



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

Área De Concentração: *Engenharia de Alimentos*

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ADSORVENTES
MONOLÍTICOS MACROPOROSOS PARA A PURIFICAÇÃO DE
BROMELINA.**

RUI GOMES NASCIMENTO

**ITAPETINGA – BA
ABRIL DE 2021**

RUI GOMES NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ADSORVENTES
MONOLÍTICOS MACROPOROSOS PARA A PURIFICAÇÃO DE
BROMELINA.**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos, área de
concentração em Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –
UESB.

ORIENTADOR:

Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

CO-ORIENTADORES:

Prof. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. DSc. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA-BA

ABRIL 2021

543
N198d

Nascimento, Rui Gomes.

Desenvolvimento e caracterização de adsorventes monolíticos macroporosos para a purificação de bromelina. / Rui Gomes Nascimento. – Itapetinga-BA: UESB, 2021.

134f.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e coorientação da Profª. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Enzimas – Purificação. 2. Abacaxi – Polpa – Produção de adsorvente. 3. Adsorventes monolíticos macroporosos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

CDD(21): 543

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Bromelina – Enzimas - Purificação
2. Adsorventes - Purificação de bromelina
3. Criogel - Cromatografia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS PARA A PURIFICAÇÃO DE BROMELINA.

Autor (a): RUI GOMES NASCIMENTO

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

Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Renata Cristina Ferreira Bonomo
Prof. Dr. Leandro Soares Santos

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



Prof^ª. Dr^ª. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Membro Externo - UFLA



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



Prof^ª. Dr^ª. Simone Andrade Gualberto
Membro Externo - UESB



Prof. Dr. Luis Antonio Minim
Membro Externo - UFV



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

Itapetinga-BA, 09 de abril de 2021.

“Você não pode colocar um limite em nada. Quanto mais você sonha, mais longe você chega.”

Michael Phelps

Agradecimento

Ao meu bom Deus, por guiar minha vida, iluminar meus caminhos e permitir-me superar todos os obstáculos para o alcance dessa vitória e a minha rainha Maria, que se faz presente em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Ney e Áurea, e a minha irmã Nicolle, pelo apoio integral, pelas orações e por manter nossa relação sempre tão especial. Muito do que faço e tudo o que sou, é por causa desse amor.

À minha namorada Carolina, por todo amor e companheirismo. Sua presença sempre me gerou inspiração pra alcançar esse objetivo.

Agradeço imensamente ao meu orientador Rafael Fontan por todo suporte, paciência, confiança, apoio e orientação. Deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos pela sua compreensão, principalmente no último ano. Sem essa compreensão, eu não conseguiria concluir esta etapa. Por fim e mais importante, agradeço pela construção de uma verdadeira amizade.

A todos os amigos, pelo incentivo e parceria de sempre. Com vocês a jornada se torna divertida. Não vou citar nomes, para não esquecer de ninguém rsrs

Aos grandes amigos (que se encaixam também no paragrafo acima) que me acompanharam nesta jornada acadêmica, especialmente Gabriel, Olga e Márjorie, que se fizeram presentes na construção e desenvolvimento do experimento. Obrigado pelo apoio, companheirismo, paciência e prestatividade

Um agradecimento em especial ao professor e grande amigo Leandro Soares, que me inseriu ao meio acadêmico e me ajudou a alcançar grandes conquistas. Você sabe o quanto sou grato a ti.

Aos professores Renata Bonomo, Evaldo e Cristiane Veloso por todo apoio, atenção dispensada, disponibilidade e sugestões criativas.

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

A todos os funcionários do modulo de laboratório, grande abraço!

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

Aos professores presentes na banca, pela disponibilidade e futuras correções/sugestões.

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

RESUMO

NASCIMENTO, Rui Gomes, D.Sc., Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, abril de 2021. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ADSORVENTES MONOLÍTICOS MACROPOROSOS PARA A PURIFICAÇÃO DE BROMELINA.**

A purificação de biomoléculas, em especial macromoléculas, desperta cada vez mais o interesse de pesquisadores em todo o mundo devido ao potencial de uso das mesmas. Para isso, novas técnicas e materiais vêm sendo desenvolvidos, como os criogéis poliméricos, considerados a nova geração de matrizes para os processos cromatográficos. Os criogéis permitem a produção de colunas monolíticas cromatográficas com elevada porosidade e com poros grandes o suficiente para permitir a passagem até mesmo de células inteiras, o que é altamente desejável para a purificação de macromoléculas a partir de meios viscosos e/ou não clarificados. Apesar do crescente interesse nos criogéis, estudos envolvendo as condições de equilíbrio e a dinâmica do deslocamento de fluidos são insuficientes para se caracterizar completamente essa classe de adsorventes. Assim sendo, neste trabalho um novo adsorvente que utiliza a interação hidrofóbica e outro que utiliza a afinidade por íons metálicos imobilizados voltado para a purificação da enzima bromelina a partir da polpa do fruto abacaxi, foi produzido e caracterizado sob diversos aspectos, dentre eles a estrutura física e as relações de equilíbrio de adsorção, bem como o efeito da temperatura e força-iônica da fase móvel nessas reações, o que permitiu compreender melhor o mecanismo de adsorção da bromelina nesses adsorventes. Por fim, os leitos produzidos foram empregados com êxito na purificação da bromelina diretamente do extrato do abacaxi com um mínimo preparo da solução de alimentação e em apenas duas etapas cromatográficas.

Palavras-chave: criogel, enzima, purificação

Orientador: Rafael da Costa Ilheu Fontan.

Coorientadores: Renata Cristina Ferreira Bonomo e Leandro Soares Santos.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Rui Gomes, D.Sc., Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, april de 2021. **DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MACROPORATE MONOLITHIC ADSORVENTS FOR PURIFICATION OF BROMELINE.**

The purification of biomolecules, especially macromolecules, is increasingly attracting the interest of researchers around the world due to the potential for their use. For this, new techniques and materials have been developed, such as polymeric cryogels, considered the new generation of matrices for chromatographic processes. Cryogels allow the production of monolithic chromatographic columns with high porosity and pores large enough to allow even whole cells to pass through, which is highly desirable for the purification of macromolecules from viscous and / or unclear media. Despite the growing interest in cryogels, studies involving equilibrium conditions and fluid displacement dynamics are insufficient to fully characterize this class of adsorbents. Therefore, in this work a new adsorbent that uses hydrophobic interaction and another that uses affinity for immobilized metal ions aimed at the purification of the bromelain enzyme from the pulp of the pineapple fruit, was produced and characterized under several aspects, among them the structure physics and the adsorption equilibrium relationships, as well as the effect of temperature and ionic strength of the mobile phase in these reactions, which allowed a better understanding of the adsorption mechanism of bromelain in these adsorbents. Finally, the beds produced were successfully used to purify bromelain directly from the pineapple extract with minimal preparation of the feed solution and in just two chromatographic steps.

Keywords: cryogel, enzyme, purification

Advisor: Rafael da Costa Ilheu Fontan.

Co-supervisors: Renata Cristina Ferreira Bonomo and Leandro Soares Santos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1. Bromelina	15
1.2. Purificação de biomoléculas por cromatografia.	18
1.3. Cromatografia de interação hidrofóbica	20
1.4. Cromatografia de afinidade	22
1.5. Criogéis poliméricos monolíticos	25
1.6. Criogéis ativados e funcionalizados por ligações covalentes.....	29
1.7. Funcionalização dos criogéis para interação hidrofóbica	31
1.8. Funcionalização de criogéis para interação de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).	32
1.9. Isotermas de Adsorção.....	33
1.10. Propriedades termodinâmicas	38
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPITULO 2	53
DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE MACROPOROSO HIDROFÓBICO FUNCIONALIZADO COM ANILINA.....	53
Resumo.....	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	56
2.1. Reagentes.....	56
2.2. Síntese dos criogéis monolíticos.	56
2.3. Funcionalização dos criogéis para o uso por interação hidrofóbica	57
2.4. Caracterização dos criogéis.	58
2.5. Obtenção das isotermas de adsorção	60
2.6. Determinação das propriedades termodinâmicas.....	62
2.7. Avaliação de ciclos experimentais de reutilização	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1. Síntese dos criogéis.	63
3.2. DTR, dispersão axial, HETP.	65

3.3.	Permeabilidade ao escoamento.....	68
3.4.	Avaliações estruturais.	69
3.5.	Comportamento adsortivo.....	74
3.6.	Análise termodinâmica.....	77
3.7.	Avaliação do reuso das matrizes produzidas	80
4.	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS.....	82
CAPITULO 3	88
	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE MACROPOROSO DE AFINIDADE FUNCIONALIZADO COM COBRE (Cu²⁺).....	88
	Resumo.....	88
1.	INTRODUÇÃO	89
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	91
2.1.	Reagentes.....	91
2.2.	Síntese dos criogeis monolíticos	91
2.3.	Funcionalização dos criogéis com íons metálicos	92
2.4.	Avaliação da adsorção e do potencial de uso dos monólitos produzidos.	92
2.5.	Caracterização dos criogeis.....	93
2.6.	Obtenção das isotermas de adsorção	96
2.7.	Determinação da variação das propriedades termodinâmicas	97
2.8.	Avaliação do reuso das matrizes produzidas	97
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
3.1.	Descrição dos criogeis	98
3.2.	DTR, dispersão axial, HETP.	103
3.3.	Permeabilidade ao escoamento.....	106
3.4.	Análises estruturais	107
3.5.	Comportamento adsortivo.....	110
3.6.	Análise termodinâmica.....	112
4.	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS.....	116
CAPITULO 4	121
	PURIFICAÇÃO DE BROMELINA A PARTIR DE TÉCNICAS SEQUENCIAIS DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICAS E AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS.	121
	Resumo.....	121
1.	Introdução.....	122
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.	124
2.1.	Reagentes.....	124

2.2.	Preparação da solução de alimentação	125
2.3.	Determinação da concentração de proteínas totais e atividade enzimática.....	125
2.4.	Purificação da bromelina.....	126
2.5.	Purificação da bromelina em etapas sequenciais.	126
2.6.	Cálculo do fator de purificação e rendimento	127
3.	Resultados e discussões	128
	Referências.....	132

INTRODUÇÃO GERAL

A inovação de técnicas e metodologias para a separação e purificação de compostos de origem biológica, em especial proteínas, tem sido importante para os recentes avanços nas pesquisas de biotecnologia. O objetivo principal dos processos de purificação não é simplesmente a remoção de contaminantes indesejados, mas também a concentração do produto desejado e sua transferência para um meio onde seja estável e que mantenha suas características para a aplicação (ZHOU et al., 2020)

Uma das alternativas de purificação é a utilização de técnicas cromatográficas. Tais técnicas estão entre as mais utilizadas para purificação de proteínas. Porém a presença de biomoléculas de alta massa molar e tamanho desafia os limites dos métodos cromatográficos tradicionais (KIRCHERT et al., 2019). Para superar esses inconvenientes, vem ocorrendo o desenvolvimento de materiais monolíticos poliméricos macroporosos, que permitem a separação de grandes biomoléculas e até mesmo de células inteiras de materiais não clarificados (NASCIMENTO et al., 2019).

Destacam-se entre os monolitos poliméricos macroporosos os criogéis, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização. São caracterizados por possuírem elevada porosidade com poros grandes (diâmetro acima de 10 micrometros). Esses compostos são versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e apresentam baixo custo se comparados a matrizes tradicionais na cromatografia. Além disso, apresentam alta estabilidade química e mecânica, e resistência aos ciclos de uso e esterilização (GONÇALVES et al., 2016; VERISSIMO et al., 2017; FONTAN et al., 2018; NASCIMENTO et al. 2019; DA SILVA et al., 2019)

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis, os grandes poros fazem com que sua área superficial para adsorção e conseqüentemente a sua capacidade, seja significativamente menor quando comparadas a um leito fixo empacotado. Para contornar esses problemas, o estudo das modificações na superfície dos criogéis é uma área promissora e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações químicas e/ou físicas podem ser feitas na matriz do criogel para aumentar a sua seletividade conforme o produto de interesse a ser purificado, visando aumentar a eficiência dos processos de separação (GONÇALVES et al., 2016; VERISSIMO et al., 2017; FONTAN et al., 2018; NASCIMENTO et al. 2019; DA SILVA et al., 2019).

Entre as possíveis modificações, está a funcionalização com compostos hidrofóbicos e com íons metálicos, para a utilização destas matrizes em técnicas de cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) e cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), respectivamente. A técnica de CIH se baseia na afinidade diferencial, onde os compostos hidrofóbicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por grupamentos apolares expostos na superfície de biomoléculas anfipáticas (BONOMO et al., 2006). Já a técnica IMAC explora a interação entre grupos doadores de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelatados imobilizados em um suporte sólido. Um exemplo dessa técnica seria a afinidade diferencial que os compostos metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam pelos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes em enzimas e proteínas que estejam em solução (CARVALHO et al., 2016).

Nos processos de purificação de proteínas/enzimas, a cromatografia de interação hidrofóbica é uma das técnicas de cromatografia mais utilizada devido à rapidez de separação, com baixa degradação do produto e pequena quantidade de solvente, conduzindo a um elevado grau de purificação (MUCA et al., 2017). Já a técnica de IMAC vem sendo muito utilizada em purificação de proteínas de origem natural ou recombinante, mas os estudos com proteases ainda são limitados, abrindo grandes possibilidades nesse segmento (UEDA et al., 2003; HAGEL et al., 2008; BRESOLIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2016; LYNCH et al., 2019).

As proteases são enzimas que atuam na hidrólise de outras proteínas. São encontradas naturalmente em diversos organismos animais, vegetais e microbianos, além de serem produzidas a partir de técnicas recombinantes. Representam cerca de 60% da produção mundial de enzimas, sendo usadas em diversos segmentos das indústrias de alimentos, química e farmacêutica. Entre as diversas proteases já identificadas, estão a papaína e a bromelina, obtidas naturalmente do mamão e abacaxi, respectivamente. São encontradas em diversas partes dessas plantas, como, folhas, caule e epicarpo dos frutos, incluindo partes menos nobres, não aproveitadas no seu processamento. O uso de resíduos agroindustriais do processamento de frutas constitui uma fonte de proteases de baixo custo, que além de contribuir para a destinação mais adequada deste resíduo, contribui para a agregação de valor à cadeia produtiva, o que, potencialmente, pode gerar uma série de benefícios econômicos, ambientais e sociais (DORNELLES et al., 2018).

Para a obtenção de proteases purificadas, alguns métodos podem ser aplicados, como a precipitação com etanol e sais (GENTIL, 2014), extração com sistemas aquosos bifásicos (BARROS, 2015), filtração em gel (CLEMENTINO et al., 2019) e troca iônica (ALVES et al., 2017). No entanto, a cromatografia por interação hidrofóbica e de afinidade são opções efetivas para se obter um grau de pureza mais elevado, além da maior manutenção da atividade catalítica das enzimas se comparada a técnicas tradicionais de precipitação e cristalização (CARVALHO et al., 2016; WU et., 2020). O desenvolvimento de novos adsorventes de menor custo e a utilização de resíduos para a obtenção de proteases de origem vegetal constituem uma iniciativa para a agregação de valor à cadeia produtiva de frutas já comercialmente exploradas.

Assim, o objetivo na realização deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e aplicar novas colunas monolíticas poliméricas macroporosas em um processo de purificação de uma protease presente no abacaxi, a bromelina, a partir de um meio parcialmente clarificado. Para isso, a presente tese foi dividida em 4 partes visando ao melhor detalhamento de cada um dos aspectos avaliados.

Na primeira parte, foi descrita por meio de uma revisão de literatura, todos os conceitos necessários para a execução, entendimento e discussão do experimento.

Na segunda parte, a qual já foi tramitada o pedido para o depósito de uma patente de invenção, se propôs um inédito processo de funcionalização de um criogel polimérico monolítico para utilização em cromatografia de interação hidrofóbica. Para esta inovação, foram avaliados os aspectos associados à sua capacidade adsortiva, bem como características físicas do material produzido, que estão descritos no Artigo 2 deste trabalho. Foram determinadas ainda as isotermas de adsorção de uma proteína modelo, sob diferentes condições de temperatura e força iônica da fase móvel. Além disso, foram avaliados de acordo com fundamentos termodinâmicos, os efeitos do fenômeno de adsorção da proteína dentro do processo de interação hidrofóbica como um todo.

Na terceira parte (Artigo 3) foi descrito o processo de síntese de um criogel polimérico monolítico e sua funcionalização para o uso por afinidade por metais imobilizados, sendo também avaliados os aspectos associados à sua capacidade adsortiva, bem como características físicas do material produzido. Foram determinadas as isotermas de adsorção da "*Bovine Serum Albumin*" (BSA) no criogel produzido, sob diferentes condições de temperatura e também foram avaliados de acordo com fundamentos

termodinâmicos, os efeitos do fenômeno de adsorção da proteína dentro do processo de afinidade como um todo.

Por fim, foi avaliada a aplicação dos adsorventes monolíticos desenvolvidos para a purificação da bromelina presente na polpa do abacaxi, abordando-se aspectos relacionados à pureza e rendimento do produto obtido descritos no Artigo 4.

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é o mais conhecido (NADIZARAH et al., 2013). Esta proteína possui as seguintes características:

- São proteínas digestiva que pode ser categorizada como uma protease, que pertence ao grupo de enzimas que têm a função catalítica de hidrolisar as ligações peptídicas de proteínas (TAP et al., 2016).
- São enzimas sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica (BALDINI et al., 1993). Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos, e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática (TAP et al., 2016).
- São semelhantes em função à papaína e à ficina e sua atividade enzimática é dependente do grupo tiol de um resíduo de cisteína no seu sítio ativo (AMID et al., 2011).

A bromelina é naturalmente extraída do abacaxi e de suas partes não comestíveis, normalmente consideradas como resíduos na indústria. No entanto, não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta, rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo (NOR et al., 2016). (RAMLI et al., 2017).

Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. Por exemplo, no mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Este fato se torna uma das vantagens da utilização e purificação das proteases do abacaxi.

Como visto, a bromelina é encontrada em toda a planta do abacaxizeiro: caule, raízes, folhas e frutos e coroa. A bromelina procedente do talo do abacaxi (código EC 3.4.22.32, anteriormente designada como EC 3.4.22.4, de acordo com o Enzyme Commission,) apresenta massa molecular média de 24,5 kDa, com ponto isoelétrico igual a 9,5 sendo a mais abundante protease entre as preparações derivadas do abacaxi. Já a bromelina do fruto do abacaxi (EC 3.4.22.33, anteriormente designada como EC 3.4.22.5) apresenta massa molecular média de 31 kDa, com ponto isoelétrico igual a 4,6, e está presente em menor quantidade (WU et al., 2017).

A sequência de aminoácidos da bromelina foi determinada por Ritonja e colaboradores, em 1989. As composições de aminoácidos da bromelina do fruto, de frutos maduros e verdes são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição de aminoácidos da bromelina da polpa do abacaxi

	Fruto verde (mg/100g)	Fruto Maduro (mg/100g)
Lisina	1.5	1.8
Histidina	1.3	1.4
Arginina	79.7	90.5
Ácido Aspártico	2.7	2.5
Tirosina	13.8	13.4
Serina	32.2	32
Prolina	1.4	1.5
Glicina	32.6	32
Alanina	23.8	24.4
Cisteína	10.0	10.0
Valina	19.8	20.1
Metionin	-	-
Isoleucina	16.4	16.2
Leucina	20.3	21.0
Tirosina	22.4	22.2
Fenilalanina	7.6	8
Triptofano	501.0	604.0

Fonte: RITONJA et al., 1989.

Diante de todas essas informações, as preparações comerciais de bromelina ainda são avaliadas de acordo com sua atividade proteolítica, uma vez que todos os usos dessa enzima estão baseados em sua atividade, à qual é avaliada em condições ótimas. A atividade de bromelina pode ser determinada em condições ótimas de pH, e temperatura, com vários substratos, que incluem, caseína, gelatina e substratos sintéticos (BALA et al., 2012).

A bromelina do caule é muito estável, o que permite que a enzima mantenha sua atividade biológica a temperaturas entre 40 e 60°C, na qual a maioria das enzimas é desnaturada (COELHO et al., 2014). Entre o pH 5,5 e 8,0, a atividade enzimática da bromelina é mantida (PAVAN et al., 2012), mas em condições de estresse, como temperatura elevada, presença de solventes orgânicos e químicos, pode ocorrer um decréscimo da atividade (SOARES et al., 2012). Em relação à bromelina derivada do abacaxi, verificou-se que a enzima do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos. A atividade proteolítica da bromelina derivada do fruto mostrou-se estável entre pH 4,0 - 8,0 e à temperatura de 30°C - 70°C (BALA et al., 2012). Diante dessa ampla faixa de atividade, a bromelina pode ser utilizada para diversas finalidades.

A enzima bromelina tem funções úteis para as indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil (NOR et al., 2016; WU et al., 2017). Na indústria alimentícia, é utilizada na produção de amaciantes de carnes, em processos de panificação, produção de queijos, clarificação de cerveja, prevenção do escurecimento do suco de maçã, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, preparo de biscoitos a partir de farinha de trigo com alto teor protéico, produção de ovos desidratados, leite de soja e isolados proteicos. O Food and Drug Administration (FDA) qualificou bromelina como “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS). A bromelina proveniente do abacaxi possui efetiva ação amaciante de carnes. Esta enzima proteolítica causa hidrólise geral de todos os componentes estruturais do músculo da carne bovina, principalmente em proteínas miofibrilares como a actina e miosina. (COELHO et al., 2014). Na indústria de panificação, a bromelina melhora o relaxamento da massa, permitindo que ela aumente de volume uniformemente e sendo usada na produção de farinha hipoalergênica, apropriada para pacientes alérgicos ao trigo (ARSHAD et al., 2014).

A bromelina também tem sido estudada em aplicações na indústria cosmética e de higiene como ingrediente ativo em dentifrícios e produtos de pele, tratamento de acne,

rugos e pele seca (ARSHAD et al., 2014). É usada como ingrediente ativo para fornecer efeitos de *peeling* (BALA et al., 2013) e como agente de limpeza (CHAURASIYA et al., 2013). Esta enzima é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como ativo para o tratamento de doenças inflamatórias, distúrbios intestinais, doenças relacionadas com a coagulação do sangue (NOR et al., 2015), como agente fibrinolítico (CHAURASIYA et al., 2013), tratamento oral para queimaduras de terceiro grau (BERNELA et al., 2016), aplicação terapêutica de anticorpos (TAP et al., 2016) e ação mucolítica (COSTA et al., 2014).

Em indústrias têxteis, a bromelina é usada para melhorar as propriedades de tingimento de fibras proteicas, decompondo a fibra parcialmente (BALA et al., 2013). Muitas aplicações têm sido estudadas e com o aumento do emprego da bromelina, amplia-se o interesse em determinar métodos viáveis de extração e purificação dessa enzima (COSTA et al., 2014).

Dessa forma, a bromelina comercial assim como todas as biomoléculas purificadas são produtos de alto valor agregado e isso se deve aos altos custos dos processos atualmente disponíveis para a sua purificação e obtenção, o que tem levado ao desenvolvimento de várias estratégias de purificação (COSTA, 2014), como extração líquido-líquido, sistemas micelares, precipitação, técnicas cromatográficas e processos por membranas.

1.2.Purificação de biomoléculas por cromatografia.

As biomoléculas são compostos presentes nas células de todos os seres vivos. São em geral moléculas orgânicas, compostas principalmente de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Cada biocomposto macromolecular é composto de subunidades que determinam características estruturais e arranjos específicos dentro da célula. As proteínas por exemplo, são biomoléculas compostas por subunidades de aminoácidos, os lipídios são biomoléculas compostas por subunidades de ácidos graxos e gliceróis, e os carboidratos são compostos por subunidades de monossacarídeos. Devido à essas características específicas que cada biocomposto apresenta, é necessário que as estratégias de purificação das biomoléculas sejam adequadas às propriedades individuais do produto, com a finalidade de se atingir alto grau de pureza e elevadas taxas de recuperação, conservando a atividade da molécula alvo. (GONDIM et al., 2017)

Nesse sentido, é inegável que a purificação e recuperação de uma biomolécula não é uma tarefa simples, uma vez que estão envolvidos diversos aspectos técnicos e econômicos para tornar o processo viável. Diversas operações unitárias são utilizadas para esse propósito, incluindo a filtração, centrifugação, precipitação e cristalização. No entanto, a cromatografia é a técnica que mais se destaca, por apresentar alto grau de separação de biomoléculas, sem que as mesmas percam suas características essenciais. Devido a isso, a popularidade e utilização dos sistemas cromatográficos vêm sendo constantemente debatidos (COLLINS, 1997; CAVALCANTI, 2010; HE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016; GONDIM et al., 2017; KIRCHERT et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

Um sistema cromatográfico compreende duas fases: uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio de separação baseia-se na diferença de interação dos componentes da mistura (fase móvel) com a fase estacionária. Essa diferença resulta em migrações diferenciais dos compostos de interesse, permitindo assim separá-los (COLLINS et al., 1997; HOGAN et al., 2016).

A adsorção em leito expandido permite o uso de alimentação que contém material particulado, que por consequência reduz a necessidade de clarificação inicial do meio e minimiza o número de etapas do processo, evitando a perda de atividade da biomolécula. Em contrapartida, esse método cromatográfico exige tipos especiais de colunas e acessórios que não podem ser instalados em sistemas tradicionais de cromatografia (HE et al., 2015). Já o leito fixo apresenta elevada eficiência e é uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos. Porém, a presença de grandes biomoléculas e materiais altamente concentrados desafiam a capacidade e produtividade da transferência de massa (MACHADO et al., 2015). Para contornar os problemas presentes no leito fixo, em especial os problemas de transferência de massa, vem crescendo o interesse dos pesquisadores por diferentes fases móveis e estacionárias disponíveis. Tais fases possibilitam explorar as diferentes características físico-químicas das biomoléculas e assim separá-las por meio da diferença do tamanho, carga, afinidade e hidrofobicidade (PERÇIN et al., 2015).

1.3.Cromatografia de interação hidrofóbica

Na busca por novos suportes cromatográficos, pesquisadores têm estudado e explorado características hidrofóbicas das biomoléculas e o potencial da cromatografia de interação hidrofóbica para separá-las (ZHOU et al., 2020). Inúmeros exemplos do uso da cromatografia de interação hidrofóbica na purificação de biomoléculas podem ser verificados na literatura.

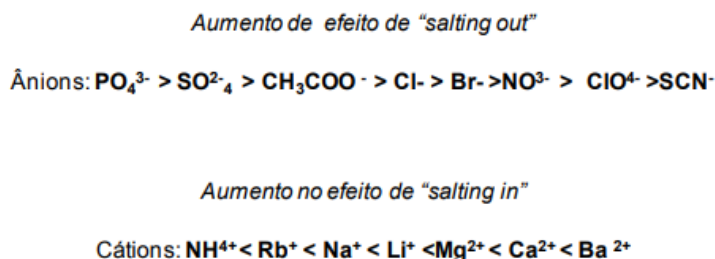
BONOMO et al.(2006), estudou o processo de adsorção das proteínas albumina do soro bovino (BSA) e β -lactoglobulina (β -lg), provenientes do soro do queijo, em cromatografia de interação hidrofóbica variando as condições de temperatura e concentração de sal. LI et al.(2010), sintetizaram monólitos rígidos a partir de poli(etileno) contendo diferentes comprimentos de cadeias de etilenoglicol e modificaram a superfície, com o intuito de atuarem como colunas de cromatografia de interação hidrofóbica na adsorção de proteínas. Já WU et al. (2014), utilizou butil-acrilato contendo copolímero de poli (N-isopropilacrilamida) enxertado em papel de filtro para preparar uma membrana de interação hidrofóbica (HIMC) para separação de proteínas. MUCA et al. (2017), utilizaram uma coluna de adsorção para reter albumina sérica bovina (BSA) e α -lactalbumina por interação hidrofóbica sob diferentes condições de concentração de sal. CAO et al. (2019), desenvolveram duas metodologias para produção de colunas cromatográficas de interação hidrofóbica, utilizadas para purificar proteínas.

Como pôde ser observado, nos processos de purificação de proteínas, a cromatografia de interação hidrofóbica é uma das metodologias mais utilizadas, devido à rapidez de separação e baixa degradação do produto, conduzindo a um elevado grau de purificação. Esta técnica tem como base o ganho entrópico do sistema proteico, devido à remoção da água estruturada nos domínios hidrofóbicos presentes na estrutura da proteína e adicionalmente pelo aumento da força iônica no meio, através do efeito da adição de sal neutro, por exemplo, o sulfato de sódio, que apresenta íons do tipo “salting-out” (CAO et al., 2019). Isto faz com que os sais atraiam as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas protéicas o que acarreta na diminuição da solubilidade e exposição de grupamentos apolares. Estes grupos apolares normalmente ficam na parte interna das estruturas das proteínas quando em meio aquoso (CAO et al., 2019).

É importante ressaltar que as características da fase estacionária e da fase móvel podem afetar o processo de separação. Com relação às diferentes fases estacionárias, as mesmas diferem entre si principalmente pela natureza dos ligantes imobilizados na matriz (MUCA et al., 2017). Os ligantes mais usados na cromatografia de interação hidrofóbica são os alcanos de cadeia linear com ou sem um grupo amino terminal. Segundo QUEIROZ et al. (2001) o fenil e outros compostos aromáticos são também usados como ligantes, apresentando bons resultados. A fase móvel deve ter características tais como tipo e concentração de sal, pH e temperatura que favoreçam a interação da proteína, presente na fase líquida, com o adsorvente (ZHOU et al., 2020).

Na CIH, uma fase móvel com alta concentração salina favorece a adsorção de proteínas e o decréscimo da concentração salina favorece a dessorção (MELANDER E HORVÁTH, 1977). As interações hidrofóbicas são potencializadas diante de sais que favorecem a precipitação de proteínas, cujo fenômeno é denominado “salting-out”. Estes íons estão ordenados de acordo com série de Hofmeister para a precipitação de proteínas em soluções aquosas (Figura 1).

Figura 1. Série de Hofmeister de desnaturação de proteínas.



Fonte: HOFMEISTER, 1988.

Esta série foi elaborada por HOFMEISTER em 1988 levando em consideração a influência de diferentes íons no comportamento de proteínas em sistemas aquosos. Os íons foram classificados como cosmotrópicos ou caotrópicos, de acordo com sua capacidade de alterar a ligação de hidrogênio da molécula de água. Os íons chamados de cosmotrópicos, agrupados no início da série, promovem a interação hidrofóbica, geram altas densidades de carga que levam a forte interferência na ligação de hidrogênio resultando no redirecionamento das moléculas de água na camada de hidratação hidrofóbica ao redor da proteína para o seio da solução. Eles promovem o efeito “salting-out” nas proteínas e macromoléculas. Já os íons denominados caotrópicos, do final da

série de Hofmeister, quebram as estruturas da água, e geram baixas densidades de carga que levam a pequenos efeitos na ligação hidrogênio e redirecionam as moléculas de água do seio da solução para a camada de hidratação ao redor da proteína. Os íons caotrópicos desfavorecem as interações hidrofóbicas e adsorção em fases estacionárias com ligantes hidrofóbicos. Estes íons aumentam a solubilidade das proteínas, fenômeno denominado “salting-in”

Outro fator que influencia a seletividade em adsorção de proteínas é a concentração de sal (MUCA et al., 2017). Em CIH, o uso de alta concentração de sal no tampão de equilíbrio e solução da amostra promove as interações entre o ligante-proteína e, conseqüentemente, aumenta a retenção das proteínas. A quantidade de proteína ligada aumenta quase linearmente com o aumento da força iônica (CAO et al., 2019).

A temperatura é outro fator que afeta a CIH. Em geral, pode-se afirmar que o aumento da temperatura eleva a retenção de proteínas. Essa elevação só ocorre até o momento em que a temperatura faz a proteína expor ao máximo seus grupamentos hidrofóbicos. (BONOMO et al., 2006). Ou seja, o aumento da temperatura faz com que a proteína altere sua estrutura secundária e/ou terciária e seu arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica é modificado, fazendo com que exponha suas partes hidrofóbicas. HJERTEN et al. (1974), BONOMO et al. (2006) e MUCA et al. (2017) demonstraram que retenção da proteína geralmente aumenta com a temperatura. Além disso, um aumento na temperatura pode ocasionar aumento de energia cinética e na mobilidade das espécies do adsorvato, e ainda provocar um aumento na taxa de difusão intrapartícula do mesmo. Desta forma, a alteração na temperatura conduz a uma mudança na capacidade de adsorção (Horner et al., 2019)

1.4.Cromatografia de afinidade

Suportes cromatográficos também podem ser funcionalizados para aplicações baseadas em interações de afinidade. A cromatografia por afinidade engloba um conjunto de técnicas usadas para a purificação de biocompostos, em especial proteínas, baseada em maior seletividade devido a características específicas que estas apresentam. Com isso, mecanismos de ligação específicos são utilizados, garantindo maior eficiência e especificidade nos processos de separação (HAGEL et al., 2008., HAGE, 2011). Os processos em cromatografia de afinidade consistem basicamente em percolar uma

amostra por sobre uma fase estacionária adsorvente contendo os pares específicos de ligação previamente equilibrada pela fase móvel para se conseguir as melhores condições de interação. As moléculas do soluto presente na amostra interagem seletivamente com os pares imobilizados, sendo retidos na fase estacionária. (LYNCH et al., 2019).

A fase móvel em geral é aquosa e comumente tamponada em valores de pH ótimos para promover a ligação específica com o par imobilizado. Para a eluição dos compostos retidos, a fase móvel é alterada, mudando-se o tipo de tampão, por um incremento na força iônica, mudanças de pH ou adição de solventes orgânicos. É comum ainda o uso de agentes caotrópicos, como a uréia e a guanidina, que alteram o arranjo conformacional das macromoléculas. (WANG et al., 2018).

A fase estacionária deve ser estável às variações de vazão, pressão, pH, polaridade, força iônica e ser a mais neutra possível evitando-se desse modo interações não específicas que venham a comprometer a seletividade da mesma. As mais comuns são resinas poliméricas sintéticas ou naturais, a base de agarose, celulose, poliacrilamida, entre outras. A imobilização dos grupos ligantes pode-se dar diretamente na superfície do adsorvente ou por meio de braços espaçadores, mantendo-os a certa distância da superfície (UYGUN et al., 2015).

Os grupos ligantes que podem ser utilizados definem a natureza da técnica cromatográfica de afinidade a ser usada. De maneira geral, eles se dividem em dois grandes grupos, baseado na especificidade do par ligante. São eles os ligantes de alta especificidade, que se ligam a um grupo mais restrito de moléculas, como, por exemplo, antígenos para anticorpos; e os ligantes gerais ou de especificidade em grupo, que se ligam a uma família de solutos sem distinção entre compostos individuais. É o caso de metais quelatos (CARVALHO et al., 2016).

1.4.1. Afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC)

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida em 1985 por PORATH et al. (1978), explora a afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida e grupamentos situados na superfície de uma proteína. Nesta técnica, o grupo ligante é um íon metálico, ligado em um agente quelante imobilizado e tem como princípio separar peptídeos e proteínas que contenham aminoácidos com grupos doadores de elétrons, como a histidina. A seletividade na IMAC depende do

agente quelante, em geral o ácido iminodiacético, e dos íons metálicos complexados, sendo os mais comuns o Cu^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} e Fe^{+3} (CARVALHO et al., 2016)

Segundo PORATH et al. (1985), na presença de íons metálicos imobilizados, baixa concentração de sal e determinadas condições de pH, os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína são fortemente adsorvidos. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, ou seja, atuam como base de Lewis. O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante (BRESOLIN et al., 2009).

Proteínas ou outros solutos introduzidos na fase móvel são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados, havendo também a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas. As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel) ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida (redução de pH). De forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de agentes competidores fortes, como o EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), sem que haja perda da capacidade da matriz (UEDA et al., 2003; CARVALHO et al., 2016).

Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e das condições cromatográficas. A estabilidade dos quelatos em uma ampla faixa de temperatura e condições da fase líquida é uma vantagem da técnica, pois, além de significar estabilidade operacional desejada em aplicações rotineiras (analítica e larga escala comercial), propicia também a reutilização dos mesmos, sem que haja perda de desempenho (BRESOLIN et al., 2009; UYGUN et al., 2015; WANG et al., 2018).

Desta forma, é possível perceber que os tipos de cromatografia abordados, são técnicas capazes de oferecer aplicação na purificação e separação de biomoléculas, sem

que ocorra deterioração ou perda da funcionalidade das mesmas. Devido a isso, diversos estudos vêm sendo feitos para a inovar na produção de novos materiais adsorventes e matrizes cromatográficas. Uma técnica que vem apresentando resultados promissores para a área em questão, é a criogeleificação polimérica.

1.5.Criogéis poliméricos monolíticos

Técnicas adsorptivas são utilizadas em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. Na maioria das vezes é utilizada a adsorção por leitos fixos tradicionais, os quais apresentam uma alta capacidade de saturação devido à elevada área superficial das partículas adsorventes. Entretanto, poros relativamente pequenos de colunas tradicionais, juntamente com soluções de alimentação altamente concentradas ou particuladas desafiam os limites dos leitos fixos convencionais em relação a sua capacidade e taxa de transferência. Para contornar esses problemas, em especial os problemas de transferência de massa, vem crescendo o interesse dos pesquisadores pelo desenvolvimento de colunas monolíticas macroporosas, que permitem que o processo ocorra a uma velocidade superficial comparável a cromatografia líquida de alta eficiência convencional e superior às utilizadas em leito expandido, utilizando baixas pressões. (HAHN et al., 2008; MACHADO et al., 2015; FONTAN et al., 2017; DA SILVA et al., 2019).

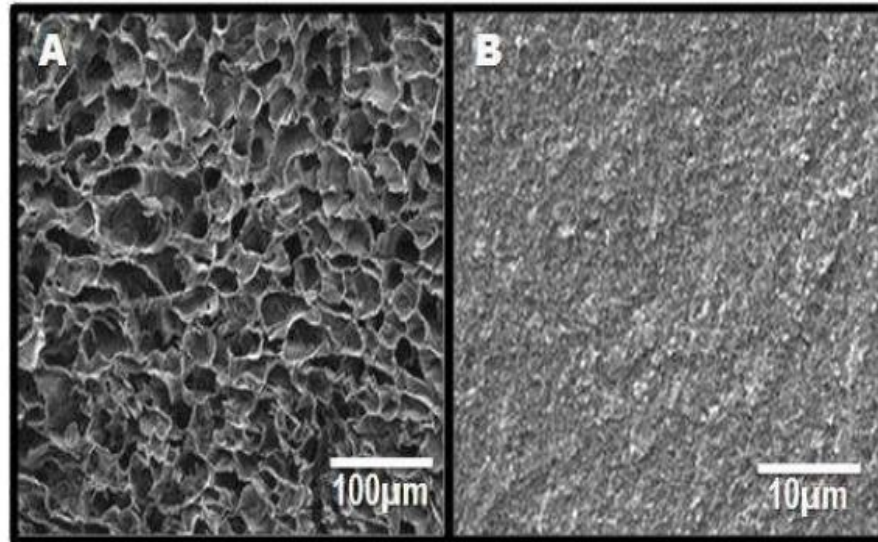
As colunas monolíticas poliméricas, também denominadas de materiais cromatográficos de quarta geração, estão entre os últimos avanços no setor de matrizes cromatográficas. Devido à estrutura de macroporos interconectados de grandes dimensões, o fluxo através dos poros é predominantemente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa (ERTÜRK et al., 2014; YAVUZ et al., 2015). Os monólitos poliméricos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel, apresentando ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008). Entre os monólitos poliméricos utilizados como matrizes cromatográficas, um que apresenta destaque é o criogel de poli(acrilamida), obtido da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam), N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento (-10°C a -20°C), pela técnica conhecida como criogeleificação (PLIEVA et al., 2004). Os monólitos assim sintetizados são chamados

de criogéis pAAm e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores (YAO et al., 2007; DRAGAN et al., 2012; WANG et al., 2014; MACHADO et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016; CARVALHO et al., 2016; VERÍSSIMO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019; DA SILVA et al., 2019).

Cada um dos componentes utilizados apresenta uma função específica na formação do criogel de poli(acrilamida). A AAm, principal monômero da estrutura, atua como o agente reticulante, sendo o responsável pela linearidade da cadeia. A BAAm, um monômero com duas moléculas de AAm acoplada nas extremidades com terminações não reativas, promoverá o enlace das cadeias de AAm, formando as ligações cruzadas necessárias para a formação do gel. O AGE é utilizado para aumentar a resistência estrutural e dispor grupos epóxi reativos na superfície. O persulfato de amônio (APS) e o N,N,N,N-tetrametiletilenodiamino (TEMED) fornecem os radicais livres necessários para iniciar e acelerar a reação de polimerização, respectivamente (COOPER, 1977; ARVIDSSON et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2019; DA SILVA et al., 2019).

A criogeleificação que ocorre para a formação dos criogéis é um processo de polimerização comum, porém em condições de congelamento. As diferenças de morfologia dos criogéis para os géis formados em temperatura ambiente são explicadas pelo fato de que, em condições moderadas de congelamento, parte do solvente permanece não congelado, na chamada microfase líquida. Na Figura 2 observam-se micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de estruturas preparadas a partir de uma mistura idêntica via polimerização em temperaturas de -20°C e 20°C . Enquanto que a estrutura do material preparado à temperatura ambiente é compacta e praticamente sem funcionalidade para cromatografia, o criogel apresenta grandes poros interconectados, separados por paredes sólidas poliméricas, que permitem o fluxo por sua estrutura.

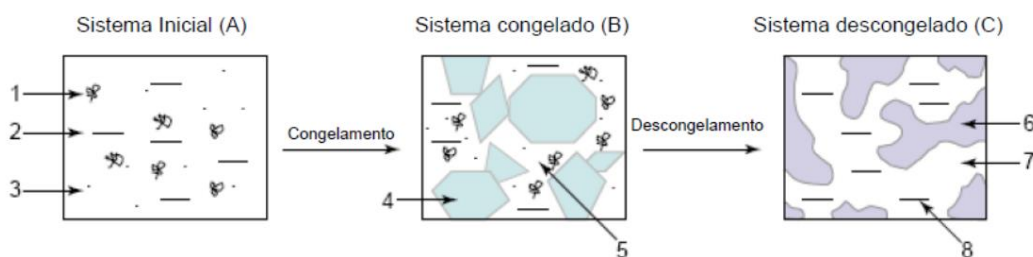
Figura 2. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a -20°C e (B) gel de dextrana convencional preparado a temperatura ambiente.



Fonte: PLIEVA et al., 2007.

As substâncias dissolvidas nesses sistemas concentram-se nessa região, e como o volume dessa microfase é bem menor do que o volume da solução inicial, ocorrerá aumento da concentração dos materiais dissolvidos. Desse modo, a reação de polimerização ocorre nas regiões monoméricas concentradas não congeladas formando um gel resistente (LOZINSKY et al., 2002; GUN'KO et al., 2013). A representação esquemática para a formação de criogéis poliméricos é mostrada na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da produção de criogéis. Os componentes marcados nos sistemas são: (1) precursor de alta massa moléculas, (2) solvente, (3) precursor de baixa massa molecular ou substâncias solúveis, (4) policristais do solvente congelado, (5) microfase líquida não congelada, (6) rede polimérica do criogel, (7) macroporos e (8) solvente descongelado.



Fonte: Adaptado de LOZINSKY et al., 2003.

A cristalização do solvente é uma etapa crucial para a formação satisfatória de supermacroporos interconectados dentro do criogel, ou seja, os cristais de gelo em crescimento são os responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura macroporosa. A forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem durante a síntese do criogel (PLIEVA et al., 2008). GUN'KO et al. (2013) realizaram a síntese de criogéis de poliacrilamida utilizando três temperaturas de congelamento (-10°C, -20°C e -30°C) e observaram que poros maiores foram formados quando se utilizou temperatura mais elevada. Isto ocorre, pelo fato de, ao se utilizar maiores temperaturas, o congelamento ocorrer de maneira mais lenta, resultando no desenvolvimento de cristais de gelo maiores.

Este tipo de suporte apresenta algumas vantagens que o destaca para utilização em bioprocessos, que são: fácil preparação, os monômeros usualmente utilizados são solúveis em água permitindo a biocompatibilidade do leito, apresentam características de formar leitos mecanicamente estáveis, rápida transferência de massa pelo leito e a permeabilidade não é significativamente afetada pela compressão do leito (DA SILVA et al., 2019).

Uma desvantagem ressaltada por MOURÃO et al. (2019), é que devido aos grandes poros existentes na matriz do criogel, a capacidade de adsorção de enzimas ou outras proteínas é limitada, devido à baixa área superficial, no entanto, modificações na matriz podem melhorar essa capacidade. O processo de imobilização de monômeros funcionais na superfície pode aumentar consideravelmente a densidade dos grupos funcionais de superfície, gerando uma maior capacidade para a coluna (LYNCH et al., 2019). Diante disso, surge a necessidade de estudos para modificação de sua estrutura, visando melhorar sua capacidade de ligação, aumentando assim a seletividade com os compostos de interesse e, conseqüentemente, elevando a eficiência de tal processo. Para isto, diversos métodos de ativação para posterior imobilização têm sido relatados, como por exemplo, a ativação via ligação covalente (GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019; DA SILVA et al., 2019)

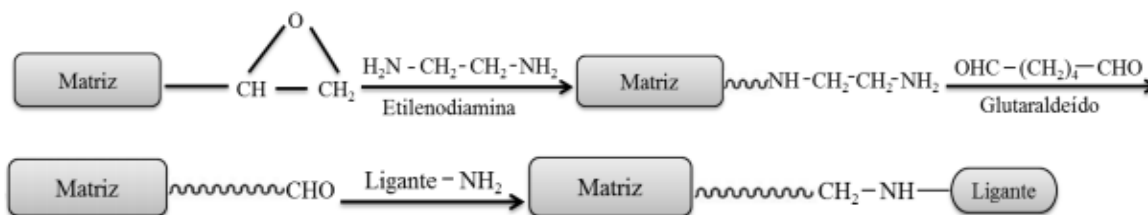
1.6. Criogéis ativados e funcionalizados por ligações covalentes.

Visando aperfeiçoar o processo de utilização dos leitos monolíticos como suporte para imobilização e purificação de biomoléculas, diversas abordagens para a imobilização de ligantes de afinidade têm sido reportadas (ANDAÇ et al., 2016). Os processos de adsorção, conformação e atividade aparente da biomolécula imobilizada ou purificada são influenciados pelas propriedades da coluna monolítica utilizada com suporte. Os grupos reativos, na maioria dos casos são inseridos na superfície da matriz polimérica para propiciar a formação de ligação covalente entre a biomolécula e o suporte.

A imobilização via ligação covalente é normalmente realizada pelo escoamento de uma solução contendo ligantes através do criogel ou por imersão do criogel nesta solução (LYNCH et al., 2019). Os grupos reativos, como os grupamentos epóxi, são introduzidos na superfície do suporte para permitir a formação de ligação covalente entre a biomolécula e o suporte na etapa subsequente.

Os suportes contendo radicais epóxi disponíveis na superfície estão entre os mais utilizados para a imobilização de biomoléculas. Isso ocorre em razão de tais grupos poderem reagir facilmente com grupamentos amina, tiol ou hidroxila das moléculas, formando uma ligação covalente estável. Além disso, grupos epóxi são muito estáveis em valores de pH próximo ao neutro, o que torna o suporte contendo esses grupos adequados para longos períodos de armazenamento. Geralmente, os radicais epóxi são oriundos da inserção de monômeros específicos no processo de síntese dos monólitos. A utilização dos monômeros glicidil metacrilato (GMA) e alil-glicidil éter (AGE) são exemplos de monômeros comumente utilizados na reação de polimerização, responsáveis pelo fornecimento desses radicais (UYGUN et al., 2015; PERÇIN et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019). Um dos métodos que utilizam como suporte uma matriz macroporosa contendo radicais epóxi reativo é o método do glutaraldeído, mostrado na Figura 4 (DA SILVA et al., 2019).

Figura 4. Método do glutaraldeído – imobilização de ligantes via ligação covalente para monólitos de afinidade.



Fonte: Adaptado de Nascimento et al. (2019).

Neste método, um criogel contendo grupamentos epóxi reativos (epóxi-ativado) é primeiro convertido a uma forma amina-ativado pela reação dos grupos epóxi com reagentes contendo grupamento amina, como etilenodiamina. O monólito amina-ativado reage então com um dialdeído (por exemplo, glutaraldeído) para produzir um criogel aldeído-ativado, capaz de reagir com grupamento amina das moléculas ligantes com a característica funcional desejada (GONÇALVES et al., 2016). A vantagem principal está na capacidade de formação de um longo braço espaçador entre o criogel e o ligante, evitando possíveis efeitos de impedimento estérico, o que pode acarretar em uma maior capacidade de imobilização do ligante e de purificação da molécula alvo (GONÇALVES et al., 2017; DA SILVA et al., 2019).

Partindo dessa abordagem, a realização de mais pesquisas nessa área é de fundamental importância para ampliar o conhecimento e contribuir na otimização de tal processo. Outras alternativas viáveis para aumentar a eficiência dos criogéis é adicionar ligantes específicos aos monólitos ativados pelo método glutaraldeído. Dessa forma, será possível obter matrizes cromatográficas com atividade específicas a determinados grupos de biomoléculas. Por exemplo, ao se inserir moléculas apolares na superfície dos criogéis, fará com que os mesmos tenham maior afinidade em adsorver moléculas apolares, pois as cadeias ou subunidades apolares presentes tanto na superfície como na molécula encontram-se solvatadas por camadas de moléculas de água. A aproximação das superfícies apolares promove o colapso da estrutura organizada da água, permitindo assim a interação superfície-molécula através da hidrofobicidade.

1.7. Funcionalização dos criogeis para interação hidrofóbica

Diversos autores têm demonstrado a eficiência da funcionalização de criogeis para uso na cromatografia de interação hidrofóbica. Exemplos podem ser vistos a seguir. NEVES et al. (2020), objetivando purificar proteínas, percolaram fenilalanina e triptofano nas superfícies de criogeis de poliacrilamida, por meio do método glutaraldeído. ZHANG et al. (2020), produziram uma matriz de interação hidrofóbica pelo método de inserção, ou seja, inseriram o composto hidrofóbico, neste caso o butil metacrilato, na composição da estrutura do criogel de poliacrilamida. Já Turkeman et al. (2017), sintetizaram criogel megaporoso carregado com grânulos de glicidil metacrilato para fornecer afinidade hidrofóbica e estes foram utilizados para a purificação de lisozima de clara de ovo de galinha.

Dessa forma, percebe-se que para a funcionalização de adsorventes para o uso em interação hidrofóbica é necessária a escolha de um agente que promova a interação da biomolécula alvo com a superfície. A via mais comumente para tal é utilizando matrizes poliméricas que contenham radicais epóxi em sua estrutura, aproveitando-se da reatividade dos mesmos. Assim, uma das técnicas que tem sido utilizada para a imobilização de ligantes hidrofóbicos é o método do glutaraldeído, que consiste em uma matriz base produzida a partir da criogeleificação de uma mistura de acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida e alil glicidil éter em meio aquoso, com o processo de polimerização catalisado pela adição de persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, em moldes adequados. Para que esta técnica tenha eficácia é necessário que a matriz-base seja funcionalizada a partir da formação de bases de Schiff sequencias. Inicialmente, ocorre a reação entre os radicais epóxi existentes na matriz base devido ao uso de alil glicidil éter (AGE) e radicais amino de etilenodiamina em solução. Posteriormente bases de Schiff são formadas entre radicais amino da etilenodiamina e radicais carbonila de glutaraldeído em solução e finalmente entre os radicais carbonila do glutaraldeído e os radicais amino das moléculas do composto que irá fornecer radical ativo para a interação hidrofóbica. Tal grupo ativo pode ser derivar de cadeias longas de carbono ou anéis aromáticos, como é o caso da butilamina que possui 4 moléculas de carbonos em sua estrutura e a anilina que possui um anel aromático ligado a um radicalamina. Por fim, radicais epóxi residuais que não tenham reagido são bloqueados pela reação com etanolamina, para se evitar interações indesejáveis nos processos de separação.

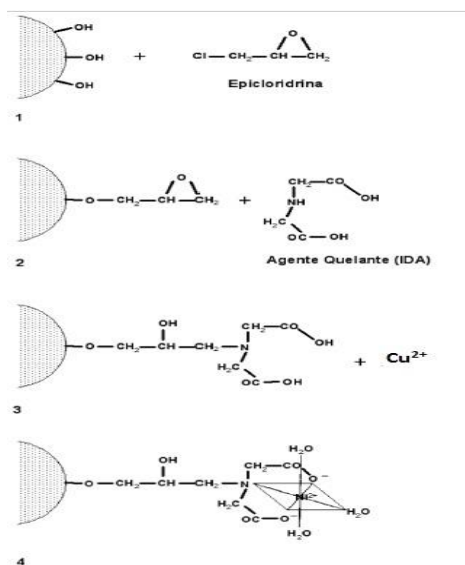
Uma outra alternativa viável para aumentar a eficiência dos criogéis é a imobilização de ligantes específicos para transformá-los em monólitos de afinidade.

1.8. Funcionalização de criogéis para interação de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

A principal exigência para se utilizar uma matriz em IMAC é que a matriz seja hidrofílica, visando não favorecer a adsorção não-específica de biomoléculas. Além disto, é essencial a presença de grupos funcionais que possibilitem a modificação química (ativação) do material para imobilização de ligantes. É aconselhável que a matriz apresente também as seguintes características: alta resistência mecânica, área superficial e porosidade elevadas, estabilidade em uma ampla faixa de pH e na presença de sais e solventes orgânicos (WANG et al., 2018).

Na maioria dos trabalhos publicados de IMAC, a ativação foi realizada em matrizes que contenham radicais epóxi em sua estrutura, aproveitando-se da reatividade dos mesmos. Tais radicais são inseridos nas matrizes cromatográficas no momento da sua síntese, utilizando-se por exemplo epicloridrina, alil-glicidil éter ou glicidil metacrilato (WANG et al., 2018). Os agentes quelantes são ligados covalentemente à fase estacionária ativada ou ao braço espaçador através de seu grupo amino (Figura 5).

Figura 5. Esquema de ativação por epicloridrina, acoplamento do agente quelante e imobilização de íon metálico em matrizes poliméricas.



Fonte: BABAC et al., 2006

Como observado pela figura acima, para que ocorra a funcionalização desses adsorventes para o uso em IMAC é necessária a escolha de um agente quelante e posteriormente a coordenação com um íon metálico. (KIM E HAGE, 2005; BABAC et al., 2006; HAZIJADEH et al., 2012; WANG et al., 2018).

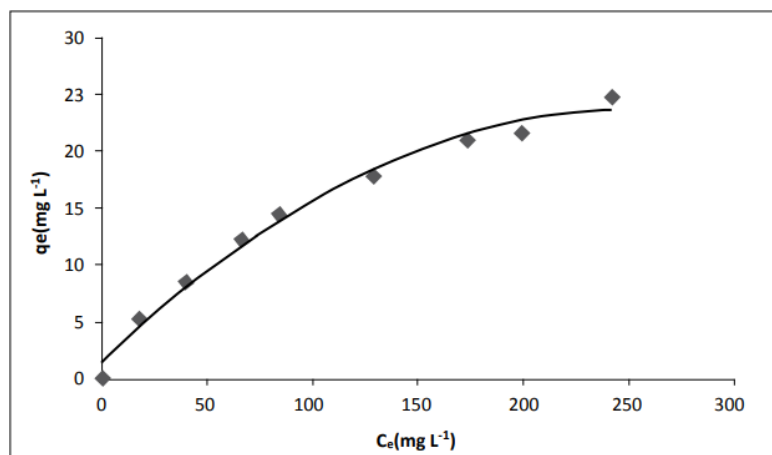
Os agentes quelantes usualmente empregados são o ácido iminodiacético (IDA) e o ácido nitrilotriacético (NTA), capazes de fazer, respectivamente, três e quatro ligações coordenadas com os íons metálicos. Tais agentes são imobilizados covalentemente na matriz cromatográfica, utilizando-se ou não braços espaçadores que permitam maior acesso ao sítio de ligação. A escolha do íon metálico varia em função da biomolécula-alvo, variando de íons divalentes (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) quando se objetiva a interação, por exemplo com os aminoácidos histidina, cisteína e triptofano a íons tri e tetravalentes (Al^{3+} , Fe^{3+} , Zr^{4+}) quando se quer purificar fosfoproteínas e fosfopeptídeos (UYGUN et al., 2015). Diversos estudos vêm sendo feitos com a utilização de monólitos em IMAC na purificação de proteínas nativas e recombinantes (BIBI et al., 2013, UYGUN et al., 2015, CARVALHO et al., 2016). No entanto, as variações possíveis abrem uma imensa gama de oportunidades nesse segmento, podendo contribuir bastante para a processo de purificação de biomoléculas. No projeto de um processo de purificação ou de sua ampliação de escala, é usual o estudo do equilíbrio do soluto entre a solução e o adsorvente usando isoterma de adsorção.

1.9. Isotermas de Adsorção

Isotermas de adsorção podem ser definidas como as relações de equilíbrio entre a concentração de um composto em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentrações de interesse. O equilíbrio de adsorção é geralmente um requisito essencial para obtenção de informações relevantes sobre projeto e análise de um processo de separação por adsorção. Quando uma determinada quantidade de um sólido, comumente chamado de adsorvente, entra em contato com um dado volume de um líquido contendo um soluto adsorvível, chamado adsorvato ou adsorbato, a adsorção ocorre até que o equilíbrio seja alcançado. Isto é, na adsorção quando o adsorvato é colocado em contato com o adsorvente, as moléculas tendem a fluir do meio aquoso para a superfície do adsorvente até que a concentração de soluto na fase líquida (C_e) permaneça constante. Nesse estágio é dito que o sistema atingiu o estado de equilíbrio e a capacidade

de adsorção do adsorvente (q_e) é determinada. Curvas, denominadas de isotermas, envolvendo a capacidade de adsorção (q) versus C_e podem ser obtidas a partir de dados experimentais (Figura 6).

Figura 6. Exemplo de isoterma de adsorção



Fonte: Do Nascimento et al. (2014).

A obtenção de uma isoterma de adsorção pode ser feita a partir de um processo simples em batelada, em que uma massa de adsorvente é adicionada em um determinado volume (V) de uma série de soluções com concentrações iniciais (C_o) diferentes e conhecidas. Quando o equilíbrio de adsorção é atingido, tem-se a concentração final de soluto na solução em equilíbrio (C_e , em gramas ou mols por litro de solução) e a capacidade de adsorção do adsorvente (q , em massa ou mols de adsorvato, por unidade de massa de adsorvente). Assim, podemos obter um gráfico de q versus C_e (CARVALHO et al., 2016).

A palavra isoterma está relacionada com o fato de que os ensaios são realizados em temperatura constante. Pode-se, naturalmente, repetir os testes de batelada, em diferentes temperaturas constantes e, desse modo, gerar um outro conjunto de dados q versus C_e para cada temperatura (ZHENG et al., 2020). Dessa forma, pode-se verificar a influência da temperatura no processo de adsorção. Para obter valores de concentração de equilíbrio, deve-se fazer um balanço de massa, em que a quantidade de adsorvato no adsorvente deve ser igual à quantidade de adsorvato removido da solução, ou, em termos matemáticos (equação 1):

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

Onde: q = Capacidade de adsorção; C_o = Concentração inicial do adsorvato; C_e = Concentração do adsorvato no equilíbrio; V = Volume da solução; m = Massa do adsorvato.

É importante mencionar que as unidades para cada variável (q , C_o , C_e e m) ficam a critério do pesquisador, tomando somente o cuidado para a padronização das mesmas. Após as determinações de q e C_e , pode-se construir um gráfico dos valores de q versus C_e (q na ordenada, ou eixo vertical, e C_e na abscissa, ou eixo horizontal) o qual tem como resultado um gráfico de uma isoterma de adsorção (DO NASCIMENTO et al., 2014).

No entanto, apesar do fenômeno da adsorção poder ocorrer em qualquer tipo de interface, na aplicação de técnicas cromatográficas para a purificação de biocompostos, tal fenômeno tem maior relevância quando uma das fases é sólida. (ZHENG et al., 2020).

Entre os modelos de isotermas de adsorção existentes, um dos mais simples e utilizados é o modelo de LANGMUIR (1918), que considera a adsorção em uma monocamada, sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos. Tal modelo foi proposto inicialmente para a adsorção de gases em superfícies sólidas, sendo posteriormente estendido o seu uso para a adsorção de solutos a partir de soluções líquidas (CARVALHO et al., 2016). O modelo de Langmuir é apresentado abaixo na equação 2.

$$q = q_{max} \frac{K_l C_e}{1 + K_l C_e} \quad (2)$$

Onde q_{max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($mol \cdot L^{-1}$), K_l é relacionada à constante de equilíbrio de adsorção ($L \cdot mol^{-1}$), q é a quantidade de soluto adsorvido ($mol \cdot L^{-1}$) no equilíbrio e C_e é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio ($mol \cdot L^{-1}$).

De acordo com CARVALHO et al. (2016) e ZHENG et al. (2020), as suposições decorrentes da equação de Langmuir podem ser explicadas a partir das considerações feitas para o desenvolvimento da mesma.

Quando uma solução é posta em contato com o adsorvente e o sistema atinge o equilíbrio, este estado de equilíbrio nada mais é do que a igualdade da velocidade em que as moléculas ou íons são adsorvidos/dessorvidos na superfície do adsorvente. É isso que o conceito de “equilíbrio” implica. Isto é, no equilíbrio, a adsorção e dessorção não deixam de ocorrer, mas sim que as suas velocidades (taxas) são iguais. Assim, se a velocidade de adsorção é proporcional à concentração do adsorvato no líquido (C_e), e para a fração da área de superfície do adsorvente que está vazia ($1 - \theta$), onde θ é a fração da superfície coberta (CARVALHO et al., 2016; ZHENG et al., 2020), podemos escrever a equação 3:

$$\text{Taxa de adsorção} = K_1 C_e (1 - \theta) \quad (3)$$

Onde: k_1 : constante para adsorção.

Admitindo-se que todos os sítios da superfície do adsorvente possuem a mesma energia, ou seja, são de tal forma homogêneos, K_1 assume o mesmo valor para todos os sítios. Além disso, pode-se admitir o fato de que a cobertura da superfície se dá de maneira mono (molecular ou elementar), isto é, somente é possível a formação de uma monocamada, então a taxa de adsorção é proporcional a $(1 - \theta)$, isto é, a total cobertura (adsorção) estará completa quando $\theta = 1$. Da mesma forma como considerado com a taxa de adsorção faz-se para a taxa de dessorção, considerando que o sistema encontra-se em equilíbrio, portanto:

$$\text{Taxa de dessorção} = K_2 \theta \quad (4)$$

Onde: k_2 : constante para a dessorção

Como o sistema encontra-se em estado de equilíbrio, podemos igualar as duas taxas:

$$K_1 C_e (1 - \theta) = K_2 \theta \quad (5)$$

ou, resolvendo para θ e adotando, $K_1 = K_1/K_2$ temos:

$$\theta = \frac{K_1 C_e}{1 + K_1 C_e} \quad (6)$$

Em geral, é preferível trabalhar em termos da quantidade q , a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente, em vez de θ . Desde que q e θ sejam proporcionais, volta-se para a equação 2:

$$q = q_{max} \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

Onde: q_{max} : se torna outra constante.

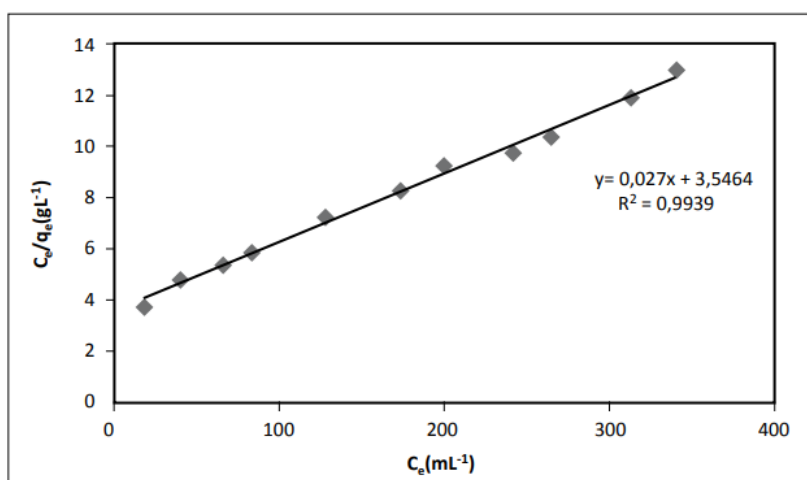
Este é o valor máximo que q pode atingir com o aumento de C_e , o que leva à conclusão de que a cobertura da superfície θ é igual à relação de q/q_{max} , e, portanto, $\theta = 1$ quando $q=q_{max}$. De todo modo, q_{max} representa a concentração das espécies adsorvidas sobre a superfície, ou seja, todos os sítios disponíveis foram preenchidos, uma cobertura completa é atingida. A equação 2 é frequentemente rearranjada para outras formas lineares para determinar os valores de K_L e q_{max} , como mostrado nas equações 7 e 8:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{K_L q_{max} C_e} \quad (7)$$

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{max}} C_e + \frac{1}{K_L q_{max}} \quad (8)$$

Geralmente, essas duas formas são mais utilizadas. Portanto, tomando como base a equação 7, a construção do gráfico $1/q$ versus $1/C_e$ irá produzir uma linha reta (a qual é geralmente obtida por um procedimento de ajuste linear por mínimos quadrados) com inclinação $1/(K_L q_{max})$ e interceptação $1/q_{max}$. Conhecendo os valores da inclinação e a interceptação, podemos facilmente calcular valores para os dois parâmetros K_L e q_{max} . A Figura 7 mostra os dados obtidos por Melo et al. (2013) em estudo da adsorção de íons metálicos Cu^{2+} em adsorventes específicos, onde um gráfico é construído a partir da equação 8. Os dados foram coletados utilizando uma massa de 25 mg do adsorvente em 25 ml de solução numa faixa de concentração de 10 a 400 $mg L^{-1}$, pH tamponado em 5,5 e sob agitação de 250 rpm. Assim, utilizando os coeficientes angular (inclinação) e linear (intercepto), os valores de q_{max} e K_L calculados são 37,03 e $7,60 \times 10^{-3}$, respectivamente.

Figura 7 - Gráfico de C_e/q_e versus C_e para determinação dos parâmetros de Langmuir.



Fonte: Melo et al., 2013.

Mesmo este modelo sendo amplamente empregado para descrever o equilíbrio de adsorção e afinidade de macromoléculas (CARVALHO et al., 2016), as equações ajustadas adquirem certo caráter empírico, uma vez que a consideração do modelo de Langmuir de que cada sítio de adsorção interage com apenas uma única molécula, e vice-versa. No entanto, ele ainda se ajusta melhor que outros modelos, e indica um limite de saturação da superfície (VIDAL et al., 2012; PACURARIU et al., 2013; SOUSA NETO et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; CHONG et al., 2020).

1.10. Propriedades termodinâmicas

Além dos parâmetros relacionados ao equilíbrio do processo de adsorção, é essencial para a compreensão dos fenômenos envolvidos o conhecimento da variação das propriedades termodinâmicas.

Interações soluto-adsorvente, soluto-solvente, solvente-solvente, soluto-soluto, solvente-adsorvente, alterações conformacionais, entre outros, são alguns dos fatores envolvidos. A partir do estudo da variação das propriedades termodinâmicas verifica-se a espontaneidade dos processos avaliados, bem como o tipo de fenômeno predominante, entre efeitos entálpicos (associados à formação/ruptura de interações) e entrópicos (associados a alterações configuracionais no sistema) (NASCIMENTO et al., 2018).

Uma dessas propriedades (a entalpia de adsorção) pode ser avaliada a partir da determinação direta das mesmas em ensaios experimentais calorimétricos (VIEIRA et al., 2017). Sempre que possível, ensaios experimentais são preferidos, dada a precisão e exatidão que os equipamentos atuais permitem, com menor propagação de erros com os cálculos. (VIEIRA et al., 2017; SIMOES-CARDOSO et al., 2019).

Quando não é possível a realização de ensaios calorimétricos, as correlações matemáticas são amplamente empregadas. A magnitude destas interações é governada pela energia livre do sistema antes e após as interações ocorrerem, e podem ser atribuídas às mudanças na entalpia e entropia do sistema (TONG et al., 2020). Assim torna-se de grande importância a determinação da variação destas propriedades.

Na prática, o estudo termodinâmico de um processo de adsorção envolve a determinação e cálculo dos parâmetros termodinâmicos energia livre de Gibbs (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS). A variação na energia de Gibbs fornece informações a respeito da espontaneidade do processo. Quanto mais negativo o valor de ΔG , mais espontâneo e favorável é o processo. Se ΔG for positivo, o processo é considerado não espontâneo. Por sua vez, a variação de entalpia (ΔH) indica se o processo como um todo é exotérmico (valor negativo) ou endotérmico (valor positivo). A magnitude dos valores de variação da entropia (ΔS) estão relacionados à entalpia de hidratação do adsorvato na interface líquido/sólido, ou seja, aos graus de liberdade do sistema. Se $\Delta S < 0$, o processo envolve um mecanismo associativo, enquanto valores de $\Delta S > 0$ sugerem aumento da entropia na superfície sólido/líquido e um mecanismo dissociativo, podendo ocorrer devido à mudanças estruturais no adsorvato e/ou adsorvente.

Estes parâmetros estão relacionados segundo as equações: (VIEIRA et al., 2017):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (9)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H_{ads}^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{ads}^0}{R} \quad (11)$$

Onde R é a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T a temperatura (K) e K a constante de equilíbrio.

A equação 11 é conhecida como “Equação linear de van’t Hoff”. Essa equação é um dos modelos mais utilizados, quando não se há a possibilidade de utilizar ensaios calorimétricos para contemplar análises termodinâmicas. Ela é obtida substituindo a equação 10 na equação termodinâmica 9. Plotando-se $\ln K$ versus $1/T$ obtém-se uma reta (se o comportamento for linear) onde é possível obter os parâmetros termodinâmicos do processo (TONG et al., 2020).

No entanto, diversos autores como VIEIRA et al. (2017), SIMOES-CARDOSO et al. (2019) e TONG et al. (2020) mostraram que quando a entalpia e entropia são dependentes da temperatura, a curva de $\ln K$ versus $1/T$ fornece uma relação não linear que pode ser aproximada por um polinômio de segundo grau de acordo com a conhecida “Equação não linear de van’t Hoff”:

$$\ln K = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \theta \quad (12)$$

Onde a , b e c são parâmetros empíricos e θ uma constante do sistema que depende da razão entre as fases e é constante com a temperatura.

Dessa forma, as propriedades termodinâmicas podem ser dimensionadas para que se tenha um fator essencial para a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de adsorção e purificação da bromelina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O principal objetivo neste trabalho foi a purificação de Bromelinas, utilizando técnicas de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) e interação hidrofóbica (CIH) utilizando novos adsorventes monolíticos macroporosos, além de compreender do ponto de vista termodinâmico o efeito da temperatura e força iônica no comportamento adsorptivo dos mesmos com uma proteína-modelo (BSA).

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma funcionalização de adsorventes poliméricos macroporosos monolíticos, obtidos pelo processo de criogeificação para serem utilizados em processos e interação hidrofóbica.

- Caracterizar adsorventes poliméricos macroporosos monolíticos, obtidos pelo processo de criogeificação e modificados quimicamente para serem utilizados em processos de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC);

 - Avaliar o efeito de diferentes íons metálicos nas características dos adsorventes;

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

 - Determinar o efeito da temperatura e força iônica nas isotermas de adsorção de albumina de soro bovino no adsorvente de interação hidrofóbica e no adsorvente de afinidade com íons metálicos imobilizados;

 - Avaliar a variação das propriedades termodinâmicas entalpia, entropia e energia livre de Gibbs para os processos de adsorção em ambos os adsorventes;

 - Avaliar o potencial de purificação da protease advinda do abacaxi, avaliando a eficiência, grau de pureza e sua atividade proteolítica;

 - Promover a difusão do conhecimento adquirido a partir da divulgação dos resultados obtidos;

REFERÊNCIAS

ALVES, R.O. Purificação De Proteases De *Aspergillus tamaris* Urm4634 Por Cromatografia De Troca Iônica. *Revista Brasileira De Agrotecnologia*. volume 7, paginas 329 – 334, 2017.

AMID, A. et al. Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain, *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2232-2239, 2011.

ANDAÇ, M.; GALAEV, I. Y.; DENZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. *Journal of Chromatography B*, v. 1021, p. 69-80, 2016.

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

ARSHAD, Z.I.M. et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies, *Appl. Microbiol Biotechnol*, v. 98, p. 7283-7297, 2014.

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

BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolitCIH cryogel. *Reactive and Functional Polymers*, v. 66, n. 11, p. 1263-1271, 2006.

BALA, M.; ISMAIL, N. A.; MEL, M.; JAMED, M.S.; MOHD, H.; AZURA AMID, S. Bromelain Production: Current trends and perspective. *Archives des Sciences*. Geneva. v. 65, n. 11, p. 369-399, 2012.

BALDINI, V. L. S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H.; SALES, A. M.; RAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina e cultivares do abacaxizeiro. *Colet. Ital*, v. 23, n. 1, p. 44-55, 1993.

BARROS, K.V.G. Sistema De Duas Fases Aquosas Napa/Peg Aplicado Na Purificação De Proteases Produzidas Por Fungos Filamentosos. Universidade De Brasília

Faculdade De Ciências Da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2015.

BERNELA, M., AHUJA, M., THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, v. 143, p. 18-24, 2016.

BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. ; FONTAN, R. C. I. ; COIMBRA, J. S. R. ; BONOMO, R. C. F. . Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. *Journal of Chromatography. B*, v. 844, p. 6-14, 2006

Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, v.72, 248-254.

BRESOLIN, I.T.L, EVERSON, A.M e BUENO, S.M.A.. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações. *Química Nova*, Vol. 32, No. 5, 1288-1296, 2013.

CAO, M.; HARI, S.; MULAGAPATI, R.; VEMULAPALLI, B.; WANG, J.; Saveliev, S.; Urh, M.; Hunter, A.; Liu, D. Characterization and quantification of succinimide using peptide mapping under low-pH conditions and hydrophobic interaction chromatography, *Analytical Biochemistry*, v. 566, p. 151-159, 2019.

CARVALHO, B. M. A.; SILVA JÚNIOR, W. F. ; CARVALHO, L. M. ; MINIM, L. A. ; CARVALHO, G. G. P. . Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering (Online)*, v. 33, p. 215-223, 2016.

CAVALCANTI, J. S. Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leito na forma expandida. 2010a. 149f. Tese (Doutorado) – Centro de tecnologia, Programa de PósGraduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

CHAURASIYA, R.S.; HEBBAR, H.U. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology*, v. 111, p. 90-97, 2013.

CHONG, L.; MYSHAKIN, E.M. The effect of residual water content on preferential adsorption in carbon dioxide – methane – illite clay minerals: A molecular simulation study. *Fluid Phase Equilibria*. Volume 504, 15 January 2020.

CLEMENTINO, E.L. et al. Produção e purificação integrada de protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2019, vol.71, n.2 [cited 2019-11-16], pp.553-562. ISSN 0102-0935. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9495>.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A.; TAMBOURGI, E.B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulfate. *Bioprocess and biosystems engineering*. Berlin, v. 36, n.2, p. 185-192, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. B.; Introdução a métodos cromatográficos, 7^o Edição, Campinas: Ed. da Unicamp, 1997.

COOPER, T. G. *The Tools of Biochemistry*, Wiley (New York) 423p, 1977.

COSTA, H.B., FERNANDES, P.M.B, VENTURA, J.A, 2012. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. Brazilian patente PI10201027122

DA SILVA, J.F., DA SILVA, D.L., NASCIMENTO, R.G., VERÍSSIMO, L.A.A., FONTAN, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019, 1-9.

DO NASCIMENTO, R.F; DE LIMA, A.C.A.; VIDAL, C.B. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. 256 p. : il. ; 21 cm. (Estudos da Pós - Graduação) ISBN: 978-85-7485-186-0

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

FONTAN, R.C.I; BONOMO, R.C.F; GONÇALVES, G.R.F; MINIM, V.P.L ; MINIM, Luis Antonio . Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide

MonolitCIH Ion Exchanger Columns. POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE , v. 58, p. 1717-1725, 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food quantity. FAOSTAT, 2012. Available at: < www.faostat.fao.org >

FREIBURGER, L.A.; AUCLAIR, K.; MITTERMAIER, A.K. Van 't Hoff global analyses of variable temperature isothermal titration calorimetry data. *Thermochimica Acta*, 527,148-157, 2012.

GENTIL, N.O, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2014. Purificação parcial de proteases termorresistentes secretadas por *Bacillus sp* SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo. Orientador: Prof^o. Meire Lelis Leal Martins.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN; R. C. Immobilization of sugars in 39 supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 1068-1069, 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. Development of supermacroporous monolitCIH adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B*, v. 1033-1034, p. 406-412, 2016.

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

GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. *Advanced in Colloid and Interface Science*, v. 187-188, p. 1-46, 2013.

HAGE, D. S.; RUHN, P. F. An introduction to affinity chromatography. In: *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd Ed.; Hage,D.S., Ed.; Taylor & Francis: New

York, Chapter 1. 2006. HAGE, D.S., Affinity chromatography in: Cazes, J. (ed.), enciclopeya da chromatography, third edition. Taylor & Francis Group, p. 2518, 2010.

HAIJZADEH, S.; KIRSEBOM, H.; LEISTNER, A.; MATTIASSON, B. Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 21, p. 2978-2985, 2012.

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

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

HJERTÉN, S., ROSENGREN, J., PAHLMAN, S. Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of same alkyl and aryl derivatives of agarose. *Journal of Chromatography*. V. 101, p. 281-288, 1974.

HOGAN, S.A.; I.B. O'LOUGHLIN, P.M. KELLY. Soft matter characterisation of whey protein powder systems *Int. Dairy J.*, 52 (2016), pp. 1-9

HORNER, A. R.; WILSON, E. R; GROSKREUTZ, S.R.; MURRAY, S.R. Evaluation of three temperature- and mobile phase-dependent retention models for reversed-phase liquid chromatography retention and apparent retention enthalpy. *Journal of Chromatography A*, V. 1589, Pages 73-82, 2019.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction, *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 385-391, 2012.

KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; YOON, K.-S.; SONG, Y.-S.; LEE, K. P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, v. 42, n. 1, p. 86-95, 2006.

KIRCHERT, S.; KAISERB, R.E. MORLOCK, G.E. In-process quality control of wine by planar chromatography versus micro planar chromatography, *Journal of Chromatography A*, v. 1588, 15, p. 137-149, 2019.

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

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

LANGMUIR, I. The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, n. 6, p. 1145-1156, jun. 1916.

LI, Y.; TOLLEY, H.; LEE, M. Monoliths from poly(ethylene glycol) diacrylate and dimethacrylate for capillary hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 4934-4945, 2010.

LOZINSKY, V.I, PLIEVA, F.M, GALAEV, I.Y AND MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, v. 10, n. 4-5, p. 163-188, 2002

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

LYNCH, K.B.; REN, J.; BECKNER, M.A.; HE, C.; LIU, S. Monolith columns for liquid chromatography separations of intact proteins: A review of recent advances and applications. *Analytica Chimica Acta*. Volume 1046, 10 January 2019, Pages 48-68.

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

MARTINS, Y. J. C ; PINHEIRO, D. R ; GONÇALVES, L. R. ; ALMEIDA, A. C. M ; RIBEIRO, N. F. P . Avaliação Da Capacidade De Adsorção Da Lama Vermelha Em Efluentes Têxteis. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, São Paulo. Blucher Chemical Engineering Proceedings. São Paulo: Editora Blucher, 2018. p. 1662.

MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. Arch. Biochem. Biophys., p. 183, p. 200–215, 1977.

MOURA, C. P. et al. Adsorption of BTX (benzene, toluene, o-xylene, and p-xylene) from aqueous solutions by modified periodic mesoporous organosilica. Journal of Colloid and Interface Science, v. 363, p. 626-634, 15 nov. 2011.

MOURÃO, C.A.; MARCUZ, C.; HAUPT, K.; BUENO, S.M.A. Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolith C18 cryogels: Purification of IgG from human serum. Journal of Chromatography B. Volume 1129, 15 October 2019.

MUCA, R.; MAREK, W.; ŻURAWSKI, W.; PIĄTKOWSKI, W.; ANTOS D. Effect of mass overloading on binding and elution of unstable proteins in hydrophobic interaction chromatography, Journal of Chromatography A, v. 1492, p. 79-88, 2017.

NASCIMENTO, I. S. ; SILVA, D. L. ; VERISSIMO, L. A. A. ; PEREIRA, T. B. ; GONCALVES, G. R. F. ; VELOSO, C. M. ; BONOMO, R. C. F. ; FONTAN, R. C. I. . Single-step purification of lectins from jackfruit (*artocarpus integrifolia*) seeds using a supermacroporous ion exchange cryogel. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica , v. 18, p. 313-324, 2019

NASCIMENTO, R.G; FONTAN, R.C.I; BONOMO, R.C.F; VELOSO, C.M; CASTRO, S.S; SANTOS, L.S. Liquid-Liquid Equilibrium of Two-Phase Aqueous Systems Composed of PEG 400, Na₂SO₄, and Water at Different Temperatures and pH Values: Correlation and Thermodynamic Modeling. Journal Of Chemical And Engineering Data **JCR**, v. 63, p. 1352-1362, 2018

NEVES ICO, RODRIGUES AA, VALENTIM TT, MEIRA ACFO, SILVA SH, VERÍSSIMO LAA, RESENDE JV. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for

protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. *Journal of Chromatography B*. Volume 1161, 15 December 2020.

NOR, M.Z.M. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a twostage ceramic ultrafiltration process, *Food and Bioproducts Processing*, v. 98, p.142-150, 2016.

PACURARIU, C. Adsorption of phenol and p-chlorophenol from aqueous solutions on poly (styrene-co-divinylbenzene) functionalized materials. *Chemical Engineering Journal*, v. 222, p. 218-227, 15 abr. 2013

PAVAN, R.; JAIN, S.; SHRADDHA, KUMAR, A. Properties and therapeutic application of bromelain. *Biotechnology Research International*. Nova York, v. 2012, n. 2012.

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

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

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in 88 microbiology. *Trends in Microbiology*, v.16, n. 11, p. 543-551, 2008.

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

PLIEVA, F. M.; SETA, E.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: processing under compression and scale-up. *Separation and Purification Technology*, v. 65, n. 1, p. 110-116, 2009. Rawlings, N. D. (2013). *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*. In: *Proteases: Structure and Function*. Brix, K.; Stöcker, W. (Eds.). Springer.

PORATH, J.; BELEW, M. Thiophilic interaction and the selective adsorption of proteins, *TIBTECH*, v. 5, p. 225-229, 1987.

PORATH, J.; MAISANO, F.; BELEW, M. Thiophilic adsorption, a new method for protein fractionation, *FEBS Lett.*, v. 185, n. 2, p. 306-310, 1985.

QUEIROZ J.A., TOMAZ C.T., CABRAL J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159, 2001.

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

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

SIMOES-CARDOSO, J.C.; YOSHIMOTO, N.; YAMAMOTO, N. Thermodynamic analysis of polyphenols retention in polymer resin chromatography by van't Hoff plot and isothermal titration calorimetry. *Journal of Chromatography A*. 27 July 2019.

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

SOARES, P.A.G et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation, *Separation and Purification Technology*, v. 98, p. 389-395, 2012.

SOUSA NETO, V. O. et al. Equilibrium and Kinetic Studies in Adsorption of Toxic Metal Ions for Wastewater Treatment. In: NAUSHAD, M; ALOTHMAN, Z. A. *A Book on Ion Exchange, Adsorption and Solvent Extraction*, New York, v. 1, p. 145-182. 2013.

SOUSA, F. W. et al. Single and multielementary isotherms of toxic metals in aqueous solution using treated coconut shell powder. *Desalination and Water Treatment*, v. 36, p. 289-296, 2011.

TAP, F.M.; MAJID, F.A.A.; KHAIRUDIN, N.B.A. Structure prediction of Stem Bromelain from pineapples (*Ananas Comosus*) using procaricain enzyme as a modelling

template, *International Journal of Applied Engineering Research*, v. 9, p. 6109-6111, 2016.

TONG, Y.; LI, H.; ZHAI, S.; WANG, K.; An, Q. Thermodynamic analysis and molecular dynamic simulation of the solubility of saccharin in three binary solvent mixtures. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. Volume 141, February 2020.

Türkmen D, Denizli A. PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 123, 1 November 2017, Pages 859-865

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

VERÍSSIMO, LIZZY AYRAALCÂNTARA ; PAGANOTO, FERNANDA SPAGNOL ; MOL, PAULA CHEQUER GOUVEIA ; ILHÉU FONTAN, RAFAEL DA COSTA ; MINIM, Valéria Paula Rodrigues ; MINIM, LUIS ANTONIO . Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. *SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY* , v. 52, p. 1973-1982, 2017.

VIDAL, C. B. et al. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solutions by modified periodic mesoporous organosilica. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 357, p. 466-473, 15 maio 2011.

VIEIRA, E.D.; BASSO, L.G.M. COSTA-FILHO, A.J. Non-linear van't Hoff behavior in pulmonary surfactant model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. Volume 1859, Issue 6, June 2017, Pages 1133-1143.

WANG, C.; BAI, S.; TAO, S-P.; SUN, Y. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 1333, p. 54–59, 2014 Yan, L.; Shen, S.; Yun, J.; Yao, K. (2011). *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.

WANG, J.; ZHANG, R.; YANG, X.; LIU, X.; ZHANG, X. Facile synthesis of copper(II)-decorated functional mesoporous material for specific adsorption of histidine-rich proteins. *Talanta*. Volume 176, 1 January 2018, Pages 308-317.

WU, Q.; WANG, R.; CHEN, X.; GHOSH, R. Temperature-responsive membrane for hydrophobic interaction based chromatography separation of proteins in bind-and-elute mode, *Journal of Membrane Science*, v. 471, p. 56-64, 2014.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamidebased 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 cationexchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. *Journal of Chromatography A*, v.1157, n.1-2, p.246-251, 2007. Yuhai, H.; Chik, S. M. S. T.; Chin, C. F. (2014). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.20, 4293–4297.

ZHANG S, LOU X, XU R, DAI C, KIRSEBOM H. Hydrophobic cryogels prepared via cryo-polymerization as oil carriers for biosynthesis of sophorolipids. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 161, 15 September 2020.

ZHENG, J.; He, X.; CAI, C.; XIAO, J.; LIU, Y.; CHEN, Z.; PAN, B.; LIN, B. 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*. Volume 239, January 2020.

ZHOU, L.; ZHU, J.; LIN, M.; XUA, J.; XIE, Z.; YANG, D. Tetra-alkylsulfonate functionalized poly(aryl ether) membranes with nanosized hydrophilic channels for efficient proton conduction, *Journal of Energy Chemistry*, v. 40, p. 57-64, 2020.

CAPITULO 2

DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE MACROPOROSO HIDROFÓBICO FUNCIONALIZADO COM ANILINA

Resumo

O desenvolvimento de matrizes cromatográficas é essencial em processos de separação e os criogéis poliméricos apresentam potencial para a purificação de macromoléculas. Buscou-se uma inédita abordagem na funcionalização com anilina em criogéis de poliacrilamida com alil glicidil éter, para o uso em cromatografia de interação hidrofóbica. Resultados de análises de espectroscopia FTIR e termogravimétrica (TGA) indicam sucesso na funcionalização, bem como a análise de microscopia eletrônica de varredura que também confirmou uma estrutura macroporosa. Tal funcionalização provocou diferenças significativas na capacidade de inchamento, grau de expansão e porosidade, que diminuíram, indicando aumento da hidrofobicidade devido à imobilização de anilina. O método dos momentos, mais adequado quando se verifica assimetria nas curvas de distribuição de tempos de residência, foi usado na determinação do coeficiente de dispersão axial aparente em função da velocidade de escoamento. Tal método também foi usado para estimar a altura de pratos teóricos, em torno de 2 mm. Avaliou-se também a adsorção de albumina de soro bovino (BSA) no adsorvente, variando-se a concentração de sulfato de sódio (1.0 a 2.5 mol.L⁻¹) e temperatura (298.15 a 328.15K), conseguindo-se uma capacidade adsortiva máxima de 77.38 mg_{BSA}.g⁻¹_{adsorvente} a 328.15K e 1.5 mol.L⁻¹ de sulfato de sódio em tampão fosfato pH 6.0. O modelo de Langmuir ajustou-se adequadamente aos dados obtidos e a partir da análise não linear de van't Hoff determinou-se a variação de propriedades termodinâmicas para o processo adsortivo. Verificou-se o aumento da capacidade adsortiva com o aumento da temperatura. O processo ocorreu de forma espontânea, indicando compensação entálpico-entrópica, passando de entropicamente dirigido para entalpicamente dirigido com o aumento da temperatura. A matriz desenvolvida mostra-se promissora e com potencial de aplicação em processos de captura por interação hidrofóbica.

Palavras chave: Criogel, purificação, novidade, interação hidrofóbica

1. INTRODUÇÃO

Técnicas cromatográficas se destacam no uso em escala preparativa, por seu elevado poder de purificação na obtenção de produtos em larga escala [1]. Na purificação de proteínas, a cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) é uma das metodologias de cromatografia mais utilizadas. Baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície de biomoléculas e um ligante hidrofóbico de uma matriz cromatográfica, a CIH alcança separações eficientes, com pequena degradação do produto, baixas exigências de solventes e níveis de purificação desejáveis [2]. Inúmeros exemplos do potencial de utilização da CIH podem ser verificados na literatura.

Rojas et al. [3] obtiveram dados de equilíbrio de adsorção por interação hidrofóbica das proteínas albumina, conalbumina e lisozima da clara do ovo de galinha, obtidos em sistemas descontínuos, a 25 °C, utilizando a resina comercial e diferentes concentrações de sulfato de sódio. Bonomo et al. [4] também estudaram o comportamento adsorptivo da albumina sérica bovina (BSA) e β -lactoglobulina (β -lg) em um adsorvente comercial hidrofóbico, que foi estudado em diferentes temperaturas e concentrações de sal. Já Avcibaşı et al. [6] avaliaram a adsorção de albumina em criogel poli (HEMA) simples. Por fim, Silvério et al. [7] e Santhi et al. [8] utilizaram o método do sistema aquoso bifásico para avaliar a interação hidrofóbica de proteínas e o solvente usado no processo de extração.

As características benéficas da CIH, juntamente com a demanda crescente das indústrias farmacêutica e de alimentos por proteínas com elevado grau de pureza, fazem com que pesquisadores busquem desenvolver técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade das mesmas [1]. Indo de encontro a esses interesses, a produção e modificação de monólitos poliméricos vem ganhando destaque para processos envolvendo macromoléculas [3].

Dentre estes, destacam-se os criogéis, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização. Entre os possíveis monômeros empregados na síntese dos criogéis está a poli(acrilamida), obtida da polimerização de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAam) adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE) [10]. Os criogéis possuem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, o que traz uma redução nos

custos operacionais por eliminar etapas de pré-preparo das amostras como pré-concentração, sem afetar a eficiência da purificação. Outro ponto positivo é a flexibilidade na escolha do formato desses monólitos, que podem ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, entre outros [11].

Em contrapartida, os grandes poros e elevada porosidade de sua estrutura fazem com que sua área superficial seja menor se comparada à de uma coluna cromatográfica tradicional, levando a uma menor eficiência teórica. Para contornar esse problema, surge a necessidade de modificar quimicamente ou fisicamente tais estruturas para aumentar a sua seletividade conforme o produto de interesse a ser purificado, visando aumentar a eficiência dos processos de separação [11,12]. Para tal modificação pode-se proceder à inserção de ligantes na superfície, com características de interesse [13]. Uma das técnicas de enxertia usualmente empregada envolve a inclusão de braços espaçadores em radicais epóxi existentes na estrutura do criogel para evitar o impedimento estérico na adsorção de macromoléculas [12]. Para isso, faz-se uma funcionalização sequencial nos radicais epóxi, convertendo a matriz numa estrutura amino ativada e em seguida numa estrutura aldeído ativada, para então ocorrer a inclusão do radical ligante hidrofóbico de interesse [11].

Entre os possíveis ligantes hidrofóbicos estão aqueles contendo radicais etil, butil, octil e phenil, entre outros [1, 2]. A anilina é um composto aromático aminado, com características de interesse como grupo hidrofóbico a ser imobilizado. O anel aromático confere a hidrofobicidade desejada ao ligante químico imobilizado, enquanto o seu radical amina presente confere polaridade suficiente para que o mesmo seja solúvel em água, além de permitir a formação de uma base de Schiff com os sítios aldeído ativados existentes na estrutura previamente ativada do criogel. Apesar do potencial de uso dos criogéis macroporosos em CIH, poucos trabalhos envolvendo eles são observados [5-6].

Entre eles, Avcibaşı [6] produziu uma coluna composta de Poli {2-hidroxietil metacrilato-co- e [poli (HEMA-co-DIPPER)]. O criogel poli (HEMA-co-DIPPER) foi utilizado na adsorção/dessorção de albumina de soluções aquosas. A adsorção não específica de albumina em criogel simples poli (HEMA) foi muito baixa (3,36 mg / g de polímero). Assim, é necessário criar outras colunas de interação hidrofóbica com outros tipos de radicais específicos, como é o caso da anilina.

Para se assegurar que os radicais de interesse estão ligados à matriz cromatográfica conferindo-lhe as características de interações desejáveis sem afetar significativamente

aspectos operacionais como a presença de macroporos, é importante a caracterização do material produzido, utilizando-se das ferramentas disponíveis, como a espectroscopia FTIR, a análise termogravimétrica TGA, a microscopia eletrônica de varredura e as características operacionais da coluna, entre outras [13]. Essa caracterização é de grande importância para se conhecer 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. Além das características físicas é necessário conhecer o comportamento adsorptivo do material produzido. Para isso, a determinação das isotermas de adsorção e a análise termodinâmica são essenciais para a obtenção dos dados de equilíbrio referentes à retenção das proteínas na coluna cromatográfica [14-16].

Dessa forma, com a realização deste trabalho, objetivou-se desenvolver um novo adsorvente monolítico macroporoso voltado para o processo de purificação de proteínas por cromatografia de interação hidrofóbica e caracterizá-lo com relação a aspectos, físicos, químicos, operacionais e termodinâmicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1.Reagentes.

Todos os reagentes necessários para o desenvolvimento desse trabalho possuíam, no mínimo, grau analítico PA-ACS, sendo descritos ao longo do detalhamento das metodologias. Foi utilizada água destilada e os equipamentos e materiais também foram descritos na sequência, nos momentos em que foram usados.

2.2.Síntese dos criogéis monolíticos.

Para a síntese dos criogéis foram adaptadas metodologias propostas por Kumar et al. [17] e Yao et al. [18]. 4,4 g de AAm, 1,2 g de BAAm e 1,4 g de AGE foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, sendo a solução degaseificada em banho ultrassônico por 5 minutos. Em seguida, a solução foi colocada em banho de gelo sendo adicionados 140 µL de solução de persulfato de amônio (APS) na concentração de 0,5 g/mL e 91 µL de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino (TEMED). Após homogeneização da solução, a

mesma foi imediatamente vertida em seringas plásticas de 5mL, que foram seladas e mantidas em banho termostático à temperatura de $-12,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram abertas e deixadas à temperatura de 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Posteriormente, as seringas abertas contendo os criogéis foram colocadas em estufa a $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 48h, até os criogéis serem completamente secos. Em seguida, os mesmos foram removidos das seringas e suas extremidades foram cortadas para retirar partes defeituosas. Os criogéis foram então recolocados nas seringas e lavados com 200 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de $1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e novamente secos em estufa ($60\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{h}$), sendo as massas medidas em balança analítica. Os monólitos foram mantidos individualizados em dessecador contendo sílica até o momento da funcionalização.

2.3.Funcionalização dos criogéis para o uso por interação hidrofóbica.

Para o processo de modificação da superfície e funcionalização com anilina, foi adotado o método do glutaraldeído em sistema em batelada adaptado de Da Silva et al. [11]. Monólitos de criogéis secos, com cerca de 3cm de altura, 1cm de diâmetro e peso médio de 250 mg, foram colocados sob agitação rotativa à 25 rpm em todas as etapas do processo, utilizando seringas fechadas de 20 mL. A cada etapa realizada os criogéis foram suavemente comprimidos manualmente, para a retirada do excesso de solução da etapa anterior.

Os criogéis foram colocados em contato com 20 mL de álcool metílico por 2 horas. Na sequência, foram mantidos em contato com 20 mL de água destilada, seguidos de contato com 20 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6, ambos com tempo de contato de 1 hora. Em seguida, os mesmos foram imersos em 20 mL de etilenodiamina $0,5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em PBS e mantidos sob agitação por 14 horas à temperatura ambiente $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Após essa etapa os criogéis foram lavados com água destilada e depois imersos em 20 mL de PBS, cada etapa com 1 hora de duração. Então, os criogéis foram colocados em contato com 20 mL de solução de glutaraldeído 5% em PBS, à temperatura controlada de $(12,0\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ por 5 horas. Em seguida, os criogéis foram enxaguados duas vezes com 20 mL água destilada por 30 minutos, para remoção do excesso de glutaraldeído. Na sequência os criogéis aldeído-ativados foram mantidos em contato com 20mL de solução de anilina $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS durante 14 horas à temperatura ambiente $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

Feito isso, imergiu-se as matrizes em 20 mL de PBS por 1 hora e em seguida, em 20 mL de solução de borohidreto de sódio 0,1 mol/L em PBS, por 60 minutos com os frascos abertos. Por fim, os criogéis foram lavados com 20 mL de água destilada, seguido de 20 mL de etanolamina 0,1 mol/L em PBS e novamente 20 mL de água destilada, as três últimas etapas com 1 hora de duração cada. Após a ativação os criogéis foram colocados em estufa a 60°C e após a secagem obteve-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de interação hidrofóbica.

2.4. Caracterização dos criogéis.

Para a caracterização dos criogéis produzidos e posteriormente funcionalizados, foram realizadas as análises seguindo as metodologias propostas por Savina et al. [19] para capacidade de inchamento (S), Fontan et al. [9] e Gonçalves et al. [10] para o grau de expansão (ED), e Plieva et al. [21,22] para porosidade (φ). A microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas utilizando as metodologias propostas por Da Silva et al. [11].

Outro método utilizado para determinação da porosidade total dos criogéis foi baseado no método dos momentos utilizado para leitos fixos empacotados [23]. A coluna de criogel foi adaptada a um cromatógrafo com detector de feixe de diodos com espectro no UVVisível. A coluna foi equilibrada a $(30,0 \pm 0,1)$ °C com 20 volumes de coluna (VC) de água deionizada. Pulsos de 100 μ L de uma solução de acetona 5% (em volume) foram injetados, em triplicata, em vazões variando de 4 mL \cdot min $^{-1}$ a 10 mL \cdot min $^{-1}$, sendo as corridas monitoradas em $\lambda = 280$ nm. Foi calculado então o primeiro momento estatístico (ou tempo de retenção) para os pulsos injetados, que na forma discretizada e com a concentração do soluto linearmente proporcional à absorbância é dado por Furusawa et al. [23]:

$$M_1 = t_r = \frac{\sum_{i=1}^n t_i A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} \quad (1)$$

Onde: M_1 é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, tR é o tempo de retenção (s), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima 20 observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$) e A_i é a absorbância registrada no tempo t_i .

Para a injeção dos pulsos de acetona no tempo de corrida igual a zero, Furusawa et al. [23] demonstram que t_R é igual a:

$$t_r = \frac{L}{U} \varepsilon_t \quad (2)$$

Onde: L é o comprimento da coluna (m), U é a velocidade de escoamento da fase móvel ($m \cdot s^{-1}$) e ε_t é a porosidade total da coluna.

Para a determinação das curvas de Distribuição dos tempos de residência (DTR) e dos coeficientes de dispersão axial aparente foi utilizado um método adaptado de Yao et al. [18]. Para tanto, foram utilizados os dados obtidos dos mesmos pulsos de acetona descritos no item anterior. Além dos tempos de retenção, foram calculadas também as variâncias (σ^2) ou segundos momentos estatísticos (M2) de cada pulso, utilizando-se a equação 3 [23].

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} - t_r^2 \quad (3)$$

Onde: M_2 é o segundo momento estatístico (s^2), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, σ^2 é a variância do pulso observado (s^2), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$), A_i é a absorvância registrada no tempo t_i e t_r é o tempo de retenção do pulso observado (s).

Uma vez determinados t_r e σ^2 , o coeficiente de dispersão axial aparente para cada velocidade de escoamento estudada foi calculado por regressão não-linear, resolvendo-se a equação 3 utilizando-se a ferramenta solver do software MS-Excel® 2015 (Microsoft, Redmond, EUA).

$$\frac{\sigma^2}{t_r^2} = 2 \left(\frac{Dax}{uL} \right) - 2 \left(\frac{Dax}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(- \frac{uL}{Dax} \right) \right] \quad (4)$$

Onde Dax é o coeficiente de dispersão axial aparente ($m^2 \cdot s^{-1}$), L é a altura (m) do leito, u é a velocidade ($m \cdot s^{-1}$) intersticial da fase móvel ($u = U \varepsilon T$), t_r é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

Os gráficos das curvas de DTR foram plotados pela equação 5.

$$E_{\theta} = t_R \frac{Abs(t)}{\int_0^{\infty} Abs(t) dt} \quad (5)$$

Onde: E_{θ} é a função de distribuição de tempo de residência normalizada (s^{-1}) e Abs é a absorvância registrada em função do tempo .

Para a determinação da altura dos pratos teóricos equivalentes (HETP) em função da velocidade de escoamento da fase móvel foram utilizados os dados obtidos das curvas de DTR mencionados. Os valores da HETP foram calculados utilizando-se a equação 6.

$$HETP = L \frac{M_2}{M_1^2} = L \frac{\sigma^2}{t_r^2} \quad (6)$$

Onde: L é a altura do leito (m), t_r é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

A permeabilidade ao escoamento foi determinada utilizando-se o método baseados na equação de Darcy, onde o criogel produzido na coluna foi equilibrado com 20 VC de coluna de água deionizada. A permeabilidade foi encontrada vide equação 7:

$$\Delta P = \frac{nL}{AK_p^1} Q \quad \text{ou} \quad Q = \frac{AK_p^1}{nL} \Delta P \quad (7)$$

Onde ΔP é a pressão hidrostática sobre a coluna (Pa), η é a viscosidade da fase móvel (Pa·s), Q é a vazão volumétrica ($m^3 \cdot s^{-1}$), A é a área transversal da coluna (m^2), L é a altura do leito (m) e k_p é a permeabilidade do leito (m^2).

2.5.Obtenção das isotermas de adsorção

Utilizou-se albumina do soro bovino (BSA, Sigma, cod. A7908, pureza $\geq 98\%$) como proteína modelo. Os experimentos de adsorção da BSA foram conduzidos em batelada, em diferentes valores de temperatura (298,15 a 328,15 K) e concentração de sulfato de sódio (1,0 a 2,5 mol.L⁻¹). A fase móvel usada foi tampão PBS 0,05M, pH 6,0 adicionado de sulfato de sódio em concentrações desejadas. Para a manutenção da temperatura foi utilizada uma estufa BOD com precisão de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Para a utilização nos ensaios de adsorção os monólitos produzidos foram cortados com uma lâmina de aço em pequenos cubos com cerca de 1.5 mm de aresta. Foram utilizados 15 pontos experimentais, com 3 repetições. Foram avaliadas concentrações iniciais de BSA variando de 0,0 a 15,0 mg/mL.

Inicialmente avaliou-se o efeito da adição de sulfato de sódio de sódio à fase móvel na adsorção de BSA. Em tubos plásticos com tampas foram pesados cerca de 30 mg do adsorvente produzido e colocados em contato com 4.0 mL de solução com concentração de sal e BSA desejadas. Os tubos foram deixados em agitação orbital a 25 rpm durante 12 horas à 298.15K. Posteriormente o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e a concentração de proteínas determinada a 595nm usando o método de Bradford [17]. A concentração de proteína na fase sólida foi determinada de acordo com a Equação 8:

$$q = \frac{(C_o - C_e)V}{m} \quad (8)$$

Em que q é a capacidade adsortiva do adsorvente (mgproteína/g criogel); Co e Ce são respectivamente as concentrações inicial e final de proteínas em solução (mg/mL); V é o volume de solução (mL); m é a massa de criogel seco utilizado.

Posteriormente, o modelo de Langmuir [24] (Equação 9), foi ajustado aos dados experimentais, utilizando-se regressão não-linear. A adequação do modelo foi avaliada com base no ajuste do modelo e significância dos parâmetros (p=0.05) e coeficiente de determinação.

$$q = q_{max} \frac{K_l C_e}{1 + K_l C_e} \quad (9)$$

Onde q_{max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente (mol·L⁻¹), K_l é relacionada à constante de equilíbrio de adsorção (L·mol⁻¹), q é a quantidade de soluto adsorvido (mol·L⁻¹) no equilíbrio e C_e é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio (mol·L⁻¹).

Selecionada a melhor condição de sulfato de sódio testada, avaliou-se o efeito da temperatura na adsorção de BSA na matriz produzida. O mesmo experimento foi conduzido, utilizando-se como fase móvel a solução tampão adicionada de 1.5 mol.L-1 de sulfato de sódio. Foram determinadas a curvas de isotermas de adsorção em temperaturas entre 298.15 K e 328.15 K, sendo o modelo de Langmuir ajustado.

2.6.Determinação das propriedades termodinâmicas

A partir dos dados de equilíbrio de adsorção foi realizada a análise não-linear de van't Hoff para a determinação os parâmetros termodinâmicos ΔH^0_{ads} , ΔS^0_{ads} e ΔG^0_{ads} , foram determinados utilizando metodologia proposta por Bonomo et al. [4] e Ueberbacher et al. [25]. A análise não linear de Van't Hoff é obtida pela Equação 10:

$$\ln K' = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \theta \quad (10)$$

Sendo K' a constante de equilíbrio; a , b e c são parâmetros empíricos e θ uma constante do sistema que depende da razão entre as fases e é constante com a temperatura.

2.7.Avaliação de ciclos experimentais de reutilização

Na sequência de todo o experimento descrito, utilizou-se albumina do soro bovino (BSA, Sigma, cod. A7908, pureza $\geq 98\%$) como proteína modelo, para se avaliar a capacidade de reutilização da coluna utilizada. A adsorção foi repetida na temperatura de 298,15 K e concentração de sulfato de sódio 1,5 mol.L⁻¹. A fase móvel usada foi tampão PBS 0,05M, pH 6,0 adicionado de sulfato de sódio em concentrações especificada.

Em tubos plásticos com tampas foram pesados cerca de 30 mg do adsorvente produzido e colocados em contato com 4.0 mL da fase móvel juntamente com BSA na concentração de 10mg/mL. Os tubos foram deixados em agitação orbital a 25 rpm durante 12 horas à 298.15K. Posteriormente o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e a concentração de proteínas determinada a 595nm usando o método de Bradford.

Para a eluição da proteína adsorvida, o adsorvente foi colocado em contato com 10 mL de água destilada, durante 1 hora. Após isso, o adsorvente ficou exposto em estufa a 60°C até que estivesse seco e em condições de uso, novamente. Essas etapas, denominadas de ciclos de adsorção e eluição da BSA, foram repetidas 5 vezes, com 3 repetições, para a avaliação da perda de eficiência ao longo do tempo de uso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese dos criogéis.

Imagens dos criogéis produzidos e posteriormente funcionalizados com anilina são apresentados na Figura 1. As matrizes adquiriram o formato do molde utilizado, cilíndrico, e apresentaram-se uniformes e rígidos quando desidratados. Quando hidratados apresentaram estrutura macia e elástica, característica dos monólitos de poliacrilamida [27-30]. As matrizes funcionalizadas apresentaram coloração amarelada devido à formação de bases de Schiff no processo de funcionalização [11].

Figura 1. Imagem dos criogéis controle e ativado produzidos no experimento.



Informações sobre a capacidade de adsorção das matrizes controle e funcionalizadas com cobre são apresentadas na Tabela 1. Observa-se que as matrizes funcionalizadas apresentaram uma capacidade de adsorver a a proteína modelo (BSA) muito maior que as matrizes controles. Isso pode ser explicado porque na interação hidrofóbica, a adsorção irá ocorrer a depender da quantidade de zonas hidrofóbicas disponíveis no sistema para que as proteínas possam interagir [7]. Assim sendo, neste trabalho, a coluna funcionalizada com moléculas de anilina apresentaram maior interatividade com as partes hidrofóbicas presente na superfície da BSA do que as matrizes controle [3].

Tabela 1- Valores médios obtidos para capacidade adsortiva das matrizes produzidas

Parâmetro	Controle	Funcionalizado
<i>Capacidade adsortiva (mg_{bsa}/g_{criogel})</i>	4.77 ± 0.95 ^a	31,14 ± 1,38 ^b

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

Informações sobre a caracterização das matrizes produzidas são apresentadas na Tabela 2. Foram encontradas diferenças significativas para capacidade de inchamento (S), fração de macroporos e porosidade total, ocorrendo uma redução nos valores dessas variáveis, quando comparados os criogéis controle e ativados.

A redução nos valores de capacidade de inchamento (S) confirm a funcionalização com anilina, que tornou a superfície do adsorvente mais hidrofóbica, diminuindo conseqüentemente a capacidade de retenção de água das matrizes produzidas [10]. Os valores de S obtidos neste trabalho estão dentro das faixas reportadas para criogéis de poliácridamida em diversos trabalhos da literatura [9,11,20,26,29]

Em relação à dimensão dos poros, pode-se afirmar que os macroporos (diâmetro acima de 1 μm) são de tamanho grande se comparados aos poros de coluna cromatográfica tradicionais. São formados como canais interconectados por onde a fase móvel é facilmente deslocada. Representam a maior parte de colunas dessa natureza e são responsáveis pela elevada permeabilidade deste tipo de leito, assim como as suas tortuosidades e capacidade de constrição. Na fração macroporosa os processos convectivos de transferência de massa dentro do leito são favorecidos. A outra fração é composta por micro e mesoporos com predomínio de processos difusivos de transferência de massa [18-22].

Com a funcionalização houve uma redução na fração de macroporos e porosidade total, reduzindo conseqüentemente a rede interconectada por onde a solução escoar com a predominância de efeitos convectivos de transferência de massa. No entanto a porosidade total manteve-se elevada, correspondendo a cerca de 90% da estrutura das matrizes produzidas. Atribui-se tal alteração na dinâmica de distribuição das frações de poros devido ao potencial de polimerização do glutaraldeído empregado nesse processo, fazendo com que sua estrutura se torne mais reticulada e alguns dos macroporos tornem-se micro e mesoporos. Além disso, com a inserção da anilina na superfície do criogel, o mesmo se torna mais hidrofóbico e dessa maneira, menos água se ligará à ele, o que

provavelmente impeça a maximização dos seus poros. Os valores encontrados são consistentes com os observados em outros trabalhos na literatura em que se trabalhou com criogéis de poliacrilamida [10-12, 21, 30-32].

Tabela 2- Valores médios obtidos para capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED) e frações de poros das matrizes produzidas

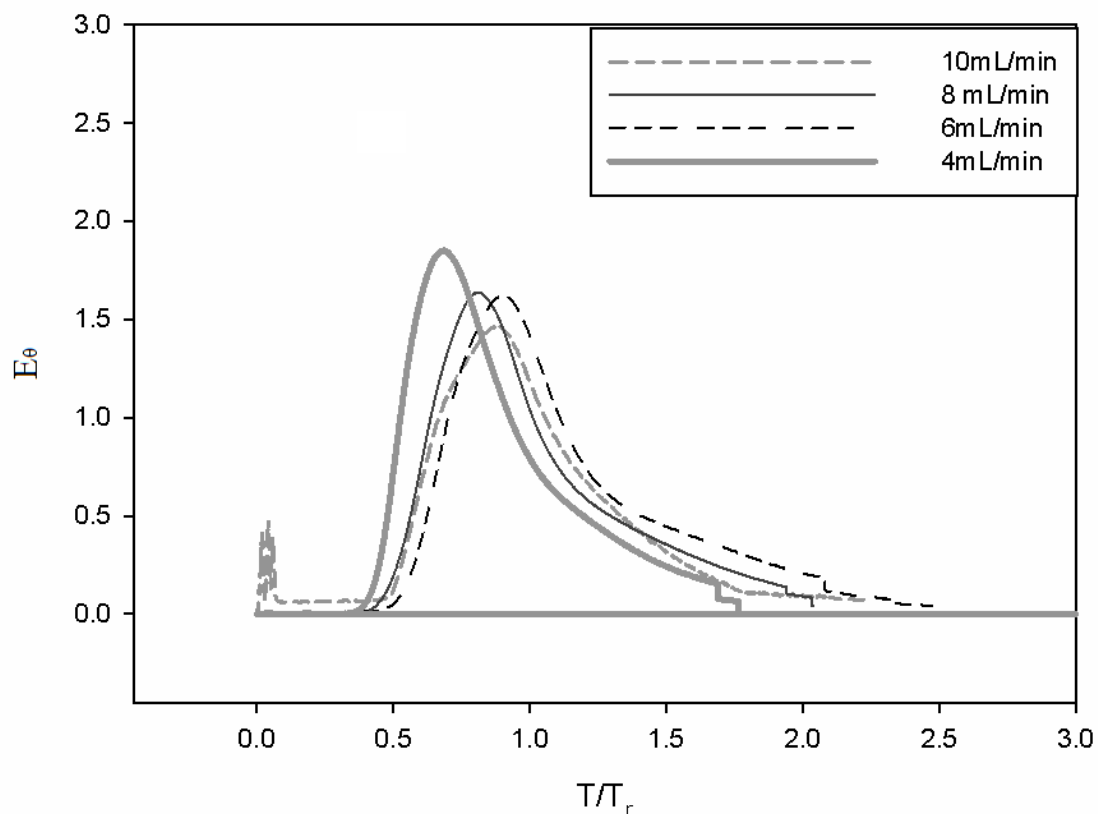
Parâmetro	Controle	Funcionalizado
<i>S</i> (kg/kg)	18.77 ± 0.95 ^a	12.66 ± 0.81 ^b
<i>ED</i> (L/kg)	18.55 ± 2.10 ^a	16.12 ± 2.40 ^a
Fração de macroporos	0.828 ± 0.019 ^a	0.786 ± 0.022 ^b
Fração de micro/mesoporos	0.103 ± 0.020 ^a	0.129 ± 0.021 ^a
Porosidade total	0.941 ± 0.003 ^a	0.905 ± 0.002 ^b

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

3.2.DTR, dispersão axial, HETP.

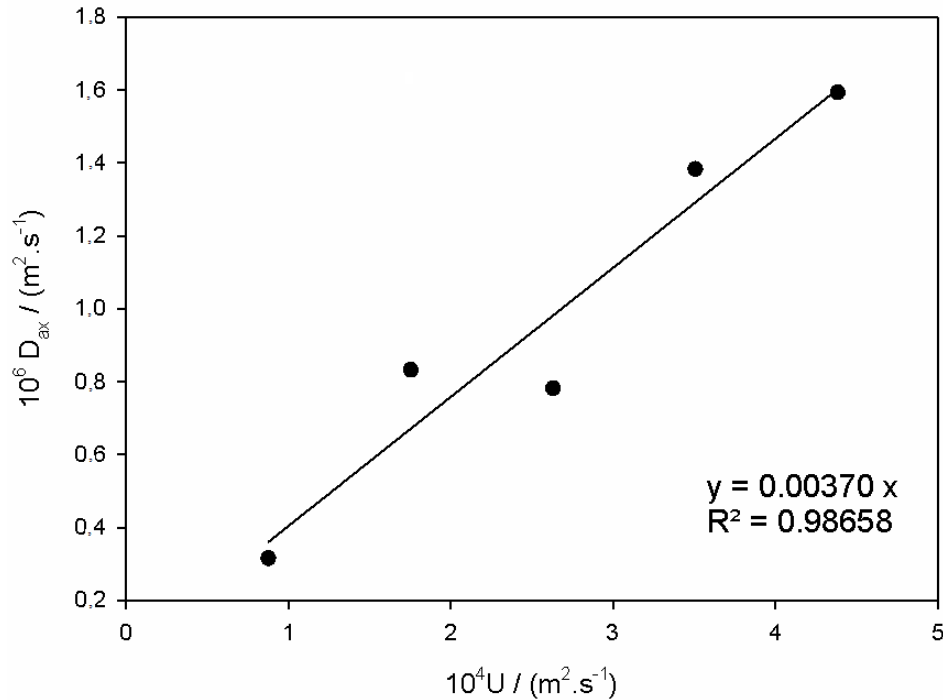
A distribuição dos tempos de residência (DTR) para pulsos de acetona em diferentes velocidades de escoamento da fase móvel são apresentadas na Figura 2. A distribuição do tempo de residência (DTRs) no criogel foi medido em vazões de líquido de 2, 4, 6, 8 e 10 mL / min, respectivamente. Avaliando-se os perfis das curvas para os dois criogéis, nota-se que à medida em que a velocidade superficial aumenta, os picos se tornam mais estreitos. O grau de mistura no escoamento através do leito monolítico é representado pela dispersão axial. Através da observação das curvas de DTR (Figura 2) pode-se observar que quanto menor a vazão maior a largura da base do pico. Quanto menor a largura da base do pico. Percebe-se ainda que as curvas obtidas foram assimétricas, o que pode ser atribuído à homogeneidade na estrutura dos poros e tamanho uniforme dos mesmos. De acordo com Yao et al. (2006a), a assimetria nas curvas de DTR está diretamente relacionada a uma estrutura porosa não homogênea ou à falta de uniformidade na distribuição dos poros que são formados no criogel durante o processo de produção, acarretando em uma mistura e dispersão intensas dentro da coluna.

Figura 2: DTR para pulsos de acetona a diferentes vazões de escoamento, na coluna de criogel com anilina



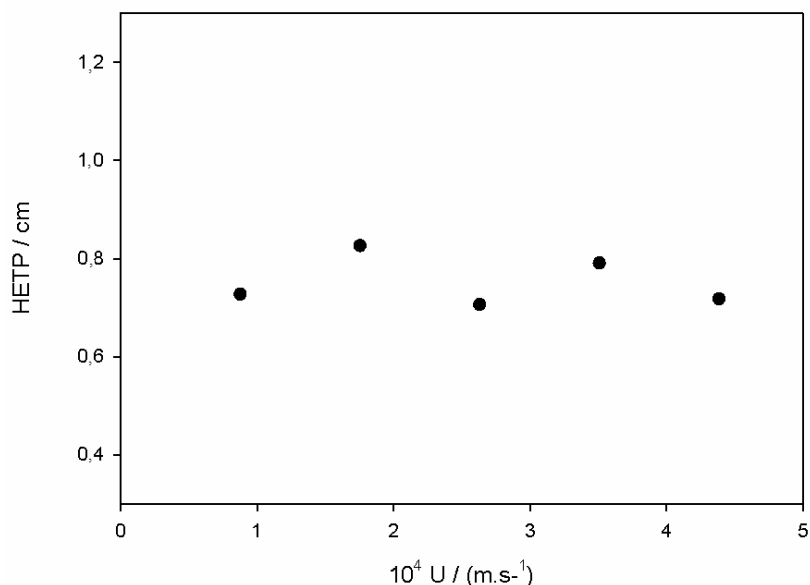
Os coeficientes de dispersão axial (D_{ax}) em função da vazão da fase móvel correspondente à coluna de criogel são apresentados na Figura 3. Pode-se observar que os coeficientes de dispersão axial, nas presentes condições estão na faixa de $3.23 \cdot 10^{-7}$ a $1.67 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$. Observa-se que à medida que velocidade superficial do líquido aumenta, o coeficiente de dispersão axial também aumenta. Esse mesmo comportamento foi reportado por Yao et al. [18]. Os valores para o D_{ax} (bem como sua variação) foram baixos, indicando que houve um menor grau de mistura durante o escoamento da fase móvel, logo o escoamento é tido como pistonado. Escoamento pistonado ocorre quando a velocidade da fase móvel é uniforme em toda a coluna e, portanto, cada porção do fluido que alimenta a coluna escoar sem misturar-se, o que é desejável. Os resultados desse trabalho estão similares aos obtidos por Fontan et al. [9], Mól et al. [26], Yao et al. [18] para criogéis sintetizados a partir de acrilamida e bis-acrilamida. Esse mesmo comportamento foi reportado por Yao et al. [18].

Figura 3: Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de fluxo na coluna de criogel.



Os valores obtidos neste trabalho de altura equivalente a um prato teórico (HETP) estão na faixa de 0,73-0,83 cm. Verificou-se que a HETP da coluna produzida pouco variou em função da vazão de escoamento da fase móvel. Tais valores indicam que a velocidade de escoamento da fase móvel exerce um efeito pequeno sobre a HETP. Outros autores também verificaram para criogéis pAAm um pequeno efeito da vazão sobre a HETP. No entanto, foram maiores que os encontrados por Mól et al. [26], quando trabalharam com um criogel de 3 cm de comprimento e encontraram alturas que variaram entre 0,370 e 0,454 cm; mas semelhantes aos valores encontrados por Veríssimo et al. [13], que variaram entre 0,70 e 0,95 cm, quando utilizaram colunas com comprimento semelhante a este trabalho (5cm).

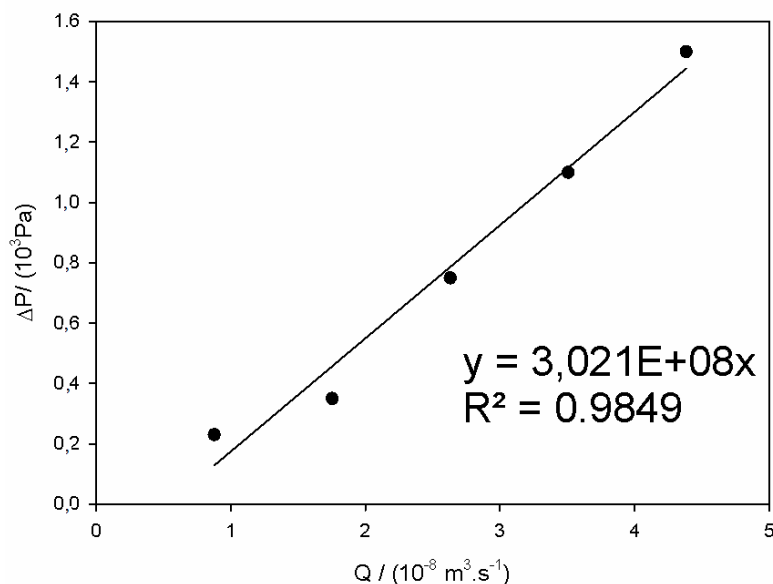
Figura 4: HETP da coluna de criogel produzida em função da vazão de escoamento, para pulsos de acetona.



3.3. Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento de um meio poroso reflete a capacidade que os fluidos têm de percorrê-lo. Na Figura 5 estão apresentados os resultados experimentais referentes à queda de pressão hidrostática em função da velocidade superficial de escoamento. Percebe-se que a permeabilidade ao escoamento da água no leito do criogel monolítico foi de $2,22 \times 10^{-11} \text{ m}^2$. Este valor foi superior aos relatados por outros autores para monólitos poliméricos. Carvalho et al., [14] encontraram um K_w de $4,70 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Mól et al. [26] encontraram o valor de K_w igual a $5,9 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, trabalhando com criogéis de afinidade. Quanto maior o valor de permeabilidade, menor a resistência ao fluxo. Isso pode ser explicado pois a estrutura com grande número de poros, como os grandes poros interconectados são fatores que contribuem diretamente para a baixa resistência ao fluxo, o que possibilita que criogéis supermacroporosos sejam utilizados como fase estacionária em técnicas cromatográficas, podendo-se ainda empregar altas vazões sem que elevados valores de pressão sejam atingidos. A resistência à transferência de massa é praticamente negligenciável, devido ao fluxo predominantemente convectivo da solução através dos poros [22].

Figura 5: Dados experimentais da variação de pressão em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel para criogel de interação hidrofóbica

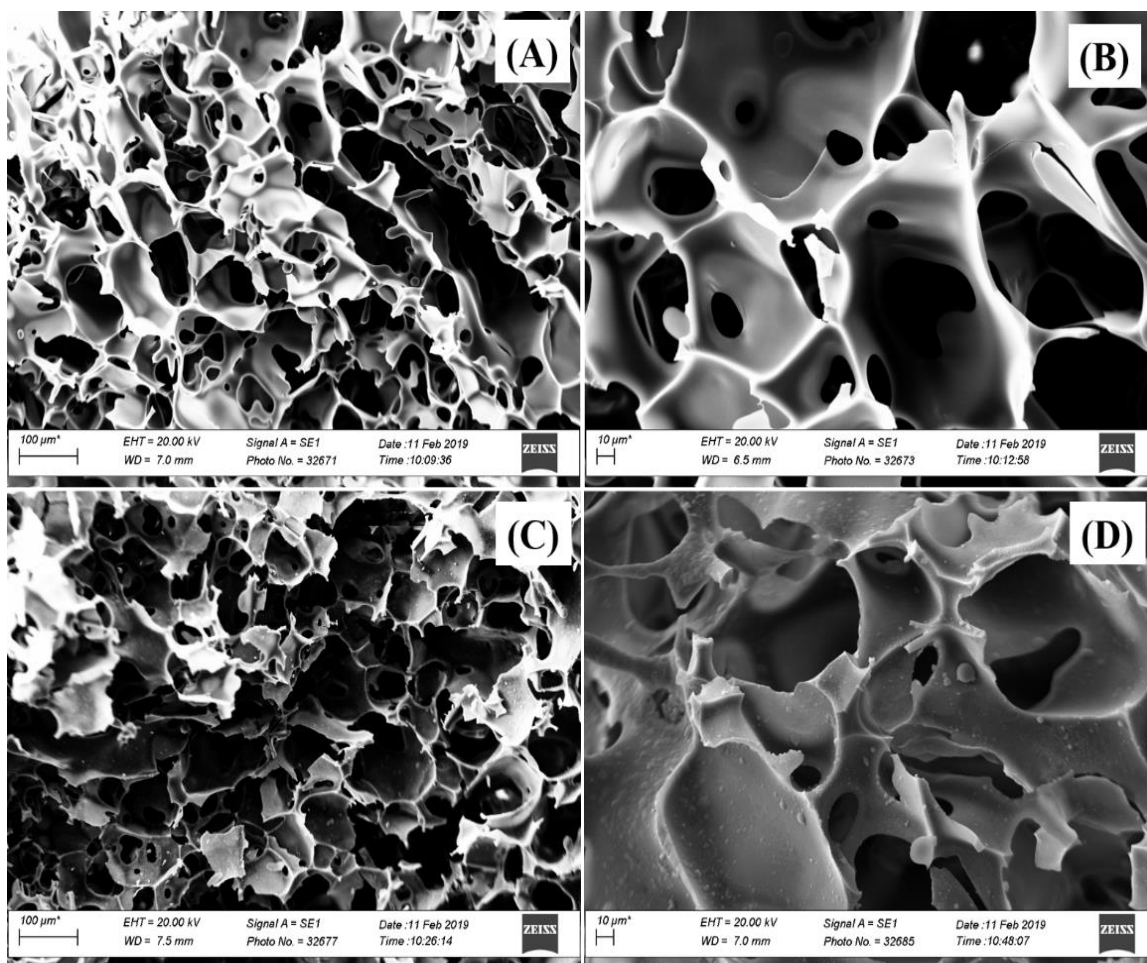


3.4. Avaliações estruturais.

A avaliação morfológica das matrizes produzidas foi realizada através da análise de microscopia de varredura (MEV), sendo as imagens obtidas apresentadas na Figura 6. Observa-se que as matrizes apresentaram estrutura homogênea, com poros grandes e interconectados. Verifica-se o predomínio de macroporos com diâmetro entre 30 e 70 μ m, em acordo com o reportado por diversos autores [18-22,33,34]. As dimensões de poros observada permitem a passagem tanto de macromoléculas, como de células microbianas, fragmentos celulares e até mesmo soluções concentradas e particuladas, facilitando processos de purificação com um menor número de etapas [27, 31, 35, 36].

Verifica-se também a diferença entre as imagens das matrizes controle (A e B) e funcionalizada (C e D). Observa-se na matriz funcionalizada a existência de pontos de rugosidade na superfície dos poros, que pode ser atribuída à inclusão dos braços espaçadores de glutaraldeído nos sítios epóxi ativados da superfície dos criogéis, e posterior funcionalização com anilina, indicando que a mesma foi bem-sucedida.

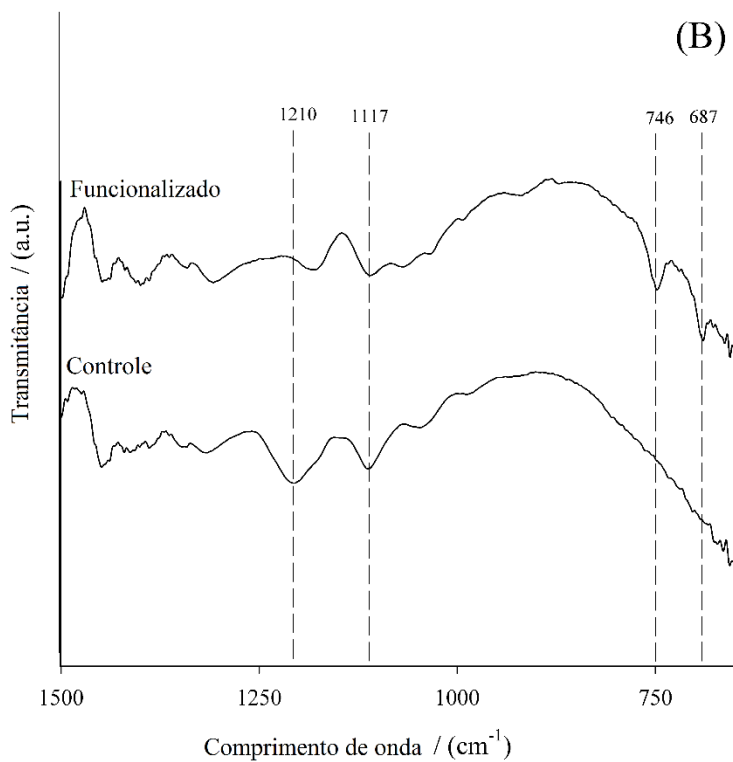
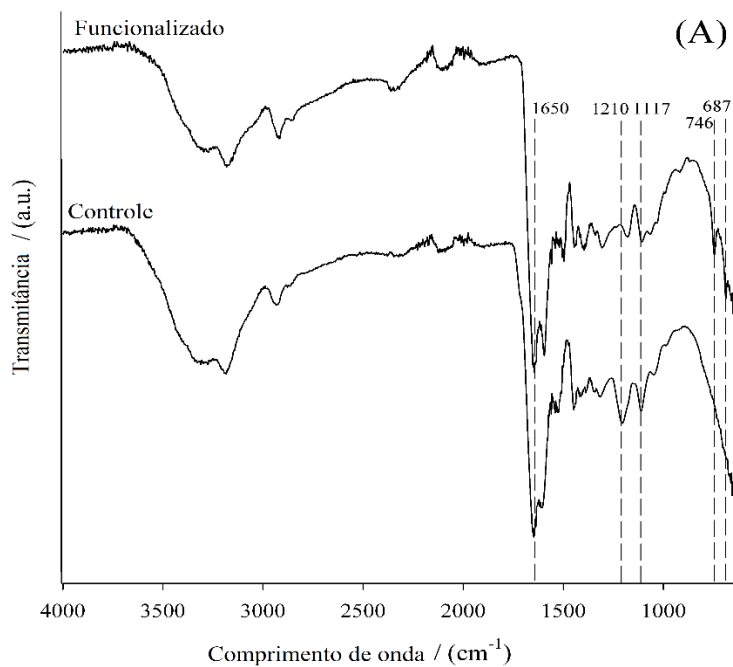
Figura 6 – Micrografias de MEV das matrizes controle (A e B) e funcionalizadas (C e D).



A análise de FTIR foi utilizada para se avaliar a inclusão de grupos funcionais característicos durante o processo de funcionalização. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 7.

Em ambas as matrizes se verifica uma banda de vibração na região próxima a 1650 cm^{-1} , característica do grupamento amida existente nas moléculas de AAm e BAAM utilizadas no processo de síntese dos criogéis [37]. Em diversos trabalhos da literatura, observa-se que há a ocorrência dessa banda em criogéis de poliacrilamida [19, 21, 26, 28].

Figura 7- Espectros de FTIR para matrizes controle e funcionalizada. (A): intervalo de 650-4000 cm^{-1} ; (B) intervalo de 650-1500 cm^{-1} .



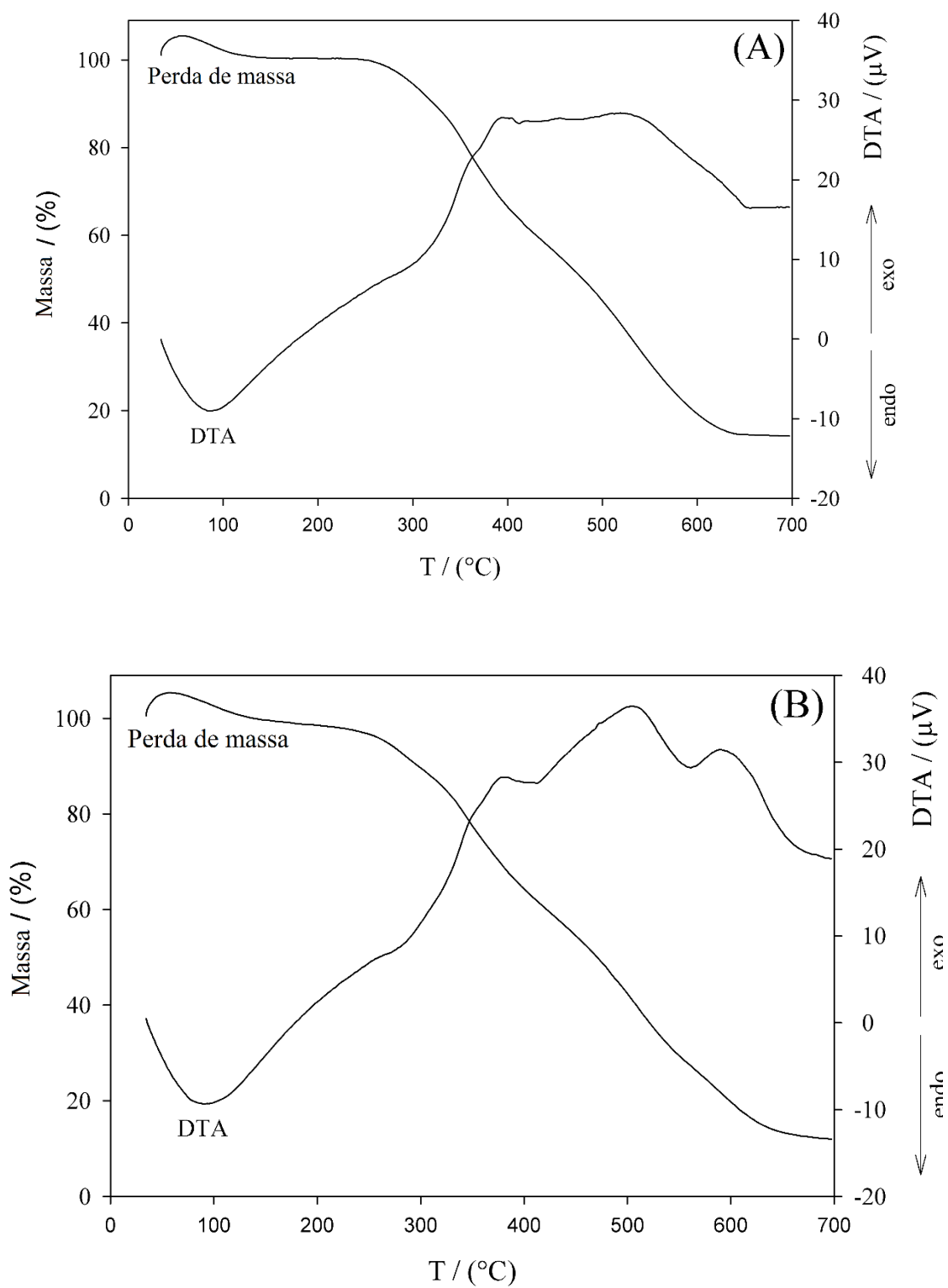
Outras bandas importantes associadas à molécula de AGE na estrutura foram observadas em 1117,5 cm^{-1} e 1250, respectivamente o estiramento do grupo C-O de grupamentos éter e do anel epóxi, respectivamente advindos do AGE [10,11,26,37].

Observa-se uma redução na intensidade dessas bandas na matriz funcionalizada, o que é atribuído à abertura do anel epóxi e alteração da conformação molecular com a inclusão dos braços espaçadores e posterior inclusão do ligante hidrofóbico. As bandas observadas na matriz funcionalizada em torno de 746 cm^{-1} e 687 cm^{-1} são características da anilina, indicando que a inclusão da molécula de anilina na matriz polimérica foi bem-sucedida [38].

Também foi realizada a análise termogravimétrica, cujos resultados são apresentados na Figura 8. Observa-se nas curvas de TGA de ambas as matrizes (controle e funcionalizada) comportamentos similares. Em um primeiro momento, a perda de massa em temperaturas até cerca de 130°C a 150°C é associada à remoção de moléculas de água adsorvidas na superfície dos poros. A partir de 250°C até 650°C observa-se uma taxa de perda de massa quase uniforme, atribuída à degradação da estrutura polimérica orgânica das matrizes, até uma perda de massa quase total. Isso era esperado, dada a natureza orgânica das matrizes e ausência de compostos inorgânicos em sua estrutura [29,39]. Apesar do comportamento semelhante com relação à perda de massa, observa-se para a degradação da matriz funcionalizada um pico exotérmico em 500°C , diferenciando-se do comportamento da matriz controle. Esse evento pode estar associado à degradação da estrutura do glutaraldeído utilizado no processo de funcionalização do criogel. O mesmo resultado foi encontrado por alguns autores como, Mallakpou et al. [40] que avaliaram a bioatividade de nanotubos de carbono com paredes de glutaraldeído (GA) e ao fazerem uma análise térmica do material, perceberam que o glutaraldeído sofria uma degradação em temperaturas próximas à 500°C ; Ansari et al. [41] avaliaram a degradação térmica de nanotubos de carbono, funcionalizado com glutaraldeído e galactose, e também perceberam que o glutaraldeído sofria uma degradação em temperaturas próximas à 500°C .

Estes resultados indicam a diferença entre a matriz controle e funcionalizada e que ambas possuem resistência para utilização em amplas faixas de temperatura, inclusive em valores usualmente utilizados em processos de esterilização de materiais.

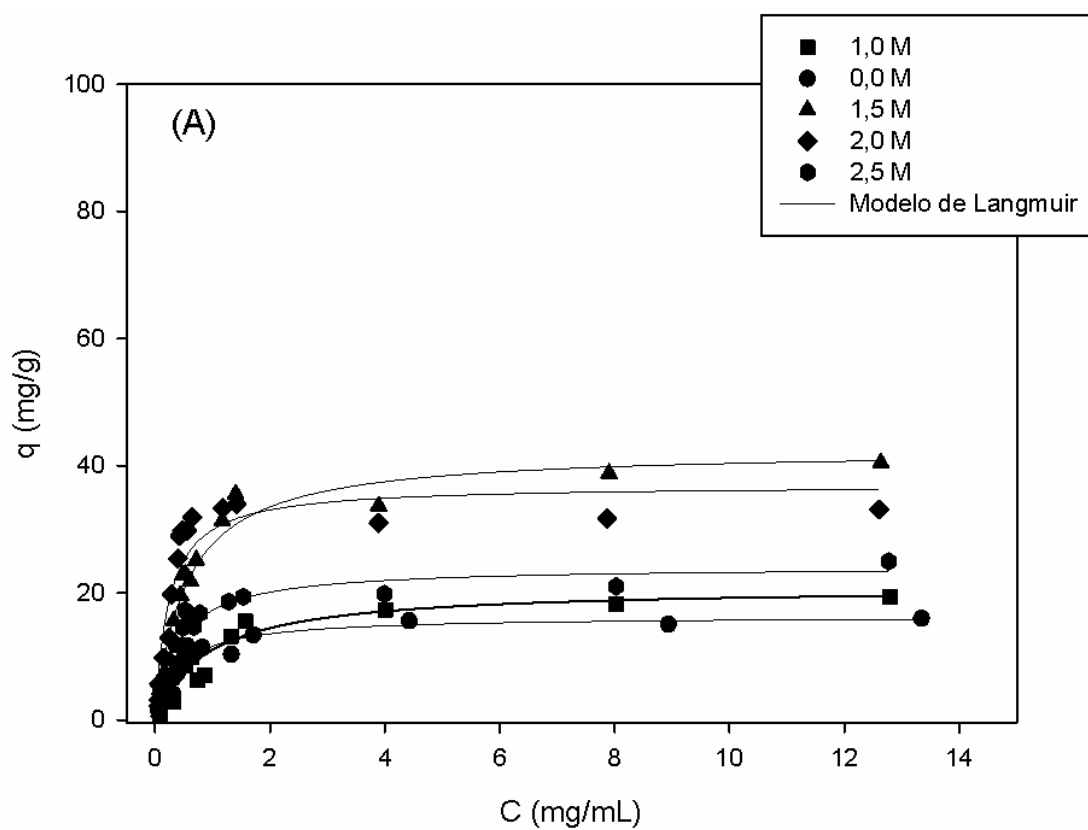
Figura 8- Curvas de TG dos criogéis controle (a) e ativado (b).

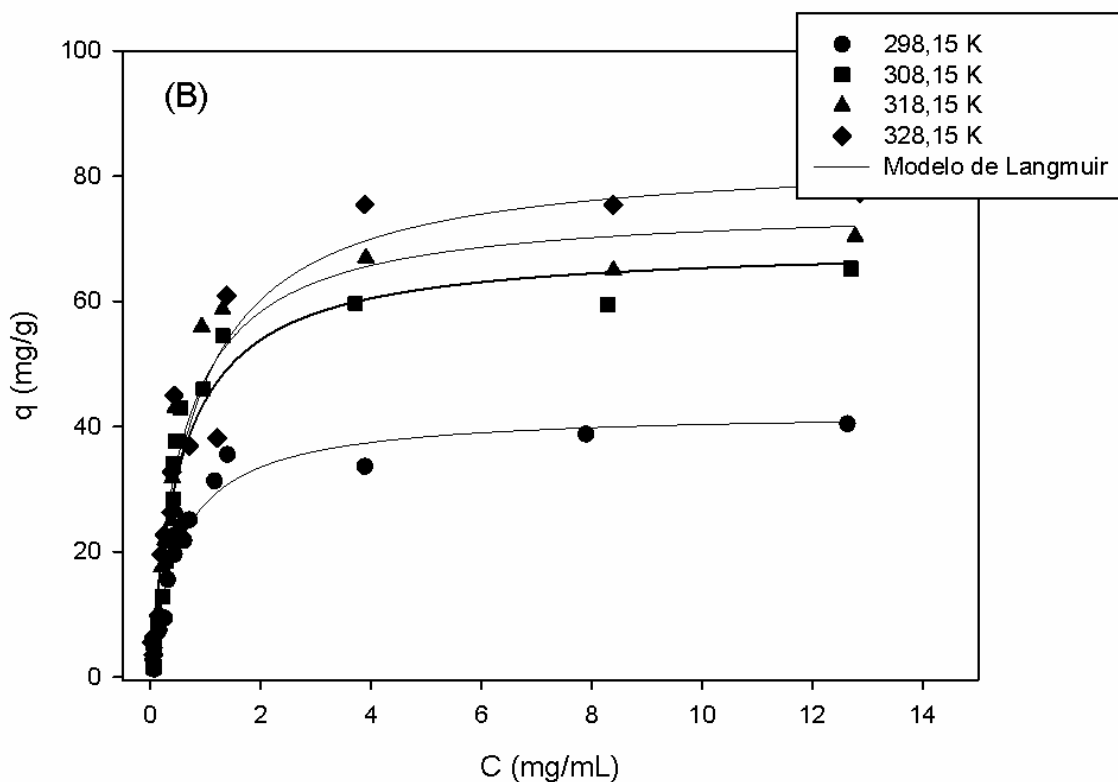


3.5. Comportamento adsorptivo

Na Figura 9 são apresentadas as curvas experimentais das isotermas de adsorção de BSA na matriz de interação hidrofóbica produzida, considerando-se o efeito da concentração de sulfato de sódio e a temperatura.

Figura 9 – Curvas de isotermas de adsorção de BSA na matriz funcionalizada. (A) efeito da concentração de Na_2SO_4 , $T=298.15\text{ K}$ e (B) efeito da temperatura, $C_{\text{sal}}= 1.5\text{ mol.L}^{-1}$ de Na_2SO_4 .





A capacidade adsorptiva aumentou com o aumento da força iônica até a concentração de 1.5 mol.L^{-1} , diminuindo após isso. Diversos autores relatam o aumento da capacidade adsorptiva em CIH com o aumento da concentração de sais em diversos sistemas [3, 4, 25, 42]. No entanto, apesar da menção do uso de concentrações salinas entre 1.0 mol.L^{-1} e 3.0 mol.L^{-1} em CIH, é recorrente o uso de valores que não excedem a 1.5 mol.L^{-1} , empregando-se sais como sulfato de sódio, sulfato de amônio ou cloreto de sódio [43, 44]. Poucos estudos com adsorção de proteínas em CIH em concentrações tão elevadas de sulfato de sódio como as utilizadas neste trabalho (até 2.5 mol.L^{-1}) foram observados [43].

A utilização de um sal cosmotrópico como o sulfato de sódio favorece a adsorção na CIH por promover um aumento de tensão interfacial molar no sistema e a dessolvatação da superfície da proteína expondo grupos hidrofóbicos existentes, levando a um ganho de energia livre que precisa ser compensado pelo processo de adsorção da proteína, que então ocorre [44, 45]. Até a concentração de sulfato de sódio igual a 1.5 mol.L^{-1} verificou-se esse comportamento. No entanto, muitas variáveis podem afetar esse processo, como o pH, tipo de proteína e do sal, natureza do adsorvente, entre outros [43 - 45]. Acima de 1.5 mol.L^{-1} de sulfato de sódio, houve o aumento do efeito salting out sobre a proteína, o que levou à maior dessolvatação da mesma e exposição de regiões hidrofóbicas o que

contribui para a formação de agregados como forma de estabilização do sistema [45]. As interações entre regiões hidrofóbicas nos agregados de proteína possivelmente diminuíram as superfícies externas com tais características, fazendo com que a interação com o adsorvente fosse reduzida.

O efeito da temperatura na adsorção de BSA foi avaliado então na concentração de sulfato de sódio igual a 1.5 mol.L^{-1} , por ter apresentado maior capacidade adsortiva. O efeito da temperatura é um fenômeno complexo, que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do adsorvente, quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais e configuracionais de proteínas [1]. Em geral, o aumento da temperatura faz com que a proteína altere seu arranjo tridimensional, modificando sua estrutura secundária e/ou terciária, fazendo com que sejam expostas regiões hidrofóbicas. Bonomo et al. [4] e Ueberbacher et al. [25] demonstraram que retenção da proteína geralmente aumenta com a temperatura. Além disso, um aumento na temperatura pode ocasionar aumento de energia cinética e na mobilidade das espécies do adsorvato [46].

Informações sobre o ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais são apresentados na Tabela 3. Em todos os casos os parâmetros foram significativos ($p < 0,05$), pelo teste T e o coeficiente de determinação igual ou superior ao 0,90. Diversos autores vêm relatando o ajuste satisfatório do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de proteínas em CIH [3, 4, 47]. Também é importante destacar que os valores de capacidade adsortiva observados neste trabalho com a matriz macroporosa desenvolvida não diferem consideravelmente de valores observados ao se trabalhar com matrizes comerciais. Mirani et al. [43] observou capacidade adsortiva de BSA na resina Phenyl Sepharose FF de cerca de 30 mg.mL^{-1} , Meng et al. [47] observou valores experimentais para capacidade adsortiva de BSA entre 60 e 70 mg.mL^{-1} em resinas Sepharose Phenyl, Butyl e Octyl. Rodler et al. [44] obtiveram valores em torno de 18 mg.mL^{-1} para a adsorção de BSA em Toyopearl Butyl. Os valores máximos obtidos no presente trabalho. Em torno de 80 mg.mL^{-1} demonstram ser promissora a aplicação da matriz desenvolvida.

Tabela 3- Parâmetros ajustados do modelo de Langmuir para as isotermas de adsorção obtidas nas diferentes condições estudadas.

T (K)	C _s (M)	Parâmetros de Langmuir		R ²
		q _{max} / (mg.g ⁻¹)	K' / (mg.mL ⁻¹)	
298,15	1,0	20,901	0,894	0,93
	1,5	42,499	0,536	0,97
	2,0	36,919	0,235	0,90
	2,5	24,117	0,400	0,94
298,15		42,499	0,536	0,97
308,15	1,5	69,014	0,564	0,95
318,15		75,284	0,582	0,95
328,15		83,474	0,773	0,94

q_{max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente (mol·L⁻¹), K' é a constante de equilíbrio de adsorção.

3.6. Análise termodinâmica

A partir dos resultados obtidos observou-se que, dentro da faixa de temperatura estudada, o processo de interação hidrofóbica torna-se mais favorável com a elevação da temperatura, verificado pelo aumento do q_{max}, é a capacidade máxima de saturação do adsorvente (mol·L⁻¹), e também do aumento de K', que é a constante de equilíbrio de adsorção, descoberto pelo limite da concentração no modelo de Langmuir tendendo a zero. Tal fato, sugere mudanças conformacionais da proteína e configuracionais em todo o sistema em função da temperatura. Nas Figuras 10 e 11 são apresentados o gráfico de van't Hoff e os valores estimados para a variação das propriedades termodinâmicas padrão de adsorção energia livre de Gibbs, entalpia e entropia (multiplicada pela temperatura).

Figura 10- Gráfico de van't Hoff para a adsorção de BSA na matriz produzida.

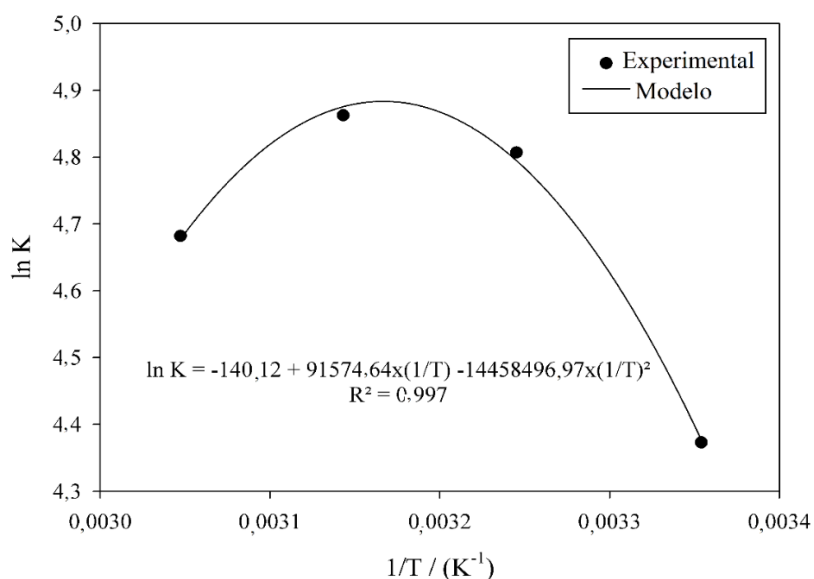
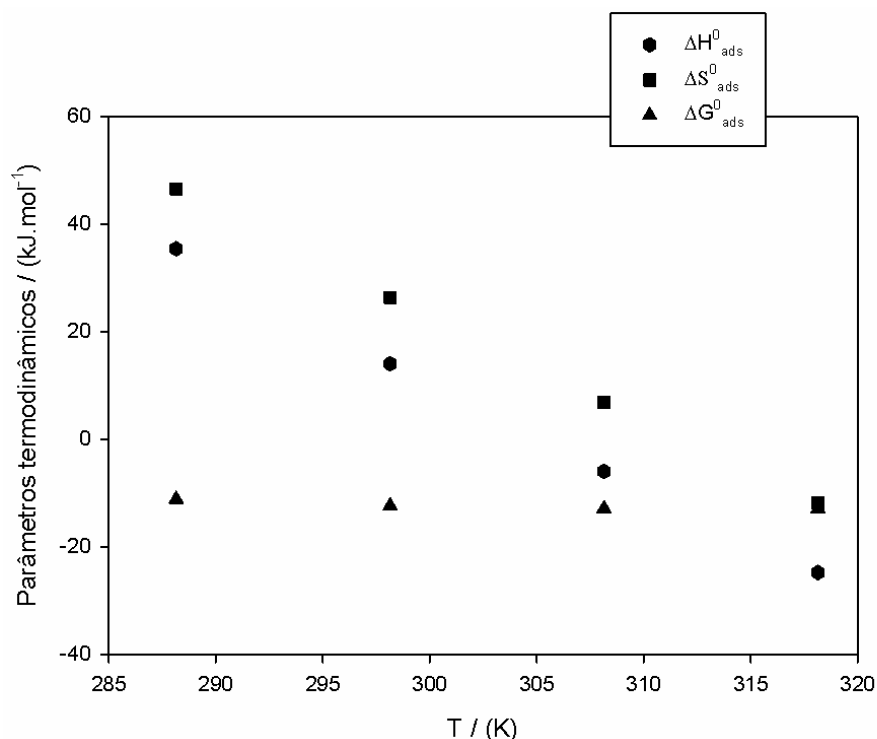


Figura 11– Variação das propriedades termodinâmicas para o processo de adsorção de BSA na matriz produzida em função da temperatura.



Observa-se na Figura 10 que apesar da capacidade adsorptiva ter aumentado com o aumento da temperatura, houve um declínio no valor de K (e no lnK) ao se passar de 318.15K para 328.15K, sugerindo alterações nos fenômenos que dominam o processo adsorptivo em questão. Na Figura 11 verifica-se que o processo de adsorção foi espontâneo ($\Delta G^0_{ads} < 0$), com os valores de ΔG^0_{ads} permanecendo praticamente constantes

com o aumento da temperatura. O processo foi mudando de entropicamente dirigido a 298.15K para entalpicamente dirigido a 328.15K, havendo compensação entálpico-entrópica na faixa de temperatura estudada. Tal compensação é relatada na literatura em eventos envolvendo macromoléculas como proteínas [48, 49].

Como já mencionado, o processo de adsorção de proteínas em CIH envolve uma série de fenômenos complexos afetados por diversas variáveis. De modo geral, é aceito que sais cosmotrópicos dessolvam a superfície das proteínas, expondo regiões hidrofóbicas das proteínas aptas à adsorção por interações dessa natureza [43]. O mesmo acontece ao redor dos radicais hidrofóbicos do adsorvente, que também ficam menos solvatados. Todo esse conjunto de fenômenos leva à alterações configuracionais e conformacionais no sistema (proteínas, íons, água,...), visando à estabilização termodinâmica do mesmo [44].

O comportamento entropicamente dirigido nas temperaturas mais baixas estudadas está de acordo com o relatado em diversos trabalhos [4, 25, 44]. A dessolvatação das moléculas de proteína não é energeticamente favorável comparada às novas interações formadas no sistema. E a proteína adsorvida perde entropia configuracional, por encontrar-se num estado de menor mobilidade no sistema. No entanto o ganho de entropia configuracional do sistema com a liberação de moléculas de água para a solução, ainda que se orientando em torno dos íons existentes, e de entropia conformacional da proteína que ainda está em solução, devido ao desenovelamento parcial da sua estrutura, tornam o processo favorável e entropicamente dirigido.

Ao se aumentar a temperatura até 55°C, associado à elevada concentração de sulfato de sódio, começa a se observar efeitos de agregação proteica, ainda que não se observe precipitação até a temperatura estudada [50]. Com a formação de agregados, a proteína passa a perder entropia conformacional e configuracional, o que causaria um aumento da energia livre de Gibbs do sistema [51]. No entanto, para manter a espontaneidade do processo de adsorção como observado eventos entálpicos exotérmicos, possivelmente associados às interações hidrofóbicas proteína-proteína nos agregados, passam a ser relevantes tornando o processo entalpicamente dirigido [43,51]. A possível adsorção de pequenos agregados proteicos ainda explica o aumento na capacidade adsortiva apesar de um declínio no valor de K.

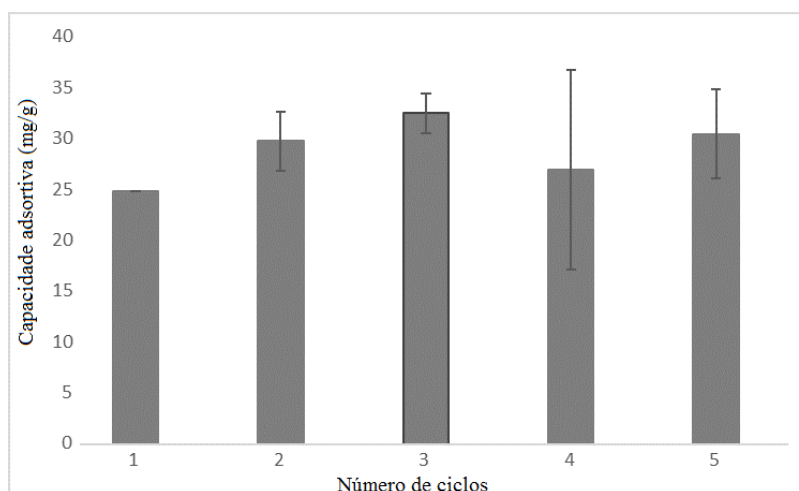
O comportamento termodinâmico encontrado neste trabalho difere do observado por outros autores utilizando CIH. Apesar do aumento da capacidade adsortiva com a

temperatura, Bonomo et al. [4] e Ueberbacher et al. [25] observaram que a adsorção de BSA em adsorventes comerciais foi endotérmica e entropicamente dirigida nas condições estudadas. No entanto, não se verificou estudos termodinâmicos de adsorção similares com a utilização de temperatura e concentração salina tão elevadas quanto no presente trabalho.

3.7. Avaliação do reuso das matrizes produzidas

Para demonstrar a eficiência dos criogéis funcionalizados com anilina ao longo da quantidade de etapas de adsorção ele pode ser submetido, foi feito um ciclo de reutilização dessas matrizes, o qual está pode ser visto na Figura 11.

Figura 11: Valores experimentais da capacidade adsortiva da coluna ativada com anilina em 5 ciclos consecutivos.



O adsorvente apresentou uma capacidade adsortiva média de 29.15 mg de BSA / g de criogel seco ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e não perdeu a eficiência em 5 ciclos de utilização, o que demonstra estabilidade ao longo do tempo de uso. Os resultados foram similares a outros trabalhos da literatura, que também obtiveram uma boa estabilidade de reutilização para os criogéis de poliácridamida ao longo do tempo de uso. Como é o caso de Carvalho et al. [14] que utilizou o criogel de poliácridamida para adsorver lactoferrina, Uygun et al. [4] que utilizou matrizes poliméricas para adsorver enzimas e Gonçalves et al [10], que imobilizou glicose às matrizes poliméricas para terem afinidade com Lectinas. Os resultados encontrados sugerem que os criogéis de poliácridamida podem ser utilizados em processos de purificação de proteínas e por isso, foram feitas as caracterizações necessárias para se obter um melhor conhecimento do mesmo.

4. CONCLUSÃO

Foi possível a produção de um novo monólito polimérico de interação hidrofóbica com anilina imobilizada a partir da metodologia proposta. Tal imobilização foi confirmada a partir da análise do espectro de FTIR. Foi verificado que as matrizes funcionalizadas com o método do glutaraldeído apresentaram menores valores para capacidade de inchamento e grau de expansão. Verificou-se que foi possível a adsorção da BSA em diferentes temperaturas e concentrações de sal. O processo de interação hidrofóbica entre a proteína e o criogel macroporoso polimérico modificado pela enxertia da anilina foi avaliado a diferentes temperaturas e concentrações de sulfato de sódio adicionado à fase móvel, tamponada em pH 6. As isotermas de adsorção obtidas demonstraram que o aumento da temperatura aumentou a capacidade adsortiva do criogel, ocorrendo o mesmo com o aumento da concentração de sal, até certo ponto. O modelo de Langmuir foi utilizado e o ajuste foi satisfatório. A análise termodinâmica proposta a partir do modelo não linear de Van't Hoff permitiu avaliar o processo de interação como um todo, sendo útil para a compreensão dos fenômenos observados. Os processos ocorreram de forma espontânea mostraram-se exotérmico e entalpicamente dirigido, com o fenômeno dominante provavelmente associado à naturação das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

REFERÊNCIAS

- [1] L. Zhou, J. Zhu, M. Lin, J. Xua, Z. Xiec, D. Yang, Tetra-alkylsulfonate functionalized poly(aryl ether) membranes with nanosized hydrophilic channels for efficient proton conduction. *Journal of Energy Chemistry*, 40 (2020) 57-64.
- [2] W.R.. Lei, M. Kenneth, Evaluation of protein separations based on hydrophobic interaction chromatography using polyethylene terephthalate capillary-channeled polymer (C-CP) fiber phases. *Journal of Chromatography A*, 1585 (2019) 161-171.
- [3] E.E.G. Rojas, J.S.R. Coimbra, L.A., Minim, S.H. Saraiva, C.A.S. da Silva, Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme, *Journal of Chromatography B*, 840 (2) (2006) 85-93.
- [4] R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, R.C.I. Fontan, J.S.R. Coimbra, Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. *Journal of Chromatography B*, 844 (1) (2006) 6-14.
- [5] M.E. Çorman, N. Bereli, S. Ozkara, L. Uzun, A. Denizli, Hydrophobic cryogels for DNA adsorption: Effect of embedding of monosize microbeads into cryogel network on their adsorptive performances. *Biomedical Chromatography*, 27 (11) (2013) 1524-1531.
- [6] N. Avcibaşı, M. Uygun, M.E. Çorman, S. Akgöl, A. Denizli, Application of supermacroporous monolitCIH hydrophobic cryogel in capturing of albumin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (8) (2010) 2232-2243.
- [7] S.C. Silvério, L.A. Ferreira, J.A. Martins, J.C. Marcos, E.A. Macedo, J.A. Teixeira, Lysozyme and bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol–phenylalanine conjugate polymer/salt aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 322–323 (2012) 19-25.
- [8] S. Cankara, E.B. Özkütük, Ö. Öztürk, A. Ersöz, R. Say, Biopolymer based ion imprinting cryogel traps for the removal of Tl(I). *Journal Separation Science and Technology*, 51 (2016) 901-908.
- [9] R.C.I. Fontan, R.C.F. Bonomo, G.R.F. Gonçalves, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolitCIH ion exchanger columns. *Polymer Engineering and Science*, 58 (10) (2018) 1717-1725.

- [10] G.R.F. Gonçalves, O.R.R. Gandolfi, L.S. Santos, R.C.F. Bonomo, C.M. Veloso, L.A.A. Veríssimo, R.C.I. Fontan, Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1068-1069 (2017) 71-77.
- [11] J.F. Da Silva, D.L. Da Silva, R.G. Nascimento, L.A.A. Veríssimo, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (37) (2019) 47956.
- [12] I.S. Nascimento, D.L. Silva, T.B. Pereira, G.R.F. Gonçalves, L.A.A. Verissimo, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, Single-step purification of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds using a supermacroporous ion exchange cryogel. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18 (1) (2019) 313-324.
- [13] L.A.A. Veríssimo, F.S. Paganoto, P.C.G. Mol, R.C.I. Fontan, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. *Separation Science and Technology*, 52 (12) (2017) 1973-1982.
- [14] B.M.A. Carvalho, W.F. Silva Júnior, L.M. Carvalho, L.A. Minim, G.G.P. Carvalho, Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33 (1) (2016) 215-223.
- [15] E.D. Vieira, L.G.M. Basso, A.J. Costa-Filho, Non-linear van't Hoff behavior in pulmonary surfactant model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1859 (6) (2017) 1133-1143.
- [16] X. Guo, X. Li, Y. Jiang, L. Yi, Q. Wu, H. Chang, X. Diao, Y. Sun, X. Pan, N. Zhou, A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 149 (2014) 353–360.
- [17] A. Kumar, V. Bansal, J. Andersson, P. Roychoudhury, B. Mattiasson, Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. Immobilized metal affinity chromatography purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, 1103 (1) (2006) 35-42.

- [18] K. Yao, S. Shen, J. Yun, L. Wang, X. He, X. Yu, Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithCIH cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109 (1) (2006) 103-110.
- [19] I.N. Savina, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. *Polymer*, 46 (23) (2005) 9596-9603.
- [20] G.R.F. Gonçalves, O.R.R. Gandolfi, L.S Santos, R.C.F. Bonomo, C.M. Veloso, L.A.A. Veríssimo, R.C.I. Fontan. Development of supermacroporous monolithCIH adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B*, 1033-1034 (2016) 406-412.
- [21] F.M. Plieva, J. Andersson, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Characterization of polyacrylamide based monolithCIH columns. *Journal of Separation Science*, 27 (10-11) (2004) 828-836.
- [22] F.M. Plieva, J. Andersson, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, I.N. Savina, S. Deraz, Characterization of supermacroporous monolithCIH polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *Journal of Chromatography B*, 807 (1) (2004) 129-137.
- [23] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2) (1976) 248-254.
- [24] I. Langmuir, The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 38 (6) (1916) 1145-1156.
- [25] R. Ueberbacher, A. Rodler, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins: Thermodynamic analysis of conformational changes. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2) (2010) 184-190.
- [26] P.C.G. Mól, L.A.A. Veríssimo, M.R. Eller, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from cCIHken egg white. *Journal of Chromatography B*, 1044-1045 (2017) 17-23.

- [27] C.A. Mourão, C. Marcuz, K. Haupt, S.M.A. Bueno, Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolithC₁₈ cryogels: Purification of IgG from human serum. *Journal of Chromatography B*, 1129 (2019) 559-567.
- [28] X. Yang, D. Kebebew, D. Guorong, P.S. Pan, Selective adsorption and high recovery of La³⁺ using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. *Chemical Engineering Journal*, 379 (2020) 122335.
- [29] A.C.F. De Oliveira, I.C.O. Neves, J.A.M. Saraiva, M.F.F. De Carvalho, G.A. Batista, L.A.A. Veríssimo, J.V. De Vilela, Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, (2019) DOI: 10.1080/01496395.2019.1617743.
- [30] P.A.P. Fonseca, L.A. Minim R.C.I. Fontan, V.P.R. Minim, G.R.F. Gonçalves, P.C.G. Mól, Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithC₁₈ column. *Fluid Phase Equilibria*, 401 (2015) 64-69.
- [31] J.T. Newberg, Equilibrium shifts upon freezing. *Fluid Phase Equilibria*, 478 (2018) 420-428.
- [32] I. Güven, O. Gezici, M. Bayrakç, M. Morbidelli, Calixarene-immobilized monolithC₁₈ cryogels for preparative protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1558 (2018) 82-89.
- [33] V.M. Trejos, S. Skołowski, O. Pizio, On the phase behavior of model fluids with square-well attraction in slit-like pores. Density functional approach. *Fluid Phase Equilibria*, 483 (2019) 92-100.
- [34] K. Yao, J. Yun, S. Shen, F. Chen, In-situ graft-polymerization preparation of cation exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. *Journal of Chromatography A*, 1157 (1-2) (2007) 246-251.
- [35] F.M. Plieva, E. Seta, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: processing under compression and scale-up. *Separation and Purification Technology*, 65 (1) (2009) 110-116.

- [36] M. Alex Brown, P. Tkac, A. Paulenova, F. Vandegrift, Influence of Temperature on the Extraction of Pu(IV) by Tri-n-butyl Phosphate from Acidic Nitrate Solutions. *Journal Separation Science and Technology*, 45 (2009) 50-57.
- [37] J. Coates, Interpretation of Infrared Spectra: A practical approach. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (online). John Wiley & Sons Ltd, (2006) DOI: 10.1002/9780470027318.a5606
- [38] Coblenz Society, Inc., “Evaluated Infrared Reference Spectra” in NIST Chemistry webbook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <https://doi.org/10.18434/T4D303> (accessed on march, 8th, 2020).
- [39] P.C.G. Mól, L.A.A. Veríssimo, L.A. Minim, M. Boscolo, E. Gomes, R. Da Silva, Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. *Process Biochemistry*, 82 (2019) 75-83.
- [40] S. Mallakpour; S. Rashidimoghadam. Preparation, characterization, and in vitro bioactivity study of glutaraldehyde crosslinked chitosan/poly(vinyl alcohol)/ascorbic acid-MWCNTs bionanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 144, 2020, Pages 389-402.
- [41] S.A. Ansari; R. Satar; S. Chibber; M.J. Khan. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 167, 2013.
- [42] A. Vu, X. Qian, S. Wickramasinghe, Membrane-based hydrophobic interaction chromatography. *Journal Separation Science and Technology*, 52 (2017) 278-298.
- [43] M.R. Mirani, F. Rahimpour, Thermodynamic modeling of hydrophobic interaction chromatography of biomolecules in the presence of salt. *Journal of Chromatography A*, 1422 (2015) 170-177.
- [44] A. Rodler, R. Ueberbacher, B. Beyer, A. Jungbauer, Calorimetry for studying the adsorption of proteins in hydrophobic interaction chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49 (1) (2019) 1-20.

- [45] C. Borrmann, C. Helling, M. Lohrmann, S. Sommerfeld, J. Strube, Phenomena and Modeling of Hydrophobic Interaction Chromatography. *Journal Separation Science and Technology*, 46 (2011) 1289-1305.
- [46] A. Werner, E Hackemann, H Hasse, Temperature dependence of adsorption of PEGylated lysozyme and pure polyethylene glycol on a hydrophobic resin: Comparison of isothermal titration calorimetry and van't Hoff data. *Journal of Chromatography A*, 1356 (2014) 188-196.
- [47] Q. Meng, J. Wang, G. Ma, Z. Su, Isotherm Type Shift of Hydrophobic Interaction Adsorption and its Effect on Chromatographic Behavior. *Journal of Chromatography Science*, 51 (2) (2013) 173-180.
- [48] X. Jin, K. Chen, J. Zhu, Y. Wu, Effect of Solution Polarity and Temperature on Adsorption Separation of Erythromycin A and C onto Macroporous Resin SP825. *Separation Science and Technology*, 49 (2014) 898-906.
- [49] A.I. Dragan, C.M. Read, C. Crane-Robinson, Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation. *European Biophysics Journal*, 46 (4) (2017) 301-308.
- [50] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements. *Langmuir*, 24 (13) (2008) 6866-6872.
- [51] L.S. Bigman, Y. Levy, Entropy-enthalpy compensation in conjugated proteins. *Chemical Physics*, 514 (2018) 95-105.

CAPITULO 3

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO TERMODINÂMICO DE UM ADSORVENTE MACROPOROSO DE AFINIDADE FUNCIONALIZADO COM COBRE (Cu²⁺)

Resumo

Criogéis macroporosos com metal imobilizado são suportes eficazes na separação por afinidade de biomoléculas. Neste trabalho, um adsorvente de poliacrilamida (criogel) foi produzido e funcionalizado com íons de Cu²⁺ utilizando ácido iminodiacético (IDA), com o objetivo de capturar proteínas que tenham resíduos de histidina em sua estrutura. O adsorvente foi caracterizado quanto à porosidade, grau de expansão (ED), capacidade de inchamento (S), espectrofotometria no infravermelho FTIR, análise termogravimétrica (TGA) e ciclos de reutilização. Avaliou-se a adsorção da albumina do soro bovino (BSA) no adsorvente, variando-se a temperatura (288,15 a 328,15K), conseguindo-se uma capacidade adsortiva máxima de aproximadamente 208.74 mg_{BSA}.g⁻¹_{adsorvente} a 328.15K. A termodinâmica da adsorção da BSA no criogel-IDA-Cu²⁺ foi investigada. Os dados de equilíbrio da adsorção foram avaliados por meio das isotermas de adsorção desenvolvidas, em pH 7,2. O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados de equilíbrio, e verificou-se o aumento na capacidade adsortiva com o aumento da temperatura em toda temperatura estudada. Análise termodinâmica baseada na relação de van't Hoff mostra que nas condições estudadas o processo foi espontâneo com compensação entálpico-entrópica. O processo de afinidade tornou-se endotérmico e entropicamente dirigido com o aumento da temperatura e o fenômeno dominante foi provavelmente associado à desnaturação das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

Palavras chave: Criogel; cobre; afinidade; adsorção; isotermas; termodinâmica.

1. INTRODUÇÃO

Os fundamentos da afinidade de biomoléculas por íons metálicos são conhecidos há muito tempo. Em 1974, Everson e Parker [1] demonstraram que certos grupamentos, expostos na superfície de metaloproteínas são os principais responsáveis pela adsorção dessas em resinas contendo íons metálicos imobilizados. Esse procedimento de afinidade popularizou-se com o trabalho publicado por Porath et al. [2], quando introduziram a técnica cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

A IMAC se baseia na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e resíduos de aminoácidos, tais como o imidazol da histidina, o tiol da cisteína e o indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico [3]. A técnica de IMAC vem sendo muito utilizada na purificação de proteínas de origem natural ou recombinante, pois alcança separações rápidas e níveis de purificação muito bons [4-8]. Inúmeros autores já descreveram diferentes materiais adsorventes que separam e purificam biomoléculas por meios da IMAC. Por exemplo Carvalho et al. [5], utilizaram um criogel supermacroporoso com íons Cu^{2+} imobilizados para avaliarem o comportamento adsorptivo da lactoferrina. Serinbaş et al [6], desenvolveram um novo adsorvente, denominado de “*nanoflowers*” e utilizaram os Fe^{3+} sintetizados em sua estrutura para promover a adsorção e separação de biomoléculas como o ácido desoxirribonucléico. Trang et al. [8] criaram uma fibra polimérica de nylon enxertada com íons de cobre, para serem utilizadas como adsorvente de proteínas que têm como base a afinidade por metais quelatados (IMAC).

As vantagens de uma rápida separação sem declínio da concentração da molécula específica, presentes da IMAC, juntamente com a necessidade das indústrias farmacêutica e de alimentos em obter proteínas com elevado grau de pureza, fazem com que pesquisadores busquem desenvolver técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade das mesmas [8]. Dentre as várias técnicas, vem se destacando o desenvolvimento de materiais monolíticos poliméricos supermacroporosos, utilizados na cromatografia, que permitem a separação de grandes biomoléculas e até mesmo de células inteiras em materiais não clarificados [9].

Dentre os monólitos utilizados como colunas cromatográficas, os criogéis poliméricos de poli(acrilamida) vêm apresentando destaque por possuírem elevada porosidade, com grandes poros interconectados, apresentando baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções mais viscosas, além apresentarem baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas em cromatografia. Entretanto, como desvantagem, tais estruturas possuem uma menor área superficial, acarretando em uma menor capacidade de ligação, o que acaba diminuindo a eficiência da purificação. Diante disso, modificações podem ser realizadas na estrutura dos criogéis visando aumentar sua capacidade de purificação [10,11].

Uma das possíveis modificações é transformar os criogéis poliméricos em matrizes de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados, por meio da enxertia com grupos ligantes de interesse. Para que isso ocorra, é necessária a escolha de um agente quelante e posteriormente a coordenação com um íon metálico. A via mais comumente para tal é a utilização de matrizes poliméricas que contenham radicais epóxi em sua estrutura, aproveitando-se da reatividade dos mesmos. Tais radicais são inseridos nas matrizes cromatográficas no momento da sua síntese, utilizando-se por exemplo o alilglicidil éter ou glicidil metacrilato [5,12].

O agente quelante usualmente empregado é o ácido iminodiacético (IDA), capaz de fazer ligações coordenadas com os íons metálicos. A escolha do íon metálico varia em função da biomolécula-alvo, variando de íons tri e tetravalentes (Al^{3+} , Fe^{3+} , Zr^{4+}) quando se objetiva purificar fosfoproteínas e fosfopeptídeos e íons divalentes (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) quando se objetiva a interação com os aminoácidos histidina, cisteína e triptofano, para purificar proteínas em geral [4].

Dessa forma, a utilização da técnica IMAC juntamente com os criogéis poliméricos, indicam ser um suporte adequado para separação de proteínas. No entanto, apenas essa separação das proteínas não é suficiente para a compreensão do mecanismo de afinidade entre os íons metálicos e as proteínas [5]. Para isso, tanto a caracterização das propriedades físico químicas dos criogéis, quanto a análise dos parâmetros termodinâmicos serão de grande importância para se adquirir conhecimento a respeito do processo que envolve a adsorção de proteínas [13,14].

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir um adsorvente monolítico macroporoso voltado para o processo de purificação de proteínas por cromatografia de

afinidade por íons metálicos imobilizados e caracterizá-lo com relação a aspectos, físicos, químicos, operacionais e termodinâmicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Reagentes

Todos os reagentes necessários para o desenvolvimento desse trabalho possuíram, no mínimo, grau analítico PA-ACS, sendo descritos ao longo do detalhamento das metodologias. A água utilizada foi do tipo destilada, e os equipamentos e materiais consumíveis em geral também foram descritos na sequência, nos momentos mais convenientes.

2.2.Síntese dos criogéis monolíticos

Para síntese dos criogéis foram adaptadas metodologias propostas por Kumar et al. [15] e Yao et al. [16]. Onde 4,4 g de AAm, 1,2 g de BAAM e 1,4 g de AGE foram dissolvidas em 100 mL de água destilada, sendo a solução degaseificada em banho ultrassônico por 5 minutos. Em seguida, a solução foi colocada em banho de gelo sendo adicionados 140 μL de solução de persulfato de amônio (APS) na concentração de 0,5 g/mL e 91 μL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED). Após homogeneização da solução, a mesma foi imediatamente vertida em seringas plásticas de 5mL, que foram seladas e mantidas em banho termostático à temperatura de $-12,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Decorrido esse tempo, as seringas foram abertas e deixadas à temperatura de 4°C por 4 h para o descongelamento da água existente. Posteriormente, as seringas abertas contendo os criogéis foram colocadas em estufa a $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 48h, até os criogéis serem completamente secos. Em seguida, os mesmos foram removidos das seringas e suas extremidades foram cortadas para retirar partes defeituosas. Os criogéis foram então recolocados nas seringas e lavados com 200 mL de água destilada, utilizando-se uma bomba peristáltica na vazão de $1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e novamente secos em estufa ($60\text{ }^{\circ}\text{C}/48\text{h}$), sendo as massas medidas em em balança analítica. Os monólitos foram mantidos individualizados em dessecador contendo sílica até o momento da funcionalização.

2.3.Funcionalização dos criogéis com íons metálicos

Nesta etapa pretendeu-se avaliar como matrizes funcionalizadas com íons de ferro, zinco, níquel, cobalto e cobre se comportariam de maneira mais eficiente na adsorção das proteínas. Para isso foi adotado o sistema em batelada adaptado de Carvalho et al. [5]. Utilizando-se a temperatura de 298.15K, monólitos de criogéis secos, com cerca de 3cm de altura, 1cm de diâmetro e peso médio de 250 mg, foram colocados sob agitação rotativa à 25 rpm em todas as etapas do processo, utilizando seringas fechadas de 20 mL. A cada etapa realizada os criogéis foram suavemente comprimidos manualmente, para a retirada do excesso de solução da etapa anterior.

Inicialmente uma solução de Na₂CO₃ (20 mL, 1 M) foi agitada juntamente com o com o monólito por 1 hora. Posteriormente, uma solução de IDA (0,5 M em 1,0 M de Na₂CO₃, pH 10,0) foi colocada em contato com monólito durante 24 h à temperatura ambiente. Após estas etapas, o criogel modificado foi lavado com Na₂CO₃ 0,5 M (20 mL) por uma hora e em seguida com água deionizada até atingir o pH 8,0. Então criogel foi posto em contato com uma solução de 0,1 M dos íons metálicos de interesse (dos íons de ferro, zinco, níquel, cobalto e cobre), durante 2 horas para a ligação do metal na matriz. Finalmente, o criogel foi lavado com água deionizada para remover o metal não ligado e, em seguida, com tampão de imidazol (15 mM em HEPES e 0,2 M de NaCl, pH 7,0) para remoção do metal fracamente ligado.

Após a ativação os criogeis foram colocados em estufa a 60°C e após a secagem obteve-se uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de afinidade por íons metálicos imobilizados.

2.4.Avaliação da adsorção e do potencial de uso dos monólitos produzidos.

Para avaliação da adsorção e do potencial de uso dos criogéis, foi utilizada a albumina do soro bovino (BSA) como proteína modelo. Para tanto foram avaliados a capacidade de adsorção de BSA a cada monólito com seu específico íon metálico imobilizado, bem como o efeito de 5 ciclos de reutilização dos criogéis produzidos. Dessa forma, uma solução de BSA a 0,5 mg.mL⁻¹ foi preparada em solução tampão fosfato de sódio (0.05M, pH 7) e colocada em contato com 30 mg dos criogeis ativados com os diferentes íons metálicos durante 24 horas à 298.15K. Após esse tempo, a solução sobrenadante foi

retirada dos tubos e a concentração de proteínas contida foi determinada espectrofotometricamente a 595nm usando o método de Bradford [17].

A concentração de proteína na fase sólida foi determinada de acordo com a Equação 1.

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

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

Feito os experimentos adsortivos e descoberto qual íon metálico adsorvia mais proteínas, utilizou-se apenas as colunas que continham este íon. Dessa forma, as colunas com proteína adsorvida foram lavadas (20mL) com solução tampão imidazol (200mM) por uma hora, para a eluição das proteínas. Posteriormente, a coluna foi agitada com solução de 0,1M do metal de interesse por duas horas, para repor a ligação do metal à coluna e conseqüentemente ficar apta para a adsorção novamente, a qual foi feita ao colocar o adsorvente em contato com solução de BSA a 0,5 mg.mL⁻¹ durante 24 horas.

Na sequência todo o procedimento descrito foi repetido para se avaliar os ciclos de reutilização da coluna usada. Tais ciclos de adsorção e eluição da BSA foram repetidos 5 vezes em duas diferentes colunas para a avaliação da perda de eficiência ao longo do tempo de uso.

2.5.Caracterização dos criogeis.

Para a caracterização dos criogéis produzidos e posteriormente funcionalizados, foram realizadas as análises seguindo as metodologias propostas por Savina et al. [18] para capacidade de inchamento (S), Fontan et al. [9] para grau de expansão (ED), e Plieva et al. [19,20] para porosidade. A microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TG) foram realizadas utilizando as metodologias propostas por Da Silva et al. [11].

Outro método utilizado para determinação da porosidade total dos criogéis foi baseado no método dos momentos utilizado para leitos fixos empacotados [23]. A coluna de criogel foi adaptada a um cromatógrafo com detector de feixe de diodos com espectro no UVVisível. A coluna foi equilibrada a $(30,0 \pm 0,1)$ °C com 20 volumes de coluna (VC) de água deionizada. Pulsos de 100 µL de uma solução de acetona 5% (em volume) foram injetados, em triplicata, em vazões variando de 2 mL·min⁻¹ a 10 mL·min⁻¹, sendo as corridas monitoradas em $\lambda = 280\text{nm}$. Foi calculado então o primeiro momento estatístico (ou tempo de retenção) para os pulsos injetados, que na forma discretizada e com a concentração do soluto linearmente proporcional à absorvância é dado por Furusawa et al. [23]:

$$M_1 = t_r = \frac{\sum_{i=1}^n t_i A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} \quad (2)$$

Onde: M_1 é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, t_r é o tempo de retenção (s), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima 20 observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$) e A_i é a absorvância registrada no tempo t_i .

Para a injeção dos pulsos de acetona no tempo de corrida igual a zero, Furusawa et al. [23] demonstram que t_R é igual a:

$$t_r = \frac{L}{U} \epsilon_t \quad (3)$$

Onde: L é o comprimento da coluna (m), U é a velocidade de escoamento da fase móvel (m·s⁻¹) e ϵ_t é a porosidade total da coluna.

Além dos tempos de retenção, foram calculadas também as variâncias (σ^2) ou segundos momentos estatísticos (M_2) de cada pulso, utilizando-se a equação 4 [23].

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} - t_r^2 \quad (4)$$

Onde: M_2 é o segundo momento estatístico (s²), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, σ^2 é a variância do pulso observado (s²), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação.

ésima observação (para $i \geq 2$), A_i é a absorvância registrada no tempo t_i e t_r é o tempo de retenção do pulso observado (s).

Uma vez determinados t_R e σ^2 , o coeficiente de dispersão axial aparente para cada velocidade de escoamento estudada foi calculado por regressão não-linear, resolvendo-se a equação 4, utilizando-se a ferramenta solver do software MS-Excel® 2015 (Microsoft, Redmond, EUA).

$$\frac{\sigma^2}{t_r^2} = 2 \left(\frac{Dax}{uL} \right) - 2 \left(\frac{Dax}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(- \frac{uL}{Dax} \right) \right] \quad (5)$$

Onde Dax é o coeficiente de dispersão axial aparente ($m^2 \cdot s^{-1}$), L é a altura (m) do leito, u é a velocidade ($m \cdot s^{-1}$) intersticial da fase móvel ($u = U \varepsilon T$), t_r é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

Os gráficos das curvas de DTR foram plotados pela equação 6.

$$E_\theta = t_R \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (6)$$

Onde: E_θ é a função de distribuição de tempo de residência normalizada (s^{-1}) e Abs é a absorvância registrada em função do tempo .

Para a determinação da altura dos pratos teóricos equivalentes (HETP) em função da velocidade de escoamento da fase móvel foram utilizados os dados obtidos das curvas de DTR mencionados. Os valores da HETP foram calculados utilizando-se a equação 7.

$$HEPT = L \frac{M_2}{M_1^2} = L \frac{\sigma^2}{t_r^2} \quad (7)$$

Onde: L é a altura do leito (m), t_r é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

A permeabilidade ao escoamento foi determinada utilizando-se o método baseados na equação de Darcy, onde o criogel produzido na coluna foi equilibrado com 20 VC de coluna de água deionizada e submetido à diferenças de pressão hidrostática sobre a coluna entre 1,5 kPa e 20,5 kPa, sendo a vazão volumétrica registrada na saída do leito. A permeabilidade foi encontrada vide equação 8:

$$\Delta P = \frac{nL}{AK_p^1} Q \quad \text{ou} \quad Q = \frac{AK_p^1}{nL} \Delta P \quad (8)$$

Onde ΔP é a pressão hidrostática sobre a coluna (Pa), η é a viscosidade da fase móvel (Pa·s), Q é a vazão volumétrica ($m^3 \cdot s^{-1}$), A é a área transversal da coluna (m^2), L é a altura do leito (m) e k_p é a permeabilidade do leito (m^2).

2.6. Obtenção das isotermas de adsorção

Utilizou-se albumina do soro bovino (BSA, Sigma, cod. A7908, pureza $\geq 98\%$) como proteína modelo. Os experimentos de adsorção da BSA foram conduzidos em batelada, em diferentes valores de temperatura (288.15K, 298.15 K; 308.15 K; 318.15 K; 328.15 K). A fase móvel usada foi tampão fosfato de sódio (0.05M, pH 7) nas devidas temperaturas. Para a manutenção da temperatura foi utilizada uma estufa BOD com precisão de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Para a utilização nos ensaios de adsorção os monólitos produzidos foram cortados com uma lâmina de aço em pequenos cubos com cerca de 1.5 mm de aresta. Foram utilizados 15 pontos experimentais, com 3 repetições. Foram avaliadas concentrações iniciais de BSA variando de 0.0 a 15.0 mg/mL.

Em tubos plásticos com tampas foram pesados cerca de 30 mg do adsorvente produzido e colocados em contato com 4.0 mL de solução com concentração de sal e BSA desejadas. Os tubos foram deixados em agitação orbital a 25 rpm durante 12 horas à temperatura de interesse. Posteriormente o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e a concentração de proteínas determinada a 595nm usando o método de Bradford [17]. A concentração de proteína na fase sólida foi determinada de acordo com a Equação 9:

$$q = \frac{(C_o - C_e)V}{m} \quad (9)$$

Em que q é a capacidade adsortiva do adsorvente ($mg_{proteína}/g_{criogel}$); C_o e C_e são respectivamente as concentrações inicial e final de proteínas em solução (mg/mL); V é o volume de solução (mL); m é a massa de criogel seco utilizado.

Uma vez obtidos os valores experimentais das isotermas de adsorção, o modelo de Langmuir [21] foi ajustado aos dados encontrados, utilizando-se regressão não-linear. O modelo de Langmuir é apresentado abaixo na equação 10.

$$q = q_{max} \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (10)$$

Onde q_{max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), K_l é relacionada à constante de equilíbrio de adsorção ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$), q é a quantidade de soluto adsorvido ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) no equilíbrio e C_e é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Os parâmetros q_{max} e K_l (*constante de equilíbrio adimensional*), que serão utilizados na análise termodinâmica, foram estimados por meio de regressão não-linear, utilizando-se o *software* SigmaPlot® v.11 (Systat Software, Inc., CCIHago, EUA).

Desse modo, a partir do ajuste prévio do modelo de Langmuir aos dados experimentais em diferentes temperaturas, foram obtidos os parâmetros K_T e q_{max} . Determinados K_T e q_{max} , foi plotado um gráfico do logaritmo de ($q_{max}K_T$) versus o logaritmo da concentração do soluto em questão. Do coeficiente angular da reta foi obtido o valor da carga característica da proteína (ν) e do coeficiente linear determinou-se o valor da constante de equilíbrio de adsorção K' .

2.7.Determinação da variação das propriedades termodinâmicas

A partir dos dados de equilíbrio de adsorção foi realizada a análise não-linear de van't Hoff para a determinação os parâmetros termodinâmicos ΔH^0_{ads} , ΔS^0_{ads} e ΔG^0_{ads} , foram determinados utilizando metodologia proposta por Bonomo et al. [22] e Ueberbacher et al. [23]. A análise não linear de Van't Hoff é obtida pela Equação 11:

$$\ln K' = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \theta \quad (11)$$

Sendo K' a constante de equilíbrio; a , b e c são parâmetros empíricos e θ uma constante do sistema que depende da razão entre as fases e é constante com a temperatura.

2.8.Avaliação do reuso das matrizes produzidas

Na sequência de todo o experimento descrito, utilizou-se albumina do soro bovino (BSA, Sigma, cod. A7908, pureza $\geq 98\%$) como proteína modelo, para se avaliar a capacidade de reutilização da coluna utilizada. A adsorção foi repetida na temperatura de

298,15 K e concentração de sulfato de sódio 1,5 mol.L⁻¹. A fase móvel usada foi tampão PBS 0,05M, pH 6,0 adicionado de sulfato de sódio em concentrações especificada.

Em tubos plásticos com tampas foram pesados cerca de 30 mg do adsorvente produzido e colocados em contato com 4.0 mL da fase móvel juntamente com BSA na concentração de 10mg/mL. Os tubos foram deixados em agitação orbital a 25 rpm durante 12 horas à 298.15K. Posteriormente o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e a concentração de proteínas determinada a 595nm usando o método de Bradford.

A eluição da proteína adsorvida foi feita pelo contato com 10 mL de tampão imidazol (200mM, pH 7,4) durante 2 horas e agitação rotativa constante. Após isso, o adsorvente ficou exposto em estufa a 60°C até que estivesse seco e em condições de uso, novamente. Essas etapas, denominadas de ciclos de adsorção e eluição da BSA, foram repetidas 5 vezes, com 3 repetições, para a avaliação da perda de eficiência ao longo do tempo de uso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

3.1.Descrição dos criogéis

Imagens dos criogéis produzidos e posteriormente funcionalizados com metais são apresentados na Figura 1. Os criogéis supermacroporosos de poliacrilamida apresentaram estrutura esponjosa e elástica quando hidratados, conforme relatado em diversos trabalhos [9,19,20,24]. Devido à elasticidade, tais monólitos podiam ser suavemente comprimidos mantendo a integridade de sua estrutura. Essas características são benéficas quando relacionadas aos processos experimentais, pois possuem resistência física e mobilidade para suportarem as etapas que serão submetidos.

As matrizes também apresentaram boa estabilidade aos processos de secagem e hidratação, pois não sofreram danificações em sua estrutura física ao longo do procedimento experimental. Tornando-se essenciais para que os criogéis de poliacrilamida possam ser armazenados para utilização posterior em processos de purificação. Essas características fazem dos criogéis de poliacrilamida um material promissor para ser utilizado em processos de purificação [25,26]. As matrizes funcionalizadas apresentaram coloração específica para cada íon metálico utilizado, diferentemente do criogel base (sem ativação e imobilização). Esta coloração se dá devido

ao íon metálico que é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante.

Figura 1. Imagem dos criogéis controle e ativado produzidos no experimento.



Informações sobre a capacidade adsorviva das colunas funcionalizadas com metais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de BSA adsorvida nas colunas de afinidade por metais imobilizados a temperatura de 25°C.

Íon metálico imobilizado	Concentração de BSA adsorvida (mg/g)
Cobre (Cu ²⁺)	56,82 ± 5,38
Zinco (Zn ²⁺)	34,46 ± 7,02
Níquel (Ni ²⁺)	29,88 ± 1,01
Cobalto (Co ²⁺)	30,22 ± 6,50
Ferro (Fe ³⁺)	28,05 ± 0,48

De modo geral, qualquer íon metálico que apresente a capacidade de interagir com proteínas pode ser utilizado em IMAC, porém o Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ e Zn²⁺ são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina, triptofano e cisteína, pois os íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com o enxofre do grupamento tiol, respectivamente, de cada aminoácido [3]. No entanto, pode ser observado que neste experimento realizado, a coluna funcionalizada com cobre imobilizado apresentou uma capacidade adsorviva média de 56,82 mg de BSA / g de criogel seco. Esse valor foi superior às outras colunas ativadas, que tiveram capacidade

adsortiva variando de 28,05 a 34,05 mg de BSA/ g de criogel seco. Este mesmo resultado foi obtido Erol et al. [7], que também encontraram o cobre como principal metal para a adsorção de metaloproteínas, quando comparado com zinco, ferro e prata. Diante disso, as colunas funcionalizadas com cobre foram utilizadas no restante dos experimentos.

Informações sobre a capacidade de adsorção das matrizes controle e funcionalizadas com cobre são apresentadas na Tabela 2. Observa-se que as matrizes funcionalizadas apresentaram uma capacidade de adsorver a a proteína modelo (BSA) muito maior que as matrizes controles. Isso pode ser explicado porque em IMAC, a adsorção irá ocorrer a depender do número e tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com um metal específico [7]. Assim sendo, neste trabalho, a coluna funcionalizada com íons de Cu^{2+} apresentaram mais afinidade de interação com os resíduos de histidina, triptofano e cisteína presente na superfície da BSA do que as matrizes controle [3].

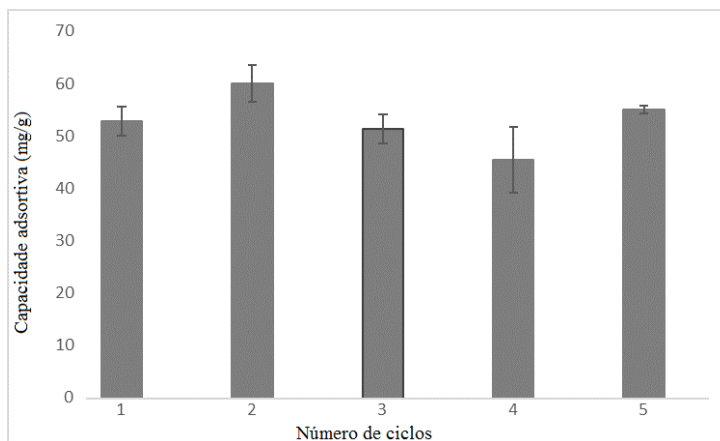
Tabela 2- Valores médios obtidos para capacidade adsortiva das matrizes produzidas

Parâmetro	Controle	Funcionalizado
Capacidade adsortiva ($\text{mg}_{\text{bsa}}/\text{g}_{\text{criogel}}$)	4.77 ± 0.95^a	$56,82 \pm 5,38^b$

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

Para demonstrar a eficiência dos criogéis funcionalizados com cobre na adsorção de proteínas ao se reutilizar o adsorvente, as matrizes funcionalizadas foram submetidas a cinco ciclos de reutilização, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 2.

Figura 2: Valores experimentais da capacidade adsortiva da coluna ativada com cobre em 5 ciclos consecutivos.



A coluna apresentou uma capacidade adsortiva média de 54,44 mg de BSA / g de criogel seco com a reutilização, demonstrando estabilidade ao longo do tempo de uso. Os resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura, que também obtiveram estabilidade de reutilização para os criogéis de poliacrilamida ao longo do tempo de uso, como na adsorção de lactoferrina (Perçin et al. [27]), de enzimas (Uygun et al. [4]) e lectinas (Gonçalves et al [10]). Os resultados encontrados sugerem que os criogéis de poliacrilamida podem ser utilizados em processos de purificação de proteínas e por isso, foram feitas as caracterizações necessárias para se obter um melhor conhecimento sobre o material produzido, sendo alguns dos resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados da caracterização dos criogéis.

Parâmetro	Criogel	
	Controle	Funcionalizado com Cu ⁺⁺
Capacidade de inchamento (kg/kg)	18,77 ± 0,95 ^a	18,93 ± 1,59 ^a
Grau de expansão (L/kg)	18,55 ± 2,10 ^a	19,53 ± 0,98 ^a
Fração de macroporos	0,82 ± 0,019 ^a	0,78 ± 0,024 ^b
Fração de meso/microporos	0,10 ± 0,020 ^a	0,16 ± 0,021 ^a
Fração de água ligada	0,02 ± 0,001 ^a	0,01 ± 0,001 ^a
Fração de polímero seco	0,04 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,002 ^a
Porosidade total	0,94 ± 0,003 ^a	0,93 ± 0,002 ^b

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

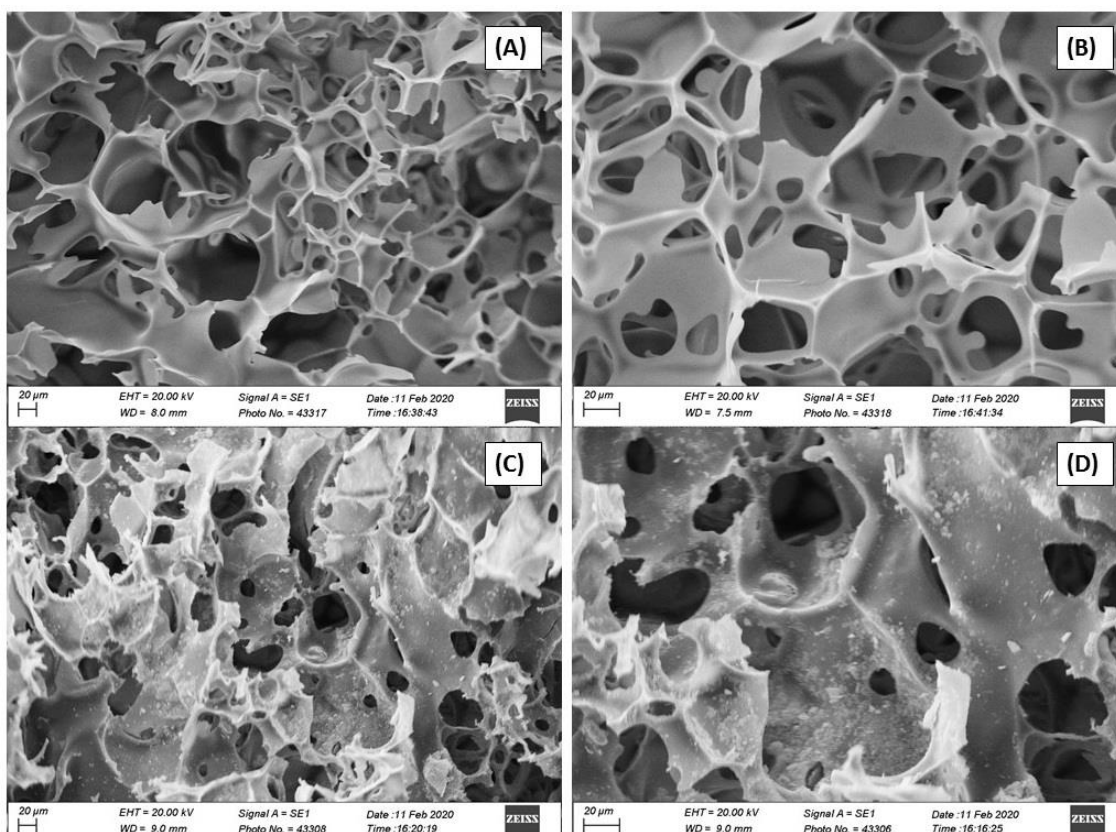
Foram encontradas diferenças significativas na fração de macroporos e porosidade total, ocorrendo uma redução nos valores dessas variáveis, quando comparados os criogéis controle e ativados. Essa diferença pode ser atribuída ao fortalecimento das interações cruzadas e redução do espaço dos poros a partir da funcionalização do criogel, tornando-os menos flexíveis. Mais especificamente, essa diferença se deve ao alto potencial de polimerização do agente quelante IDA, que atua como braço espaçador e diminui o tamanho dos poros formados. Ainda assim a porosidade dos criogéis ativados manteve-se elevada, sendo os valores encontrados sconsistentes com os observados em

outros trabalhos na literatura em que se trabalhou com criogéis de poliácridamida [10-12, 21, 30-32].

Já os valores observados neste trabalho para a capacidade de inchamento e grau de expansão demonstram a alta capacidade de absorção de água apresentada pelos criogéis produzidos.

A avaliação morfológica das matrizes produzidas foi realizada por meio da análise de microscopia de varredura (MEV). As imagens obtidas são apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Micrografias de MEV das matrizes controle (A e B) e funcionalizadas (C e D).



Observa-se que as matrizes apresentaram estrutura homogênea, com poros grandes e interconectados. Verifica-se o predomínio de macroporos com diâmetro entre 20 e 140µm, em acordo com o reportado por diversos autores [27, 13, 30-32]. As dimensões de poros observada pode ser útil nos processos de purificação de macromoléculas, pois permitem a passagem delas e até mesmos de células microbianas e fragmentos celulares, além do uso de soluções concentradas e particuladas. [29, 28, 33, 19].

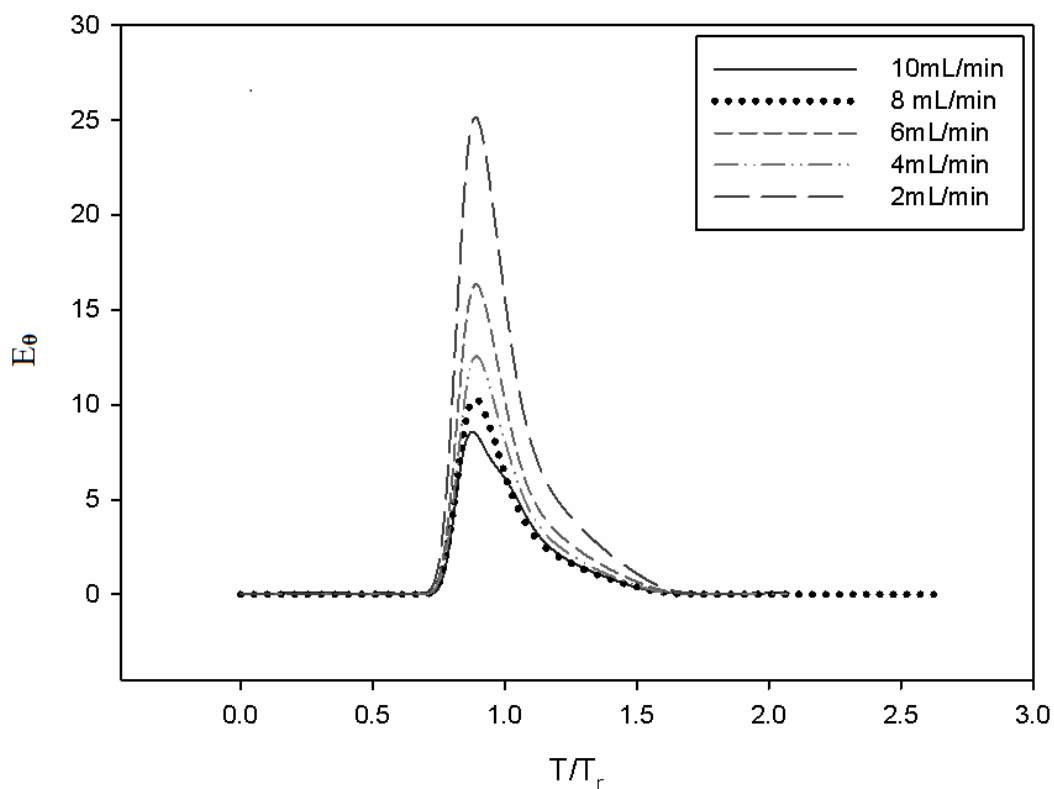
Verifica-se também na Figura 6 a diferença entre as imagens das matrizes controle (A e B) e funcionalizadas (C e D). Observa-se na matriz funcionalizada a existência de

pontos de rugosidade na superfície dos poros, que podem ser atribuídos à inclusão dos braços espaçadores de IDA nos sítios ativadas da superfície dos criogéis, e posterior funcionalização com o metal de interesse (Cu^{2+}), indicando que a mesma foi bem-sucedida.

3.2.DTR, dispersão axial, HETP.

A distribuição dos tempos de residência (DTR) para pulsos de acetona em diferentes velocidades de escoamento da fase móvel é apresentada na Figura 4. Como pode se observar, as curvas de DTR se apresentam mais dispersas com a redução da da vazão do líquido. Nota-se ainda que à medida em que a vazão aumenta, os picos se tornam mais estreitos. Comportamento semelhante foi obtido por outros autores com criogéis de poliacrilamida como Yao et al. [16] e criogéis ativados com íons metálicos imobilizados, como Carvalho et al. [5].

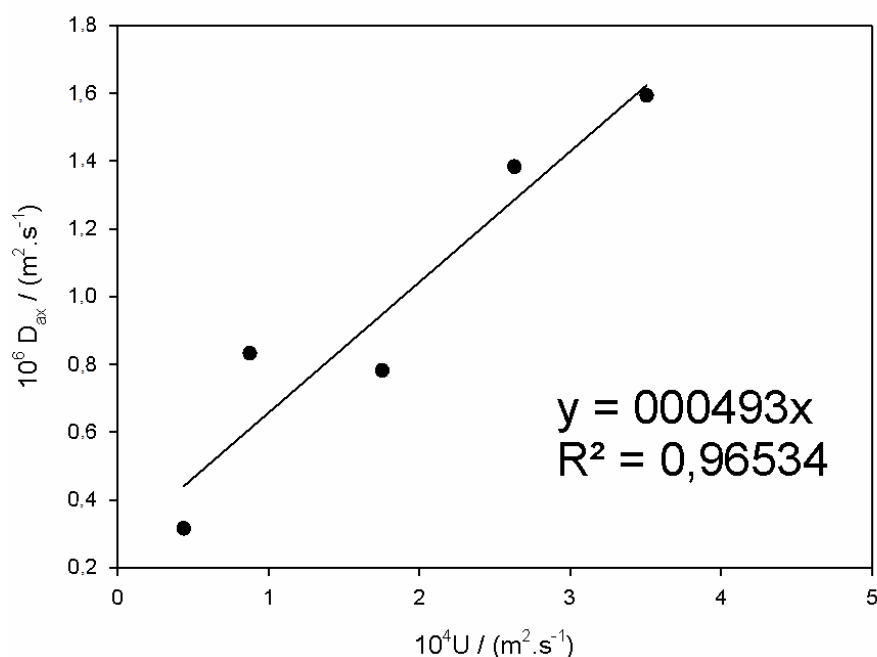
Figura 4: DTR para pulsos de acetona a diferentes velocidades superficiais de escoamento, na coluna de criogel com cobre.



Verificou-se ainda assimetria nas curvas, com a formação de caudas estendidas. Tal fato pode ser atribuído à falta de homogeneidade na estrutura ou distribuição dos poros, que surgem quando do processo de síntese do criogel [16]. Possivelmente os efeitos observados neste caso ocorreram devido à grande variação no tamanho dos poros (de 20 μm a 140 μm , aproximadamente) que será visto mais à frente, do que da sua distribuição pelo criogel, uma vez que a partir das micrografias, não se constatou regiões específicas com tamanhos de poros diferenciados, como será visto mais adiante.

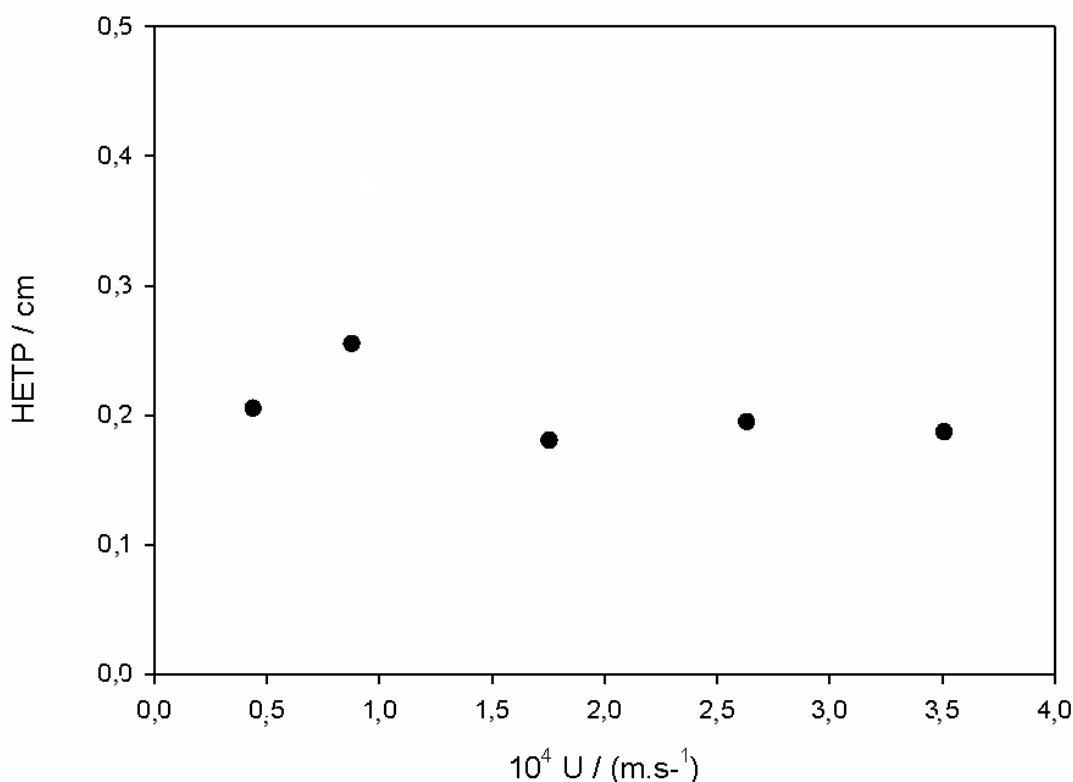
Os valores do coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) em função da vazão da fase móvel são apresentados na Figura 5. Pode-se observar valores na faixa de $3.16 \cdot 10^{-7}$ a $1.49 \cdot 10^{-6}$ m^2/s , crescentes com a vazão. Observa-se que à medida que velocidade superficial do líquido aumenta, o coeficiente de dispersão axial também aumenta. Esse mesmo comportamento foi reportado por Yao et al. [18]. Os valores para o D_{ax} (bem como sua variação) foram baixos, indicando que o escoamento foi tido como pistonado e que o grau de mistura na coluna no momento em que a fase móvel percolava o leito não foi intenso, o que é desejável. Os resultados desse trabalho estão similares aos obtidos por Fontan et al. [9], Carvalho et al. [5], Yao et al. [18] para criogéis sintetizados a partir de acrilamida e bis-acrilamida.

Figura 5: Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de fluxo na coluna de criogel.



Também foi determinada a altura equivalente a pratos teóricos (HETP) para as diferentes velocidades de escoamento da fase móvel. Os valores obtidos neste trabalho de altura equivalente a um prato teórico (HEPT) estão na faixa de 0,19- 0,24 cm, que foram valores inferiores aos encontrados por Carvalho et al. [5] quando utilizaram um criogel funcionalizado com cobre, para a purificação de proteínas e este obteve valores que variaram entre 0,61-0,77 mm. Também fora inferiores à Mol et al. [36], quando trabalharam com um criogel de afinidade (purificação da lisozima) cujos valores variaram entre 0,370 e 0,454 . De modo geral, os valores apresentados neste trabalho são melhores que os encontrados na literatura. Pois, se a altura de pratos teóricos é pequena, significa que a coluna vai comportar um alto número de pratos teóricos e ter uma boa resolução.

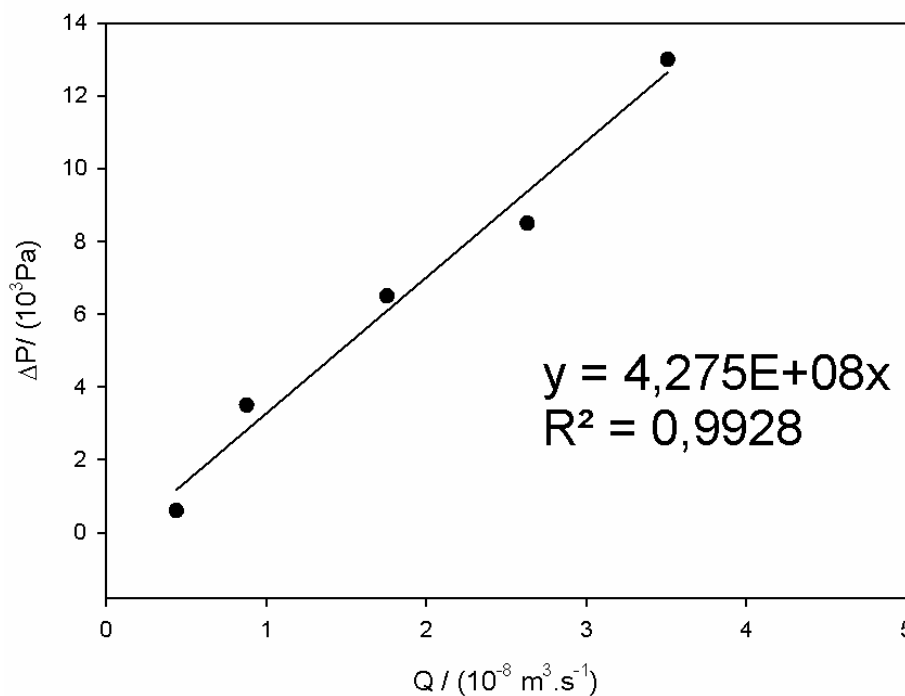
Figura 6: Dados experimentais da variação de variação da pressão ($-\Delta P$) / em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel Ao longo do criogel de IMAC funcionalizado com íons de cobre.



3.3. Permeabilidade ao escoamento

Na Figura 7 são apresentados os resultados experimentais referentes à queda de pressão hidrostática em função da velocidade superficial de escoamento. Percebe-se que a permeabilidade da água obtida no leito do criogel monolítico foi $1.65 \times 10^{-11} \text{ m}^2$. Este valor foi superior aos de outros autores relatados para monólitos poliméricos orgânicos. Carvalho et al., [5] encontraram um K_w de $4,70 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Mól et al. [36] encontraram o valor de K_w igual a $5,9 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, trabalhando com criogéis de afinidade. O valor desse parâmetro indica que quanto maior o valor calculado, menor a resistência ao fluxo. Isso pode ser explicado pois a estrutura com grande número de poros bem como os grandes poros interconectados são fatores que contribuem diretamente para a baixa resistência ao fluxo, o que possibilita que criogéis supermacroporosos sejam utilizados como fase estacionária em técnicas cromatográficas, podendo-se ainda empregar altas vazões sem que elevados valores de pressão sejam atingidos. O tamanho elevado dos poros e a interconectividade dos mesmos favorece para que a transferência de massa ocorra principalmente por convecção. A resistência à transferência de massa é praticamente negligenciável, devido ao fluxo predominantemente convectivo da solução através dos poros [22].

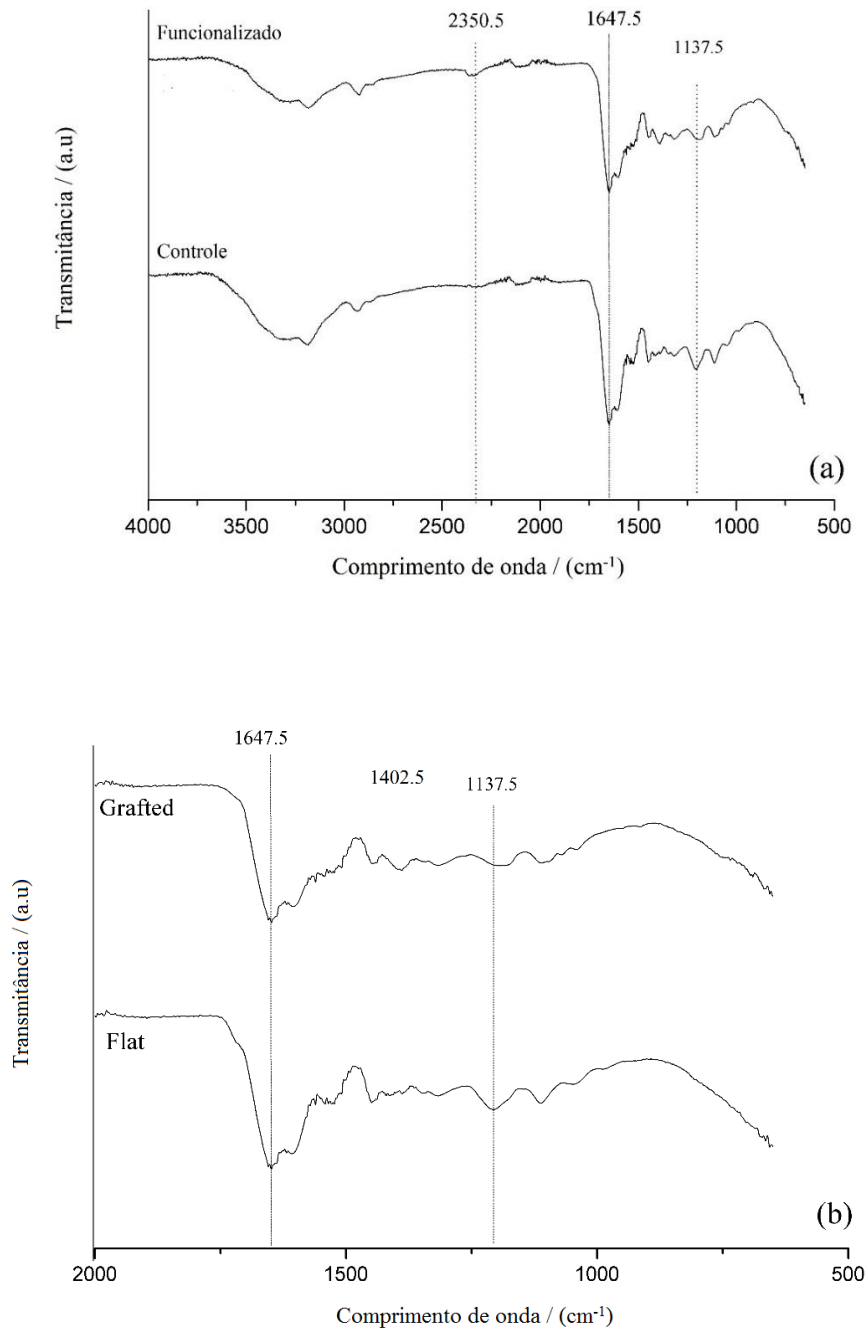
Figura 7: Dados experimentais da variação de pressão ($-\Delta P$) / em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel para criogel de IMAC.



3.4. Análises estruturais

Os espectros obtidos na análise de FTIR são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Espectros de FTIR do criogel controle (a) e ativado (b).



Para ambos os criogéis pode-se observar uma banda de vibração formada na região de $1647,5\text{ cm}^{-1}$. Essa vibração é característica do grupamento amida ($\text{C}=\text{O}$) provenientes dos monômeros (AAM e BAAM) utilizados para a síntese dos criogéis. Esse mesmo resultado foi relatado por diversos autores que trabalharam com criogéis de poliacrilamida [18,34, 35-37].

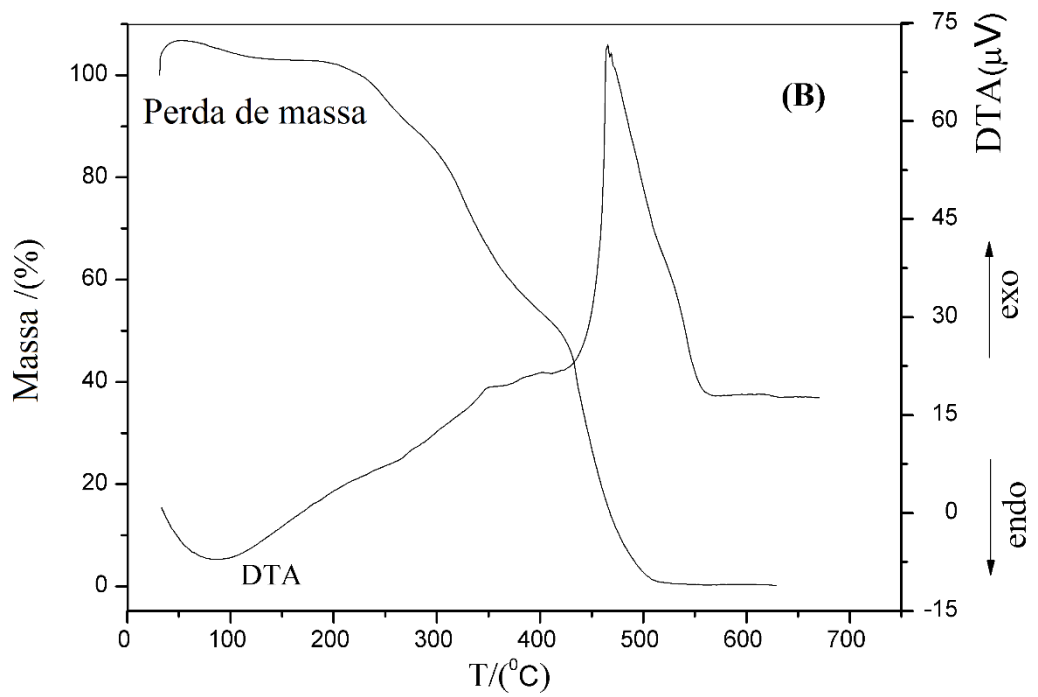
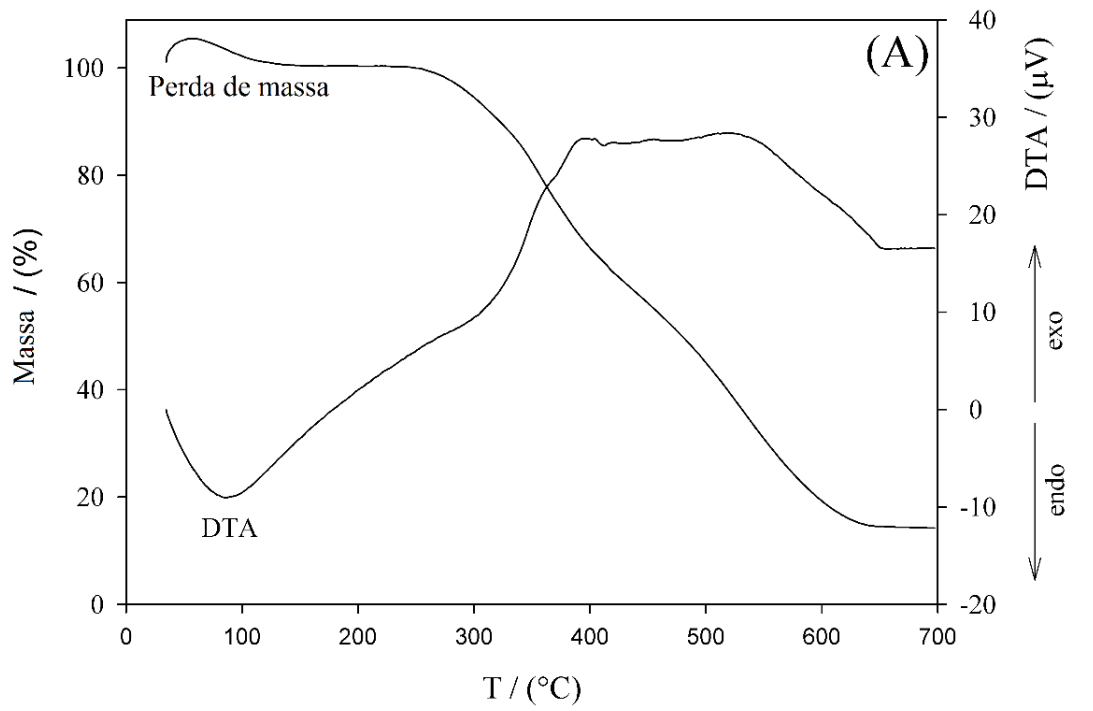
Outra banda a ser analisada é a de $1137,5\text{ cm}^{-1}$ que indica o estiramento do grupamento C-O. Esse comportamento se deve à presença de radicais epóxi advindos do AGE, agente iniciador dos braços espaçadores [10, 11, 36]. Observa-se ainda uma redução na intensidade dessa mesma banda no criogel ativado, quando comparado com o criogel controle. Isso pode ser explicado pelo fato de outras moléculas presentes na reação de funcionalização, como o IDA, formarem ligações com o grupo epóxi, para formar os braços espaçadores.

Observa-se no criogel funcionalizado, o aparecimento de uma pequena banda em 1402 cm^{-1} , que indica a vibração referente aos grupamentos N-H [38]. Esse grupamento está presente no ácido iminodiacético.

Outra banda que pode ser observada apenas no criogel ativado é a de 2350 cm^{-1} e pode estar associada ao grupamento do ácido carboxílico [34]. O aparecimento dessa banda nos criogéis ativados pode ser decorrente ao contato do criogel com o ácido iminodiacético que foram inseridos durante a modificação da superfície dos criogéis controle. Segundo Solomons [38], os ácidos carboxílicos produzem uma absorção de deformação axial na região de $3100 - 2300\text{ cm}^{-1}$.

Além da análise de espectroscopia FTIR foi realizada a análise termogravimétrica (TGA), cujos resultados estão apresentados na Figura 9. As curvas TG referentes aos criogéis ativados e funcionalizados apresentam comportamentos distintos e podem ser divididas em 2 etapas de perda de massa. Essas etapas são atribuídas à desidratação e decomposição da matéria orgânica. A primeira perda de massa ocorreu no intervalo de temperatura aproximadamente de 25 a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi atribuída à desidratação do composto. A segunda perda de massa ocorre no intervalo de 130°C e temperatura final da análise, nos dois tipos de matrizes. Essa perda foi atribuída à decomposição da estrutura polimérica, com perda de massa total. Isso era esperado, dada a natureza orgânica das matrizes e presença apenas do cobre como composto inorgânico em sua estrutura [31,36].

Figura 9. Curvas de TGA dos criogeis controle (A) e ativado (B).



Já em relação às curvas DTA, é possível observar muitas distinções entre os criogeis controle e ativado. Durante a degradação térmica dos componentes, ocorre a incidência de um pico endotérmico nas temperaturas inferiores a 100°C para ambos os criogeis, que pode ser atribuído às moléculas de água presente na amostra, que absorvem essa energia na forma de calor e evaporam [39]. Percebe-se também que ocorre um pico exotérmico em 400°C apenas no criogel controle e um pico em 350°C apenas no funcionalizado que pode ser atribuída à decomposição da poliacrilamida em ambos os tipos de adsorvente [39]. Por fim, é possível observar o surgimento de um grande pico exotérmico na temperatura 465°C dos criogis funcionalizados. Nessa temperatura, praticamente toda a massa de matéria orgânica já havia sido degradado e dessa forma, este comportamento pode ser atribuído à degradação dos íons de cobre, os quais se mantêm estável nessa faixa de temperatura [11].

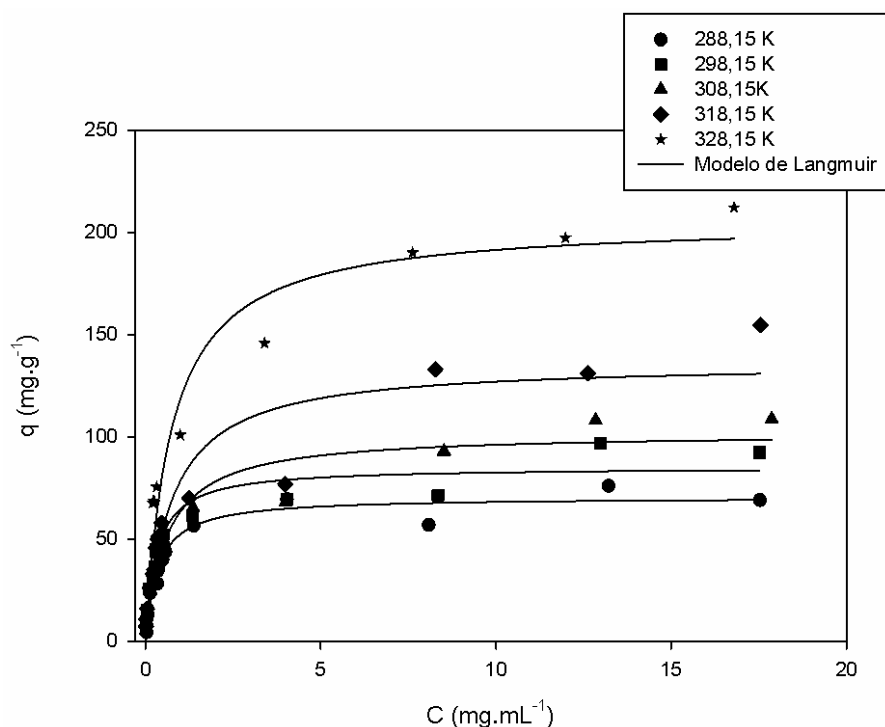
Dessa forma, pode-se afirmar que ambas as matrizes possuem resistência para utilização em amplas faixas de temperatura, inclusive em valores usualmente utilizados em processos de esterilização de materiais.

3.5. Comportamento adsortivo

Em IMAC, a adsorção irá ocorrer a depender do número e do tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com o metal imobilizado na matriz polimérica, sendo influenciada por variáveis independentes tais como sistema tamponante, natureza do metal imobilizado, pH e temperatura [40]. Assim sendo, neste trabalho o sistema tamponante utilizado foi o fosfato de sódio, pois em baixas concentrações não possuem afinidade com íons metálicos [3] e é o mais comumente utilizado nesses tipos de sistema. Além disso, não foi utilizado o acréscimo de sal ao sistema tamponante pois os efeitos eletrostáticos são mais intensos quando se emprega uma fase móvel com baixa força iônica. Estes efeitos ocorrem entre proteínas carregadas e as cargas dos íons metálicos [3,41]. Já o pH escolhido para a fase móvel foi de aproximadamente 7, pois o pKa da proteína em questão (BSA) varia de 3,14 a 6,32. Em IMAC, a adsorção é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da proteína estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em uma condição na qual o valor de pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis. [2,41].

Dessa forma, na Figura 10 são apresentadas as curvas experimentais das isotermas ajustadas pelo modelo de Langmuir [21]

Figura 10: Efeito da temperatura no perfil isotérmico de adsorção da BSA no criogel IMAC, ajustado pelo modelo de LANGMUIR;



Verifica-se que a capacidade adsorptiva aumentou com o aumento da temperatura. Isso pode ser explicado por conta do acesso aos resíduos de histidina e triptofano para a interação com o metal imobilizado muitas vezes é dificultado porque proteínas de modo geral não possuem tais resíduos em sua superfície [3]. Assim, o aumento da temperatura pode contribuir com a alteração do arranjo espacial da proteína, facilitando a exposição de resíduos de histidina e consequentemente facilitando a sua adsorção.

Além disso, a elevação da temperatura pode aumentar a energia cinética e a mobilidade das moléculas presentes na solução a ser adsorvida. Dessa forma, o aumento na temperatura de um processo irá alterar a conformação e configuração do sistema analisado, e provavelmente isso irá afetar de maneira positiva a capacidade de retenção [42]. Característica essa, foi observada por alguns autores, como Carvalho et al. [5], que avaliaram a adsorção de lactoferrina do soro de leite bovino em temperaturas que variaram de 20 a 40°C e perceberam que a adsorção da proteína em criogel monolítico supermacroporoso por afinidade foi mais elevada na temperatura de 40°C

O ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados experimentais é apresentado na Tabela 3. Em todos os casos os parâmetros foram significativos ($p < 0.05$) e o coeficiente de determinação igual ou superior ao 0.95. Diversos autores, como Carvalho et al. [5] e Uberbacher et al. [8] vêm relatando o ajuste satisfatório do modelo de Langmuir aos dados de adsorção. A partir desses resultados foi possível a análise termodinâmica para melhor compreensão do processo de adsorção em questão.

Tabela 3. Parâmetros ajustados do modelo de Langmuir para isotermas de adsorção obtidas nas diferentes condições estudadas.

Parâmetros de Langmuir			
T (K)	q_{\max} (mg/mL)	K' (mL/mg)	R^2
288,15	70,51	0,44	0,98
298,15	85,17	0,51	0,97
308,15	101,94	0,60	0,97
318,15	136,32	0,72	0,95
328,15	205,47	0,73	0,97

q_{\max} é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), K' é a constante de equilíbrio de adsorção.

3.6. Análise termodinâmica

A partir dos resultados obtidos observou-se que, dentro da faixa de temperatura estudada, o processo de adsorção IMAC é favorecido com a elevação da temperatura, verificado pelo aumento do q_{\max} , é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), e também do aumento de K' , que é a constante de equilíbrio de adsorção, descoberto pelo limite da concentração no modelo de Langmuir tendendo a zero. Tal fato, sugere mudanças conformacionais da proteína usada e configuracionais em todo o sistema em função da temperatura. A análise termodinâmica contribui para a elucidação desses fenômenos. Nas Figuras 11 e 12 são apresentados o gráfico de van't Hoff e os valores estimados para a variação das propriedades termodinâmicas padrão de adsorção energia livre de Gibbs, entalpia e entropia (multiplicada pela temperatura).

Figura 11. Gráfico de Van't Hoff para a adsorção de BSA na matriz produzida.

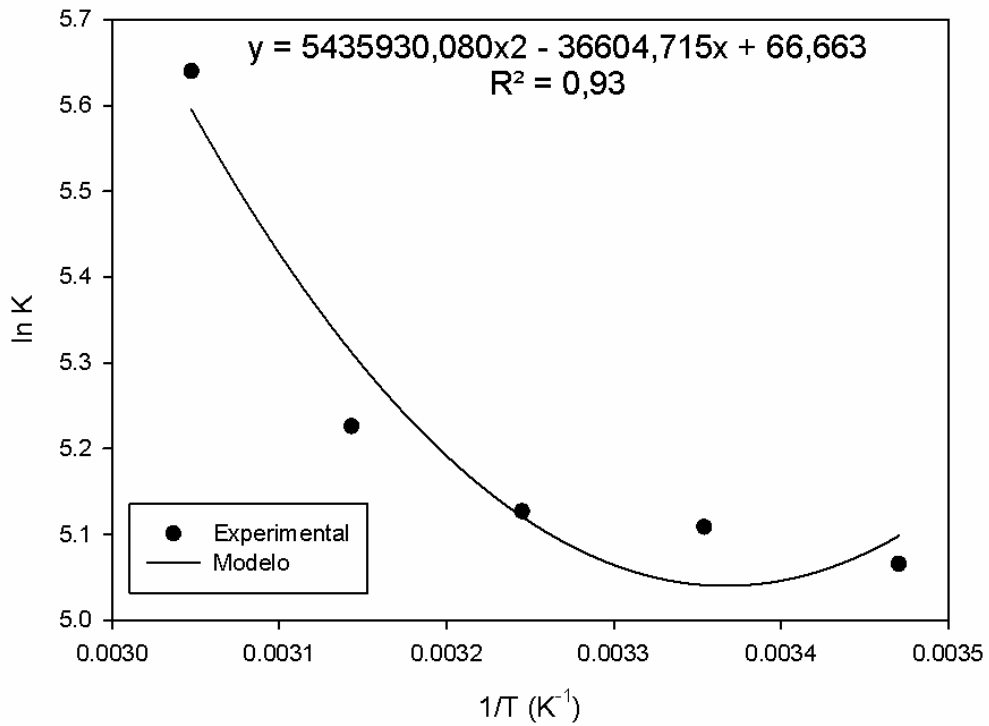
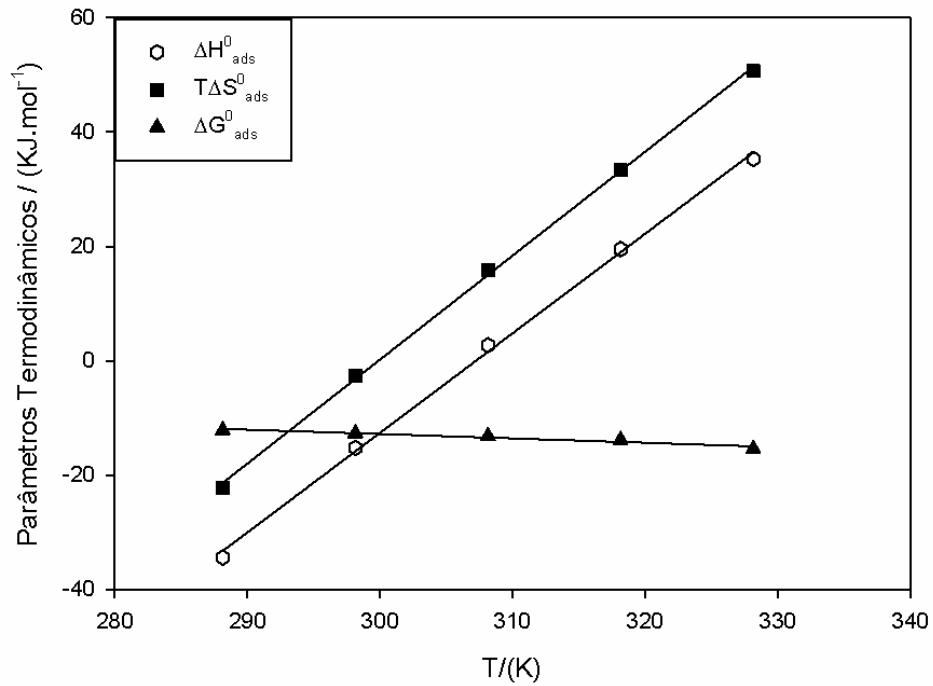


Figura 12. Variação dos parâmetros termodinâmicos da adsorção da BSA no criogel em diferentes temperaturas.



Os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12 mostram que o processo de adsorção de BSA na matriz funcionalizada para IMAC foi espontâneo ($\Delta G^0_{ads} < 0$) e que os valores da energia livre de gibbs (ΔG^0_{ads}), permanecem praticamente constantes com o aumento da temperatura. Segundo Yu et al. [43], este fato indica que quanto maior a temperatura, dentro da faixa estudada, o processo de adsorção ocorrerá com maior facilidade. Além disso, pode-se observar que as variações na entalpia de adsorção e na entropia de adsorção aumentam com o aumento da temperatura. Logo, o processo de adsorção dessa proteína tende a se tornar endotérmico e entropicamente favorável com o aumento da temperatura. Este resultado está de acordo com outros autores, que relataram que o processo de adsorção de proteínas pode ser endotérmico ou exotérmico, dependendo da natureza da proteína, do adsorvente, de outras espécies envolvidas e das condições utilizadas. Ressaltam ainda que se o processo for exotérmico, o mesmo será entálpicamente dirigido. Se for endotérmico, o processo será entropicamente dirigido [5,9,44,45].

O processo de adsorção de proteínas pode ser avaliado com ocorrendo em quatro etapas específicas, que são a de dessolvatação e desdobração da proteína; a interação da proteína com os sítios ativos do adsorvente; o rearranjo da conformação da proteína; e redistribuição das moléculas de água e íons removidos na dessolvatação da proteína [44]. Diante disso, uma explicação para que o aumento da temperatura, provocasse um aumento na variação da entalpia, entropia e da capacidade adsorptiva foi proposta:

A variação positiva na entropia (ΔS^0_{ads}) com o aumento da temperatura esteve associada principalmente ao aumento na entropia configuracional do sistema (água, íons e proteína), pois o aumento da temperatura acarreta em um aumento da mobilidade das moléculas presentes no sistema e dessa forma, aumenta a possibilidade de formarem novas interações. Este comportamento está de acordo com o relatado em diversos trabalhos [5,9,43,44,46]. Além disso, alterações conformacionais da BSA com o aumento da temperatura podem ocorrer, visto que essa proteína tende a sofrer alterações estruturais nas condições avaliadas [22,47]

A variação positiva na entalpia com o aumento da temperatura esteve associada à necessidade de energia que o sistema requeria para romper ligações/interações (proteína-água) e da pouca energia gerada ao formar novas ligações/interações (proteínas-íons imobilizados/água-água). Ou seja, o sistema necessita de mais energia para romper as ligações dos reagentes do que conseguia liberar com novas ligações dos produtos. [44].

Dessa forma, observa-se que ocorreu uma compensação entálpico-entrópica neste processo. Essa compensação fez com que o valor de ΔG ficasse constante em toda faixa de temperatura avaliada, pois quanto mais o efeito entrópico crescia de maneira favorável (sendo mais positivo), mais o efeito entálpico crescia de maneira desfavorável (sendo mais positivo também). Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho et al. [5], que estudaram a afinidade da lactoferrina desnaturada por íons de cobre, e concluíram que para a manutenção da energia livre de Gibbs de forma positiva no processo de adsorção, teve de haver uma compensação entálpica-entrópica no sistema.

4. CONCLUSÃO

Foram produzidos criogeis poliméricos monolíticos macroporosos de poliacrilamida funcionalizados com IDA+Cu²⁺. As análises de caracterização mostraram que o processo de ativação foi efetivo e manteve a estrutura macroporosa e as características físicas dos criogeis produzidos. No que se refere à adsorção da BSA, uma característica interessante deste estudo é que a coluna produzida apresentou estabilidade aos ciclos de reutilização. A interação entre a BSA e o adsorvente de afinidade em íons metálicos foi estudada por meio de dados de equilíbrio obtidos por isotermas ajustadas pelo modelo de Langmuir. Além disso foi feita a análise termodinâmica com o modelo não linear de Van't Hoff, para caracterizar o processo termodinamicamente. Dessa forma concluiu-se que o aumento da temperatura afetou positivamente a capacidade máxima do adsorvente e os processos ocorreram de forma espontânea tornando-se entropicamente dirigido com o aumento da temperatura, com o fenômeno dominante provavelmente associado à desnaturação das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

REFERÊNCIAS

- [1] R.J. Everson, H.E. Parker, Effect of hydrogen ion concentration on the determination of lead by solvent extraction and atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 46 (1974) 1966-1970.
- [2] J. Porath, F. Maisano, M. Belew, Thiophilic adsorption, a new method for protein fractionation. *FEBS Lett*, 185 (1975) 306-310.
- [3] I.T.L. Bresolin, A.M. Everson, S.M.A. Bueno, Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações. *Química Nova*, 32 (2009) 1288-1296.
- [4] M. Uygun, B. Akduman, B. Ergönül, D.A. Uygun, S. Akgöl, A. Denizli, Immobilization of Amyloglucosidase onto Macroporous Cryogels for Continuous Glucose Production from Starch. *Journal of Biomaterials Science*, 26 (2015) 1112-1125.
- [5] B.M.A. Carvalho, W.F. Silva Júnior, L.M. Carvalho, L.A. Minim, G.G.P. Carvalho, Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33 (1) (2016) 215-223.
- [6] Serinbaş, A.; Önal, B.; Acet, O.; Özdemir, N.; Dzmitruk, V.; Dzmitry, I.H.B. A new application of inorganic sorbent for biomolecules: IMAC practice of Fe³⁺-nano flowers for DNA separation. *Materials Science and Engineering: C*, Volume 113, 2020.
- [7] B. Erol, K. Erol, E. Gökmeşe, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. *Process Biochemistry*, 83 (2019) 104-113.
- [8] H. K. Trang, L. Jiang, R.K. Marcus, Grafting polymerization of glycidyl methacrylate onto capillary-channeled polymer (C-CP) fibers as a ligand binding platform: Applications in immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) protein separations. *Journal of Chromatography B*, 1110–1111 (2019) 144-154.
- [9] R.C.I. Fontan, R.C.F. Bonomo, G.R.F. Gonçalves, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolith ion exchanger columns. *Polymer Engineering and Science*, 58 (10) (2018) 1717-1725.
- [10] G.R.F. Gonçalves, O.R.R. Gandolfi, L.S. Santos, R.C.F. Bonomo, C.M. Veloso, L.A.A. Veríssimo, R.C.I. Fontan, Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels

for the purification of lectins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1068-1069 (2017) 71-77.

[11] J.F. Da Silva, D.L. Da Silva, R.G. Nascimento, L.A.A. Veríssimo, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (37) (2019) 47956.

[12] J. Wang, R. Zhang, X. Yang, X. Liu, X. Zhang, Facile synthesis of copper(II)-decorated functional mesoporous material for specific adsorption of histidine-rich proteins. *Talanta*. 176 (2018) 308-317.

[13] E.D. Vieira, L.G.M. Basso, A.J. Costa-Filho, Non-linear van't Hoff behavior in pulmonary surfactant model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1859 (6) (2017) 1133-1143.

[14] S. Zheng, Y. Han, J. Zhang, W. Li, Determination and correlation of solubility of linezolid form II in different pure and binary solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 432 (2017) 18-27.

[15] A. Kumar, V. Bansal, J. Andersson, P. Roychoudhury, B. Mattiasson, Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. Immobilized metal affinity chromatography purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, 1103 (1) (2006) 35-42.

[16] K. Yao, S. Shen, J. Yun, L. Wang, X. He, X. Yu, Characterization of a novel continuous supermacroporous monolith cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109 (1) (2006) 103-110.

[17] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2) (1976) 248-254.

[18] I.N. Savina, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. *Polymer*, 46 (23) (2005) 9596-9603.

- [19] F.M. Plieva, J. Andersson, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, I.N. Savina, S. Deraz, Characterization of supermacroporous monolithCIH polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *Journal of Chromatography B*, 807 (1) (2004) 129-137.
- [20] F.M. Plieva, J. Andersson, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Characterization of polyacrylamide based monolithCIH columns. *Journal of Separation Science*, 27 (10-11) (2004) 828-836.
- [21] I. Langmuir, The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 38 (6) (1916) 1145-1156.
- [22] R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, R.C.I. Fontan, J.S.R. Coimbra, Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. *Journal of Chromatography B*, 844 (1) (2006) 6-14.
- [23] R. Ueberbacher, A. Rodler, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography of proteins: Thermodynamic analysis of conformational changes. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2) (2010) 184-190.
- [24] I.S. Nascimento, D.L. Silva, T.B. Pereira, G.R.F. Goncalves, L.A.A. Verissimo, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, Single-step purification of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds using a supermacroporous ion exchange cryogel. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 18 (1) (2019) 313-324.
- [25] S. Zhao, D. Wang, S. Zhu, X. Liu, 3D cryogel composites as adsorbent for isolation of protein and small molecules. *Talanta*. 191 (2019) 229-234.
- [26] M. Wiśniewska, S. Chibowski, T. Urban, Influence of temperature on adsorption mechanism of anionic polyacrylamide in the Al₂O₃ –aqueous solution system. *Fluid Phase Equilibria*, 408 (2016) 205-211.
- [27] I. Perçin, E. Aksöz, PHEMA Based Cryogel For Lectin Purification From Soybean Flour Hacettepe. *Journal of Biology and Chemistry*, 40 (2012) 303-308.
- [28] I. Guven, O. Gezici, M. Bayrakc, M. Morbidelli, Calixarene-immobilized monolithCIH cryogels for preparative protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1558 (2018) 59-68. [29] N. Ni, D. Duquette, M.J. Dumont, Synthesis

and characterization of zein-based cryogels and their potential as diesel fuel absorbent. *European Polymer Journal*, 91 (2017) 420-428.

[30] X. Guo, X. Li, Y. Jiang, L. Yi, Q. Wu, H. Chang, X. Diao, Y. Sun, X. Pan, N. Zhou, A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 149 (2014) 353–360.

[31] A.C.F. De Oliveira, I.C.O. Neves, J.A.M. Saraiva, M.F.F. De Carvalho, G.A. Batista, L.A.A. Veríssimo, J.V. De Vilela, Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, (2019) DOI: 10.1080/01496395.2019.1617743.

[32] P. Arvidsson, F.M. Plieva, I.N. Savina, V.I. Lozinsky, Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 977 (1) (2002) 27-38. [33] C.A. Mourão, C. Marcuz, K. Haupt, S.M.A. Bueno, Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolith CIL cryogels: Purification of IgG from human serum. *Journal of Chromatography B*, 1129 (2019) 559-567.

[34] J. Coates, Interpretation of Infrared Spectra: A practical approach. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (online). John Wiley & Sons Ltd, (2006) DOI: 10.1002/9780470027318.a5606

[35] G.C. Ingavle, L.W.J. Baillie, Y. Zheng, E.K. Lis, I.N. Savina, S. R. Sandeman, Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen. *Biomaterials*, 50 (2015) 140-153.

[36] P.C.G. Mól, L.A.A. Veríssimo, M.R. Eller, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from cCILHen egg white. *Journal of Chromatography B*, 1044-1045 (2017) 17-23.

[37] X. Yang, D. Kebebew, D. Guorong, S.P. Pan, Selective adsorption and high recovery of La³⁺ using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. *Chemical Engineering Journal*, 379 (2020) 122-127.

[38] T.W.G. Solomons, C.B. Fryhle, *Química orgânica* 1. ed. Rio de Janeiro : LTC, 1 (2005).

- [39] J. Cai, D. Xu, Z. Dong, X. Yu, Y. Yang, S.W. Banks, A.V. Bridgwater, Processing thermogravimetric analysis data for isoconversional kinetic analysis of lignocellulosic biomass pyrolysis: Case study of corn stalk. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82 (2018) 2705-2715.
- [40] M.A. Martínez-Vitela, J. Gracia-Fadrique, The Langmuir-Gibbs surface equation of state. *Fluid Phase Equilibria*, 506 (2020) 112-119.
- [41] E. Sulkowski, Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotech.* 3 (1985).
- [42] P. Zimmermann, T. Goetsch, T. Zeiner, S. Enders, Prediction of adsorption isotherms of n-aldehydes mixtures using density functional theory in combination with Peng-Robinson equation of state. *Fluid Phase Equilibria*, 424 (2016) 173-181.
- [43] P. Yy, D.E. Wurster, Thermodynamic Estimate of the Number of Solvent Molecules Displaced by a Solute Molecule for Enthalpy-Driven Adsorption: Phenobarbital and Activated Carbons as the Model System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107 (2018) 1055-1062.
- [44] R.A. Lira, L.A. Minim, R.C.F. Bonomo, V.P.R. Minim, L.H.M. Silva, M.C.H. Silva, Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropptide on anion-exchange chromatography adsorbent. *Journal of Chromatography*, 1216 (2009) 4440-4444.
- [45] A.P.F. Machado, L.A. Minim, R.C.I. Fontan, V.P.R. Minim, P.C.G. Mól, Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolitCIH column. *Fluid Phase Equilibria*, 401 (2015) 64-69.
- [46] T. Greinert, K. Vogel, J. Mühlenweg, G. Sadowski, T. Maskow, C. Helda, Standard Gibbs energy of metabolic reactions: VI. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase reaction. *Fluid Phase Equilibria*, 517(2020) 112-127.
- [47] I.M. Bezerra, L.C. Moreira, O. Chiavone-Filho, S. Mattedi, Effect of different variables in the solubility of ampicillin and corresponding solid phase. *Fluid Phase Equilibria*, 459 (2018) 18-29.
- [48] L.S. Bigman, Y. Levy, Entropy-enthalpy compensation in conjugated proteins. *Chemical Physics*, 514 (2018) 95-105.

CAPITULO 4

PURIFICAÇÃO DE BROMELINA A PARTIR DE TÉCNICAS SEQUENCIAIS DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICAS E AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS.

Resumo

A bromelina é uma enzima com elevado potencial de uso nas indústrias farmacêutica e de alimentos devido à sua atividade proteolítica. Purificá-la com um elevado grau de pureza é de grande interesse. Leitos monolíticos poliméricos supermacroporosos são uma promessa nesse sentido. Neste sentido foi avaliado o uso individual e em conjunto de duas diferentes colunas monolíticas para a purificação de bromelina a partir do extrato obtido da polpa de abacaxi. Primeiramente a purificação da bromelina foi avaliada em um criogel funcionalizado para atuar com cromatografia de interação hidrofóbica. Para isso este criogel foi exposto ao extrato juntamente com uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6, acrescida de $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2SO_4 como fase móvel e a eluição foi feita com água destilada. Depois disso, avaliou-se a purificação em um outro criogel, dessa vez de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), onde foi utilizada uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6 como fase móvel e a eluição foi feita com tampão imidazol. Os fatores de purificação obtidos foram semelhantes, próximos a 2, e com isso foi feita uma purificação em sequencia com os dois tipos de criogel. Primeiramente, utilizou-se o criogel CIH para purificar o extrato e em sequencia utilizou o criogel IMAC para purificar a porção eluída do criogel CIH. Dessa forma, solução final eluída da etapa sequencial apresentou um maior fator de purificação, próximo à 10. O uso de leitos monolíticos supermacroporosos na purificação de bromelina mostrou-se promissor, permitindo o uso de soluções de alimentação mais concentradas em um processo com um reduzido número de etapas. Com isso é possível a redução de custos e do consumo de água requerido, minimizando o impacto ambiental do processo.

Palavras-chave: purificação, afinidade, interação hidrofóbica, leito monolítico, bromelina.

1. Introdução

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido amplamente reconhecida, havendo a necessidade da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Reconhece-se também a necessidade da substituição das múltiplas etapas de bioprocessos por processos biotecnológicos mais eficientes [1]. Além disso, a demanda das indústrias farmacêutica e de alimentos por biocompostos de fontes naturais é crescente, buscando-se o emprego de técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade dos mesmos [2].

Em decorrência destas necessidades e tendências, é notório o aumento significativo do consumo e demanda de produção de enzimas, por possuírem amplas aplicações industriais e terapêuticas. As proteases, por exemplo, são as enzimas de grande importância em processos industriais, pois podem ser utilizadas na produção de detergentes, no aumento da digestibilidade em alimentos animais e na degradação de subprodutos ricos em proteína [1]. Elas podem ser obtidas a partir de diversas fontes, destacando-se as de origem microbiana, animal e vegetal. Tem-se uma grande variedade de vegetais que podem constituir fontes inesgotáveis dessas enzimas [1].

Dentre as proteases existentes, merece destaque a bromelina, uma cisteínoprotease, que está presente em plantas da família Bromeliaceae no qual o abacaxi é sua principal fonte de obtenção. Seu destaque nas indústrias alimentícias se deve ao poder de ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor de proteínas, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados protéicos dentre outros [3]. Além disso, possuem uma massa molecular entre 23,8 e 37 kDa e apresenta uma ampla faixa de estabilidade processual, com pH ótimo entre 4,6 – 8,5, e temperatura ótima entre 25 – 70 °C [4].

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para a purificação da bromelina, como afinidade por íons metálicos [5], magnetismo [6], sistemas aquosos bifásicos [7], extração micelar reversa [8], precipitação por etanol [9], cromatografia líquida [10], troca iônica [10] e ultrafiltração [11].

Dessa forma, percebe-se que uma importante alternativa a ser utilizada nos processos de purificação é a utilização de técnicas cromatográficas. Tais técnicas estão entre as mais utilizadas para purificação de proteínas. Porém, a presença de grandes biomoléculas

desafia os limites dos métodos cromatográficos tradicionais [12]. Para superar esses inconvenientes, vem ocorrendo o desenvolvimento de materiais monolíticos poliméricos supermacroporosos, que permitem a separação de grandes biomoléculas e até mesmo de células inteiras em materiais não clarificados [13].

Materiais monolíticos poliméricos supermacroporosos conhecidos como criogéis (géis poliméricos formados em meio moderadamente congelado), tem se tornado uma tecnologia muito útil na área de bioseparação. Devido à estrutura de poros interconectados de grandes dimensões, o escoamento através dos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa [14, 15]. Tais monólitos também são facilmente sintetizados e modificados para adquirir características específicas para o isolamento de compostos de interesse.

Por exemplo, uma das técnicas de modificação utilizada é a funcionalização dos criogéis para que sirvam como colunas de interação hidrofóbica. Essa funcionalização é baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície de biomoléculas e o ligante hidrofóbico contido no criogel [16]. Outra técnica é a funcionalização por afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC), a qual se baseia na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em na matriz sólida apresentam por grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução [17]. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico [18].

Essas técnicas são utilizadas por causar pouco ou nenhum dano à estrutura terciária e consequente perda da bioatividade das moléculas de interesse. Tal característica é devida à seletividade e capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos [15, 19]. Assim sendo, neste trabalho foi feito o estudo da purificação em batelada da bromelina presente na polpa do abacaxi, utilizando-se duas colunas monolíticas poliméricas de diferentes funcionalizações. Uma delas funcionalizadas para utilizar a interação hidrofóbica como centro da purificação e a outra para utilizar a afinidade por ions metálicos imobilizados (IMAC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1.Reagentes.

Para a realização deste trabalho foram utilizados abacaxis frescos adquiridos de supermercados registrados no comércio local. Todos os outros reagentes necessários para o desenvolvimento desse trabalho possuíram, no mínimo, grau analítico PA-ACS, sendo descritos ao longo do detalhamento das metodologias. A água utilizada foi do tipo ‘destilada’, e os equipamentos e materiais consumíveis em geral também foram descritos na sequência, nos momentos mais convenientes.

Para a purificação da bromelina foram utilizados dois tipos matrizes monolíticas macroporosas de poliacrilamida funcionalizadas de maneiras distintas. O desenvolvimento do criogel de interação hidrofóbica foi feito utilizando matrizes poliméricas que continham radicais epóxi em sua estrutura (vindos do alil glicidil éter). Os radicais epóxi existentes na matriz reagiram com radicais amino de etilenodiamina em solução e posteriormente bases de Schiff foram formadas entre radicais amino da etilenodiamina e radicais carbonila de glutaraldeído em solução e finalmente entre os radicais carbonila do glutaraldeído e os radicais amino das moléculas de anilina.

Já o desenvolvimento do criogel de afinidade por íons metálicos imobilizados Foi feito utilizando criogéis que também continham radicais epóxi em sua estrutura. Para que esses, reagissem com os agentes quelantes e posteriormente com os íons de cobre. Algumas características físicas e químicas das matrizes utilizadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos leitos monolíticos utilizados.

Características	Criogel CIH	Criogel IMAC
Permeabilidade ao escoamento (KW) / (m²)	2.21·10 ⁻¹¹	1.65·10 ⁻¹¹
Porosidade total (εT)	0.90	0.93
Altura de um prato teórico (HETP) / (cm)	0.73-1.24	0.18- 0.24
Diâmetro médio de poro (dm) / (µm)	85	80

2.2. Preparação da solução de alimentação

A solução de alimentação foi um extrato enzimático obtido a partir da polpa do abacaxi (*Ananas comosus*), utilizando-se metodologia adaptada por Chaurasiy et al. [8]. A polpa foi separada da casca e o material recolhido foi então triturado juntamente com solução tampão fosfato de sódio (0.2 mol.L^{-1}), na proporção de 1:2, em processador de alimentos à temperatura ambiente ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$). A solução foi duplamente filtrada em tela de nylon (120 mesh), para retirada de fibras e particulados em suspensão, e posteriormente centrifugados a 5000xg por 20 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato bruto) seguiu para a realização dos ensaios posteriores.

2.3. Determinação da concentração de proteínas totais e atividade enzimática

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford et al. [20]. O ensaio da atividade enzimática proteolítica foi realizado através do método da azocaseína, descrito por Kunitz [21] e modificado por Walter [22], onde azocaseína 1,0% (m/v, Sigma) foi solubilizada em 4% de etanol (v/v) e tampão fosfato 200 mM, pH 7,0, e utilizados como substrato. A mistura de ensaio, contendo 5mL de substrato e 100 μL de extrato enzimático foi colocada em banho-maria por 10 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo a reação interrompida pela adição de 5mL de ácido tricloroacético 5% (m/v, Synth). As amostras foram então centrifugadas à 4000x G por 10 minutos e a uma temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizando um espectrofotometro com leitura a 280nm, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir o aumento na densidade ótica em uma unidade como mostrado na equação 1:

$$\alpha = \frac{C_{Tirocina} V_f}{t_i V_a} \quad (1)$$

Onde, α = Atividade enzimática (U/mL); $C_{Tirocina}$ = Valor obtido a partir da amostra; V_f = Volume total da análise (em mL); V_a = Volume do extrato enzimático; t_i = tempo (minuto) de incubação

2.4.Purificação da bromelina.

Para avaliação da purificação e do potencial de uso das matrizes produzidas, foi utilizado o extrato de bromelina aquoso obtido do abacaxi. Para tanto foram avaliados inicialmente o potencial de purificação da bromelina utilizando-se as matrizes de interação hidrofóbica (CIH) e afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) separadamente. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

A purificação com as matrizes de interação hidrofóbica foi conduzida em batelada, utilizando-se tubos cônicos de 50mL com tampa. Neles 40 mL do extrato enzimático foram acrescidos de sulfato de sódio (1 mol.L^{-1} , pH 6) e colocados em contato com 450 mg da matriz (coluna com 5.5 cm de comprimento e 2.1 cm de diâmetro) durante 12 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos para se avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática. Após o contato do criogel com o extrato, a coluna foi direcionada para a eluição. A eluição da proteína adsorvida foi feita pelo contato com 10 mL de água destilada durante 2 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos para se avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática.

A purificação nas matrizes de IMAC foi conduzida de modo similar. 40 mL do extrato enzimático bruto (sem adição de sulfato de sódio) foram colocados em contato com 450 mg do criogel (coluna com 5.5 cm de comprimento e 2.1 cm de diâmetro) durante 12 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos para se avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática. Após o contato do criogel com o extrato, a coluna foi direcionada para a eluição. A eluição da proteína adsorvida foi feita pelo contato com 10 mL de tampão imidazol (200mM, pH 7,4) durante 2 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos para se avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática.

2.5. Purificação da bromelina em etapas sequenciais.

Feito os experimentos de purificação utilizando-se as matrizes separadamente, percebeu-se que o fator de purificação das duas eram semelhantes. No entanto, a eluição da matriz de CIH é com água. Fato que facilita o preparo da alimentação da IMAC. Isso

serviu para definir qual dos dois tipos de coluna, seria utilizado primeiramente na purificação em etapas sequenciais. Dessa forma, dez tubos contendo 40 mL do extrato bruto de bromelina foram acrescidos de sulfato de sódio (1 mol.L⁻¹) e colocados em contato com aproximadamente 450 mg da matriz de interação hidrofóbica (CIH) durante 12 horas de agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e as matrizes utilizadas prosseguiram-se para a eluição. A eluição da proteína adsorvida foi feita pelo contato com 10 mL de água destilada durante 2 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e reunido em um único frasco, totalizando 90 mL. Deste volume, utilizou um total de 80mL para a etapa seguinte de captura por IMAC.

O eluído obtido da etapa de CIH devidamente padronizado foi então dividido em 2 tubos com 40 mL de solução em cada um, que foram postos em contato com com 450 mg da matriz (coluna com 5,5 cm de comprimento e 2,1 cm de diâmetro) de IMAC durante 12 hora e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos e as colunas prosseguiram para a eluição. A eluição da proteína adsorvida foi feita pelo contato com 10 mL de tampão imidazol (200mM, pH 7,4) durante 2 horas e agitação rotativa constante. Após esse tempo, o líquido sobrenadante foi retirado dos tubos para se avaliar a concentração de proteínas e atividade enzimática. No fim, a quantidade obtida em cada tubo foi mais uma vez analisada.

2.6. Cálculo do fator de purificação e rendimento

A eficiência dos processos foi avaliada por dois parâmetros, dados pelas Equações 2, 3 e 4. Descritas por Toledo et al. [23] e por Biazus et al. [24], onde A equação 3 é rendimento que compara a atividade total no material purificado com a atividade total no material bruto (dado em porcentagem) e a equação 4 é o fator de purificação (FP) que compara a atividade enzimática específica total no material purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto.

$$\begin{aligned} \textit{Atividade específica} \\ \textit{(U/mL)} \end{aligned} &= \frac{\textit{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL}\right)}{\textit{Proteínas Totais} \left(\frac{mg}{mL}\right)} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \textit{Rendimento} \\ \textit{(\%)} \end{aligned} &= \frac{[\textit{Atividade Enzimática}]_{eluição}}{[\textit{Atividade Enzimática}]_{bruto}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Fator de purificação} = \frac{[\text{Atividade específica}]_{\text{elução}}}{[\text{Atividade específica}]_{\text{extrato bruto}}} \quad (4)$$

3. Resultados e discussões

Os resultados obtidos utilizando as matrizes de CIH e IMAC separadamente são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características das soluções de alimentação e eluição.

Matriz	CIH		IMAC	
	Extrato	Eluído	Extrato	Eluído
Amostra				
Volume (mL)	120	30	120	30
C_{pt} (mg·mL⁻¹)	0,303 ± 0,032	0,040 ± 0,010	0,303 ± 0,032	0,045 ± 0,009
Massa proteína (mg)	36,36	1,2	36,36	1,35
Atividade enzimática (U/mL)	4,955 ± 0,221	1,435 ± 0,134	4,955 ± 0,221	1,405 ± 0,201
Atividade específica (U·mg⁻¹)	15,997 ± 0,22	30,669 ± 0,18	15,997 ± 0,22	38,689 ± 0,20
Fator de purificação		1,92		2,42
Rendimento		29%		28%

C_{pt} = Concentração de proteínas totais; α = Atividade enzimática específica

Observou-se que no uso das duas matrizes houve um aumento da atividade enzimática na solução eluída, quando comparada ao extrato bruto, e também houve uma redução na concentração de proteínas durante o processo de purificação.

A cromatografia de interação hidrofóbica em geral faz parte das técnicas que possuem o objetivo de retirar a maior parte das impurezas de uma solução e separar contaminantes de propriedades similares ao composto de interesse [25]. Já a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados é utilizada em uma fase de polimento, cujo objetivo é aumentar a pureza do composto de interesse [17, 18].

Diante do exposto, avaliou-se que, ao se fazer a purificação em etapas sequenciais, seria melhor utilizar primeiramente a matriz de interação hidrofóbica e sequencialmente

a matriz de afinidade por ions metálicos. Assim sendo, os valores obtidos para os ensaios sequenciais são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Características das soluções de alimentação e eluição nas etapas sequenciais de purificação.

Etapa	Extrato	Eluído_{CH}	Eluído_{IMAC}
Volume (mL)	400	100	20
C_{pt} (mg·mL⁻¹)	0,23 ± 0,032	0,091 ± 0,018	0,005 ± 0,0002
Massa proteína (mg)	92,1	9,1	0,1
Atividade enzimática (U/mL)	4,416 ± 0,021	1,902 ± 0,204	0,208 ± 0,002
Atividade específica (U·mg⁻¹)	11,29 ± 0,01	22,74 ± 0,18	103,58 ± 0,31
Fator de purificação final			9,174
Rendimento final			4,72%

C_{pt} = Concentração de proteínas totais; α = Atividade enzimática específica;

Observou-se que houve um aumento da atividade enzimática na solução eluída da purificação em etapas sequenciais, quando comparadas com a purificação em etapa individual, e também houve uma grande redução na concentração de proteínas durante o processo de purificação em etapas sequenciais.

Ao se utilizar a técnica de purificação em etapas sequenciais, provavelmente, a interação hidrofóbica atuou como captura das proteínas existentes no extrato bruto.

Isso pode ser explicado pelo fato das proteínas, de maneira geral, serem moléculas anfipáticas, ou seja, elas se caracterizam por possuírem zonas hidrofílicas e zonas hidrofóbicas em sua estrutura. Geralmente as zonas hidrofóbicas se localizam no interior da molécula e para que elas se exponham, é necessário que a camada de solvatação que as rodeia seja desfeita. A camada de solvatação é desfeita pelo contato com algum tipo de sal, pois a função do sal é modificar as interações intermoleculares provenientes da dupla camada elétrica, alterando, assim, a distribuição molecular e iônica desta região, que quando colocadas em contato com a solução salina se tornaram expostas e se ligaram às zonas hidrofóbicas presentes na superfície da matriz [2]. Dessa forma, a maioria das proteínas presentes no extrato são contempladas pela interação hidrofóbica e assim, esta

técnica é reponsável por purificar a maior parte das proteínas e separá-las da maior parte das impurezas do extrato.

Esta explicação é consistente com as discussões de Chen et al. [26] e Arakawa [27] para a interação de proteínas em colunas hidrofóbicas de octil-sepharose e polissacarídeo, respectivamente, em solução tampão de sulfato de amônio. E também com os resultados de Ferreira [28] para a interação de proteínas em resina hidrofóbica Streamline Phenyl em coluna empacotada de leito fixo e uma solução tampão com fosfato de sódio.

Já ao se utilizar a técnica de afinidade por ions metálicos imobilizados, esta tenha feito um trabalho de lapidação e separou proteínas específicas da fração total de proteínas. Isso se deve ao fato de que a técnica IMAC atua na extração das proteínas que tenham mais afinidade com os íons metálicos, já que essa afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos presentes em alguns tipos de proteína. No caso da bromelina os resíduos de aminoácidos são o imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano [29]. Ou seja, a técnica IMAC irá completar a purificação sequencial de modo seletivo às proteínas de interesse, que são as bromelinas.

O fator de purificação obtido no presente trabalho foi elevado, conseguindo-se um produto cerca de 9,2 vezes mais puro que a alimentação com apenas duas etapas de purificação. Outros trabalhos como os de Han et al. [5], Han et al. [6], Wu et al. [7], Chaurasiy et al. [8], Soares et al. [9] e Costa et al. [10], não conseguiram um fator de purificação superior a 7, utilizando mais de duas etapas de purificação. Resultados estes, demonstram o potencial do método empregado.

No entanto, verificou-se uma redução no rendimento com a utilização de duas etapas de purificação, chegando-se a cerca de 5% de rendimento na fração eluida obtida. Han et al. [5] purificando bromelina de uma alimentação previamente precipitada de extrato de abacaxi com tampão-fosfato em um sistema aquoso bifásico à base de líquido iônico quelatado com metais de cobre, conseguiram um rendimento de aproximadamente 78%. Tais valores foram obtidos a partir de uma solução previamente concentrada de bromelina, ao contrário deste específico experimento que utilizou uma solução de entrada sem tratamentos prévios. O mesmo ocorreu no trabalho realizado por Wu et al. [7], que conseguiram um rendimento de 55%, a partir de uma solução já concentrada e precipitada de bromelina.

4. Conclusões

Com as matrizes monolíticas poliméricas macroporosas utilizadas na purificação da bromelina do abacaxi, conseguiu-se até 5% de rendimento e um fator de purificação próximo a 9,2 em duas etapas cromatográficas. O emprego de criogéis poliméricos mostrou-se viável e promissor, sendo possível a obtenção de bromelina com elevado grau de pureza a partir do extrato de abacaxi, reduzindo o número de etapas do processo e os custos envolvidos, e minimizando impactos ambientais devido à redução do consumo de água requerido. Mais estudos são demandados buscando-se otimizar as condições operacionais, para se aumentar o grau de pureza e o rendimento do processo.

Referências.

[1] Wessner, M. Nowaczyk, M. Brandenbusch, C. Rapid identification of tailor-made aqueous two-phase systems for the extractive purification of high-value biomolecules. *Journal of Molecular Liquids*, 314, 2020.

[2] Zhou, L.; Zhu, J.; Lin, M.; Xua, J.; Xiec, Z.; Yang, D. Tetra-alkylsulfonate functionalized poly(aryl ether) membranes with nanosized hydrophilic channels for efficient proton conduction, *Journal of Energy Chemistry*, v. 40, p. 57-64, 2020.

[3] Erol, B.;Erol, K.;Gökmeşe, E. The effect of the chelator characteristics on insulin adsorption in immobilized metal affinity chromatography. *Process Biochemistry*. Volume 83, August 2019, Pages 104-113.

[4] Banerjee, S. Ranganathan, V. Pattic, A. Arora, A. Valorisation of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 2018, 60-70

[5] Han, J. Cai, Y. Wang, L. Mao, Y. Ni, L. Wang, Y. A high efficiency method combining metal chelate ionic liquid-based aqueous two-phase flotation with two-step precipitation process for bromelain purification. *Food Chemistry*, 309, 2020.

[6] Han, J. Wang, L. Wang, Y. Cai, Y. Mao, Y. Ni, L. Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. *Food and Bioproducts Processing*. 114, 2019, 253-262

[7] Wu, S-L., Figueroa, A., Karger, B. L.. Protein conformational effect in hydrophobic interaction chromatography: Retention characterization and the role of mobile phase additives and stationary phase hydrophobicity. *Journal of Chromatography A*, v. 371, p. 3-27, 1986.

[8] Chaurasiy, R.S. Hebbar, H.U. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology*. 111, 2013, 90-97.

[9] Soares, P.A.G. Vaz, A.F.M. Correia, M.T.S. Pessoa, A.J. Cunha, M.G.C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology*, 98, 2012, 389-395.

[10] Costa, H.B. Fernandes, P.M.B. Romão, W. Ventura, J.A. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. *Industrial Crops and Products*, 59, 2014, 163-168.

[11] Nor, M.Z.M. Ramchandran, L. Duke, M. Vasiljevic, T. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a two-stage ceramic ultrafiltration process. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 2016, 142-150.

[12] Fontan, Rafael Da Costa Ilhéu ; Bonomo, Renata Cristina Ferreira ; Gonçalves, Gabriel Ramos Ferreira ; Minim, Valéria Paula Rodrigues ; Minim, Luis Antonio . Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolith C1H Ion Exchanger Columns. *POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE* , v. 58, p. 1717-1725, 2018.

[13] Gonçalves, G. R. F.; Gandolfi, O. R. R.; Santos, L. S.; Bonomo, R. C. F.; Veloso, C. M.; Veríssimo, L. A. A.; Fontan; R. C. Immobilization of sugars in 39 supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

[14] Nascimento, I. S. ; Silva, D. L. ; Verissimo, L. A. A. ; Pereira, T. B. ; Goncalves, G. R. F. ; Veloso, C. M. ; Bonomo, R. C. F. ; Fontan, R. C. I. . Single-step purification of lectins from jackfruit (*artocarpus integrifolia*) seeds using a supermacroporous ion exchange cryogel. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica* , v. 18, p. 313-324, 2019

[15] Da Silva, J.F., Da Silva, D.L., Nascimento, R.G., Veríssimo, L.A.A., Fontan, R.C.I. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019, 1-9.

[17] Carvalho, B. M. A.; Silva Júnior, W. F. ; Carvalho, L. M. ; Minim, L. A. ; Carvalho, G. G. P. Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering (Online)*, v. 33, p. 215-223, 2016.

[18] Bresolin, I.T.L, Everson, A.M E Bueno, S.M.A.. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações. *Química Nova*, Vol. 32, No. 5, 1288-1296, 2009.

[19] Veríssimo, Lizzy Ayraalcântara ; Paganoto, Fernanda Spagnol ; Mol, Paula Chequer Gouveia ; Ilhéu Fontan, Rafael Da Costa ; Minim, Valéria Paula Rodrigues ;

Minim, Luis Antonio . Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. *SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY* , v. 52, p. 1973-1982, 2017.

[20] Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2) (1976) 248-254.

[21] Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II general properties. *Journal of General . Physiology*, v. 30, p. 291-310, 1974.

[22] Walter, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein, and azocoll as substrates. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, v. 5, 1984.p.270-277.

[23] TOLEDO, A. L. et al. Purification by expanded bed adsorption and characterization of an α -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. *Journal of Chromatography B*, v. 846, n. 1, p. 51-56, 2007.

[24] BIAZUS, J. P. M. et al. Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, p. 1786-1791, 2006a.

[25] Lei, W. R.; Kenneth, M. Evaluation of protein separations based on hydrophobic interaction chromatography using polyethylene terephthalate capillary-channeled polymer (C-CP) fiber phases. *Journal of Chromatography A*, 1585 (2019) 161-171.

[26] Wu, W. Suan, H. Sun, I. Lan, JC. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 79, 2017, 158-162.

[27] Ueberbacher, R.;Rodler, A.;Hahn, R.;Jungbauer, A. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: Thermodynamic analysis of conformational changes. *Journal of Chromatography A*. Volume 1217, Issue 2, 8 January 2010, Pages 184-190

[28] Abreu, Danielly C. A.; Figueiredo, Kátia C. De S. . Bromelain Separation And Purification Processes From Pineapple Extract. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, v. 36, p. 1029-1039, 2019