



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

**Desenvolvimento e caracterização de resina
cromatográfica supermacroporosa com potencial para a
separação de proteínas do soro de leite**

Alessandra Claudino

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del-
Rei.

Orientador: Edson Romano Nucci

Ouro Branco
Junho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Desenvolvimento e caracterização de resina cromatográfica supermacroporosa com potencial para separação de proteínas do soro de leite

Aluna: **Alessandra Claudino**

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Edson Romano Nucci – Orientador

Alessandra Costa Vilaça – examinador 1

Ênio Nazaré de Oliveira Junior – examinador 2

Ouro Branco, 26/06/2015

AGRADECIMENTO

À Deus, que através da força do teu espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho.

Ao professor Edson Nucci, pela orientação.

À professora Bruna Mara Aparecida de Carvalho pela co-orientação.

Aos professores mestres e doutores que a mim repassaram seus conhecimentos, fazendo que meu desenvolvimento fosse o melhor possível.

Aos amigos de iniciação científica que contribuíram com os resultados e conhecimento.

Aos meus amigos e colegas de curso e disciplinas que compartilharam comigo seus conhecimentos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Soro do leite.....	4
3.2. Albumina do Soro Bovino (BSA)	5
3.2.1. Propriedades funcionais da BSA	6
3.3. Criogéis de poli(acrilamida)	6
3.3.1. Caracterização das matrizes de criogel.....	9
3.4. Aplicação	10
3.5. Modelagem dos dados	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Material.....	13
4.2. Síntese da matriz.....	13
4.3. Caracterização das Matrizes	13
4.4. Acoplamento do ligante fenil	12
4.5. Isotermas de adsorção.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1. Produção do criogel	13
5.2. Caracterização do criogel	13
5.3. Isotermas de adsorção.....	15
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	22

RESUMO

Monólitos de criogéis supermacroporosos são suportes eficazes na separação em processos downstream. Neste trabalho, criogel de poliacrilamida com ligante fenil foi preparado com o objetivo de adsorver a proteína BSA (*bovine serum albumin*). A matriz de criogel foi caracterizada por medidas de capacidade de inchamento, porosidade. A modelagem dos dados para as amostras de BSA no sistema criogel-fenil foi analisada usando dados de equilíbrio adsorptivo para o modelo de Langmuir, o modelo de Freundlich e Langmuir-Freundlich. Os resultados experimentais mostraram porosidade em torno de 16,10%, capacidade de inchamento em torno de 4,82. Os modelos de Langmuir e Freundlich foram ajustados de maneira satisfatória, mostrando sim, a sua aplicabilidade em prever comportamentos de equilíbrio adsorptivo em sistemas líq-sol. A matriz apresenta-se como uma tecnologia promissora na área de bioseparações.

1. INTRODUÇÃO

Uma grande porcentagem do soro de leite produzido pelas indústrias de laticínios é descartada sem nenhum tratamento nos corpos de água, o que gera sérios impactos ambientais. Sendo que um dos problemas são a separação e purificação de biomoléculas de meios complexos, que pode conter até células e seus fragmentos. O soro é fonte de proteínas e peptídeos funcionais (0,7% m/m), lipídeos (0,1% m/m), vitaminas (0,1% m/m), minerais (0,5% m/m) e lactose (4,9% m/m) Em torno de 10 a 20% do conteúdo proteico do soro de leite é composto por BSA (ZADOW, 2006).

Uma característica estrutural relevante da BSA é a presença de 17 pontes dissulfeto na molécula, sendo que o rompimento dessas ligações resulta em modificações de algumas de suas propriedades físicas e estruturais e do perfil de solubilidade em função do pH (NELSON, 2011, COSTA, 2013).

Os processos cromatográficos são em geral preponderantes nos estágios de separação e purificação de compostos biológicos, sendo este processo um dos responsáveis mais impactantes do custo do processo. Portanto investir na otimização dos processos representa diretamente uma redução do custo de produção e aumento da qualidade do produto obtido (SHUKLA, 2007).

A cromatografia de leito fixo, cuja fase estacionária está empacotada em uma coluna, mesmo apresentando uma alta capacidade e resolução, não consegue processar soluções com materiais particulados, como por exemplo, homogenados celulares não clarificados. Isto ocorre, pois o material particulado diminui a porosidade do leito, aumentando a resistência do escoamento e consequentemente gera seu bloqueio (PESSOA JÚNIOR e KILKIAN, 2008).

A cromatografia de leito expandido veio para contornar este empecilho, já que o escoamento da fase móvel aumenta a porosidade, uma vez que as partículas do adsorvente ficam em suspensão. Como a porosidade aumenta o fluxo do material particulado passa sem aumentar a resistência ao fluxo na coluna. Mas apesar de todas essas vantagens este tipo de cromatografia exige colunas e tipos de equipamentos especiais.

Quando há a combinação das características da cromatografia de leito fixo com poros grandes, estes permitem a passagem de soluções com fragmentos celulares e materiais particulados sem comprometer o fluxo na coluna. Tais características estão presentes nas estruturas chamadas de criogéis.

Criogéis, géis poliméricos sintetizados em condições criogênicas, tem-se tornado

uma tecnologia muito útil na área de bioseparação, como em processamento de proteínas, vírus, entre outros. Isso acontece devido ao fato de que as condições criogênicas conferem a eles um sistema contínuo de macroporos interconectados com variação de tamanho de 10-100 μm , uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho, fatores que os tornam um tipo de fase estacionária muito atrativa para cromatografia (PLIEVA et. al, 2004).

2. OBJETIVO

Desenvolver um criogel supermacroporoso para avaliara a capacidade adsortiva da proteína BSA (*bovine serum albumin*), ajustando os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich, visando à aplicação deste criogel para a purificação de proteínas do soro de leite.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Soro do leite

O soro do leite é o líquido residual extraído a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína e pode ser obtido através de três processos principais: coagulação enzimática, resultando na precipitação de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos; precipitação ácida ao atingir o pH isoeletrico da caseína; separação física das micelas de caseína por microfiltração; obtendo-se independentemente do processo um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (BRASIL, 2005 ; SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006).

O soro do leite apresenta proteínas de estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídos de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP) conforme mostrado na tabela 1. Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais. Presentes em todos os tipos de leite, a proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça do gado, da ração fornecida e do país de origem (AIMUTIS, 2004, HARAGUCHI, 2006).

Tabela 1. Propriedades e composição das frações proteicas no leite.

Frações Proteicas	Aminoácidos	Massa Molar (KDa)	Total de proteínas no Leite (%)
β -lactoglobulina	162	18	12
α -lactoalbumina	123	14	3,5
Imunoglobulinas	--	1000-1430	2
Glico-macropéptídeo	689	7	--
Albumina do Soro Bovino	582	66	1
Lactoferrina	612	80	--
Lactoperoxidase	64	78	--

Fonte: ALMEIDA, 2013.

3.2. Albumina do Soro Bovino (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA) está presente no leite em concentrações próximas de 0,1 a 0,4 g.L⁻¹. Possui massa molecular de 66,4 kDa, dimensões 4 x 14 nm e ponto isoelétrico igual a 4,9, possuindo assim, um caráter ácido (KADI et al, 2006). É constituída de 582 resíduos de aminoácidos, sendo a proteína com maior cadeia de polipeptídeo das proteínas do soro, possuindo 17 ligações de dissulfetos e um grupo de sulfidrílico livre no resíduo 34 (PETERS,1985, COSTA, 2013).

A estrutura secundária da BSA é majoritariamente α -hélice, e ainda possui alta flexibilidade. A molécula de BSA é constituída por três sub-domínios I, II e III (figura 1), os quais apresentam, em pH neutro, uma carga eletrostática de -10, -8 e 0, respectivamente (PETERS,1985, COSTA, 2013).

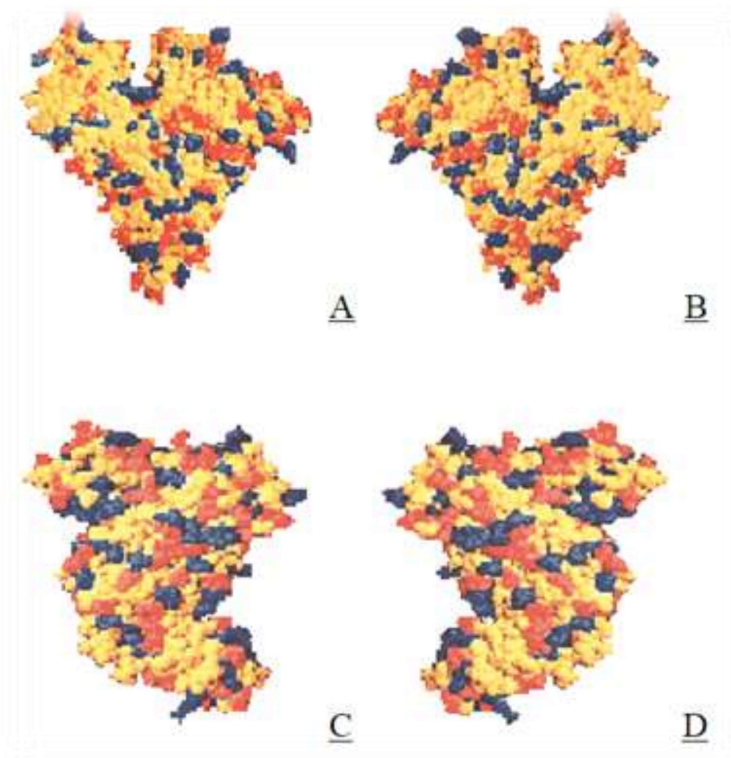


Figura 1. Modelo da molécula de albumina sérica (BSA) identificando regiões dos domínios I, II e III, os resíduos de aminoácidos básicos em azul, neutros em amarelo, e ácidos em vermelho, em pH neutro (CARTER e HO, 1994).

É um peptídeo de alta massa molar caracterizado pelo baixo número de triptofano e metionina, rico em cistina (aproximadamente 6%), aminoácidos carregados, ácido aspártico e glutâmico, lisina e arginina (FERREIRA, 2009).

Relevante precursor da síntese de glutathiona. A ligação da BSA com ácidos graxos corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. Possui afinidade por

ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sanguínea, uma vez que estabiliza as moléculas evitando a desnaturação pelo calor. É solúvel em água até 35% a 3 °C, mas nota-se uma extensiva precipitação na faixa de temperatura de 40 a 50 °C (HARAGUGHI, 2006, VEREDAS, 2000).

A proteína BSA é muito empregada em estudos de adsorção em superfícies de materiais devido ao grande conhecimento de sua estrutura, sua função e seu baixo custo.

3.2.1. Propriedades funcionais da BSA

Como já mencionado a BSA é um dos principais carreadores de ácido graxos, os quais em outra forma são insolúveis. Ela também realiza diversas funções como desativação de vários metabolitos lipofílicos tóxicos, como bilirrubina e também eliminação de radicais livres de oxigênio (FERREIRA, 2009).

A albumina tem afinidade grande por compostos aromáticos pequenos carregados negativamente e alta afinidade por ácidos graxos, hematinas, bilirrubina. Forma ligações covalentes com fosfato de piridoxil, cisteína e diversos metais, como por exemplo, Ag(II), Au(II), Cu(II), Hg(II) e Ni(II) (FERREIRA, 2009).

Por ser uma proteína de transporte multifuncional, é carregador chave ou reservatório de óxido nítrico, influenciando em vários processos fisiológicos importantes, incluindo neurotransmissão (FERREIRA, 2009).

3.3. Criogéis de poli(acrilamida)

Géis poliméricos têm sido utilizados em diversas áreas da biotecnologia, como por exemplo, suportes para a imobilização de células, materiais para eletroforese assim como também cromatográficos. Os criogéis, devido a propriedades, como macroporosidade, boa elasticidade, tem despertado o interesse em diversos trabalhos no campo da biotecnologia (ARVIDSSON et al., 2002 e 2003).

Géis poliméricos consistem em um sistema “polímero-solvente imobilizado”, no qual macromoléculas interligadas por interações químicas formam uma cadeia 3D (LOZINSKY, 2003, CARVALHO et al, 2013).

Há duas vias principais para a produção de géis poliméricos sendo elas: via inchamento limitado ou via inchamento de um xerogel, sendo que parte da formação em um sistema líquido. Assim o sistema inicial é composto por uma solução de monômeros em que a gelatinização ocorre por polimerização ramificada ou resultado das ligações

cruzadas químicas. A gelatinização criotrópica é um tipo específico de síntese de géis, sendo que o tratamento criogênico permite a formação de géis, o produto de tal processo é chamado de criogel. (LOZINSKY, 2003, CARVALHO et al, 2013).

Na produção de géis poliméricos de poliacrilamida os componentes comumente utilizados são acrilamida, N,N'-metileno-bis(acrilamida), tetrametilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio, suas estruturas podem ser observadas na figura 2.

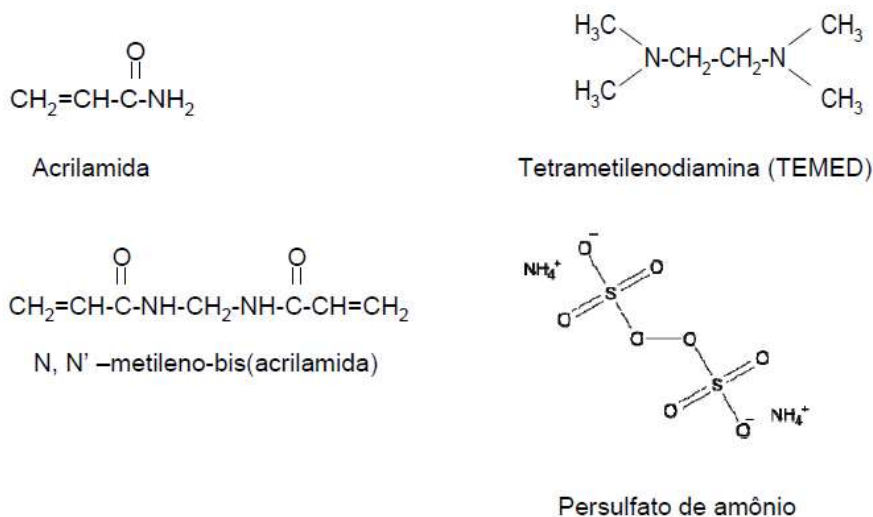


Figura 2. Estrutura dos componentes usados na síntese de géis de acrilamida (CARVALHO, 2010).

Quando em solução, o persulfato de amônio forma radicais livres e estes em contato com acrilamida ocorre uma reação radicalar (figura 3).

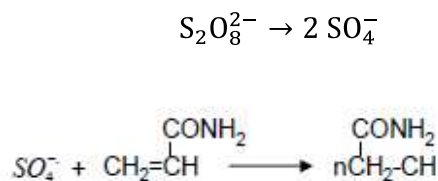


Figura 3. Radicais livres de persulfato de amônio e reação radicalar com a acrilamida.

Nesta forma a acrilamida pode reagir em cadeia com outras acrilamidas, produzindo longas cadeias de polímero, esta solução apesar de viscosa não forma gel. A geleificação ocorre quando há o enlace de várias cadeias, esta polimerização ocorre na presença de N,N'-metileno-bis(acrilamida), o qual é um composto com duas moléculas de acrilamida em suas extremidades em terminações não reativas (ADNADJEVIC & JOVANOVIC, 2009).

Assim forma-se uma rede de acrilamida, como demonstrado na figura 4. O tamanho dos poros da rede é determinado segundo dois parâmetros: pelo conteúdo de acrilamida por unidade de volume e pelo grau de ligação-cruzada.

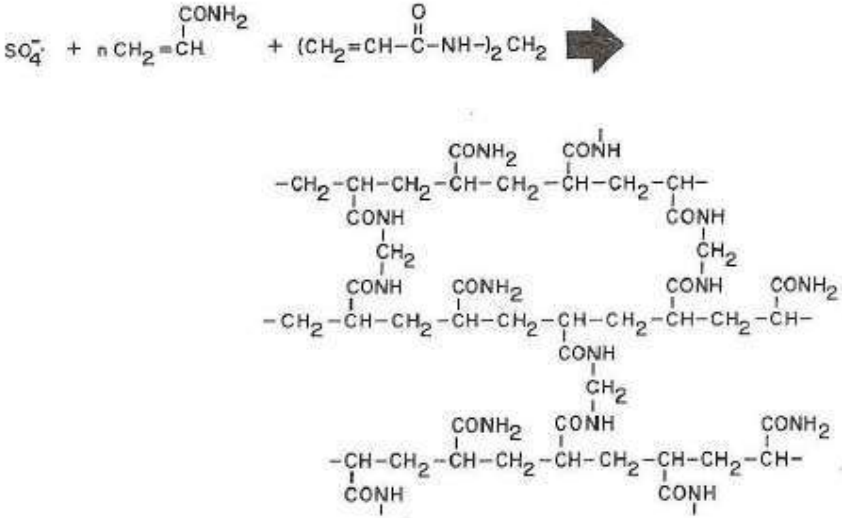


Figura 4. Reações das ligações cruzadas em cadeias de acrilamida.

A média do tamanho dos poros alcança um mínimo quando total usado de poliacrilamida 5% é de N,N'-metileno-bis(acrilamida), com isso em muitas formulações o conteúdo de (bis)acrilamida utilizado é de 5% para controlar o tamanho do poro (Tabela 2). O tamanho dos poros ainda pode ser controlado pela variação no conteúdo total de acrilamida, o que pode ser observado na figura 5 (ARVIDSSON et al, 2002, CARVALHO, 2010).

Tabela 2. Efeito da concentração de bis(acrilamida) no tamanho médio dos poros (raio em Å°).

Total de acrilamida + N,N'-metileno-bis(acrilamida) (m/v)	% de N,N'-metileno-bis(acrilamida) do total de acrilamida			
	1	5	15	25
6.5	24	19	28	-
8.0	23	16	24	36
10.0	19	14	20	30
12.0	17	9	-	-
15.0	14	7	-	-

Fonte: Cooper (1997).

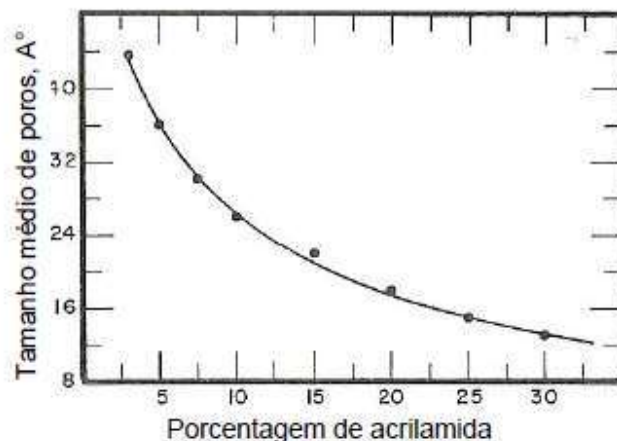


Figura 5. Influência da concentração de acrilamida no tamanho médio dos poros (Fonte: Cooper, 1997).

Para catalisar a formação do gel o usa-se o tampão TEMED, devido aos radicais livres deste. Tampões também mantêm o pH dentro do gel e ainda conduz corrente através de um campo elétrico.

Analisando micro e macroscopicamente Butler e Bruice (1964) e Pinock (1966) evidenciaram que em soluções moderadamente congeladas a microfase líquida não congela. Assim as substâncias dissolvidas concentram-se na região não congelada, tal efeito é chamado de crioconcentração.

Estudos termodinâmicos mostraram que o sistema possui duas fases, uma policristalina do solvente puro congelado e outra microfase não congelada contendo os componentes dissolvidos na solução inicial. Lozinsky (1986) ainda mostrou que poros maiores foram formados no ponto de congelamento mais alto, ou seja, quanto menor a temperatura menor o tamanho médio dos poros (LOZINSKY, 1986).

3.3.1. Caracterização das matrizes de criogel

Os criogéis possuem um sistema de macroporos interconectados com tamanhos que variam de 10-100 μm , diferenciando-se por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão facilitada por solutos de qualquer tamanho. Isto confere vantagens quando comparadas a cromatográfica de leito fixo, não sendo capaz de processar materiais particulados e a cromatografia de leito expandido, a qual requer equipamentos especiais.

Para caracterizar as matrizes cromatográficas existem diversas metodologias, dentre elas pode-se citar a porosidade. A água no interior do criogel é encontrada de

várias formas, sendo ligado ao polímero, dentro dos pequenos poros ou grandes poros. Esta é responsável pela porosidade, podendo ser retirada mecanicamente por compressão do criogel, já que este possui uma elasticidade intrínseca. Para calcular a porosidade mede-se o conteúdo de água livre presente e o volume, calculando-se pela fórmula a seguir descrita por Yao et al., 2006.

$$\varphi = \frac{m_w - m_s}{\rho_w V_0} \quad (1)$$

Onde m_w é a massa da amostra saturada de água e m_s a massa da amostra após a remoção da água livre, ρ_w é a densidade da água e V_0 é a diferença entre V_2 e V_1 , sendo que V_2 é o volume final após imersão da amostra em uma proveta graduada contendo água e V_1 é o volume inicial de água na proveta (ARVIDSSON et al., 2003).

3.4. Aplicação

Utilizar o criogel para captura direta de biomacromoléculas tem se tornado uma opção atraente, pois como já mencionado, eles possuem poros interconectados de diversos tamanhos, permitindo que o escoamento de massa através dos poros seja convectivo e apresenta baixa resistência a transferência de massa.

O transporte convectivo através dos poros com um diâmetro acima de 1000 nm faz com que a capacidade de interação com a matriz não mude com a velocidade, isto tem sido verificada experimentalmente e também apoiada por análises teóricas. Apesar da baixa área de superfície total, estes poros proporcionam uma área suficiente para a adsorção destas biomoléculas grandes, que não podem penetrar nos meios de cromatografia convencionais concebidos para a separação de proteínas (JUNGBAUER e HAHN, 2008).

Os criogéis tem uma ampla aplicação na microbiologia, pois suas propriedades, como macroporosidade, biocompatibilidade, estabilidade físico-química, mostrou-se eficiente para o processamento de suspensões de células e vírus, purificação de células, dentre outras linhas de pesquisa da microbiologia.

De acordo com Jungbauer & Hahn, 2008, os monólitos são considerados como o material de cromatografia de quarta geração, e sua utilização para a separação preparativa de biomoléculas tem evoluído. Colunas de monolíticos até 8L em tamanho já estão comercialmente disponíveis para a separação de grandes biomoléculas tais

como proteínas, agregados proteicos, DNA plasmídeo e vírus. Devido a propriedades inerentes dos monólitos, como operação rápida e de alta capacidade para biomoléculas grandes, tem-se tornado interessante para estas aplicações (JUNGBAUER e HAHN, 2008).

3.5. Modelagem dos dados

A isoterma de adsorção representa a quantidade de um determinado soluto adsorvido por uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto. Para se construir uma isoterma de adsorção coloca-se em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido em diferentes concentrações iniciais e em temperatura constante até o equilíbrio, determinando-se assim a quantidade de material adsorvido. No processo de adsorção, a temperatura, o pH, e o tipo de material adsorvente são parâmetros que influenciam na forma da isoterma (VEGLIO et al. 2003).

Os modelos de isoterma de Langmuir e de Freundlich são os mais comumente utilizados na literatura. O modelo de isoterma de Langmuir assume que todas as forças que atuam na adsorção são similares em natureza aquelas que envolvem uma reação química e que a adsorção se resume em uma única camada de moléculas da substância sobre a superfície das partículas sólidas (TAGLIAFERRO, 2011).

$$q = \frac{q_m C^*}{(k_d + C^*)} \quad (2)$$

Onde q_m é a capacidade máxima adsorptiva do adsorvente, k_d é a constante de equilíbrio da adsorção, q é a concentração da proteína no adsorvente e C^* concentração da proteína na fase líquida.

Para validar as suposições que os sítios de interação estão presentes na superfície do adsorvente, faz-se a linearização, assim tem-se o semirecíproco:

$$\frac{C^*}{q_e} = \frac{K_d}{q_m} + \frac{C^*}{q_m} \quad (3)$$

O gráfico linear C^*/q_e vs C^* confirma a validade do modelo de Langmuir para o processo. A equação de reta obtida apresenta coeficiente angular correspondente a $1/q_m$ e coeficiente linear correspondente a K_d/q_m . Se C^*/q_e vs C^* apresentar-se convexo o

cooperativismo é negativo, se é linear a interação independente entre a proteína e sítios ligantes é ressaltada, já se for côncavo o cooperativismo positivo é observado.

O modelo de isoterma de Freundlich considera que a adsorção ocorre em multicamadas e é útil para descrever a adsorção em superfícies altamente heterogêneas.

$$q^* = KC^\eta \quad (4)$$

Sendo K a constante de equilíbrio de Freundlich e η o fator capacidade da isoterma de Freundlich.

A forma linear da Equação de Freundlich é dada pela equação abaixo (TAGLIAFERRO, 2011).

$$\log q^* = \log K_f + 1/n \log C_e \quad (5)$$

Sendo K_f e n constantes relacionadas com a capacidade de adsorção. Os valores de K_f e n podem ser obtidos pela intersecção e inclinação do gráfico linear de $\log q^*$ vs $\log C_e$. O valor de n entre 2 e 10 indica adsorção favorável (TAGLIAFERRO, 2011).

Os modelos de Langmuir e Freundlich podem ser combinados para descrever o comportamento das proteínas em adsorventes de afinidade.

$$q^* = \frac{q_{m(LF)}(C^*)^\eta}{K_d^* + (C^*)^\eta} \quad (6)$$

Onde K_d^* é a constante de dissociação aparente, a qual inclui contribuições das ligações dos ligantes em monômeros, dímero-monômeros. O $q_{m(LF)}$ é a capacidade máxima de ligação, e η é o coeficiente numérico da isoterma de Langmuir-Freundlich (TAGLIAFERRO, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Acrilamida (AAM, 99,9%), N,N'-Metilenobisacrilamida (MBAAM, 99%), alil glicidil éter (AGE) Per-sulfato de Amônio (APS, 98%), N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED, 99%), Citrato de Sódio, Fosfato de Sódio, Cloreto de Sódio, água Mili-Q, HCl 10 M, NaOH 6 M. Banho ultratermostático, sonificador, bomba peristáltica, estufa, pHmetro, BOD, Seringas de 10 mL, béquer, balão volumétrico, proveta, microtubos do tipo Eppendorf, filtro para seringa 0,22 μ m.

4.2. Síntese da matriz

A produção da matriz de criogel foi desenvolvida no laboratório da Universidade Federal de São João del-Rei *campus* Alto Paraopeba, de acordo com a metodologia de Kumar et al (2006), segundo as seguintes modificações: dissolução de 4,74 g de AAM, 1,27 g de MBAAM e 1 mL de AGE em 100 mL de água Mili-Q e desgaseificação desta solução em ultrassom por 5 ciclos de 1min; adicionou-se 95 μ L de TEMED, homogeneizou-se a solução e levou-a para o banho de gelo por 5 minutos; foi acrescentado 110 mg de APS. Injetou-se 10 mL da solução reacional em seringas, vedou-as e as amostras foram mantidas em banho ultratermostático a -12°C *overnight*. Por fim, lavou-se cada resina com 50 mL água deionizada sob vazão de 1 mL/min usando bomba peristáltica.

4.3. Caracterização das Matrizes

Para a caracterização das matrizes os experimentos foram realizados em três monólitos diferentes, sendo que para cada monólito foram realizadas duplicatas, realizou-se isto para os protocolos de capacidade de inchamento e porosidade.

Capacidade de Inchamento: A capacidade de inchamento do criogel ($S_{w/w}$) foi determinada por meio da imersão das matrizes em recipientes contendo água por um intervalo de 2 h. A cada 15 min os recipientes foram agitados manualmente e de forma lenta. Em seguida, retirou-se o excesso de água das matrizes e, então, obteve-se o peso úmido (m_w) das mesmas. As matrizes foram secas a 60°C até peso constante, as massas das amostras secas (m_d) foram determinadas e a capacidade de inchamento foi calculada pela equação:

$$S_{w/w} = \frac{(m_w - m_d)}{m_d} \quad (7)$$

Onde $S_{w/w}$ é a capacidade de inchamento (g H_2O / g de gel seco) e m_w e m_d são as massas (g) da amostra em peso úmido e seco, respectivamente.

Porosidade: a porosidade do monólito de criogel foi avaliada de acordo com o procedimento relatado em Yao *et al.* (2006) e, então, calculada segundo a equação (1).

4.4. Acoplamento do ligante fenil

A matriz de criogel (10 mL), seca a 60°C até massa constante, foi cortada em pequenos pedaços. Equilibrou-se a coluna com 50 mL de tampão de carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5 a uma vazão de 2mL/min. Preparou-se 30 mL de solução de fenol 0,3 mol L⁻¹, em tampão carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 10, esta foi bombeada na coluna a uma vazão de 1,2 mL em modo de refluxo, durante 24 h. Em seguida, tratou-se a coluna solução de etanolamina 0,1 mol L⁻¹, em tampão carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 9,5, por 3 h. Por fim lavou-se o sistema criogel-fenil com água até pH neutro. As amostras foram secas a temperatura de 60 °C até que sua massa permanecesse constante.

4.5. Isotermas de adsorção

Realizaram-se os experimentos seguindo o delineamento fatorial, considerando três variáveis: pH, concentração de NaCl e temperatura. Fez-se os experimentos nos pHs de 3,3 e 4,5, utilizando tampão de citrato de sódio 20 x 10⁻³ mol L⁻¹ e pH 6,2, utilizando o tampão de fosfato de sódio 20 x 10⁻³ mol L⁻¹ como tampão de equilíbrio. Já as temperaturas foram 25°C, 30°C e 40°C e as concentrações de NaCl foram de 50 x 10⁻³ mol L⁻¹ e 150 x 10⁻³ mol L⁻¹. 15 ± 5 mg da matriz de criogel foram pesadas e colocadas em microtubos de 2 mL. Colocou-se o tampão de equilíbrio e a BSA em diferentes quantidades, obtendo no final concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 e 2 mg/mL de BSA em um volume total de 1,3 mL. Os tubos foram postos em uma incubadora com temperatura controlada (BOD) com agitação constante por 12 h. Após o sobrenadante era filtrado com filtro para seringa e a concentração mensurada por espectrometria a 280 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção do criogel

As matrizes de criogel obtidas apresentaram-se como um monólito esponjoso (figura 6), com a formação de supermacroporos, como esquematizado na figura 7. A formação destes poros possibilitam a passagem de moléculas grandes e confere elasticidade ao monólito.

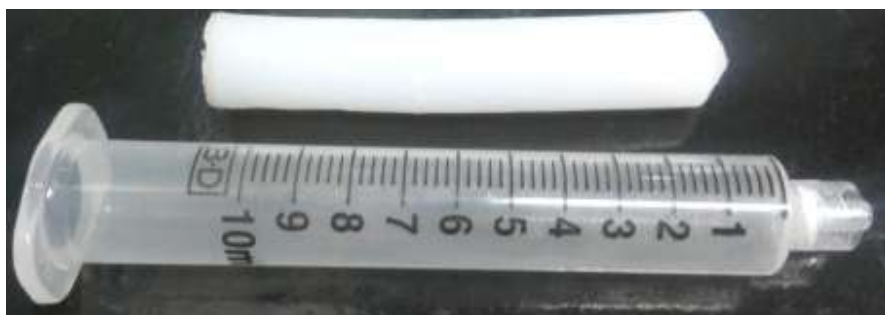


Figura 6. Monólito de criogel após banho ultratermostático a -12°C *overnight*.

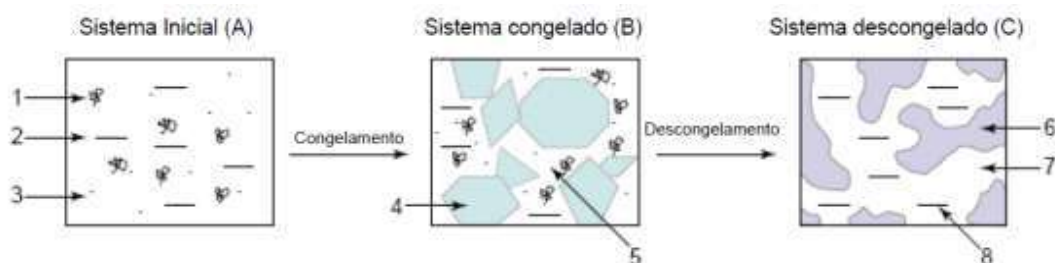


Figura 7. Apresentação esquemática da criopolimerização e formação da estrutura de supermacroporosa em uma matriz de polímero contínua. 1, precursor de alto peso molecular; 2, solvente; 3, precursor de baixo peso molecular ou substâncias solúveis; 4, policristais do solvente congelado; 5, microfase líquida não congelada; 6, rede polimérica do criogel; 7, macroporos e 8, solvente descongelado. Inicialmente ocorre a polimerização em volta do cristal de gelo e depois do descongelamento ficam os poros. Fonte (LOZINSKY, 2003).

5.2. Caracterização do criogel

Após a produção dos criogéis, os mesmos foram caracterizados de acordo com a metodologia descrita por Yao et al. (2006), e os dados obtidos da caracterização do monólito são apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Parâmetros da caracterização da matriz de criogel sintetizado.

Monólito	m_d (g)	$m_w(g)S_{w/w}$	$m_d(g)\phi$	$m_s(g)\phi$	$m_w(g)\phi$	V_1 (mL)	V_2 (mL)	V_0 (mL)
1	0,20425	1,05225	0,08105	0,5447	1,0893	15	15,3	0,3
2	0,1373	0,9265	0,03875	0,2397	0,66265	15	15,15	0,15
3	0,1886	1,06185	0,118	0,88255	1,70785	15	15,4	0,4

Tabela 4. Valores da caracterização do monólito de criogel, capacidade de inchamento, porosidade e fração total de água.

Coluna	$S_{w/w}(g_{H_2O}/g_{gel\ seco})$	ϕ (%)	F.T.A (v/v)
1	4,1 ($\pm 0,5$)	16,0 ($\pm 0,1$)	36 (± 5)
2	5,748 ($\pm 0,006$)	6,3 ($\pm 0,1$)	9,3 ($\pm 0,3$)
3	4,6 ($\pm 0,3$)	33 ($\pm 0,1$)	63 (± 4)
Média	4,8 ($\pm 0,6$)	18,5 ($\pm 0,1$)	34 (± 6)

Sendo que AAm é responsável pela linearidade das cadeias e a MBAAm fornece ligações cruzadas na etapa de polimerização, assim quanto mais próxima a relação AAm/MBAAm, mais compacta será a estrutura, tendo reflexo direto na capacidade de inchamento, tornando-a menor. O valor médio encontrado para a capacidade de inchamento foi de 4,8, valor este próximo do descrito pela literatura, o qual é 4,15, para a concentração final de 6% de monômeros (ARVIDSSON et al., 2002, KUMAR et al., 2003).

O resultado apresentou-se satisfatório já que a capacidade de inchamento é uma forma de medir a expansão da matriz, assim valores altos podem não ser atrativos, uma vez que as matrizes de criogel seriam mais maleáveis, suportando menos às pressões.

A porosidade média encontrada foi de 18,5% e o conteúdo de água total no monólito foi de 34,% (v/v), assim em torno de 15,95% da água total ficaram retidas na matriz do polímero e nos pequenos poros, onde há pouca probabilidade do fluido corrente passar. Esse percentual condiz com o descrito em literatura, contudo os valores da porosidade e fração total de água foram baixos quando comparado ao da literatura, mostrando que o monólito possuía pouca água livre.

5.3. Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção, construídas a partir de dados experimentais, foram ajustadas de acordo com os modelos das isotermas de Langmuir e Freundlich. Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustaram-se de maneira satisfatória, apresentando-se como modelos com aplicabilidade aceitável para prever o comportamento adsorptivo do sistema. As condições que apresentaram mais adsorção e melhores ajustes podem ser observadas na tabela 5 e as isotermas podem ser analisadas na figura 8.

Tabela 5. Condições de temperatura (°C), pH e concentração de salina (10^{-3} mol L⁻¹) que apresentaram melhor adsorção.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de NaCl (mM)
25	3,3	150
25	4,5	50
30	4,5	150
30	6,2	150
40	4,5	150
40	6,2	150

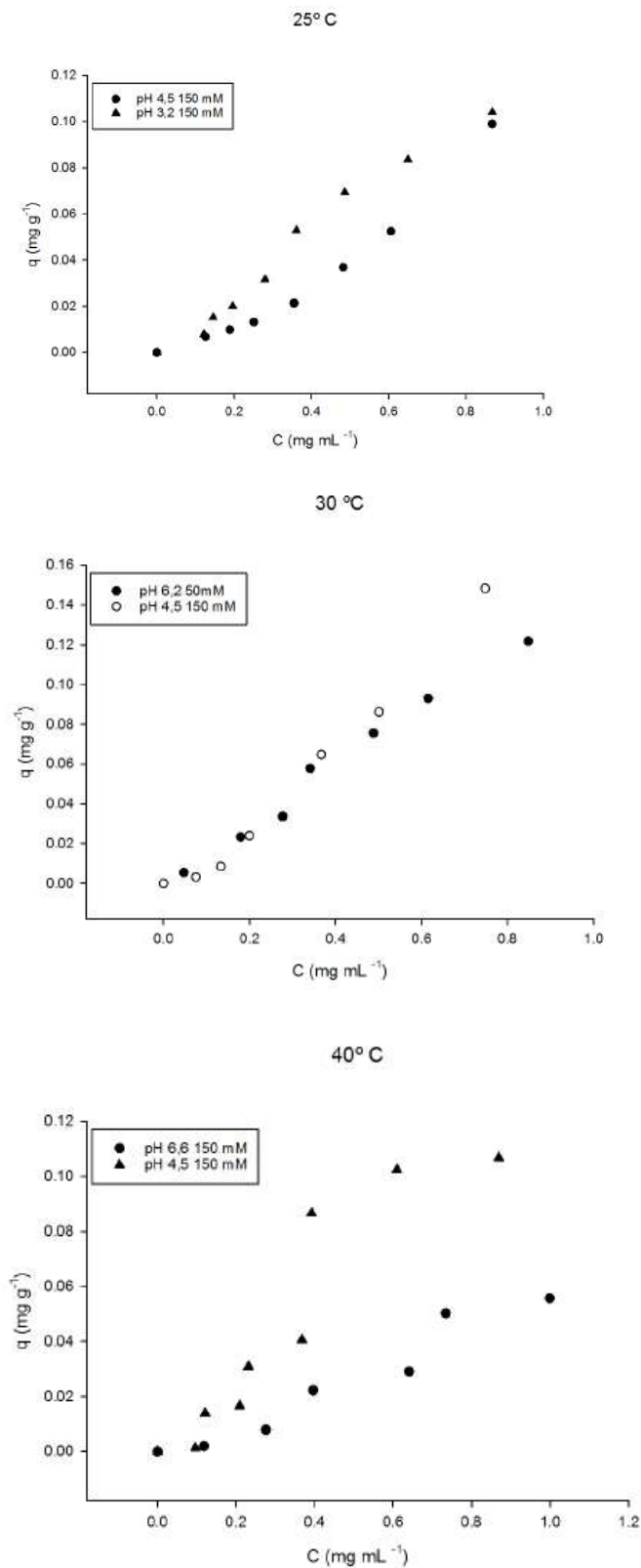


Figura 8. Isothermas obtidas nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C.

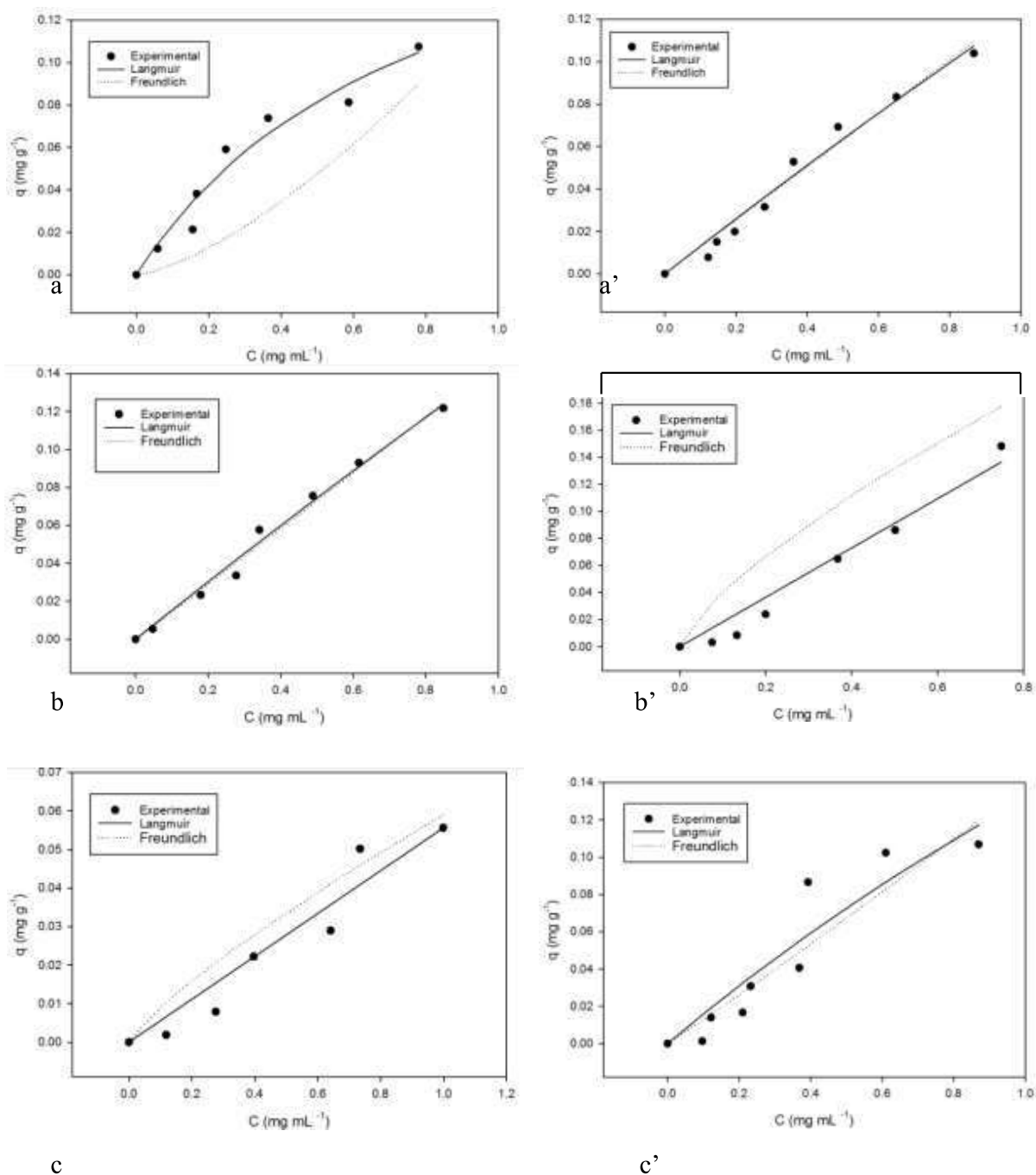


Figura 9. Isothermas de adsorção de BSA no complexo criogel-fenil ajustado aos modelos de Langmuir e Freundlich: a isoterma obtida a temperatura de 25°C sendo (a) 50mM, pH4,5 e (a') 150mM pH 3,3. Isothermas obtidas à temperatura de 30°C (b) 50mM, pH 6,2 e (b') 150mM, pH 4,5. Temperatura de 40°C (c) pH 6,2 150 mM e (c') pH 4,5 150mM.

O ajuste foi realizado em função das concentrações de NaCl, temperatura e pH avaliados e para ajustar os dados experimentais utilizou os valores dos parâmetros de cada um dos modelos, apresentados nas tabelas de 6 a 8.

Tabela 6. Parâmetros do modelo de Langmuir.

T °C	pH	NaCl (mM)	q_m	K_d	R^2
25	3,3	150	1,6939	12,817	0,96
25	4,5	50	0,2112	0,7911	0,91
25	4,5	150	$1,47 \times 10^7$	$1,58 \times 10^9$	0,93
25	6,2	150	$1,28 \times 10^9$	$1,14 \times 10^{10}$	0,94
30	3,3	50	$1,26 \times 10^9$	$1,34 \times 10^{10}$	0,89
30	4,5	50	$5,14 \times 10^8$	$4,07 \times 10^9$	0,87
30	4,5	150	$1,02 \times 10^8$	$5,58 \times 10^8$	0,88
30	6,2	50	2,4597	16,012	0,81
30	6,2	150	$2,43 \times 10^6$	$1,40 \times 10^7$	0,79
40	3,3	50	$7,92 \times 10^7$	$5,12 \times 10^8$	0,77
40	3,3	150	$1,99 \times 10^5$	$8,63 \times 10^5$	0,69
40	4,5	50	$2,67 \times 10^8$	$9,30 \times 10^8$	0,67
40	4,5	150	0,6905	4,2524	0,92
40	6,2	50	$3,86 \times 10^6$	$1,92 \times 10^7$	0,91
40	6,2	150	$1,02 \times 10^8$	$5,58 \times 10^8$	0,87

Os dados ajustados para o modelo de Langmuir apresentaram resultados relativamente satisfatórios, já que o coeficiente de correlação (R^2), o qual indica a porcentagem de ajuste do modelo à amostra, variou entre 67% até 96%. Uma possível explicação para isto foram os altos valores de K_d , o qual representa a razão entre a constante de dessorção e a de adsorção. Valores pequenos para K_d significam que a constante de adsorção é bem maior do que a constante de dessorção, indicando que a adsorção ocorre rapidamente e que o equilíbrio é atingido rapidamente. Assim o equilíbrio pode não ter sido atingido (ARAÚJO, 1996).

Tabela 7. Parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich.

T °C	pH	NaCl (mM)	q _m	K _d	η	R ²
25	3,3	150	0,1	0,01	3	0,86
25	4,5	50	0,1263	0,1664	1,5322	0,92
25	4,5	150	8,7x10 ⁵	7,0x10 ⁶	1,6617	0,48
25	6,2	150	1,1	2,01	3	0,87
30	3,3	50	7831	53245	2,2705	0,91
30	3,3	150	0,6834	0,8568	3,3643	0,93
30	4,5	150	0,4029	1,0591	1,6989	0,90
30	6,2	50	0,2288	0,6918	1,4948	0,95
30	6,2	150	11871	38085	1,9144	0,89
40	3,3	50	10695	59965	1,4706	0,91
40	3,3	150	0,5303	1,0251	1,9994	0,76
40	4,5	50	3,3046	6,7546	1,9013	0,87
40	4,5	150	0,1180	0,0463	2,9582	0,81
40	6,2	50	1,4x10 ⁴	4,5x10 ⁴	2,46	0,47
40	6,2	150	0,0865	0,5255	2,1019	0,89

Tabela 8. Parâmetros do modelo de Freundlich

T °C	pH	NaCl (mM)	K	η	R ²
25	3,3	150	0,1260	0,9955	0,7653
25	4,5	50	0,1283	1,4323	0,7923
25	4,5	150	0,1243	0,6018	0,7431
25	6,2	150	0,1831	0,6243	0,9485
30	3,3	50	0,1471	0,4404	0,8257
30	3,3	150	0,5603	0,3287	0,9687
30	4,5	150	0,2208	0,7444	0,8633
30	6,2	50	0,1470	1,0085	0,8773
30	6,2	150	0,3117	0,5224	0,9134
40	3,3	50	0,1784	0,6800	0,7615
40	3,3	150	0,2786	0,6721	0,6992
40	4,5	50	0,4432	0,5483	0,9177
40	4,5	150	0,1383	1,0369	0,8367
40	6,2	50	0,3299	0,4065	0,9445
40	6,2	150	0,0591	0,8187	0,7089

A proteína BSA apresentou melhor resposta de interação com o sistema criogel-fenil quando a concentração de NaCl era maior. A concentração de sal no sistema tem um profundo efeito sobre a distribuição da proteína entre as fases. Quando a força iônica é maior, há um maior número de íons cloreto em solução competindo com a proteína, levando a uma menor adsorção (ARAÚJO, 2006). E ainda a adição de sal reduz as interações eletrostáticas, mas reforça as interações de coordenação e hidrofóbicas, assim ocorrem diferentes tendências para diversas proteínas, dependendo de sua hidrofobicidade (BRESOLIN, 2009).

O efeito da temperatura é um evento mais complexo de se avaliar, já que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do soluto, quanto do adsorvente, como ainda mudanças conformacionais na proteína.

Em relação ao pH, o que apresentou melhor adsorção foi de 4,5, próximo do ponto isoelétrico, alterando a conformação da proteína deixando-a com mais afinidade pelo ligante fenil do monólito

6. CONCLUSÃO

O monólito de criogel é uma boa opção para o uso em cromatografias que apresentam partículas em suspensão devido a suas características intrínsecas, como supermacroporos.

O criogel mostrou-se eficiente na adsorção, sendo que os resultados obtidos apresentaram boa resposta de interação entre o sistema criogel-fenil com a proteína BSA. A caracterização do monólito obteve bons resultados, sendo estes porosidade em torno de 16,10% e capacidade de inchamento em torno de 4,82.

Assim monólitos de criogel mostraram-se uma tecnologia promissora para futuramente ser testada no processamento do soro de leite para o reaproveitamento das proteínas contidas neste, já que estas possuem diversas aplicações.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AIMUTIS, W. L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *J Nutr.*; 134(4):989s-95s, 2004.
- ADNADJEVIC, B., JOVANOVIĆ, J., A comparative kinetics study of isothermal drug release from poly(acrylic acid) and poly(acrylic-co-methacrylic acid) hydrogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69, 31–42, 2009.
- ALMEIDA C.C, CONTE Jr. C.A., SILVA A. C. de O, ALVARES T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, Goiânia, v.9, N.16; p 1840-1854, 2013.
- ARAÚJO, M. O. D. Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.
- ARVIDSSON, P, PLIEVA, F.M, SAVINA, I.N, LOZINSKY, V.I, FEXBY, S, BÜLOW, L, GALAEV, I.Y, MATTIASSON, B. *Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns*. *J. Chromatogr. A* 977:27–38, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº16 de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. Brasília, DF, 2005.
- BRESOLIN, I.T.L, EVERSON, A.M., BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas; aspectos fundamentais e aplicações. *Química Nova*, Vol. 32, No. 5, 1288-1296, 2009.
- BRUCE, T. C e BUTLER, A. R. Catalysis in water and ice. II. The reaction of thiolactones with morpholine in frozen systems, *J. Am. Chem. Soc.* 86: 4104–4108, 1964.
- CARVALHO, B. M. A., Da SILVA S. L., Da SILVA L. H. M., MINIM V. P. R., Da SILVA M. C. H., CARVALHO L. M., MINIM L. A. Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications *Journal: Separation & Purification Reviews*. Vol 43, 3:241-262, 2013.
- CARVALHO, B. M. A, adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poli(acrilamida) ativada com íons de cobre. Dissertação (Doutorado em Ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

CARTER, D. C., HO, J. X. Structure of Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203, 1994.

COOPER, T.G. The tools of biochemistry, Wiley (New York) 423p, 1977.

COSTA, A. M., Estudo de adsorção de proteínas em hidroxiapatita e zinco-hidroxiapatita nanoestruturadas. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar De Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

FERREIRA, E. S., Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos. Dissertação (Doutorado em Ciências, física aplicada à medicina e biologia) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP. 2009.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; PAULA H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista Brasileira de Nutrição*, 19(4):479-488, jul./ago., Campinas, 2006.

KADI, E.N., TAULIER, N., LE HUÉROU, J. Y., GINDRE, M., URBACH, W., NWIGWE, I., KAHN, P. C., WAKS, M., Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies, *Biophysical Journal*, 91, 3397–3404, 2006.

KUMAR, A, BANSAL V, ANDERSSON J, ROYCHOUDHURY, P. K, MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. Immobilized metal *affinity* chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*. 1103(1):35-42, 2006.

JUNGBAUER, A., HAHN, R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal Chromatography A*. 14;1184(1-2):62-79, 2008.

LOZINSKY, V. I. Polymeric cryogel as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 57, No. 5, p. 1015–1032, 2008.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5.ed. Porto Alegre: ArtMed, p. 173–181, 2011.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V.. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: Manole, 444 p, 2008.

PETERS, T. JR., Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, 37, 1985, 161-245.

PLIEVA, F.M, SAVINA, I.N., DERAZ, S., ANDERSSON, J., GALAEV, I.Y, MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *Journal of Chromatography. B* 807:129–137, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. Braz. J. Food Technol. Preprint Serie, n.185, 2005.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHUKLA, A.A., ETZEL, M.R., GADAM, S. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. Taylor & Francis Group, LLC. 2007

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A., Principios de Analisis Instrumental, 5ª ed, Mc Graw Hill, 2001, 322-381.

TAGLIAFERRO G. V.; PEREIRA P. H. F. ; RODRIGUES L. A.; SILVA M. L. C. P. Adsorção de chumbo, cádmio e prata em óxido de nióbio (v) hidratado preparado pelo Método da precipitação em solução homogênea. *Química Nova*, Vol.34,No1, 101-105, 2011.

VEGLIO, F.; ESPOSITO, A.; REVERBERI, A. P.; Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase. *Process Biochem.* Vol 38, No 5, 809–814, 2003.

VEREDAS V. Purificação da α -lactalbumina a partir do soro de leite fixo e expandido de resina. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109, 103–110, 2006.

ZADOW J. G., *Utilization of milk components: Whey*. In R. K. Robinson (Ed.), Modern dairy technology, advances in milk processing, Vol. 1 (2nd ed.) 313 373. London, UK: Chapman & Hall, 1996.