



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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

DESENVOLVIMENTO DE UM TROCADOR CATIÔNICO MACROPOROSO E
PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LISOZIMA DA CLARA DO OVO

JONATHAN BARBOSA SANTOS

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril de 2022

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

JONATHAN BARBOSA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM TROCADOR CATIÔNICO MACROPOROSO E
PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LISOZIMA DA CLARA DO OVO

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

Orientador: Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Coorientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril de 2022

660.634 Santos, Jonathan Barbosa.
S235d Desenvolvimento de um trocador catiônico macroporoso e purificação parcial de lisozima da clara do ovo. / Jonathan Barbosa Santos. – Itapetinga-BA: UESB, 2022.

76f.

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

1. Purificação - Enzima. 2. Lisozima - Proteína – Criogel. 3. Lisozima da clara do ovo – Purificação. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Ácido glutâmico
2. Cromatografia
3. Atividade enzimática

Título: DESENVOLVIMENTO DE UM TROCADOR CATIONICO MACROPOROSO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LISOZIMA DA CLARA DO OVO.

Autor (a): JONATHAN BARBOSA SANTOS

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

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

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

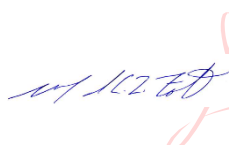
Rui Gomes
Nascimento

Assinado de forma digital
por Rui Gomes Nascimento
Dados: 2022.04.04 22:43:12
-03'00'

Prof. Dr. Rui Gomes Nascimento
Membro Externo – IFPA



Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso
UESB



Assinado de forma
digital por Rafael da
Costa Ilhéu Fontan
Dados: 2022.04.04
21:24:17 -03'00'

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

Itapetinga-BA, 04 de abril de 2022.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus por me dar força, coragem e sabedoria para alcançarmos nossas conquistas, e em segundo lugar, à todos que de alguma maneira contribuíram para a conquista dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço a oportunidade de estar aqui nesse momento, crescendo pessoalmente e profissionalmente na vida, agradeço a todos os momentos que me deu força para levantar e principalmente pela vontade de nunca desistir.

Aos meus Pais, João e Soraia, tenho que agradecer por serem os maiores suportes dessa vitória, por sempre batalharem para que eu pudesse chegar aqui, mestre que me torno. Obrigado por todo amor dado, vocês são os maiores vencedores dessa luta.

Ao Rafael, que estive sob orientação, agradeço infinitamente por todo conhecimento que me foi dado, por todas as dúvidas que foram tiradas quando eu precisei, por não medir esforços quando eu o solicitava. E acima de tudo pela paciência e compreensão.

À professora Renata Bonomo pela orientação, disponibilidade, sugestões e pela presença.

Ao meu amigo/irmão Filipe, agradeço por sempre confiar em mim, por sempre cuidar de mim, sempre estar ao meu lado em cada momento de dificuldade e principalmente pela sua amizade, que foi crucial para essa realização.

À minha amiga/companheira, Valquiria, agradeço ao companheirismo durante todo esse processo de caminhada repleto de altos e baixos e principalmente a amizade.

À Isabelle pelo apoio, companheirismo e todos os momentos que foram divididos.

À equipe do LEP 2021 agradeço e devo a todos:

À Marjorie, que sem sombra de dúvidas me auxiliou de todas as formas para a compreensão desse projeto, que esteve presente em praticamente todas as análises que realizei, que me deu direções quando surgiam minhas dúvidas e pela amizade. Ao Mateus agradeço por todas às dúvidas que me foram sanadas, toda ajuda que sempre me ofereceu, com gráficos, as eletroforeses e principalmente pela paciência e acima de tudo pelas conversas.

Agradeço a Emília por cada momento que compartilhamos juntos, que foram necessários para caracterizar essa amizade tão forte. Agradeço a Priscila, pela diversão no laboratório, pelas risadas, e principalmente a amizade. Agradeço a Annie pela amizade e compreensão. Ao Lucas agradeço ao companheirismo e momentos de diversão que nos foi proporcionado. Agradeço a Jéssica e Matheus pelo companheirismo.

Aos demais colegas, Débora, Josane, Isabella, Renata, Janaína, Rosana, agradeço pelos momentos e pela ajuda que me foi dada.

Aos professores presentes na banca avaliadora, Rui Gomes e Cristiane Veloso pela disponibilidade e sugestões.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade em desenvolver esse projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Aos meus familiares, agradeço Tia Sônia, Neidina, Preta, Lia, Laia e Cida, aos meus avós maternos Rosa e Valdir, e paternos Eulalia e Geraldo, a minha bisavó Mariana e em memória ao meu bisavô Sebastião e a todos meus primos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fatores que afetam as medidas termogravimétricas	26
Tabela 2. Resultados da caracterização estrutural das matrizes produzidas.....	45
Tabela 3. Capacidade adsortiva das matrizes produzidas.....	56
Tabela 4. Resultados referentes à purificação em batelada da lisozima da clara do ovo por interação iônica.....	57
Tabela 5. Resultados referentes à purificação da lisozima da clara do ovo por cromatografia de troca iônica no leito monolítico produzido.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de adsorção por troca aniônica e catiônica.....	20
Figura 2. Copolimerização dos monômeros acrilamida, N,N-metileno-bis-acrilamida e alil glicidil éter.....	21
Figura 3. Esquema da produção dos criogéis, (1) precursor com alta massa molecular, (2) solvente, (3) precursor com baixa massa molecular ou substâncias solúveis, (4) cristais do solvente já congelado, (5) microfase líquida não congelada, (6) rede polimérica do criogel, (7) macroporos e (8) solvente descongelado.....	22
Figura 4. Imagens da microscopia eletrônica dos criogéis de poli(acrilamida) a -10 °C (a), -20 °C (b) e -30 °C (c).	22
Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de varredura: (a) criogel produzido a -20 °C, (b) gel produzido a 20 °C.	23
Figura 6. Método do Glutaraldeído.	24
Figura 7. Ácido 2-aminoglutárico.	24
Figura 8. Representação esquemática do espectro eletromagnético.	26
Figura 9. Representação de desnaturação proteica.....	28
Figura 10. Estrutura primária da lisozima.	30
Figura 11. Estrutura cristalográfica de raios-x da lisozima.....	30
Figura 12. Cromatógrafo Akta Pure para purificação de proteínas.....	41
Figura 13. Imagem dos criogéis controle e funcionalizado.....	44
Figura 14. Dados experimentais referentes a variação de pressão (ΔP) em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel no leito de troca catiônica.	47
Figura 15. Distribuição dos tempos de residência para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito monolítico produzido.....	48
Figura 16. Coeficientes de dispersão axial aparente para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento na coluna de criogel produzida.....	49
Figura 17. Altura equivalente dos pratos teóricos da coluna de criogel produzida em função da velocidade superficial de escoamento, para pulsos de acetona.	50
Figura 18. Análise do Ponto de carga zero para a matriz produzida. (A) Controle; (B) Funcionalizada.....	51
Figura 19. Espectro de FTIR para matriz controle e funcionalizada. (A) intervalo 500-4000 cm^{-1} ; (B) intervalo de 500-1750 cm^{-1}	53
Figura 20. Curvas de TG e DTA para os criogéis elaborados: (A) Criogel controle; (B) criogel funcionalizado.	54

Figura 21. Difratoogramas dos criogéis controle e funcionalizado.....	56
Figura 22. Perfil de adsorção da purificação da lisozima por meio de uma solução da clara do ovo (1:5), utilizando a coluna de criogel em sistema cromatográfico Akta Pure.....	59
Figura 23. Parâmetros para avaliação do processo de purificação da lisozima por meio de criogel de troca catiônica em cromatógrafo Akta Pure.	60
Figura 24. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para lisozima purificada (batelada) da clara do ovo. (A) Padrão lisozima puro; (B) extrato bruto; (C) Solução purificada.	61
Figura 25. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para lisozima purificada (solução de alimentação) da clara do ovo. (A) Padrão lisozima puro; (B, C e D) Solução purificada; (E) Extrato bruto.	62

RESUMO

SANTOS, J. B. **Desenvolvimento de um trocador catiônico macroporoso e purificação parcial de lisozima da clara do ovo por troca iônica.** 76 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2022.

Os processos cromatográficos são frequentemente utilizados para identificação, separação e purificação de biomoléculas de interesses industrial e farmacêutico. Com isso, há a necessidade de inovação de técnicas que possam a cada vez mais melhorar os resultados nessa área. Avanços nos estudos de materiais são importantes nesse segmento e a classe de monolitos poliméricos chamada de criogéis despertam o interesse devido à versatilidade que apresenta na sua produção e modificação, com isso, existem estudos da sua utilização com fins relacionados a adsorção e imobilização de biomoléculas com atividade biológica, como é o caso das proteínas. Essas por sua vez, possuem uma gama de aplicação em diversos setores, podendo ser purificadas por diferentes princípios, baseados em sua estrutura. Entre as proteínas de interesse, a lisozima é uma enzima que se destaca pela sua atividade antimicrobiana, sendo usada como conservante na indústria de alimentos. Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi a produção de uma matriz de troca catiônica, produzida a partir da funcionalização de um criogel de poli(acrilamida) com glutamato monossódico, a caracterização do material produzido e a purificação parcial de lisozima da clara do ovo. Foram realizadas análises de caracterização estrutural do suporte produzido, como porosidade, grau de expansão (ED), capacidade de inchamento (S), capacidade de troca iônica (CTI), ponto de carga zero (PCZ) espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), Difração de raios-x (DRX) e análise termogravimétrica (TGA). Também foi feita a caracterização hidrodinâmica do leito produzido, com determinação da distribuição dos tempos de residência (DTR), coeficiente de dispersão axial aparente (D_{ax}), altura dos pratos teóricos equivalentes (HETP) e permeabilidade ao escoamento (k_w). A matriz produzida apresentou porosidade superior a 90%, ED de $21,73 \text{ L.kg}^{-1}$, S de $17,97 \text{ kg.kg}^{-1}$, CTI de $362 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{criogel seco}}$ e PCZ em torno de pH 6,0. As análises de FTIR e TGA indicaram a modificação da matriz, e a análise de DRX indicou a natureza amorfa do material. As curvas de DTR obtidas, apresentaram assimetria, indicando não uniformidade dos poros presentes, pequena variação nos valores de D_{ax} e HETP para vazões variando de 2 a 10 mL.min^{-1} , além da baixa resistência ao escoamento. Foi avaliada a purificação de lisozima a partir da clara de ovo em processos em batelada e em leito fixo, obtendo-se, respectivamente, fatores de purificação iguais a 9,53 e 15,11, baseado na atividade enzimática específica. A matriz utilizada apresentou repetibilidade no processo em leito fixo após três repetições. A análise de eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE indicou alta pureza da lisozima, uma vez que não há o aparecimento de outras bandas de proteínas na solução eluída. Esses resultados mostram o potencial do material produzido, visto que em apenas uma etapa cromatográfica empregada, se obteve um fator de purificação de quinze vezes maior comparado ao extrato bruto utilizado.

Palavras-chave: Criogel, adsorção, troca catiônica, glutamato, purificação.

Orientador: Rafael Costa Ilhéu Fontan

Coorientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo

ABSTRACT

SANTOS, J. B. **Development of a macroporous cation exchanger and partial purification of lysozyme from egg white by ion exchange.** 76 p. Dissertation (Master in Food Engineering) Graduate Program in Food Engineering and Science, State University of Southwest Bahia, Itapetinga-BA, 2022.

Chromatographic processes are frequently used for identification, separation and purification of biomolecules of industrial and pharmaceutical interest. Thus, there is a need for innovation in techniques that can increasingly improve results in this area. Advances in materials studies are important in this segment and the class of polymeric monoliths called cryogels arouses interest due to the versatility that it presents in its production and modification. biological activity, such as proteins. These, in turn, have a range of application in different sectors, and can be purified by different principles, based on their structure. Among the proteins of interest, lysozyme is an enzyme that stands out for its antimicrobial activity, being used as a preservative in the food industry. Thus, the objective of this work was the production of a cation exchange matrix, produced from the functionalization of a polyacrylamide cryogel with monosodium glutamate, the characterization of the material produced and the partial purification of lysozyme from egg white. Analyzes of structural characterization of the produced support were carried out, such as porosity, degree of expansion (ED), swelling capacity (S), ion exchange capacity (IEC), point of zero charge (PCZ) infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD) and Thermogravimetric Analysis (TGA). The hydrodynamic characterization of the produced bed was also carried out, with determination of the residence time distribution (DTR), apparent axial dispersion coefficient (Dax), equivalent theoretical plate height (HETP) and flow permeability (k_w). The matrix produced showed porosity greater than 90 %, ED of 21.73 L.kg^{-1} , S of 17.97 kg.kg^{-1} , IEC of $362 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{dry cryogel}}$ and PCZ around pH 6.0. FTIR and TGA analysis indicated matrix modification, and XRD analysis indicated the amorphous nature of the material. The DTR curves obtained showed asymmetry, indicating non-uniformity of the pores present, small variation in the Dax and HETP values for flow rates ranging from 2 to 10 mL.min^{-1} , in addition to low flow resistance. The purification of lysozyme from egg white was evaluated in batch and fixed bed processes, obtaining, respectively, purification factors equal to 9.53 and 15.11, based on the specific enzymatic activity. The matrix used showed repeatability in the fixed bed process after three repetitions. Electrophoresis analysis in denaturing SDS-PAGE gel indicated high purity of lysozyme, since there is no appearance of other protein bands in the eluted solution. These results show the potential of the material produced, since in just one chromatographic step used, a purification factor fifteen times greater was obtained compared to the crude extract used.

Keywords: Cryogel, adsorption, ion exchange, glutamate, purification.

Advisor: Rafael da Costa Ilhéu Fontan
Coadvisor: Renata Cristina Ferreira Bonomo

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Cromatografia.....	19
2.2 Criogéis Poliméricos Monolíticos	20
2.3 Modificação na superfície das matrizes cromatográficas.....	23
2.4 Ácido glutâmico	24
2.5 Caracterização dos Criogéis	25
2.5.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	25
2.5.2 Análise termogravimétrica	26
2.5.3 Difração de Raios-X	27
2.5.4 Características hidrodinâmicas de colunas cromatográficas.....	27
2.6 Proteínas	28
2.6.1 Lisozima	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Reagentes.....	33
4.2 Síntese dos Criogéis Monolíticos	33
4.3 Funcionalização dos criogéis para troca iônica	33
4.4 Caracterização dos Criogéis	34
4.4.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão	34
4.4.2 Porosidade dos Criogéis.....	35
4.4.3 Permeabilidade ao Escoamento.....	35

4.4.4 Distribuição dos tempos de residência (DTR) e Coeficiente de Dispersão Axial (Dax) aparente.....	36
4.4.5 Altura dos pratos equivalentes (HETP).....	37
4.4.6 Análise de ponto de carga zero (PCZ)	37
4.4.7 Capacidade de troca iônica (CTI)	37
4.4.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.4.9 Análises termogravimétricas (TGA)	38
4.4.10 Difração de raios-x (DRX)	39
4.5 Ensaio adsorptivos	39
4.6 Preparo do extrato bruto	39
4.7 Purificação da lisozima da clara do ovo em batelada.....	40
4.8 Purificação da Lisozima a partir da clara de ovo em leite monolítico	40
4.9 Atividade enzimática	42
4.10 Atividade Específica e Fator de Rendimento	42
4.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1 Síntese dos criogéis	44
5.2 Caracterização hidrodinâmica do leite produzido	46
5.2.1 Permeabilidade ao escoamento	46
5.2.2 Distribuição dos tempos de residência e Coeficiente de dispersão axial aparente	48
5.3 Análise do ponto de carga zero	51
5.4 Determinação dos grupos funcionais pela técnica de FTIR	52
5.5 Análises térmicas.....	54
5.6 Avaliação estrutural dos criogéis por DRX.....	55
5.7 Ensaio adsorptivo de Lisozima Padrão	56
5.8 Purificação da lisozima da clara do ovo em processo em batelada.....	57
5.9 Purificação da lisozima em processo em coluna	58
5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	61

6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

Técnicas de separação de biomoléculas são frequentemente utilizadas em algumas áreas de pesquisa, indústrias de alimentos e farmacêutica, para que se obtenha compostos com alto grau de pureza. Dentre essas técnicas pode-se destacar às cromatográficas, por sua capacidade de auxiliar na identificação de componentes através de uma comparação com padrões já pré-estabelecidos, e também na purificação desses compostos. Assim, a cromatografia se destaca por suas vantagens em relação a outros métodos, principalmente o curto tempo de preparo das amostras e as variadas formas de detecção. Diferentes princípios de ação também são comumente usados nas técnicas cromatográficas como a interação hidrofóbica, de afinidade e iônica (VECHIA et al., 2016; CORRÊA et al., 2016; GOMES et al., 2020).

A troca iônica é um princípio cromatográfico muito utilizado na separação e purificação de moléculas. A técnica se baseia nas cargas presentes na fase estacionária e na estrutura química do componente de interesse, inserido na fase móvel, como é o caso das proteínas, que possuem cargas negativas e/ou positivas a depender do pH da solução que estão presentes. Assim as ligações iônicas são utilizadas como mecanismos de interação para processos adsorptivos, que consistem na apreensão de moléculas. A adsorção ocorre quando esses componentes são percoladas em uma fase estacionária, havendo a interação proteína-matriz. Posteriormente é realizado o processo de eluição, definido como o desprendimento das moléculas adsorvidas à matriz (BROOIJAMANS et al., 2021). Isso acontece pela utilização de soluções que sobreponham a força de interação da matriz com a molécula, havendo a recuperação desses componentes em uma solução chamada de eluido. Uma vantagem da troca iônica em relação a outros métodos como alguns hidrofóbicos, é a não necessidade de desnaturação proteica, mantendo o estado conformacional inalterada e assim sua atividade biológica. Geralmente o processo é realizado por alteração do pH e ou/ aumento da força iônica pela adição de sal, fazendo com que grupos hidrofóbicos da proteína sejam expostos. Dessa maneira, matrizes modificadas têm sido utilizadas nos segmentos de extração de proteínas (TOHAMY et al., 2018).

No contexto da separação cromatográfica de biomoléculas, as colunas macroporosas interconectadas vem a cada vez mais ganhando espaço, devido aos seus bons resultados de recuperação. Estruturas monolíticas poliméricas macroporosas sintetizadas em temperaturas abaixo de zero, chamadas criogéis, são particularmente interessantes para a aplicação em processos de purificação. No processo de obtenção dos criogéis, há a polimerização do material com formação de gelo nos espaços vazios. Após o descongelamento os cristais de gelo dão lugar à estrutura porosa dos criogéis, obtendo um material flexível, durável, com boa

estabilidade química e um curto caminho para difusão das moléculas, além de ser um material mais barato quando comparado às colunas cromatográficas convencionais (GONÇALVES et al., 2017; FONTAN et al., 2018; OZTURK et al., 2020).

Criogéis macroporosos apresentam baixa resistência ao escoamento, permitindo o uso de soluções moderadamente viscosas como alimentação, com baixa interferência na eficiência da purificação de componentes de interesse. Por esta característica, verifica-se um aumento na utilização desses materiais para purificar moléculas com diferentes características (SHOW et al., 2020; LIU et al., 2020; SUN et al., 2020).

Com a disseminação da tecnologia de separação cromatográfica, se vê cada vez mais a elaboração de criogéis com diferentes mecanismos de interação para purificação de moléculas (ANDAÇ et al., 2016; VERÍSSIMO et al., 2017; NEVES et al., 2020; BAYRAMOGLU & ARICA, 2021), assim pesquisadores se empenham na criação de novas matrizes. A utilização de um novo criogel é de grande importância para investigação dos mecanismos de interação entre a matriz e a molécula de interesse. As inovações podem ser nos monômeros utilizados na formação do gel, a concentração destes, a temperatura de polimerização e principalmente a imobilização de ligantes. Esse último irá caracterizar o criogel enquanto seu mecanismo de interação. Visto isso, o glutamato, um aminoácido polar não carregado, será imobilizado a matriz polimérica, caracterizando como um trocador catiônico para purificação da lisozima comercial e obtida da clara do ovo, trazendo inovação a imobilização de ligantes em criogéis poliméricos monolíticos.

Tão importante quanto a purificação utilizando criogéis é o entendimento das características estruturais do material e como elas podem influenciar em um processo adsorptivo. Normalmente são realizados estudos sobre porosidade, capacidade de inchamento e grau de expansão (CARVALHO et al., 2013; ZHAN et al., 2013). A avaliação do processo dinâmico de escoamento no criogel também é de suma importância, pois tem relação com a interação das proteínas com os sítios de ligação do (FONTAN et al., 2018).

É visto uma grande utilização de criogéis a base de acrilamida para separação e purificação de proteínas com atividade, a ser, às enzimas, devido a sua importância tecnológica (MOL et al., 2017; SUN et al., 2020; ERZENGIN et., 2021; NASCIMENTO, 2021). A lisozima é uma enzima reconhecida na área de alimentos, engenharia química e farmacêutica devido às características, como a capacidade de causar lise bacteriana, a partir da hidrólise de ligações glicosídicas. Devido à sua propriedade antibacteriana já comprovada, a lisozima é frequentemente utilizada na conservação de alimentos e na elaboração de filmes de embalagens para carnes (SANTOS, 2013; CARRILLO, 2013; VALENCIA et al. 2018). Aplicações na

elaboração de medicamentos anticancerígenos (UYGUN et al., 2009), tratamento de tumores (YE et al., 2008), e até úlceras (GHOSH et al., 2000) já foram realizados a partir da lisozima.

Bem reconhecida por suas propriedades a lisozima é permitida na indústria de alimentos, por ser considerada segura pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos da *Food and Drug Administration* (FDA, 1998). A utilização como aditivo alimentar deve seguir padrões de pureza estabelecidos pelo Regulamento da Comissão Europeia (EC Regulation No. 231/2012, Commission Regulation, 2012). Nesse contexto, surge a necessidade de se obter lisozima em grandes quantidades e com alto nível de pureza (GUIOCHAN, 2002; ROJAS et al., 2003; NOGUEIRA, 2016).

Diante do exposto, esse trabalho objetivou a produção de um adsorvente polimérico monolítico pela técnica da criogeificação, funcionalizado com glutamato monossódico como um trocador catiônico, para purificação parcial da lisozima da clara do ovo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cromatografia

As técnicas cromatográficas consistem na junção de dois pontos que sustentam sua utilização, uma fase móvel e uma fase estacionária. A fase móvel contém a mistura de todos os componentes que serão separados, ou seja, é a fase que irá guardar as moléculas de interesse. Esta fase deve ser fluida para que não ocorra problemas de difusão na coluna. Já a fase estacionária, é formada por uma matriz que irá interagir com componentes que estão na fase móvel. É chamado de alimentação, o movimento da fase móvel pela fase estacionária, que resulta na captura das moléculas, ou seja, é o processo na qual os componentes da fase móvel são adsorvidos à coluna. A capacidade de adsorção, pode depender ainda de mudanças realizadas gradualmente na fase móvel, mediante a utilização de eluição com diferentes solventes, chamada de eluição em gradiente. (ZUÑIGA et al., 2003; MALDANER et al., 2010; SILVA & COLLINS, 2011).

Uma das diferenças entre as técnicas cromatográficas utilizadas tem relação ao método de interação entre a fase móvel e a estacionária. As cromatografias adsorptivas que mais se destacam são: cromatográfica de afinidade, que se baseia na interação específica com determinado grupo químico presente na molécula; cromatografia de interação hidrofóbica, se dá pela união da matriz a molécula por grupos apolares; e a cromatográfica de troca iônica, que se baseia na interação pelas diferentes cargas existentes (PESSOA JR & KILIKIAN, 2005; CASSIMIRO, 2018; NASCIMENTO, 2021).

Na cromatografia de troca iônica, o mecanismo de adsorção está relacionado a diferença de cargas entre a matriz e a molécula de interesse, ou seja, a técnica se baseia em uma competição dos íons de interesse pelos grupos que estão carregados na fase estacionária, se tornando um método viável na extração e purificação de proteínas. Basicamente uma solução contendo proteínas carregadas (fase móvel) passará pela coluna ionizada e essas proteínas ficarão retidas por interações iônicas. Logo após, é percolada uma solução com pH alto ou baixo, ou até a utilização de sal para aumentar a força iônica do meio, que vai liberar primeiramente os componentes que estão ligadas fracamente e depois as fortemente ligadas, obtendo assim os componentes purificados (ZUÑIGA et al., 2003; CAVALCANTI, 2010).

Já foi descrito anteriormente que a interação das moléculas na fase móvel com a fase estacionária ocorre por interações iônicas, que são basicamente a interação entre as cargas negativas e positivas. Para a troca aniônica, a fase estacionária carregada positivamente atrai moléculas de cargas negativas, ao passo que na troca catiônica, cargas negativas em sua matriz atraem moléculas de cargas positivas. A escolha da técnica definirá o tipo de ligante a ser

utilizado, que em processos adsorptivos, é dito como o agente que trará a característica desejada a matriz e se ligará ao componente de interesse. Existem ainda os trocadores de caráter anfifílico, que podem se ligar tanto a cargas negativas quanto a positivas. Na Figura 1, é representado o mecanismo de funcionamento das trocas aniônicas e catiônicas (ABRÃO, 2014).

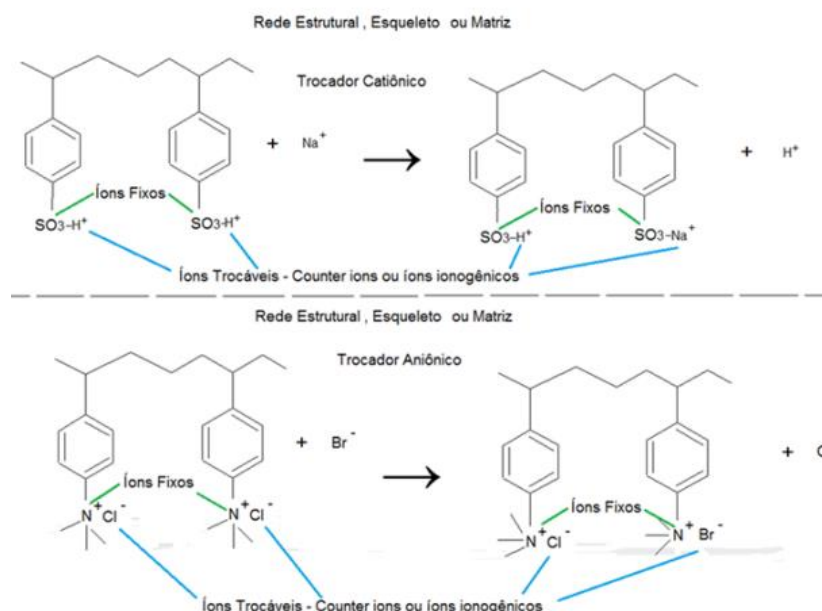


Figura 1. Mecanismo de adsorção por troca aniônica e catiônica
Fonte: ABRÃO, (2014).

2.2 Criogéis Poliméricos Monolíticos

Criogéis são definidos como géis poliméricos obtidos em temperaturas de congelamento, utilizando monômeros que são capazes de se polimerizar de maneira a formar estruturas amorfas e interconectadas, com capacidade de imobilizar componentes (PARIZZI, 2015).

Estruturalmente interconectados em poros com grandes dimensões, os criogéis são uma alternativa na área de separações. A estrutura do criogel oferece um fluxo por meio dos poros de forma convectiva e uma baixa resistência à transferência de massa, sendo favorável para processos cromatográficos. Os poros dos criogéis podem variar de 10-100 μm , o que facilita uma difusão desobstruída de solutos de tamanhos distintos (KUMAR et al., 2003; CARVALHO, 2010; FIDELIS, 2010).

Monômeros podem ser usados para produção desses criogéis desde que estes sejam precursores de formação de gel com ampla variedade de morfologia e porosidade. Uma das matrizes de maior destaque é o criogel de poli(acrilamida), obtido por meio da polimerização da acrilamida (Aam) com um agente capaz de formar ligações cruzadas, como o N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), que pode ser adicionado ou não de outros monômeros (alil-glicidil éter

AGE), sob temperatura de congelamento variando de -10 a -20 °C (CARVALHO et al., 2014; MÓL et al., 2017).

Cada monômero utilizado na copolimerização dos monólitos tem suas funções específicas na formação do criogel. Por exemplo, na formação de criogéis de poliacrilamida, a acrilamida (Aam) é responsável pela linearidade da cadeia. A bis-acrilamida (BAam) promove a reticulação entre as cadeias de Aam, levando à formação de ligações cruzadas que darão sustentação ao gel. Por fim, monômeros adicionais podem ser usados, como o alil-glicidil éter (AGE), que aumenta a resistência estrutural e dispõe de grupos epóxi reativos na superfície da matriz. E além disso, existem dois agentes que fornecem radicais livres que são necessários para dar início e acelerar a reação de polimerização, sendo estes o persulfato de amônio (APS) e o N,N,N,N-tetrametiletenodiamino (TEMED) (GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al, 2022). A reação de copolimerização pode ser observada na Figura 2.

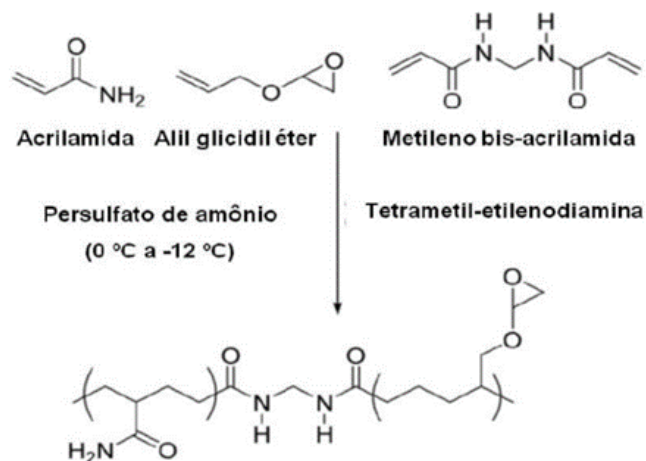


Figura 2. Copolimerização dos monômeros acrilamida, N,N-metileno-bis-acrilamida e alil glicidil éter.

Fonte: Adaptado de MALLIK et al., (2006).

Durante o processo de criogeificação são formados os primeiros cristais de gelo com formato irregular, de maneira que os monômeros e precursores quando se dissolvem tendem a se aglomerar nos pequenos espaços entre os cristais. Então de maneira lenta, há o surgimento de poros, tendo o gelo como seu agente formador. Quando a polimerização está completa, a estrutura é descongelada e o gelo dará lugar aos poros que não são uniformes, mas interconectados, por onde a fase móvel irá passar (ERTURK & MATTIASSON, 2014; MARCUZ, 2019). O esquema apresentado na Figura 3, representa a criogeificação dos polímeros.

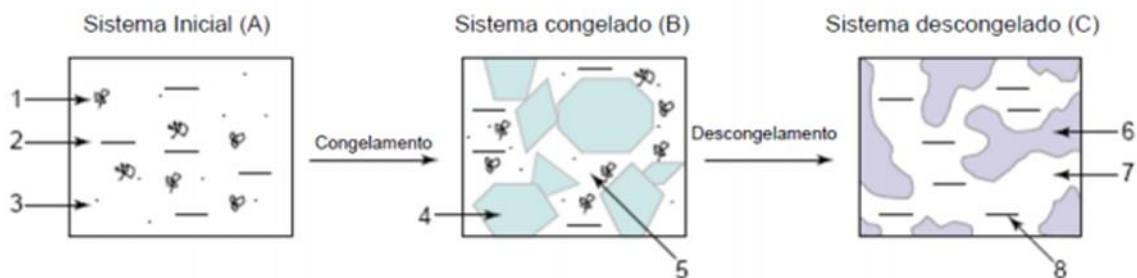


Figura 3. Esquema da produção dos criogéis, (1) precursor com alta massa molecular, (2) solvente, (3) precursor com baixa massa molecular ou substâncias solúveis, (4) cristais do solvente já congelado, (5) microfase líquida não congelada, (6) rede polimérica do criogel, (7) macroporos e (8) solvente descongelado.

Fonte: Adaptado de LOZINSKY et al., (2003).

A temperatura do processo de formação do criogel é de extrema importância para sua estrutura, pois influencia na forma e tamanho dos poros (PLIEVA et al., 2008). Em trabalhos realizados por Lozinsky (1986), foram sintetizados criogéis nas temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, e verificou-se que temperaturas mais elevadas formaram maiores poros (Figura 4). Esse fenômeno tem relação com às maiores temperaturas utilizadas, assim o congelamento ocorre de forma mais lenta, com crescimento de maiores cristais de gelo.

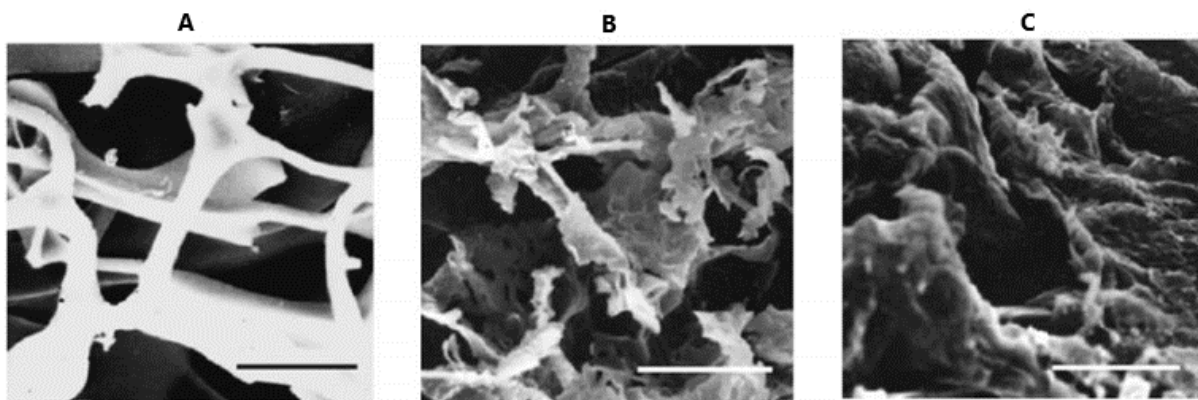


Figura 4. Imagens da microscopia eletrônica dos criogéis de poli(acrilamida) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) e $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (c).

Fonte: LOZINSKY, (1986).

Em um outro estudo feito por Plieva et al. (2007), foi também avaliada a diferença na estrutura em relação a temperatura do processo. Na Figura 5 é possível observar que o gel obtido a temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) é compacta com poros menores, ao passo que o criogel formado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) apresenta poros grandes e conectados entre si. O que reafirma novamente a importância da criogeificação na síntese desses materiais.

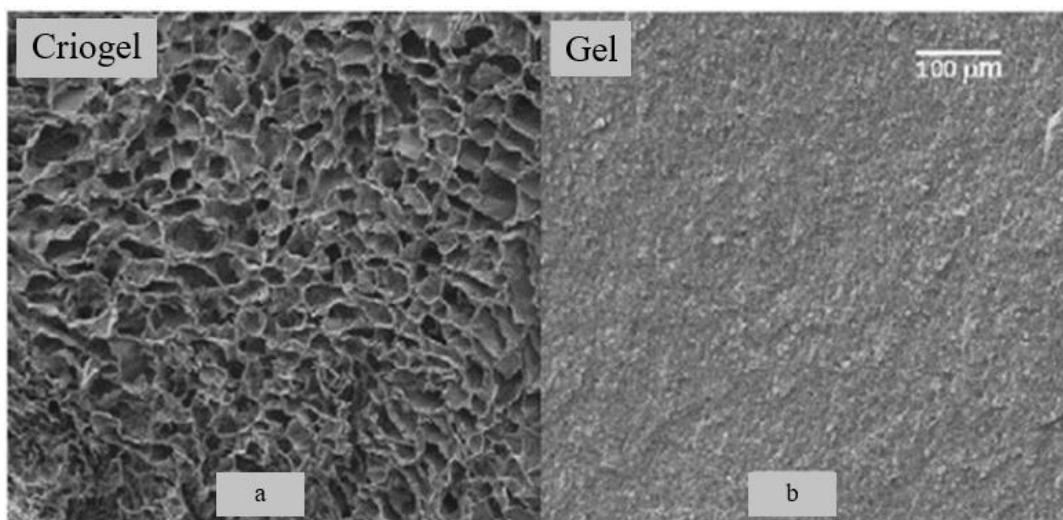


Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de varredura: (a) criogel produzido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) gel produzido a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Fonte: PLIEVA et al., (2007).

2.3 Modificação na superfície das matrizes cromatográficas

Existe uma gama de matrizes monolíticas que estão disponíveis para purificação das mais distintas moléculas. Com intuito de aperfeiçoar a utilização dos criogéis para imobilização de componentes, algumas metodologias de funcionalização são utilizadas. A técnica é realizada por meio da circulação de soluções que contenham agentes reticulantes pela matriz polimérica em uma solução que contém os grupos ligantes (KIM & HAGE, 2005; ANDAÇ et al., 2016).

A modificação da matriz ocorre na sua superfície e é geralmente feita pela inserção de grupos que são considerados reativos com outras moléculas, como os grupos amina (NH_2), tiol (SH), carboxila (COOH) e hidroxila (OH). Cada método de funcionalização tem diferentes mecanismos químicos para atingir uma grande quantidade de ligações entre as moléculas alvo (SANTOS, 2016). Um dos monômeros utilizados é o alil-glicidil-eter (AGE), que contém grupos epóxi que serve de ancora para ligantes que darão a característica principal ao criogel, sendo de troca iônica, afinidade ou interação hidrofóbica (ARRUA et al., 2009).

A etapa de funcionalização dos criogéis é utilizada para trazer características específicas de interação para com dadas moléculas, além da utilização de agentes que melhoram a eficiência da coluna. Dessa forma, é realizado a utilização de braços espaçadores, que também auxiliam na redução do impedimento estérico. Porém, em contrapartida, esses braços podem acarretar em interações não específicas de várias proteínas com a matriz (ANDAÇ et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017).

Na Figura 6 é possível observar o esquema do Método do Glutaraldeído que tem seu princípio baseado na interação de grupamentos amina. O monólito que contém grupos epóxi reativos (oriundo do AGE) é primeiramente convertidos para uma forma aminada, através de

uma reação dos grupos epóxi com reagentes que contenham grupos amina, tais como, hexanodiamina (LUO et al., 2002) ou etilenodiamina (PETRO et al., 1996). Então o monólito aminado que estão ativados podem reagir com o glutaraldeído, de maneira a formar um monólito aldeído-ativado se tornando capaz de interagir com grupos aminas de outras moléculas, (MALLIK & HAGE, 2006). Finalmente um radical aldeído do glutaraldeído fica disponível para a reação com um composto funcional de interesse, desde que tenha em sua estrutura um radical amina livre para uma nova reação.

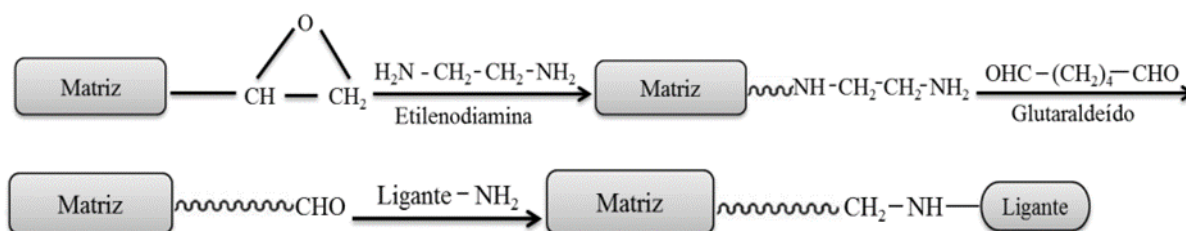


Figura 6. Método do Glutaraldeído.

Fonte: GONÇALVES et al., (2017).

Esse método tem sido utilizado na imobilização de proteína A, tripsina, concavalina A entre outras. Com um bom espaçamento ente os grupos ligantes e a superfície da matriz, o método é útil para evitar o problema do impedimento estérico (PARIZZI, 2015). De maneira geral o Método do Glutaraldeído tem resultados mais satisfatórios do que outros métodos de funcionalização (DA SILVA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2022).

2.4 Ácido glutâmico

Popularmente conhecido como ácido glutâmico ($C_5H_9NO_4$), visto na Figura 7, o ácido 2-aminoglutárico é um aminoácido, contendo grupo amina (NH_2) e uma carboxila ($COOH$) ligada ao carbono principal, além disso possui outra carboxila no grupo R, e tem uma massa molar de $147,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. É um aminoácido não essencial e polar não-carregado. Esse ácido desempenha funções importantes no organismo, sendo essencial na glicólise e gliconeogênese, pois sofre desaminação, se tornando o α -cetoglutarato. Outra função importante é a de neurotransmissor, essencial no desempenho das funções cognitivas, relacionadas à aprendizagem e até memória (NELSON & COX, 2014).

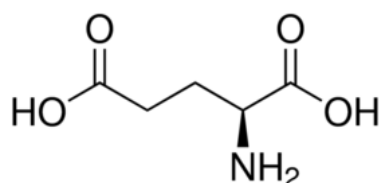


Figura 7 . Ácido 2-aminoglutárico.

Fonte: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/content/dam/sigmaaldrich/structure3/054/mfcd00002634.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00002634-medium.png.

O glutamato vem ganhando espaço em algumas pesquisas, como nas áreas de reconhecimento de componentes. Já foi utilizado como sensor eletroquímico para detecção de trifosfato de adenosina (ATP), sendo um sensor extremamente sensível (MENG et al., 2021). Outra aplicação muito interessante foi sua modificação com dopamina, para inserção de grupos catecol ($C_6H_6O_2$) com características auto curativas (KIM et al., 2021).

A estrutura de um aminoácido dá informações acerca de como o pH pode afetá-la, o que tem relação direta à sua forma de interação, assim o glutamato pode ser utilizado como um trocador iônico, em decorrência da presença de funções orgânicas protonadas e/ou desprotonadas. O pK_R de um aminoácido define a protonação do grupo carboxila presente na cadeia R, no caso do glutamato, quando esse valor se encontra acima de 4,25 (COO^-) está apto para troca catiônica (NELSON & COX, 2014). Com isso, já existem trabalhos utilizando-o como ligante, como é o caso dos discos de criogel com ácido glutâmico para remoção de dióxido de urânio (UO_2^{2+}) de soluções aquosas (BERELI et al., 2012).

2.5 Caracterização dos Criogéis

Técnicas são utilizadas para caracterização estrutural de polímeros, a fim de se ter um conhecimento sobre a dinâmica da adsorção. No caso do criogel, esse tipo de análise ganha mais importância, devido à grande quantidade de interações entre a matriz monolítica e as moléculas de interesse. A partir disso, é possível verificar o comportamento dessas interações, e assim aumentar e padronizar a escala do processo de purificação de biocompostos, por meio da Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de *Fourier*, termogravimetria, difração de raios-x e avaliação hidrodinâmica do leito produzido (FONTAN et al., 2018).

2.5.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

A espectrometria no infravermelho com transformada em *Fourier* (FTIR) é uma técnica que analisa as vibrações características de cada grupo funcional, o que provoca o surgimento de bandas no espectro de luz infravermelha em comprimentos específicos de onda, que podem também sofrer influência pela presença de grupos funcionais próximos. A técnica de FTIR é considerada uma análise quantitativa, pois as intensidades de absorção das bandas no espectro devem ser proporcionais às suas concentrações. Logo a análise FTIR gera várias informações que não são apenas valores de posição ou de absorção de picos, podendo representar uma espécie de impressão digital de uma certa amostra quando está integralmente utilizada (SILVÉRIO et al., 2009; RUSCHEL et al., 2014).

As aplicações desta técnica variam desde pequenas moléculas até sistemas mais complexos, como as matrizes monolíticas poliméricas. Assim como as demais espectrometrias, na técnica de FTIR ocorre a interação da radiação com a matéria, que leva a um acoplamento do campo elétrico oscilante da vibração molecular e incidente. Na Figura 8 é possível verificar que o infravermelho ocorre na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Para que uma molécula possa apresentar absorção no infravermelho, às suas vibrações precisam resultar em uma alteração de momento dipolar. Essas vibrações são definidas como deformações axiais e angulares (FORATO et al., 2010).

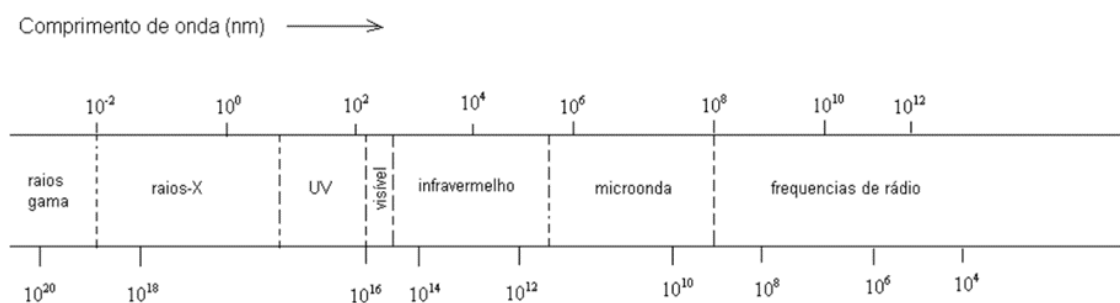


Figura 8. Representação esquemática do espectro eletromagnético.
Fonte: FORATO et al., 2010.

A técnica de FTIR é utilizada para determinar diferentes grupos funcionais no criogel. A verificação feita é em relação a modificação realizada no mesmo, seja por enxertia, acoplamento de braços espaçadores e ligantes (GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019). Segundo Samistrato et al. (2009), a espectroscopia se destaca por ser uma análise não destrutiva e não invasiva, além da rapidez, baixo custo e fornecer informações precisas sobre ligações covalentes entre C-H, N-H, e O-H, que estão presentes na estrutura do criogel.

2.5.2 Análise termogravimétrica

O estudo da termogravimetria analisa as variações de massa de uma amostra, em decorrência da programação de temperatura utilizada no processo. Por meio das curvas obtidas, é possível estimar a presença ou não e até a temperatura de degradação de determinados componentes químicos presentes na estrutura dos materiais (DENARI & CAVALHEIRO, 2012). Existem alguns fatores que podem afetar as medidas termogravimétricas, que podem ser observados abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Principais fatores que afetam as medidas termogravimétricas

Fatores Instrumentais	Fatores da Amostra
Razão de aquecimento do forno	Quantidade de amostra
Velocidade de registro	Solubilidade dos gases envolvidos
Atmosfera de forno	Tamanho das partículas e calor de reação
Geometria do suporte de amostra	Empacotamento da amostra
Sensibilidade da balança	Natureza da amostra

A técnica permite realizar uma análise indireta das características estruturais e estabilidade térmica dos criogéis, em decorrência de eventos térmicos que podem ser observados. Sendo assim a compreensão da degradação ou perda de massa é importante para entender o comportamento e estrutura dos monólitos poliméricos (RAMOS et al., 2017; MÓL, et al., 2019; JAIN et al., 2020).

2.5.3 *Difração de Raios-X*

A difração de Raios-X é uma técnica para estudos em materiais cristalinos, pois permite uma boa precisão em seus resultados, sendo uma análise tanto quantitativa, como qualitativa (ANTONIO, 2010; HARLOW et al., 2020). A técnica se baseia na difração de Raios-X pela incidência da radiação em uma amostra e em uma detecção de fótons difradados, ou seja, ela analisa o movimento entre um feixe de raios-x e os elétrons dos componentes da matriz que estão relacionados ao espalhamento dos raios (GOBBO, 2009).

Como os criogéis são matrizes em sua maioria, amorfa, a difração permite estimar essa estrutura, por duas frações, a parcela cristalina (regiões ordenadas) e a não cristalina (região desordenada) (CUNHA, 2008; CAROLINO, 2017).

2.5.4 *Características hidrodinâmicas de colunas cromatográficas*

Os criogéis são materiais porosos vantajosos para o mecanismo de transporte convectivo de massa, em decorrência à baixa resistência a difusão. Essas matérias, podem suportar maiores vazões e menores variações de queda de pressão, e com isso é possível a separação de purificação de biomoléculas, sem a necessidade de clarificação prévia (SAYLAN & DENIZLI, 2019; COIMBRA et al., 2021). Dessa forma, a avaliação do processo dinâmico de escoamento em materiais porosos, são uteis para entendimento da influência do material e sua estrutura no processo (CARVALHO et al., 2013; ZHAN et al., 2013; FONTAN et al., 2018).

Os parâmetros hidrodinâmicos avaliados são: Permeabilidade ao Escoamento, que dá uma ideia acerca da resistência ao fluxo, por meio da permeabilidade hidráulica da água em função da queda de pressão hidrostática, assim faz-se necessário a medição pela determinação da constante de permeabilidade ao escoamento com base na lei de Darcy (ARVIDSSON et al., 2003; YAO et al., 2007; CHEN et al., 2008); a Distribuição dos Tempos de Residência, que é a resultante obtida pelo fluxo laminar, definido como o tempo que leva um fluido injetado simultaneamente para atravessar completamente e sair de uma coluna (PANARIELLO et al., 2018; REIS et al., 2019); Dispersão Axial Aparente, que é descrita como um espalhamento e/ou

distribuição do fluido em escoamento de uma forma livre, na qual, altos coeficientes indicam rápida destruição e baixos mostram distribuições mais lentas (YANG et al., 2018; BARBOSA, 2019); e Altura Equivalente de Pratos Teóricos, o parâmetro corresponde a cada estágio na coluna, e a partir disso, é possível ter um entendimento a respeito da eficiência da mesma, uma vez que cada estágio corresponde a uma dada região da coluna, onde há o equilíbrio entre a concentração do soluto na fase estacionária e na fase móvel, dessa forma menores valores para HETP indicam uma maior eficiência (CASSIMIRO, 2018; ROBERTS & CARTA, 2020).

2.6 Proteínas

Proteínas são macromoléculas presentes em todos os organismos vivos. Elas são constituídas por uma combinação de aminoácidos diferentes unidos por ligações peptídicas. Basicamente a estrutura de um aminoácido é composta de um ácido carboxílico (COOH), uma amina (NH₂) e um grupo R, todos ligados individualmente a um carbono principal covalentemente. A diferença entre os aminoácidos será este grupo R (polares, apolares, carregados positivamente e carregados negativamente) (SERAVALLI et al., 2004).

Essas moléculas possuem várias interações que às sustentam em sua estrutura, porém esta pode ser rompida, o que leva a uma perda da sua função biológica, isso é denominado como desnaturação proteica. É uma modificação de estrutura tridimensional que pode ser de maneira reversível ou irreversível. Alguns fatores que causam a desnaturação proteica é a variação do pH, temperaturas extremas, solventes orgânicos, utilização de detergentes, pressão, agitação, sal entre outros. Em um trabalho realizado por Rodrigues (2010), foi visto a desnaturação de um monômero da Transtirretina (Figura 9) ao logo de 10 nanosegundos. É possível observar mudanças na estrutura com o decorrer do tempo. Contudo nem todas as desnaturações são indesejáveis, como é o caso da elaboração de queijos, na qual, há a necessidade da desnaturação da caseína (BOSCHI, 2006; GRÉGORIO, 2012).

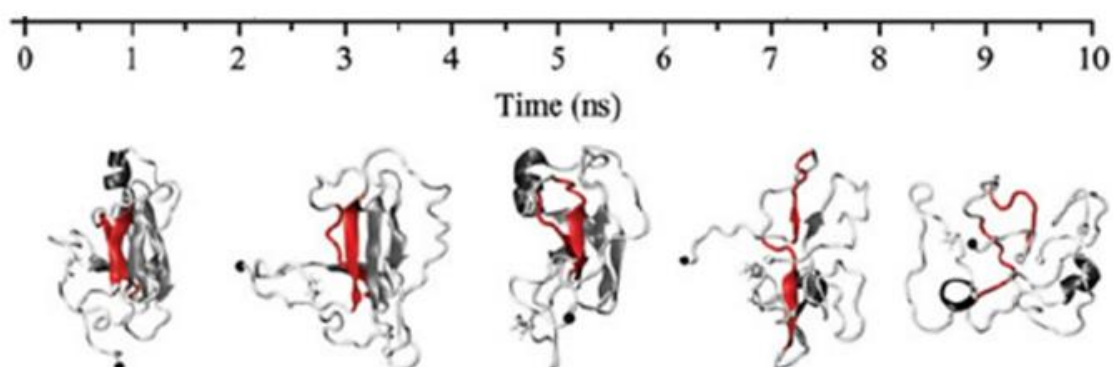


Figura 9. Representação de desnaturação proteica.
Fonte: RODRIGUES, (2010).

O pH do meio reacional em que uma proteína está presente é um dos parâmetros de grande importância para a sua funcionalidade, isso ocorre pois existem muitas cargas positivas e negativas ao longo da estrutura proteica que vão ser modificados pelo pH. O ponto isoelétrico é um valor de pH no qual, existem as mesmas quantidades de cargas positivas e negativas na proteína, ou seja, elas se anulam. Acima do seu ponto isoelétrico a proteína terá mais cargas negativas, com predominância de aminoácidos ácidos. Já em valores abaixo do ponto isoelétrico existem mais aminoácidos básicos e sua carga será positiva. Um fator importante do ponto isoelétrico, é que as proteínas se tornam insolúveis nesse ponto, logo, modificações no pH e assim na estrutura dessas moléculas são mecanismos utilizados para extração de proteínas (SERAVALLI et al., 2004; NELSON & COX, 2014).

2.5.1 Lisozima

A lisozima, muramidase ou N-acetilmurâmico hidrolase (EC. 3.2.1.17) é uma enzima com massa molecular de 14.400 Daltons com ponto isoelétrico igual a 11, geralmente encontrada em secreção nasal, lágrimas, saliva, leucócitos, clara de ovo entre outros. Sua composição é de 129 aminoácidos reticulados em quatro pontes dissulfeto (Figura 10) (LIMA, 2006). É uma enzima globular com atividade antimicrobiana, atuando na hidrólise das ligações glicosídicas β (1-4) entre N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-murâmico de oligossacarídeos presentes nas paredes celulares de bactérias, tendo mais efetividade nas gram-positivas, pois o acesso da lisozima a parede peptidoglicana das bactérias gram-negativas é impedido pela membrana lipopolissacarídica (FENNEMA, 2010; MELCHIORS, 2017).

A propriedade antimicrobiana da lisozima à torna uma enzima interessante a trabalhada. Com isso, já há aplicações na área farmacêutica, no auxílio no diagnóstico de doenças entre outros. A lisozima é bastante utilizada na indústria de alimentos de modo a preservar os alimentos do crescimento e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, especialmente em alimentos como carnes e produtos lácteos (ÁVILA et al., 2014). Mecitoglu et al. (2006) e Barbiroli et al. (2012) incorporaram a lisozima em filmes para revestimentos em alimentos, com intuito bactericida, e seus resultados foram positivos contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lysodeikticus* e *Lactobacillus plantarum*.

A lisozima possui alto ponto isoelétrico, em decorrência da presença de certos aminoácidos a sua estrutura, que é o caso de 6 resíduos de lisina e 9 resíduos de arginina, dando-lhe um caráter básico. Assim, ela tem uma boa vantagem em processos cromatográficos em relação à sua utilização dentro de uma ampla faixa de pH, com isso ela é tratada como uma espécie de proteína modelo para avaliar procedimentos de purificação e estudos termodinâmicos. Por ter um caráter básico a lisozima pode ser utilizada em pesquisas relacionadas a adsorção por trocadores catiônicos (VERÍSSIMO et al., 2017; GUAN et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O trabalho teve como principal objetivo produzir um novo adsorvente monolítico macroporoso de troca catiônica para a purificação da lisozima da clara do ovo.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir um monólito macroporoso pela técnica de criogeleificação e funcionalizá-lo como um trocador catiônico, sendo o glutamato monossódico o grupo ativo do mesmo;
- Caracterizar os materiais monolíticos produzidos;
- Verificar o potencial do adsorvente produzido na purificação de lisozima da clara de ovo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho possuíam no mínimo grau analítico PA-ACS e foram adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. Foram utilizados Acrilamida (Aam), bis-acrilamida (BAam), N,N,N',N'- tetrametilenodiamino (TEMED), persulfato de amônio (APS), alil-glicidil-eter (AGE) e Glutamato monossódico. A proteína utilizada como modelo para adsorção foi a lisozima (EC. 235-747-3, 70000 U.mg⁻¹, CAS: 12650-88-3) da clara do ovo. Os demais reagentes utilizados são descritos ao longo das metodologias.

4.2 Síntese dos Criogéis Monolíticos

A metodologia utilizada para síntese dos criogéis foi adaptada de Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Utilizou-se uma solução de 100 mL contendo 7% de monômeros de Aam (4,4 g), BAam (1,2 g), AGE (1,4 g), APS (140 µ.L⁻¹ na concentração de 0,5 g.mL⁻¹) e TEMED (91 µ.L⁻¹). A solução preparada foi vertida em seringas plásticas de 10 mL, seladas e levadas a um banho ultratermostático microprocessado com circulador (QUIMIS Q214M2, Diadema, BR) a -12 °C por 24h. Após isso, as seringas foram abertas e levadas para estufa BOD (SP500 LABOR, Cótia, BR) a 4 °C por 4 h para descongelamento da água presentes nos poros. Posteriormente, as seringas foram deixadas em estufa (Tecnal, modelo TE - 393/1, Piracicaba, BR) a 60±1°C por um período de 7 dias. Depois de completamente secos, os criogéis tiveram suas extremidades cortadas com auxílio de uma lâmina para retirada de partes defeituosas.

Foi realizada uma etapa de lavagem dos criogéis para remoção de monômeros não polimerizados. Para isso, cada criogel foi colocado em um tubo Falcon (50 mL) com 40 mL de água destilada e deixados em contato com o criogel por 30 min, sob agitação suave a 20 rpm. O processo foi realizado 10 vezes, totalizando um volume final de 400 mL. Os criogéis foram novamente levados a estufa (60±1) °C para secagem por 7 dias. Em seguida foram armazenados em dessecador contendo sílica até o momento da funcionalização.

4.3 Funcionalização dos criogéis para troca iônica

O processo de funcionalização dos criogéis seguiu a metodologia descrita por Gonçalves et al. (2017) e Nascimento (2021), com adaptações. Foi preparada uma solução-tampão de fosfato de sódio (TFS) 0,05 mol.L⁻¹ em pH 6, para dissolução dos componentes utilizados na funcionalização. Para isso, utilizou-se seringas de 20 mL que eram então seladas, em cada percolação de solução, mantendo-se a agitação orbital a 20 rpm. A cada etapa do processo os criogéis eram suavemente comprimidos para retirada do excesso da solução da última etapa.

Primeiramente os criogéis foram imersos em 20 mL de álcool metílico por 2 h para abertura do anel epóxi. Feito isso, realizou-se uma lavagem com água destilada por 1 h, sendo posteriormente utilizada a solução TFS por também 1 h. Em seguida, os criogéis foram imersos em 20 mL de solução etilenodiamina ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) em TFS e mantidos por 14 h a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Passado esse tempo realizou-se duas lavagens com água destilada, cada uma de 30 min, na qual, os criogéis eram deixados nas seringas em agitador orbital. Em seguida, 20 mL de solução TFS foi mantido em contato com o criogel por 1 h. Na sequência, 20 mL de solução de glutaraldeído 5% em TFS foi mantida em contato com criogel por 5 h em estufa BOD (Tecnal, modelo TE-184, Piracicaba, BR) a temperatura controlada de $12 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Para retirada do excesso da solução anterior realizou-se duas lavagens de 30 min com água destilada. Então os criogéis aldeído-ativados foram mantidos em 20 mL de solução de glutamato (10 mg.mL^{-1}) em TFS por 14 h a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Realizou-se uma lavagem de 1h com água destilada, sendo posteriormente passada uma solução de borohidreto de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) em TFS por 1 h em temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), nessa etapa as seringas ficaram abertas, devido a formação de gás, e agitadas manualmente a cada 15 min. Por fim, duas lavagens de 30 min cada com água destilada foram realizadas para finalização do processo. Assim, os criogéis foram secos em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ se obtendo uma coluna adsorvente monolítica supermacroporosa de interação catiônica.

4.4 Caracterização dos Criogéis

4.4.1 Capacidade de inchamento e grau de expansão

A avaliação da capacidade de inchamento (S) dos criogéis foi determinada pela metodologia de Savina et al. (2005) por meio da Equação (1). Para isso, 8 criogéis controle e 8 funcionalizados foram deixados em recipientes com 50 mL de água destilada em temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, os criogéis foram levemente exprimidos para retirada do excesso de água e pesados em balança analítica.

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (1)$$

Sendo m_s (kg) a massa do criogel hidratado e m_d (kg) a massa do criogel seco.

O grau de expansão (ED) foi calculado seguindo a metodologia de Gonçalves et al. (2016). O cálculo auxilia na conversão entre a massa de criogel desidratado e seu volume hidratado durante o uso. Para isso 8 criogéis foram identificados e secos em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram então imersos em água destilada por 24 h. Posteriormente, os criogéis saturados foram

transferidos para proveta contendo um volume de água (v_1) e depois de imersos o novo volume obtido (v_2) foi anotado, sendo calculado o ED pela Equação 2:

$$ED = \frac{(v_2 - v_1)}{m_d} \quad (2)$$

Onde: v_1 é o volume inicial da proveta (mL) e v_2 é o volume lido na proveta após a colocação do criogel (mL) (MONTGOMERY, 2001). Os valores médios obtidos de S e ED foram analisados pelo teste t de Student a 5% de probabilidade

4.4.2 Porosidade dos Criogéis

O grau de porosidade dos criogéis foi determinado por meio da medida de água livre nos monolitos. Para isso 8 criogéis desidratados e com as massas conhecidas foram deixados em um dessecador contendo uma solução saturada de sulfato de potássio, para controle da umidade relativa em torno de 98 %, durante 7 dias. Ao final as massas foram novamente pesadas. Feito isso, os criogéis foram imersos em um recipiente com 70 mL de água destilada por 24 h, sendo registrada sua massa após o período. Estes foram espremidos e pesados novamente. A fração de macroporos (φ_M), com tamanho $\geq 1\mu\text{m}$, fração de meso e microporos (φ_m), com tamanho $< 1\mu\text{m}$, fração de água ligada (φ_{wb}), fração de polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogéis foram calculadas utilizando as Equações 3 a 7, respectivamente (PLIEVA et al., 2004a e 2004b).

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (3)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (4)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (5)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (6)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (7)$$

Onde: m_s é a massa do criogel hidratado (kg), m_d é a massa do criogel desidratado (kg), m_e é a massa do criogel espremido (kg) e m_{wb} é a massa do criogel com água de ligação (kg). Os valores de porosidade foram dos criogéis foram analisados pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

4.4.3 Permeabilidade ao Escoamento

Para o cálculo da permeabilidade ao escoamento foi utilizado da equação de Darcy (Equação 8), para um escoamento em meios porosos, onde o coeficiente angular da equação

ajustada no gráfico de vazão versus pressão hidrostática sobre a coluna determinará a permeabilidade.

$$Q = \frac{AK_p}{\eta L} \Delta P \quad (8)$$

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

4.4.4 Distribuição dos tempos de residência (DTR) e Coeficiente de Dispersão Axial Aparente (D_{ax})

A determinação das curvas de distribuição dos tempos de residência e o coeficiente de dispersão axial foi realizado empregando o método adaptado de Yao et al. (2006a e 2006b). Para tal, empregou-se a Equação (9), e além do tempo de retenção, foi calculado também as variâncias (σ^2) ou os segundos momentos estatísticos (M_2) de cada pulso, segundo FURUSAWA et al. (1976).

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (9)$$

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_1 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).

Após a determinação dos valores de t_R e σ^2 foi feita a determinação do coeficiente de dispersão axial para cada velocidade de escoamento e calculada por uma regressão não linear (Equação 10).

$$\frac{\sigma^2}{t_R^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{\mu L} \right)^2 - 2 \left(\frac{D_{ax}}{\mu L} \right)^2 \left[1 - \exp \left(- \frac{\mu L}{D_{ax}} \right) \right] \quad (10)$$

Sendo D_{ax} o coeficiente de dispersão axial aparente ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), L é a altura (m) do leito, u é a velocidade ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) intersticial da fase móvel ($u = U_{\epsilon T}$), 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 na forma normalizada de acordo com a Equação 11 (ZABKA et al., 2006).

$$DTR^* = E = \frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t) dt} = \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (11)$$

Na qual $DTR^* = E$ é a função de distribuição de tempo de residência normalizada (s^{-1}) e Abs é a absorvância registrada em função do tempo.

4.4.5 *Altura dos pratos equivalentes (HETP)*

Para o cálculo da HETP em função da velocidade de escoamento na fase móvel foi utilizado o coeficiente das curvas de DTR . Os valores foram determinados pela Equação (12) (FONTAN et al., 2018).

$$HETP = L \frac{M_2}{M_1^2} = L \frac{\sigma^2}{t_R^2} \quad (12)$$

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

4.4.6 *Análise de ponto de carga zero (PCZ)*

O pH do ponto de carga zero (pH_{pcz}) é definido como o pH em que um suporte possui carga neutra. A metodologia empregada para sua determinação é denominada “Experimento dos 11 Pontos” (MÓL et al., 2019). O procedimento consistiu em condicionar 50 mg de criogel controle e funcionalizado, em contato com 50 mL de soluções de cloreto de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de pH (1-11) sendo deixados sobre agitação orbital a 25 rpm durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de HCl ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) ou NaOH ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus o pH inicial. O pH do PCZ corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

4.4.7 *Capacidade de troca iônica (CTI)*

A metodologia para determinação da capacidade de troca iônica total foi adaptada de Fontan et al. (2018) pelo método titulométrico, sendo expressa em função da capacidade máxima de troca de cátions monovalentes.

Para isso, foram utilizados 7 tubos de centrifuga de 50 mL com 50 mg de criogel: 6 funcionalizados e 1 controle. Em cada tubo adicionou-se 45 mL de solução HCl (1 mol.L^{-1}) e mantidos por 12 h a temperatura ambiente em rotação orbital a 20 rpm. Posteriormente, a solução ácida foi retirada e realizada três lavagens com 45 mL de água, cada uma por 1 h em rotação orbital. Antes de cada lavagem os criogéis foram lavados com 90 mL de água. O objetivo do processo foi a retirada do excesso de íons H^+ presentes na solução. Em seguida, os tubos com criogéis foram deixados em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, posteriormente foram colocados em contato com 45 mL de solução NaCl ($2,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e deixados por 12 h em rotação orbital (20 rpm).

Retirou-se uma alíquota de 40 mL de cada tubo para titulação com uma solução de NaOH (0,01 mol.L⁻¹), previamente padronizada com uma solução de biftalato de potássio, sendo também utilizado um branco para a análise. Dessa maneira a capacidade de troca iônica é quantificada pelos íons H⁺ que representam o número de íons Na⁺ trocados com o criogel.

A Equação (13) relaciona a capacidade total iônica pela massa do criogel desidratado (Λ_m) expresso em mol.kg⁻¹. E a Equação (14) expressa a capacidade de troca iônica total por volume de criogel hidratado (Λ).

$$\Lambda_m = \frac{V_T}{m} \left[\left(\frac{M_{NaOH} \cdot f \cdot V_{NaOH}}{V} \right)_{Amostra} - \left(\frac{M_{NaOH} \cdot f \cdot V_{NaOH}}{V} \right)_{NaCl} \right] \quad (13)$$

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

$$\Lambda = \frac{\Lambda_m}{ED} \quad (14)$$

Onde: Λ_m é a capacidade iônica total por massa de criogel desidratado (mol.kg⁻¹) e ED é o grau de expansão (L.kg⁻¹).

4.4.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presentes no criogel foram avaliados pela espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* pela metodologia descrita por Da Silva et al. (2019). Criogéis secos foram transformadas em pó e acondicionadas em cristal ATR coberto com tampa e lidos em FTIR utilizando o equipamento (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado com detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) e célula de Reflectância Total Atenuada (ATR) pela técnica da reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500 cm⁻¹ em espectrômetro. O software para utilizado para obtenção dos espectros foi o Agilent MicroLab PC Software.

4.4.9 Análises termogravimétricas (TGA)

A perda de massa foi determinada pela análise termogravimétrica (TGA). Cerca de 10 mg de criogel triturado foi levada ao calorímetro (Marca Linseis, modelo STA PT1000, Selb, GER). As amostras foram submetidas a aquecimento de 20 a 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C. min⁻¹.

4.4.10 Difração de raios-x (DRX)

Para obtenção dos difratogramas, os criogéis controle e funcionalizado foram cortados e acondicionados em um difratômetro (D2 PHASER, Bruker, Leipzig, GER), equipados com Cu K α . Usando uma fonte de radiação monocromática de $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$, a uma tensão do gerador de 30 KV e uma corrente de 10 mA com varredura de 5 a 90 ° (2θ) em uma taxa de 4 °. min⁻¹.

4.5 Ensaios adsorptivos

Os ensaios adsorptivos foram realizados em pH 7,2 em triplicata. O processo se deu em batelada, em tubos Falcon de 15 mL, sendo adicionado cerca de 20 mg de criogel cortado e 4 mL da solução de lisozima pura (1 mg.mL⁻¹). Os criogéis imersos na solução enzimática foram levados à estufa BOD a temperatura de 25 °C, sob agitação orbital de 20 rpm por 12 h (*overnight*). Posteriormente os tubos foram centrifugados a 4677xg durante 5 min, sendo os sobrenadantes coletados para a quantificação da concentração de proteína por leitura da absorbância em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis, São Paulo, BR) a 595 nm, seguindo-se a metodologia descrita por Bradford (1976). Foi construída uma curva de calibração de 0,1 a 1 mg.mL⁻¹ de lisozima pura. A capacidade adsorptiva foi expressa pela Equação (15).

$$q = \frac{(c_o - c) \times V}{M} \quad (15)$$

Sendo, q se refere a quantidade de lisozima adsorvida no criogel (mg.mL⁻¹); c_o e c são as concentrações iniciais e finais da solução de lisozima (mg.mL⁻¹); V é o volume de solução enzimática (mL) utilizada no processo; e M é a massa de criogel seco (g).

4.6 Preparo do extrato bruto

Para o preparo do extrato enzimático da clara do ovo, seguiu-se a metodologia descrita por Fontan (2013), realizando-se um tratamento para retirada da ovomucina, proteína presente na clara, responsável pela consistência gelatinosa (OMANA et al., 2010).

O processo se deu da seguinte forma: realizou-se a separação manual da clara, sendo levada a uma peneira plástica, para separação da parte fina da clara da parte mais viscosa e da chalaza pela ação da gravidade. O processo foi realizado com quatro ovos, obtendo-se 100 mL de clara fina. Posteriormente, a clara já tratada foi diluída em um volume de 200 mL de água destilada, tendo seu pH ajustado para 6 utilizando uma solução de HCl (2,0 mol.L⁻¹). Logo após, a solução foi dividida em tubos de centrifuga de 50 mL e levados a estufa BOD a temperatura de 2 °C, por 12 h (*overnight*). Posteriormente os tubos foram levados à centrifuga (SP LABOR modelo Sp-701, Pircicaba, BR) sob refrigeração (4 °C) e com agitação de 4677 xg por 30 min,

então o sobrenadante (S1) foi separado do precipitado, obtendo cerca de 300 ml de solução. Para esse volume foi adicionado 6 mL de solução TFS em pH 7,2 (1 mol.L⁻¹).

A solução S1 teve seu pH ajustado para 7,2 utilizando uma solução de NaOH (0,02 mol.L⁻¹). Então realizou-se duas diluições: a primeira para os ensaios em batelada, utilizou-se 6 ml da solução S1 para um volume final de 150 ml de solução TFS (0,02 mol.L⁻¹) e pH 7,2; a segunda diluição, 1:5, foi utilizado 25 mL da solução S1 para um volume final de 150 mL da solução TFS (0,02 mol.L⁻¹) e pH 7,2. Ambas diluições foram novamente centrifugadas sob refrigeração a 4 °C, 4677 xg por 45 minutos, sendo os sobrenadantes coletados e armazenados sob refrigeração em recipiente limpo até a utilização. As soluções foram identificadas com ALO 1:5 (Alimentação Livre de Ovomucina) e 1:30 (Alimentação Livre de Ovomucina).

4.7 Purificação da lisozima da clara do ovo em batelada

O processo de purificação seguiu parte da metodologia já descrita no item 4.2 dos ensaios adsorptivos, utilizando-se uma curva de calibração com albumina de soro bovino, BSA (EC A7908, pureza \geq 98%, CAS: 232-936-2), para quantificação das proteínas totais. Nesse caso 4 mL da solução ALO 1:30 foram deixados em contato com aproximadamente 20 mg de criogel seco por 12 h (*overnight*) à temperatura ambiente, sob rotação orbital de 20 rpm. Após isso, o extrato que estava em contato com o criogel foi retirado e foram realizadas duas lavagens com 4 mL da solução tampão TFS (0,02 mol.L⁻¹) em pH 7,2 para retirada da lisozima não adsorvida na superfície do trocador produzido. Então foi preparada uma solução 1 mol.L⁻¹ de NaCl em TFS (pH 7,2 e 0,02 mol.L⁻¹) para eluição da lisozima. 2 mL dessa solução foram deixados em contato com o criogel por 4 h. Passado esse tempo, a fase líquida foi separada e realizou-se um processo de diálise das amostras para retirada do excesso de NaCl. Utilizou-se bolsas de diálise (D0530, Sigma) com aproximadamente 6 cm de comprimento, sendo cada amostra armazenadas em uma bolsa. Foram realizadas 5 lavagens de 200 mL de tampão TFS em pH 7,2, sendo trocada a cada 2 h.

Cada solução do processo de purificação recebeu uma identificação, sendo a solução antes do contato do criogel 'Extrato' e a solução dialisada após o processo da dessorção da lisozima 'Eluição'. Para cada solução foi feita a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), atividade enzimática (SHUGAR, 1952) e Eletroforese (SDS-PAGE).

4.8 Purificação da Lisozima a partir da clara de ovo em leito monolítico

O processo de purificação da solução de alimentação foi realizado em triplicata, utilizando-se um equipamento AKTA Pure 25 (Figura 12) (GE Life Sciences, Upsalla, SWE) com uma coluna. O monitoramento da fase móvel foi realizado utilizando-se um detector com

comprimento de onda fixo em 280 nm, com o sistema conectado a um computador e controlado por meio do *Software Unicorn 7.2*. A coluna foi montada com três peças de monolíticas de criogéis funcionalizados, totalizando um volume de leito de 18,47 mL. A vazão utilizada na alimentação foi de 1,5 mL.min⁻¹.



Figura 12. Cromatógrafo Akta Pure para purificação de proteínas.

Para a hidratação, lavagem e equilíbrio prévio da coluna, foi passada água destilada e tampão TFS (0,02 mol.L⁻¹) em pH 7,2 com 25 volumes de coluna cada. Então foram percolados quatro volumes de coluna de uma solução de HCl (0,1 mol.L⁻¹). Após isso foi realizada uma etapa para equilibrar a coluna com o tampão TFS (0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,2) com a passagem de quatro volumes dessa solução. Dessa forma, se deu início ao processo de alimentação, na qual, foram passados sete volumes de coluna, da solução de Extrato Livre de Ovomucina em uma diluição 1:5, até que foi verificada a formação e estabilização da curva de ruptura. Logo após, a coluna foi lavada com mais quatro volumes com o tampão TFS (0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,2), esse processo foi realizado para retirada dos componentes não adsorvidos pela coluna,. Para a etapa de eluição, utilizou-se uma solução de NaCl (1 mol.L⁻¹) preparada em TFS (0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,2), passando-se quatro volumes de coluna. Finalmente a coluna foi reequilibrada e lavada com quatro volumes do tampão TFS (0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,2) e água destilada com quatro volumes de coluna, respectivamente.

Os picos foram obtidos durante a etapa de eluição, sendo coletados no momento em que a leitura estava subindo e próxima de 6 mAU e finalizado a coleta quando houve a queda da leitura, até o mesmo valor. Então os picos coletados foram submetidos ao processo de dialise

para retirada do NaCl. Foi utilizado novamente bolsas de dialise, previamente ativadas (código D0530, Sigma), com aproximadamente 8 cm de comprimento. Foram realizadas 5 lavagens com 700 ml de tampão TFS e pH 7,2 (0,02 mol.L⁻¹) por um período de 12h.

4.9 Atividade enzimática

A atividade enzimática da lisozima das soluções ‘Extrato’ e ‘Eluido’ foram determinadas pelo método de Shugar (1952). Para isso foi utilizada uma suspensão 0,15 % m.v⁻¹ de *Micrococcus lysodeikticus* preparada em Solução Fosfato de Potássio (50 mmol.L⁻¹) em pH 6,24, ajustado com soluções de KOH ou HCl, ambas a 1 mol.L⁻¹. Foi preparada uma suspensão do micro-organismo, que foi lida diretamente em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração da suspensão foi ajustada com tampão de modo que a sua leitura inicial estivesse com valores de absorvância entre 0,6 e 0,7. A análise de atividade foi realizada para as duas soluções, na qual, 200 µL de amostra foram deixados em contato com 5 mL da suspensão de micrococcus por 5 min a temperatura ambiente (25 °C), sendo realizadas leituras a cada 30 segundos para obtenção da velocidade linear máxima ($\Delta A_{450}/\text{min}$). Foi realizada também análise do branco com tampão puro. A atividade enzimática (U.mL⁻¹) é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um decréscimo de 0,001 na densidade ótica por minuto, sendo calculada a partir da Equação (16). Os três ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{450}}{\text{min}}\right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{\Delta A_{450}}{\text{min}}\right)_{\text{branco}}}{0,001 \times 0,2} \times (df) \quad (16)$$

Onde ($\Delta A_{450}/\text{min}$)_{amostra} é a variação da absorvância no tempo no de 0 a 5 minutos para a amostra pelo total da análise, 5 minutos; ($\Delta A_{450}/\text{min}$)_{branco} é a variação da absorvância para o branco; 0,2 mL é o volume de amostra; e *df* é o fator de diluição.

4.10 Atividade Específica e Fator de Rendimento

Para verificação da eficiência do processo de purificação foi realizado o cálculo do fator de purificação, para isso, fez-se inicialmente o cálculo da atividade específica. O fator de purificação, compara a atividade específica da solução purificada e a atividade específica da solução bruta.

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{U}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Ativ.enzimática}}{\text{Conc.Proteína}} \quad (17)$$

$$\text{Fator de Purificação} = \frac{\text{Ativ.Específica}_{\text{Eluição}}}{\text{Ativ. Específica}_{\text{Extrato}}} \quad (18)$$

4.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de eletroforese em gel desnaturante foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970) com adaptações. Primeiramente foi produzido um gel de empilhamento na concentração de 5% (v.v⁻¹) e um gel de separação na concentração de 12% (v.v⁻¹).

As amostras obtidas dos processos de purificação em batelada e no leito monolítico, foram submetidas a eletroforese. Para a amostra padrão de lisozima, foi preparada uma solução de 1mg.mL⁻¹ e dessa solução utilizou-se 100 uL diluídos em 400 uL de solução desnaturante. A amostra identificada como extrato bruto foi preparada em uma diluição de 1:30, dessa forma 30 uL dessa solução foram diluídas em 570 uL de solução desnaturante. Para as amostras eluídas, do processo em batelada, utilizou-se 50 uL de amostra em 150 uL de solução desnaturante e para a amostra identificada com eluição da purificação em coluna foram utilizados 100 uL de amostra para 100 uL de solução desnaturante.

Todas as amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf e desnaturadas em água sob fervura à temperatura de 100 °C por 3 minutos. A corrida seguiu uma tensão constante de 100 V, e finalmente finalizado, o gel foi mantido em contato em solução fixadora por 2h. Feito isso, foi realizado a etapa de coloração do gel. Este foi deixado em contato com a solução corante por 24 h, logo após, foi realizado lavagens com água destilada. Finalmente o gel foi mantido em contato com a solução descorante, até obtenção de um gel transparente, sempre fazendo a troca da solução quando necessário.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese dos criogéis

Os criogéis obtidos são apresentados na Figura 13. De maneira geral, possuem caráter rígido e uniforme, com aproximadamente 500 mg e um comprimento de 4 cm. Quando hidratados conseguem absorver grandes quantidades de líquidos, e possuem maciez característica observada por outros autores para criogéis de poliacrilamida (DEMIRYAS et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2019). Tais características de hidratação tem relação com a grande presença de poros em sua estrutura, e com a natureza hidrofílica do material usado.

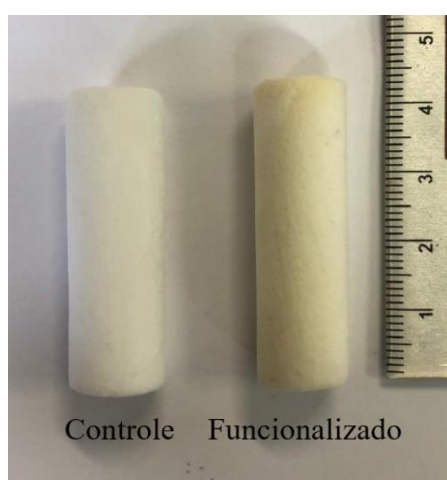


Figura 13. Imagem dos criogéis controle e funcionalizado.

A leve coloração amarelada do criogel funcionalizado tem relação com o processo de funcionalização, especialmente da incorporação do glutaraldeído em sua estrutura, quando foi observado a mudança de cor durante o processo.

Os valores para caracterização obtidos referentes a porosidades, fração de água, capacidade de inchamento e grau de expansão dos criogéis são apresentados na Tabela 2.

Verifica-se que a fração de macro, meso e microporos do criogel se manteve igual mesmo após o processo de funcionalização, indicando que não houve modificação na rede interconectada da matriz, não afetando os canais para o fluxo da fase móvel. Podendo ser confirmado na porcentagem da porosidade total, que não sofreu alteração e se manteve acima de 90%. Segundo Arvidsson et al. (2002) a alta porcentagem de macroporos no criogel indica benefícios aos processos de purificação de moléculas, no tocando a difusão dos componentes pela matriz, o que é favorável ao presente trabalho, pois oferece um fluxo contínuo e desobstruído.

Tabela 2. Resultados da caracterização estrutural das matrizes produzidas.

Parâmetros	Controle	Funcionalizado (Glutamato)
Fração de Macroporos (%)	0,763±0,047 ^a	0,729±0,027 ^a
Fração de Mesos e Microporos (%)	0,164±0,046 ^a	0,197±0,027 ^a
Fração de Água Ligada (%)	0,017±0,002 ^b	0,021±0,001 ^a
Fração de Polímero Seco (%)	0,056±0,005 ^a	0,052±0,002 ^a
Porosidade Total (%)	0,927±0,007 ^a	0,926±0,002 ^a
<i>S</i> (kg.kg ⁻¹)	17,01±1,584 ^a	17,97±0,82 ^a
<i>ED</i> (L.kg ⁻¹)	20,23±1,701 ^a	21,73±1,14 ^a
Λ_m (10 ⁻³ molNa ⁺ .kg ⁻¹ criogel seco)	-	362±<0,01
Λ (10 ⁻³ molNa ⁺ .L ⁻¹ criogel hidrat.)	-	16,65

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).

Os resultados de capacidade de inchamento do criogel neste presente trabalho são maiores que alguns observados na literatura (SAVINA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2019). A principal diferença pode ter relação com a formulação utilizada, no presente trabalho a concentração de monômeros foi maior que nos trabalhos supracitados. Esse parâmetro tem relação com a medida de expansão do criogel, ou seja, impacta na maleabilidade das matrizes após sua hidratação, o que tem relação com a resistência mecânica da matriz (CARVALHO, 2010; GONÇALVES et al., 2017). Já o grau de expansão, serve para entender o comportamento em relação a massa de criogel desidratado enquanto armazenado e seu volume em condições operacionais. Os resultados mostraram que não há diferença significativa para esse parâmetro, do criogel controle para o funcionalizado, indicando que há uma alta razão entre o volume ocupado e sua massa. Em seu trabalho Souza (2020) desenvolveu um criogel catiônico, e obteve valores menores dos parâmetros supracitados, isso pode ter relação à não presença de AGE na estrutura do material. Entende-se que esse componente é altamente reativo e possui um alta densidade de elétrons, acarretando em interações do tipo ligações de hidrogênio, logo o comportamento observado como a maior capacidade de inchamento e grau de expansão tem relação direta a maior interação com a água.

De maneira geral, é observado que o processo de funcionalização, levou a pequenas alterações nos parâmetros estruturais do criogel. O glutamato não possui funções orgânicas ou componentes químicos que sejam diferentes de alguns já presentes na estrutura do material, com exceção de um grupo carboxílico, além de não ter uma grande cadeia. Logo não há indicativos de que a imobilização desse componente, pudesse levar a mudanças estruturais na matriz produzida.

Pode-se observar diferença significativa apenas no parâmetro de fração de água ligada. Entende-se que nesse caso a inserção de grupos ativos, amina (NH_2) e carboxila (COOH) oriundos da imobilização do glutamato à superfície do criogel são responsáveis pela diferença. Isso ocorre, pois, o oxigênio e nitrogênio presentes nesses grupos, interagem com a água por ligações de hidrogênio, aumentando a capacidade de hidratação da matriz. Salvo et al. (2020) verificaram este comportamento em seu trabalho, quando a presença de grupos aminados levaram a uma maior hidratação do material, influenciando também em uma menor resistência mecânica e um aumento do coeficiente de difusão efetiva dentro do material.

Um dos parâmetros de caracterização de importância para a performance do criogel produzido é a capacidade de troca iônica, que é definido como o número de íons em uma quantidade específica de um determinado material (HAN et al., 2021). O valor encontrado foi de $16,65 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{criogel hidrat}}$, em seu trabalho Fontan et al. (2018), encontrou $25,72 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{criogel hidrat}}$, utilizando um processo de enxertia com a inclusão do ácido-2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA). Nesse caso a diferença está ligada ao processo de modificação do criogel, uma vez que são utilizados diferentes componentes para a troca catiônica.

5.2 Caracterização hidrodinâmica do leito produzido

5.2.1 Permeabilidade ao escoamento

Na Figura 14 são apresentados os dados experimentais relativos à variação da queda de pressão hidrostática em função da velocidade superficial de escoamento.

O valor encontrado para a permeabilidade hidráulica da água em função da variação da queda de pressão hidrostática no leito do criogel foi de $1,23 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$. Quanto maior seu valor, menor será a resistência ao fluxo. Foram verificados valores semelhantes na literatura: Yao et al. (2007) produziu criogéis de troca catiônica com o AMPSA e obteve valor de $9,6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$; Carvalho et al. (2014) utilizando um criogel de afinidade por íons metálicos (IMAC) com cobre (Cu^{2+}) através da ligação com ácido iminodiacético (IDA) obteve o valor de $4,70 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$ e Mól et al. (2017) utilizando o TRIS encontraram $5,9 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$; todos criogéis a base de acrilamida.

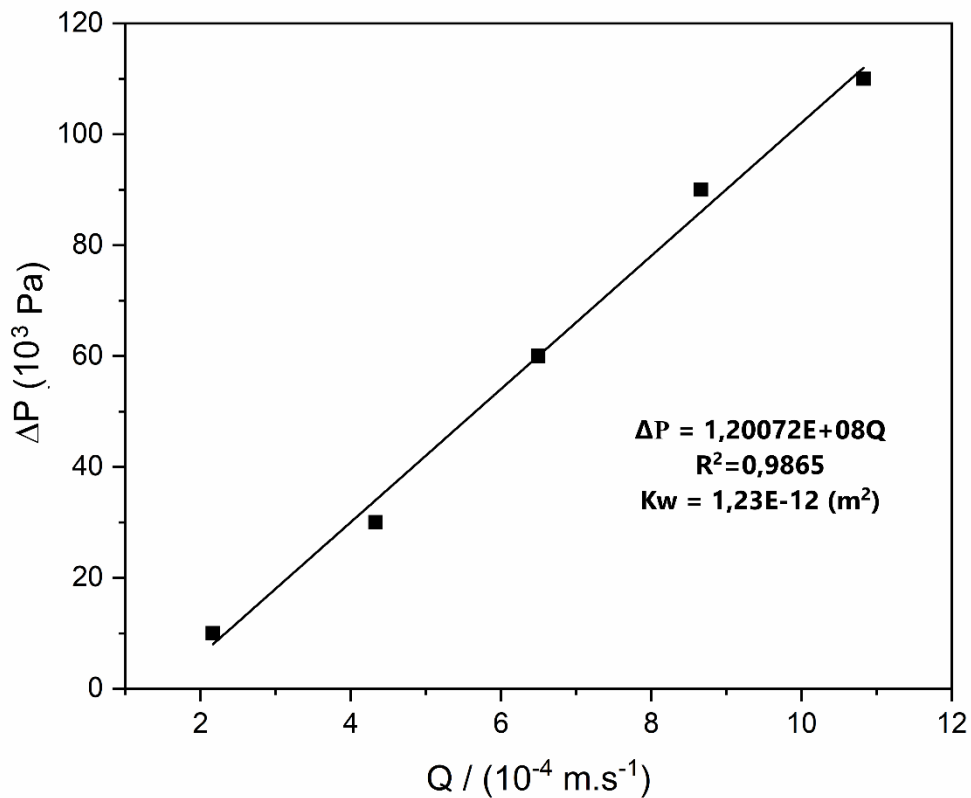


Figura 14. Dados experimentais referentes a variação de pressão (ΔP) em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel no leito de troca catiônica.

Estruturalmente os criogéis são formados por poros interconectados de diferentes tamanhos. Tais poros têm relação direta com a baixa resistência ao escoamento, ou seja, quanto maior a porosidade e o tamanho desses poros, e assim o caminho de difusão para as moléculas, melhor será sua utilização como coluna para processos de purificação, uma vez que possuem, maiores superfícies de contato levando a maiores capacidades adsorptivas. O processo de transferência de massa em monolitos é predominado pelo mecanismo convectivo devido a influência da interconectividade e tamanho dos poros, de forma a favorecer esse escoamento (PLEIVA et al., 2004a; DERAZSHAMSHIR et al., 2008).

5.2.2 Distribuição dos tempos de residência e Coeficiente de dispersão axial aparente

As curvas de distribuição do tempo de residência (DTR) são mostradas na Figura (15).

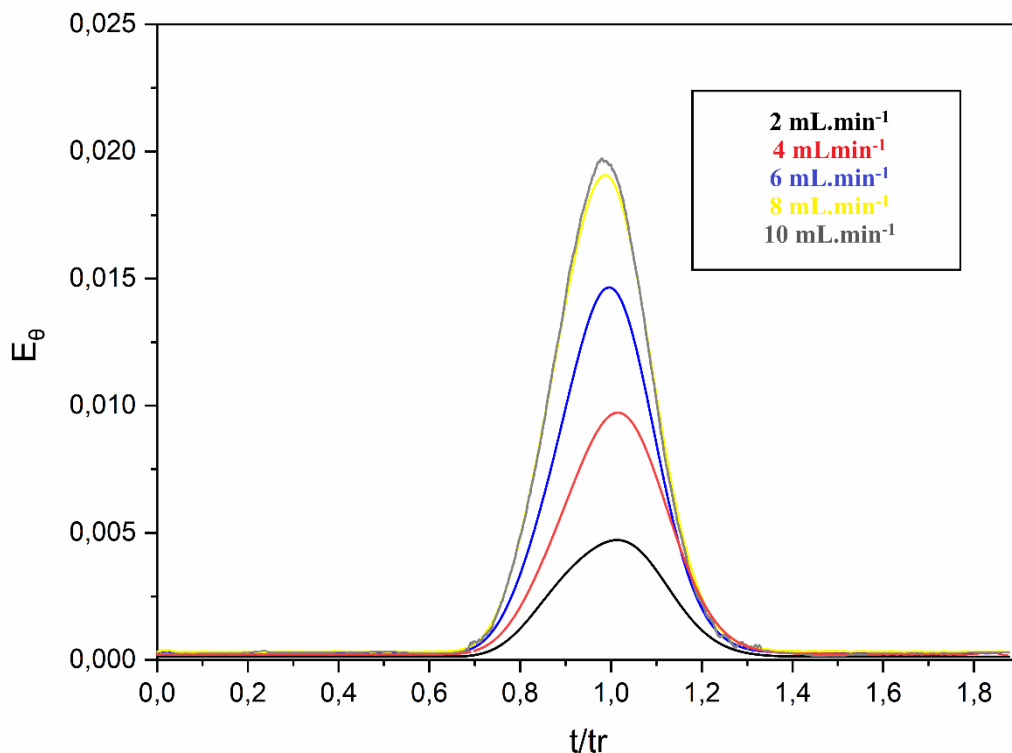


Figura 15. Distribuição dos tempos de residência para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento no leito monolítico produzido.

Pode-se observar na Figura 15 que, à medida que há o aumento da velocidade superficial, há também o incremento dos picos se tornando mais estreitos. As curvas mostram comportamento assimétrico nas menores vazões utilizadas, e à medida que aumenta a vazão o comportamento das curvas se altera, indicando um alto grau de mistura durante o escoamento pela fase móvel. Yao et al. (2006a) relata essa assimetria relacionada a uma estrutura com porosidade não homogênea e a não uniformidade na formação dos poros durante o processo de polimerização.

Comportamento semelhante foi observado por Coimbra et al. (2022) quando determinaram as curvas de DTR em criogel catiônico de poli(acrilamida). Segundo os autores, a morfologia da estrutura porosa pode levar a heterogeneidade no escoamento, acarretando em diferentes perfis de DTR. O presente trabalho indica uma dispersão relativa, pois não há alteração significativa na forma das curvas, com o aumento da vazão.

Na Figura 16, pode-se observar os coeficientes de dispersão axial em função da velocidade superficial da fase móvel.

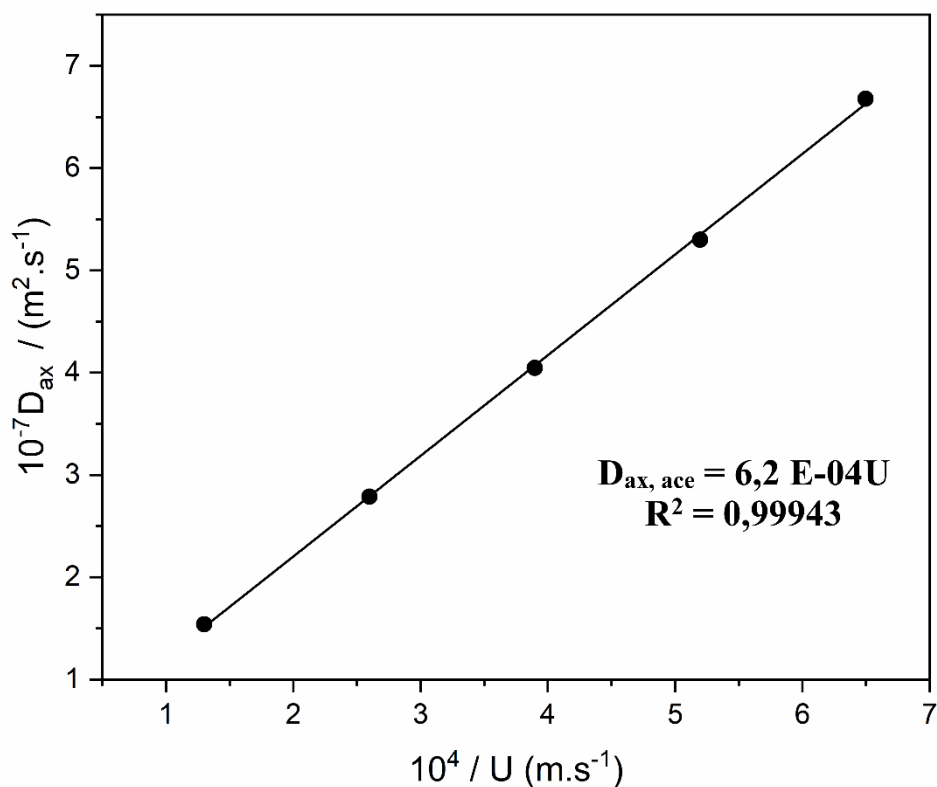


Figura 16. Coeficientes de dispersão axial aparente para pulsos de acetona em diferentes velocidades superficiais de escoamento na coluna de criogel produzida.

É possível verificar no gráfico que os coeficientes variaram de $6,68 \cdot 10^{-7}$ a $1,54 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Há um aumento do D_{ax} em relação à medida em que a velocidade superficial do líquido também aumenta, esse comportamento foi observado também por Yao et al. (2006a) e Nascimento (2021). Os valores obtidos de D_{ax} e o pequeno alargamento das bandas são advindas de uma baixa mistura dispersiva com alta transferência de massa em matrizes porosas. A baixa variação nos valores de D_{ax} indicam um escoamento pistonado, este ocorre quando há uniformidade na velocidade da fase móvel por toda coluna, assim o fluído que passa pela coluna escoar sem que haja uma mistura, o que é desejável. Os resultados encontrados nesse trabalho são semelhantes aos encontrados por Fontan et al. (2018) ($5,0 \cdot 10^{-8}$ a $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$); Mól et al. (2019) (10^{-7} e $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$); e Machado et al., (2015) (10^{-8} e $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), todos com criogéis de poliacrilamida. Segundo os autores, o comportamento observado nesses materiais, tem relação à sua estrutura amorfa e interconectada, indicando um pequeno efeito de retromistura devido ao coeficiente de dispersão axial.

Na Figura 17 são apresentados os resultados obtidos para o HEPT em função da velocidade superficial de escoamento.

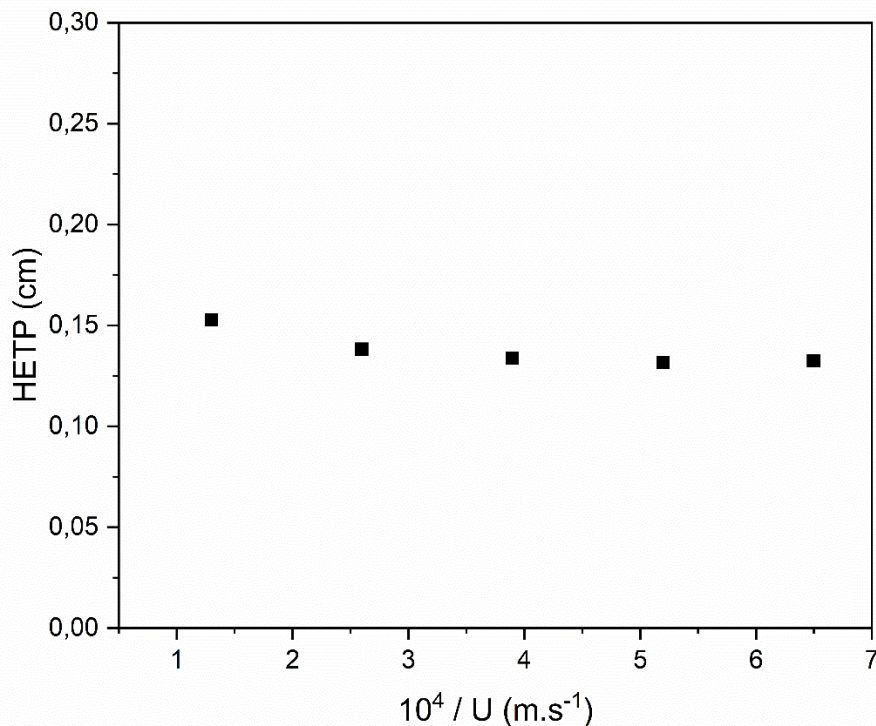


Figura 17. Altura equivalente dos pratos teóricos da coluna de criogel produzida em função da velocidade superficial de escoamento, para pulsos de acetona.

Pode-se observar que os valores obtidos para HEPT variaram de 0,13 a 0,15 cm. Os resultados indicam que a velocidade de escoamento da fase móvel exerce uma baixa influencia no HETP. Segundo Mól et al (2019), esse comportamento mostra que o mecanismo convectivo para transferência de massa é predominante, e concordando com os baixos valores de dispersão axial, mostram boa eficiência e rendimento da coluna em processo de purificação. Plieva et al. (2004b) concorda com premissa, quando afirma que a transferência de massa em criogéis tem relação especificamente ao fluxo convectivo e não difusivo.

Os resultados obtidos no presente estudo para HETP, se mostram positivos, quando comparados à trabalhos encontrados na literatura. Mól et al. (2019) obtiveram valores em torno de 0,33 cm de HETP utilizando criogéis de poliacrilamida ativados com 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA); Mól et al. (2017) com criogéis de afinidade para purificação de lisozima, obtiveram valores de 0,37 a 0,45 cm; com um criogel de poliacrilamida de interação hidrofóbica Neves et al. (2020), observou valores de HETP em torno de 0,31 a 0,33. Os valores mais semelhantes encontrados com o presente trabalho foram de Machado et al. (2015), quando adsorveu α -lactoalbumina com um criogel de troca catiônica ativado com AMPSA, sendo de 0,08 a 0,13. Entende-se que as diferenças e semelhanças encontradas nos trabalhos acima citados tem relação a concentração da formulação utilizada, método de funcionalização e/ ou ativação, vazão de escoamento utilizada e tamanho da coluna.

5.3 Análise do ponto de carga zero

O ponto de carga zero é uma medida importante para o entendimento a cerca do comportamento de sítios de ligação na superfície de adsorventes monolíticos. A protonação ocorre abaixo do Pcz favorecendo a adsorção de componentes carregados negativamente, ao passo que acima do Pcz a superfície se apresenta desprotonada (Mól et al., 2019), o que é ideal para o trabalho, favorecendo interação com moléculas carregadas positivamente. A Figura 18 mostra o comportamento dos criogéis em diferentes valores de pH.

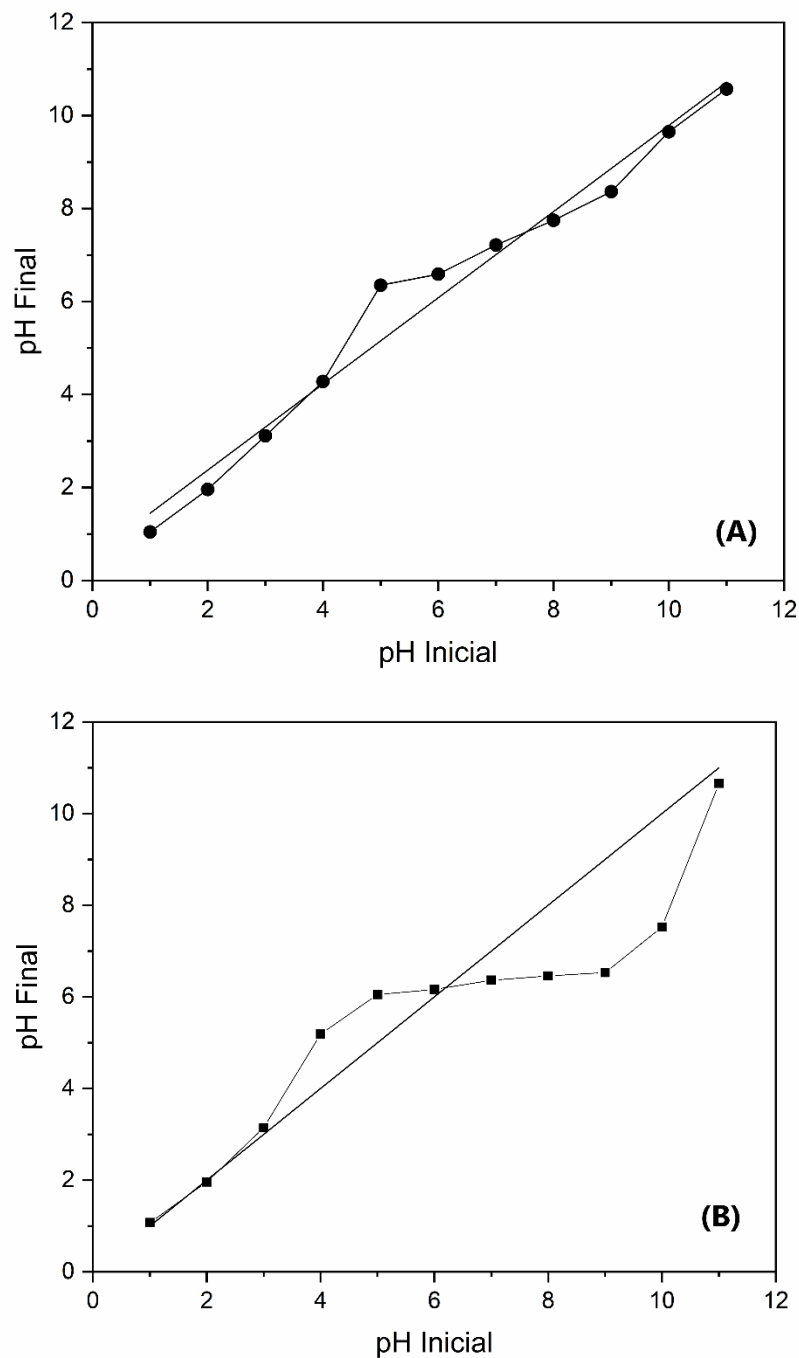


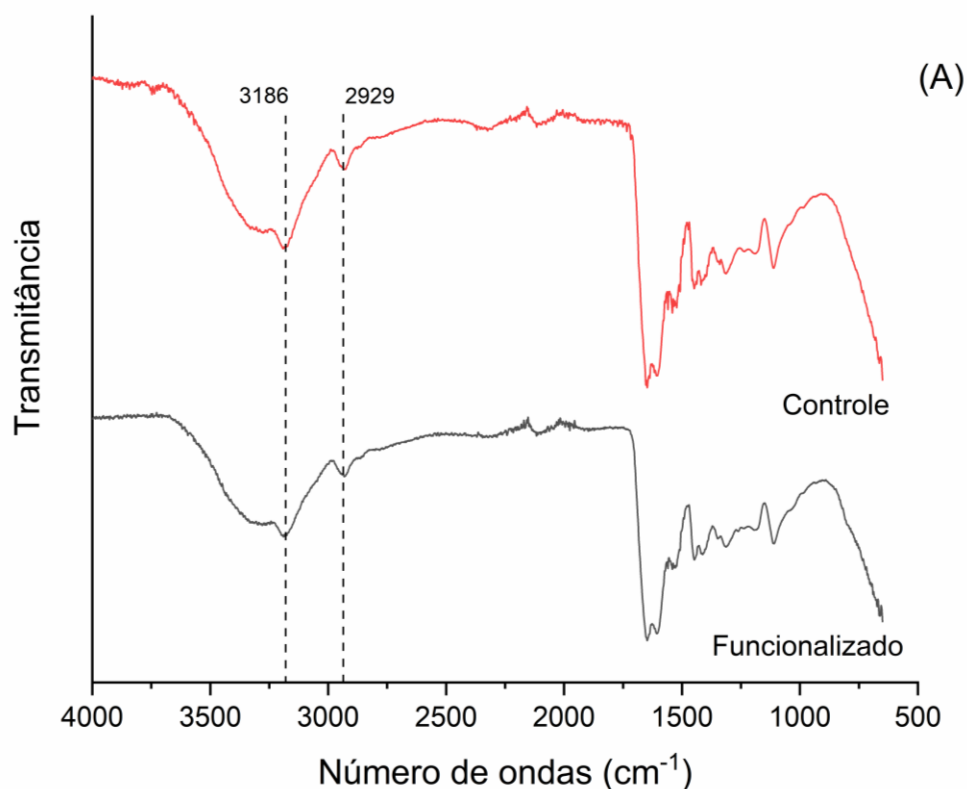
Figura 18. Análise do Ponto de carga zero para a matriz produzida. (A) Controle; (B) Funcionalizada.

O ponto de carga zero foi determinado por meio do cruzamento da curva de solução inicial e do pH final das soluções deixadas em contato com os criogéis. Para o criogel controle, é verificado pouca alteração da matriz sobre o meio reacional, uma vez que não grupos imobilizados em sua superfície que pudesse causar alteração de prótons no meio. Em contrapartida para o criogel funcionalizado é visto um valor de P_{cz} de 6,03 com intervalo de tamponamento variando de 5 a 8, indicando uma faixa significativa para processos adsortivos.

O processo de funcionalização do criogel produzido foi realizado em pH 6 por meio da imobilização do ácido glutâmico à sua superfície, trazendo um caráter catiônico a matriz produzida. Com isso, houve a disponibilização de ions de ácido carboxílico (COO^-) responsáveis pela alteração do pH do criogel produzido, além de atuarem no processo adsortivo.

5.4 Determinação dos grupos funcionais pela técnica de FTIR

A análise de FTIR foi realizada para identificação de grupos específicos oriundos do processo de polimerização dos criogéis de poli(acrilamida) e funcionalização com glutamato, os espectros são apresentados na Figura 19.



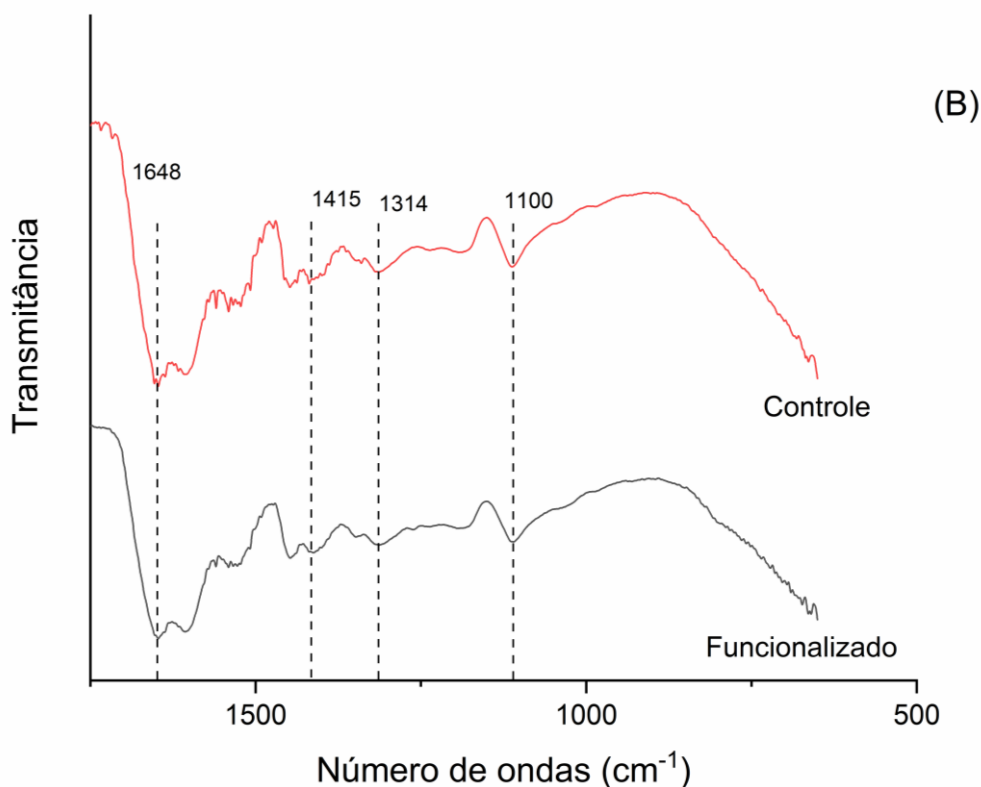


Figura 19. Espectro de FTIR para matriz controle e funcionalizada. (A) intervalo 500-4000 cm^{-1} ; (B) intervalo de 500-1750 cm^{-1} .

Os espectros mostram alguns pontos de alargamento e/ou diminuição de modos vibracionais do criogel controle para o funcionalizado. No comprimento de onda próximo a 1100 cm^{-1} é identificado banda referente a C-O-C, que pode ser atribuído a presença de grupos epóxi (CHATUVERDI et al., 2016). Observa-se uma ligeira redução na intensidade do pico, isso tem relação à modificação decorrida do processo de funcionalização com os braços espaçadores. Nesse processo há a abertura do anel epóxi para ligação com a etilenodiamina.

Foi identificado também um modo vibracional em 3186 e 2929 cm^{-1} que se referem aos grupos O-H e N-H (NISAR et al., 2021; SONG et al., 2022). Para o grupo amina (NH) entende-se sua presença devido as aminas do braço espaçador, etilenodiamina, da amina principal do glutamato, como também o grupo presente na acrilamida, monômero utilizado na síntese. A identificação da interação entre O-H, tem relação à presença de água na matriz como também o grupo hidroxila (OH) do glutamato, presente na carboxila (COOH) principal do aminoácido.

O espectro apresenta um modo vibracional, referente a C=O para ambos os criogéis, no comprimento de onda de 1648 cm^{-1} (CELIK & EKICI, 2019; YAVASER & KARAGOZLER, 2021). No criogel controle essa ligação está presente em sua estrutura, oriundo do monômero acrilamida. Já para o funcionalizado, em alguns trabalhos é verificado que o comprimento

também é responsável por identificar uma banda que tem associação a presença de grupos dímeros (COOH) e/ou vibrações assimétricas da ligação C=O do grupo COO⁻, específicos do glutamato (MIHAILESCU et al., 2019; SONG et al., 2022).

Ainda é possível verificar um modo vibracional no comprimento de 1415 cm⁻¹, mostrando a ligação de C-C para ambos os criogéis (GUNASEKARAN et al., 2009). Esse grupo está presente na estrutura do criogel (Aam e BAam), nos braços espaçadores utilizados, etilenodiamina e glutaraldeído, como também na cadeia no glutamato monossódico.

5.5 Análises térmicas

Na Figura 20 são apresentadas as curvas referentes a decomposição térmica, avaliado por meio da perda de massa (TG) e a análise térmica diferencial (DTA).

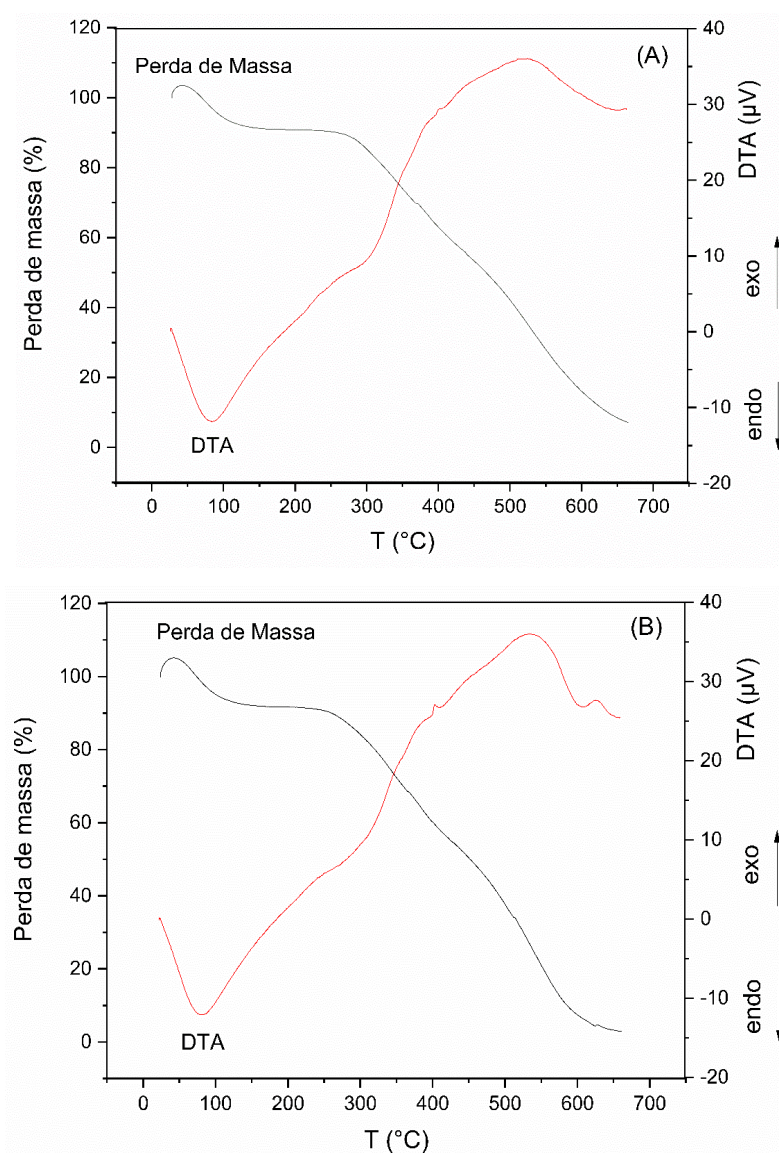


Figura 20. Curvas de TG e DTA para os criogéis elaborados: (A) Criogel controle; (B) criogel funcionalizado.

As curvas referentes a perda de massa para ambos os criogéis são semelhantes, possivelmente devido à natureza química do glutamato ser semelhante a matriz do criogel. É possível verificar para ambas amostras, dois eventos de degradação térmica, na faixa de 25 a 600 °C, encontrado também por Nascimento (2021) e Souza (20), em criogéis. O primeiro evento ocorre de 25 até 120 °C, esta perda se deve a vaporização da água e de moléculas consideradas voláteis (JAIN & KUMAR 2012; JAIN et al., 2020).

O segundo evento é observado em torno de 120 a 600 °C, segundo Xia et al. (2005), Jain et al. (2020), Celik & Ekici (2019), Show et al. (2020) até 430 °C ocorre uma degradação química dos componentes principais, ou seja, há uma ruptura na cadeia polimérica, que basicamente é a pirolise da matriz. É visto que a degradação da poliacrilamida ocorre estritamente na faixa de 175 a 300 °C. Após a temperatura de 430 °C se dá início a degradação de demais grupos que contém carbono, isso ocorre por meio de sua oxidação, dada a alta temperatura (NEVES et al., 2020).

É possível verificar uma diferença no início do segundo evento térmico para os criogel controle e funcionalizado, sendo de em torno de 300 e 260 °C respectivamente. Entende-se que o processo de funcionalização, ou seja, a imobilização de grupos químicos a matriz do criogel, pode ter levado a uma ruptura mais rápida da sua cadeia polimérica.

A análise térmica diferencial também mostra um comportamento padrão para o criogel controle a funcionalizado, por volta de 100°C é visto um pico endotérmico, relacionado a degradação térmica dos componentes referente a evaporação da água, resultados semelhantes foram encontrados por Xia et al. (2005), Souza (2020), Nascimento (2021). Para a matriz funcionalizada é possível observar picos exotérmicos na faixa de 450 a 650 °C, tal resultado tem relação à degradação térmica da estrutura do glutaraldeído imobilizado ao criogel. Isso foi confirmado por Ansari et al. (2013) e Mallakpour & Rashidimoghadam (2020) quando avaliaram matrizes porosas e observaram à degradação do componente em 500 °C.

A alta temperatura necessária para levar a degradação térmica dos criogéis, oferece uma boa resistência acerca da sua utilização. Nesse caso, podem ser aplicados para processos que dependam de temperaturas mais elevadas.

5.6 Avaliação estrutural dos criogéis por DRX

A Figura 21 apresenta os difratogramas referentes aos criogéis controle e funcionalizado.

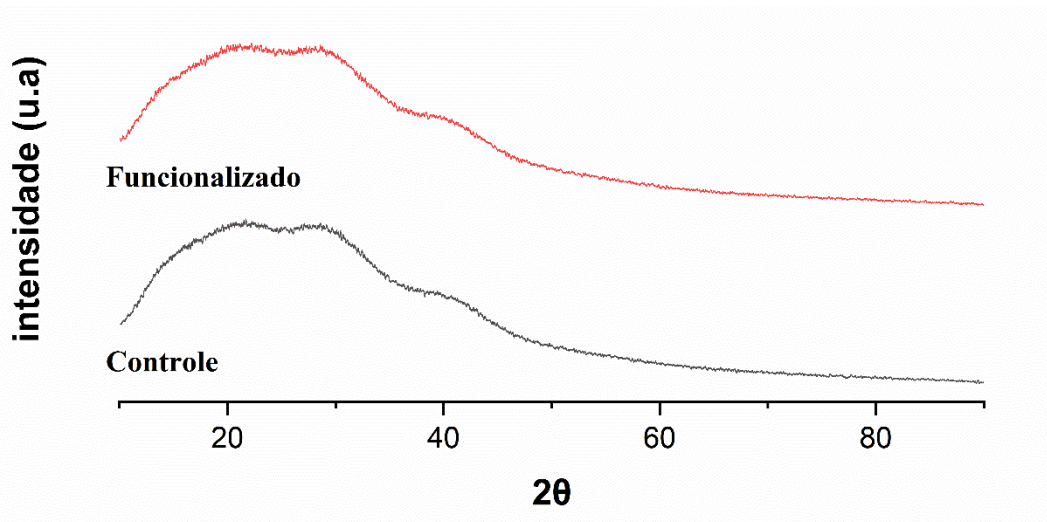


Figura 21. Difratogramas dos criogéis controle e funcionalizado.

Materiais cristalinos são estudados utilizando a difração de raios-x, na qual, um feixe de raios-x é projetado na amostra, e a forma de como os feixes se espalham entre os átomos vai revelar informações sobre a cristalinidade desses materiais, isso é observado nas linhas de difração geradas nos difratogramas (RAJESHKUMAR et al., 2019; SELVAN et al., 2021). Dessa forma, os difratogramas apresentam halos amorfos em torno de 30 a 40 °, verificando que a funcionalização com o glutamato não afetou a estrutura do criogel, devido a semelhança na composição química com a matriz. Como não foi observado nenhuma linha de difração para as amostras analisadas, entende-se que o criogel possui estrutura amorfa, resultados semelhantes foram obtidos por Souza (2020) e Meira (2020).

5.7 Ensaio adsortivo de Lisozima Padrão

Foram realizados testes com a lisozima padrão em pH 7,2. Na Tabela 3 são apresentados os resultados para capacidade adsortiva.

Tabela 3. Capacidade adsortiva das matrizes produzidas

Parâmetro	Controle	Funcionalizado
Capacidade adsortiva (mg _{lis} /g _{crio.seco})	9,80±1,29 ^b	35,15±1,68 ^a

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

Por meio das capacidades adsortivas encontradas para os criogéis analisados, entende-se que o processo de funcionalização foi eficiente, uma vez que houve um incremento de quase 4 vezes na capacidade adsortiva do criogel funcionalizado em relação ao criogel controle. As interações intermoleculares envolvidas no processo adsortivo dizem respeito ao grupo catiônico (COO^-) que é o responsável pelo caráter ácido e o incremento da elevação enquanto coluna

adsortiva. Dessa forma, prosseguiu-se para o processo de purificação da lisozima obtida da clara do ovo em pH 7,2.

5.8 Purificação da lisozima da clara do ovo em processo em batelada

Os resultados referentes ao processo de purificação da lisozima da clara do ovo em batelada são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados referentes à purificação em batelada da lisozima da clara do ovo por interação iônica.

Amostra	Extrato	Eluição
Volume (mL)	4	2
Conc. Proteína (mg.mL⁻¹)	0,931 ± 0,025	0,034 ± 0,008
Proteína total (mg)	3,724 ± 0,082	0,068 ± 0,006
Atividade enzimática (U.mL⁻¹)	251,52 ± 5,117	90,65 ± 1,382
Atividade específica (U.mg⁻¹)	269,90 ± 2,858	2574,94 ± 11,425
Fator de purificação	-	9,53 ± 2,647

Na literatura foram encontrados outros trabalhos para processos de purificação de lisozima. Bayramoglu & Arica (2021) utilizando um criogel como trocador catiônico, COOH (trocador forte) e HSO₃ (trocador fraco), tiveram 188,3 e 79,9 mg.g⁻¹ de capacidade adsortiva, nesse processo foi utilizado 10 mmol.L⁻¹ de NaOH e 0,5 mol.L⁻¹ de KCl para dessorção da lisozima ligada a matriz de poly (hidroximetilmetacrilato/glicidil metacrilato). Contudo no trabalho citado foi obtido 21,41 U.mg⁻¹ de atividade específica, sendo considerado um valor baixo para processos de purificação de lisozima. Algum parâmetro do processo, seja de elaboração e funcionalização do criogel, ou até o processo adsortivo, interferiram na conformação e assim eficiência da enzima.

A atividade específica em um processo de purificação é um parâmetro de grande importância pois relaciona a atividade enzimática à concentração de enzima presente em solução. No trabalho, foi encontrado o valor de 2575,94 U.mg⁻¹. Meira (2020) utilizando um criogel funcionalizado com fenilalanina encontrou 1932,60 U.mg⁻¹.

O ponto chave nesse processo adsortivo é o pH do meio reacional, que pode levar alterações tanto na matriz quando na enzima de trabalho. Wang et al. (2017), Liu et al. (2017) e Liu et al. (2020) estudando lisozima perceberam que, por mais que haja uma alta densidade de cargas no pH em torno de 5 a 9, em alguns casos pode ocorrer um fenômeno de distribuição assimétrica de moléculas de lisozima em que os grupos carregados positivamente ficam concentrados em uma dada região de pH ácido, e isso pode acarretar em alteração nas interações iônicas e assim uma menor capacidade adsortiva.

O parâmetro de fator de purificação relaciona à quantidade de vezes que a enzima foi purificada em relação à si enzima presente na solução de alimentação/extrato. Com isso, 9,53 foi o valor obtido para purificação em batelada da lisozima, que está bem próximo ao visto por Meira (2020). Outros resultados próximos foram obtidos por Fontan (2013) e Cassimiro (2018). A diferença nos resultados pode ter relação à funcionalização utilizada, sendo nos dois casos supracitados, os grupos enxertados de hidroximetil aminometano (TRIS) e 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA). Existem outros fatores que podem impactar no fator de purificação, como o pH do meio, sais utilizados e suas concentrações, volume de eluição entre outros.

5.9 Purificação da lisozima em processo em coluna

Os dados referentes a volume, concentração, proteína total e atividade enzimática do processo de purificação em coluna monolítica são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados referentes à purificação da lisozima da clara do ovo por cromatografia de troca iônica no leito monolítico produzido

Amostra	Extrato	Eluição
Volume (mL)	129,29	14,2
Conc. Proteína (mg.mL⁻¹)	4,11 ± 0,098	0,11 ± 0,004
Proteína total (mg)	531,81 ± 4,266	1,65 ± 0,093
Atividade enzimática (U.mL⁻¹)	504,61 ± 11,006	219,80 ± 15,479
Atividade específica (U.mg⁻¹)	121,82 ± 2,845	1893,83 ± 80,356
Fator de Purificação	-	15,11 ± 0,638

As diluições utilizadas no processo de purificação em batelada e na solução de alimentação, justificam as diferenças nos resultados mostrados acima. Foram realizados estudos preliminares para melhor adequação da concentração a ser aplicada na purificação.

A solução da clara de ovo de galinha 1:5 foi aplicada em cromatógrafo Akta Pure, objetivando a purificação da lisozima, o perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 22.

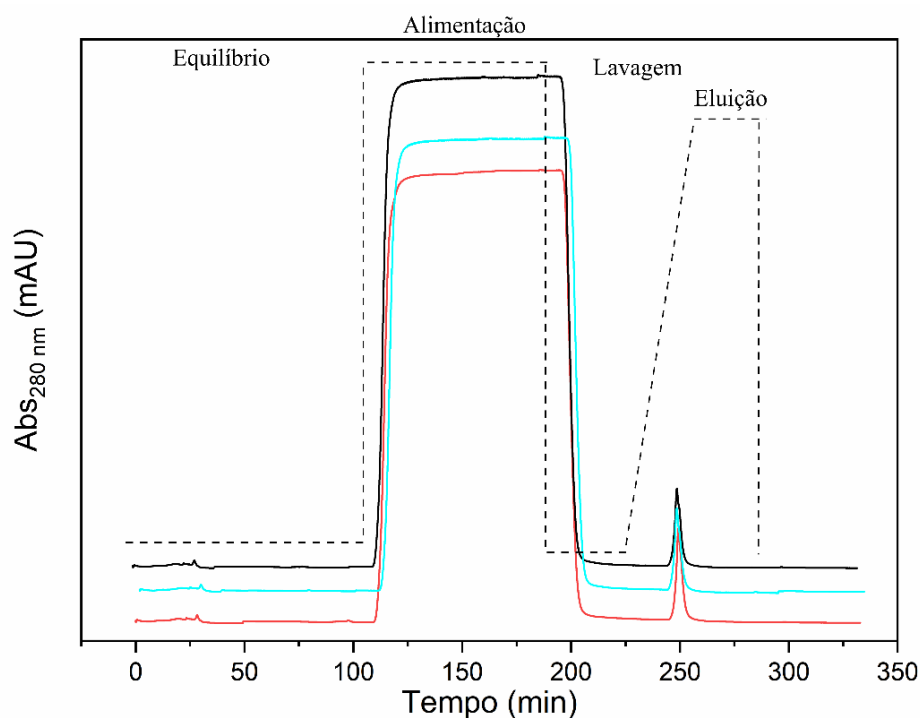


Figura 22. Perfil de adsorção da purificação da lisozima por meio de uma solução da clara do ovo (1:5), utilizando a coluna de criogel em sistema cromatográfico Akta Pure.

Foi realizada a corrida em triplicata para efeito de comparação dos tempos dos picos referentes a eluição da lisozima. Como pode-se ser visto, apenas um pico de eluição, isso mostra a eficiência no processo de imobilização do glutamato e ainda uma concentração ideal de NaCl utilizada na dessorção da enzima adsorvida à coluna.

Alguns resultados importantes foram encontrados por Marques et al. (2020) que podem auxiliar na elucidação da interação da enzima-coluna. Para valores de pH entre 5 e 9 há uma alta densidade de cargas encontradas na lisozima, o que pode favorecer as interações iônicas. Alveroglu et al. (2019) e Zhao et al. (2020) também verificaram bons resultados trabalhando nessa faixa de pH, a partir de um incremento na capacidade de troca iônica devido à distância do ponto isoelétrico da lisozima, o que favorece a disponibilidade de mais cargas a sua superfície e também à sua orientação de ligação.

Resíduos de aminoácidos carregados reticulados em ligações peptídicas na cadeia polimérica da lisozima, são os responsáveis pelas interações com a matriz. Os resíduos, ácido aspártico, histidina, tirosina e ácido glutâmico, podem ser os responsáveis pelo processo adsorptivo dessa forma há a prevalência de interações eletrostáticas (BAYDEMIR et al., 2014). Dentro do processo adsorptivo de troca iônica ainda podem ocorrer a mudanças na posição da lisozima, isso foi visto por Dimer & Hubbuch (2007) quando verificaram que na presença de trocadores catiônicos, são vistas duas posições, extremidade e lado. Nesse caso, a área de

superfície de contato da lisozima com uma matriz é duas vezes menor em comparação com a posição lateral.

Segundo Hatti-Kaul & Mattiasson (2003) Baydemir et al. (2014), Mól et al. (2017) há dois fatores cruciais que governam os processos cromatográficos, que é a concentração da solução de entrada e a distribuição de solutos entre a fase estacionária e móvel, ou seja, a velocidade de escoamento. Existe um platô na capacidade adsorptiva das colunas, independente da concentração utilizada, esse platô indica a saturação dos sítios ativos dos criogéis. O outro ponto desse parâmetro diz respeito a concentração da lisozima, que é em torno de 3,5% da proteína total, dessa forma pode acarretar em impedimento estérico em decorrência da alta concentração de proteína, dificultando à adsorção da enzima ao criogel. A velocidade superficial de escoamento também tem forte influência, pois interfere na retenção e solubilidade e até na dispersão axial da coluna. Show et al. (2020) observaram que, em menores velocidades de escoamento, há uma maior capacidade adsorptiva para lisozima em membrana de nanofibra modificada com etilenodiamina e quitosana.

A Figura 23, mostra os dados referentes a atividade específica e fator de purificação para o processo em Akta Pure.

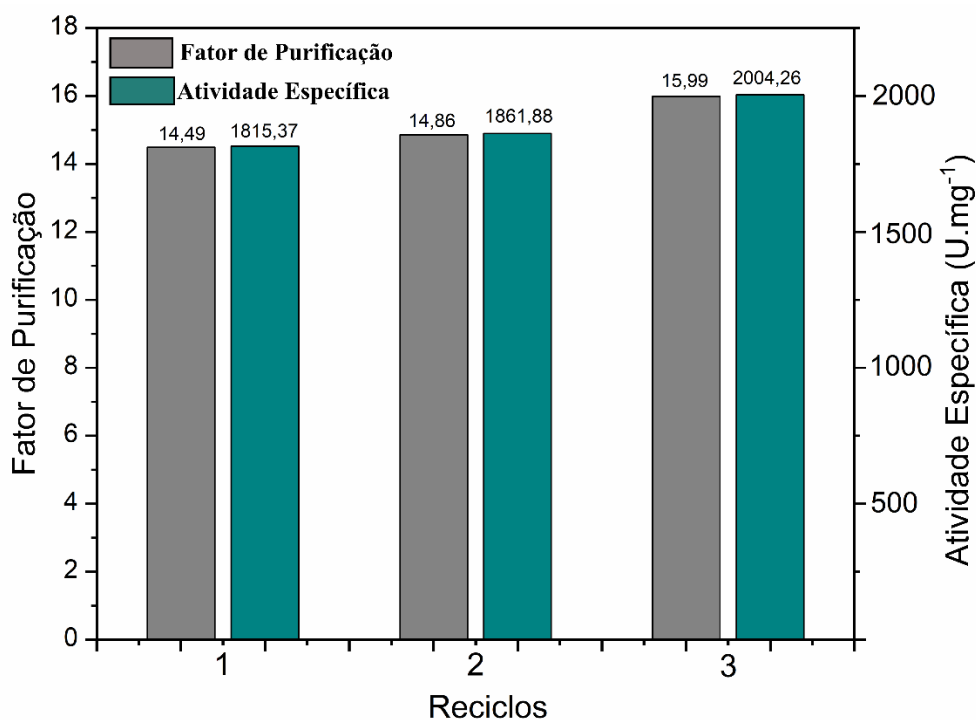


Figura 23. Parâmetros para avaliação do processo de purificação da lisozima por meio de criogel de troca catiônica em cromatógrafo Akta Pure.

Pode-se observar valores próximos para atividade específica e fator de purificação encontrados nas diferentes corridas. O resultado mais significativo encontrado para fator de purificação foi de 15,99, isso corresponde a um aumento de quase 60% na purificação da

lisozima quando comparada ao processo em batelada. Tal resultado tem relação ao mecanismo convectivo utilizado na solução de alimentação, garantindo uma eluição mais eficiente.

Em muitos processos de purificação em colunas se utiliza de eluições sequências e até de mais um mecanismo de interação para melhor eficiência do processo. Yan et al. (2011) trabalhando com criogéis de troca catiônica realizou três etapas sequenciais afim de alcançar maior pureza da lisozima recuperada. Ventura et al. (2008) e Guan et al. (2019) também utilizaram de etapas sequenciais para purificação de lisozima. Dessa forma, entende-se como eficiente o processo de purificação da lisozima no criogel produzido, uma vez que se utilizou de apenas uma etapa de eluição.

5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação da pureza da solução purificada de lisozima em relação ao extrato bruto, como é visto na Figura 24 e 25.

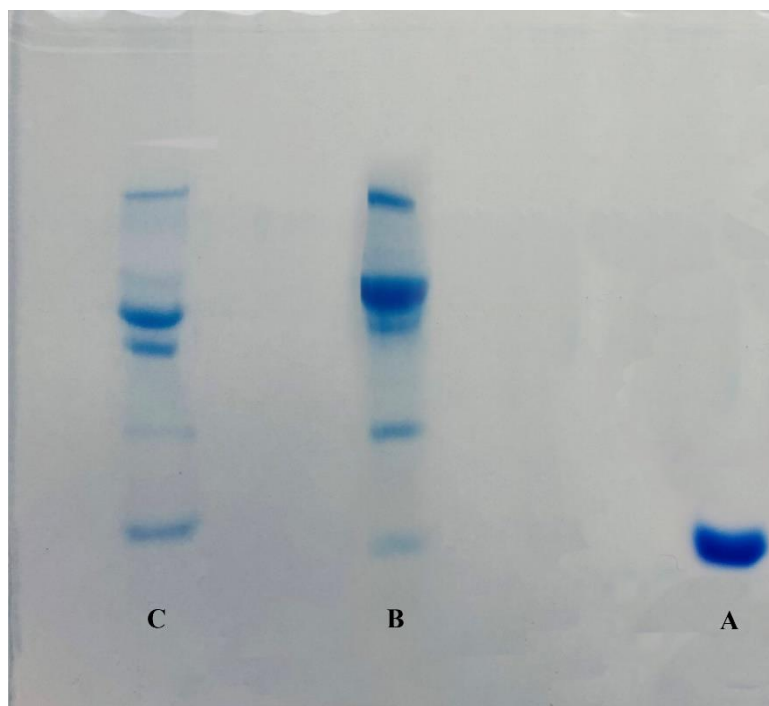


Figura 24. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para lisozima purificada (batelada) da clara do ovo. (A) Padrão lisozima puro; (B) extrato bruto; (C) Solução purificada.

Algumas informações podem ser obtidas com a análise SDS-PAGE para purificação em batelada. Primeiramente a solução bruta (B) apresenta bandas referentes às proteínas presentes na clara, como é o caso da albumina, lisozima, conalbumina e etc. Nessa amostra a concentração utilizada na análise foi de $0,04655 \text{ mg.mL}^{-1}$ de concentração de proteína, ao passo que para a amostra de eluição (C) foi $0,0085 \text{ mg.mL}^{-1}$. A diferença nas concentrações das amostras dizem respeito a melhor faixa encontrada para visualização da eletroforese.

Pode-se observar também que na solução de eluição há bandas que dizem respeito à outras proteínas que não seja apenas a lisozima, isso também foi visto por Fontan (2013), quando realizou a purificação de lisozima em trocador catiônico, nesse caso a concentração utilizada na análise foi de $0,905 \text{ mg.ml}^{-1}$.

A Figura 25 mostra a análise em gel desnaturante para avaliação da pureza da lisozima, obtida pela solução de alimentação.

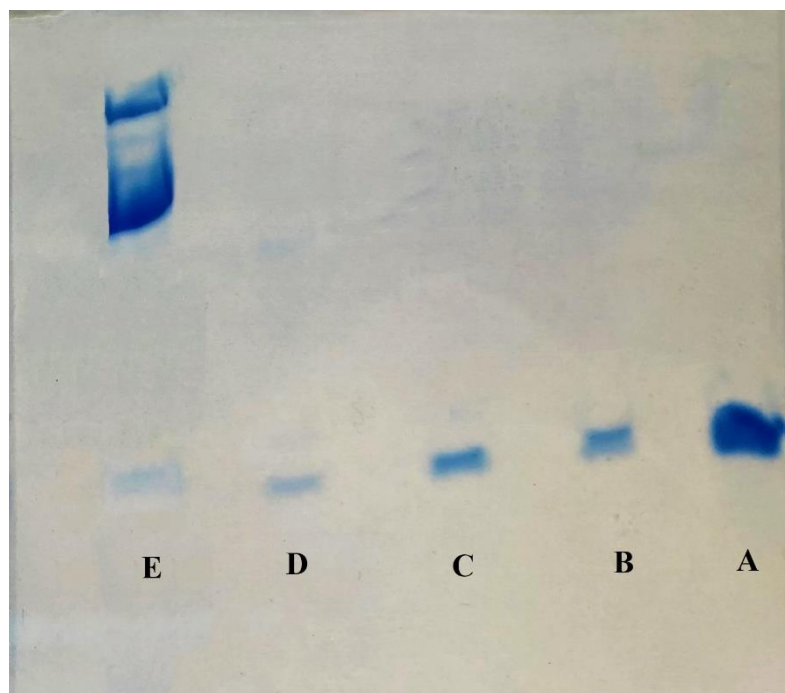


Figura 25. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) a 12%, para lisozima purificada (solução de alimentação) da clara do ovo. (A) Padrão lisozima puro; (B, C e D) Eluído; (E) Extrato bruto.

Assim como foi verificado na SDS-PAGE da purificação em batelada, também foi verificado bandas na solução bruta (E) que não dizem respeito apenas a lisozima, sendo as demais proteínas presentes na clara, nesse caso também foi utilizado uma concentração de $0,0345 \text{ mg.mL}^{-1}$. De forma que para os três picos coletados, B, C e D as concentrações em gel foi de 0,0602, 0,05675 e 0,0546 respectivamente.

Para efeito de comparação, pode-se observar bandas mais marcantes na análise referente a purificação pela solução de alimentação, concordando com os resultados obtidos de fator de purificação, sendo estes maiores. Outro ponto importante é a não presença de outras proteínas na solução purificada, indicando que o processo convectivo pela solução de alimentação se mostrou mais eficiente, uma vez que há um processo de lavagem e eluição mais efetivo, quando comparado ao processo em batelada.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido um novo criogel de poliacrilamida como trocador catiônico para a purificação de lisozima. O material apresentou cerca de 90% de porosidade, parâmetro ideal para purificação. Demonstrou também características positivas em relação a capacidade de hidratação. A análise de FTIR mostrou grupos ativos na estrutura do criogel por meio dos seus modos vibracionais, que são utilizados para sustentação dos braços espaçadores e grupos catiônicos ativados utilizados na interação. Além de sua característica amorfa verificada pela análise difração de raios-x, as análises térmicas mostraram degradação da cadeia polimérica dos criogéis a partir de 120 °C. A caracterização referente ao processo adsortivo mostrou baixos coeficientes de dispersão axial e assimetria nas curvas de distribuição de tempo de residência, como baixos valores de HETP que são ideias para processos de purificação.

A avaliação do potencial do material produzido foi verificada por meio da purificação parcial da lisozima da clara do ovo. Foi comparado o processo em batelada e pela solução de alimentação para a purificação de lisozima, e foi verificado fato e purificação de 15,11, que corresponde a um aumento de 57 % nesse fator para a solução de alimentação, sendo observado apenas um pico de eluição em cromatograma. Dessa forma a lisozima da clara do ovo foi purificada de maneira satisfatória por meio do criogel de poliacrilamida funcionalizado com glutamato, em decorrência dos dados obtidos, como também a pureza observada no gel de eletroforese SDS-PAGE.

Diante do apresentado os criogéis podem ser utilizados como materiais para purificação de proteínas de maneira alternativa às colunas cromatográficas convencionais, uma vez que apresentam custos reduzidos para sua produção. Mais estudos são necessários para elucidar todos os mecanismos envolvidos nos processos de purificação, e assim aperfeiçoamento da técnica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. Ed1. São Paulo, Ipen, 2014.
- ALVEROGLU, E.; ILKER, N.; SHAH, M. T.; RAJAR, K.; GOKCEOREN, A. T.; KOC, K. Effect of gel morphology on the lysozyme adsorption and adsorption kinetics of temperature sensitive magnetic gel composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 181, 981-988, 2019.
- ALVES, R. O.; GOMES, M. H. G.; SILVA, O. S. S.; PORTO, T. S. Purificação de protease de *Aspergillus tamari* URM4634 por cromatografia de troca iônica. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 7, n. 2, p. 329-334, 2017.
- 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.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R.; CHIBBER, S.; KHAN, M. J. Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 97, p. 258-263, 2013.
- ANTONIO, S. G. **Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos. 161 p.** Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2010.
- ARRUA, R. D. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. **Materials**. v. 2, n. 4, p. 2429-2466, 2009.
- ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous super macroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**. v. 986, p. 275-290, 2003.
- ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I. et al. Chromatography of microbial cells using continuous super macroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**. v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002.
- ÁVILA, M.; GÓMEZ-TORRES, N.; HERNÁNDEZ, M.; GARDE, S. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. **International journal of food microbiology**, v. 172, p. 70-75, 2014.
- BARBIROLI, A.; BONOMI, F.; GIORGIO, C.; IAMETI, S.; MANXONI, M.; PIERGIOVANNI, L.; ROLLINI, M. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. **Food Control**. v. 26, p. 387-392, 2012.
- BARBOSA, J. C. B. **Hidrodinâmica em sistemas com estruturas do tipo open-cell foam: estudos com ferramentas de CFD. 64 p.** Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química). Centro de Estudos de Fenômenos de Transporte. Faculdade de Engenharia do Porto, 2019.
- BAYDEMIR, G.; TURKOGLU, E. A.; ANDAÇ, M.; PERÇIN, I.; DENIZLI, A. Composite cryogel for lysozyme purification. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. p. 1-8, 2014.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Strong and weak cation-exchange groups generated cryogel films for adsorption and purification of lysozyme from chicken egg white. **Food Chemistry**. v. 342, p. 1-11, 2021.

BERELI, N.; TÜRKMEN, D.; KÖSE, K.; DENIZLI, A. Glutamic acid containing super macroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel disks for UO₂ 2+ removal. **Materials Science and Engineering C**, v.32, p. 2052-2059, 2012

BOSCHI, J. R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração. 119 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2006.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, 2012.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 248-254, 1976.

BROOIJMANS, T.; BREUER, P.; SCHOENMAKERS, P. K.; PETERS, R. A. H. Change-based separation of synthetic macromolecules by non-aqueous ion Exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, 2020.

CAROLINO, A. S. **Estimativa do percentual de cristalinidade de polímeros semicristalinos derivados da anilina através dos padrões de difração de raios x. 88 p.** Dissertação (Mestrado em Física) Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2017.

CARRILLO, W. Lisozima: actividad antibacteriana y alergenicidad. **Rev. Actualización em Nutrición**, v. 14, n. 4, p. 314-326, 2013.

CARVALHO, B. M. A. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poli(acrilamida) ativada com íons de cobre. 125 p.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CARVALHO, B. M. A. SILVA, DA SILVA, S. L. MINIM, V. P. R.; DA SILVA, M. C. H.; CARVALHO, L. M.; MINIM, L. A. Cryogel poly(acrylamide): synthesis, structure and applications. **Separation & Purification Reviews**. v, 43, p. 1-23, 2013.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on super macroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**. v. 154, p. 308-314, 2014.

CARVALHO, N. M. S. **Determinação do segundo coeficiente virial de proteínas empregando calorimetria de titulação isotérmica. 110 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2016.

CASSIMIRO, D. M. J. **Desenvolvimentos de uma estratégia de purificação de avidina e pisolina da clara do ovo. 87 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2018.

CAVALCANTI, J. S. **Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida.** 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Natal-RN. 2010.

CELIK, M. U.; EKICI, S. Polyacrylamide-polyaniline composites: the effect crosslinking on thermal, swelling, porosity, crystallinity, and conductivity properties. **Colloid and Polymer Science.** v. 297, p. 1331-1343, 2019.

CHANG, Y.; CHEBG, H.; OOI, C. W.; SONG, C. P.; LIU, B. Adsorption and purification performance of lysozyme from chicken egg white using ion exchange nanofiber membrane modified by ethylene diamine and acetic acid. **Food Chemistry.** v. 358, p. 1-15, 2021.

CHATUVERDI, A.; BAJPAI, A. K.; BAJPAI, J.; SINGH, S. K. Evaluation of poly (vinyl alcohol) based cryogel-zinc oxide nanocomposites for possible application as wound dressing materials. **Materials Science and Engineering C,** v. 65, p. 408-418, 2016.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. (2008). Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamide-2-methyl-1-propane sulfonic acid. **Chemical Engineering Science.** v. 63, p. 71-77, 2008.

COIMBRA, J. C.; MARTINS, M. A.; MINIM, L. A. A simplified CFD model to describe fluid dynamics, mass transport and breakthrough curves performance in cryogel supports for chromatographic separation. **Chemical Engineering Research and Design.** v. 179, p. 56-65, 2022.

COIMBRA, J. C.; MARTINS, M. A.; PATRICK, S. O.; MINIM, L. A. The potential use of a gyroid structure to represent monolithic matrices for bioseparation purposes: Fluid dynamic and mass transfer analysis via CFD. **Separation and Purification Technology,** v. 254, p. 117594, 2021.

CORRÊA, J. B.; BERNARDI, F. N.; GEHRKE, I. T. Técnicas cromatográficas combinadas para investigação de moléculas bioativas com potencial biotecnológico. *In: Jornada de Pesquisa,* 21, 2016, Ijuí, Rio Grande do Sul.

CUNHA, S. Método simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de raios x. **Quim. Nova.** v. 31, n. 4, p. 906-909, 2008.

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.** p. 1-9, 2019.

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura Microscopia Eletrônica de Varredura Aplicações e Preparação de Amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: Edipucrs, 2007.

DEMIRYAS N.; T, N.; GALAEC, I. Y.; PISKIN E.; DENIZLI, A. Poly (acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. **Applied Polymer Science.** v. 15, p. 1808-1816, 2007.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Princípios e aplicações de análise térmica. **São Carlos: IQSC,** p. 19, 2012.

DERAZSHAMSHIR, A.; ERGUN, B.; PESINT, G.; ODABASI, M. Preparation of Zn²⁺-chelated poly (HEMA-MAH) cryogel for affinity purification of Chicken egg lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**. p, 1-9, 2008.

DISMER, J.; HUBBUCH, J. A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. **J Chromatogr A**. v. 1149, p. 312-320, 2007.

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

ERZENGIN, M.; PESINT, G. B.; ODABASI, M. Monolithic hydrophobic cryogel for protein separation. **Polymer Bulletin**. p. 1-15, 2021.

FDA. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe; egg white lysozyme. **Federal Register** **63**, n. No. 49/Friday, p. 12421–12425, 1998.

FENNEMA, O.R.; DAMODARAN, S.; PARKIN L. K. **Química de alimentos de Fennema**. 1° Ed - Porto Alegre: Artmed, 2010.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacoporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite**. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; GONÇALVEZ, G. R. F.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. M. Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolithic ion exchanger columns. **Polymer Engineering and Science**. v. 58, p. 1717-1725, 2018.

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

FORATO, L. A.; FILHO, R. B.; OSIRO, D.; BICUDO, T. C.; CONAGO, L. A. A espectrometria na região do infravermelho e algumas aplicações. **Empresa Brasileira de Pesquisa e Agrepecuária**. Documentos 1, 2010.

FREYER, T. R. **Aspectos termodinâmicos da interação entre fosfolipases A₂ de venenos ofídicos e inibidores: estudo por calorimetria de titulação isotérmica**. 176 p. Tese (Doutorado em Biologia Geral) Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu-SP, 2017.

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

GHOSH, R.; SILVA, S. S.; CUI, Z. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2000.

GOBBO, L. A. **Aplicação da difração de raios-X e método de Rietveld no estudo de cimento Portland**. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) Programa de Pós-Graduação em Recursos Minerais e Hidrogeologia, Universidade de São Paulo, 2009.

GOMES, W. P. C.; YOSHINAGA, F. B.; GONÇAVES, G. Determinação de álcoois em bebidas comerciais por cromatografia gasosa e amostragem por *headspace*. **Bioenergia em revista: diálogo**. v. 10, n. 1, p. 114-124, 2020.

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

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

GREGÓRIO, C. A. M. **Análise de dados de desnaturação proteica obtida por simulações de dinâmica molecular. 138 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Informática) Programa de Pós-Graduação em Engenharia em Informática, Universidade do Minho Escola de Engenharia, 2012.

GUAN, Y. F.; LAI, S. Y.; LIN, C. S.; SUEN, S. Y.; WANG, M. Y. Purification of lysozyme from chicken egg white using diatom frustules. **Food Chemistry**, v. 286, p. 483-490, 2019.

GUIOCHON, G. Preparative Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic A**, v. 965, n. 0021–9673, p. 129–161, 2002.

GUNASEKARAN, S.; SAILATHA, E.; SESHADRI, S.; KUMARESAN, S. FTIR, FT Raman spectra and molecular structural confirmation of isoniazid. **Indian Journal of Pure & Applied Physics**, v. 47, p. 12-18, 2009.

HAN, S-Y.; YU, D. M.; MO, Y-H.; AHN, S. M.; LEE, J. Y.; KIM, T-H.; YOON, S. J.; HONG, S.; HONG, Y. T.; SO, S. Ion exchange capacity controlled biphenol-based sulfonated poly (arylene ether sulfone) for polymer electrolyte membrane water electrolyzers: Comparison of random and multi-block copolymers. **Journal of Membrane Science**, v. 632, p. 1-11, 2021.

HARLOW, G. S.; LUNDGREN, E.; ESCRIBANO, M. E. Recent advances in surface x-ray diffraction and the potential for determining structure-sensitivity relations in single-crystal electrocatalysis. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 23, p. 162-173, 2020.

HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. *Isolation and Purification of Proteins*, Marcel Dekker, New York, 2003.

JAIN, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K.; MISHRA, A. Thermoresponsive cryogels of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-N-isopropyl acrylamide) (P (HEMA-co-NIPAM)): fabrication, characterization and water sorption study. **Polymer Bulletin**, p. 1-27, 2020.

JAIN, E.; KUMAR, A. Designing Super macroporous cryogel based on polyacrylonitrile and a polyacrylamide-chitosan semi-interpenetrating network. **Biomaterials Science**, p. 877-902, 2012

KIM, H. C.; LEE, J. N.; KIM, E.; KIM, M. H.; PARK, W. H. Self-healable poly (γ -glutamic acid)/chitoooligosaccharide hydrogels via ionic and pi-interactions. **Materials Letters**, v. 297, p. 1-4, 2021.

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

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity

chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v.1103, 35-42, 2006.

KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using super macroporous monolithic cryogel. **Journal Immunol.** v. 283, p. 185-194, 2003.

KÚSMIEREK, K.; SZALA, M.; SWIATKOWSKI, A. Adsorption of 2,4 dichlorophenol and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solution on carbonaceous materials obtained by combustion synthesis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.** v, 63, p. 371-378, 2016.

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

LECHEVALIER, V.; CROGUENNEC, T.; PEZENNEC, S.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; PASCO, M.; NAU, F. Evidence for synergy in the desaturation at the air-water interface of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme in ternary mixture. **Food Chemistry.** v. 92, p. 72-87, 2005.

LI, N.; BAI, R. Copper adsorption on chitosan-cellulose hydrogel beads: behaviours and mechanisms, **Separation Purification Technology.** v, 42, p. 237-247, 2005.

LIMA, L. H. F. **Precipitação de lisozima e insulina bovina e suína por “salting out” com uso de eletrólitos voláteis. 107 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

LINHARES, L. A.; FILHO, F. B. E.; BELLIS, V. M.; SANTOS, E. A.; IANHEZ, R. Utilização dos modelos de Langmuir e de Freundlich na adsorção de cobre e zinco em solos Brasileiros. **Acta Agronômica.** v. 59, n. 3, p. 303-315, 2010.

LIU, B-L.; O, C. W.; NG, I-S.; SHOW, P. L.; CHANG, Y. Effective purification of lysozyme from Chicken egg White by tris(hydroxymethyl)aminomethane affinity nanofiber membrane. **Food Chemistry.** v, 327, p. 1-12, 2020.

LIU, H. I.; HSIEH, W. C.; LIU, H. S. Molecular Dynamics Simulations To Determine the Effect of Supercritical Carbon Dioxide on the Structural Integrity of Hen Egg White Lysozyme. **Biotechnology Progress,** v. 20, n. 3, p. 930-938, 2004.

LOZINSKY, V. I., GALAEV, I. Y, PLIEVA, F. M, SAVINA, I.N., JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology,** v. 21, n.10, p. 445-451, 2003.

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

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

MACHADO, A, LIRIA, CW, PROTI, PB, REMUZGO, C & MIRANDA, MTM. *Quim. Nova*, 27(5), 781-789, 2004 Loffredo, C. & Miranda, MTM. (2005) Um marco na bioquímica e na medicina, *Ciência Hoje*, 36(214), 75-77. Remuzgo, C; Andrade, GFS; Temperini, MLA & Miranda, MTM. *Biopolym. – Pept. Sci.*, 92, 65-75, 2009.

- MACHADO, A. P. F.; MINIM, L. A.; FONTAN, R. C. I.; MINIM, V. P. R. GONÇALVEZ, G. R. F.; MÓL, P. C. G. Adsorptive behavior of α -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**. v. 401, p. 64-69, 2015.
- MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Modern stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.
- MALLAKPOUR, S.; RASHIMOGHADAM, S. Preparation, characterization, and in vitro bioactivity study of glutaraldehyde crosslinked chitosan/poly(vinyl alcohol)/ascorbic acid-MWCNTs biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 144, p. 389-402, 2020.
- MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.
- MARCUZ, M. **Síntese e avaliação de criogel monolítico contendo grupo epóxi reativo com o-fosfo-l-tirosina para adsorção de IgG e seus fragmentos. 97 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2019.
- MARQUES, F. S.; SILVA, G. L.; TRASH, M. E.; DIAS-CABRAL, A. C. Calorimetric approach to understanding pH and salt influence on the adsorption mechanism of lysozyme to a traditional cation exchanger. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 185, p. 1-29, 2020.
- MECITOGLU, Ç.; YEMENICIOGLE, A.; ARSLANOGLU, A.; ELMACI, Z. S.; KOERL, F.; ÇETIN, A. E. Incorporation of partially purified hen egg White lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. **Food Research International**. v. 13, p. 12-21, 2006.
- MEIRA, A. C. F. O. **Aplicação de criogéis funcionalizados com l-fenilalanina na adsorção de lisozima por cromatografia de afinidade hidrofóbica. 75 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2020.
- MELCHIORS, M. S. **Efeito do tratamento com fluidos pressurizados na conformação estrutural e atividade enzimática da lisozima. 98 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2017.
- MENG, A.; HONG, X.; ZHANG, Y.; YIN, J.; SHENG, L.; LI, Z. Na antifouling electrochemical aptasensor based on poly (glutamic acid) and peptide for the sensitive detection of adenosine triphosphate. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 1-7, 2021.
- MIHAILESCU, M.; NEGREA, A.; CIOPEC, M.; DAVIDESCU, C. M.; NEGRAE, P.; DUTEANU, N.; RUSU, G. Gold (III) adsorption from dilute waste solutions onto Amberlite XAD7 resin modified with L-glutamic acid. **Scientific Reports**, p. 1-13, 2019.
- MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER, M. R.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A.; Development of an affinity cryogel for one-step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.
- MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor-made anionic cryogel. **Process Biochemistry**. v. 82, p. 75-83, 2019.

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

NASCIMENTO, I. S.; SILVA, D. L.; PEREIRA, T. B.; GONÇALVES, G. R. F.; VERÍSSIMO, L. A. A.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 1, p. 313-324, 2019.

NASCIMENTO, R. F.; DE LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; DE QUADROS MELO, D.; RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**, 2014.

NASCIMENTO, R. G. **Desenvolvimento e caracterização de adsorventes monolíticos macroporosos para a purificação de bromelina**. 135 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2021.

NASCIMENTO, R. G.; PORFÍRIO, M. C. P.; NASCIMENTO, P. A.; ALVES, A. N.; SANTOS, L. S.; CRISTIANE, M. V.; BONOMO, R. C. F. A novel hydrophobic matrix grafted with aniline for protein capture and thermodynamic study of BSA adsorption. **Journal of Polymer and the Environment**, p. 1-9, 2022.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

NEVES, I. C. O.; RODRIGUES, A. A.; VALENTIM T. T.; MEIRA, A. C. F. O.; SILVA, S. H.; VERÍSSIMO, L. A. A.; RESENDE, J. V. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1161, p. 1-47, 2020.

NIKARA, S.; AHMADI, E.; NIA, A. A. Effect of different preparation techniques on the microstructural features of biological materials for scanning electron microscopy. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, 2020.

NISAR, S.; PANDIT, A. H.; NADEEM, M.; PANDIT, A. H.; RIZVI, M. M. A.; RATTAN S. γ -Radiation induced L-glutamic acid grafted highly porous, pH-responsive chitosan hydrogel beads: A smart and biocompatible vehicle for controlled anti-cancer drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 37-50, 2021.

NOGUEIRA, K. A. B. **Estudo da adsorção de biomoléculas (albumina de soro bovino e lisozima) em materiais mesoporosos**. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2016.

OMANA, D. A.; WANG, J.; WU, J. (2010). Ovomucine - a glycoprotein with promising potential. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p. 455-463, 2010.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos - Componentes dos alimentos e processos**. v. 1, 1ª Ed – Editora Artmed, 2005.

OZTURK, G.; SAYLAN, Y.; DENIZIL, A. Designing composite cryogel carriers for tyrosine adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 254, 2020.

PANARIELLO, L.; MAZZEI, L.; GAVRIILIDIS, A. Modelling the synthesis of nanoparticles in continuous microreactors: The role of diffusion and residence time distribution on nanoparticle characteristics. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 1144-1154, 2018.

PARIZZI, P. C. **Imobilização de b-galactosidase em criogel supermacroporoso para hidrólise da lactose. 72 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2015.

PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. **J. Recept. Signal Transduct. Res.** v. 24, p. 1-52, 2004.

PESSOA, JR. A; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** Ed1. São Paulo, Manole, 2005.

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

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

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

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in 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 super macroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004a.

RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V.; GEETHA, R. Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action. **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**, p. 249-444, 2019.

RAMOS, F.; LEDO, J. M.; FLORES, H.; CARARILLO, E. A.; CARVENTE, J.; AMADOR, M. P. Evaluation of sublimation enthalpy by thermogravimetry: Analysis of the diffusion effects in the case of methyl and phenyl substitutes hydantoins. **Thermochimica Acta**. v. 655, p. 181-193, 2017.

REIS, M, H. VARNER, T. P. LEIBFARTH, F. A. The influence of residence time distribution on continuous-flow polymerization. **Macromolecules**. v, 52, p. 3551-3557, 2019.

ROBERTS, J. A.; CARTA, G. Relationship between HETp measurements and breakthrough curves in short chromatography columns. **Biotechnology Progress**. p. 1-10, 2020.

RODRIGUES, J. R.; SIMÕES, C. J. V.; SILVA, C. G.; BRITO, R. M. M. Potentially amyloidogenic conformational intermediates populate the unfolding landscape of transthyretin: Insights from molecular dynamics simulations. **Protein Science**. v. 19, p. 202-219, 2010.

ROJAS, E. E. G.; ZINIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.

- RUSCHEL, C. F. C.; HUANG, C. T.; SAMIOS, D.; FERRÃO, M. F. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blendas de biodiesel/diesel. **Química Nova**. v. 37, n. 5, p. 810-815, 2014.
- SAGAR, J. S.; KASHYAP, S. J.; MADHU, G. M.; PRADIPKUMAR, D. Investigation of mechanical, thermal and electrical parameters of gel combustion-derives cubic zircônia/epoxy resin composites for high-voltage insulation. **Cerâmica**. v. 66, p. 186-196, 2020.
- SALVO, J. L. D.; LUCA, G. D.; CIPOLLINA, A.; MICALE, G. Effect of ion exchange and water uptake hydroxide transport in PSU-TMA membranes: A DFT and molecular dynamics study. **Journal of Membrane Science**, v. 598, p. 117837, 2020.
- SAMISTRARO, G.; DE MUNIZ, G. I.; PERALTA-ZAMORA, P.; CORDEIRO, G. A. Estimation of physical properties of kraft paper by near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1422-1425, 2009.
- SANTOS, S. M. L. **Síntese e caracterização de sílicas mesoporosas para a adsorção de biomoléculas modelo (BSA, Lisozima e Celulose). 135 p.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.
- SANTOS, C. M. S. **Desenvolvimento de adsorventes monolíticos macroporosos com concanavalina a imobilizada para a purificação de lectinas. 78 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2016.
- 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.
- SAYLAN, Y.; DENIZLI, A. Supermacroporous Composite Cryogel in Biomedical Applications. **Gels**, v. 5, p. 20, 2019.
- SELVAN, G. A.; RACHEL, S.; GAJENDRAN, T. Several assorted characterization methods of nanoparticles. **Nanomaterials**, p. 301-308, 2021.
- SERAVALLI, E, A, G; RIBEIRO, E, P. **Química de Alimentos**. 1° ed – São Paulo, SP: Editora Edgard Blucher Ltda, 2004.
- SHOW, P. L.; OOI, C. W.; LEE, X. J.; YANG, C-L.; LIU, B-L.; CHANG, Y-K. Batch and dynamic adsorption of lysozyme from chicken egg on dye-affinity nanofiber membranes modified by ethylene diamine and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 162, p. 1711-1724, 2020.
- SHOW, P. L.; OOI, C. W.; SONG, C. P.; CHAI, W. S.; LIN, G-T.; LIU, B-L.; CHANG, Y-K. Purification of lysozyme from chicken egg white by high-density cation exchange adsorbents in stirred fluidized bed adsorption system. **Food Chemistry**. v. 343, p. 1-12, 2021.
- SHUGAR, D. **BBA - Biochim. Biophys. Acta**, 8, 302, 1952.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. **Química Nova**. v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PÍLO-VELOSO, D. Characterization of synthetic polymers and speck impurities in cellulose pulp: A comparison between pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**. v. 2009, p. 108-116, 2009.

- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 2008.
- SONG, T.; XIONG, Z.; SHI, T.; YUAN, L.; GAO, R. Effect of glutamic acid on the preparation and characterization of Pickering emulsions stabilizes by zein. **Food Chemistry**, v. 366, p. 1-9, 2022.
- SOUZA, Y. G. **Produção de um adsorvente monolítico trocador catiônico e estudo termodinâmico da adsorção de lisozima**. 58 p. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2020.
- SRIVASTAVA, K.; S, A, K.; K, A. Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. **Enzyme and Microbial Technology**. v, 51, p. 373-381, 2012.
- SUN, L.; FENG, X.; ZHONG, T.; ZHANG, X. Preparation of supermacroporous with improved mechanical strength for efficient purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Separation Science**. v, 43, p. 3315-3326, 2020.
- TOHAMY, K. M.; MABROUK, M.; SOLIMAN, I. E.; BEHEREI, H. H.; ABOELNASR, M. A. Novel alginate/hydroxymethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffold for bone regeneration: *In vitro* cell viability and proliferation of human mesenchymal stem cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v, 112, p. 448-468, 2018.
- UYGUN, D. A.; KARAGOZLER, A. A.; AKGOL, S.; DENIZLI, A. Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 2165–2173, 2009.
- UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Concanavalin A immobilized poly (ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, p. 73-78, 2012.
- VALENCIA, F. E. G.; GIL, J. E.; GARCÍA, J. P.; BOTERO, S. Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* em co-cultivo com *Lactobacillus plantarum*, **Rev. Colomb. Biotecnol.** v. 20, n. 2, p. 68-77, 2018.
- VECHIA, C. A. D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A. P.; DIEL, K. P.; FAUST, C. MENIN, C.; GOMES, D. B.; ROMAN, J. W. A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Rev. Bras. PI. Med.** v. 18, n. 1, p. 288-296, 2016.
- VENTURA, A. M.; LAHONE, H. M. F.; S, E. E.; G, M. High-speed protein purification by adsorptive cation-exchange hollow-fibre cartridges. **Journal of Membrane Science**. v, 312, p. 350-355, 2008.
- VERÍSSIMO, L. A. A., PAGANOTO, F. S., MOL, P. C. G., ILHÉU FONTAN, R. D. C., MINIM, V. P. R., & MINIM, L. A. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1973-1982, 2017.
- WANG, S. S. S.; YANG, S. M. HSIN, A.; CHANG, Y. K. Dye-affinity nanofiber membrane for adsorption of lysozyme: preparation and performance evaluation. **Food Technology & Biotechnology**. v, 56, p. 42-50, 2017.

- XIA, Y. Q., GUO, T. Y., SONG, M. D., ZHANG, B. H., & ZHANG, B. L. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2601-2606, 2005.
- YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 876-880, 2011.
- YANG, S.; ZHANG, L.; LUO, K.; CHEW, J. W. DEM investigation of the axial dispersion behaviour of a binary mixture in the rotating drum. **Powder Technology**, v. 330, p. 94-104, 2018.
- YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based super macroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical engineering science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006a.
- YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. (2007). *In-situ* graft-polymerization preparation of cation-exchange super macroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 246-251, 2007.
- YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous super macroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 103-110, 2006b.
- YAVASER, R.; KARAGOZLER, A. A. Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for the treatment of effluents. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 137-146, 2021.
- YE, J.; WANG, C.; CHEN, X.; GUO, S.; SUN, M. Marine Lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. **Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins**, v. 77, p. 1261-1267, 2008.
- YUN, J.; TU, C.; LIN, D-Q.; XU, L.; GUO, Y.; S, S.; Z, A.; Y, K.; G, Y-X.; Y, S-Q. Microchannel liquid-flow focusing and cryo-polymerization preparation of super macroporous cryogel beads for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1274, p. 81-88, 2012.
- ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. (2006). Experimental and modelling study of adsorption in preparative monolithic silica column. **Chemical Engineering and Processing**, v. 45, p. 150-160, 2006.
- ZHAN, X-Y.; LU, D-P.; LIN, D-Q.; YAO, S-J. Preparation and characterization of super macroporous polyacrylamide cryogel beads for biotechnological application. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 130, n. 5, p. 3082-3089, 2013.
- ZHAO, Y.; LI, X.; YU, L.; DONG, X.; SUN, Y. Lysozyme adsorption to cation exchanger derivatized by sequential modification of poly (ethylenimine)-Sepharose with succinic anhydride and ethanolamine: Effect of pH and ionic strength. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2019.
- ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, 2003.