

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

**CRIOGÉIS MACROPOROSOS COMO UMA FERRAMENTA VERSÁTIL
PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS: UMA REVISÃO NARRATIVA**

Layse Guedes Campos

Ouro Branco, MG
Novembro de 2021

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

**CRIOGÉIS MACROPOROSOS COMO UMA FERRAMENTA VERSÁTIL
PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS : UMA REVISÃO NARRATIVA**

Layse Guedes Campos

Orientador

Professor Dr. Gabriel de Castro Fonseca

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Engenharia de Bioprocessos**.

Ouro Branco, MG
Novembro de 2021

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

LAYSE GUEDES CAMPOS

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Engenharia de Bioprocessos**.

APROVADO EM _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Gabriel de Castro Fonseca
UFSJ
Orientador

Prof. Ênio Nazare de Oliveira Júnior
UFSJ
Membro da banca de avaliação

Prof. Vagner Fernandes Knupp
UFSJ
Membro da banca de avaliação

Ouro Branco, MG
Novembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Finalizo a graduação com orgulho da realização de vários sonhos neste caminhar, agora fecho um ciclo para iniciar um novo, com uma bagagem rica de aprendizados, amadurecimento de tantas vivências. Prosseguindo em construção, feliz pelas minhas escolhas e pelos meus caminhos tomados.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos. Aos meus pais Raimundo e Nilmar, pelo carinho e amor incondicional, por cada gota de suor derramado, pelo esforço dispensado durante toda a vida e por se fazerem sempre presentes. As minhas irmãs Sandy e Thayná, parceiras de toda a vida. Amo vocês. Aos meus familiares e amigos, porque foram vocês que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades.

Agradeço a meu orientador o professor Gabriel e a professora Sandra, pela excelente orientação. Aos professores reconheço um esforço gigante com muita paciência e sabedoria. Foram vocês que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias. À Universidade quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos.

A todas as pessoas que de uma alguma forma me ajudaram a acreditar em mim eu quero deixar um agradecimento eterno, porque sem vocês minhas conquistas não seriam possíveis.

RESUMO

CAMPOS, Layse Guedes. **Criogéis macroporosos como uma ferramenta versátil para captura e imobilização de biomoléculas : uma revisão narrativa.** p. 30 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Bioprocessos). Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, MG, 2021.

Palavras-chave: Criogel; Purificação; Biomoléculas

Esta revisão salienta a descrição de géis macroporosos formados como resultado da polimerização, sob condições de congelamento, a partir de soluções de monômero. Os materiais resultantes dessa polimerização são conhecidos como criogéis e possuem propriedades particulares. Eles são atraentes em termos de aplicações biotecnológicas. Os criogéis possuem macroporos interconectados permitindo a difusão sem impedimentos de solutos, bem como o transporte em massa de nanopartículas e até micropartículas. A estrutura única dos criogéis, em combinação com porosidade de natureza específica, biocompatibilidade, estabilidade física e química e facilidade de preparação, os torna matrizes atraentes. Recentemente, os criogéis têm sido utilizados como adsorventes para a separação e purificação eficiente de biomacromoléculas, como proteínas, DNA, organelas celulares, vírus e enzimas presentes nas soluções. Apesar da ampla aplicação de criogéis, são necessárias melhorias em sua preparação para minimizar problemas, como a formação de hidrogéis, em vez dos criogéis. Os hidrogéis se formam devido à polimerização imediata após a adição do iniciador redox antes do congelamento do solvente. Nessa revisão serão discutidas as características, a síntese e o uso de criogéis como suportes cromatográficos.

ABSTRACT

CAMPOS, Layse Guedes. **Macroporous cryogels as a versatile tool for capturing and immobilizing biomolecules: a narrative review.** p 30. 2021. Final Paper (Bachelor in Bioprocess Engineering). Federal University of São João del-Rei, Ouro Branco, MG, 2021.

Key words: Cryogel; Purification; Biomolecules

This review highlights the description of macromolecular gels formed as a result of polymerization, under freezing conditions, from monomer solutions. The materials resulting from this polymerization are known as cryogels and have particular properties. They are attractive in terms of biotechnological applications. The cryogels have interconnected macropores allowing unimpeded diffusion of solutes, as well as the mass transport of nanoparticles and even microparticles. The unique structure of cryogels, in combination with porosity of a specific nature, biocompatibility, physical and chemical stability and ease of preparation, makes them attractive matrices. Recently, cryogels have been used as adsorbents for efficient separation and purification of biomacromolecules, such as proteins, DNA, cell organelles, viruses and enzymes present in solutions. Despite the wide application of cryogels, improvements in their preparation are needed to minimize problems, such as the formation of hydrogels, instead of cryogels. Hydrogels are formed due to immediate polymerization after the addition of the redox initiator before the solvent freezes. In this review, the characteristics, synthesis and use of cryogels as chromatographic supports will be discussed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de uma coluna cromatográfica.....	6
Figura 2 - Tipos de colunas cromatográficas.....	12
Figura 3 - Representação esquemática da produção de criogéis.....	15
Figura 4 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações em duas temperaturas (-20°C e 20°C).....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos.....	4
Tabela 2 - Ligantes comuns usados na cromatografia de afinidade.....	7
Tabela 3 - Exemplos de trocadores catiônicos e aniônicos.....	9
Tabela 4 - Exemplos de sistemas para preparação de criogéis poliméricos.....	14
Tabela 5 - Exemplos de aplicações de criogel para separação de biomoléculas.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam: Acrilamida

APS: Ammonium persulphate (persulfato de amônio)

BAAm: N,N-metileno-bis-acrilamida

HIC: hydrophobic interaction chromatography (cromatografia de interação hidrofóbica)

IEC : ion exchange chromatography (cromatografia de troca iônica)

IAC: Immunoaffinity chromatography (cromatografia de imunoafinidade)

MBAAm: N,N-metileno-bis(acrilamida)

MIP: Molecularly printed polymers (polímeros impressos molecularmente)

PHEMA: Poli(2-hidróxi etil metacrilato)

PLOT: Porous layer open tubular (tubular aberto de camada porosa)

TEMED: N,N,N,N-tetrametiletenodiamino

UI: Unidade individual

WCOT: Wall- coated open tubular (tubular aberto revestido de parede).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	2
3	METODOLOGIA	2
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
4.2	PRODUÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS	3
4.3	CROMATOGRAFIA.	6
4.3.1	Interação por afinidade.....	7
4.3.2	Interação eletrostática	9
4.3.3	Interação Hidrofóbica.....	11
4.4	TIPOS DE COLUNAS PARA SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS.	12
4.5	CRIOGÉIS: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES	14
4.5.1	Síntese do Criogel.....	14
4.5.2	Propriedades do criogel.....	17
4.6	APLICAÇÕES DO CRIOGEL PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.....	21
5	CONCLUSÃO	24
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biotecnologia e a demanda das indústrias farmacêuticas, químicas e de cosméticos por preparações biologicamente ativas cada vez mais puras (compostos de baixa massa molar, biopolímeros como proteínas, DNA, vírus, organelas celulares), fez com que o interesse sobre os processos de purificação de biomoléculas aumentasse (LIU; KOKARE, 2017). A indústria de alimentos e bebidas também possui uma alta demanda por biomoléculas como enzimas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação (FELIPE; BICAS, 2016).

A purificação de biomoléculas exige o emprego de muitas técnicas devendo-se buscar a mais apropriada para cada estágio de separação. Assim, são empregadas técnicas diferentes na remoção de compostos insolúveis ou clarificação, no isolamento do produto ou captura, na purificação intermediária e no polimento (TEEPAKORN; FIATY; CHARCOSSET, 2016). Para o isolamento e purificação de biomoléculas podem ser usadas técnicas como homogeneização, centrifugação, filtração, extração em duas fases aquosas e cromatografia (FIDELIS, 2011).

Dentre as técnicas de purificação a cromatografia é uma das mais importantes, geralmente estão presentes em todos os processos de purificação de biomoléculas, ela permite a separação, identificação e purificação dos componentes de misturas. A grande disponibilidade das técnicas cromatográficas com diferentes propriedades fornece combinações poderosas para a purificação de biomoléculas (COSKUN, 2016). Com a utilização dessas em sequência, por exemplo, é possível purificar uma única enzima das muitas presentes num extrato celular. A quantidade e tipo de técnicas usadas dependerão da natureza e das características das amostras, assim como do grau de pureza desejado no produto final (RAJAMANICKAM; HERWIG; SPADIUT, 2015).

Apesar dos processos de purificação cromatográficos de biomoléculas serem conhecidos, grandes estruturas biomoleculares e materiais muito concentrados desafiam os limites dos métodos cromatográficos convencionais em relação a sua capacidade de purificação, além disso os processos cromatográficos convencionais muitas vezes não são viáveis quando o produto de interesse possui baixo valor agregado, pois as resinas utilizadas são caras. A partir desse contexto é de extrema

importância o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo para purificação de biomoléculas (ZYDNEY, 2021).

Os criogéis macroporosos surgem como materiais alternativos das colunas cromatográficas convencionais. Além de possuírem custo menor do que as resinas utilizadas atualmente eles podem ser facilmente utilizados para purificar amostras complexas e biomoléculas grandes (PFAUNMILLER et al., 2013).

Os criogéis são materiais macroporosos interconectados que são sintetizados em temperaturas abaixo de 0 °C usando um par iniciador / ativador disponível (ANDAÇ et al., 2016). A polimerização é realizada em solução de monômero congelado, onde ocorre em locais intersticiais entre os cristais de gelo. Os cristais servem como um porogênio durante o processo de polimerização e um polímero macroporoso é formado após o processo de descongelamento (LOZINSKY, 2018).

As propriedades significativas dos criogéis, como poros grandes (10–200 µm), caminhos curtos de difusão, flexibilidade, boa biocompatibilidade e alta resistência mecânica, os tornam portadores eficientes para imobilização e purificação de biomoléculas (SAYLAN; DENIZLI, 2019). A presente revisão tem como objetivo discutir sobre a síntese e caracterização e aplicações dos criogéis supermacroporoso.

2 OBJETIVO

Realizar uma breve revisão narrativa sobre o potencial da utilização de criogel macroporoso, descrevendo os métodos de preparação, bem como propriedades, e aplicações dos criogéis para purificação de biomoléculas.

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado na forma de revisão narrativa da literatura. A revisão narrativa fornece uma síntese ou descrição de um determinado assunto por meio da avaliação das produções científicas já existentes. Esse tipo de estudo têm um papel importante na educação continuada, pois fornece aos leitores conhecimento atualizado sobre um tema específico, o que contribui para a realização de novas pesquisas (BRUM et al., 2015). Os dados coletados foram retirados de artigos específicos sobre o tema e os objetivos mencionados, sendo estes pesquisados em

bases de dados contendo acervos de artigos científicos, artigos de periódicos e de revistas, teses e dissertações.

Os estudos disponíveis na literatura científica foram identificados utilizando as bases de dados Scientific- Eletronic Library Online (SCIELO), PubMed e Google Acadêmico. Para a busca foram utilizadas as palavras-chave; criogel, purificação, biomoléculas, cromatografia. Foram realizadas diversas combinações com as palavras-chaves.

Este estudo teve como critérios de inclusão: artigos, teses e dissertações em inglês e português, disponibilidade do texto completo em suporte eletrônico, data de publicação a partir do ano de 2013. Os critérios de exclusão foram: anais de congressos ou conferências; teses, dissertações e artigos repetidos; e publicações de anos anteriores a 2013.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.2 PRODUÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

A produção dos produtos biotecnológicos envolve duas etapas: *upstream* e *downstream*. A etapa *upstream* é aquela em que ocorre a seleção dos microrganismos, define-se as condições ideais do meio para o crescimento celular e então efetua-se a fermentação para multiplicação dos microrganismos e expressão da biomolécula de interesse. Com o final da fermentação e tendo-se atingido a quantidade desejada de produto de interesse, uma sequência de etapas, chamadas de *downstream*, devem ser realizadas para eliminação das impurezas e purificação do produto (JOZALA et al., 2016). Diversas técnicas podem ser utilizadas com a finalidade de remover os compostos interferentes do fermentado isolando a molécula de interesse. A escolha adequada depende primeiramente de propriedades físico-químicas da molécula alvo, sendo mais comumente envolvidas em processos de separação por tamanho, forma, densidades, solubilidade e carga eletrostática (HANKE; OTTENS, 2014).

Antes de se iniciar a fase de purificação é importante saber a localização final do produto de interesse, que pode ser extracelular ou intracelular. Se ele estiver no meio

intracelular, será necessário adicionar uma etapa de rompimento celular no *downstream* (JOZALA et al., 2016).

A purificação pode ser dividida em etapas que dependem da aplicação final do produto, requerendo maior ou menor grau de pureza. O número de operações de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo, de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes no meio (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014). Produtos que requerem maior grau de pureza, como os destinados a usos terapêuticos possuem uma elevada complexidade no processo de purificação. Já para a utilização de enzimas em biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (BOI, 2019).

A etapa *downstream* pode ser dividida em quatro processos principais: clarificação, rompimento celular, purificação e polimento.

a) Clarificação: Corresponde ao processo de separação das células suspensas do meio de cultivo fermentado. Em escala industrial os processos mais utilizados nessa etapa são a centrifugação e a filtração. O meio isento de células é denominado então clarificado.

b) Rompimento celular: Essa etapa ocorre após a clarificação nos processos em que a molécula de interesse é um produto intracelular. Ela tem como finalidade romper as células a fim de obter um homogeneizado celular constituído por molécula alvo, moléculas contaminantes e fragmentos celulares.

c) Purificação: A purificação é dividida em purificação de baixa resolução, que é uma etapa na qual é feita concentração da molécula de interesse, separando-a das moléculas com características físico-químicas diferentes; e a purificação de alta resolução, que é a fase em que ocorre efetivamente a separação da molécula de interesse das demais que apresentam características físico-químicas semelhantes.

d) Polimento: Fase em que ocorre a estabilização e adequação do volume, com a finalidade de adequar o acondicionamento para uso e comercialização do produto final (ZYDNEY, 2015).

A Tabela 1 mostra as diferentes técnicas que podem ser empregadas durante a etapa *downstream*.

Tabela 1 - Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos

Etapa do processo	Técnicas de separação	Princípio
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração por membranas	Tamanho de partículas
	Flotação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento celular	Homogeneização de alta pressão	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação da parede ou membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração	Massa molar e raio hidrodinâmico
Purificação de alta resolução	Sistemas de duas fases aquosas	Solubilidade, massa molar
	Cromatografia de troca iônica	Carga da superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
Polimento	Cristalização	
	Liofilização	
	Secagem	

Fonte: PESSOA et al., 2015.

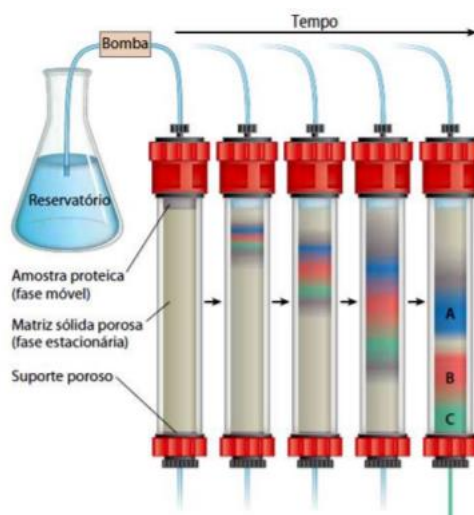
A maioria das técnicas utilizadas para a purificação de biomoléculas (precipitação, ultrafiltração e as técnicas cromatográficas) apresentam dificuldades do ponto de vista técnico. As etapas de concentração, como a precipitação e ultrafiltração, podem ter baixos rendimentos. A precipitação por exemplo apresenta baixa capacidade de purificação nos meios em que os contaminantes e a molécula de interesse apresentam propriedades físico-químicas semelhantes. Já o emprego de procedimentos cromatográficos convencionais na separação das biomoléculas, muitas vezes é limitado pela dificuldade de ampliação em larga escala e pelo alto

custo das resinas, principalmente pra purificação de biomoléculas que possuem baixo valor agregado (SINGH; HERZER, 2017).

4.3 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é uma técnica de purificação poderosa, que separa os componentes de uma mistura de acordo com sua distribuição entre duas fases, uma fase móvel formada pela mistura dos componentes a serem separados, e outra fase estacionária que normalmente é sólida, e em sua forma mais simples consiste em um leito empacotado dentro de uma coluna. Conforme representado na Figura 1, durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária os componentes presentes na fase móvel percorrem o sistema a diferentes taxas de migração que dependem das suas interações com a fase estacionária, bem como da vazão da fase móvel (STEINEBACH; MÜLLER-SPÄTH; MORBIDELLI, 2016).

Figura 1: Representação esquemática de uma coluna cromatográfica



Fonte: (LEHNINGER et al., 2014).

A cromatografia foi descoberta como uma técnica de purificação em 1906, por um pesquisador russo chamado Mikhael Tswett. Em seu experimento o pesquisador conseguiu isolar a clorofila de uma mistura de pigmentos de plantas, utilizando uma

coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio e éter de petróleo como fase móvel (RODRIGUES et al., 2015).

Em geral, a maioria dos processos de purificação de biomoléculas envolvem etapas de cromatografia, devido à versatilidade e ao elevado grau de pureza que a técnica proporciona. É importante ressaltar que diferentes técnicas cromatográficas podem ser combinadas para atingir a pureza desejada (LIMA, 2014).

As separações cromatográficas abrangem um número de diferentes interações da fase móvel com a fase estacionária, das quais as mais comuns são as interações hidrofóbicas, por afinidade e eletrostática (COSKUN, 2016).

4.3.1 Interação por afinidade

A cromatografia de afinidade baseia-se na interação específica entre a molécula alvo e um ligante imobilizado na fase estacionária. Nessa cromatografia a amostra contendo o composto de interesse é aplicada à coluna de afinidade através da fase móvel, que foi preparada em pH e força iônica adequados para ligação soluto-ligante (HAGE; MATSUDA, 2015).

Enquanto a amostra estiver passando através da coluna, os compostos que possuem afinidade com o ligante se ligam e os outros solutos presentes na amostra serão lavados ou eluídos da coluna como compostos não retidos. Depois de todos os componentes não retidos serem lavados da coluna, elui-se a molécula de interesse. A eluição pode ser específica, utilizando um ligante competitivo, por alteração do pH, força iônica ou polaridade (ANUSHA, 2018).

O ligante de afinidade pode ser um derivado biológico ou sintético e é caracterizado por ter alta especificidade em relação à ligação de uma dada molécula alvo ou classe de moléculas alvo (LACKI; RISKE, 2019). Na Tabela 2 estão descritos os ligantes de afinidade mais comuns utilizados na cromatografia de afinidade, bem como as moléculas que possuem especificidade com os mesmos. Os ligantes biológicos são obtidos de fontes naturais, os mais comuns são nucleotídeos, coenzimas, cofatores, lectinas, anticorpos, proteínas de ligação ou receptores e os ligantes de afinidade sintética mais comuns são os boronatos, corantes de triazina e íons metálicos (HAGE et al., 2017).

Tabela 2: Ligantes comuns usados na cromatografia de afinidade

Classificação	Ligantes	Moléculas de ligação
Biológico	Anticorpos	Antígenos (hormônios, peptídeos, proteínas, componentes celulares)
	Cofatores, coenzimas e substrato	Enzimas
	Lectinas	Açúcares, glicoproteínas e glicolipídios
	Ácidos nucleicos	Ácidos nucleicos complementares e proteínas de ligação a ácidos nucleicos
Sintéticos	Proteína A / proteína G	Anticorpos
	Boronatos	Açúcares, glicoproteínas e compostos contendo diol
	Corantes de triazina	Proteínas e enzimas de ligação a nucleotídeos
	Quelatos de íons metálicos	Aminoácidos, peptídeos e proteínas de ligação a íons metálicos

Fonte: HAGE et al., 2017.

A alta seletividade dos ligantes biológicos é uma vantagem deles em relação aos ligantes sintéticos, no entanto, apresentam algumas desvantagens, como baixa capacidade de ligação, alto custo e baixa estabilidade. Já os ligantes sintéticos podem oferecer soluções para esses problemas, fornecendo eficácia e baixo custo, mas podem ter seu uso limitado devido a toxicidade que podem apresentar. A grande variedade de ligantes disponíveis, torna a cromatografia de afinidade prontamente disponível para uma ampla gama de aplicações, incluindo a purificação de ácido nucleico, a purificação de proteínas a partir de extratos isentos de células, purificação do sangue, entre outros (PERRET; SANTAMBIEN; BOSCHETTI, 2015).

Dentre a cromatografia de afinidade existem dois tipos: a cromatografia de imunoafinidade (IAC) e a cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados . A cromatografia de afinidade utiliza anticorpos ou moléculas relacionadas a anticorpos como fase estacionária. As colunas IAC têm tipicamente uma ligação forte e seletiva entre anticorpos e seus antígenos alvo. Anticorpos imobilizados são utilizados para purificação ou separação de vários substratos, contendo enzimas, peptídeos, anticorpos e células (LI et al., 2017).

Já a cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados em que íons metálicos são usados como ligantes aproveita ao máximo as afinidades de íons

metálicos com os grupos funcionais da superfície das proteínas, principalmente histidinas. As proteínas marcadas com histidina podem ser purificadas seletivamente por meio da interação entre o marcador de poli-histidina com vários cátions, como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} (RODZIK *et al.*, 2020).

A cromatografia de afinidade oferece alta seletividade e alta resolução. Devido à alta especificidade da interação de afinidade, essa técnica é frequentemente aplicada como uma etapa de captura primária em um processo de purificação cromatográfica, mas também pode ser utilizada como etapa final para remover as impurezas restantes presentes em uma amostra (HAGE; MATSUDA, 2015).

4.3.2 Interação eletrostática

A cromatografia de troca iônica (IEC) baseia-se no princípio da reversibilidade das atrações eletrostáticas de uma molécula carregada em relação a uma matriz sólida com grupos de cargas opostas e ligados covalentemente à matriz. A IEC pode ser usada para purificação de todos os tipos de moléculas carregadas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, biopolímeros e aminoácidos (COSKUN, O, 2016).

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária ou por variação de pH (FASCIANO; DANIELSON, 2016).

A fase estacionária da cromatografia de troca iônica pode conter ligantes catiônicos ou aniônicos. As resinas de troca aniônica são trocadoras de cargas negativas, ou seja, a resina é carregada positivamente. Por outro lado, as resinas de troca catiônica são trocadoras de cargas positivas, sendo assim carregadas positivamente (BARRAGAN, 2016).

Alguns dos ligantes de troca iônica frequentemente utilizados estão resumidos na Tabela 3. Com base nas propriedades de dissociação, esses ligantes são classificados como ligantes 'fortes' ou 'fracos'. O número de cargas em um trocador iônico forte permanece constante independentemente do pH do tampão. Estes tipos de resinas mantêm sua seletividade e capacidade ao longo de um grande intervalo de

pH. Por outro lado, os estados iônicos dos ligantes de troca iônica fracos dependem do pH, o que pode, em alguns casos, oferecer seletividade extra. O acoplamento dos ligantes às matrizes leva à produção de adsorventes de troca iônica (FERRI, M. *et al.*, 2020).

Tabela 3: Exemplos de trocadores catiônicos e aniônicos.

Tipo de resina	Trocadores de íons	Grupo funcional	Classificação
Troca aniônica	Dietilaminoetil	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$	Fraca
	Aminoetil quaternário	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$	Forte
	Amônio quaternário	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$	Forte
Troca catiônica	Carboximetil	$-O-CH_2COO^-$	Fracos
	Sulfopropil	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2SO_3^-$	Forte
	Metilsulfonato	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$	Forte

Fonte: (FERRI, M. *et al.*, 2020).

A cromatografia de troca iônica possui alto poder de resolução e capacidade e pode ser utilizada para a purificação de qualquer molécula carregada que seja solúvel em um solvente aquoso. O processo para cromatografia de troca iônica é semelhante ao descrito para cromatografia de afinidade, com diferenças importantes na capacidade da coluna e na mecânica da eluição (TEREFE *et al.*, 2014).

Inicialmente, na cromatografia de troca iônica a coluna é equilibrada com um tampão de baixa força iônica contendo íons de carga oposta à resina, esse tampão tem como vantagem o baixo custo. Esses contra-íons são deslocados por moléculas carregadas no fluxo de alimentação, que adsorvem à resina. Nessa técnica, a força e a seletividade da ligação entre a proteína alvo e a resina podem ser otimizadas ajustando a força iônica e pH do tampão e a taxa de fluxo através da coluna, de modo que seja alcançada a retenção máxima da molécula alvo (REUHS, 2017).

No entanto, como muitas proteínas compartilham o mesmo perfil de cargas, numerosos contaminantes podem se ligar na coluna, portanto a especificidade de uma coluna de troca iônica é sempre menor que a de uma coluna de afinidade. Mas sua ampla aplicabilidade (principalmente para proteínas e enzimas), custo moderado, capacidade de resolução, facilidade de expansão e automação levaram a tornar-se

uma das cromatografias líquidas mais versáteis e amplamente usadas. Entretanto, raramente este tipo de cromatografia é utilizado como etapa única de purificação devido à baixa especificidade (PERIAT *et al.*, 2016).

A cromatografia de troca iônica é um método eficiente para separar proteínas de tamanho pequeno e médio (peso molecular de até 70.000), e amplamente utilizado não apenas em laboratório, mas também em processos de produção de biotecnologia. Ela também é usada para a separação de biomoléculas muito maiores, como imunoglobulinas, DNAs plasmidiais e vírus (BÜYÜKKÖROĞLU, 2018).

4.3.3 Interação Hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) separa as biomoléculas com base em sua hidrofobicidade, ela se baseia na interação entre as partes hidrofóbicas da superfície de uma biomolécula e ligantes hidrofóbicos imobilizados na fase estacionária. A hidrofobicidade pode ser definida, em termos gerais, como a repulsão entre uma molécula apolar e um ambiente polar, como aquele conferido pela água, metanol e outros solventes polares (TOMAZ, 2017).

Na HIC, uma fase móvel com alta concentração salina favorece a adsorção das biomoléculas e o decréscimo da concentração salina favorece a dessorção. Na ausência de sal, o solvente polar é organizado em uma estrutura semelhante a uma gaiola em torno do sistema hidrofóbico e este é um arranjo entropicamente desfavorável, com a adição de sal, as moléculas do solvente dispostas em torno das porções hidrofóbicas irão interagir com os íons do sal e isso leva as porções hidrofóbicas a se unirem. Os sais mais comuns empregados na cromatografia hidrofóbica são o fosfato de amônio e sais de sulfato de amônio ou sódio (HAVERICK *et al.*, 2014).

A cromatografia hidrofóbica mostra capacidade similar à cromatografia de troca iônica (IEC) e um alto nível de resolução. HIC costuma ser uma excelente escolha após a troca iônica em um procedimento de purificação de proteínas. Ambas as técnicas têm uma aplicabilidade ampla e são complementares, uma vez que separam de acordo com a hidrofobicidade e carga, respectivamente (VALEJA *et al.*, 2015).

Devido à sua alta versatilidade e eficiência, a HIC é amplamente utilizada na separação de proteínas homólogas, receptores, anticorpos, proteínas recombinantes

e ácidos nucleicos. Como vantagens esta técnica emprega condições não desnaturantes, não requer o uso de solventes orgânicos ou altas temperaturas, e as separações são realizadas em pH fisiológico, o que permite a preservação da estrutura das biomoléculas (TOMAZ, 2017).

4.4 TIPOS DE COLUNAS PARA SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Na cromatografia a fase estacionária tem uma grande influência no desempenho da purificação. Ao se trabalhar com biomoléculas, é desejável que a coluna seja biocompatível e com baixa adsorção inespecífica. Além disso, deve ser estável mecanicamente para suportar a vazão e pressão do líquido. Ela também deve ser compatível com diferentes solventes, além de uma ampla faixa de pH e condutividades (LYNCH *et al.*, 2019).

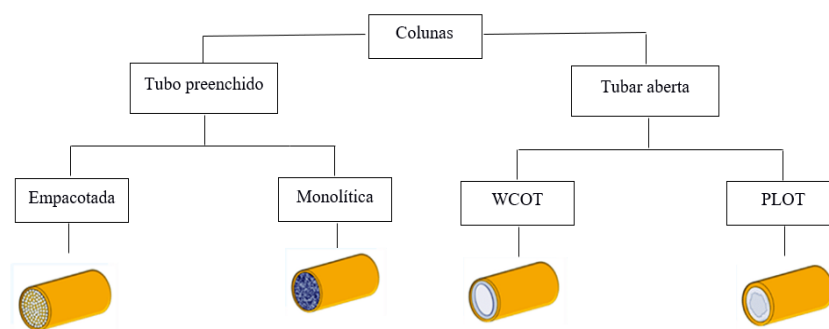
Existem dois tipos principais de colunas analíticas para cromatografia líquida que podem ser classificadas de acordo com seu preenchimento, as com o tubo preenchido e as tubulares abertas, como pode ser observado na Figura 2 (LI *et al.*, 2017).

As colunas com o tubo preenchido são divididas em empacotadas e monolíticas. As colunas empacotadas são preenchidas inteiramente com partículas, sendo que aquelas à base de sílica são as mais empregadas. Partículas de sílica podem ser preparadas de diferentes maneiras, produzindo características únicas, resultando em uma ampla gama de colunas empacotadas disponíveis comercialmente (LAMBERT *et al.*, 2016). Já as colunas monolíticas consistem em uma coluna contínua porosa com estrutura de bloco feita a partir de polímeros. A eficiência das colunas monolíticas depende do tamanho dos macroporos, esqueleto uniforme e tipo de polímero empregado. As colunas de tubo preenchido foram empregadas nos primeiros sistemas instrumentais para cromatografia líquida, e até hoje são as mais utilizadas (NEMA; CHAN; HO, 2014).

Já, as colunas tubulares abertas, as quais possuem fase estacionária aderida somente à parede interna do tubo, mantendo o centro vazio, são divididas em WCOT (tubular aberto revestido de parede) e PLOT (tubular aberto de camada porosa). O que as diferencia é o caráter da fase estacionária: nas colunas WCOT é não porosa, e na PLOT é porosa (MANOUSI; TZANAVARAS; ZACHARIS, 2020). Inicialmente

introduzidas para cromatografia gasosa em 1958 por Golay as colunas tubulares abertas, surgiram pela primeira em cromatografia líquida em 1966, quando Pretorius e Smuts viram elas como alternativas para se trabalhar utilizando fluxos maiores sem aumento significativo da pressão na coluna (NOVOTNY, 2017).

Figura 2: Tipos de colunas cromatográficas



Fonte: (LEAL; SILVA; LANÇAS, 2017).

Apesar de muitos anos de intensa pesquisa e do alto padrão alcançado atualmente pela tecnologia de colunas para cromatografia líquida, alguns problemas persistem e novos desenvolvimentos impulsionam pesquisas nesta área. As colunas mais convencionais como as empacotadas apresentam algumas limitações como baixas taxas de fluxo, altas pressões, dificuldade de “scale-up”. Por este motivo não são as mais indicados para a separação de biomoléculas de tamanhos maiores presentes em meios viscosos e de baixo coeficiente de difusão (RATHORE; KUMAR; KATEJA, 2018).

A constante procura por moléculas biológicas altamente puras desencadeou estudos e o desenvolvimento de materiais alternativos que ultrapapassem as limitações das colunas convencionais para purificação de biomolécula. A partir desta busca surgiram novos suportes cromatográficos baseados na utilização de criogéis como fases estacionárias, materiais que permitem melhorar a difusão, se trabalhar com altas taxas de fluxo e baixas pressões devido aos seus macroporos. Diversos materiais poliméricos podem ser usados como fase estacionária em cromatografias, mas os materiais poliméricos macroporosos (criogéis) têm se destacado devido à sua versatilidade, tendo aplicações em diferentes áreas, como biotecnologia, química e

biologia, permitindo a purificação de ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos e outras biomoléculas (SINGH et al., 2014).

4.5 CRIOGÉIS: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado. Apresentam uma estrutura sólida e esponjosa com um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 200 μm que permitem a passagem através do leito até mesmo de células inteiras, como as células microbianas ou fragmentos de células, proporcionando uma maior permeabilidade devido à baixa resistência ao escoamento dos fluidos (REICHELT, 2015).

Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades. São versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e de baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas na cromatografia (SAYLAN; DENIZLI, 2019).

4.5.1 Síntese do Criogel

O criogel é obtido quando catalisadores adequados são usados para a polimerização de uma solução aquosa contendo monômeros em condições criogênicas (abaixo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) (OKAY; LOZINSKY 2014).

Vários pares de monômeros podem ser utilizados para a preparação de criogéis por co-polimerização de reticulação por radicais livres, sendo os mais utilizados para formação do criogel a acrilamida (AAM) e N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam). Um sistema iniciador redox de persulfato de amônio (APS) e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) é geralmente usado para iniciar as reações de polimerização (OKAY, 2014). Alguns dos diferentes compostos poliméricos que podem ser utilizados na síntese dos criogéis, bem como as temperaturas de congelamento apropriadas, podem ser observados na Tabela 4.

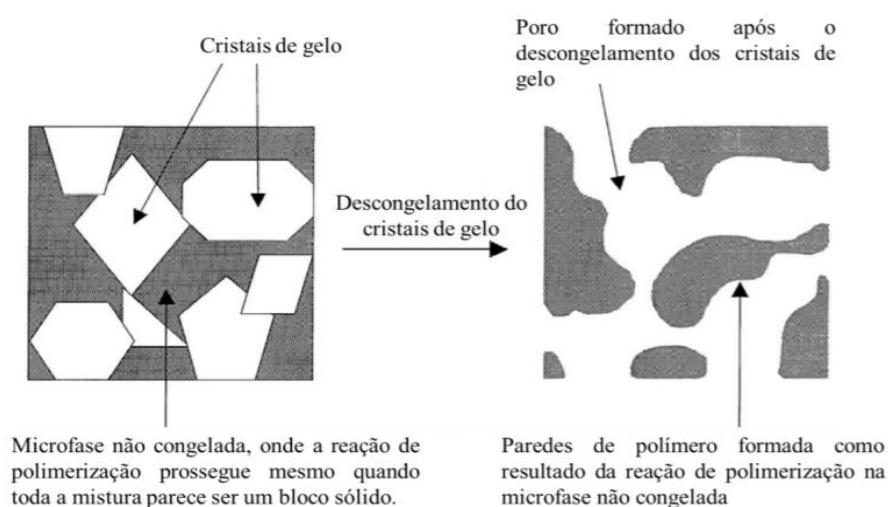
Tabela 4- Exemplos de sistemas para preparação de criogéis poliméricos

Monômeros e reticulantes	Solvente	Catalisador	Temperatura (°C)
Ácido metacrílico + oligoetilenoglicol Diacrilato	Água	APS+ TEMED	-20
N,N-dimetilacrilamida + N,N-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-16
N-isopropilacrilamida + N,N-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-18
Acrilamida + N,N-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-20
N-isopropilacrilamida + alil glicidil éter + N, N'-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-20
N,N-dietilacrilamida + N,N-metileno-bis-acrilamida	Água	APS+ TEMED	-12

Fonte: Adaptado de Okay (2014).

A formação do criogel macroporoso ocorre devido aos princípios da criogeificação. Durante este processo os cristais de gelo em crescimento são os responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura macroporosa. Mais de 90% do monólito é composto de água e apenas 10% é a fase de gel. Por isso, os cristais de gelo desempenham o papel de modelos porogênicos, ou seja, a forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem durante a síntese do criogel, como ilustrado na Figura 3 (ERTURK; MATTIASSON, 2014).

Figura 3 - Representação esquemática da produção de criogéis



Fonte: Adaptado de Erturk e Mattiasson (2014).

4.5.1.1 Preparação solução contendo os precursores do criogel

A preparação da solução inicial contendo os precursores monoméricos é simples. A solução inicial deve conter os dois monômeros que vão constituir a rede estrutural do criogel, e ainda um agente reticulante, iniciadores da reação de polimerização e o solvente que vai formar os poros (MEMIC et al., 2019). Por exemplo, para preparação do criogel podem ser usados os monômeros N,N-metileno-bis-acrilamida (BAam), como agente reticulante a N,N-metileno-bis(acrilamida) (MBAam) e como iniciadores N,N,N,N-tetrametil-enodiamino (TEMED), persulfato de amônio (APS). A água é amplamente utilizada como solvente para a produção do criogel devido às suas propriedades ecológicas, além de ser mais barata do que outros solventes, como dimetilsulfóxido, dioxano, dimetilformamida e ciclo-hexano que possuem temperatura de congelamento relativamente alta e também podem ser usados para a preparação de criogéis (ERZENGIN, 2021).

Uma vez que a polimerização dos iniciadores radicais depende da temperatura, as soluções de reação devem ser resfriadas antes da adição do iniciador, caso contrário, a geleificação começará antes do congelamento do sistema de reação, resultando na formação de géis convencionais. Alternativamente, inibidores de polimerização como a hidroquinona podem ser incluídos no sistema de reação para alterar o início das reações além do congelamento da solução (LOZINSKY, 2014).

A preparação da solução inicial é um passo importante, pois alterações na quantidade de água, o solvente mais usual, alterações na concentração dos monômeros e iniciadores da polimerização poderão modificar as características do criogel, tais como tamanho do poro e espessura da parede do poro. A faixa de concentração dos monômeros é geralmente entre 2 e 20% (m / v), pois criogéis formados com concentrações de monômeros muito baixas são mecanicamente fracos (SINGH et al., 2014).

Para a formação do criogel a mistura reacional, contendo os precursores da formação de gel deve ser congelada a temperaturas abaixo de 0°C, entre -10°C a -20°C. A temperatura de criogeificação a que o criogel é sujeito na solução é um passo importante sendo também responsável, por definir tanto o tamanho, como a quantidade de poros existentes no criogel. O sistema do criogel na forma congelada, apesar de parecer um único bloco sólido, permanece essencialmente heterogêneo

contendo uma micro-fase líquida não congelada ao longo dos cristais formados pelo solvente congelado (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014).

Ao se aumentar a concentração dos polímeros a resistência mecânica aumenta, mas o tamanho dos poros diminui. Em contrapartida, quando se diminui a temperatura da polimerização o tamanho dos poros tende a aumentar. Esses parâmetros de síntese podem ser usados para ajustar as propriedades dos criogéis (WANG, J. et al, 2015).

Após o fim da etapa de congelamento, o criogel é retirado do banho de gelo e colocado à temperatura ambiente. À medida que os cristais de solvente fundem e a rede polimérica é hidratada, dá-se por fim a formação de um criogel macroporoso interconectado. Os cristais do solvente congelado quando fundem deixam um sistema contínuo de lacunas formando uma rede interconectada de poros fornecendo canais de passagem para a fase móvel (LOZINSKY; OKAY, 2014).

4.5.2 Propriedades do criogel

Os criogéis possuem uma ampla variedade de morfologias e propriedades, que podem ser personalizadas para uma aplicação específica. As propriedades dos criogéis dependem da estrutura dos poros (tamanho, distribuição e interconectividade), espessura da parede dos poros e densidade expressa como a concentração de polímero nas paredes dos poros dilatadas. O tamanho juntamente com a interconectividade dos poros, controla o transporte de massa no gel. A espessura e a densidade da parede do poro determinam as propriedades mecânicas macroscópicas do criogel (RAZAVI; QIAO; THAKOR, 2019).

Como sua estrutura é composta por grandes poros interconectados e densas paredes de polímero, os criogéis podem ser secos sem colapsar a estrutura porosa. Quando embebida no solvente, a estrutura original é totalmente restaurada por ressurgimento rápido, um processo que dura alguns segundos. Esta é uma propriedade importante dos criogéis, uma vez que simplifica seu armazenamento. Podem ser armazenados secos e ressurgidos antes do uso (YETISKIN; AKINCI; OKAY, 2017).

Outra propriedade importante dos criogéis é a elasticidade. Devido à elasticidade e morfologia esponjosa, os criogéis podem suportar grandes

deformações e podem ser facilmente comprimidos em até 80% sem sofrer danos mecânicos. Eles mostram propriedades de recuperação contra compressão. Depois de liberar a pressão, os criogéis retornam instantaneamente à sua forma inicial. Devido à estabilidade mecânica, a compressão repetida dos criogéis não causa nenhuma distorção de sua estrutura porosa (ERTÜRK, G.; MATTIASSON, 2014).

A aplicação de criogéis em diferentes áreas da biotecnologia depende de características estruturais como geometria do criogel, porosidade geral, tamanho médio e distribuição dos poros, área de superfície, interconectividade de poros, bem como estabilidade mecânica e química. Como descrito, a morfologia porosa dos criogéis decorre do congelamento da mistura de reação antes da polimerização e da concentração de polímeros utilizada para formação do criogel. O congelamento de misturas complexas é um processo aleatório e, portanto, cada monólito de criogel terá sua própria impressão digital porosa, resultando em propriedades físicas únicas. Nesta perspectiva, cada criogel deve ser considerado como um lote separado e, idealmente, deve ser caracterizado de acordo com técnicas que não comprometam a eficiência e qualidade dos criogéis (ÖNCEL et al, 2017).

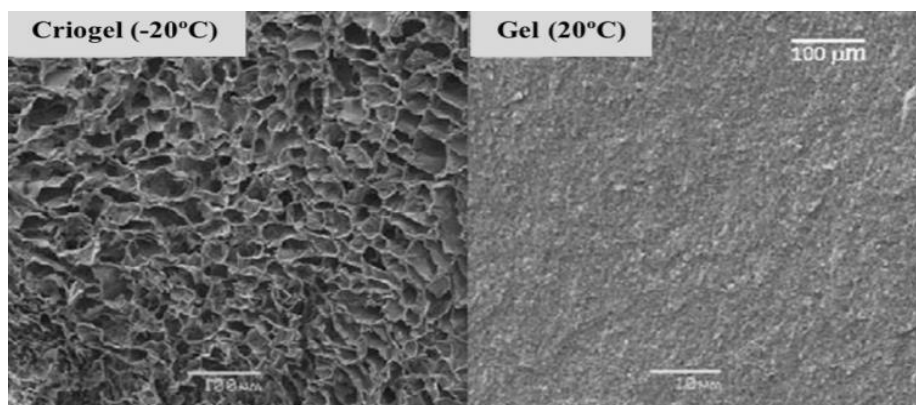
4.5.2.1 Morfologia dos poros

A determinação da estrutura dos poros do criogel é altamente determinante para sua aplicação, por exemplo para sua utilização em processos de purificação é necessário que os poros possuam forma homogênea, bem distribuída, interconectada, com poros largos, variando o diâmetro de 10 μm a 200 μm , pois são essas características que permite a passagem de macromoléculas como células microbianas, fragmentos celulares, soluções contendo partículas que se deseja purificar (YEŞİLOVA et al., 2018).

A microscopia ótica é a técnica utilizada para a avaliação preliminar dos criogéis e para a estimativa do valor médio do diâmetro dos poros, dentre as técnicas existentes a mais utilizada para visualizar a morfologia dos poros é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permite a visualização em resoluções muito altas, possibilitando o estudo da microestrutura da parede porosa. Uma desvantagem dessa técnica é a exigência de amostras secas, o que significa que ela não permite o estudo de criogéis em seu estado altamente hidratado. Além disso, as amostras em estudo

devem ser quimicamente fixadas e revestidas com metal antes da análise, o que introduz o risco de deformação da amostra. A partir da análise da Figura 4 verifica-se que a estrutura do gel formado a 20°C é compacta e possui poros de menor tamanho, enquanto o criogel formado a -20°C apresenta poros grandes e interconectados variando, o que reforça a importância da criogeificação na síntese desses compostos (ERTURK; MATTIASSON, 2014).

Figura 4 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de duas misturas poliméricas com as mesmas concentrações em duas temperaturas (-20°C e 20°C).



Fonte: Adaptado de Erturk e Mattiasson (2014).

Os longos canais formados devido a existência dos macroporos são os principais responsáveis pela baixa resistência ao fluxo da fase móvel e, conseqüentemente, alta permeabilidade oferecida pelas fases monolíticas. As baixas quedas de pressão nas colunas monolíticas permitem que as separações sejam realizadas com fluxos altos de fase móvel, reduzindo drasticamente o tempo de análise (MIKHALOVSKY et al., 2014).

4.5.2.2 Porosidade

A água no interior do criogel inchado é encontrada em duas formas: água ligada ao polímero e água dentro dos poros. A água no interior dos poros é responsável pela porosidade da matriz de criogel, ela pode ser removida mecanicamente por compressão do criogel. Assim, a porosidade pode ser estimada, medindo-se o

conteúdo de água livre presente e o volume do criogel como descrito por Yao et al, (2006). A porosidade é dada pela equação 1:

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

Onde m_w e m_s são, respectivamente, a massa da amostra saturada com água e a massa da amostra úmida após sua compressão para a remoção da água livre dentro dos poros, ρ_w é a densidade da água e V_0 é a diferença entre V_2 e V_1 , onde V_2 é o volume final após a imersão da amostra do criogel em uma proveta graduada contendo água e V_1 é o volume conhecido de água em um proveta graduada (BRUNS; MCBRIDE-GAGYI; ZUSTIAK, 2018).

No estudo realizado por Paiva (2019), utilizando criogéis de acrilamida contendo 7% de monômeros, apresentou porosidade de 86%, indicando uma distribuição da água dentro de todos os poros do criogel. Esses valores foram próximos ao de Plieva et al. (2013) que encontraram uma porosidade total em cerca de 90% e também utilizou criogéis monolíticos contendo 7% de monômeros.

Em média, nos estudos já realizados de criogel macroporoso utilizando como monômeros acrilamida e N,N-metileno-bis-acrilamida, o polímero seco, com água de ligação constitui apenas 10 - 12% do peso total de um criogel completamente inchado. Juntos, polímero e água fortemente ligada, formam as paredes dos poros. O restante, cerca de 88% do peso do criogel, é devido à água no interior dos poros.

Como a adsorção na coluna monolítica ocorre no interior desses poros, quanto maior for a porosidade do sólido maior será a adsorção. A porosidade também irá influenciar na resistência ao escoamento, quanto maior a porosidade menor será a resistência ao escoamento permitindo o uso de soluções mais viscosas e trabalho com fluxos mais altos (CARVALHO et al., 2013).

4.5.2.3 Capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento do criogel, corresponde à quantidade da água absorvida por massa de criogel desidratado. Ela pode ser determinada utilizando os criogéis produzidos, secos em estufa à $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$, até peso constante e resfriados em dessecador (OLIVEIRA et al., 2014).

Os criogéis devem ter suas massas determinadas em balança analítica. Em seguida, os monólitos poliméricos devem ser hidratados por imersão em 50 mL de água deionizada à temperatura ambiente por 24 horas e suas massas devem ser novamente registradas. A capacidade de inchamento é dada pela equação 2:

$$S = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (2)$$

Onde S é a capacidade de inchamento (g H₂O/ g de criogel seco) e m_w e m_d são as massas (g) da amostra em peso úmido e desidratado, respectivamente.

As taxas de dilatação dos criogéis são influenciadas pela espessura da parede do poro criogel e graus de reticulação. Com espessuras das parede menores e graus de reticulação mais baixos, os poros se tornam mais flexíveis, o que facilita a expansão da rede resultando em razões de inchaço mais altas (OLIVEIRA et al., 2014).

No estudo realizado por Cassimiro (2018) os valores de capacidade de inchamento para criogéis de poliacrilamida foram de 15,15 ± 0,82 kg / kg e 19,56 ± 1,24 kg / kg (criogéis de afinidade e de troca catiônica, respectivamente). Os valores encontrados indicam a quantidade de água necessária para hidratar completamente 1 kg de criogel, trata-se da medida do quanto essa matriz pode expandir-se (CARVALHO et al., 2014). Esses valores estão próximos ao encontrado por Paganoto (2014) e por Veríssimo et al. (2017) que também utilizaram criogéis de poliacrilamida, onde obtiveram 13,73 kg / kg e 14,55 kg / kg.

Através da capacidade de inchamento é possível também avaliar a homogeneidade dos criogéis. Se os eles possuírem um inchaço semelhante ao longo do teste, tudo indica que são homogêneos. Portanto quando o criogel apresenta inchaço gradual, ou alguma parte demora mais para atingir o completo grau de inchamento do que outra, significa que o criogel não é homogêneo (SCHEJTMAN et al., 2020).

4.6 APLICAÇÕES DO CRIOGEL PARA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Vários métodos foram desenvolvidos para separação de proteínas e biomoléculas usando criogéis, eles podem melhorar significativamente o resultado da

separação. Várias abordagens com base na funcionalização do criogel que inclui cromatografia de afinidade, bem como a impressão molecular podem ser usadas para purificação eficiente de proteínas usando ligantes. Nesta seção, será descrito as abordagens mais utilizadas para a separação de várias biomolécula (ERTURK; MATTIASSON, 2014).

Os criogéis têm sido usados como fase estacionária para cromatografia de afinidade de proteínas em inúmeras aplicações. Os ligantes peptídicos são comumente usados para cromatografia de afinidade, mas eles são caros de se produzir. Como alternativa podem ser usados os bacteriófagos, que são produzidos para se ligar seletivamente a uma proteína alvo. Contudo, os fagos não podem ser imobilizados em meios convencionais devido ao seu grande tamanho (1 μm) (HIXON; LU; SELL, 2017).

Para resolver esse problema Memic et al. (2019) utilizou fagos acoplados covalentemente com afinidade para lactoferrina humana e Fator de von Willebrand em criogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) (PHEMA) ativados por epóxi. Este criogel capturou e eluiu com sucesso lactoferrina humana e Fator de von Willebrand de leite cru e sangue total, respectivamente. Memic et al. (2019) não apenas demonstrou a capacidade dos criogéis PHEMA de processar alimentos contendo partículas: eles também ilustraram o potencial da cromatografia de afinidade de fago como um método simples e econômico.

A heparina é um anticoagulante frequentemente usado em vários procedimentos clínicos. No entanto, após as operações, ele deve ser removido do plasma de maneira eficiente devido aos seus graves efeitos colaterais (TANAKA; BOLLIGER, 2017). Os pesquisadores Yavuz e Denizli (2015) desenvolveram um adsorvente à base de criogel poli(2-hidróxi etil metacrilato) (PHEMA) compatível com sangue modificado com L-lisina para remover a heparina do plasma humano. Eles relataram que no plasma humano enriquecido com 100 UI / mL de heparina, a ligação ainda era altamente eficiente (4330 UI / g de criogel, ou seja, 87% da concentração inicial).

Outra técnica utilizada para purificação de biomoléculas em criogel é a impressão molecular. Essa é uma técnica usada para conferir propriedades de reconhecimento molecular a uma matriz de polímero sintético. Na fase inicial de formação do criogel, adiciona-se a molécula molde, o arranjo espacial da molécula é

determinado por suas interações com o monômero. Este arranjo é então fixado durante a polimerização do monômero e do reticulador. Quando a molécula modelo é removida, o resultado é uma impressão química complementar na rede de polímero, que pode religar o modelo com alta especificidade. Aplicações de polímeros impressos molecularmente (MIPs) incluem separações químicas e biológicas, eles são empregados com sucesso para a separação de compostos de baixo peso molecular (ANDAÇ GALAEV; DENIZLI, 2016).

Em relação às separações biológicas, os MIPs apresentam várias vantagens sobre a cromatografia de afinidade métodos, incluindo vida útil mais longa, custo reduzido, ausência de lixiviação do ligante. No entanto, biomoléculas são estruturas grandes e complexas com sensibilidade ao pH, temperatura e concentração de sal. Consequentemente, eles têm uma tendência a sofrer desnaturação e mudanças conformacionais durante polimerização quando exposto a solventes orgânicos ou altas temperaturas. Outro desafio é desenvolver condições ideais para a remoção e ligação da molécula modelo, porque o resultado de sua interação com o polímero depende de uma infinidade de fatores, incluindo interações intermoleculares (por exemplo, forças eletrostáticas e van der Waals, ligação de hidrogênio), flexibilidade, acessibilidade do local de ligação e forma da molécula (ASLđYÜCE; MATTIASSON; DENIZLI, 2019).

Tabela 5- Exemplos de aplicações de criogel para separação de biomoléculas.

Alvo	Matriz	Monômero/ Ligante	Método	Adsorção	Referência
Ovalbumina	N-[3-(2 aminoetilamino) propil] trimetoxissilano	N-isopropilacrilamida e ácido p-vinilfenilborônico	Impressão molecular	21 mg / g	(GAO et al., 2013).
Lisozima	Criogéis de poliacrilamida	N, N-Metileno bisacrilamida	Impressão molecular	36,3 mg / g	(RABIEIZADE et al., 2014).
Imunoglobulina G	Criogel PHEMA com fragmento Fc impresso	Éster metílico de N-metacrilóil- (I) - cisteína (MAC) / Imobilização de anti-hIgG	Impressão molecular	86,9 mg / g	(BERELI et al., 2013).

Imunoglobulina G	Criogel PHEMA	Poli (etileno imina) (PEI) -Cu ²⁺	Cromatografia de afinidade com metal imobilizado	72,3 mg / g	(BAKHSHP et al., 2016).
------------------	---------------	--	--	-------------	-------------------------

Os criogéis também têm sido biomateriais alternativos para regeneração e funcionalização muscular. Em um estudo anterior, as linhas de células mioesqueléticas foram cultivadas em criogéis de gelatina PHEMA e seu potencial de biocompatibilidade e reprodução celular foram confirmados. Sua estrutura altamente porosa e a estabilidade mecânica os torna aplicáveis na engenharia de tecidos esqueléticos e cardíacos (RAZAVI; QIAO; THAKOR, 2019).

5 CONCLUSÃO

A fabricação de produtos biotecnológicos depende fortemente das etapas *downstream*. Nos últimos anos, a introdução de novos e complexos bioprodutos no mercado requereu uma estratégia que enfatizasse a importância da separação como uma seção significativa do bioprocessamento. Limitações das técnicas de separação convencionais (cromatografia em leito empacotado) para purificação direta de fluidos contendo partículas são um desafio na purificação, pois esses materiais podem ocasionar o entupimento dessas colunas. Portanto, é necessário o desenvolvimento de sistemas robustos, econômicos e integrados para a separação seletiva de misturas sólidas e líquidas.

Os criogéis são os materiais poliméricos sintetizados por gelificação criotrópica com as vantagens de uma preparação fácil e econômica. Os criogéis têm recursos exclusivos, como estruturas macroporosa e estabilidade mecânica e química. Essas propriedades desejáveis os tornam materiais atrativos para isolamento, imobilização e purificação de biomoléculas ou separação de células inteiras

Por outro lado, também existem estudos da utilização dos criogéis na engenharia de tecidos. Os resultados obtidos a partir destes estudos indicaram que os criogéis têm sido ferramentas promissoras e aplicáveis em uma variedade de tipos de tecido. Estes materiais também podem ser usados em culturas de células e são de grande interesse para aplicações *in vitro* e *in vivo*. Nestes casos, eles afetam diretamente a melhoria da migração, proliferação e diferenciação celular com a

vantagem de estabilidade mecânica aprimorada. Evidentemente, os criogéis com memórias de forma produzidos por impressão molecular irão, sem dúvida, fornecer vantagens para uma ampla gama de aplicações biomédicas.

Devido à alta porosidade e estrutura de poros interligados, esses materiais permitem a separação não destrutiva de vários tipos de biomoléculas ou células. É necessário continuar o desenvolvimento da química dos criogéis e a modificação de seus materiais, a fim de torná-los mais adequados e eficientes para aplicação industrial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDAÇ, M. et al. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1021, p.69-80, 2016.

ANUSHA, S. et al. A Overview on Affinity Chromatography: A Review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 8, p. 1462-1472, 2018.

ASLdYÜCE, S; MATTIASSON, B; DENIZLI, A. Combined protein A imprinting and cryogelation for production of spherical affinity material. **Biomedical Chromatography**, [s.l.], v. 33, n. 10, p. 1-10, 2019.

BAKHSHPOUR, M. et al. [PHEMA/PEI]–Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: application on the separation of igg from human plasma. **Materials Science And Engineering**, [s.l.], v. 61, p. 824-831, 2016.

BARRAGAN, J. T. **Melhorias nos sistemas de detecção de carboidratos para cromatografia de íons**. 2016. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas, 2016.

BERELI, N. et al. Oriented immobilized anti-hIgG via Fcfragment-imprinted PHEMA cryogel for IgG purification. **Biomedical Chromatography**, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 599-607, 2013.

BOI, C. Membrane Chromatography for Biomolecule Purification. **Current Trends And Future Developments On (Bio-) Membranes**, Elsevier, [s.l.], p. 151-166, 2019.

BRUM, C. N. et al. Revisão de literatura narrativa: aspectos conceituais e metodológicos. **Metodologias de pesquisa**. Porto Alegre, 2015.

BRUNS, J.; MCBRIDE-GAGYI, S.; ZUSTIAK, S. P. Injectable and Cell-Adhesive Polyethylene Glycol Cryogel Scaffolds: Independent Control of Cryogel Microstructure and Composition. **Macromolecular Materials And Engineering**, [s.l.], v. 303, n. 10, p.18-29, 2018.

BÜYÜKKÖROĞLU, G.; DORA, et al. Techniques for Protein Analysis. **Omics Technologies And Bio-Engineering**, [s.l.], p. 317-351, 2018.

CARVALHO, B. M. A. et al. Microcalorimetric study of the adsorption of lactoferrin in supermacroporous continuous cryogel with immobilized Cu^{2+} ions. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1312, p.1-9, 2014.

CARVALHO, B. M. et al. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 154, p. 308-314, 2014.

CARVALHO, B. M. A. et al. Cryogel Poly(acrylamide): synthesis, structure and applications. **Separation & Purification Reviews**, [s.l.], v. 43, n. 3, p. 241-262, 2013.

CASSIMIRO, Débora Mara de Jesus. **Desenvolvimento de uma estratégia de purificação de avidina e lisozima da clara de ovo**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

COSKUN, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics Of Istanbul**, [s.l.], v. 2, p.156-160, 2016.

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

ERZENGIN, M. et al. Monolithic hydrophobic cryogel columns for protein separation. **Polymer Bulletin**, [s.l.], p. 321-335, 2021.

FASCIANO, J. M; DANIELSON, N. D. Ion chromatography for the separation of heparin and structurally related glycoaminoglycans: A review. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1118-1129, 2016.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. O Mercado de Bioaditivos para a Indústria de Alimentos. **Revista Processos Químicos**, [s.l.], v. 10, n. 19, p.25-38, 2016.

FERRI, M. et al. Fragment-based Design of Zwitterionic, Strong Cation- and Weak Anion-Exchange Type Mixed-mode Liquid Chromatography Ligands and their Chromatographic Exploration. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1621, p. 2-13, 2020.

GAO, F et al. A pH and temperature dual-responsive macroporous molecularly imprinted cryogel for enhanced recognition capability towards ovalbumin. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 5, n. 23, p. 6700, 2013.

HAGE, D. et al. Affinity chromatography. **Liquid Chromatography**, [s.l.], p. 319-341, 2017.

HAGE, D S.; MATSUDA, R. Affinity Chromatography: a historical perspective. **Methods In Molecular Biology**, [s.i.], p. 1-19, New York, 2015.

HANKE, A. T.; OTTENS, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 210-220, 2014.

HAVERICK, M. et al. Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: overview and applications. **Mabs**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 852-858, 2014.

HIXON, K. R.; LU, T.; SELL, S. A.. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 62, p. 29-41, 2017.

JOZALA, A. et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 47, p. 51-63, 2016.

LACKI, K. M; RISKE, F. J. Affinity Chromatography: An Enabling Technology for Large-Scale Bioprocessing. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.18-34, 25 out. 2019.

LAMBERT, N. et al. Comparison of the kinetic performance of different columns for fast liquid chromatography, emphasizing the contributions of column end structure. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1473, p. 99-108, 2016.

LEAL, V. L.; SILVA, M. R.; LANÇAS, F. M. Avanços recentes na miniaturização de colunas para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 117-133, 2017.

LEHNINGER, T. M et al. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014.

LIMA, M. A. **Recuperação e purificação da beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando cromatografia de modo misto**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2014.

LI, R. et al. Preparation and Application of Porous Layer Open Tubular Capillary Columns with Narrow Bore in Liquid Chromatography. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 1865-1873, 2017.

LI, Z et al. Affinity monolith chromatography: a review of general principles and applications. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 38, n. 22-23, p. 2837-2850, 2017.

LIU, X; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology Of Microbial Enzymes**, [s.l.], p.267-298, 2017.

LOZINSKY, V. Cryostructuring of Polymeric Systems. Cryogels and Cryotropic Gel-Formation: Terms and Definitions. **Gels**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.77-83, 2018.

LOZINSKY, V I. A Brief History of Polymeric Cryogels. **Polymeric Cryogels**, [S.L.], v. 263, p. 1-48, 2014.

LOZINSKY, V. I.; OKAY, O. Basic Principles of Cryotropic Gelation. **Polymeric Cryogels**, [s.l.], p. 49-101, 2014.

LYNCH, K. B. et al. Monolith columns for liquid chromatographic separations of intact proteins: a review of recent advances and applications. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 1046, p. 48-68, 2019.

MANOUSHI, N.; ZANAVARAS, P. D.; ZACHARIS, C. K.. Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid Phase Microextraction: a two-decade overview. **Molecules**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 2096, 2020.

MEMIC, A. et al. Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications. **Advanced Therapeutics**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 180, 2019.

MIKHALOVSKY, S. V. et al. Biomaterials/Cryogels. **Comprehensive Biotechnology**, [s.l.], p. 411-423, 2014.

NEMA, T.; CHAN, E. C.; HO, P. C. Applications of monolithic materials for sample preparation. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 87, p. 130-141, 2014.

NOVOTNY, M. V. Development of capillary liquid chromatography: a personal perspective. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1523, p. 3-16, 2017.

OKAY O. Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties. **Advances in Polymer Science** v. 263 p. 20-32, 2014.

OKAY, O; LOZINSKY, V. Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels. **Polymeric Cryogels**, [s.l.], p. 103-157, 2014.

OLIVEIRA, A. C. F. et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science And Technology**, [s.l.], v. 55, n. 11, p. 2012-2024, 2019.

ÖNCEL, P. et al. Molecularly imprinted cryogel membranes for mitomycin C delivery. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 519-531, 20 jan. 2017.

PAIVA, Thainane Silva. **Desenvolvimento e estudo termodinâmico de um adsorvente macroporoso hidrofóbico funcionalizado com radical butil**. 2019. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2019.

PAGANOTO, F. S. **Adsorção de lisozima por interação específica em um criogel supermacroporos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

PERIAT, A. et al. Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1448, p. 81-92, 2016.

PERRET, G; SANTAMBIEN, P; BOSCHETTI, E. The quest for affinity chromatography ligands: are the molecular libraries the right source?. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 38, n. 15, p. 2559-2572, 2015.

PESSOA J. A, et al. **Purificação de produtos biotecnológicos**. In: Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações [s.l.], 2015.

PFAUNMILLER, E. L, et al. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2133-2145, 2013.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. **Characterization of polyacrylamide based monolithic columns**. Journal of Separation Science, v.27, n.10-11, p.828-836, 2013.

RABIEIZADEH, M et al. Monolithic molecularly imprinted cryogel for lysozyme recognition. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 37, n. 20, p. 2983-2990, 2014.

RAJAMANICKAM, V; HERWIG, C; SPADIUT, O. Monoliths in Bioprocess Technology. **Chromatography**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.195-212, 2015.

RATHORE, A. S.; KUMAR, D.; KATEJA, N. Recent developments in chromatographic purification of biopharmaceuticals. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 895-905, 2018.

RAZAVI, M.; QIAO, Y.; THAKOR, A. S. Three-dimensional cryogels for biomedical applications. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 107, n. 12, p. 2736-2755, 2019.

REICHEL, S. Introduction to Macroporous Cryogels. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p. 173-181, 2015.

REUHS, B. High-Performance Liquid Chromatography. **Food Science Text Series**, [s.l.], p. 213-226, 2017.

RODRIGUES, A. et al. Principles of Simulated Moving Bed. **Simulated Moving Bed Technology**, [s.l.], p. 1-30, 2015.

RODZIK, A et al. Interactions of Whey Proteins with Metal Ions. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 2156-2167, 2020.

SAYLAN; D. Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications. **Gels**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.20-34, 2019.

SCHEJTMAN, S. D. G. et al. Redefining the chemistry of super-macroporous materials: when dendritic molecules meet polymer cryogels. **Polymer Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 27, p. 4507-4519, 2020.

SINGH, N.; HERZER, S. Downstream Processing Technologies/Capturing and Final Purification. **New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins**, [s.l.], p. 115-178, 2017.

SINGH, N. K. et al. High capacity cryogel-type adsorbents for protein purification. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1355, p. 143-148, 2014.

STEINEBACH, F.; MÜLLER-SPÄTH, T.; MORBIDELLI, M. Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 11, n. 9, p. 1126-1141, 2016.

TANAKA, K.; BOLLIGER, D. Point-of-Care Coagulation Testing in Cardiac Surgery. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [s.l.], v. 43, n. 04, p. 386-396, 2017.

TEEPAKORN, C; FIATY, K; CHARCOSSET, C. A Review on Some Recent Advances on Membrane Chromatography for Biomolecules Purification. **Journal Of Colloid Science And Biotechnology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.32-44, 2016.

TEREFE, N. S. et al. Application of stimuli responsive polymers for sustainable ion exchange chromatography. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 92, n. 2, p. 208-225, abr. 2014.

TOMAZ, C. T. Hydrophobic interaction chromatography. **Liquid Chromatography**, [s.l.], p. 171-190, 2017.

VALEJA, S. G. et al. Three Dimensional Liquid Chromatography Coupling Ion Exchange Chromatography/Hydrophobic Interaction Chromatography/Reverse Phase Chromatography for Effective Protein Separation in Top-Down Proteomics. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 87, n. 10, p. 5363-5371, 2015.

WANG, J. et al. Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 43, n. 11, p. 1777-1784, 2015.

YAO, K. S, et al. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, [s.l.], v. 61, n. 20, p.6701-6708, 2006.

YAVUZ, H.; DENIZLI, A.. A New Affinity Separation Medium: supermacroporous cryogels. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [s.l.], p. 1-12, 2015.

YETISKIN, B.; AKINCI, C.; OKAY, O. Cryogelation within cryogels: silk fibroin scaffolds with single-, double- and triple-network structures. **Polymer**, [s.l.], v. 128, p. 47-56, 2017.

YEŞİLOVA, E. et al. Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 200, p. 155-163, 2018.

ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: a review. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 113, n. 3, p. 465-475, 2015.