

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Brunna D'Onofre Couto

**Aplicação de um sistema cromatográfico contínuo para purificação da
lactoferrina bovina a partir do soro de leite**

Ouro Branco/MG

2017

Brunna D'Onofre Couto

**Aplicação de um sistema cromatográfico contínuo para purificação da
lactoferrina bovina a partir do soro de leite**

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

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco/MG

2017

RESUMO

COUTO, Brunna D. Aplicação de um sistema cromatográfico contínuo para purificação da lactoferrina bovina a partir do soro de leite. Ouro Branco: Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso.

O soro de leite é um subproduto da produção de queijo ou caseína, sendo de grande importância na indústria de laticínios, devido ao seu grande volume e a sua composição nutricional. Possui proteínas de alto valor agregado, principalmente pelas características de sua composição, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade. A lactoferrina, uma das proteínas presentes no soro de leite, tem atividade antimicrobiana e anticancerígena. Sua massa molar é 80kDa, com pI entre 8,0 e 9,0, glicosilada e de cadeia simples. O objetivo deste trabalho foi produzir uma matriz contínua macroporosa para purificação da lactoferrina, a partir da cromatografia de troca iônica com soro de leite. Esta matriz foi produzida pela criopolimerização da acrilamida com o agente reticulante bis-acrilamida, em colunas de 5 mL. Foram utilizadas três diferentes proporções de acrilamida:bisacrilamida (5:1; 10:1 e 15:1) para obtenção dos criogeis, os quais foram caracterizados quanto ao tamanho dos poros, grau de expansão e capacidade de inchamento. Duas diferentes concentrações do ligante 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (1 e 3 mol.L⁻¹) foram acopladas às resinas 5:1 e 15:1 (acrilamida:bisacrilamida). E a concentração de 2 mol.L⁻¹ do AMPSA foi acoplada à resina 10:1 (acrilamida:bisacrilamida). Os criogeis apresentaram poros interligados, com tamanhos variados de até 100 μm . Quanto menor a proporção entre os polímeros utilizados, menor foi a porosidade e a capacidade de inchamento das matrizes. Foram traçadas as isotermas de adsorção da lactoferrina, para diferentes valores de concentração de ligante e proporção de polímeros, sendo os dados experimentais ajustados para o Modelo de Langmuir. A matriz com maior fração de mesoporos e 1 mol.L⁻¹ de ligante apresentou melhor adsorção de lactoferrina. Esta proteína foi purificada a partir de soro de leite utilizando a coluna de fase contínua acrilamida:bisacrilamida (5:1) e 1mol.L⁻¹ de AMPSA. A matriz se mostrou eficiente

para a captura e purificação da lactoferrina bovina a partir de soro de leite, obtendo 15,9% de rendimento.

Palavras-Chave: Criogel; Lactoferrina; Soro de Leite; Troca Iônica.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação da molécula de lactoferrina bovina, sendo as α -hélices representadas por cilindros e as β -folhas representadas por setas. Os átomos de ferro são esferas e há três sítios de glicosilação ligados à extremidade do lobo C. Fonte: MOORE, et. al. 1997	17
Figura 2: Representação de diferentes formas para as isotermas de adsorção. Fonte: OSCIK, et. al. 1982	21
Figura 3: Formas comuns das isotermas de adsorção. O eixo Y, composto por “W”, representa a quantidade adsorvida em grama de molécula-alvo por grama de matriz sólida; e o eixo X é representado por “c”, que é a concentração de molécula-alvo restante no sobrenadante, estando em partes por milhão (ppm). Fonte: BARROS, 2000	22
Figura 4: Polimerização do monômero AMPSA em criogel de poliacrilamida iniciada por diperiodatocuprato de potássio e álcali (YAO et al., 2007)	24
Figura 5: Esquematização da formação de criogeis, onde 1 é o precursor de alto massa molar; 2 é o solvente; 3 é o precursor de baixo massa molar; 4 são policristais do solvente congelado; 5 é a microfase líquida não congelada; 6 é a rede polimérica; 7 são os macroporos e 8 é o solvente descongelado. Fonte: Lozinsky, 2003	33
Figura 6: A – criogel desidratado; B – criogel úmido	34
Figura 7: Mecanismo de imobilização do ligante AMPSA na matriz de criogel. Fonte: SAVINA, et. al. 2005 ^a	34
Figura 8: Imagens de MEV de matrizes de criogel sintetizadas variando a concentração de monômeros: (a) AAm/MBAAm = 5:1, (b) AAm/MBAAm = 10:1, (c) AAm/MBAAm = 15:1	38
Figura 9: Isotermas de adsorção de lactoferrina na matriz de criogel ativada e o correspondente gráfico de ajuste ao modelo de Langmuir, para cada condição do	

planejamento experimental, variando-se a concentração de polímeros e ligante: (a) isoterma obtida para relação 5:1 de polímeros e com 1 e 3 mol.L⁻¹ de ligante; (b) isoterma obtida para relação 10:1 de polímeros e com 2 mol.L⁻¹ de ligante, sendo o ponto central; (c) isoterma obtida para relação 15:1 de polímeros e com 1 e 3 mol.L⁻¹ de ligante; (d) isotermas para comparação das proporções de polímeros, contendo as relações 5:1 com 1 mol.L⁻¹ de ligante, 10:1 com 2 mol.L⁻¹ de ligante e 15:1 com 1 mol.L⁻¹ de ligante 41

Figura 10: Gel de eletroforese da cromatografia 1 para purificação de lactoferrina. PM é o padrão de massa molar; BSA é a albumina de soro bovino; Lact é a lactoferrina comercial; Lav 1 é a lavagem 1; Lav 2 é a lavagem 2; E.2 é o pico de eluição 2 (eluido com tampão A acrescido de 0,4M de NaCl); E3 é o pico de eluição 3 (eluido com tampão A acrescido de 0,6M de NaCl) 46

Figura 11: Gel de eletroforese da cromatografia 2 para purificação de lactoferrina. PM é o padrão de massa molar; BSA é a albumina de soro bovino; Lact é a lactoferrina comercial; Lav 1 é a lavagem 1; Lav 2 é a lavagem 2; E.2 é o pico de eluição 2 (eluido com tampão A acrescido de 0,4M de NaCl); E3 é o pico de eluição 3 (eluido com tampão A acrescido de 0,6M de NaCl) 47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro de leite	16
Tabela 2: Variação da proporção de monômeros (mol:mol) e concentração do ligante catiônico AMPSA, totalizando 6 ensaios, os quais foram realizados em duplicata	26
Tabela 3: Porosidade total, fração de poros e fração de água de ligação das matrizes de criogel produzidas, variando a proporção de polímeros, na relação mol:mol	35
Tabela 4: Capacidade de inchamento e grau da expansão das matrizes de criogel produzidas, variando a proporção de polímeros, na relação mol:mol	36
Tabela 5: Parâmetros do modelo de Langmuir	42
Tabela 6: Caracterização do soro de leite quanto a dosagem de proteína total, teor de lactose e ácido graxo	43
Tabela 7: Dosagem de proteína total e atividade enzimática de lactoperoxidase para as frações lavadas e eluídas da cromatografia em duplicata para purificação de lactoferrina, sendo aplicados 10 mL de amostra na coluna	44
Tabela 8: Tabela de purificação da lactoferrina a partir da cromatografia de troca iônica, com aplicação de 10 mL de soro de leite centrifugado	45

ÍNDICE DE ABREVIações

AAm	Acrilamida
AMPSA	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico
APS	Persulfato de amônio
BAAm	Bisacrilamida
BSA	Albumina de soro bovina
Criogel pAAM	Criogel não-ativado
Criogel pAAm-SO ₃	Criogel ativado
ED	Grau de expansão do criogel (L.kg ⁻¹)
K _d	Constante de equilíbrio da adsorção (mg.mL ⁻¹)
kDa	Unidade de massa molecular: 10 ³ Dalton
LF	Lactoferrina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PTN	Proteína
q	Concentração de proteína no adsorvente (mg mL ⁻¹ criogel)
q _{máx}	Capacidade adsortiva máxima do adsorvente (mg.mL ⁻¹ criogel)
R ²	Coefficiente de determinação
S	Capacidade de inchamento do criogel (g H ₂ O.g ⁻¹ criogel)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
VC	Volumes de coluna
φ	Porosidade do criogel
μm	Unidade de medida: 10 ⁻⁶ m

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Soro do leite.....	15
3.2 Lactoferrina.....	16
3.3 Bioatividade de lactoferrina	18
3.4 Purificação de biomoléculas por cromatografia	18
3.5 Troca iônica	19
3.6 Isotermas de adsorção	20
3.7 Criogeis	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material	25
4.2 Métodos.....	25
4.2.1 Formação do criogel	25
4.2.1.1 Ativação do criogel e imobilização do trocador catiônico	26
4.2.2 Medidas das propriedades da matriz polimérica	26
4.2.2.1 Porosidade	27
4.2.2.2 Capacidade de inchamento.....	28
4.2.2.3 Grau de expansão.....	28
4.2.2.4 Avaliação da morfologia dos criogeis utilizando	
microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
4.2.3 Isotermas de adsorção.....	29
4.2.4 Captura cromatográfica da lactoferrina	30
4.2.4.1 Caracterização do soro de leite.....	30
4.2.4.1.1 Dosagem de lactose	30
4.2.4.1.2 Dosagem de ácido graxo	30
4.2.4.1.3 Dosagem de proteína total	30
4.2.4.1.4 Dosagem de lactoperoxidase	31
4.2.4.2 Purificação da lactoferrina a partir do soro de leite	31

4.2.4.2.1	Dosagem de proteína total	32
4.2.4.2.2	Dosagem de lactoperoxidase	32
4.2.4.2.3	Eletroforese em gel	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÃO	49
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O consumo de leite de origem animal pelos humanos iniciou-se há aproximadamente 11.000 anos a.C. Sendo o leite de origem bovina um alimento composto por água (87%), gordura (3,7%), proteína (3,4%), lactose (4,8%) e sais minerais (0,7%) (PELEGRINE, 2008). As proteínas do leite são divididas em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas constituem 80% das proteínas totais e estão associadas com cálcio e fosfato inorgânico, contribuindo para formação de micelas (FARREL et al., 2004). As proteínas do soro de leite podem ser divididas em proteínas presentes em maior e menor concentração. Sendo as de maiores concentrações a α -lactoalbumina (25%) e β -lactoglobulina (55%). As de menores concentrações são soro albumina bovina, lactoferrina, imunoglobulinas, fosfoliproteínas e numerosos fatores bioativos e enzimas (PEREIRA et al., 2009).

Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil e uma parte deste leite é destinada a produção de diferentes tipos de queijo (Embrapa, 2015). O soro de leite é um subproduto da produção de queijo ou caseína. Este subproduto é de grande importância na indústria de laticínios, devido ao grande volume e a sua composição nutricional. Durante o processo de produção do queijo minas tipo frescal, são produzidos de 9 a 10 litros de soro de leite para cada 1kg de queijo (MOLLEA et al., 2013). Outra preocupação com o soro de leite é o seu poder poluente. A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) deste subproduto é de 30 a 50 g.L⁻¹ e a demanda química de oxigênio (DQO) de 50 a 80 g.L⁻¹. A título de ilustração, o impacto ambiental gerado pelo lançamento de 50.000 L de soro de leite nos leitos dos rios, pode ser comparado ao impacto ambiental do esgoto doméstico de uma cidade de 25.000 habitantes (SERPA, 2009).

A lactoferrina é uma proteína básica (pI 8,0-9,0), glicosilada, de cadeia simples, que contém, aproximadamente, 700 resíduos de aminoácidos e massa molar de 80-84 kDa. O seu lobo N-terminal é formado pelos resíduos de aminoácidos 1 a 332 e o lobo C-terminal é formado pelos resíduos de aminoácidos 344 a 703. Assim, a lactoferrina pode estar presente na forma Apo, a qual é a forma não ligada ao Fe³⁺,

ou na forma Holo, que é a forma ligada ao Fe^{3+} , cuja ligação é forte e reversível (BOKKHIM et al., 2014).

A lactoferrina é um excelente alvo de estudo, pois apresenta atividades antivirais, antibacterianas, anti-oxidantes e de imunomodulação. Durante os últimos anos, ficou claro que a administração oral da lactoferrina pode trazer vários benefícios à saúde humana e animal, incluindo ação anti-cancerígena e anti-inflamatória (KANWAR et al, 2015).

A lactoferrina é purificada a partir do soro de leite, utilizando precipitação com solventes ou sais e cromatografias adsorptivas. Dentre estas, o uso de matriz de fase contínua, criogeis, tem recebido crescente atenção. Os criogeis são colunas cromatográficas de fase contínua, constituídas por um gel polimérico formado a baixa temperatura. Suas características permitem a captura direta de proteínas e outras biomoléculas, a partir de extratos brutos ou até mesmo a partir da fermentação (ARVIDSSON et al., 2003; GUN'KO et al., 2013).

Alguns grupos funcionais podem ser introduzidos na matriz polimérica, a fim de melhorar a capacidade do criogel em adsorver as moléculas de interesse. Neste contexto, a matriz pode ser funcionalizada com grupos trocadores de ânions ou cátions. Isso é possível por meio da polimerização desses compostos à matriz polimérica do criogel, por exemplo, um criogel de troca catiônica pode ser obtido através da presença de grupos de ligação sulfonados, como o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA) (MACHADO et al., 2015).

A maior parte dos processos de recuperação de bioprodutos emprega etapas cromatográficas, entre outros métodos convencionais de separação. A escolha das técnicas cromatográficas é geralmente de alto custo, fazendo com que seja necessário o desenvolvimento de enfoques mais efetivos para melhorar a produtividade da tecnologia de cromatografia. O presente trabalho se insere neste contexto de melhoria de operação de métodos cromatográficos e propõe o uso de uma resina cromatográfica do tipo leito contínuo para purificação da lactoferrina, a partir do soro de leite, haja visto a importância econômica desta proteína e o alto volume atual produzido deste subproduto.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi produzir uma matriz de criogel com funcionalidade de trocador catiônico, através da polimerização do AMPSA com a base de poliacrilamida. Assim como, determinar as melhores condições para a adsorção da lactoferrina nesta matriz.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar uma matriz polimérica em relação às suas propriedades morfológicas (porosidade, teor de água, capacidade de inchamento e microscopia eletrônica de varredura da morfologia dos poros).
- Determinar as melhores condições para preparação da matriz polimérica, variando a concentração de AMPSA.
- Determinar as melhores condições cromatográficas variando a proporção de polímeros.
- Obter as isotermas de adsorção da lactoferrina na matriz polimérica.
- Estudar a captura da lactoferrina a partir do soro de leite na matriz polimérica, em termos de recuperação e grau de pureza na eluição.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Soro do Leite

O soro de leite é um composto líquido, rico em nutrientes e derivado da produção de queijos e caseína. Atualmente, é caracterizado como coproduto mais gerado e desperdiçado de forma incorreta na maioria das indústrias de laticínios. O volume mundial do soro de leite tem crescido na mesma proporção que a produção de leite, ou seja, 2 % ao ano. Cada vez mais, são buscados avanços tecnológicos e de pesquisa nesta área. Porém, apenas parte do soro do leite é aproveitada pelas indústrias, como na produção de concentrado do soro, bebidas lácteas e ricotas. Dessa forma, todo o restante é descarregado nos cursos de água ou passa pelo tratamento de resíduos, o que gera aumento de custo, logo, é pouco aplicado (FIDELIS, 2011).

O soro de leite é composto por água (95%), lactose (3,5%), proteínas (0,5%), sais minerais, vitaminas e ácido láctico (1,0%). Suas proteínas possuem alto valor nutricional, principalmente pelas características de sua composição, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade. Além disso, suas propriedades de formação e estabilização de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes, as tornam altamente importantes para as indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos (SGARBIERI, 2005; PRAZERES et. al., 2012).

As proteínas presentes do soro de leite são altamente estudadas, a fim de identificar suas propriedades físico-químicas, propriedades funcionais e estruturais, podendo encontrar novas aplicações para estes compostos. Essas proteínas são divididas em dois grupos: proteínas de maior e menor concentração. As de maiores concentrações são a α -lactoalbumina (25%) e β -lactoglobulina (55%), as quais são proteínas globulares, que possuem baixa massa molar e representam 80% de todas as proteínas do soro. Já as de menores concentrações são a soro albumina bovina, a lactoferrina, as imunoglobulinas, as fosfoliproteínas e outros fatores bioativos e enzimas relatados na tabela 1 (ANTUNES, 2003; PEREIRA et. al., 2009).

Tabela 1: Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro de leite.

Proteína	Massa molar (kDa)	Ponto isoelétrico	Concentração (g.L ⁻¹)
β-lactoglobulina	18,4	5,2	2,70
α-lactoalbumina	14,15	4,2 - 4,8	1,20
Soro albumina bovina	69	4,7 - 4,9	0,4
Imunoglobulina	15 -1000	5,5 -8,3	0,65
Lactoferrina	78	8,0-9,0	0,1
Lactoperoxidase	89	9,5	0,02

Fonte: Adaptado de Pereira, 2009.

Nota-se que a lactoferrina (78kDa e pl 8-9) e a lactoperoxidase (89kDa e pl 9,5), possuem pequena diferença de massa molar e ponto isoelétrico, sendo, geralmente, purificadas na mesma operação unitária. Por isso, é muito utilizada a atividade enzimática de lactoperoxidase para averiguar o processo de purificação da lactoferrina.

As proteínas do soro de leite, por possuírem inúmeras propriedades funcionais e nutricionais, exercem papel de influência neste processo de transformar o soro em um coproduto altamente aplicado na biotecnologia, tanto em agroindústrias, como na medicina, na indústria alimentícia e como suprimento para crescimento de culturas microbiológicas (FIDELIS, 2011).

3.2 Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é caracterizada como uma glicoproteína, possuindo tamanho de 80 kDa e pertence à família de proteínas transportadoras de ferro (transferrinas). É produzida por células epiteliais presente nas mucosas de mamíferos. Possui elevada homologia entre as diversas espécies e é localizada em secreções, como nas lágrimas, na saliva, no líquido seminal e vaginal (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et. al., 2009).

Além disso, a lactoferrina é uma proteína básica (pl 8,0-9,0), glicosilada, de cadeia simples, que contém, aproximadamente, 700 resíduos de aminoácidos. A cadeia polipeptídica da lactoferrina é dobrada em dois lobos simétricos (N e C-

terminal), os quais possuem homologia de 33 a 41%. O lobo N-terminal é formado pelos resíduos de aminoácidos 1 a 332 e o lobo C-terminal é formado pelos resíduos de aminoácidos 344 a 703. A ligação do ferro em cada lobo ocorre entre estes domínios. Assim, a lactoferrina pode estar presente na forma Apo, a qual é a forma não ligada ao Fe^{3+} , ou na forma Holo, que é a forma ligada ao Fe^{3+} , cuja ligação é forte e reversível. Sendo assim, a estrutura molecular da lactoferrina se altera de acordo com a saturação dos sítios de ligação ao Fe^{3+} . A forma holo forma uma estrutura terciária de caráter mais compacto, logo, oferece maior resistência a desnaturação térmica e a proteólise (BOKKHIM et al., 2014).

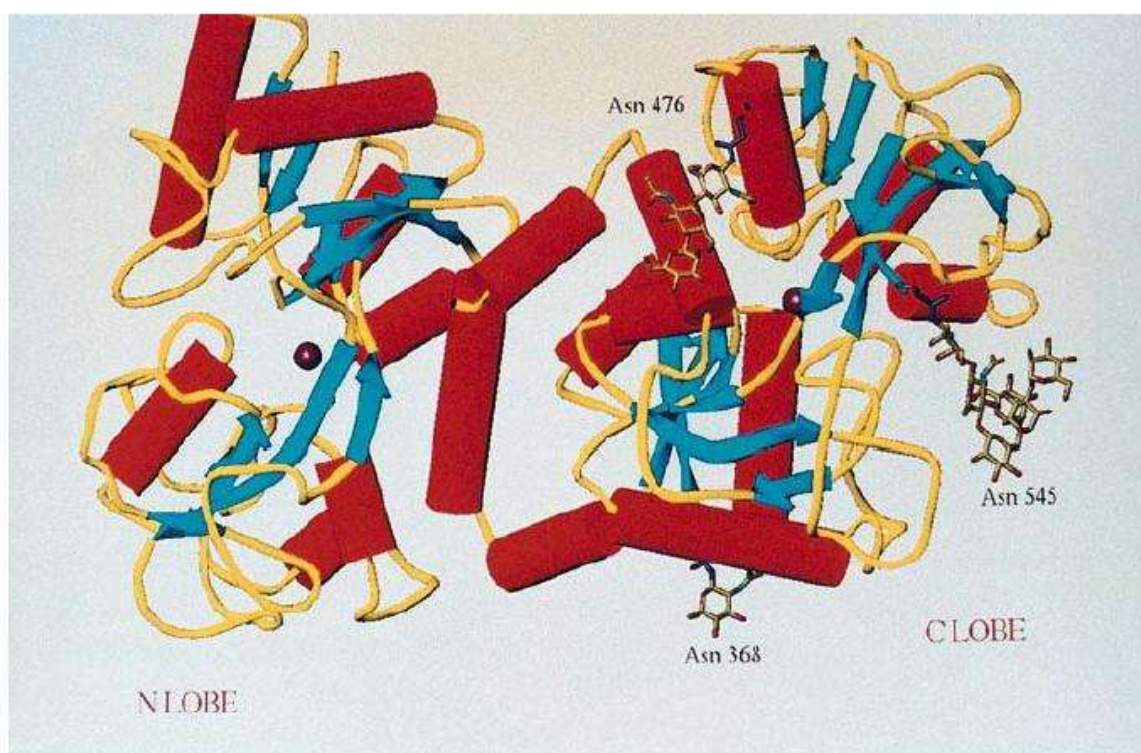


Figura 1: Representação da molécula de lactoferrina bovina, sendo as α -hélices representadas por cilindros e as β -folhas representadas por setas. Os átomos de ferro são esferas e há três sítios de glicosilação ligados à extremidade do lobo C. Fonte: MOORE, et. al. 1997.

A lactoferrina presente no leite bovino desnatado ou no soro de leite pode ser isolada por diferentes métodos, sendo que, em larga escala, a cromatografia de troca catiônica é o método mais utilizado. A produção a nível mundial da lactoferrina bovina é aproximadamente 60 ton/ano, demonstrando sua importância econômica, devido às suas inúmeras atividades biológicas (TOMITA et al., 2009).

3.3 Bioatividade da lactoferrina

A lactoferrina se caracteriza como uma importante molécula de defesa, possuindo uma gama de funções fisiológicas, como por exemplo, atividades antiviral, antimicrobiana, imunomodulatória e antioxidante. Além disso, outra função dessa proteína é o transporte de metais e a participação no sistema imune não específico. A lactoferrina bovina e humana atuam em um amplo espectro antimicrobiano, sendo eficazes contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e vários vírus. Estas propriedades de defesa são relacionadas às suas propriedades de ligação com ferro e também a outros mecanismos, ainda em fase de estudo (SANTOS, et. al., 2016).

Cada vez é mais evidente que o uso oral contínuo desta proteína pode trazer vários benefícios à saúde, incluindo ações anticancerígenas e antiinflamatórias. Logo, ultimamente, busca-se estudar a inserção da lactoferrina como um aditivo alimentar (WAKABAYASHI et al., 2006). No trabalho de Cornish et al., 2004 e Shi et al., 2017, conclui-se que a lactoferrina favorece o crescimento ósseo, através da estimulação de osteoblastos e inibição de osteoclastos. Logo, este estudo propiciou a fundamentação do uso dessa proteína como um complemento na prevenção de osteoporose.

Entretanto, a lactoferrina está presente de forma bem diluída no soro e as proteínas em maior concentração dificultam a sua purificação. Sendo assim, é um processo difícil de ser realizado e, por isso, demanda novos estudos com métodos mais eficazes de recuperação (FIDELIS, 2011).

3.4 Purificação de biomoléculas por cromatografia

As operações industriais de separação têm buscado o aumento da qualidade dos produtos e do seu rendimento, já que, estes parâmetros interferem no custo final. Geralmente, biomoléculas de alto valor agregado estão presentes em baixas concentrações, logo, podem apresentar baixa eficiência de purificação ao usar somente, por exemplo, operações unitárias como extração líquido-líquido e precipitação. Assim, nesses casos, onde há a dificuldade de realizar o processo de purificação, a cromatografia se apresenta como uma operação unitária de alta

eficiência, visto que os produtos obtidos possuem elevado grau de pureza e rendimento (FIDELIS, 2011).

O sistema cromatográfico é composto por duas fases, uma estacionária e outra móvel. Baseia-se no princípio das interações entre os constituintes da amostra aplicada com a fase móvel e a fase estacionária. Entre as cromatografias existentes, a adsorção em leito fixo é a mais utilizada, por possuir elevada eficiência e por possuir parâmetros fáceis de implementar. Porém, na presença de biomoléculas muito grandes e em fluxo elevado, esta adsorção se torna limitada. Além disso, a ampliação de escala é dificultada, pela resistência pequena a fatores mecânicos e por apresentarem instabilidade de leito (STICKEL e FOTOPOULOS, 2001).

Devido aos recorrentes problemas de transferência de massa presentes nas colunas, dificultando o fluxo convectivo da amostra, procura-se desenvolver monólitos, mais adequados para a separação industrial. Por possuírem poros maiores, possibilitam a separação de grandes macromoléculas e o uso de baixa pressão (GUIOCHON, 2007).

3.5 Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica se caracteriza como uma cromatografia adsortiva, ou seja, ocorre por meio de um fenômeno físico-químico. Neste caso, uma determinada solução troca íons com a superfície de uma matriz porosa. Assim, denomina-se trocador de íons, uma coluna sólida, que contenha íons carregados (positivos ou negativos) em sua estrutura. Logo, ao inserir uma solução com poder eletrolítico, ocorre a retirada do contra-íon ligado ao ligante e a molécula de interesse se liga a este ligante, agora disponível, com o objetivo de reestabelecer o equilíbrio. As cromatografias adsortivas são compostas pelas fases de equilíbrio, aplicação da amostra, lavagem, eluição e regeneração, todas de fundamental importância para o rendimento e fator de purificação (GUIOCHON, 2002).

As proteínas possuem grupamentos carregados em sua superfície, podendo ser negativa ou positiva, dependendo do pH do meio. Os resíduos de histidina, lisina, arginina e das aminas terminais podem apresentar carga positiva, já os resíduos de ácido aspártico, ácido glutâmico e os grupamentos carboxílicos terminais podem apresentar carga negativa (FIDELIS, 2011). Logo, a cromatografia

de troca iônica explora a diferença entre os pontos isoelétricos das proteínas presentes em uma amostra e é uma operação muito usada na recuperação e purificação de proteínas.

O mecanismo de adsorção de proteínas na cromatografia de troca iônica não é totalmente compreendido, apesar de ser extremamente importante e utilizado. Diversos parâmetros, como pH, temperatura, tipo e concentração de sais, massa de proteína total e fluxo afetam a adsorção e, com base nesses efeitos, é possível uma melhoria do processo cromatográfico. A interação entre cargas opostas, princípio fundamental da cromatografia de troca-iônica, é influenciada pela composição, estrutura, número e disponibilidade dos ligantes acoplados a resina e o tamanho e distribuição de seus poros (MACHADO et al., 2015).

Para que esta cromatografia seja eficiente é necessário conhecer o equilíbrio e adsorção para a molécula de interesse. Isto é apresentado na forma de isotermas de adsorção, as quais relacionam a concentração dessa determinada molécula na solução e na matriz porosa, com variação de concentração da mesma. Vários parâmetros experimentais influenciam a isoterma de adsorção, como a temperatura, o fluxo e a força iônica (GUIOCHON, 2002).

3.6 Isotermas de adsorção

É conveniente representarmos a adsorção por meio de isotermas, relacionando as quantidades adsorvidas por unidade de adsorvente à temperatura constante. As isotermas de adsorção são classificadas de acordo com as formas gráficas (GILES et. al., 1974).

As isotermas que possuem curvatura descendente são definidas como favoráveis e as isotermas com uma curvatura ascendente são, então, consideradas desfavoráveis. Esta caracterização é baseada no fato que, para obter um eficiente processo adsortivo, é necessário que haja captura de considerável quantidade de soluto, mesmo em soluções diluídas. Assim, a isoterma favorável é efetiva para soluções diluídas, enquanto a desfavorável não atinge este objetivo (OSCIK et. al., 1982).

Existem quatro classes de isotermas (S, L, H e C), as quais estão apresentadas na Figura 2. Dessas, as três principais são as S, L e H, as quais se baseiam nas diferenças de magnitude relativa das energias de ativação da dessorção de solutos e solventes.

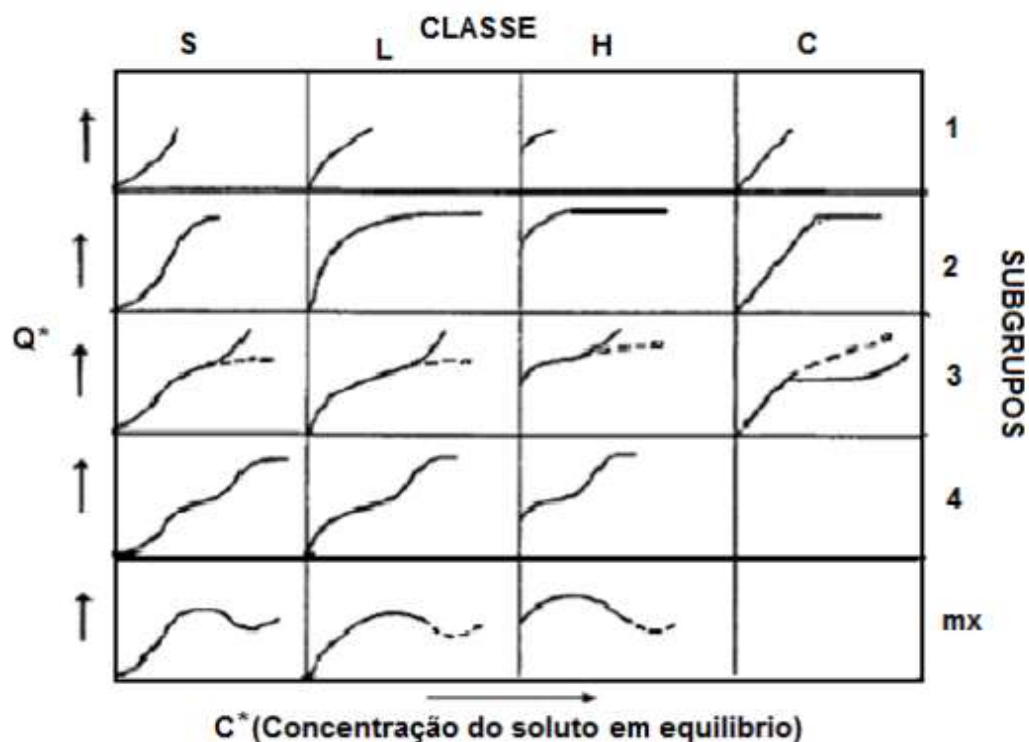


Figura 2: Representação de diferentes formas para as isotermas de adsorção. Fonte: OSCIK, et. al. 1982.

Sabe-se, ainda, que as classes S e L são classificadas como isotermas do tipo Langmuir; a H, como isoterma de alta afinidade; e a C, como constante de partição. A isoterma em forma de “S” é explicada por uma dependência de concentração adicional, implicando em uma adsorção cooperativa, onde há competição pelo sítio adsorvente. A “L” se baseia na dificuldade de preencher os sítios ainda vagos, quando já se tem muitos preenchidos, indicando que não existe forte interação da molécula-alvo com o sistema utilizado. Já a forma “H” é caracterizada pela alta afinidade do soluto pela fase sólida, sendo o mesmo completamente adsorvido; e a forma “C” ocorre quando o soluto apresenta maior afinidade pelo adsorvente poroso, sendo dependente da geometria molecular da região cristalina (HINZ, 2001).

As isotermas podem formar outras curvas de variadas formas, como pode ser observado na Figura 3, fornecendo informações relevantes sobre o processo de adsorção. Ao realizar a isoterma anteriormente à cromatografia, é possível identificar se este será um procedimento favorável ou não, reduzindo o tempo gasto com experimento.

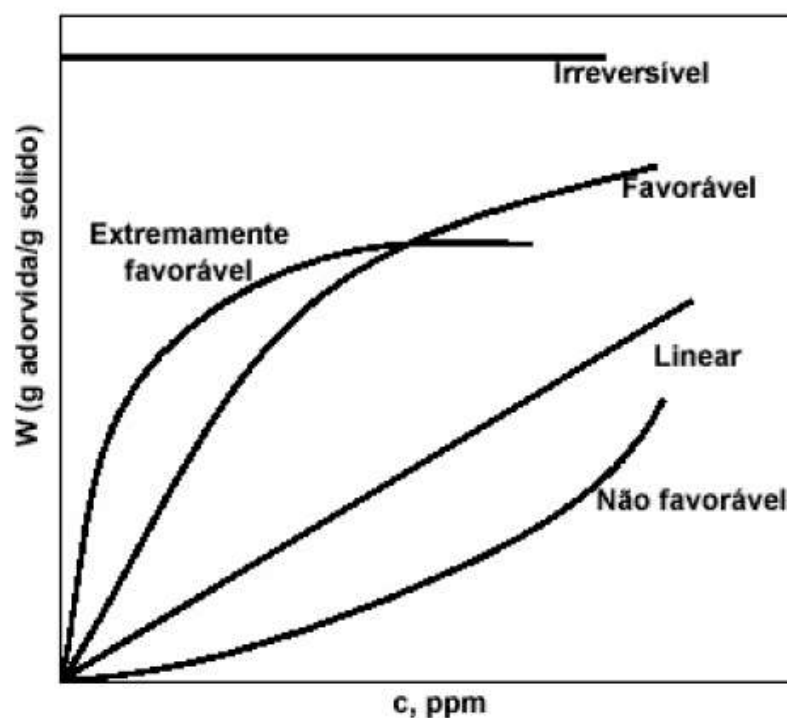


Figura 3: Formas comuns das isotermas de adsorção. O eixo Y, composto por “ W ”, representa a quantidade adsorvida em grama de molécula-alvo por grama de matriz sólida; e o eixo X é representado por “ c ”, que é a concentração de molécula-alvo restante no sobrenadante, estando em partes por milhão (ppm). Fonte: BARROS, 2000.

As isotermas de adsorção podem ser ajustadas pelo Modelo de Langmuir, o qual descreve a adsorção como sítios homogêneos presentes no adsorvente, sendo idênticos e equivalentes em energia. Além disso, é o modelo mais aplicado às biomoléculas. Prediz a adsorção uniforme nos sítios específicos do adsorvente, tendo um valor de saturação a ser atingido. Também prevê a cobertura de uma monocamada, ou seja, determina que o adsorvente adsorva uma quantidade finita de adsorvato (BARROS, 2000).

3.7 Criogeis

Os criogeis são colunas cromatográficas de fase contínua, constituídas por gel polimérico formado a baixa temperatura. Devido à sua estrutura interligada de poros de grande dimensão, os criogeis podem ser utilizados em pequena e grande escala. O fluxo convectivo e a baixa resistência à transferência de massa aumentam a eficiência do processo cromatográfico, permitindo a captura direta de proteínas e outras biomoléculas a partir de extratos brutos ou até mesmo a partir da fermentação (ARVIDSSON et al., 2003; GUN'KO et al., 2013).

Geralmente, são utilizados polímeros como acrilamida e bis-acrilamida para formação da rede porosa do criogel. A formação dessa matriz começa a partir do congelamento de uma solução inicial, mantendo-se assim por determinado período de tempo, a fim de permitir a formação de poros com um precursor em camadas de líquidos residuais. As variações da massa de água e de solvente orgânico, força iônica, pH, taxa de arrefecimento, gradientes de temperatura e concentrações de soluto permitem variações significativas nas características estruturais dos criogeis, tais como as distribuição de tamanho de poro e espessura de parede dos mesmos. Predominantemente, essas matrizes são materiais micro/macroporosos, com diâmetro médio de poro de 1 a 300 μm (GUNKO et al., 2013).

Criogeis que possuem ligantes trocadores de íons tem atraído atenção de pesquisadores, principalmente, pelo elevado potencial de aplicações na captura direta de biomoléculas tais como BSA, lisozima e DNA plasmidial (FIDELIS, 2011). Para cromatografia de troca catiônica, tem-se utilizado o ligante ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA), o qual é um trocador catiônico e tem sua ligação à matriz iniciada pela solução ativadora de diperiodatocuprato de potássio e álcali. Esta solução faz com que os íons presentes na matriz sejam expostos, permanecendo com carga positiva, na qual, se ligará o AMPSA.

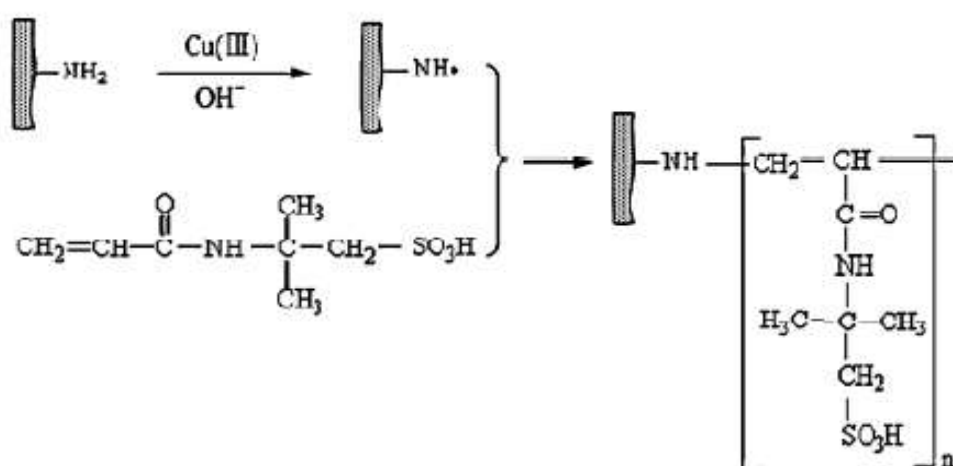


Figura 4: Polimerização do monômero AMPSA em criogel de poliacrilamida iniciada por diperiodatocuprato de potássio e álcali (YAO et al., 2007).

Logo, as matrizes de criogel são consideradas como um material cromatográfico atrativo, o qual possibilita a captura direta de proteínas e outras biomoléculas a partir extratos brutos. Sendo assim, abre novas perspectivas neste processo, tanto para purificação de proteínas como de outras biomoléculas, tais como células, vírus e nanopartículas (FIDELIS, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Acrilamida (AAm), N,N-metilenobisacrilamida (MBAAm) e persulfato de amônio (APS) obtidos da Vetec Química Fina. Albumina de soro bovino (BSA), lactoferrina bovina, 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA) e N,N,N',N'-tetrametilenodiamino (TEMED) obtidos da Sigma Aldrich Inc. Outros reagentes químicos foram de grau analítico.

4.2. Métodos

4.2.1 Formação do criogel

As matrizes de criogel foram obtidas seguindo Arvidsson et. al. 2003 e Kumar et. al. 2006, com algumas modificações. A polimerização dos monômeros AAm e MBAAm foi realizada nas proporções apresentadas na Tabela 2 com duas repetições. Os monômeros foram pesados e diluídos em 30 mL de água ultrapura. A mistura foi colocada em banho de ultrassom por 5 minutos, para eliminação de oxigênio solúvel. A concentração final de monômeros foi de 6%. A polimerização foi iniciada adicionando-se 15 mg de APS e mantendo-se a solução em banho de gelo por 5 minutos. Após, acrescentou-se 30 µL de TEMED, mantendo agitação com bastão de vidro por 1 minuto, também resfriada em banho de gelo.

Posteriormente, 5 mL desta solução foram adicionados a seringas plásticas de 5 mL, sendo vedadas suas extremidades. As seringas foram mantidas a -11 °C por 24 horas. Logo após, as colunas foram descongeladas a temperatura ambiente e lavadas com 200 mL de água destilada a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. As colunas foram preenchidas com solução de azida sódica 0,02% e armazenadas a 4°C.

Tabela 2: Variação da proporção de monômeros (mol:mol) e concentração do ligante catiônico AMPSA, totalizando 6 ensaios, os quais foram realizados em duplicata.

Ensaio	Condições	
	<i>AAm:BAAm (mol:mol)</i>	<i>Ligante (mol.L⁻¹)</i>
1	5:1	1
2	15:1	1
3	5:1	3
4	15:1	3
5	10:1	2
6	10:1	2

4.2.1.1. Ativação do criogel e imobilização do trocador catiônico

A solução ativadora de 0,031 mol.L⁻¹ (K₅(Cu(HIO₆)₂) foi preparada adicionando 1,97 g de CuSO₄.5H₂O, 3,79g de KIO₄, 1,22g de K₂S₂O₈ e 5g de KOH a 100 mL de água destilada. Essa mistura foi mantida em ebulição por 40 minutos. Em seguida, foi resfriada e filtrada em filtro de acetato de celulose (0,45 µm) e diluída para 250 mL.

A ativação das matrizes foi baseada no trabalho de Yao et. al., 2007. Primeiramente, foi percolada a solução ativadora – 5 mL de NaOH (1,0 mol.L⁻¹) e 15 mL de K₅(Cu(HIO₆)₂) (0,031 mol.L⁻¹) - por 30 minutos a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ a 40° C. Em seguida, a solução de AMPSA foi recirculada por 1 hora. Por fim, a coluna foi lavada com 200 mL de HCl a 0,1 mol.L⁻¹ e, em seguida, com 800 mL de água, para remoção dos resíduos de ligante, obtendo a coluna ativada (pAAm-SO₃)

4.2.2 Medidas das propriedades da matriz polimérica

Na caracterização dos criogeis produzidos foram realizadas as análises de porosidade (φ), capacidade de inchamento (S), grau de expansão (ED) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.2.1 Porosidade

Para determinar a porosidade, os criogéis secos e com massa conhecida, foram armazenados em um dessecador por 7 dias, o qual continha solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse a 98%. Após este período, as massas foram novamente aferidas, determinando a quantidade de água de ligação do criogel. A seguir, os criogéis foram imersos em recipiente com água por 24 horas, para que fossem saturados. A massa saturada foi quantificada e, posteriormente, as matrizes foram levemente espremidas e secas em papel toalha, para que houvesse a retirada de água livre do interior dos macroporos, sendo a massa espremida também pesada. Com isso, foram determinados os parâmetros de 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), utilizando as Equações A , B, C, D e E, respectivamente (PLIEVA et al. 2004a).

$$\varphi_M = \frac{M_{sat} - M_e}{M_{sat}} \quad \text{Eq.(A)}$$

$$\varphi_m = \frac{M_e - M_{wb}}{M_{sat}} \quad \text{Eq. (B)}$$

$$\varphi_{wb} = \frac{M_{wb} - M_s}{M_{sat}} \quad \text{Eq. (C)}$$

$$\varphi_D = \frac{M_s}{M_{sat}} \quad \text{Eq. (D)}$$

$$\varphi_T = \frac{M_{sat} - M_{wb}}{M_{sat}} = \varphi_M + \varphi_m \quad \text{Eq. (E)}$$

Onde, M_{sat} é a massa de criogel hidratado/saturado (kg), M_s é a massa do criogel seco (kg), M_e é a massa do criogel espremido (kg) e M_{wb} é a massa do criogel com água de ligação (kg).

4.2.2.2 Capacidade de Inchamento

A capacidade de absorção (S) do criogel foi determinada, de acordo com Arvidsson (2003). As matrizes, com cerca de 3 cm, foram imersas em recipientes contendo água deionizada por 2 horas e agitadas a cada 15 minutos. Decorrido este tempo, o excesso de água foi removido das matrizes e sua massa úmida (M_u) quantificada. As matrizes foram secas a 60 °C por 24 horas, quantificando as massas secas (M_s). A capacidade de absorção da matriz foi calculada usando a Eq (F).

$$S = \frac{M_u - M_s}{M_s} \frac{g_{\text{água}}}{g_{\text{criogel seco}}} \quad \text{Eq. (F)}$$

4.2.2.3 Grau de Expansão

O grau de expansão da matriz se apresenta como uma medida útil, visto que representa a conversão entre a massa desidratada do criogel e o seu volume hidratado, quando está em uso. Os criogeis foram secos em estufa a 60°C por 24 horas. Em seguida, foram saturados com água por 24 h. Após, os criogeis saturados foram transferidos para uma proveta com um volume conhecido de água (V_1). Posteriormente à imersão dos criogeis saturados na proveta, foi identificado um novo volume (V_2). O grau de expansão foi calculado seguindo a equação G, onde m_{sat} é a massa do criogel saturado (FONTAN, 2013).

$$ED = \frac{V_2 - V_1}{m_s} \frac{L_{\text{deslocado pelo criogel}}}{Kg \text{ de criogel seco}} \quad \text{Eq. (G)}$$

4.2.2.4 Avaliação da morfologia dos criogeis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização da superfície dos poros da matriz foi feita para a melhor condição encontrada no planejamento experimental. Para isto, realizou-se a microscopia de varredura eletrônica, utilizando o equipamento Inspect S50 Bruker do

Laboratório de Ensaios Mecânicos, da empresa Vallourec Soluções Tubulares do Brasil (VSB), localizada em Jeceaba - MG.

4.2.3 Isotermas de adsorção

Neste trabalho, as isotermas de adsorção foram estimadas pelo Modelo de Langmuir. Estas foram traçadas para cada um dos 6 ensaios, sendo que a melhor condição encontrada foi encaminhada para realização da cromatografia com o soro do leite. Para obter as isotermas de adsorção, foram pesadas 30 mg da matriz de criogel, previamente ativada, em tubos de eppendorf de 2 mL, seguindo CARVALHO et. al, 2013. Em seguida, foram transferidos 400 µL do tampão de equilíbrio (tampão fosfato 10mM, pH 6,5) para cada tubo e os mesmos foram mantidos em leve agitação por 2 horas no agitador tipo klime em estufa a 40°C. Após, foi adicionada a solução de lactoferrina 10 mg.mL⁻¹, de forma a ter tubos com concentração da proteína igual a 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,2 e 2,5 mg.mL⁻¹. O volume foi completado com tampão de equilíbrio até atingir 1200 µL. Os tubos foram mantidos sob agitação por 24 horas a 40°C. Posteriormente, foi dosada a lactoferrina total do sobrenadante, através do método da absorbância a 280 nm, já que foi utilizada a proteína pura. A concentração de proteína na fase sólida foi determinada pela Eq (H), onde q é a concentração de proteína na fase sólida, V é o volume da fase líquida, C₀ é a concentração inicial de proteína, C é a concentração da proteína na fase líquida em equilíbrio e M é a massa da fase sólida.

$$q = \frac{V(C_0 - C)}{M} \quad \text{Eq. (H)}$$

A relação direta entre a capacidade de adsorção e a concentração final do adsorvato na solução foi encontrada pelo método de Langmuir.

4.2.4 Captura cromatográfica da lactoferrina

4.2.4.1 Caracterização do soro de leite

O soro de leite líquido foi fornecido pelo Laticínio Porto Alegre foi caracterizado quanto a dosagem total de proteína e ao teor de lactose e de ácido graxo total.

4.2.4.1.1 Dosagem de lactose

A lactose foi quantificada utilizando o trabalho de Abu-Lehia, (1987). As proteínas do soro de leite foram precipitadas adicionando ácido tricloroacético 25%. Posteriormente, 1 mL do soro de leite foi transferido para um tubo e adicionado 2,5 mL de uma solução contendo 0,1% fenol, 1% NaOH, 0,1% ácido pícrico e 0,1% de Na₂S₂O₅. Os tubos foram incubados em banho-maria a 100°C durante 2,5 minutos. A seguir, resfriados e 7,0 mL de água foram adicionados. A absorbância foi medida a 520nm.

4.2.4.1.2 Dosagem de ácido graxo total

A concentração de ácido graxo foi determinada utilizando o método de Röse-Gottlieb (GEA Niro analytical methods), onde 1,5 mL de amônia foram adicionados a 10 mL de soro de leite e aquecido a 60°C por 15 minutos. A solução foi transferida para um funil de separação e 10 mL de álcool etílico foram adicionados e misturados. A seguir, 25 mL de éter etílico foram adicionados à mistura contida no funil de separação e agitado durante 1 minuto. A mistura foi mantida em repouso durante 2 horas, e a fase etérea foi separada da fase aquosa. Esta foi, então, extraída em triplicata. As fases etéreas foram reunidas e evaporadas até massa constante. A porcentagem total de ácidos graxos foi determinada pela Equação I.

$$\text{ácidos graxos totais (\%)} = \frac{\text{massa final do erlenmeyer} - \text{massa do erlenmeyer vazio}}{10 \text{ mL}} \cdot 100\% \text{ Eq. (I)}$$

4.2.4.1.3 Dosagem de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada utilizando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Assim, foram adicionados 250 µL das frações eluídas em um

tubo de ensaio. Em seguida, acrescentaram-se 1250 μL do reagente E (NaOH 0,2 mol.L^{-1} , de Na_2CO_3 4% m/v, de CuSO_4 1% m/v e de tartarato de Na e K 2% m/v, na proporção de 1:1:0,02:0,02, respectivamente). Esta mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 250 μL do reagente de Folim, agitou-se imediatamente e incubou-se a temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi realizada a 750 nm.

4.2.4.1.4 Dosagem de lactoperoxidase

A dosagem de lactoperoxidase das frações eluídas foi determinada utilizando o método descrito por Kumar e Bhatia (1999). Adicionou-se 1 mL da solução de ABTS 1 mmol.L^{-1} a 33 μL do soro de leite, agitando o tubo por inversão. Em seguida, esta mistura foi colocada em uma cubeta de quartzo e adicionaram-se 33 μL da solução de peróxido de hidrogênio 3,2 mmol.L^{-1} . A absorbância foi medida a 412 nm durante 1,5 minutos, com intervalos de 5 segundos.

4.2.4.2 Purificação da lactoferrina a partir do soro de leite

A cromatografia de troca iônica foi realizada manualmente, em duplicata, mantendo-se a vazão constante, em torno de 1 mL.min^{-1} . A coluna foi equilibrada com 25 mL (5 volumes de coluna) de tampão fosfato 10 mM pH 6,5 (tampão A). Em seguida, foram aplicadas 10 mL da solução de soro de leite centrifugado por 35 minutos a 6000 rpm, a fim de retirar parcialmente o elevado teor de gordura. As proteínas não adsorvidas ou adsorvidas fracamente foram lavadas utilizando o mesmo tampão A.

A eluição ocorreu com gradiente em passos, possuindo cinco picos: o primeiro com o tampão A, acrescido de 0,2 M de NaCl; o segundo o tampão A, foi acrescido de 0,4 M de NaCl; o terceiro, o tampão A foi acrescido de 0,6 M de NaCl; o quarto, o tampão A foi acrescido de 0,8 M de NaCl e o quinto, o tampão A foi acrescido de 1,0 M de NaCl. As frações eluídas foram recolhidas e armazenadas para análise posterior de dosagem de proteína total, dosagem de lactoperoxidase e eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.2.4.2.1 Dosagem de proteína total

A dosagem de proteína total das frações eluídas foi realizada seguindo a metodologia de Lowry, descrita no tópico 4.2.4.1.3.

4.2.4.2.2 Dosagem de lactoperoxidase

A dosagem da atividade enzimática da lactoperoxidase das frações eluídas foi realizada seguindo a metodologia de Kumar e Bhatia, descrita no tópico 4.2.4.1.4.

4.2.4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

O grau de pureza das amostras eluídas da cromatografia foi estimado utilizando o gel de poliacrilamida 12,5%, contendo dodecil sulfato de sódio em condições desnaturantes. O gel foi submetido a uma corrente constante de 30 mA à temperatura ambiente. As proteínas foram visualizadas utilizando a coloração com Coomassie blue (MERRIL, 1990).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese e caracterização da matriz

A matriz macroporosa foi obtida pela criocopolimerização do monômero acrilamida com o agente de reticulação – bisacrilamida – em solução aquosa, inserida diretamente em um seringa de plástico de 5 mL. A reação ocorrida para a formação dessa matriz polimérica pode ser observada na figura 5.

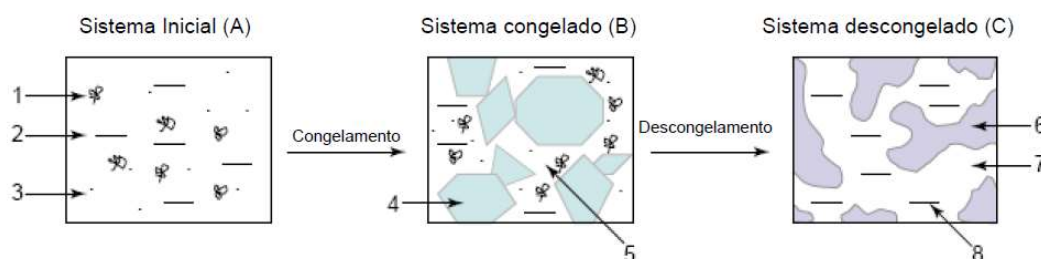
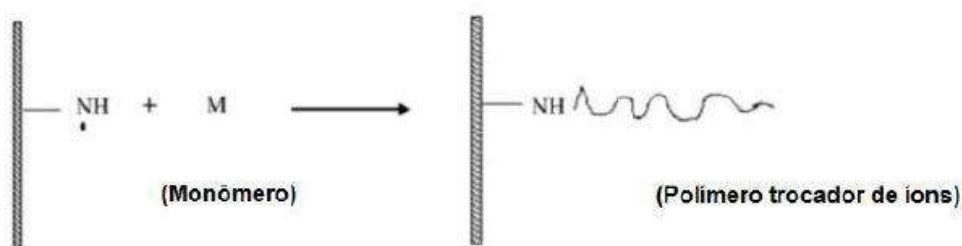
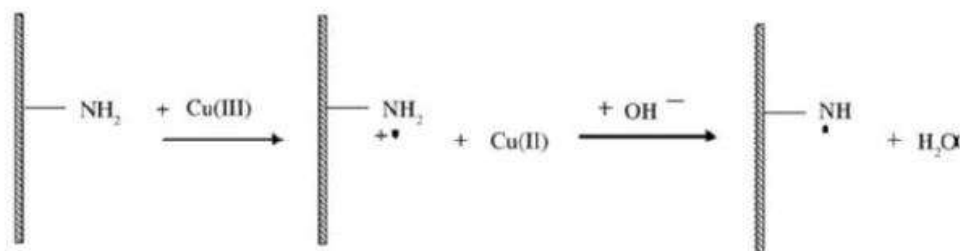


Figura 5: Esquematisação da formação de criogéis, onde 1 é o precursor de alto massa molar; 2 é o solvente; 3 é o precursor de baixo massa molar; 4 são policristais do solvente congelado; 5 é a microfase líquida não congelada; 6 é a rede polimérica; 7 são os macroporos e 8 é o solvente descongelado. Fonte: Lozinsky, 2003.

Observa-se que a água é o solvente e está presente em maior quantidade. Portanto, esta substância congela em temperaturas abaixo de 0°C, fazendo com que as substâncias dissolvidas passem a se concentrar em determinadas regiões, se polimerizando. Logo, o gelo atua como um agente porogênico. Quando o sistema é descongelado, obtém-se a rede macroporosa (FIDELIS, 2011).

O criogel formado apresentou estrutura esponjosa e elástica, conforme relatado na literatura por PERSSON et al., 2004; ARVIDSSON et al., 2002; YAO et al., 2006b, entre outros autores. A matriz pôde ser retirada da coluna com facilidade, apenas removendo o excesso de água e exercendo uma leve pressão. Cerca de 4 mL de água foram retirados da matriz, formada na seringa de 5 mL, indicando o fluxo estimado através do volume de poros, conforme relatado em CARVALHO, 2010. As matrizes secas, quando eram inseridas em béquer com água, a fim de serem umedecidas novamente, voltavam instantaneamente à conformação original, sem perder suas propriedades de porosidade e absorção de água. Quando o criogel encontra-se seco, apresenta aspecto esbranquiçado; já quando está úmido, se torna

O criogel foi ativado por reação redox entre o cátion Cu^{3+} do diperiodatocuprato de potássio ($\text{K}_5(\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2)$) e os grupamentos amina (NH_2) presentes na matriz. Sendo assim, um elétron do átomo de nitrogênio foi transferido para o Cu^{3+} , formando um radical cátion. Logo após, este perde um próton para o meio alcalino, dando origem ao radical amidil. Por fim, é este radical que se torna capaz de iniciar a polimerização dos monômeros vinil do ligante AMPSA, como representado na figura 7 (FIDELIS, 2011).



34

Porosidade

Os valores médios obtidos para a porosidade total, fração de macroporos, fração de micro e mesoporos, fração de água de ligação, fração de polímero seco dos diferentes criogeis produzidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Porosidade total, fração de poros e fração de água de ligação das matrizes de criogel produzidas, variando a proporção de polímeros, na relação mol:mol.

Criogel (AAM:BAAM – mol:mol)	Fração de macroporos	Fração de meso e microporos	Fração de água de ligação	Fração de polímero seco	Porosidade total
5:1	0,3216	0,5058	0,0593	0,0570	0,8273
10:1	0,4390	0,4526	0,0305	0,0540	0,9154
15:1	0,4628	0,4390	0,0294	0,0410	0,9296

A porosidade é uma característica de extrema importância para avaliar uma matriz cromatográfica. Os resultados encontrados para a porosidade total e para as frações de macro, meso e microporos mostraram significativas diferenças entre os criogeis produzidos com diferente relação de polímeros. Nota-se que, à medida que a relação de acrilamida e bisacrilamida diminuiu, houve um decréscimo da fração de macroporos, ou seja, a malha se torna mais fechada. Tal fato é confirmado pela porosidade total, visto que, é menor na relação 5:1. Isto ocorre, pois se tem baixa massa de acrilamida em comparação com os outros tratamentos, logo, o agente reticulante forma mais redes, formando poros menores na matriz.

O valor encontrado para a fração de polímero seco variou de 4,1% a 5,7%. Estes valores foram semelhantes ao encontrado por Plieva et al. (2004a e 2004b), que produziu criogeis contendo 7% de monômeros. A fração de água ligada foi de 2,9% para o criogel 15:1 e 5,9% para o criogel 5:1, estando próximos dos encontrados também por Plieva et al. (2004a e 2004b), que foram entre 3% a 5%. Este fato é justificado pela quantidade de meso e microporos, a qual é maior no criogel 5:1, logo, retém maior teor de água em sua estrutura.

Os valores encontrados para porosidade total variaram entre 82% a 92%, demonstrando que as matrizes produzidas foram composta, em sua maioria, por poros. Carvalho et. al, 2014 encontraram uma porosidade total entre 79% e 89%, para criogeis produzidos com 3 e 6% de polímeros.

As frações de macroporos dos criogeis produzidos ficaram entre 36 a 48%, valor abaixo do encontrado por YAO, et. al. (2006b), foi aproximadamente 70%. Tal fato está diretamente relacionado à quantidade utilizada dos polímeros, visto que este autor utilizou 3%, o que afeta diretamente a malha de porosidade. A fração de macroporos indica a quantidade de água que se consegue espremer dos criogeis saturados, sendo que os resultados obtidos neste trabalho indicam que grande parte da estrutura do criogel possui macroporos, garantindo boas características para processos de purificação (ARVIDSSON et al., 2002).

Capacidade de inchamento e grau de expansão

Os valores médios obtidos para a capacidade de inchamento e grau de expansão das matrizes produzidas estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: Capacidade de inchamento e grau da expansão das matrizes de criogel produzidas, variando a proporção de polímeros, na relação mol:mol.

Criogel (AAM:BAAM mol:mol)	S (g.g⁻¹)	ED (L.kg⁻¹)
5:1	2,8208	12,8882
10:1	3,4167	22,0974
15:1	3,8037	28,1439

S= Capacidade de inchamento, ED= Grau de expansão

Os valores encontrados para a capacidade de inchamento (S) foram semelhantes aos relatados por CARVALHO, et. al. 2014, os quais variaram entre

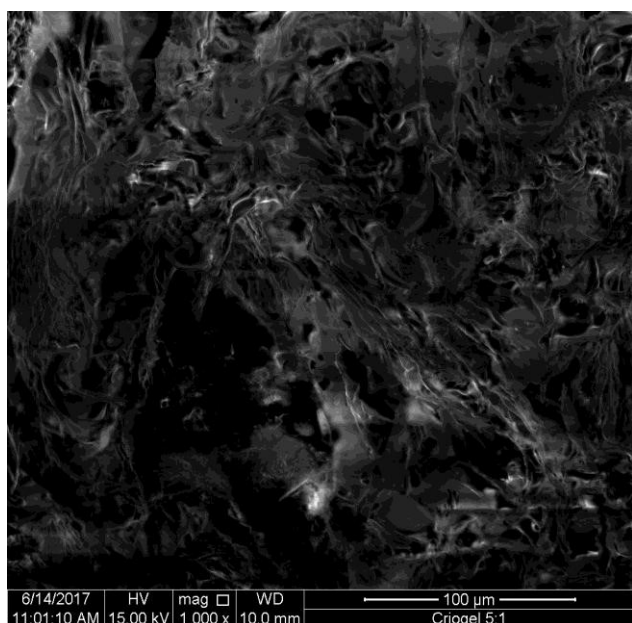
2,32 e 3,95 g.g⁻¹. Esta propriedade indica que 1 grama do criogel seco pode absorver entre 2,82 a 3,8 gramas de água, que ficará ligada a sua estrutura.

Pode-se observar que, a capacidade de inchamento diminui com o decréscimo da relação AAm:BAAm, pois, enquanto a acrilamida é responsável pela linearidade da cadeia, a bisacrilamida fornece o estágio de polimerização. Assim, quanto mais próximo de 1 for a relação AAm:BAAm, mais compacta é a estrutura formada, possuindo menor capacidade de inchamento. Geralmente, são escolhidas as matrizes que possuem menor capacidade de inchamento, pois matrizes que possuem este valor elevado são muito maleáveis e não suportam pressões elevadas (CARVALHO, 2014).

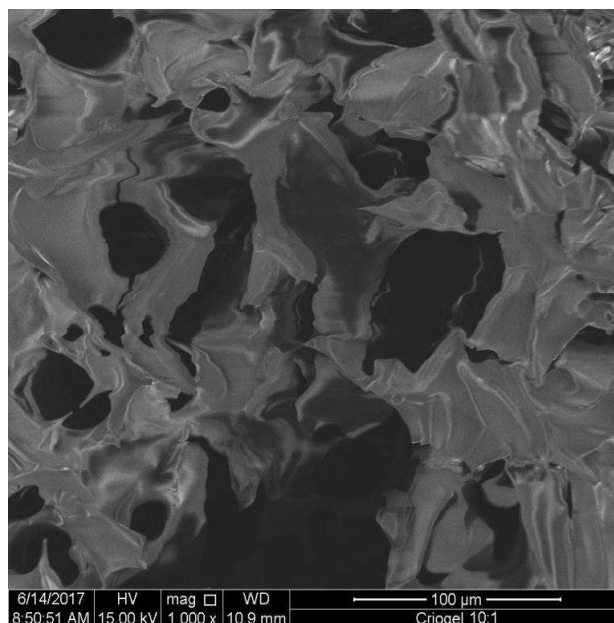
O grau de expansão (ED) é o parâmetro responsável por fornecer a relação entre a massa do criogel desidratado e o volume que passa a ocupar quando hidratado. Os valores encontrados neste trabalho variaram entre 12,88 L.kg⁻¹ e 28,14 L.kg⁻¹. Isto comprova o alto teor poroso dessa matriz. Além disso, esses valores foram próximos do obtido por FONTAN (2013), que obteve um valor próximo a 25 L.kg⁻¹ para um criogel contendo 6% de monômeros.

Avaliação da morfologia dos criogéis utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

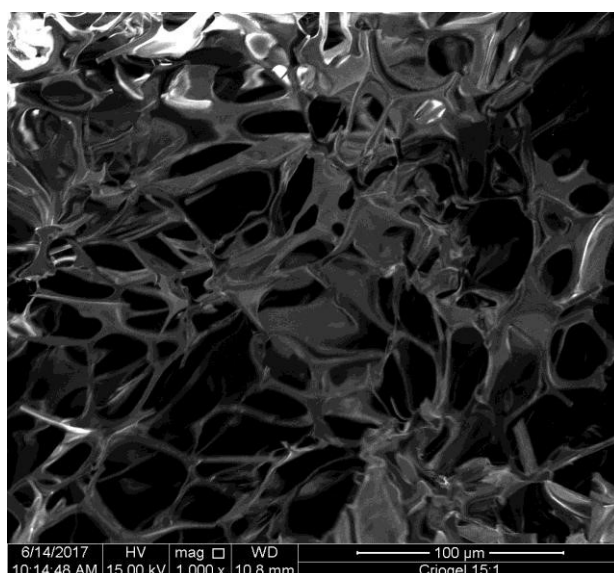
A figura 8 apresenta as imagens da microscopia eletrônica de varredura dos 3 tratamentos aplicados para a produção dos criogéis, todas com ampliação de 1000x.



(a)



(b)



(c)

Figura 8: Imagens de MEV de matrizes de criogel sintetizadas variando a concentração de monômeros: (a) AAm/MBAAm = 5:1, (b) AAm/MBAAm = 10:1, (c) AAm/MBAAm = 15:1.

As matrizes produzidas apresentaram poros largos e interconectados, tendo tamanhos variados entre de até 100 μm . Além disso, não apresentaram poros fechados, estando de acordo com resultados de outros estudos, como o de ARVIDSSON et al., 2002. Este nível de porosidade permite até mesmo a passagem de células microbianas e fragmentos celulares, sendo uma ótima possibilidade para purificação de macromoléculas.

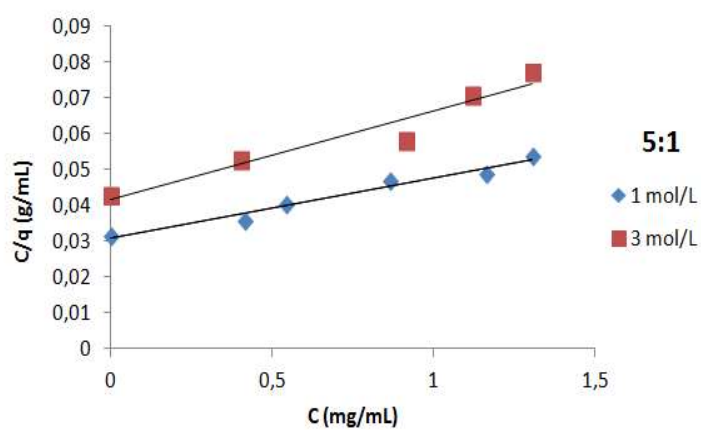
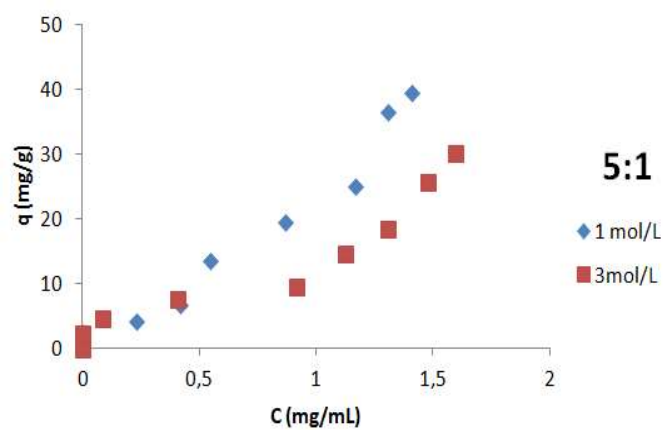
Além disso, nota-se, claramente, a diferença entre os poros de acordo com cada tratamento. À medida que a relação AAm:BAAm diminui, os poros se tornam mais finos, ou seja, a malha fica mais fechada, possuindo maior número de meso e microporos do que de macroporos. Este fato coincide com o relatado em CARVALHO, 2010 e com os resultados dos testes anteriores.

Isotermas de adsorção

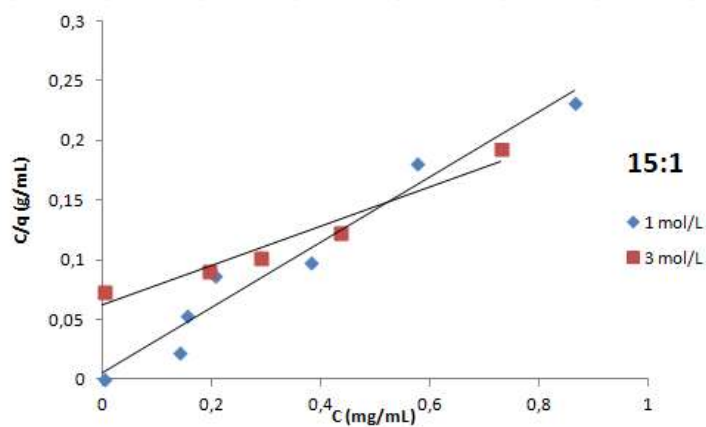
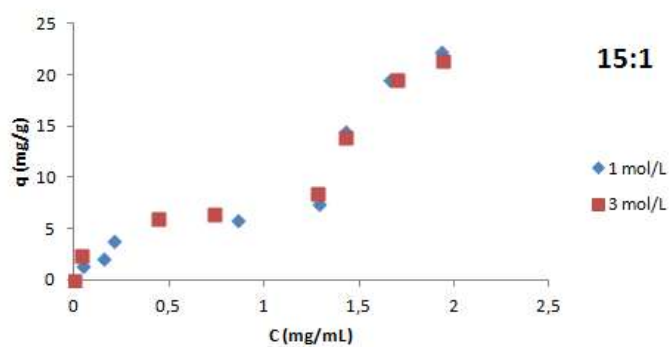
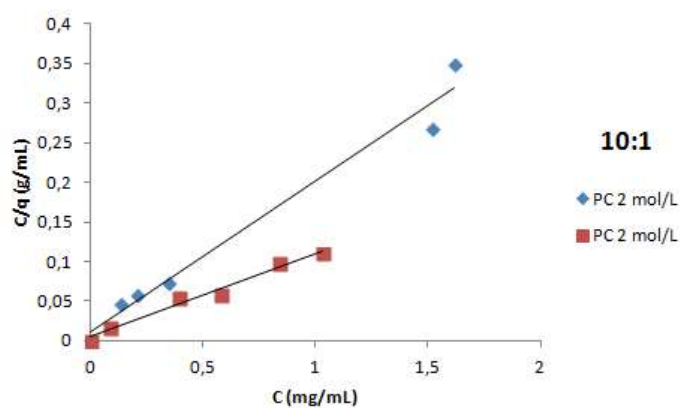
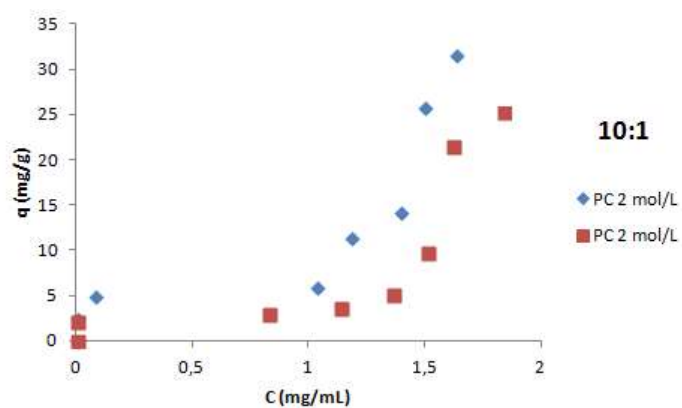
Os experimentos de adsorção da lactoferrina foram realizados utilizando os criogéis polimerizados com diferentes proporções de acrilamida : bisacrilamida (5:1, 10:1 e 15:1) e diferentes concentrações de ligante (1, 2 e 3 mol.L⁻¹). Estes parâmetros foram escolhidos, pois, já se tem descrito claramente na literatura a influência do pH e da temperatura na adsorção desta molécula. Porém, não há relatos sobre como o tamanho dos poros e a concentração de ligante influenciam este processo. Logo, almejou-se estudar se estes fatores iriam interferir na adsorção da lactoferrina.

Sabe-se por trabalhos já publicados, como de CARVALHO, 2010; FIDELIS, 2011 e BRESOLIN, 2009, que o aumento da adsorção da lactoferrina ocorre com a diminuição da força iônica, indicando a predominância de interações eletrostáticas em relação às interações por coordenação. Já o efeito da temperatura é um fenômeno de maior complexidade, pois envolve propriedades físico-químicas do adsorvente e do soluto, porém, é conhecido que o aumento direto da capacidade adsorptiva ocorre com o aumento da temperatura. Por isso, neste presente estudo, as isotermas foram feitas em bateladas, a temperatura de 40°C e baixa força iônica (tampão fosfato, pH 6,5 e 10mM).

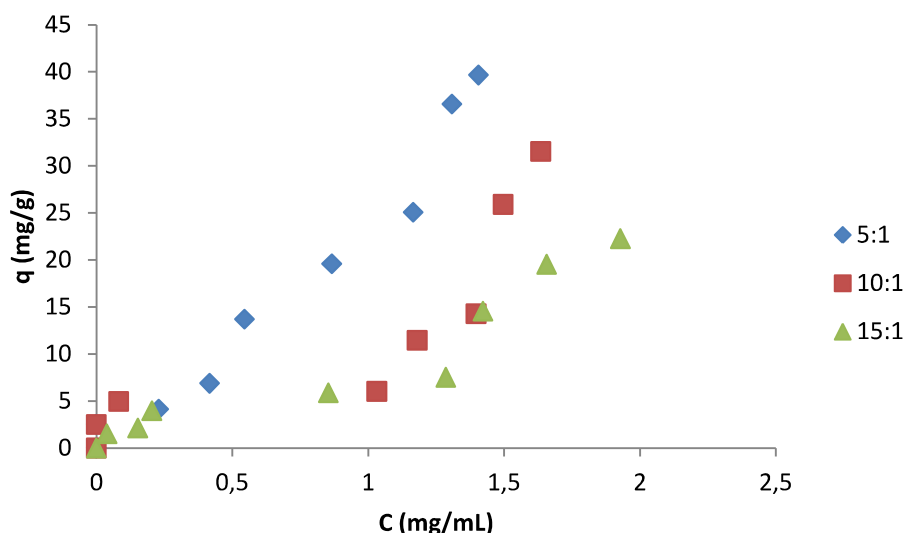
As isotermas de adsorção e os ajustes para o modelo de Langmuir foram obtidos para cada condição do planejamento experimental e estão representados na Figura 9.



(b)



(c)



(d)

Figura 9: Isotermas de adsorção de lactoferrina na matriz de criogel ativada e o correspondente gráfico de ajuste ao modelo de Langmuir, para cada condição experimental, variando-se a concentração de polímeros e ligante: (a) isoterma obtida para relação 5:1 de polímeros e com 1 e 3 mol.L⁻¹ de ligante; (b) isoterma obtida para relação 10:1 de polímeros e com 2 mol.L⁻¹ de ligante, sendo o ponto central; (c) isoterma obtida para relação 15:1 de polímeros e com 1 e 3 mol.L⁻¹ de ligante; (d) isotermas para comparação das proporções de polímeros, contendo as relações 5:1 com 1 mol.L⁻¹ de ligante, 10:1 com 2 mol.L⁻¹ de ligante e 15:1 com 1 mol.L⁻¹ de ligante.

Nota-se que o modelo de Langmuir adaptou-se aos dados experimentais, sendo comprovado pelos gráficos de ajuste, os quais formaram linha reta, reforçando o comportamento de Langmuir na adsorção da lactoferrina no sistema criogel-pAAm-SO₃.

Observa-se que as isotermas foram côncavas, representando um comportamento favorável, ou seja, o sistema é capaz de extrair quantidade relativamente alta mesmo em baixas concentrações de adsorvato. Além disso, estas curvas permaneceram na forma de “S”, indicando que a adsorção inicial é baixa e ocorre o aumento de acordo com que o número de moléculas adsorvidas também aumenta. Isto significa que pode ter ocorrido uma associação entre moléculas adsorptivas chamadas de adsorção cooperativa (FALONE, et. al., 2004).

As isotermas em “S” obtidas são classificadas, pela literatura, como sendo de Langmuir e ocorrem, principalmente, quando o sistema é igual ao do presente

trabalho, ou seja, a uma molécula monofuncional; há moderada interação, causando o empacotamento das moléculas na superfície do sólido e há competição das moléculas pelo sítio adsorvente (FALONE, et. al., 2004).

Os parâmetros das isotermas de adsorção para o modelo de Langmuir estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros do modelo de Langmuir.

Criogel (AAm:BAAm mol:mol)	Concentração de ligante (mol.L⁻¹)	q_{máx}	K_d	R²
5:1	1,0	59,5238	0,5472	0,97
5:1	3,0	49,4853	0,5874	0,93
10:1	2,0	40,2521	0,6517	0,98
10:1	2,0	41,5476	0,6713	0,98
15:1	1,0	36,6016	0,8123	0,96
15:1	3,0	30,8134	0,8850	0,96

Ao observar a Figura 8 e a Tabela 5, nota-se que, à medida que os poros aumentam, ou seja, a relação AAm:BAAm se torna maior, menor é a quantidade de proteína contida na fase sólida. Para os criogéis 5:1 esta concentração foi próxima de 45 mg/mL e para os criogéis de 10:1 e 15:1 foi entre 25 a 35 mg/mL, conforme pode ser observado no eixo Y dos gráficos de isoterma. Nota-se também que a capacidade máxima de captação de adsorvente (q_{máx}) é maior para os criogéis 5:1, cerca de 40% a mais que os outros dois; e que é baixa a constante de adsorção no equilíbrio (K_d), indicando que esta matriz é capaz de adsorver mesmo em concentrações baixas do soluto na solução. Logo, admite-se que os meso e microporos favoreceram mais a adsorção do que os macroporos. Isto pode ser justificado pelo tempo de retenção na coluna, pois, quanto maior a quantidade de poros menores, este tempo também se torna maior, propiciando maior contato entre a molécula-alvo e o ligante.

Nota-se, ainda, que a concentração de ligante influencia pouco a adsorção. A quantidade de proteína adsorvida foi semelhante para as diferentes concentrações

de AMPSA utilizadas (1, 2 e 3 mol.L⁻¹). Os valores dos parâmetros de Langmuir mostraram que a concentração menor de ligante favoreceu a adsorção. Concentrações maiores de ligante como, 3 mol.L⁻¹, podem ser acoplados e se localizarem na superfície dos poros da matriz, ocasionando uma redução parcial ou total dos poros. Logo, a elevada concentração de ligante, pode alterar a rede de microporos por onde o fluxo escoa, diminuindo a adsorção da proteína. Já a imobilização do ligante em concentrações menores (0,5 a 2 mol.L⁻¹) acarreta uma vantagem complementar às matrizes, que é o aumento da área superficial, pois as moléculas do ligante se projetam para os espaços vazios do criogel, levando à formação de uma estrutura semelhante a tentáculos, o que facilita a captura da molécula-alvo (CHEN, et. al., 2008).

A matriz 5:1 com a concentração de AMPSA 1 mol.L⁻¹ apresentou os melhores resultados para a adsorção da lactoferrina bovina, sendo utilizada para a purificação da lactoferrina bovina a partir do soro de leite.

Caracterização do soro

A concentração de proteína total, teor de lactose e ácido graxo do soro de leite estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Caracterização do soro de leite quanto a dosagem de proteína total, teor de lactose e ácido graxo. atividade enzimática da lactoperoxidase.

Parâmetros	Soro
Proteína total (g.L ⁻¹)	11,4
Lactoperoxidase (UI.mL ⁻¹)	3,79
Lactose (% m/v)	4,86
Ácido graxo (% m/v)	0,94

O soro do leite apresentou aproximadamente 1% (m/v) de ácido graxo, por isso, optou-se por realizar a centrifugação antes da cromatografia.

Captura cromatográfica da lactoferrina a partir do soro de leite

A Tabela 7 apresenta a concentração de proteína total e lactoperoxidase das frações eluídas do criogel 5:1 mol (acrilamida:bisacrilamida) e 1mol.L^{-1} de ligante.

Tabela 7: Dosagem de proteína total e atividade enzimática de lactoperoxidase para as frações lavadas e eluídas da cromatografia em duplicata para purificação de lactoferrina, sendo aplicados 10 mL de amostra na coluna.

Parâmetros	Lavagem 1	Lavagem 2	Eluição 1	Eluição 2	Eluição 3	Eluição 4	Eluição 5
Cromatografia 1							
Proteína total (g.L^{-1})	0,6164	4,404	0	0,138	0,169	0	0
Lactoperoxidase (UI.mL^{-1})	0	0	0	0,5480	0,0053	0	0
Cromatografia 2							
Proteína total (g.L^{-1})	0,809	5,81	0	0,148	0,164	0	0
Lactoperoxidase (UI.mL^{-1})	0	0	0	0,5052	0,0059	0	0

Lavagem 1 e lavagem 2 = tampão A; Eluição 1 = tampão A + 0,2M NaCl; Eluição 2 = tampão A+0,4M NaCl; Eluição 3 = tampão A+0,6M NaCl; Eluição 4 = tampão A+0,8M NaCl; Eluição 5 = tampão A+ 1,0 M NaCl.

As demais proteínas do soro, que não adsorveram ou ficaram adsorvidas fracamente, foram lavadas com o próprio tampão de equilíbrio e não houve saída de lactoperoxidase. Após a lavagem, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 0,4 e 0,6 M de NaCl. A maior atividade de lactoperoxidase foi detectada na fração eluída com 0,4M de NaCl. Provavelmente, a lactoferrina foi eluída utilizando 0,6M de NaCl.

A lactoperoxidase foi eluída com menor concentração de sal, resultado condizente com o descrito na literatura(ANDERSSON; MATTIASSON, 2006). Dessa forma, a lactoperoxidase foi eluída no segundo pico e a lactoferrina no terceiro pico.

Tabela 8: Tabela de purificação da lactoferrina a partir da cromatografia de troca iônica, com aplicação de 10 mL de soro de leite centrifugado.

Amostra	Volume (mL)	Concentração de PTN (mg.mL ⁻¹)	PTN total (mg)	Atividade Lactoperoxidase (UI.mg ⁻¹)	Recuperação lactoferrina (%)	Recuperação lactoperoxidase (%)
Soro de leite	10	5,25	52,5	0,7219	100	100
Não adsorvido	10	2,75	27,5	-	-	-
Lavado 1	3	0,7127	2,1381	-	-	-
Lavado 2	3	5,107	15,321	-	-	-
Eluição 2	5	0,143	0,715	3,6825	-	79,52
Eluição 3	5	0,167	0,835	0,0335	15,90	0,7234

Ao traçar a tabela 8, notou-se que houve uma grande recuperação de lactoperoxidase ao utilizar este sistema cromatográfico. Isto ocorreu pois, o pH do tampão favoreceu a elevada concentração de cargas positivas na superfície dessa proteína, visto que seu pI é maior que o da lactoferrina, logo, apresenta maior carga que esta. Assim, pôde se ligar com maior afinidade ao ligante.

Observa-se que, o sistema desenvolvido apresentou 15,9% de recuperação da lactoferrina. Embora ainda seja considerado um baixo rendimento, nota-se que foi maior do que o encontrado por FIDELIS, 2011, o qual utilizou a matriz de criogel com 6% ativada com AMPSA 2 mol.L⁻¹ e recuperou cerca de 9% desta proteína.

O perfil eletroforético das frações eluídas foi caracterizado utilizando o gel de SDS-PAGE, apresentado na Figura 10 para a primeira corrida e na Figura 11 para a segunda corrida.

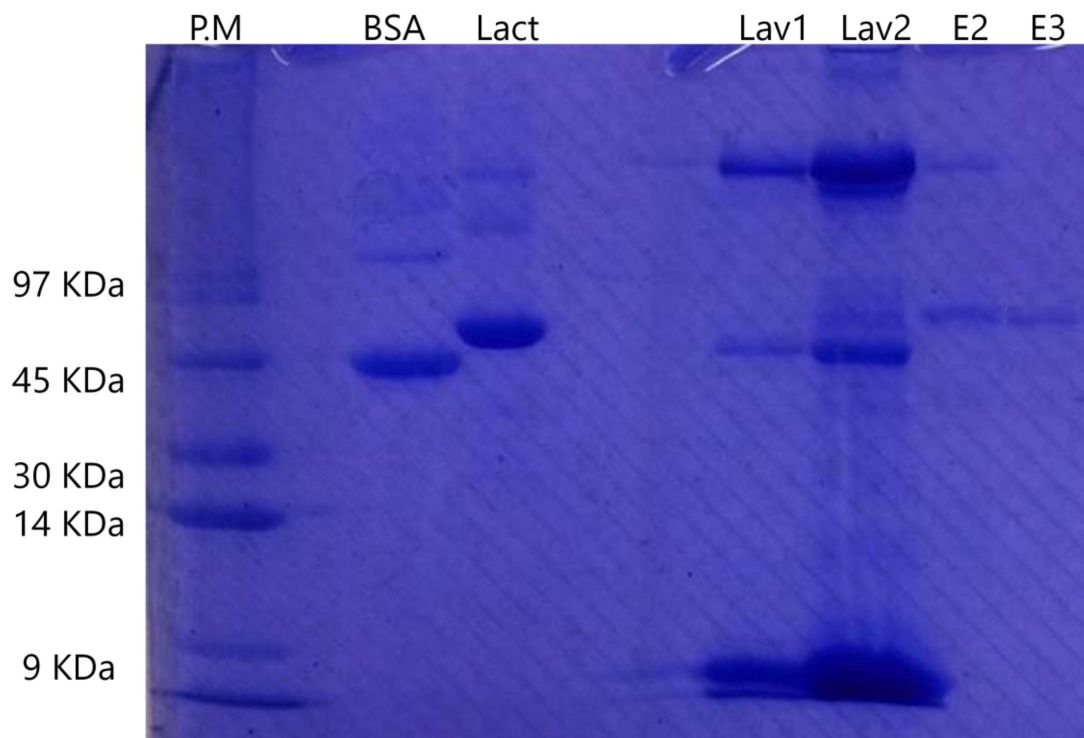


Figura 10: Gel de eletroforese da cromatografia 1 para purificação de lactoferrina. PM é o padrão de massa molar; BSA é a albumina de soro bovino; Lact é a lactoferrina comercial; Lav 1 é a lavagem 1; Lav 2 é a lavagem 2; E.2 é o pico de eluição 2 (eluido com tampão A acrescido de 0,4M de NaCl); E3 é o pico de eluição 3 (eluido com tampão A acrescido de 0,6M de NaCl)

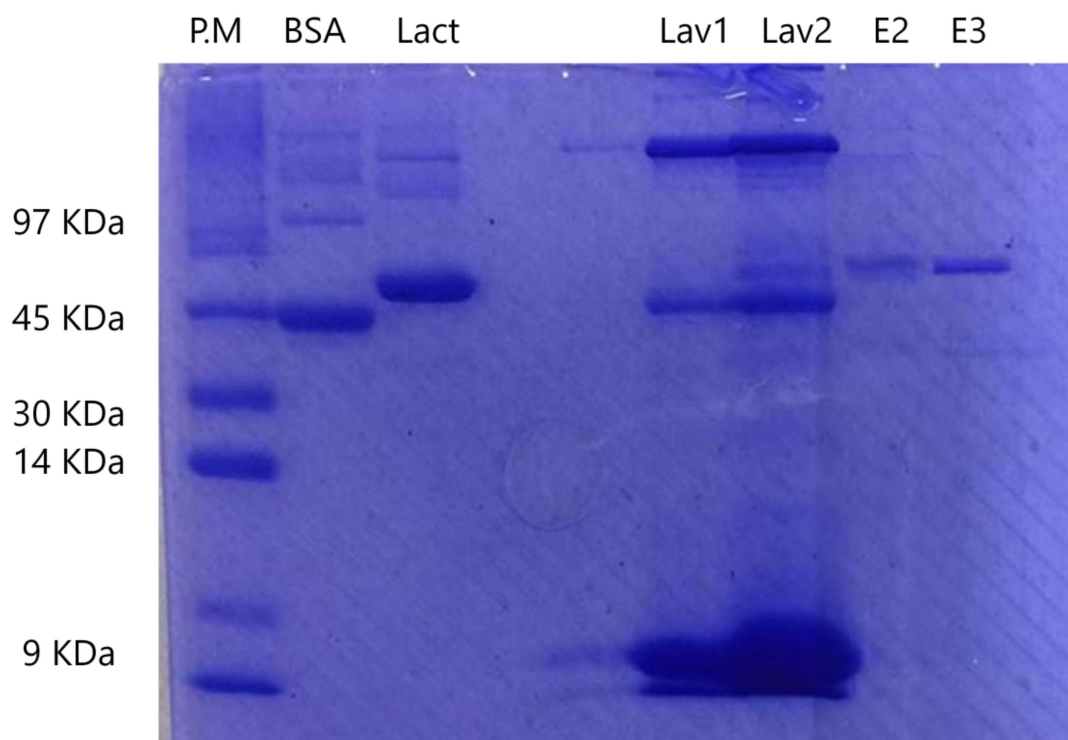


Figura 11: Gel de eletroforese da cromatografia 2 para purificação de lactoferrina. PM é o padrão de massa molar; BSA é a albumina de soro bovino; Lact é a lactoferrina comercial; Lav 1 é a lavagem 1; Lav 2 é a lavagem 2; E.2 é o pico de eluição 2 (eluido com tampão A acrescido de 0,4M de NaCl); E3 é o pico de eluição 3 (eluido com tampão A acrescido de 0,6M de NaCl)

Nota-se que, nos picos 2 e 3 de eluição apareceram somente as bandas de peso molecular próximo a 80 KDa. Assim, infere-se que no pico 2 está a lactoperoxidase e no pico 3 está a lactoferrina purificada, visto que não houve aparecimento de outras bandas nestas mesmas colunas. Assim, atingiu-se o objetivo de isolar a molécula-alvo das demais proteínas presente no soro do leite, mesmo estando em baixas concentrações. Logo, o sistema desenvolvido foi satisfatório para purificação da LF e da lactoperoxidase.

O tamanho dos poros da matriz e sua alta permeabilidade podem levá-la a utilização com soluções mais concentradas e de maior viscosidade. Porém, a concentração de lactoferrina é muito baixa no soro em relação a outras proteínas, logo, não se alcança uma alta capacidade adsorbtiva. Durante a cromatografia não houve aumento na queda de pressão do sistema devido ao acúmulo de material na

coluna, comprovando que esse sistema cromatográfico pode ser utilizado para separação de moléculas que estejam presentes em suspensões mais concentradas e viscosas, estando estas em alta concentração (FIDELIS, 2011).

Segundo Billakanti (2009), a capacidade de ligação dos criogeis é aproximadamente 25 vezes menor que a da resina SP Sepharose. Isto ocorre porque, os poros ocupam cerca de 80% do volume total da matriz. Logo, a área superficial disponível restante para a ligação com proteínas é pequena. Entretanto, estas matrizes possuem vantagens como, alta vazão que suportam, o baixo custo de operação e a grande gama de grupos funcionais disponíveis. Estas qualidades tornam os criogeis matrizes alternativas de boa qualidade, para a extração de proteínas do leite e do soro. A melhoria mais urgente para os criogeis é, justamente, aumentar a área superficial para acoplamento de ligantes.

6. CONCLUSÃO

O criogel preparado pela crio-copolimerização acrilamida e bis-acrilamida apresentou valores expressivos e de acordo com a literatura para porosidade, capacidade de inchamento e volume de expansão, em todas as faixas de AAm:BAAm utilizadas. A utilização do ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico para ativação da matriz se mostrou como um bom ligante para troca catiônica, visto que foi alcançado o rendimento de 15,9%.

As isotermas de adsorção e seus ajustes para o modelo de Langmuir demonstraram que esse criogel tem potencial de aplicação em cromatografias, pois adsorve mesmo em concentrações baixas de soluto. Pelas isotermas também foi possível notar que o tamanho médio dos poros influencia na adsorção, sendo que os mesoporos favorecem o aumento do tempo de residência na coluna, aumentando a adsorção. Já a concentração de ligante apresentou menor relevância, sendo possível observar que elevadas concentrações trazem modificações na malha porosa e podem diminuir a adsorção. Por isso, a cromatografia foi realizada na matriz porosa 5:1 com 1 mol.L^{-1} de ligante.

A cromatografia de troca iônica apresentou bom comportamento, visto que foi possível purificar a lactoferrina, mesmo estando em concentração inferior às demais proteínas presentes no soro do leite.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-LEHIA, I. H. **A simple and rapid colorimetric method for lactose determination in milk.** Food chemistry, v.24, p. 233-240, 1987.

ANDERSSON, J.; MATIASSEN, B. **Simulated moving bed technology with a simplified approach for protein purification. Separation of lactoperoxidase and lactoferrin from whey protein concentrate.** Journal of Chromatography A, v. 1107, p. 88-95, 2006.

ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: **Editora Manole**, p.22, 2003.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I. et al. **Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns.** Journal of Chromatography A, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002.

ARVIDSSON, P; PLIEVA, F.M.; IOZINSKY, V.I.; GALAEV, I.Y.; MATTIASSEN, B. J. **Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent.** Journal of Chromatography, A 986 (2003) 275–290.

BANASZEWSKA, A et al. **Effect and key factors of byproducts valorization: the case of dairy industry.** 97 (2014), 1893-1908.

BARROS, D. M. A.; et al. Remoção de metais em água utilizando diversos adsorventes, **Revista Tecnológica**, Ed especial, p.65- 72, 2000.

BILLAKANTI, J.M.; FEE, C.J. **Characterization of cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange.** Biotechnology and Bioengineering. V 103, p 1155–1163, 2009.

BOKKHIM, H. et al. Evaluation **of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin.** Food Chemistry, v.152, p. 121-127, 2014.

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.

CARVALHO, B. M. A. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliácridamida ativada com íons de cobre.** 2010. 125 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, SILVA, L. H. M; CARVALHO, L. M.; SOARES, A. M; MINIM, S. L. **Microcalorimetric study of adsorption of lactoferrin in supermacroporous continuous cryogel with immobilized Cu²⁺ ions.** J. Chromatogr. A1312 (2013), 1-9.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MININ, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, S. L. **Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions.** Food Chemistry, 154 (2014), 308-314.

CHEN, F. et al. **Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamidebased cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid.** Chemical Engineering Science, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008.

CORNISH, J.; CALLON, K. E.; NAOT, D.; PALMANO, K. P.; BANOVIC, T.; BAVA, U. **Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo.** Endocrinology. 145 (2004), 4366-4374.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Empraba). **Panorama do Leite.** Ano 7, n.65, outubro de 2015.

FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argissolo vermelho amarelo. Química Nova, v. 27, n. 6, 849-854, 2004.

FARREL, H.M. et al. **Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision.** Journal of Dairy Science, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite.** 2011. 87 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

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

GEA NIRO ANALYTICAL METHODS. Total Fat (Röse-Gottlieb Method). Disponível em: <[http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/pickfile/DA8BC7580EF81F9AC12575BC003F489F/\\$FILE/gea-niro-total-fat-rose-gottlieb-method-a9a.pdf](http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/pickfile/DA8BC7580EF81F9AC12575BC003F489F/$FILE/gea-niro-total-fat-rose-gottlieb-method-a9a.pdf)>. Acesso em: 09 de Fevereiro de 2017.

GILES, C. H.; SMITH, D. **A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 47, n. 3, p. 755-765, 1974.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A. et al. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009.

GUIOCHON, G. **Preparative liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 965, n. 1-2, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G. **Monolithic columns in high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.

GUNKO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. **Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation.** Advances in Colloid and Interface Science, 187–188 (2013), 1–46.

HINZ, C. **Description of sorption data with isotherm equations.** Geoderma, v. 99, n. 3-4, p. 225-243, 2001.

KANWAR, JR et al. **Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions.** Molecules, 20 (2015), 9703-9731.

KUMAR, R.; BHATIA, K.L. **Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk.** Lait, v.79, n.2, p. 269-274, 1999.

KUMAR, A.; BANSA, I.; ARVIDSSON, V.; ROYCHOUDHURY, P.; MATTIASSON, P. K. **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 35–42, 2006.

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 (10), p. 445-451, 2003.

LOWRY, O.H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal Biological Chemical, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, A.P.F.; MINIM, L. A.; FONTAN, R.C.I.; MININ, V.P.R.; GONÇALVES, G.R.F.; MÓL, P.C.G. **Adsorptive behavior of a-lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column,** Fluid Phase Equilibria, 401 (2015), 64–69.

MERRIL, C. R. **Gel staining techniques.** Methods Enzymol, v. 182, p. 477–478, 1990

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. **Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry**. Food Industry, Chapter 24 (2013).

MOORE, S. A. et al. **Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution**. Journal of Molecular Biology, v. 274, n. 2, p. 222-236, 1997.

OSCIK, J.; JARONIEC, M. **Liquid-solid chromatography. Recent progress in theoretical studies concerning the dependence of the capacity ratio upon the mobile phase composition**. Journal of Separation Science, v. 5, n. 1, p. 3-12, 1982.

PELEGRINE, D. H. G. **Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas**. Brazilian Journal of Food Technology. VII BMCFB, dez. 2008.

PEREIRA, I. O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico**. 2009. 92f. Monografia (Pós Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Pro-Reitoria de pesquisa e Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Itapetinga, BA, Brasil. 2009.

PERSSE, P.; BAYBAK, O.; PLIEVA, F.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSEN, B.; NILSSON, B.; AXELSSON, A. **Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles**. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 2, p. 224-236, 2004.

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

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

PRAZERES, A. R.; F. CARVALHO, J. R. **Cheese whey management: A review**. Journal of Environmental Management, 110 (2012), 48-68.

SANTOS, S. F.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; FERNANDÉZ, A. G.; PASTRANA, L. M.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. **Lactoferrin-based nanoparticles as a vehicle for iron in food applications – Development and release profile**. Food Research, 90 (2016), 16-24.

SAVINA, I. N. et al. **Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate**. Journal of Chromatography A, v. 1092, n. 2, p. 199-205, 2005a.