis poliméricos são geralmente preparados a partir de soluções onde promove-se reações de polimerização. O processo de geleificação começa com uma mistura em polimerização composta de monômeros, solventes e um iniciador. Essa mistura é transferida para um molde, como uma coluna ou capilar, e posteriormente polimerizado. A polimerização ocorre através das reações de hidrólise e subsequente condensação das espécies hidratadas, obtendo a formação de partículas coloidais ou cadeias poliméricas lineares (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995; CARVALHO, 2010; NORDBORG et al., 2011).

A estrutura de um gel pode se apresentar com diferentes conformações, dependendo das características físico-químicas da dispersão coloidal. Segundo a classificação de Flory os géis são divididos em quatro classes principais (Figura 2) (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995):

1. Estruturas lamelares ordenadas, incluindo géis mesofásicos (a - Montmorilonita);
2. Redes poliméricas covalentes de estrutura desordenada (b - Poliácridamida);
3. Redes poliméricas formadas através de agregação física, que são predominantemente desordenadas, mas com regiões de ordem local (c - Gelatina);
4. Particulados com estruturas desordenadas (d - Sílica).

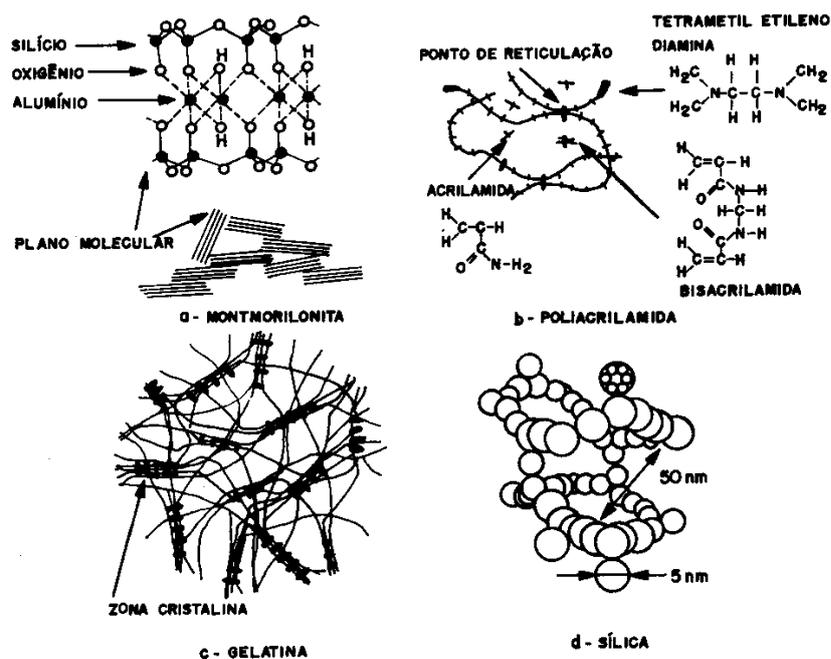


Figura 2. Exemplo dos quatro tipos de estrutura segundo a classificação de Flory.

Fonte: Hiratsuka; Santilli; Pulcinelli, (1995).

Os criogéis são géis poliméricos formados através de precursores monoméricos ou poliméricos preparados por polimerização de radicais livres em condições de congelamento. Quando descongelados, o gelo e os cristais dos solventes deixam espaços vazios entre as cadeias poliméricas formando poros com tamanhos que podem variar de 10 até 200 μm . Estes formam uma rede macroporosa interligada que permite a passagem desobstruída de biomoléculas. Estas matrizes podem ser produzidas com variedades de formatos que incluem colunas, além de discos, capilares, microchips (PFAUNMILLER; PAULEMOND; DUPPER, 2013; MÓL et al., 2019).

Por apresentarem alta porosidade, estabilidade mecânica e química, os criogéis foram introduzidos como matrizes de gel cromatográficas, sendo utilizadas para a imobilização de células e biomoléculas. Estas matrizes ainda apresentam características como: corpo único, elástico como uma esponja, de coloração opaca (PFAUNMILLER; PAULEMOND; DUPPER, 2013; GONÇALVES et al., 2017; PRIVAR et al., 2018).

A geleificação criotrópica também permite a preparação de criogéis com diferentes morfologias. Estudos demonstram que, concentração de monômero, grau de reticulação e temperatura de congelamento tem efeito sobre a microestrutura do monólito, podendo formar estruturas diferentes. A concentração de monômeros por exemplo interfere no tamanho dos poros produzidos (HWANG; ZHANG; VARGHESE, 2010).

Entre os possíveis polímeros empregados na síntese de monólitos poliméricos, a poliacrilamida é amplamente utilizada. Criogéis de poliacrilamida são obtidos da polimerização de moléculas de acrilamida (AAm) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-

acrilamida (BAAm), juntamente com o persulfato de amônio (APS) que, quando diluído formará radicais livres que irá reagir com as moléculas de acrilamida e produzirá longa cadeia polimérica como representado na Figura 3 (CARVALHO et al., 2014).

Outro componente também utilizado em solução é o N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED) este acelera a taxa de formação de radicais livres do APS. Os monólitos assim produzidos são chamados de criogéis de poliacrilamida pAAm, e sua utilização é descrita por diversos autores (PILEVA et. al., 2004; YAO et al., 2006; YAO et. al., 2007; BILLANKANTI; FEE, 2009; LUDING et. al., 2011; DRAGAN et al., 2012; CARVLHO et. al., 2014; OLANTUJI et. al., 2016). O processo de criogelificação está representado na Figura 4.

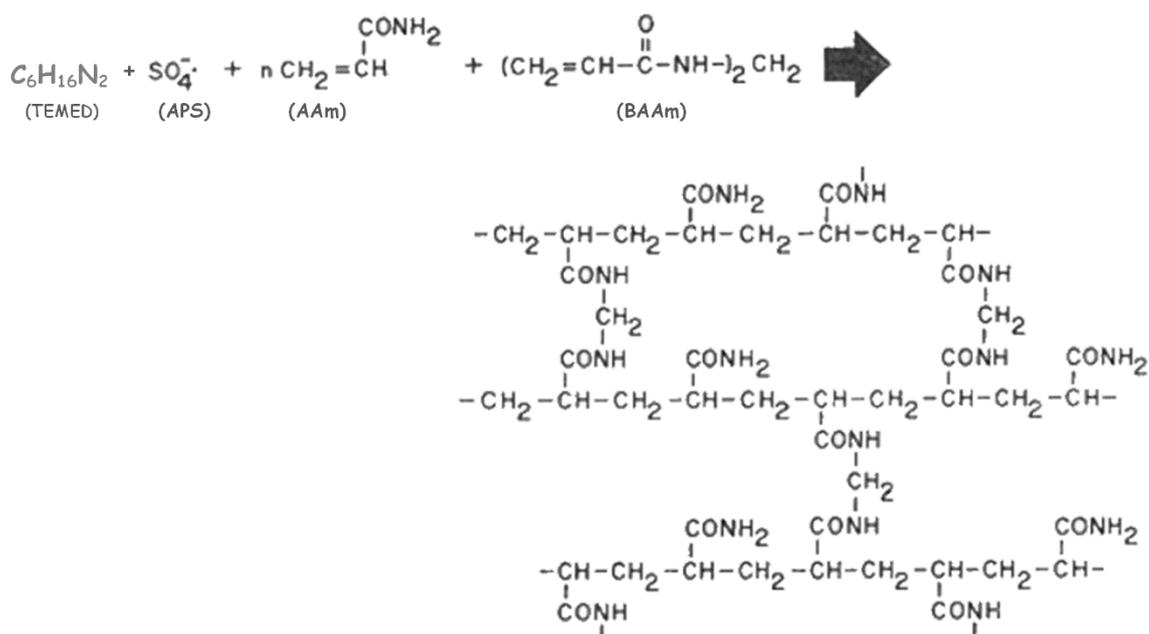


Figura 3. Reação de formação de ligações cruzadas das cadeias de acrilamida.

Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2014).

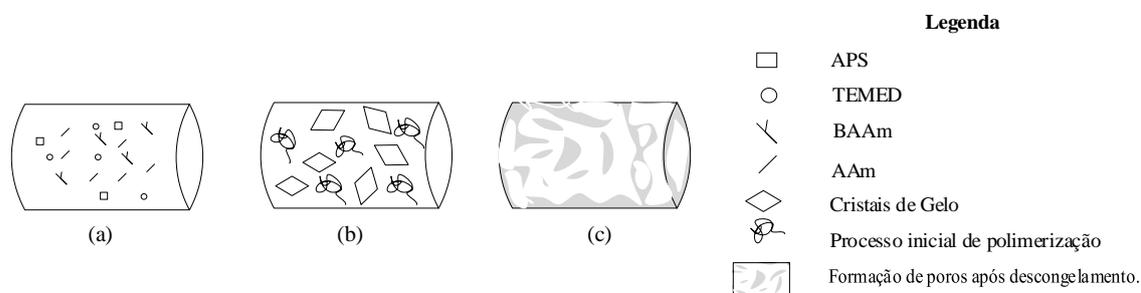


Figura 4. Representação da criogelificação: (a) Preparo da solução (b) processo de congelamento (c) descongelamento e desenvolvimento de poros interconecto.

Fonte: Adaptado de Plieva et al. (2004) e Carvalho et al. (2013).

2.3 Modificações na superfície dos suportes cromatográficos

Nos criogéis, os monômeros (AAM e BAAM) compõem parte integral do monólito formado, assim, suas características podem influenciar no material resultante, incluindo a funcionalidade da superfície. Devido à crescente demanda de leitos monolíticos, diferentes aplicações requerem acesso a novos tipos de criogéis com propriedades aprimoradas. Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos monólitos como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, diversas abordagens e técnicas de modificação de estrutura dos criogéis para a imobilização têm sido reportadas (SAVINA et al., 2005; NORDBORG et al., 2011).

As propriedades dos criogéis podem ser modificadas por meio da introdução de grupos funcionais na estrutura do polímero. Tais modificações de estrutura dos criogéis podem ser químicas ou físicas, visando aumentar a eficiência dos processos de separação. Por apresentarem alta porosidade, os criogéis possuem área superficial baixa sendo, portanto, importante a sua funcionalização para obter maior especificidade do criogel com a molécula de interesse. Uma técnica de interesse é a enxertia sobre a estrutura superficial polimérica do gel através de um agente iniciador. Esta é uma técnica conhecida como grafting from em que os grupos enxertados podem ser obtidos via ligação química entre grupos reativos na superfície do gel e grupos terminais reativos do polímero pré-formado, é também, uma poderosa alternativa para controlar a densidade e a espessura dos poros do criogel (SAVINA et al., 2005a; NORDBORG et al., 2011).

Os suportes de criogel podem ser funcionalizados de várias formas, com o emprego de diferentes compostos, como a ácido 3-mercaptopropano sulfônico, ácido húmico, ácido acrílico, dietil-laminoetanol, poli (metacrilato de carboxibetaína) e ácido iminodiacético (HWANG; ZHANG; VARCHESE, 2010; GONÇALVES et al., 2017; GOUVEN et al., 2018). A funcionalização de um monólito polimérico para o uso em troca iônica pode ser realizada de muitas maneiras, como por exemplo, por incorporação direta, ou seja, funcionalização durante a polimerização do monólito ou alguma forma de modificação pós-polimerização. Estudos com polimerização de enxertia iniciada com diperiodatocuprato de potássio ($K_5[Cu(HIO_6)_2]$) indicam este como um método eficiente para enxertar ácido acrílico (AAc) (Figura 5) em géis de poliacrilamida supermacroporosos (SAVINA et al., 2005a; NORDBORG et al., 2011). Algumas técnicas de caracterização dos criogéis são utilizadas para compreender as superfícies e suas modificações.

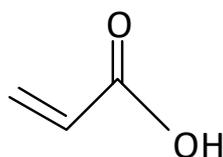


Figura 5. Representação da fórmula molecular do ácido acrílico.

Fonte: Adaptado de Gascue et al. (2017).

2.4 Caracterização de criogéis

Diferentes técnicas de caracterização de materiais poliméricos são utilizadas para melhor conhecimento estrutural dos monólitos. Conhecer a estrutura do criogel permite dimensionar o material a dinâmica do escoamento de fluidos em seu interior, bem como o processo de interação dos sítios ativos com as moléculas presentes na solução a ser purificada, visando a predição desse comportamento em um aumento de escala do processo analisado e na padronização da purificação de biocompostos (FONTAN et al. 2018). Portanto, nos próximos tópicos serão abordados, de forma prática, algumas das análises de caracterização dos criogéis.

2.4.1. *Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR*

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite a análise de compostos orgânicos a partir de vibrações características de cada grupo funcional, provocando o aparecimento de bandas no espectro infravermelho em comprimento de onda específicas, que também são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos. Portanto, um espectro de infravermelho contém mais informação do que apenas os valores de posição ou de absorção de alguns picos, atuando como uma impressão digital de uma amostra quando utilizado integralmente. A análise de FTIR é, também, uma ferramenta para análise quantitativa devido as intensidades de absorção das bandas no espectro serem proporcionais à sua concentração (SOUZA; POPPI, 2012; RUSCHEL; SAMIOS; FERRÃO 2014).

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) vem sendo utilizada para avaliação dos grupos funcionais presentes e verificação do processo de enxertia dos criogéis produzidos, assim fornecendo mais informações sobre a sua estrutura (GONÇALVES, et al., 2016; BAYSAL, et al., 2018; NASCIMENTO, et al., 2019; AKAPINAR et al., 2020). Segundo Samistrato et al. (2009) a técnica da espectroscopia no infravermelho tem sido indicada para substâncias como uma eficiente ferramenta no controle de qualidade de processos industriais e se destacam por apresentar natureza não destrutiva e não invasiva. Esta técnica também apresenta rapidez, baixo custo e aplicabilidade abrangente principalmente para moléculas contendo ligações C-H, N-H, S-H e O-H (SAMISTRATO, et., al., 2009).

2.4.2. *Análise Termogravimétrica (TGA)*

Dentre as análises de caracterização, o estudo de degradação ou perda de massa é necessário para entender o comportamento e estrutura das matrizes cromatográficas em estudo. Essa análise é utilizada na caracterização estrutural e estudo da estabilidade térmica dos criogéis, sendo descrita por vários autores (REICHELTL, et. al., 2014; SHAINER, 2018; JAIN et. al., 2019; MÓL, et. al., 2019).

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica que gera uma curva de decomposição térmica em função da temperatura que acompanha a variação da massa da amostra em função da programação de temperatura. No entanto, a TGA sozinha não é suficiente para interpretar a perda de peso da amostra (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

2.4.3. *Difração de raio-X*

A técnica de difração de raios-X vem sendo utilizada na caracterização de criogéis a fim de entender sua morfologia estrutural (GUN'KO et. al., 2013; KUROZUMI et. al., 2015; YANG et. al., 2018; JAIN et al., 2019). Essa técnica representa o movimento de interação entre um feixe de raios-X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material relacionado ao espalhamento dos raios. A difração de raios-X consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados (GOBBO, 2009).

O feixe difratado, transformado pelo detector em forma de contagem e pontos é normalmente expresso através de picos que se destacam em uma linha de base, registrados num espectro de intensidade versus o ângulo de 2θ constituindo um padrão difratométrico ou difratograma. As intensidades obtidas em ângulos de 2θ representadas através de picos nos difratogramas correspondem à difração do feixe incidente por um determinado conjunto de planos de cristal que possuem mesma distância interplanar. (BLEICHER; SASAKI, 2000; GOBBO, 2009).

2.4.4. *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Utilizada para obter informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A microscopia eletrônica de varredura é um instrumento disponível para a observação e análise de características microestruturais de sólidos e vem sendo utilizado em vários estudos de caracterização de criogéis (PALKOVSKÁ et al, 2017; SAHINER, 2018; YANG et al 2020). Este instrumento utiliza-se de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. O feixe é guiado por um sistema de bobinas de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. Através da interação entre o feixe incidente com a superfície da amostra resulta no sinal de imagem. O sinal recolhido pelo detector utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação em um sinal de vídeo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

2.5 Proteínas

Entre os diferentes compostos macromoleculares com potencial aplicação em diversos segmentos estão as proteínas. Proteínas atuam como componentes primordiais das células vivas e são constituídas de sequências de aminoácidos descritas em hierarquias complexas. Elas são estruturadas em quatro níveis com formação peptídica denominadas: estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária (Figura 6) (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; RIBEIRO; SERAVALLI, 2008).

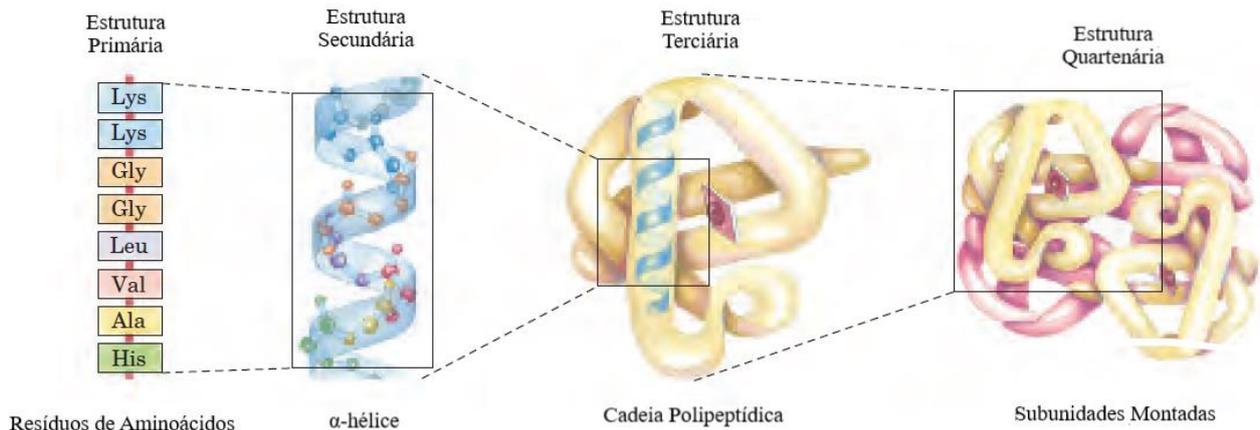


Figura 6. Níveis estruturais das proteínas.

Fonte: Nelson; Lehninger; Cox, 2006.

Os diferentes níveis estruturais de uma proteína estão relacionados com o arranjo espacial resultante das posições que os diferentes grupos presentes na molécula assumem, chamada conformação. A estrutura primária é formada por uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Cada proteína contém uma sequência própria de resíduos de aminoácidos. Portanto, as diferenças na estrutura primária determinam como será o enovelamento em uma única estrutura tridimensional, determinando assim, a função da proteína. A estrutura secundária é entendida por arranjos estáveis de resíduos de aminoácidos que ao se enrolar ou dobrar sobre si mesma pode adquirir conformações, padrões estruturais e estes podem ser espiralados, como uma α -hélice. A estrutura terciária refere-se a aspectos de curvatura e enovelamento tridimensional particular de uma cadeia polipeptídica para uma forma compacta e com maior estabilidade. A estrutura adquirida dá origem a proteínas com formatos ligeiramente esféricos estabilizadas por forças intermoleculares como: ligações de enxofre e de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de Van der Waals e interações eletrostáticas. A estrutura quaternária, por sua vez, é compreendida através do arranjo espacial quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, que são estabilizadas pelas mesmas forças que consolidam a estrutura terciária, com exceção das ligações de enxofre (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

A alteração da estrutura tridimensional, suficiente para causar perda da sua função, é denominada desnaturação e pode ser reversível ou não, sendo causada por agentes químicos ou físicos. Não é necessário que haja completo desenovelamento da estrutura para que ocorra a desnaturação, em muitas condições ocorre em um conjunto de estados parcialmente enovelados. Grande parte das proteínas podem ser desnaturadas pelo calor afetando as interações fracas e ligações de hidrogênio de maneira mais complexa. O calor é o agente físico mais comum, responsável pela alteração conformacional de proteínas. As proteínas podem ainda ser desnaturadas por outros eventos extremos como: ação de certos solventes orgânicos (acetona ou álcool), certos solutos (ureia, cloreto de guanidina ou detergentes) e condições de pH. Extremos de pH alteram a carga líquida nas proteínas causando repulsões eletrostáticas e ruptura de algumas ligações de hidrogênio (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; SILVA; TASSI; PASCOAL, 2016).

O comportamento de uma proteína em soluções de pH ácido ou básico é determinado em grande parte pelo número e pela natureza dos grupos ionizáveis nos radicais dos resíduos de aminoácidos. As proteínas possuem pontos isoelétricos característicos nos quais elas se comportam como íons dipolares, possuindo igual número de cargas positivas e negativas. O pH isoelétrico depende dos valores de pK dos grupos ionizáveis dos radicais. O pH isoelétrico será maior que 7 se a proteína contiver maior número de aminoácidos básicos que ácidos e será menor que 7 se o número de aminoácidos ácidos for maior que o de básicos. Em valores de pH menores que o ponto isoelétrico, a proteína apresenta carga líquida positiva e vice-versa (RIBEIRO; SERAVALLI, 2008; NELSON; LEHNINGER; COX, 2008; SILVA; TASSI; PASCOAL, 2016).

As proteínas podem apresentar diversas funções biológicas como estrutural reguladoras, transportadoras, defesas, armazenamento e como catalizadoras (enzimas). As enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, que possuem capacidade catalítica que dependem da integridade da sua conformação (RIBEIRO; SERAVALLI, 2008; NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

2.5.1. *Lisozima*

A lisozima é uma enzima abundante na clara do ovo de galinhas, cerca de 3,4% é encontrada em sua composição. (MINE; KOVACS-NOLAN, 2004). Tal proteína é também encontrada em outros organismos vivos, como, insetos, nematoides, répteis, mamíferos, bem como vírus e plantas, além de compor variados tecidos e secreções, como lágrimas, saliva, leite, músculos e órgãos (ALTINTAS et al., 2007; BASAR et al., 2007; THAMMASIRIRAK et al., 2006). O interesse por essa proteína iniciou-se devido à sua ação enzimática sobre bactérias gram-positivas e vírus, conferindo atividade antimicrobiana em vários alimentos. A ação enzimática da lisozima resulta na clivagem de

polissacarídeos, ligação glicosídica β -1, 4 entre N-acetilglicosamina e ácido murâmico na parede celular das bactérias (SGARBIERI, 1996; CONTE; BRESCIA; DEL NOBILE, 2011).

É utilizada como agente antimicrobiano em produtos alimentares pasteurizados e esterilizados, o que inclui sua ação contra patógenos importantes, como clostrídios termofílicos, algumas cepas de *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (MAKKI; DURANCE, 1996). Sua utilização ainda reside na preservação de queijos a fim de aumentar a vida de prateleira (CONTE; BRESCIA; DEL NOBILE, 2011; ÁVILA et al., 2014), preservação de produtos cárneos (GILL; HOLLEY, 2000), na indústria de vinhos (LINBURDI et al., 2014; CARRILLO et al., 2014), cervejas (SILVETTI et al., 2010) e na incorporação em embalagens antimicrobianas, filmes comestíveis e biodegradáveis (BARBIROLI; FARRIS; ROLLINI, 2016; OZER et al., 2016), tais estratégias tem como foco a utilização de compostos antimicrobianos naturais (GYAWALI; IBRAHIN, 2014).

A cadeia polipeptídica desta proteína é composta por três componentes estruturais, sendo o primeiro componente formado por três extensões de α -hélice, o segundo é uma pregueada antiparalela e o terceiro uma sequência com uma dobra irregular e possui massa molar igual a 14300 Da (Figura 7). (BLAKE et al., 1967; PHILLIPS, 1967; BARBIROLI; FARRIS; ROLLINI, 2016). É composta de 129 aminoácidos, entre os quais apresentam resíduos de tirosina, triptofano, metionina e cisteína (TORREGGIANI et al., 2005).



Figura 7. Estrutura da lisozima.

Fonte: Barbiroli; Farris; Rollini (2016).

Além do interesse na utilização da lisozima nas diversas aplicações já citadas, seu uso como proteína-modelo para a avaliação de novos procedimentos de purificação e estudos termodinâmicos é frequente, uma vez que sua estrutura já é bem elucidada (MÓL et al., 2017; VERÍSSIMO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). A lisozima é comumente utilizada em estudos de adsorção por troca catiônica, por apresentar caráter básico devido ao ponto isoelétrico igual a 11, assim podendo usufruir de ampla faixa de pH tampão para a adsorção por esse princípio. Tal utilização é descrita por vários autores (CHEN et al., 2008; LUDING et al., 2011; GUAN et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

2.6 Isotermas de Adsorção

O equilíbrio de adsorção é um conceito dinâmico adotado quando a taxa em que moléculas se adsorvem na superfície sólida é igual à taxa de dessorção das mesmas. Ele é geralmente um requisito essencial para obtenção de informações relevantes sobre análise de um processo de separação por adsorção. A condição de equilíbrio é representada graficamente na forma de isotermas de sorção, relacionando as concentrações de um soluto nas fases fluida e sólida, a uma temperatura constante (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016; NASCIMENTO et al., 2014).

Segundo Nascimento et al. (2014), a obtenção de uma isoterma de adsorção em batelada é um processo em que uma massa de adsorvente é adicionada em um determinado volume (V) de soluções com concentrações iniciais (C_0) diferentes e conhecidas. Quando o equilíbrio de adsorção é atingido, temos a concentração final de soluto na solução em equilíbrio ($C_e = \text{g ou mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e a capacidade adsortiva do adsorvente (q) onde a sua unidade é dada por massa ou mols de adsorvato, por unidade de massa de adsorvente. Para determinação de isotermas de adsorção por sistemas em batelada e a capacidade de adsorção (q) pode ser expressa na Equação 1:

$$q = \frac{(C_0 - C_e) V}{m} \quad (1)$$

Após as determinações de q e C_e , pode-se plotar um gráfico dos valores de q versus C_e obtendo assim uma curva de isoterma de adsorção. Segundo a IUPAC existem seis tipos de isotermas para processos de adsorção (Figura 8) (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016).

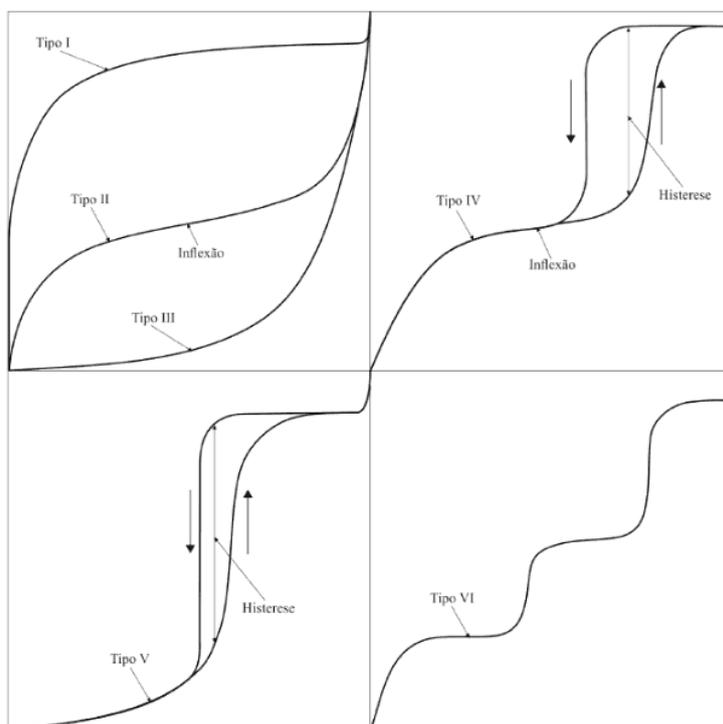


Figura 8. Classificação das isotermas de adsorção segundo a IUPAC

Fonte: Fontan; Bonomo e Coimbra, 2016.

A isoterma tipo I é correspondente à adsorção em monocamada e para adsorção física ela indica a presença de microporos. A curva tipo II representa indicativo do processo de adsorção em multicamadas e sugere a presença de superfícies não porosas ou macroporosa no sólido. A isoterma tipo III origina-se de superfícies não porosas ou macroporosa que interagem muito fracamente com as moléculas de adsorvente. A isoterma tipo IV fornece informações úteis sobre a estrutura dos mesoporos por meio da histerese, que é a não-sobreposição de pelo menos parte das curvas de adsorção e dessorção. A isoterma tipo V é parecida com a curva tipo IV, mas esta contém interações muito fracas entre o adsorvato e adsorvente. As isotermas do tipo VI ocorrem com substratos não porosos, de superfície quase uniforme, formando multicamadas (FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016).

Há vários modelos de isotermas de adsorção que podem ser utilizados para descrever o equilíbrio de um soluto entre a fase fluida e o adsorvente. As mais utilizadas são: isotermas linear, isotermas de Freundlich e as isotermas de Langmuir (Figura 9).

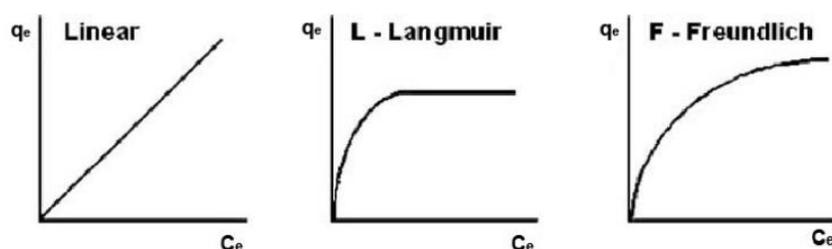


Figura 9. Modelos de isotermas de adsorção: Linear, Freundlich e Langmuir.

Fonte: Modificado de Moreno-Castilha, 2004.

O modelo de Langmuir é um dos mais amplamente utilizados para representação de processos de adsorção (BONOMO et al., 2006; FONTAN et al., 2013; ENAYATPOUR et al., 2017; SOLEYMANI; AKBARI; MAHDAVINIA, 2019; ZHENG et al., 2020). Esse modelo considera a adsorção em monocamada, de modo homogêneo, com sítios que comportam somente uma molécula adsorvida. Este também assume a reversibilidade do processo, número definido de sítios definidos que possuem energia de interação equivalente e as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras (NASCIMENTO et al., 2014; FONTAN; BONOMO; COIMBRA, 2016). A equação de Langmuir é apresentada na equação:

$$q = \frac{q_{m\acute{a}x} \cdot C}{K_d + C} \quad (2)$$

Onde: q é a quantidade de soluto adsorvido ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) no equilíbrio, $q_{m\acute{a}x}$ é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), K_d é relacionada à constante de dissociação ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$) e C é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). O processo de troca iônica envolve efetivamente a competição entre diferentes espécies iônicas pelos sítios ativos na superfície

dos adsorventes carregados positivamente ou negativamente. Este fato é importante e deverá ser considerado, portanto, alterando o modo de utilização dos modelos tradicionalmente empregados na adsorção.

2.7 Propriedades Termodinâmicas

Avaliar as propriedades termodinâmicas dos processos de adsorção é de grande importância para compreendê-los melhor. A variação de energia livre de Gibbs indica a espontaneidade do processo, a variação da entalpia explica se o processo é exotérmico ou endotérmico e a variação da entropia está associada ao número de configurações possíveis de íons, átomos e moléculas em um sistema. Valores de variação de entalpia padrão (ΔH^0), variação de entropia padrão (ΔS^0) e variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0) podem ser determinados de diversas maneiras (SOUZA et al., 2014).

Uma maneira usual de se estimar o valor de ΔG^0 é a partir da relação de equilíbrio obtida da isoterma de adsorção (equação 3) (GERSTNER et al., 1994).

$$\Delta G_{TI}^0 = -RT \ln K_{TI} \quad (3)$$

Onde: ΔG_{TI}^0 é a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) para o processo de troca iônica, 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_{TI} a constante de equilíbrio (adimensional) obtida do modelo de Langmuir.

O uso das técnicas de calorimetria são as mais adequadas para a determinação da variação de entalpia padrão, pois fornecem resultados experimentais com alta precisão e repetibilidade (DIETERLE et al., 2008). No entanto, correlações matemáticas podem prover informações também precisas quando não a disponibilização do uso da calorimetria. Entre elas, a análise de Van't Hoff, que pode ser expressa na forma linear (equação 4) e não-linear (equação 5) (LIN et al., 2002; BONOMO et al. 2006; BAYRAMOĞLU et al., 2007):

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \varphi \quad (4)$$

Onde: K é a constante de equilíbrio (adimensional) do processo de adsorção, ΔH_{TI}^0 e ΔS_{TI}^0 são, respectivamente, a variação de entalpia padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) e a variação de entropia padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) para o processo termodinâmico; φ é uma constante do sistema que depende da razão de fase na coluna e T é a temperatura.

Deste modo, os valores de ΔH_{TI}^0 podem ser calculados a partir do coeficiente angular e linear da reta $\ln Kc$ versus $1/T$, enquanto que os valores para o processo de adsorção podem ser obtidos através de valores de K_{TI} . A partir da análise linear de Van't Hoff pode-se estimar um único valor médio para a ΔH_{TI}^0 e outro para ΔS_{TI}^0 , na faixa de temperatura avaliada, para cada valor de força iônica estudada ou para adsorção (FONTAN, 2013).

Admitindo dependência de ΔH_{TI}^0 e ΔS_{TI}^0 quanto à temperatura, a curva gerada de $\ln k$ versus $1/T$ fornece relação não linear dada pela expressão polinomial de segundo grau (equação 5) (SOUZA et al, 2014; BONOMO et al, 2006) :

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

Onde a e b são parâmetros empíricos da equação (5) e os outros componentes representa o mesmo dos anteriores.

Derivando a equação (4) em relação à $1/T$ tem-se a equação (6):

$$\frac{\partial \ln k}{\partial \frac{1}{T}} = -\frac{\Delta H_{TI}^0}{R} \quad (6)$$

derivando também a equação 5, em relação a $1/T$, obtém-se:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial \frac{1}{T}} = b + 2 \frac{c}{RT} \quad (7)$$

dessa forma, igualando as expressões (6) e (7) para conclui-se a equação 8:

$$\Delta H_{TI}^0 = -R \left(b + 2 \frac{c}{T} \right) \quad (8)$$

portanto, pode-se determinar a entalpia de adsorção em função da temperatura por meio da equação 8. A entropia de adsorção pode ser então adquirida pela relação de Gibbs-Helmholtz (equação 9):

$$\Delta G_{TI}^0 = \Delta H_{TI}^0 - T\Delta S_{TI}^0 \quad (9)$$

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produzir um adsorvente monolítico macroporoso voltado ao processo de purificação de biomoléculas por troca catiônica e o estudo termodinâmico do processo de adsorção de lisozima no mesmo.

3.2. Objetivos Específicos

São objetivos específicos neste trabalho:

- Produzir um adsorvente polimérico macroporoso monolítico, obtido pelo processo de criogeificação e modificado quimicamente para ser utilizado em processos que envolvam trocadores catiônicos, sendo o ácido acrílico o grupo ativo do mesmo;
- Caracterizar os materiais produzidos;
- Determinar as isotermas de adsorção do adsorvente produzido utilizando a lisozima como sistema modelo, avaliando o efeito da temperatura;
- Realizar o estudo termodinâmico do processo de adsorção da Lisozima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes necessários para o desenvolvimento desse trabalho possuíram, no mínimo, grau analítico PA-ACS. Foram utilizados acrilamida (AAm), bis-acrilamida (BAAm), persulfato de amônio (APS), N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamino (TEMED) e ácido acrílico (AAc). A proteína-modelo utilizada para adsorção foi a lisozima da clara de ovo (Sigma). Os demais reagentes e equipamentos serão descritos ao longo do detalhamento das metodologias.

4.2 Síntese dos criogéis

Para a síntese dos criogéis foi utilizada metodologia adaptada de KUMAR et al. (2006) e YAO et al. (2006). Uma solução (100 mL) contendo 7% de monômeros foi preparada contendo AAm (5,6 g), BAAm (1,4 g), APS (140 μ) e TEMED (91 μ). A solução foi vertida em seringas plásticas de 5 mL, seladas e colocadas em banho ultratermostático (Quimis) por 24 h à -12 °C. Posteriormente os criogéis foram colocados em uma geladeira para descongelar durante 4 horas, logo após secos em estufa a 60 °C ainda nas seringas por 24 horas e posteriormente armazenado até o uso.

4.3 Solução de Diperiodatocuprato de Potássio

Uma solução de Diperiodatocuprato de Potássio - $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ com concentração de 0,0562 M foi preparada de acordo com Savina et. al., (2005). Em 200 mL de água destilada foram adicionados $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (3,54 g), KIO_4 (6,82 g), $K_2S_2O_8$ (2,20 g) e KOH (9,00 g) e levou o sistema à fervura por 40 min. Posteriormente, em temperatura ambiente (± 25 °C), a mistura foi filtrada e o filtrado diluído para 250 mL com água destilada em um balão volumétrico.

4.4 Ativação e Enxertia

Os criogéis produzidos foram ativados com Diperiodato Cuprato de Potássio - $K_5[Cu(HIO_6)_2]$, conforme metodologia adaptada de SAVINA et al. (2005). Para a ativação dos criogéis, foi utilizada uma solução ativadora de uma mistura das soluções de $NaOH$ 1,0 mol·L⁻¹ e $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ 0,0562 mol·L⁻¹ na proporção de 1:3. Em seringas de 20 mL os criogéis e a mistura pré-aquecida foram submetidas a agitação orbital constante numa estufa incubadora (B.O.D., modelo SP-500, SPLABOR) a 45 °C por 90 min. Após esse processo, seguiu-se para a enxertia do radical trocador Ácido Acrílico (AAc) $C_3H_4O_2$ (2 mol·L⁻¹). Usando a metodologia adaptada de YAO et al. (2007), a

solução de AAc foi previamente aquecida à 45°C em banho maria e colocada em contato com o criogel, sendo assim, novamente mantido em estufa BOD, em agitação orbital à 45 °C, por 120 minutos. Em seguida, o criogel foi lavado com solução de HCl (0,1 mol·L⁻¹), posteriormente lavados com água destilada por 30 minutos e por fim secos a 60 °C durante 24 h e armazenados em fracos até o uso.

4.5 Caracterização dos Criogéis

Para a caracterização dos criogéis produzidos foram realizada as análises de capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED), porosidade, capacidade iônica total (Λ), ponto de carga zero (pHz), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio X (DRX).

4.5.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchamento (S) foi realizada em 16 criogéis ativados e 16 não ativados (controle). Os criogéis secos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada em temperatura ambiente, por 24 h. Após a imersão, as massas foram verificadas novamente. Calculou-se o valor de S utilizando a equação 10 (SAVINA et al., 2005).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (10)$$

Onde: m_s é a massa (g) do criogel hidratado e m_d é a massa (g) do criogel desidratado.

Avaliou-se também o grau de expansão (ED) do criogel, utilizada para conversão entre a massa desidratada do criogel (em armazenamento) e seu volume hidratado (em uso). Dezesesseis criogéis desidratados, com e sem enxertia foram pesados em balança analítica e saturados em água destilada durante 24 h. Os criogéis hidratados foram transferidos para uma proveta graduada contendo um volume inicial de água, V1, e volume final, V2, foi determinado. O volume do criogel hidratado foi calculado pela diferença entre V2 e V1. O valor de ED foi calculado utilizando a equação:

$$ED = \frac{(v_2 - v_1)}{m_d} \quad (11)$$

Onde: V1 é o volume inicial de água na proveta (mL), V2 é o volume final lido na proveta após a colocação do criogel (mL) e m_d é a massa do criogel desidratado (g). Os valores médios de S e ED obtidos para os criogéis foram comparados entre si aplicando-se o teste t de Student a 5% de probabilidade para ambos, utilizando o software SAS (System for Windows 9.0) (MONTGOMERY, 2001).

4.5.2 Porosidade dos criogéis

O método utilizado para análise da porosidade de criogéis poliméricos se baseia na medida do conteúdo de água livre dos criogéis monolíticos. Dezesesseis criogéis desidratados e pesados foram mantidos por quinze dias em um dessecador contendo uma solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse em torno de 98% à temperatura ambiente ($(25 \pm 2)^\circ\text{C}$) (GREENSPAN, 1977). Ao fim do período proposto, as massas foram novamente aferidas. Essa medida determina a quantidade de água de ligação do criogel (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2004b). Posteriormente os criogéis foram imersos em água destilada durante 24 h e suas massas verificadas novamente. Os criogéis foram então delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. Calculou-se a fração de macroporos (φ_M), com tamanho $\geq 1\mu\text{m}$, fração de mesos e microporos (φ_m), com tamanho $< 1\mu\text{m}$, fração de água ligada (φ_{wb}), fração do polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogéis utilizando as equações:

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (12)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (13)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (14)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (15)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (16)$$

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

4.5.3 Capacidade de troca iônica (CTI)

A capacidade iônica total expressa a capacidade máxima de troca de cátions monovalentes dos criogéis sintetizados. Para a sua determinação, foi utilizado um método titulométrico segundo Fontan et al. (2018). Seis criogéis sintetizados nas seringas foram secos e cortados com uma lâmina de aço inox em pedaços cúbicos com cerca de 1,5 mm de aresta. Em seis tubos de centrífuga de 50 mL foram pesados cerca de 50 mg de criogel e adicionados 45 mL de uma solução de HCl $1,0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Colocados por 12 h à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) sob agitação à 25 rpm. Em seguida, a solução foi retirada e os criogéis nos tubos foram submetidos a uma tripla lavagem com 45 mL de água destilada seguido de agitação orbital dos tubos durante 3 horas. Antes de cada lavagem, os criogéis foram rinsados com cerca de 90 mL de água destilada. Esse procedimento foi realizado para retirar o excesso de íons H^+ em solução do contato com os criogéis. Os tubos com o conteúdo de criogéis

previamente colocados foram então levados à secagem a $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ por 24 h, resfriados e adicionados de 45 mL de uma solução de NaCl $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e colocados em agitação orbital a 25 rpm por 12 h. Uma alíquota de 40 mL de solução foi retirada de cada tubo e titulada com uma solução de NaOH $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ padronizada. A solução de NaCl original também foi titulada, sendo o branco para análise. O número de íons H^+ quantificados foi igual ao número de íons Na^+ que foram trocados com o criogel.

A capacidade iônica total pela de massa de criogel desidratado (Λ_m), expressa em $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, foi determinada utilizando a equação 17. A capacidade iônica total por volume de criogel hidratado (Λ) foi determinada de acordo com a equação 20.

$$\Lambda_m = \frac{V_T}{m} \left[\left(\frac{M_{\text{NaOH}} \cdot f \cdot V_{\text{NaOH}}}{V} \right)_{\text{Amostra}} - \left(\frac{M_{\text{NaOH}} \cdot f \cdot V_{\text{NaOH}}}{V} \right)_{\text{NaCl}} \right] \quad (17)$$

Onde: V_T é o volume total de solução de NaCl colocada nos tubos (L), m é a massa de criogel desidratado nos tubos (kg), M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH utilizada para a titulação ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), f é o fator de correção da solução de NaOH. V_{NaOH} é o volume da solução de NaOH gasta na titulação (L) e V é o volume de solução titulada com NaOH (L). Os parênteses com a notação ‘*amostra*’ indicam a solução salina após o contato com o criogel e os parênteses com a notação ‘*NaCl*’ indicam a solução salina antes do contato com o criogel.

$$\Lambda = \frac{\Lambda_m}{ED} \quad (18)$$

Onde: Λ_m é a capacidade iônica total por massa de criogel desidratado ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) e ED é o grau de expansão do criogel ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$).

4.5.4 Análise de ponto de carga zero (PCZ)

Para a análise do ponto de carga zero (pH_{pcz}) utilizou-se da metodologia adaptada denominada “Experimento dos 11 Pontos” (REGALBUTO; ROBLES, 2004). Colocou-se 50 mg de criogel cortado em cubos com aresta de cerca de 1,5 mm em contato com 50 mL de solução de cloreto de sódio ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em diferentes valores de pH (1-11) sobre agitação constante durante 24 h. O pH inicial de cada solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou hidróxido de sódio ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Após as 24h, o pH final foi verificado e então plotado o gráfico do pH inicial versus pH final utilizando-se do *software* SigmaPlot® v.11 (Systat Software, Inc., Chicago, EUA). O pH_{PCZ} é encontrado a partir da média dos valores de pH onde o pH final se mantém igual.

4.5.5 *Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os grupos funcionais dos criogéis produzidos foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. As amostras foram cortadas com uma lâmina de aço inox em pedaços cilíndricos com cerca de 1,5 mm de aresta e lidas diretamente através da técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-600 cm^{-1} , utilizando-se o modo transmitância, em um espectrofotômetro modelo FTIR Cary 630, da Agilent Technologies (Santa Clara – USA). Os dados foram obtidos utilizando-se o software Microlab e o Resolution Pro (Agilent, Santa Clara – USA).

4.5.6 *Análise termogravimétrica.*

Cerca de 8 mg do criogel desidratado foi acondicionada no equipamento. A perda de massa do criogel foi medida e registrada continuamente em função do tempo e temperatura através do calorímetro modelo STA PT1000 TG-DSC/DTA marca Linses Thermal Analysis. A temperatura utilizada foi de 0 – 650°C e tempo de 60 minutos. Os dados obtidos foram processados e plotados pelo *software* SigmaPlot® v.11 (Systat Software, Inc., Chicago, EUA).

4.5.7 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para melhor conhecimento da estrutura dos criogéis produzidos. Para isso, uma amostra de cada criogel produzido, controle e ativado, foi desidratada e quebrada próximo à região central, fixado em suporte apropriado (stub) e diretamente metalizado em uma fina camada de ouro. Após a metalização, as amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, Modelo DSM940) para realizar a análise.

4.5.8 *Difração de raios-X*

Para obtenção dos difratogramas, os criogéis controle e ativado, foram cortados em 1,5 mm de aresta com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável e condicionados em um difratômetro D2 Phaser (Bruker, Alemanha). Os raios-X ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) foram gerados por uma fonte Cu $K\alpha$ e a difração foi medida na faixa 2θ de 5–90°.

4.6 Determinação das Isotermas de Adsorção

Para a obtenção dos dados experimentais foi utilizado o método estático de batelada. Os criogéis utilizados foram cortados com uma lâmina de aço inoxidável em pedaços de 1,5 mm e misturados para uniformização do material adsorvente.

As isotermas de adsorção foram determinadas em experimentos desenvolvidos no delineamento inteiramente casualizados, com cinco temperaturas de trabalho (10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C) totalizando 5 curvas experimentais.

Para a obtenção de cada isoterma foram utilizados entre 13 e 18 pontos experimentais, com concentração inicial de lisozima variando de 0,1 g.L⁻¹ (7,0 x10⁻⁶ mol.L⁻¹) a 20,0 g.L⁻¹ (1,4 x10⁻³ mol.L⁻¹), com três repetições cada.

Como fase móvel foi utilizada uma solução-tampão de fosfato de sódio (0,02 mol.L⁻¹) e pH igual a 7,2 obtida da mistura em proporções adequadas de fosfato de sódio monobásico (0,02 mol.L⁻¹) e dibásico (0,02 mol.L⁻¹).

Em cada ponto experimental, aproximadamente 0,03 g do adsorvente desidratado foi pesado em tubos com tampa com volume de 15 mL, utilizando-se uma balança analítica (precisão de 0,0001 g, Modelo ME204, METTLER TOLEDO). Adicionou-se a cada tubo 4 mL de solução-tampão com a concentração inicial de proteína desejada e posteriormente deixou-se os mesmos em agitação orbital a 25 rpm durante 12 h (overnight), à temperatura proposta constante, mantida utilizando-se uma estufa BOD.

Determinação dos Parâmetros dos Modelos de isotermas Ajustados

Os parâmetros q_{max} e k_d do modelo de Langmuir foram estimados por análise de regressão, utilizando-se o *software* SigmaPlot® v.11 (Systat Software, Inc., Chicago, EUA). Tais parâmetros foram obtidos a partir do ajuste do modelo aos valores experimentais das isotermas de adsorção, e a adequação do modelo foi avaliada com base na significância dos parâmetros e coeficiente de determinação.

4.7 Determinação das Propriedades Termodinâmicas

A partir dos parâmetros ajustados do modelo de Langmuir para cada temperatura estudada, foi estimada a variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG_{TI}^0) utilizando-se a equação 3. A partir do modelo não-linear de van't Hoff estimou-se os valores para ΔH_{TI}^0 e para ΔS_{TI}^0 nas temperaturas avaliadas, utilizando-se as equações 8 e 9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos criogéis

Os criogéis de poliacrilamida produzidos apresentaram característica uniforme, porosa, com no máximo 5 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Enquanto secos, os criogéis apresentaram estrutura rígida, porém, quando hidratados, a estrutura se apresentava elástica e, de cor branca. Tais características foram descritas por outros autores (CARVALHO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019). Após a ativação e enxertia os criogéis apresentaram coloração esverdeada, sendo possivelmente explicada pela ação do diperiodato cuprato de potássio nas condições usadas, observada na Figura 10.

Devido à elasticidade apresentada, tais monólitos podem ser suavemente comprimidos mantendo a integridade de sua estrutura. As matrizes também apresentaram estabilidade aos processos de hidratação e secagem, características essenciais para que os criogéis de poliacrilamida possam ser armazenados para utilização posterior em processos de purificação.

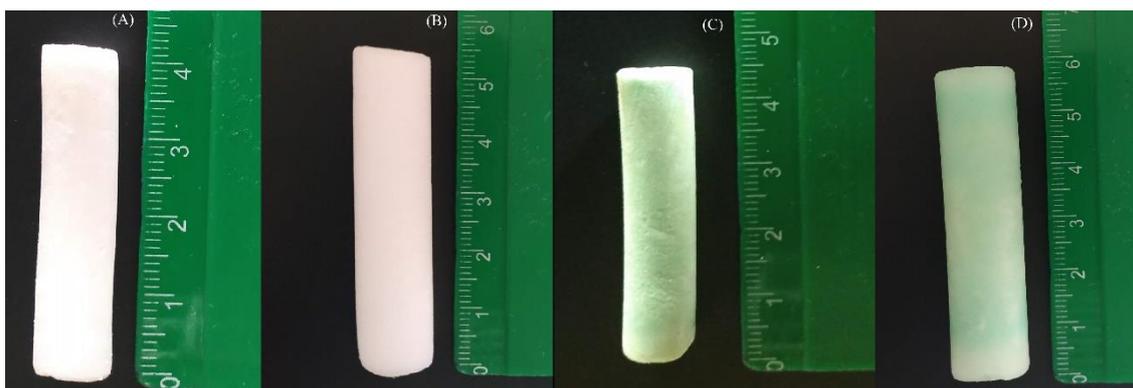


Figura 10. (A) Criogel desidratado sem ativação; (B) Criogel Hidratado sem ativação; (C) Criogel desidratado ativado; (D) Criogel hidratado ativado.

5.2 Caracterização dos Criogéis

Os resultados da caracterização das matrizes são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1. Parâmetros físicos obtidos pela caracterização da síntese dos criogéis.

	Controle	Ativado	P-value
CI (kg·kg ⁻¹)	13,59 ^a ± 1,30	11,99 ^b ± 0,78	<0,001
ED (L·kg ⁻¹)	17,26 ^a ± 0,84	15,07 ^b ± 0,76	<0,001
Fração do Polímero seco (%)	0,069 ^b ± 0,006	0,077 ^a ± 0,005	<0,001
Fração de Água Ligada (%)	0,023 ± 0,003 ^{ns}	0,023 ± 0,003	0,8171
Fração de Mesos e Microporos (%)	0,256 ± 0,036 ^{ns}	0,271 ± 0,077	0,5028
Fração de Macroporos (%)	0,652 ± 0,076 ^{ns}	0,628 ± 0,040	0,3027
Porosidade Total (%)	0,908 ^a ± 0,007	0,899 ^b ± 0,008	0,0065
$\Lambda_m / (10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ criogel seco})$	n.a.	371,44 ± 0,01	-
$\Lambda / (10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ criogel hidrat.})$	n.a.	21,51 ± 0,01	-

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste *t* ($p < 0,05$).

n.a. determinação de parâmetro não-aplicável.

n.s. não significativa a 5%.

Os valores da capacidade de inchamento e grau de expansão diminuíram após o processo de enxertia. É provável que tal redução nos valores de *ED* e *S* ocorreram devido ao fortalecimento das interações cruzadas e redução do espaço do poro a partir da funcionalização do criogel, tornando-os menos flexíveis (CARVALHO 2010; NASCIMENTO et al., 2019).

Tais reduções também podem ser explicadas devida a estrutura se tornar menos hidrofílica após a enxertia do ácido acrílico. No entanto, os valores da fração de água de ligação não se alteraram, a fração de microporos aumentou e a de macroporos diminuiu, o que sugere que realmente a redução de CI e ED é devida à redução de espaço dentro da estrutura do criogel.

A fração de água ligada e a fração de polímero seco formam a estrutura do criogel. O aumento da fração de polímero seco verificada indica que os radicais iônicos foram imobilizados através da funcionalização. Valores próximos foram encontrados por Gonçalves et. al., (2016) e Nascimento et. al., (2019) em estudo com criogéis de poliacrilamida e criogéis funcionalizados com ácido acrílico.

Na Tabela 1 pode-se observar que, para a análise de porosidade, os criogéis ativados apresentaram cerca de 62% de macroporos, sendo característica desejada para purificação de macromoléculas. Houve diferença significativa da porosidade total entre os dois tratamentos

indicando que provavelmente os espaços contidos nos poros inicialmente no controle foram reduzidos pela enxertia dos grupos de AAc (NASCIMENTO et al., 2019; FONTAN 2013).

Os resultados encontrados na caracterização dos criogéis, tanto ativados quanto controle, são condizentes com resultados obtidos por outros autores (NASCIMENTO et al., 2019; GONÇALVES et al. 2016; SAHINER et al., 2015).

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 11 apresenta as micrografias eletrônica de varredura dos criogéis controle e ativado com diferentes zoon.

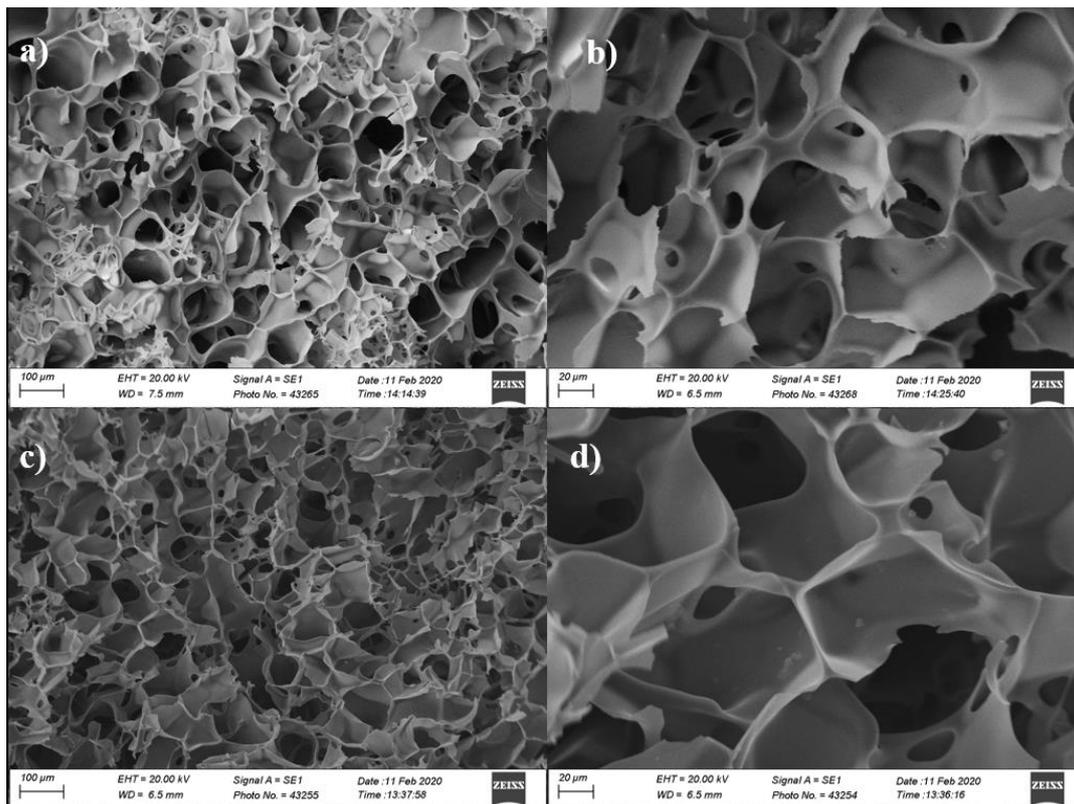


Figura 11. Micrografias de MEV dos criogéis controle e ativado. a) Controle com aumento de 200x; b) Controle 800x; c) Ativados 200x; d) Ativados 800x.

Pode-se observar que, tanto para o criogel controle quanto o ativado, as superfícies dos criogéis apresentaram poros grandes e arredondados, de aspecto liso e uniforme. Para o criogel controle os poros apresentaram tamanhos que variavam de 57,7 a 219,3 μ com média 92,37 μ , no entanto, os criogéis ativados apresentaram poros com média de 82,4 μ com variação entre 53,0 e 130,8 μ . Após a enxertia com o ácido acrílico houve uma redução em cerca de 11% dos tamanhos dos poros, podendo ser explicada pela introdução do ácido acrílico na estrutura do criogel, porém não ocorreu modificações visíveis na superfície do criogel após a enxertia.

5.4 Análise do ponto de Carga Zero

A Figura 12 ilustra os resultados obtidos durante a análise do ponto de carga zero.

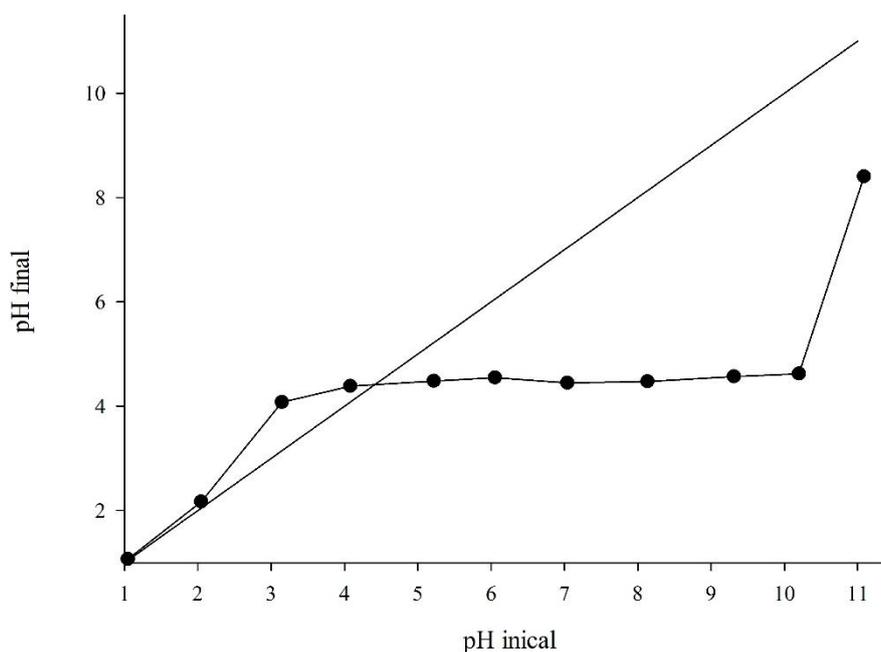


Figura 12. Análise de Ponto de Carga Zero.

O ponto de carga zero do criogel ativado foi obtido através da média aritmética dos pontos que se apresentaram constantes para o pH final. Para o adsorvente utilizado foi encontrado valor de pH_{pcz} igual a 4,5 o que pode ser explicado devido à inclusão de grupos ácidos na superfície do criogel devido à enxertia do AAc, concordando com outros autores (AKKAYA e AKKAYA, 2012). A análise apresenta também grande intervalo para tamponamento variando os valores de pH entre 3 e 10 com desvio padrão igual a 0,168.

Uma grande faixa de tamponamento proporciona ampla faixa de pH tampão para trabalho com o adsorvente produzido, podendo ser utilizado para a adsorção de outras proteínas que se encontram o valor de pH ideal dentro da faixa. O pH tampão da solução influencia o processo de adsorção, pois na superfície do adsorvente há a presença de grupos funcionais, de cargas positivas ou negativas e além disso influencia a ionização de diversos solutos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Proteínas por exemplo, são influenciadas pela solução tampão do meio, esta característica é favorável para processos de purificação de biomoléculas, mostrando assim, potencial para uso no processo de adsorção por troca catiônica.

5.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros obtidos para os criogéis com e sem enxertia do AAC são apresentados na Figura 13:

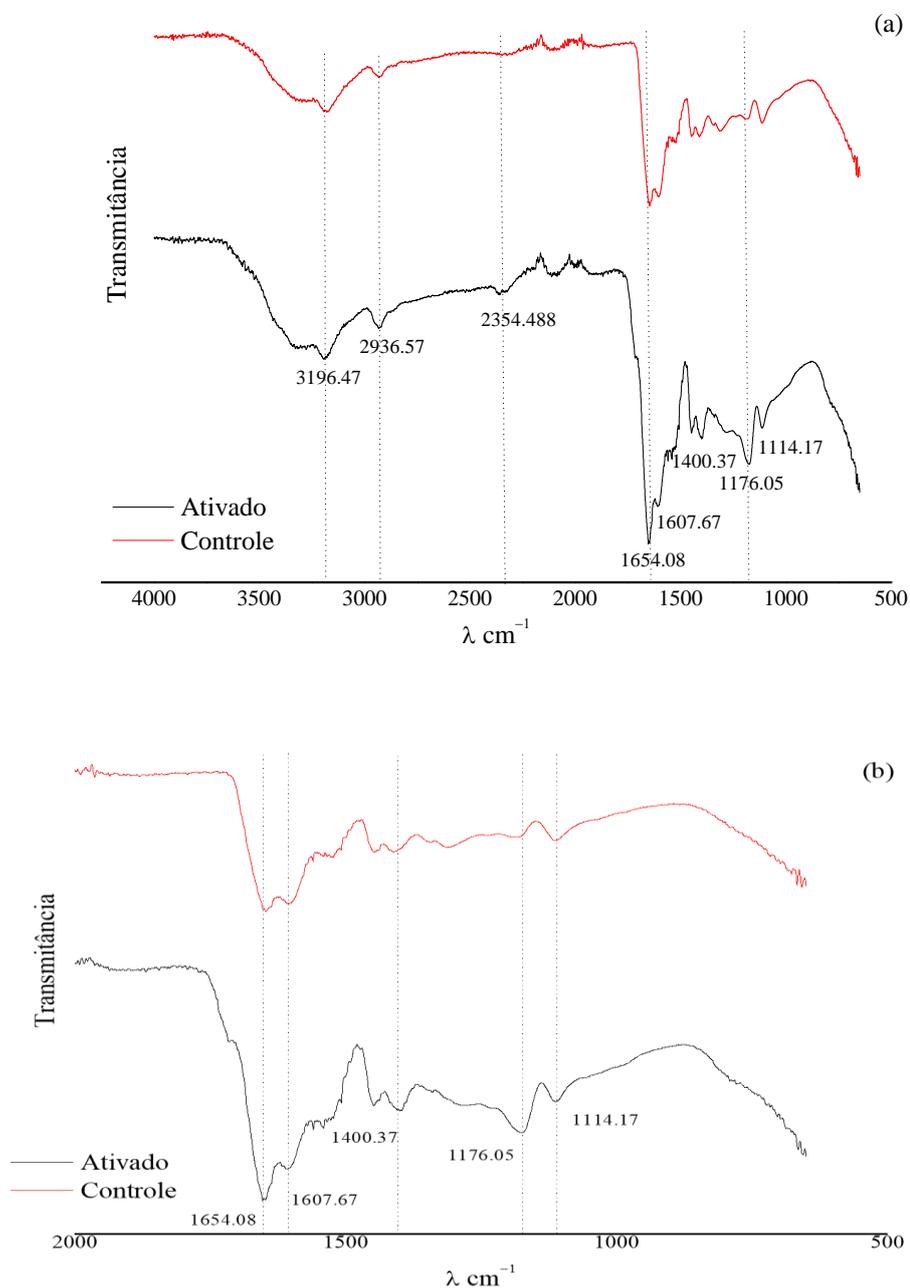


Figura 13. Espectros de FTIR dos criogéis elaborados. (a) Todo espectro. (b) Parte do Espectro de FTIR de 500 – 2000 cm⁻¹

Os espectros obtidos evidenciaram algumas diferenças entre os criogéis controle e ativado. Para o criogel controle foi possível notar uma acentuada banda na região de 1654 cm⁻¹, vibração

característica do agrupamento amida (C=O) provenientes dos monômeros (AAM e BAAM) utilizados para a síntese dos criogéis. Esta banda ainda é conservada e apresenta leve aumento no criogel ativado devido a estrutura do ácido acrílico apresentar também este grupo na sua composição. Esta banda é comum para criogéis de poli(acrilamida) ao utilizar os monômeros AAM e BAAM. A ocorrência dessas bandas já foi relatada por vários autores (GONÇALVES, et al. 2016; NASCIMENTO et al. 2019).

No espectro do criogel controle é possível ainda identificar vibrações formadas também pelo grupo amida no número de onda de $3196,47\text{ cm}^{-1}$ e uma banda em 1114 cm^{-1} que corresponde ao alongamento do grupo C-O (CHATURVEDI et al. 2016).

Analisando os espectros do criogel ativado, ocorreu aumento da banda comparado com o controle na região de $2936,57\text{ cm}^{-1}$ que indica alongamento C-H alifáticos e a banda em $1400,37\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a uma flexão assimétrica do grupo C-H. Valores aproximados foram também encontrados pelos autores Sahiner; Demirci (2016) e Silva et al. (2017). Na região de 1176 cm^{-1} , esta pode estar associada à ligação carbono-nitrogênio (C-N) oriundo da adição de ácido acrílico sobre a matriz de poli(acrilamida). Gonçalves et al. (2016), Silva et al. (2017) e Nascimento et al. (2019) identificaram a ocorrência de bandas aproximadas de tais comprimentos de ondas nos espectros de FTIR em criogéis de poli(acrilamida).

5.6 Difração de Raio X

Os resultados de difração de raios-X estão destacados na Figura 14.

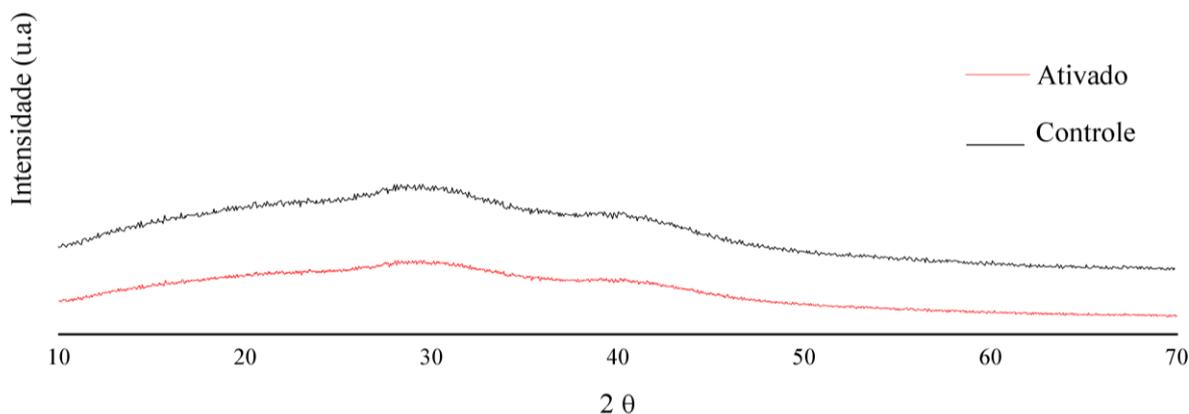


Figura 14. Difratogramas dos criogéis controle e ativado.

De acordo com os difratogramas obtidos verificou-se uma estrutura não cristalina para os criogéis controle e ativado, indicando que a estrutura formada não apresenta ordenamento á media e

longa distância. Os dois materiais exibiram dois halos amorfos centrados em 2θ em torno de 28° e 42° que são típicos de materiais sólidos.

5.7 Análise Termogravimétrica

A Figura 15 apresenta as curvas de análise térmica diferencial (DTA) e a curva de decomposição térmica através da perda de massa (TG). Considerando as curvas de TG e DTA obtidas para os materiais, notou-se perfis diferentes ao comparar o controle e o ativado.

Para a análise térmica diferencial pode-se observar picos endotérmicos tanto na amostra controle quanto nos criogéis ativados antes de atingir a temperatura de 100°C indicando a presença de água ligada à estrutura da matriz e outros componentes voláteis (XIA et al., 2005). O criogel controle demonstra conter maior quantidade de água ligada devido a curva (Figura 15a) o que pode ser explicada pela umidade adquirida por meio da absorção de água fisissorvida durante o armazenamento.

Entre 400°C e 500°C o criogel ativado apresenta evento exotérmico mais forte que o controle, exibindo um pico elevado, sendo este atribuído a degradação da poliacrilamida e compostos adquiridos através da enxertia (KUMAR et al., 2006; PAIVA, 2019). Ainda neste intervalo de temperatura, o criogel ativado há um pico inferior, indicando redução de grupos do componente através do processo de ativação. Na análise do ativado o gráfico mostra grande diferença na liberação de energia exotérmica atingindo entre as temperaturas $400\text{-}500^\circ\text{C}$ para decomposição do ácido acrílico enxertado corroborando com Ren; Wang e Wang (2006).

Ao analisar a perda de massa percebe-se diferença sutil entre o controle e ativado, sendo o controle apresentar queda brusca de massa no início entre 100 e 250°C referente a compostos voláteis e água. Na temperatura de 400°C tanto o controle quanto ativado apresentou pico de degradação de poliacrilamida, sendo que o pico do criogel controle aparece quando atinge 58% do seu peso e o ativado em 49% . Resultados aproximados foram encontrados por Xia et al. (2005) por essa análise com hidrogéis de poliacrilamida.

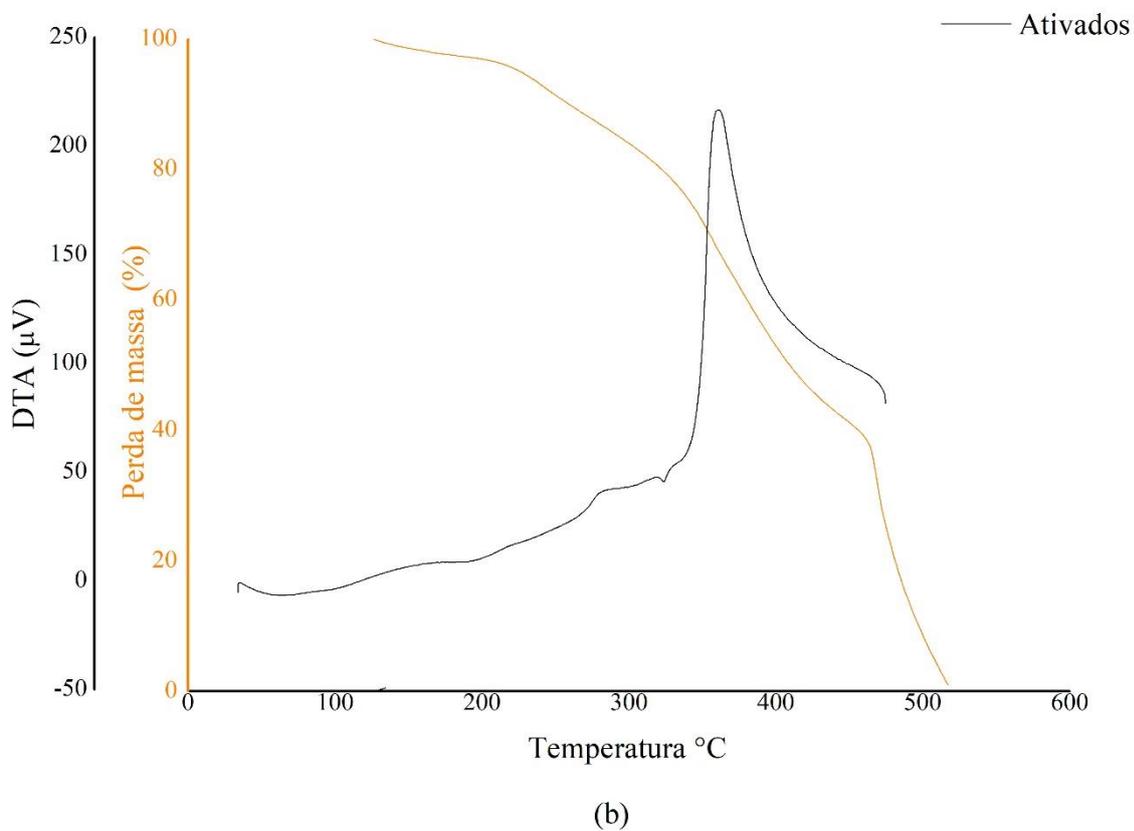
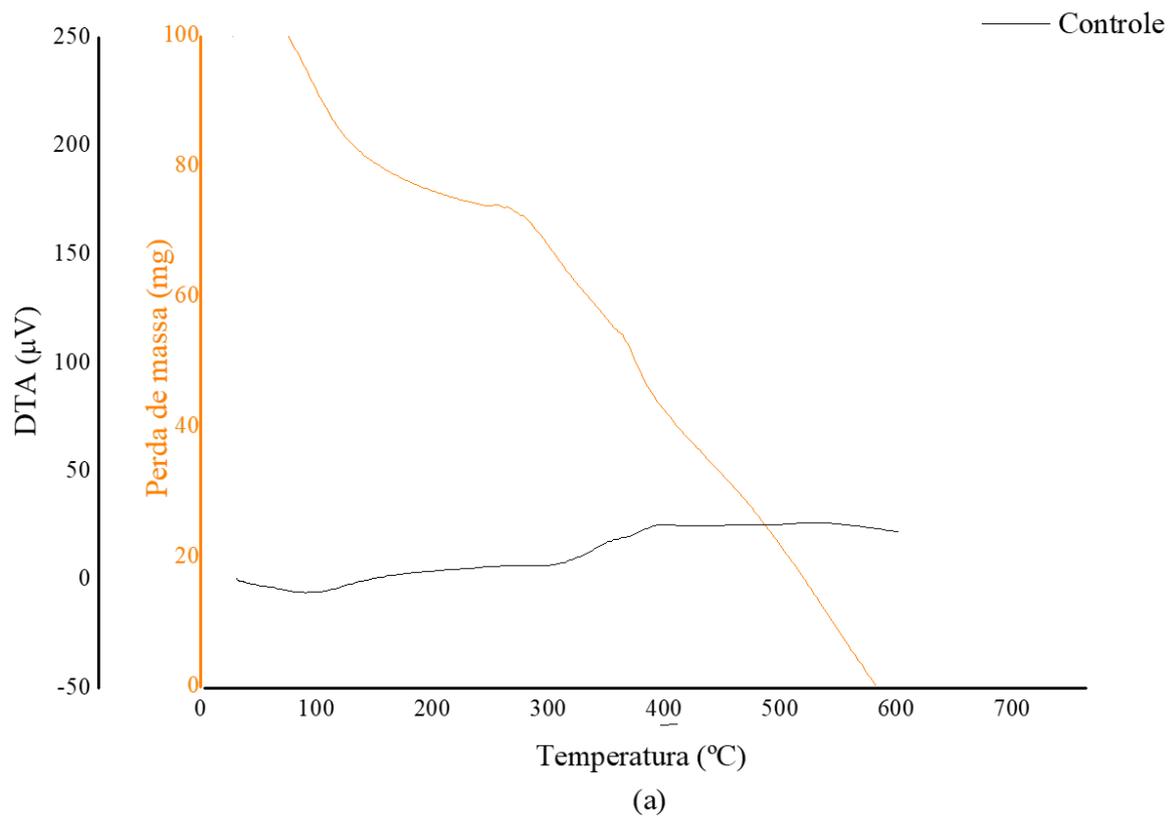


Figura 15. Análise de TG e DTA dos criogéis elaborados. (a) criogéis sem enxertia (b) criogéis com o processo de enxertia.

5.8 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção obtidas e o ajuste do modelo de Langmuir são apresentados na Figura 16. Verifica-se o efeito da temperatura sobre a capacidade adsortiva da lisozima.

A máxima adsorção de lisozima ocorreu na temperatura de 40 °C, com quantidade de 1055,874 mg·g⁻¹ de acordo com os parâmetros ajustado do modelo de Langmuir apresentados na Tabela 2. Entretanto, em temperatura superior ocorreu diminuição da capacidade adsortiva do criogel, resultando numa menor adsorção da lisozima, que pode ser explicado pelo provável rearranjo da proteína utilizada.

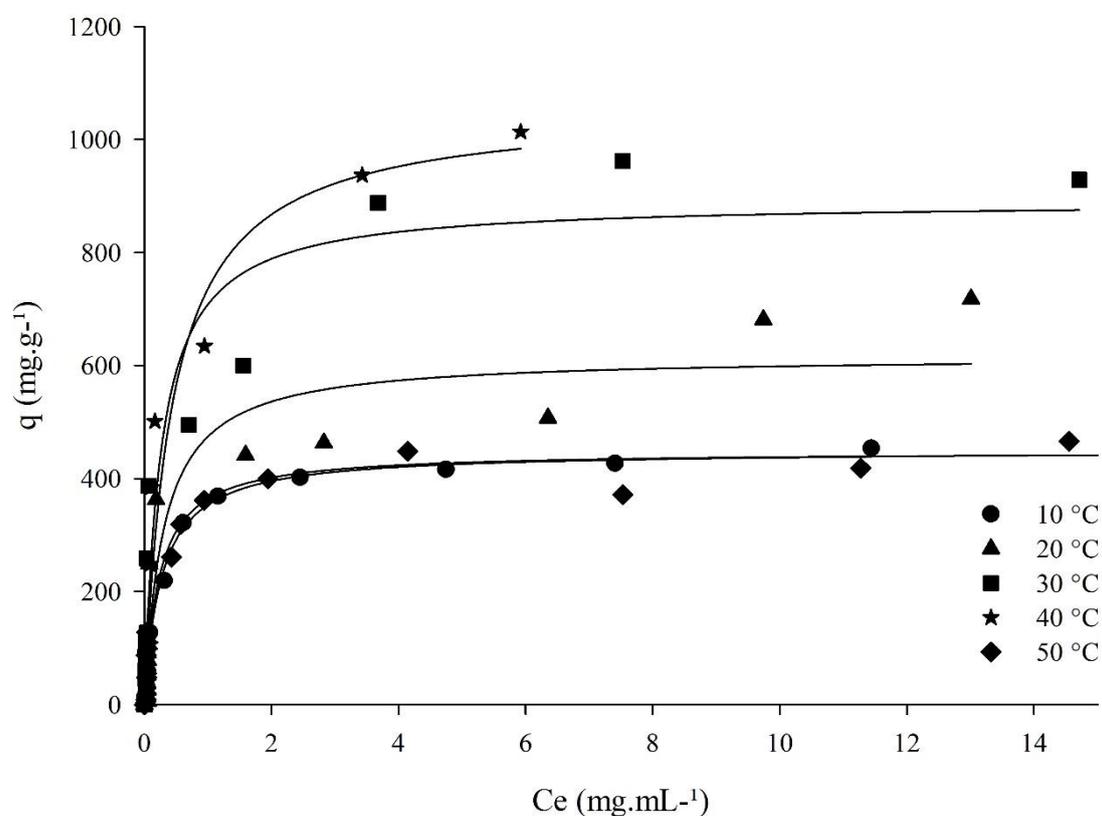


Figura 16. Isotermas de adsorção de Lisozima no trocador catiônico produzido.

As proteínas naturalmente sofrem variação na conformação e atividade em função da temperatura podendo interferir no potencial químico do adsorvato e em sua solubilidade (NASCIMENTO et al., 2014). Com o aumento da energia térmica a lisozima começa a desnaturar alterando ligações que mantêm a sua conformação, ocasionando o seu desdobramento (MANN; MCCLUSKEY; ATKIN, 2009). Stokun et al., (1995) em seu trabalho de alterações induzidas das estruturas de proteínas estudadas por FTIR, notou que em cerca de 46 °C ocorria o desdobramento da lisozima perdendo formação tridimensional da estrutura terciária, porém a estrutura secundária

mantendo-se intacta. Tal desdobração da proteína pode levar a uma nova conformação menos favorável à adsorção, ocasionando uma redução da capacidade adsorptiva.

Tabela 2. Parâmetros ajustados do modelo de Langmuir na adsorção de Lisozima.

T (K)	$q_{m\acute{a}x}$ (mg·g ⁻¹)	k_d (mg·mL ⁻¹)	R ²
283,15	448,724	0,270	0,9895
293,15	616,586	0,300	0,9510
303,15	890,272	0,257	0,9635
313,15	1055,874	0,435	0,9562
323,15	448,001	0,232	0,9812

Os parâmetros do modelo permitem maior entendimento e visualização da capacidade de adsorção do criogel em estudo e a afinidade da proteína pelo adsorvente indicada pelo K_d . O K_d é entendida como uma constante de interação entre o adsorvato e adsorvente.

A partir destes pode-se observar que, até 313,15 K a capacidade de adsorção máxima aumenta, porém, ao atingir temperaturas superiores a quantidade adsorvida diminui. Esse comportamento do $q_{m\acute{a}x}$ reflete na afinidade.

5.9 Propriedades termodinâmicas

A partir dos parâmetros $q_{m\acute{a}x}$ e K_d ajustados do modelo de Langmuir foi determinado as propriedades termodinâmicas a partir da análise não-linear de Van't Hoff. O valor de K_d é conhecido em várias temperaturas, assim é possível determinar os valores de ΔH°_{TI} pela equação 8. A partir dos valores de K_d e da equação 5 obtém-se os valores de ΔG°_{TI} . Conhecendo os valores de ΔH°_{TI} e ΔG°_{TI} é possível determinar ΔS°_{TI} . Portando o conhecimento da medição K_d em uma faixa de temperatura permite o cálculo de ΔH°_{TI} , ΔG°_{TI} e ΔS°_{TI} da reação para aquela temperatura (LEVINE, 2012). A figura 17 mostra o gráfico de $\ln k$ em função de $1/T$ e a Tabela 3 apresenta a variação das propriedades termodinâmicas determinadas.

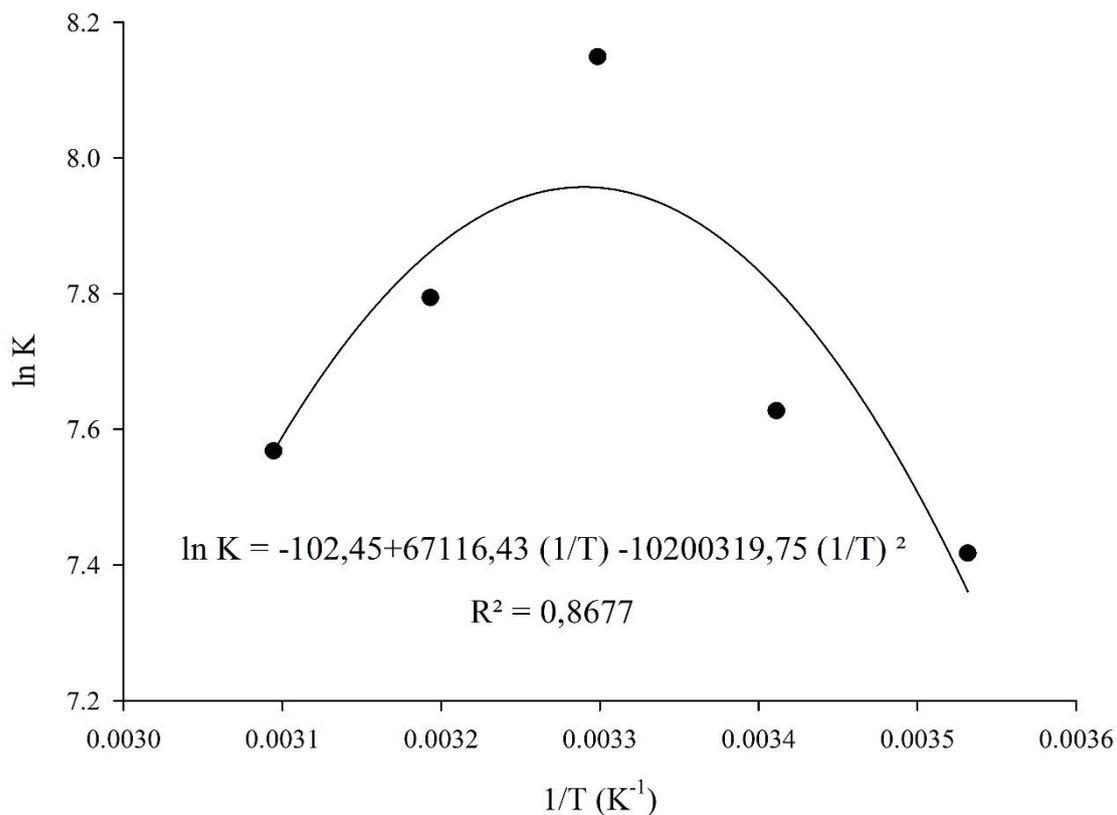


Figura 17. Figura 16. Gráfico de Van't Hoff para análise não linear.

Tabela 3. Propriedades termodinâmicas do processo de adsorção.

T(K)	ΔG^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔH^0 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^0 (kJ·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T. ΔS^0 (kJ·mol ⁻¹)
283,15	-17,46	-44,50	-0,095	-27,04
293,15	-18,59	-24,65	-0,021	-6,06
303,15	-20,54	-6,11	0,048	14,43
313,15	-20,29	11,25	0,101	31,54
323,15	-20,33	27,53	0,148	47,86

A partir dos dados obtidos da análise termodinâmica verificou-se que o processo de adsorção da lisozima no trocador catiônico foi espontâneo, indicado pelo valor de ΔG^0_{TI} negativo em todas as temperaturas. Verificou-se ainda que a variação da entalpia e entropia aumenta com a elevação da temperatura sugerindo uma compensação entálpica-entrópica no processo de adsorção. Estes fenômenos podem ser melhor visualizados na Figura 18.

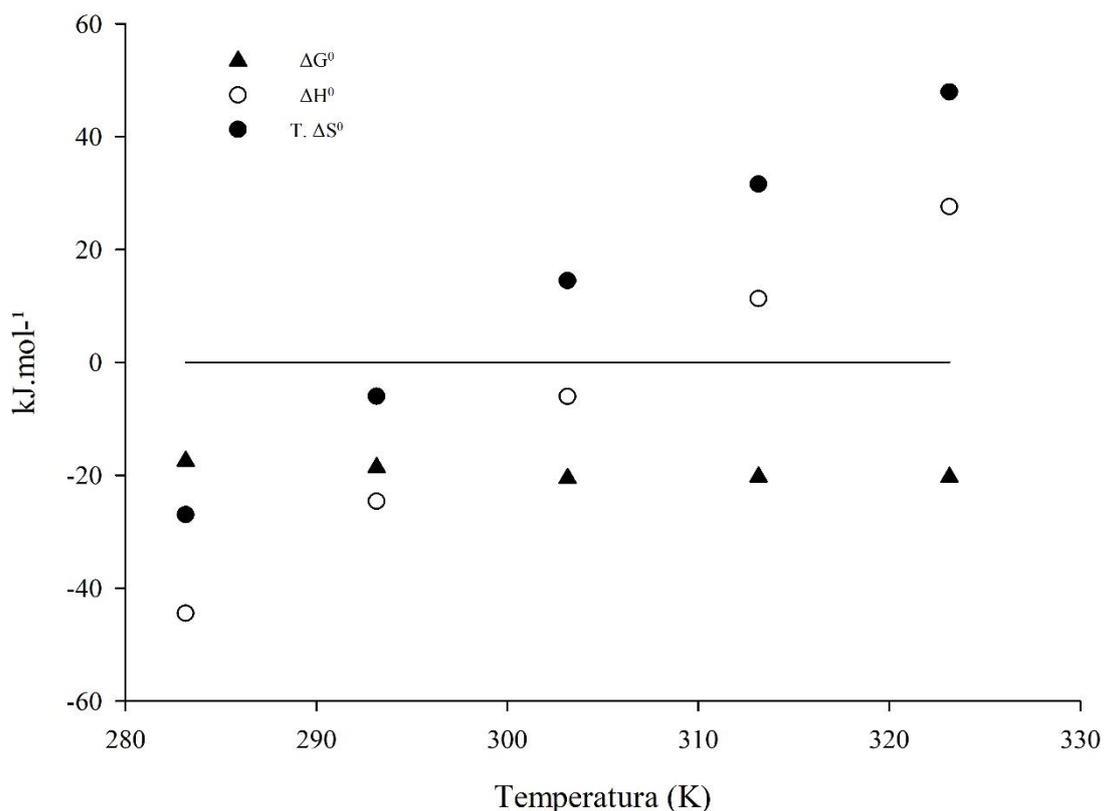


Figura 18. Propriedades termodinâmicas em função da temperatura no processo de adsorção da Lisozima.

Observou-se que nas temperaturas de 283,15 K, 293,15 K e 303,15 K o processo foi exotérmico, pois os valores de variação de entalpia nessas temperaturas foram negativos, porém o processo de adsorção apresentou tendência a se tornar endotérmico com o aumento da temperatura. Esse comportamento sugere que, até 303,15 K ocorre maior interação entre as moléculas e nas duas maiores temperaturas (313,15 e 323,15 K) as forças de interações são menores aumentando a quantidade de quebras de ligações do sistema, resultando em maior liberação de energia. Segundo Levine (2012) a reação exotérmica do processo favorece a espontaneidade do processo pois a energia transferida aumenta a entropia das vizinhanças.

O processo de adsorção da lisozima nas temperaturas mais baixas estudadas mostrou ser entálpicamente dirigido, mas com o aumento da temperatura (313,15 e 323,15 K) o processo tornou-se entropicamente dirigido. A compensação entálpico-entrópica é importante para que a variação da energia livre de Gibbs do processo seja negativa, indicando sua espontaneidade.

Os valores de variação de entropia permitem entender a reorganização do sistema após o processo de troca iônica. A variação de entropia é negativa nas temperaturas mais baixas de estudo e

positiva a partir de 303,15 K, sendo que o maior valor de ΔS°_{TI} foi observado na maior temperatura de adsorção. Nas temperaturas mais baixas estudadas (283,15 e 293,15 K) foram verificados valores positivos de ΔS°_{TI} . Nessa faixa verificou-se uma perda entrópica no processo de adsorção da proteína, envolvendo os processos de dessolvatação e deionização das superfícies do adsorvente e da proteína; a interação proteína-adsorvente e a redistribuição de íons e água em solução. Isso sugere que a adsorção da proteína causou uma perda de entropia conformacional da proteína que não foi compensada pela liberação de íons e água e seu aumento de entropia configuracional em solução.

Com o aumento da temperatura houve um aumento dos valores de ΔS°_{TI} que passaram a ser positivos a partir de 303,15 K e continuaram crescendo até 323,15 K. Isso sugere que o aumento da temperatura levou a alterações conformacionais da proteína em solução que aumentaram a entropia configuracional da água de solvatação e íons em solução, que passaram a ter acesso a novos sítios de interação com a proteína que não existiam em temperaturas menores. Tal aumento entrópico foi o responsável por permitir que o processo de adsorção permanecesse espontâneo, mesmo com o mesmo passando a ser endotérmico. A alteração conformacional da lisozima com o aumento da temperatura, principalmente acima de 313,15 K, levou à redução da quantidade adsorvida possível pelo impedimento estérico que a estrutura terciária parcialmente desnaturada da mesma causou, que, no entanto, permitiu um maior grau de alterações configuracionais no sistema.

6. CONCLUSÃO

Produziu-se um monólito supermacroporoso trocador catiônico eficiente que atende à demanda de novas matrizes para a adsorção de biomoléculas. Notou-se que a estrutura da matriz atendeu ao processo de enxertia, apresentando mudanças na superfície do criogel. Tais mudanças podem ser notadas considerando as análises de caracterização, onde o adsorvente mostrou alteração na sua estrutura para as análises de CI, ED, FTIR, TGA após o processo de enxertia indicando a eficácia do processo.

Com o processo de funcionalização dos criogéis, obteve-se maior especificidade refletindo na eficácia do processo de adsorção. A partir das isotermas de adsorção identificou-se que a temperatura de 40°C obteve o maior valor da capacidade adsortiva na faixa de estudo, com valores superiores a 1000 mg·g⁻¹.

Com relação ao estudo termodinâmico, verificou-se que o processo de adsorção foi espontâneo, sendo dirigido entalpicamente em temperaturas mais baixas e entropicamente dirigido para temperaturas mais elevadas. Assim, entendeu-se a importância da análise termodinâmica para proporcionar maior compreensão dos fenômenos ocorridos no processo de adsorção.

7. REFERÊNCIAS

ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP. 2016.

AKKAYA, B.; AKKAYA, R. A crosslinked carboxylic acid containing cation exchange monolithic cryogel for human serum albumin separation. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 49, n. 9, p. 736-743, 2012.

AKPINAR, F.; EVLI, S.; GÜVEN, G.; BAYRAKTAROĞLU, M.; KILIMCI, U.; UYGUN, M.; UYGUN, D. A. Peroxidase Immobilized Cryogels for Phenolic Compounds Removal. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 138-147, 2020.

ALTINTAŞ, E. B.; TÜZMEN, N.; CANDAN, N.; DENIZLI, A. Use of magnetic poly (glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1-2, p. 105-113, 2007.

ALTOÉ, L. P. Síntese e caracterização de sílicas híbridas modificadas com grupos amina e estudo da sua capacidade absorvente. 2016.

ÁVILA, M.; GÓMEZ-TORRES, N.; HERNÁNDEZ, M.; GARDE, S. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species. **International journal of food microbiology**, v. 172, p. 70-75, 2014.

BARBIROLI, A.; FARRIS, S.; ROLLINI, M. Combinational Approaches for Antimicrobial Packaging: Lysozyme and Lactoferrin. In: **Antimicrobial Food Packaging**. Academic Press, p. 589-597, 2016.

BARBOSA, D. H.; MOURA, M. R. D.; AOUADA, F. A. Hidrogéis Nanocompósitos de Polissacarídeo com Zeólita: Avaliação do Processo de Adsorção do Pesticida Paraquat. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 380-385, 2018.

BAŞAR, N.; UZUN, L.; GÜNER, A.; DENIZLI, A. Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. **International journal of biological macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 234-242, 2007.

BAYRAMOĞLU, G.; EKICI, G.; BEŞIRLI, N.; ARICA, M. Y. Preparation of ion-exchange beads based on poly (methacrylic acid) brushes grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. **Colloids and Surfaces A**, v.310, 68-77, 2007.

BAYSAL, Z.; AKSOY, E.; DOLAK, İ.; ERSÖZ, A.; SAY, R. Adsorption behaviours of lysozyme onto poly-hydroxyethyl methacrylate cryogels containing methacryloyl antipyrine-Ce (III). **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 67, n. 4, p. 199-204, 2018.

BILLAKANTI, J. M.; FEE, C. J. Characterization of cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1155-1163, 2009.

BLAKE, C. C. F.; JOHNSON, L. N.; MAIR, G. A.; NORTH, A. C. T.; PHILLIPS, D. C.; SARMA, V. R. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 167, n. 1009, p. 378-388, 1967.

- BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. Introdução à Difração de Raios-X em Cristais. **Universidade Federal do Ceará**, p. 1-20, 2000.
- BONOMO, R. C.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S.; FONTAN, R. C.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 1, p. 6-14, 2006.
- CARRILLO, W.; GARCÍA-RUIZ, A.; RECIO, I.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Journal Food Protection**. 77, 1732–1739, 2014.
- CARVALHO, B. M. A. Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poli(acrilamida) ativada com íons de cobre. **Tese**. p. 1205, 2010.
- CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. R.; DA SILVA, M. C. H.; CARVALHO, L. M.; MINIM, L. A. Cryogel poly (acrylamide): synthesis, structure and applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 43, n. 3, p. 241-262, 2014.
- CHATURVEDI, A.; BAJPAI, A. K.; BAJPAI, J.; SINGH, S. K. Evaluation of poly (vinyl alcohol) based cryogel–zinc oxide nanocomposites for possible applications as wound dressing materials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 408-418, 2016.
- 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.
- CONTE, A.; BRESCIA, I.; DEL NOBILE, M. A. Lysozyme/EDTA disodium salt and modified-atmosphere packaging to prolong the shelf life of burrata cheese. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 11, p. 5289-5297, 2011.
- DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., & MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura Microscopia Eletrônica de Varredura Aplicações e Preparação de Amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: Edipucrs, 2007.
- DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Princípios e aplicações de análise térmica. **São Carlos: IQSC**, p. 19, 2012.
- DIETERLE, M.; BLASCHKE, T.; HASSE, H. Microcalorimetric study of adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic materials. **Journal of Chromatography A**, v.1205, 1-9, 2008.
- 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, p. 198-209, 2012.
- DUTRA, R. C.; TAKAHASHI, M. F. K.; DINIZ, M. F. Importância da preparação de amostras em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) na investigação de constituintes em materiais compostos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 5, n. 1, p. 41-47, 2013.
- ENAYATPOUR, B.; RAJABI, M.; YARI, M.; MIRKHAN, S. M. R.; NAJAFI, F.; MORADI, O.; GUPTA, V. K. Adsorption/desorption study of proteins onto multi-walled carbon nanotubes and amino multi-walled carbon nanotubes surfaces as adsorbents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 566-571, 2017.

- ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Cryogels-versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24–35, 2014.
- FONTAN, R. C. I.; BONOMO R. C.; COIMBRA, J. S. R. **Adsorção e Troca Iônica**. In: TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; PESSOA FILHO, P. A. Operações Unitárias na Indústria de Alimentos. Grupo Gen-LTC, p400-425, 2016.
- FONTAN, R. C. I.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. Adsorption isotherms and thermodynamics of α -lactalbumin on an anionic exchanger. **Fluid Phase Equilibria**, v. 348, p. 39-44, 2013.
- FONTAN, R. D. C. I. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas**. 147 p. Tese de Doutorado. 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. Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolithic ion exchanger columns. **Polymer Engineering & Science**, v. 58, n. 10, p. 1717-1725, 2018.
- GASCUE, B. R.; RAMÍREZ, M.; AGUILERA, R.; GARCÍA, A.; PRIN, J. L.; LIAS, J.; KATIME, I. Hydrogels obtained from acrylamide, maleic acid, acrylic acid and octylmonoisocitrate: synthesis, absorbent capacity and pH variations in copper sulfate solutions. **Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia**, v. 30, n. 1, 2007.
- GERSTNER, J. A.; BELL, J. A.; CRAMER, S. M. Gibbs free of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems. **Biophysical Chemistry**, v.52, 97-106, 1994.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 83-90, 2000.
- GOBBO, L. A. **Aplicação da difração de raios-X e método de Rietveld no estudo de cimento Portland**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.
- GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN, R. D. C. I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068, p. 71-77, 2017.
- GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, C. M. S., BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, v. 1033, p. 406-412, 2016.
- GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry**, v.81A, 89-96, 1977.
- GUAN, Y. F.; LAI, S. Y.; LIN, C. S.; SUEN, S. Y.; WANG, M. Y. Purification of lysozyme from chicken egg white using diatom frustules. **Food chemistry**, v. 286, p. 483-490, 2019.
- GUIMARÃES, D.; MOTHE, R.; LEÃO, V. A. Termodinâmica de adsorção de sulfato pela resina estirênica Purolite A500 em condições levemente alcalinas. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 16-22, 2017.

- GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. **Advances in colloid and interface science**, v. 187, p. 1-46, 2013.
- GUVEN, I.; GEZICI, O.; BAYRAKCI, M.; MORBIDELLI, M. Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1558, p. 59-68, 2018.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control** 46, 412–429. 2014.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química nova**, p. 171-180, 1995.
- HWANG, Y.; ZHANG, C.; VARGHESE, S. Poly (ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 345-351, 2010.
- JAIN, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K.; MISHRA, A. Thermoresponsive cryogels of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-N-isopropyl acrylamide) (P (HEMA-co-NIPAM)): fabrication, characterization and water sorption study. **Polymer Bulletin**, p. 1-27, 2019.
- 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 broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v.1103, 35-42, 2006.
- KUROZUMI, M.; YANO, Y.; KIYOYAMA, S.; KUMAR, A.; SHIOMORI, K. Adsorption properties of arsenic (V) by polyacrylamide cryogel containing iron hydroxide oxide particles prepared by in situ method. **Resources Processing**, v. 62, n. 1, p. 17-23, 2015.
- LEVINE, I. N. **Físico-Química Vol 1**. Editora LTC. 6° ed., 2012.
- LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 13, 1062– 1073, 2014.
- LIN, F.-Y.; C., W.-Y.; HEARN, M. T. W. Thermodynamic analysis of the interactions between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, v.15, 55-93.value, and temperature. **Journal of Chromatography A**, v.912, 281-289, 2002.
- LUDING, Y.; SHAOCHUAN, S.; JUNXIAN, Y.; KEJIAN, Y. A. O. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 5, p. 876-880, 2011.
- MAKKI, F.; DURANCE, T. D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 635-645, 1996.
- MANN, J. P.; MCCLUSKEY, A.; ATKIN, R. Activity and thermal stability of lysozyme in alkylammonium formate ionic liquids—influence of cation modification. **Green Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 785-792, 2009.
- MILAKIN, K. A.; GAVRILOV, N.; PAŠTI, I. A.; TRCHOVÁ, M.; ZASONÍSKA, B. A.; STEJSKAL, J.; BOBER, P. MATERIALS Derived from Poly (aniline-co-p-phenylenediamine) Cryogels. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 11, 2020.

- Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. Biologically active hen egg components in human health and disease. **The Journal of Poultry Science**, v. 41, n. 1, p. 1-29, 2004.
- 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.
- MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 75-83, 2019.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p. 2001.
- Moreno-Castilla, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**, v. 42, n. 1, p. 83-94, 2004.
- NASCIMENTO, I. S.; SILVA, D. L.; PEREIRA, T. B.; GONÇALVES, G. R. F.; VERÍSSIMO, L. A. A.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 1, p. 313-324, 2019.
- NASCIMENTO, R. F.; DE LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; DE QUADROS MELO, D.; RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**, 2014.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.
- NORDBORG, A.; HILDER, E. F.; HADDAD, P. R. Monolithic phases for ion chromatography. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 197-226, 2011.
- OLATUNJI, M. A.; KHANDAKER, M. U.; AMIN, Y. M.; MAHMUD, H. N. M. E. Cadmium-109 radioisotope adsorption onto polypyrrole coated sawdust of dryobalanops aromatic: kinetics and adsorption isotherms modelling. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164119, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. F.; NEVES, I. C. O.; SARAIVA, J. A. M.; DE CARVALHO, M. F. F.; BATISTA, G. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; RESENDE, J. V. D. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, p. 1-13, 2019.
- OZER, B. B. P.; UZ, M.; OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging films. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 877-886, 2016.
- PAIVA, T. S. **Desenvolvimento e estudo termodinâmico de um adsorvente macroporoso hidrofóbico funcionalizado com radical butil**. 2019. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA.
- PALKOVSKÁ, M.; SLOVÁK, V.; ŠUBRT, J.; BOHÁČEK, J.; HAVLÍN, J. Thermal decomposition of a peroxopolytitanic acid cryogel: TA/MS study. **Thermochimica Acta**, v. 647, p. 1-7, 2017.
- PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND, M. L.; DUPPER, Courtney M. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 7, p. 2133–2145, 2013.

- PHILLIPS, D. C. The hen egg-white lysozyme molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 483-495, 1967.
- 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, 129-137, 2004b.
- 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.
- RABIEIZADEH, M.; KASHEFIMOFRAD, S. M.; NAEIMPOOR, F. Monolithic molecularly imprinted cryogel for lysozyme recognition. **Journal of separation science**, v. 37, n. 20, p. 2983-2990, 2014.
- REICHEL, S.; BECHER, J.; WEISSER, J.; PRAGER, A.; DECKER, U.; MÖLLER, S.; SCHNABELRAUCH, M. Biocompatible polysaccharide-based cryogels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 164-170, 2014.
- REN, C. S.; WANG, D. Z.; WANG, Y. N. Graft co-polymerization of acrylic acid onto the linen surface induced by DBD in air. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 6, p. 2867-2870, 2006.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. **Química de alimentos**. Editora Blucher, 2007.
- RUSCHEL, C. F. C.; HUANG, C. T.; SAMIOS, D.; FERRÃO, M. F. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blndas de biodiesel/diesel. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 810-815, 2014.
- SAHINER, N. Super macroporous poly (N-isopropyl acrylamide) cryogel for separation purpose. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 29, n. 8, p. 2184-2191, 2018.
- SAHINER, N.; DEMIRCI, S. Conducting semi-interpenetrating polymeric composites via the preparation of poly (aniline), poly (thiophene), and poly (pyrrole) polymers within superporous poly (acrylic acid) cryogels. **Reactive and Functional Polymers**, v. 105, p. 60-65, 2016.
- SAHINER, N.; YILDIZ, S.; SAHINER, M.; ISSA, Z. A.; AL-LOHEDAN, H. Macroporous cryogel metal nanoparticle composites for H₂ generation from NaBH₄ hydrolysis in seawater. **Applied Surface Science**, v. 354, p. 388-396, 2015.
- SAMISTRARO, G.; DE MUNIZ, G. I.; PERALTA-ZAMORA, P.; CORDEIRO, G. A. Estimation of physical properties of kraft paper by near infrared spectroscopy an partial least squares regression. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1422-1425, 2009.
- SAVINA, I.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v.46, 9596-9603, 2005.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações. In: **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. 1996.

SILVA, C.; TASSI, E.; PASCOAL, G. **Ciência dos Alimentos: princípios de bromatologia**. Editora: Rubio, 248p. Rio de Janeiro, 2016.

SILVA, J. F. **Otimização da imobilização de carboidratos em matrizes macroporosas para a purificação de lectinas por afinidade**. 2018.

SILVA, J. F.; FONTAN, R. C. I.; BATISTA, A. S.; SILVA, D. L.; FILHO, D. F.; FLORES, M. P. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; NASCIMENTO, I. S. Síntese e caracterização por FTIR de colunas monolíticas macroporosas funcionalizadas pelo método do glutaraldeído para purificação por afinidade. **57º Congresso Brasileiro de Química**. 2017.

SILVETTI, T.; BRASCA, M.; LODI, R.; VANONI, L.; CHIOLERIO, F.; DE GROOT, M.; BRAVI, A. Effects of lysozyme on the microbiological stability and organoleptic properties of unpasteurized beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 1, p. 33-40, 2010.

SING, K. S.; ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J. **Adsorption By Powders and Porous Solids: Principles, Methodology, and Applications**. Academic Press, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental** 2008.

SOLEYMANI, M.; AKBARI, A.; MAHDAVINIA, G. R. Magnetic PVA/laponite RD hydrogel nanocomposites for adsorption of model protein BSA. **Polymer Bulletin**, v. 76, n. 5, p. 2321-2340, 2019.

SOUSA, R. D. C. S. D.; COIMBRA, J. S. D. R.; AUGUSTO, L. D. L. X.; REIS, L. S. T Adsorption of alpha-lactalbumin from milk whey on hydroxyapatite: effect of ph and temperature and thermodynamic analysis. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 950-955, 2014.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Teaching Experiment of Chemometrics oor Exploratory Analysis of Edible Vegetable Oils by Mid Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis: A Tutorial. Part I. **Química Nova**, 2012.

THAMMASIRIRAK, S.; PONKHAM, P.; PREECHARRAM, S.; KHANCHANUAN, R.; PHONYOTHEE, P.; DADUANG, S.; SRISOMSAP, C.; ARAKI, T.; SVASTI, J. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 209-217, 2006.

TORREGGIANI, A.; TAMBA, M.; MANCO, I.; FARAONE-MENNELLA, M. R.; FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Radiation damage of lysozyme in a biomimetic model: some insights by Raman spectroscopy. **Journal of molecular structure**, v. 744, p. 767-773, 2005.

VERÍSSIMO, L. A. A., PAGANOTO, F. S., MOL, P. C. G., ILHÉU FONTAN, R. D. C., MINIM, V. P. R., & MINIM, L. A. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1973-1982, 2017.

XIA, Y. Q., GUO, T. Y., SONG, M. D., ZHANG, B. H., & ZHANG, B. L. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2601-2606, 2005.

YANG, C.; ZHANG, Y.; CAO, W. Q.; YAN, Y. N.; WANG, J.; JI, X. F.; WANG, Y. Ice squeezing induced multicolor fluorescence emissions from polyacrylamide cryogels. **Journal of fluorescence**, v. 28, n. 1, p. 337-345, 2018.

Yang, X.; Debeli, D. K.; Shan, G.; Pan, P. Selective adsorption and high recovery of La³⁺ using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122335, 2020.

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.

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

YILMAZ, F.; BERELI, N.; YAVUZ, H.; DENIZLI, A. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 272-279, 2009.

ZHAO, Y.; LI, X.; YU, L.; DONG, X.; SUN, Y. Lysozyme adsorption to cation exchanger derivatized by sequential modification of poly (ethylenimine)-Sepharose with succinic anhydride and ethanolamine: Effect of pH and ionic strength. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2019.

ZHENG, J.; HE, X.; CAI, C.; XIAO, J.; LIU, Y., CHEN, Z.; LIN, X. Adsorption isotherm, kinetics simulation and breakthrough analysis of 5-hydroxymethylfurfural adsorption/desorption behavior of a novel polar-modified post-cross-linked poly (divinylbenzene-co-ethyleneglycoldimethacrylate) resin. **Chemosphere**, v. 239, p. 124732, 2020.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, 2003.