

BRUNA MARA APARECIDA DE CARVALHO

**ADSORÇÃO DE LACTOFERRINA EM COLUNA SUPERMACROPOROSA
DE CRIOGEL DE POLIACRILAMIDA ATIVADA COM ÍONS DE COBRE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

BRUNA MARA APARECIDA DE CARVALHO

**ADSORÇÃO DE LACTOFERRINA EM COLUNA SUPERMACROPOROSA
DE CRIOGEL DE POLIACRILAMIDA ATIVADA COM ÍONS DE COBRE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2010.

Prof.^a Valéria P. Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Prof.^a Maria do Carmo H. da Silva

Prof. Sérgio Henriques Saraiva

Prof. Luis Antonio Minim
(Orientador)

Mesmo que cada letra contida nas palavras desta tese fosse um diamante, ela não seria valiosa o suficiente para retribuir todo o amor, companheirismo e amizade que recebo das minhas maiores jóias...
Meus pais, Eliene e Firmino e meus irmãos, Lorendane e Gleidson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença sempre tão real em minha vida, me dando força para seguir em frente. A minha mãe, nossa senhora, por ser fiel em todos os momentos.

Aos meus amados pais, Firmino e Eliene, pelo suporte e alegria que me proporcionam todos os dias.

A minha avozinha Maria Conceição, pelo carinho, pelo grande exemplo. Apesar de já não se encontrar mais entre nós, se faz presença viva em meu coração, em minha vida.

Ao Saulo por sua força, amor e companheirismo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao prof. Luis Antonio Minim, pela dedicada orientação.

Ao prof. Luis Henrique pelas contribuições.

A prof^a Valéria pela co-orientação.

A todos os funcionários do DTA, em especial à Maria Geralda, Vaninha, Letícia, sr. Zé, sr. Luiz, Adão e Juarez pela torcida e amizade.

Aos meus tios, Ennia Débora e Aureliano, pela força e amizade.

A minha família amada, Braga Carvalho, pelo apoio incondicional, união e por serem motivos de tanta felicidade em minha vida.

Aos meus irmãos, Lorendane Millena e Gleidson Giordano, pelo apoio em todos os momentos.

As minhas amigas, Geruza, Roberta, Rita, Lizzy, Aline, Maira Campeche, Cristiane Patrícia, Fabíola pela paciência, incentivo e torcida.

Ao amigo Adair Regazzi.

A galera do laboratório de desenvolvimento e simulação de processos; Janaína, Rafael, Leandro, Márcia, Millene, Maycon, Wmekson, Alexandre, Isabela, Moysés, Ana Alice, Cecília, Ana Paula e Cassiano pelo convívio e bons momentos compartilhados.

A minha família Viçosense, nas pessoas da dona Maria e sr. Israel, pela torcida.

A UFSJ por minha liberação.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
CAPÍTULO 1 - Revisão de literatura.....	3
1. Soro de Queijo	3
2. Bioatividade das proteínas e peptídeos do soro	4
3. Lactoferrina	5
4. Purificação por técnicas cromatográficas	7
4.1. Monólitos de criogéis	8
4.2. Cromatografia por afinidade em íons metálicos imobilizados .	9
5. Criogéis de poli(acrilamida): síntese, estrutura e aplicações	10
6. Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO 2 - Captura direta da lactoferrina de soro de queijo em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre.....	39
Resumo	39
1. Introdução	40
2. Experimental	41
2.1. Materiais	41
2.2. Produção das matrizes de criogel contínuo supermacroporoso.	42
2.3. Caracterização das matrizes de criogel	43
2.3.1. Capacidade de inchamento	43
2.3.2. Porosidade	43

2.3.3. Resistência ao fluxo	44
2.3.4. Dispersão axial	44
2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	45
2.5. Ativação dos criogéis com íons metálicos	46
2.6. Captura cromatográfica de lactoferrina de soro de queijo	46
2.6.1. Quantificação de proteínas totais	47
2.6.2. Eletroforese SDS-PAGE	47
2.6.3. Cromatografia de filtração em gel	47
3. Resultados e Discussão	48
3.1 Preparo e caracterização dos criogéis sob diferentes concentrações de monômeros e a presença de AGE	48
3.2. Microscopia do criogel ativado	56
3.3. Purificação de lactoferrina de soro de queijo por IMAC em criogel-IDA-Cu ²⁺	56
4. Conclusões	59
5. Referências Bibliográficas	60
 CAPÍTULO 3 – Termodinâmica e modelagem da adsorção de lactoferrina em criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de Cu ²⁺	 67
Resumo	67
1. Introdução	67
2. Experimental	70
2.1. Materiais	70
2.2. Métodos	70
2.2.1 Experimentos de adsorção	70
2.2.2. Modelagem dos dados de equilíbrio	71

2.2.3. Experimentos de microcalorimetria	76
3. Resultados e Discussão	77
3.1. Equilíbrio de adsorção por afinidade da lactoferrina em criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de cobre	77
3.2. Análise termodinâmica	98
4. Conclusão	107
5. Referências Bibliográficas	108
Conclusões Gerais	114

RESUMO

CARVALHO, Bruna Mara Aparecida de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Adsorção de lactoferrina em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Luis Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho foi avaliada a captura direta de lactoferrina proveniente de soro de queijo ultrafiltrado em colunas supermacroporosas de criogel por cromatografia por afinidade em íons metálicos imobilizados (IMAC). Foi estudado também o processo de adsorção da lactoferrina de soro bovino por IMAC variando-se as condições de concentração de sal, pH e temperatura. Com os dados experimentais e as medidas microcalorimétricas obtidas foi conduzida a análise termodinâmica do processo. Foi avaliada ainda, a influência de modelos de isothermas, Langmuir, Langmuir-Freundlich, Temkin, Freundlich e SMA (steric-mass action), na simulação do processo de adsorção assim como a otimização do processo de adsorção da lactoferrina em IMAC. Os dados obtidos a partir de análises de proteína total, eletroforese SDS-PAGE e cromatografia por exclusão molecular evidenciaram a alta afinidade de interação entre a lactoferrina e os íons de cobre imobilizados na matriz. A partir dos resultados obtidos por meio do estudo da adsorção da lactoferrina no criogel supermacroporoso foi possível observar que este processo é dependente da concentração de sal, do pH e da força iônica. Sendo a adsorção inversamente proporcional ao aumento da concentração de sal e diretamente proporcional ao aumento do pH e da temperatura. Quanto à influência dos modelos, os estudos indicaram os modelos de isoterma de Langmuir-Freundlich e SMA melhor para as simulações. A adsorção da lactoferrina de

soro de queijo em adsorvente criogel-IDA-Cu²⁺ foi estudada utilizando a microcalorimetria de titulação isotérmica para medir informações termodinâmicas sobre esse processo. Dados de isoterma foram obtidos nas temperaturas de 20 e 40°C, pH 6,0 e 8,0 e concentração de sal NaCl 200mM e 1000mM. Os dados de equilíbrio foram ajustados usando o modelo de Langmuir e o processo foi observado como espontâneo. A temperatura e pH afetaram positivamente a interação da proteína e o adsorvente. Os estudos microcalorimétricos indicaram entalpia de adsorção endotérmica para alguns casos (20°C e 40°C pH 8,0, 1000mM), sendo o processo de adsorção entropicamente dirigido para tais condições.

ABSTRACT

CARVALHO, Bruna Mara Aparecida de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Adsorption of lactoferrin in the column supermacroporosa criogel polyacrylamide activated with copper ions.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Luis Henrique Mendes da Silva.

In this study we evaluated the direct capture of lactoferrin from cheese whey ultrafiltrate in columns of supermacroporosas criogel by immobilized metal on affinity chromatography (IMAC). We also studied the adsorption of bovine serum lactoferrin by IMAC varying conditions of salt concentration, pH and temperature. With the experimental data and microcalorimetric measurements obtained the thermodynamic analysis was conducted of the process. It also assessed the influence of isotherm models, Langmuir, Langmuir-Freundlich, Temkin, Freundlich, and SMA (steric-mass action), the simulation of the adsorption process and the optimization of the adsorption of lactoferrin in IMAC. The data obtained from analysis of total protein, SDS-PAGE and molecular exclusion chromatography showed the high affinity of interaction between lactoferrin and the copper ions immobilized on the array. From the results obtained by studying the adsorption of lactoferrin in criogel supermacroporoso was possible to observe that this process is dependent on the salt concentration, pH and ionic strength. Adsorption being inversely proportional to the increase of salt concentration and directly proportional to the increase of pH and temperature. Concerning the influence of models, the studies indicated isotherm models of Langmuir-Freundlich and SMA better for the simulations. The adsorption of lactoferrin from cheese whey on an cryogel-IDA-Cu²⁺ adsorbent was investigated using isothermal titration microcalorimetry

to measure thermodynamic information regarding such processes. Isotherms data were measured at temperatures of 20° and °C, pH 6,0 and 8,0 and ionic strengths 200 e 1000mM NaCl. The equilibrium data were fit using the Langmuir model and the process was observed to be reversible. The temperature and pH positively affected the interaction of protein and adsorbent. Microcalorimetric studies indicated endothermic enthalpy of adsorption for some cases (20 ° C and 40 ° C pH 8.0, 1000mm) and the adsorption process entropically driven to such conditions.

Introdução Geral

Um problema dos processamentos de resíduos industriais, como o soro de queijo, é a separação e purificação de biomoléculas de meios complexos como suspensões líquidas de meios fermentados contendo ou não células e seus fragmentos. Uma vez que esta etapa representa o principal custo do processo, a vantagem competitiva da produção dependerá não somente das inovações da biologia molecular, mas também da inovação e da otimização de processos de separação e *downstream*. Os processos cromatográficos em escala preparativa e industrial em geral são predominantes nos estágios de separações e purificações de materiais biológicos. A cromatografia tradicional de leito fixo, com sua fase estacionária empacotada em uma coluna, entretanto, apresenta um inconveniente, é incapaz de processar soluções contendo materiais particulados, por exemplo, suspensões de células ou homogenados celulares não clarificados, apesar de sua alta capacidade e resolução. O material particulado contido nestas soluções diminui a porosidade do leito, resultando, conseqüentemente, num aumento da resistência ao escoamento na coluna culminando com seu bloqueio. Para contornar este inconveniente, foi proposta a cromatografia em leito expandido, onde o escoamento da fase móvel mantém em suspensão as partículas do adsorvente, aumentando suficientemente a porosidade do leito e permitindo que o material particulado passe pela coluna sem aumentar a resistência ao fluxo. A densidade e o tamanho corretamente projetados permitem que as partículas tenham um movimento restrito em relação a uma posição estacionária e um regime de fluxo empistonado é mantido na coluna. Entretanto, apesar de todas as vantagens da cromatografia em leito expandido, tipos especiais de colunas e de equipamentos são requeridos. Colunas cromatográficas com as características do leito fixo, mas com os poros suficientemente grandes poderiam permitir que soluções contendo fragmentos celulares e materiais particulados em geral pudessem ser escoadas pela coluna sem sua obstrução. Neste caso, o

leite poderia ter um sistema de poros contínuos interconectados ao invés de partículas porosas onde o processo convectivo é limitado apenas nos espaços intersticiais inter-partículas. Estas estruturas são inerentes aos denominados "criogéis", isto é, géis poliméricos formados em condições de congelamento. Criogéis supermacroporosos de fase estacionária contínua são denominados de monolitos ou materiais cromatográficos de quarta geração possuindo poros de tamanhos que variam entre 10 a 100 μm .

Considerando estas características favoráveis das colunas monolíticas, pretendeu-se desenvolver uma metodologia para captura direta de lactoferrina presente no soro do leite, em coluna supermacroporosa de criogel de poli(acrilamida) ativada com íons de cobre. Foi estudado ainda o processo adsorptivo da lactoferrina no sistema criogel-IDA-Cu²⁺ em condições variadas de força iônica, pH e temperatura. Modelos de isotermas de adsorção foram ajustados aos dados experimentais.

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica

1. Soro de Queijo

O soro de queijo é uma substância líquida aquosa derivada da fabricação de queijos e caseína. O soro de queijo é o co-produto mais abundante das modernas indústrias de queijo e caseína. Em média, o volume mundial de soro está crescendo na mesma taxa do crescimento da produção de leite (mais de 2% ao ano) FAO (Food and Agriculture organization), 2006. O aumento da produção de leite está sendo canalizado, em sua maioria, para a produção de queijos, caseína e caseinatos e outros produtos de laticínios, resultando num aumento concomitante do volume de soro.

Uma comparação da composição aproximada do leite bovino e do soro é apresentada na Tabela 1. Esta análise revela que 50% dos sólidos do leite estão presentes no soro, sendo essencialmente 100% da lactose e 20% das proteínas. A lactose se apresenta numa proporção aproximada de 75% do total de sólidos do soro e contribui em grande parte pelo alto potencial poluidor do soro (DBO > 35000; DQO > 60000), considerado um dos maiores resíduos ou co-produtos poluentes da indústria alimentícia (Bullerman et al., 1966; Siso, 1996).

Enquanto que o potencial poluidor do soro é bem conhecido, ele representa uma excelente fonte de proteínas e peptídeos funcionais, lipídeos, minerais e lactose (Tabela 1). Notavelmente, as proteínas e suas propriedades funcionais e nutricionais têm ajudado a transformar o soro, de um material freqüentemente rejeitado a um efluente contendo uma multitude de componentes disponíveis para utilização na agroindústria, biotecnologia, medicina e mercados relacionados.

Restrições ambientais em relação à disposição do soro têm incentivado estudos mais aprofundados sobre o conhecimento das propriedades dos componentes do soro, notavelmente suas proteínas e peptídeos. Enquanto que a qualidade nutricional (fonte de energia e perfil de aminoácido), propriedades funcionais (gelificação, formação de espuma,

retenção de água, etc) e funcionalidades fisiológicas das proteínas do soro têm sido reconhecidos já algum tempo, vários fatores tem limitado o uso mais difundido das proteínas do soro como ingredientes. Dentre estes fatores incluem: (i) conhecimento limitado das propriedades tecnológicas dos componentes do soro; (ii) base restrita de aplicações dado que o soro e suas proteínas têm sido vistas somente como ingredientes de baixo valor; (iii) desempenho imprevisível e inconsistente em sistemas alimentícios, principalmente na área de funcionalidades tecnológicas; (iv) falta de tecnologias industriais viáveis de baixo custo para isolamento e purificação (Smithers, 2008).

Tabela 1: Comparação da composição aproximada do leite bovino e do soro^a

Componentes	Conteúdo (% m/m)	
	Leite	Soro
Caseína	2,8	<0,1
Proteína do soro ^b	0,7	0,7
Gorduras	3,7	0,1
Cinzas	0,7	0,5
Lactose	4,9	4,9
Sólidos totais	12,8	6,3

^aFonte: Zadow, 1996 e Smithers, 2008;

^bProteínas do soro compreendem 50% β -lactoglobulina, 20% α -lactalbumina, 15% glicomacropéptido (somente em soro doce) e 15% de outras proteínas e peptídeos (imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, BSA, lisozima e fatores de crescimento)

2. Bioatividade das proteínas e peptídeos do soro

O soro contém um grande número de proteínas e peptídeos bioativos, o que formaram a base para seu uso em aplicações medicinais durante o século 17 e 18 (Hoffmann, 1961). Além das proteínas α -lactalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropéptido presentes em maior quantidade, o soro contém um grande número de outras proteínas com potente bioatividade

(Tabela 2).

Todas estas proteínas têm sido implicadas numa variedade de efeitos nutricionais e fisiológicos, incluindo (i) desempenho físico, recuperação após exercícios e prevenção de atrofia muscular (Carey, et al., 2006; Farnfield et al., 2005; Rankin & Darragh, 2006; Tipton et al., 2004]; (ii) saciedade e controle de peso (Tome, 2006; Ohr, 2004; Zemel, 2004); (iii) saúde cardiovascular (Ohr, 2004; Pins et al., 2006); (iv) efeitos anti-câncer (Gill & Cross, 2000); (v) nutrição infantil (Chatterton, 2006); (vi) envelhecimento saudável (Smilowitz et al., 2005).

Tabela 2: Proteínas encontradas em menores concentrações no soro de queijo

Proteína	Concentração (mg/L)
Lactoferrina	50-70
Lactoperoxidase	8-20
Imunoglobulinas	300-600
Fatores de crescimento	<0,06
IGF-I	<0,001
IGF-II	<0,001
PGDF	<0,0002
TGF- β	<0,01
FGF	<0,0001
β -celulina	<0,002

3. Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína de 80 kDa com um átomo de ferro ligado à molécula, da família das transferrinas. Entre as funções biológicas da lactoferrina está a capacidade de fixação de Fe^{+3} . Em virtude de sua habilidade de quelar o Fe^{+3} , exerce atividade bacteriostática contra alguns microrganismos patogênicos do leite, bem como no intestino de animais que ingerem o leite. A LF é considerada uma molécula de defesa importante e tem uma diversidade de funções fisiológicas, tais como atividades antiviral/antimicrobiana, atividade imunomodulatória e

atividade antioxidante. Durante a última década, tornou-se evidente que administrações orais de LF exerciam vários benefícios na saúde de humanos e animais, incluindo efeitos anticâncer e antiinflamatórios. Isto aumentou o potencial de aplicações da LF como um aditivo em alimentos (Wakabayashi et al., 2006).

A disponibilidade de grandes quantidades de LF na forma purificada tem permitido estudos dos efeitos biológicos desta proteína, *in vitro* e *in vivo* (Wakabayashi et al., 2006; Brock, 2002). Os mecanismos dos efeitos antimicrobianos conhecidos da LF foram bem estabelecidos (Farnaud & Evans, 2003) e atualmente formam a base para aplicação desta proteína no aumento da segurança de produtos cárnicos (Naidu et al., 2003). No trabalho realizado por Cornish et al., 2004, foi demonstrado que a LF possui uma excelente propriedade de aumentar o crescimento dos ossos, manifestada por meio da estimulação de osteoblastos e inibição de osteoclastos. Esta pesquisa permitiu a formação de uma fundamentação forte para o uso da LF como um complemento a várias estratégias na prevenção de tratamento de osteoporose.

Dada sua ampla gama de aplicações na medicina, biologia, indústria farmacêutica e alimentícia, muitas tecnologias de processamento foram estudadas e desenvolvidas para o isolamento da LF em níveis de pureza elevados, e a maioria destes processos são focados em processos cromatográficos. Como exemplo a purificação da lactoferrina por cromatografia por afinidade em metal quelatado (Lonnerdal et al., 1977), cromatografia de troca catiônica (Hahn et al., 1998; Yoshida & Ye, 1991), cromatografia por afinidade a heparina-Sepharose (Blackberg & Hernell, 1980), por afinidade em peptídeos (Noope et al., 2006) e por afinidade em heparina-políglícidil metacrilato (Chen et al., 2007) Todavia, a recuperação desta proteína do soro é uma tarefa difícil, uma vez que estando bastante diluída, grandes volumes de soro devem ser processados, além de que as outras proteínas presentes em maiores concentrações dificultam sua separação (Hahn et al., 1998; Yoshida & Ye, 1991).

4. Purificação por técnicas cromatográficas

A razão para a popularidade dos métodos cromatográficos de separação de biomoléculas tem freqüentemente sido debatida. Entre os vários processos adsortivos, a adsorção em leito fixo possui a maior eficiência. A adsorção de um soluto em uma fase fluida sobre um adsorvente sólido é muito mais efetiva do que em tanques agitados, ou seja, a produtividade é mais elevada em leito fixo. A maior eficiência dos leitos empacotados é devido ao fato de que o sistema se aproxima do equilíbrio tendo como referência a concentração inicial da solução líquida e não com um valor de concentração média final (Cussler, 1997). Outra razão é o alto número de ciclos obtidos em cromatografia preparativa, pois este influencia a economia dos processos separação. Freqüentemente, a cromatografia é a etapa de maior custo do processo produtivo de uma biomolécula e, na maioria das vezes, um número de ciclos entre 50 e 200 são suficientes (Jungbauer & Hahna, 2008). Finalmente, a cromatografia em leito fixo é uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos e os equipamentos, adsorventes e protocolos de purificação são prontamente disponíveis.

As estratégias de desenvolvimento e transferência de um processo de purificação cromatográfico de biomoléculas para escala industrial são bem conhecidas. Grandes estruturas biomoleculares e materiais altamente concentrados desafiam os limites dos métodos cromatográficos convencionais em relação à sua capacidade de purificação. Além disso, a ampliação de escala em leitos empacotados contendo adsorventes pouco resistentes é muito limitada, devido a fatores mecânicos e instabilidade do leito (Stickel & Fotopoulos, 2001). Estes problemas, em especial os problemas de transferência de massa, levaram ao desenvolvimento de monolitos para propósitos de separação industrial.

4.1. Monolitos de criogéis

Colunas cromatográficas monolíticas em escala preparativa e industrial, também referidas por colunas de fases contínuas, tem se tornado uma tecnologia muito útil na área de bioseparação. Devido à estrutura de poros interconectados de grandes dimensões, o fluxo através dos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa (Hahn et al., 2002; Podgornik et al., 2000), tornando os monolitos uma fase estacionária muito atrativa para cromatografia, principalmente no processamento de grandes biomoléculas como proteínas, vírus, pDNA e nanopartículas. Além disso, podem ser usados diretamente na captura de biomoléculas a partir de soluções concentradas ou contendo partículas. Os monólitos ou colunas cromatográficas de leito contínuo representam uma nova classe de materiais cromatográficos introduzidos como uma alternativa às colunas tradicionais de leito fixo (Hjertén et al., 1989; Maruska & Kornýova, 2004). Criogéis são géis poliméricos formados em meio moderadamente congelado e foram introduzidos recentemente como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de bioseparação (Lozinsky et al., 2001). Criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10-100 μm , se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho. Os criogéis supermacroporosos tem sido usados no fracionamento de linfócitos de sangue de humanos (Kumar et al., 2003), cromatografia de células de *E. coli* (Arvidsson et al., 2002) e captura direta de biomoléculas a partir de homogenizados celulares (Arvidsson et al., 2003).

Colunas monolíticas, também denominados de materiais cromatográficos de quarta geração, tem sido, portanto, testadas numa vasta área da biotecnologia e tem demonstrado suas importantes características na bioseparação de grandes biomoléculas. Assim, colunas monolíticas de criogéis apresentam-se como um excelente material cromatográfico permitindo a captura direta de proteínas e outras biomoléculas de extratos brutos não processados ou mesmo de meios de fermentação.

Esses materiais abrem novas perspectivas nos processos cromatográficos de proteínas, além de outras biomoléculas como células, vírus e nanopartículas.

4.2. Cromatografia por afinidade em íons metálicos imobilizados - IMAC

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida em 1975 por Porath et al., (1975) explora a afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida e grupamentos situados na superfície de uma determinada proteína, (Sulkowski, 1985) e tem sido utilizada na purificação de proteínas nativas ou recombinantes, peptídeos e ácidos nucléicos, por apresentar alta especificidade, capacidade e estabilidade, baixo custo, dessorção em condições brandas e facilidade de ampliação de escala (Vijayalakshmi, 1989; Hochuli, 1988).

Segundo Porath et al. (1975), na presença de íons metálicos imobilizados, alta concentração de sal e determinadas condições de pH, os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína são fortemente adsorvidos devido às ligações de coordenação formadas entre os íons metálicos e os grupos doadores de elétrons (anel imidazol, grupo tiol e grupo indol, respectivamente). Estudos revelaram que a retenção de proteínas em IMAC é largamente governada pela exposição de resíduos de histidina na superfície da proteína, apesar da cisteína e triptofano também possuírem forte afinidade por metais (Ueda et al., 2003). Segundo Arnold (1991), as cisteínas livres, entretanto, possuem potencial para interação com o metal quelatado, na prática elas raramente estão disponíveis no estado reduzido apropriado, existindo, então, dificuldades para manter os resíduos de cisteína acessíveis para coordenação.

A cromatografia por afinidade com metais imobilizados tem sido usada em colunas contínuas supermacroporosas (monólitos) de criogéis de poli(acrilamida), modificadas com resíduos de ácido iminodiacético, para captura direta de enzimas de homogenados celulares, tais como lactato desidrogenase (Arvidsson et al., 2003), urokinase (Kumar et al., 2006a; Kumar et al., 2006b), tripsina (Lysogorskaya et al., 2008), β -galactosidase

(Grosova et al., 2008), LF(Noppe et al., 2007), anticorpos monoclonais (Nilsang et al., 2007) e bacteriocinas (Deraz et al., 2007).

5. Criogéis de poli(acrilamida): síntese, estrutura e aplicações.

5.1. Histórico

Géis poliméricos têm sido aplicados em diferentes áreas da biotecnologia, incluindo o uso como materiais cromatográficos, suportes para a imobilização de células, materiais para eletroforese e imunodifusão. Uma variedade de problemas associados ao uso do gel polimérico, bem como a vasta gama de objetos biotecnológicos encontrados, conduz a novas, e muitas vezes contraditórias, exigências para os géis. Estas condições estimulam o desenvolvimento de novos géis para aplicações biológicas (Lozinsky et al., 2003). Um dos novos tipos de géis poliméricos com considerável potencial na área da biotecnologia são os criogéis (vindo do grego κριος (Kryos) que significa gelo). Os criogéis, relatados primeiramente há 45 anos atrás (ver Lozinsky, 2002a), atraem atenção devido a suas propriedades, tais como a sua macroporosidade, boa elasticidade, boa estabilidade química, por serem bastante incomuns em géis poliméricos. O potencial biotecnológico destes materiais tem sido reconhecido por diversos trabalhos no campo da biotecnologia (Arvidsson et al., 2002 e 2003, Plieva et al., 2004 e 2008).

Definições fundamentais

Gel é um sistema coloidal com características de baixíssima fluidez onde a substância dispersa forma estruturas contínuas e ramificadas que são interpenetradas por uma fase normalmente líquida (Gesser, 1989). Géis contêm apenas uma pequena quantidade de fase dispersa (1-3%) e apresentam certo grau de rigidez e elasticidade, estando a rigidez associada com a interação entre partículas que estão ligadas entre si por alguma interação intermolecular. A organização de unidades primárias pode ser realizada com a união de cadeias por meio de ligações de valência, ligações de

hidrogênio, forças dipolares e forças de van der Waals. Os géis são usualmente classificados de acordo com a fase contínua usada, isto é, água, álcool e ar para hidrogel ou liogel, alcogel e aerogel, respectivamente.

Géis poliméricos consistem em um sistema 'polímero-solvente imobilizado' em que macromoléculas conectadas via interações químicas formam uma cadeia 3D (por ligações que, na grande maioria, permanecem inalteradas com o tempo) (Lozinsky, 2003). A conformação das cadeias é determinada pela natureza das ligações e o método de produção do gel. O papel do solvente (água, álcool e ar) contido no interior da rede de polímeros é crucial, pois o solvente não permite a formação de polímeros de massa mais compacta prevenindo assim o colapso do sistema.

Segundo Lozinsky (2003) de acordo com a natureza intermolecular das ligações nas uniões das cadeias de polímeros, os géis podem ser divididos em 2 grandes grupos: géis químicos quando macromoléculas são ligadas por interações eletrostáticas e géis físicos quando macromoléculas são ligadas por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Tabela 3).

Os géis poliméricos podem ser produzidos por duas principais vias; na primeira via o inchamento limitado devido à ligações não-cruzadas de polímeros ou via inchamento de um xerogel (produzido por evaporação simples do solvente dentro do gel). A segunda e, mais comumente usada via de síntese dos géis, parte da formação em um sistema líquido. Neste caso, o sistema inicial consiste de uma solução de monômeros em que a gelatinização acontece como resultado da polimerização ramificada, ou de uma solução de polímeros em que a formação do gel é resultado das ligações-cruzadas químicas (Lozinsky 2002b). Gelatinização criotrópica (também conhecida como criogelatinização ou crioestruturação) é um tipo específico de síntese de géis poliméricos onde a formação deriva-se do tratamento criogênico de sistemas potencialmente capazes de formar géis. Os produtos dessa criogelatinização obtidos sob condições de congelamento podem ser chamados de criogéis.

A cristalização do solvente é o principal fator de diferenciação entre a criogelatinização com a gelatinização induzida por refrigeração. Os produtos deste último são os géis psicotrópicos, isto é, géis formados em condições de temperaturas mais baixas, por exemplo, a geleificação da gelatina, sem que

ocorra transição de fase do solvente. Estes géis são termoreversíveis diferenciando assim dos criogéis formados sob condições de congelamento.

Tabela 3 – Classificação de géis poliméricos e processos de formação do gel (Lozinsky, 2003).

Tipo	Causas físico-químicas da formação do gel	Géis poliméricos Exemplos	Comentários
Géis quimiotrópicos	Ligações químicas intermoleculares resultando em redes covalentes 3D	- Géis de poliacrilamida; - Resinas de troca iônica com base em matrizes de poliestireno ou poliacrilato; - Géis de dextrana com ligações cruzadas conhecidos como Sephadexes, etc.	Grande grupo de géis, a formação ocorre durante a polimerização ramificada de precursores monoméricos ou durante a ligação cruzada covalente dos precursores poliméricos. Os géis são amplamente aplicados na área da biotecnologia.
Géis ionotrópicos	Reações de troca-iônica que dão origem a ligações iônicas intermoleculares estáveis	- Géis baseados em complexos polieletrólitos como matrizes mistas de alginato-polilisina ou chitosana-poli-fosfato, etc.	Nessa categoria estão géis em média estáveis, mas que podem facilmente serem dissolvidos por mudança, por exemplo, no pH ou composição iônica do solvente. Os géis são utilizados como suportes para microrganismos imobilizados, células de plantas e animais.
Géis quelatotrópicos	Reações quelatantes que dão origem ligações de coordenação intermoleculares estáveis	- Géis formados pela adição de íons metálicos multivalentes fortemente coordenados (por exemplo, Cu(II) ou Co(II)) para soluções de chitosana ou íons de Cr(III) para soluções de carboximetil celulose ou géis de alginato com ligações cruzadas por exemplo, íons de cálcio.	Géis de Ca-alginatos são usados para a imobilização de células, outros tipos de géis quelatotrópicos ainda não têm, contudo aplicações biotecnológicas.
Géis solvotrópicos (ou solvatotrópicos)	Gelificação devido às mudanças de composição do solvente	- Géis formados como resultado do também chamado fenômeno da coacervação, esse tipo de gelificação é uma etapa intermediária do processo de formação de filmes e fibras, por exemplo, a partir de nitratos de celulose ou acetatos de celulose.	Géis são formados, quando um não solvente é adicionado na solução de polímeros reduzindo assim a afinidade do polímero em interações polímero-polímero não covalente. Nenhuma aplicação para biotecnologia foi encontrada.
Géis termotrópicos	Gelificação causada pelo aquecimento de um sistema inicial de polímeros	- Géis de hidroxietil celulose modificados hidrofobicamente; - Géis de ovalbumina e ovos brancos	Interações hidrofóbicas intermoleculares têm um papel significativo na formação do gel.
Géis psicrotropicos	Gelificação causada pela refrigeração (não congelamento) de um sistema inicial de polímeros	- Géis de gelatina; - Géis de amido; - Géis de agarose e agar-agar; - Géis de carragena.	Géis psicrotropicos são bem conhecidos, eles são relacionados com a física. Os géis são amplamente aplicados na biotecnologia como suportes sólidos para cultivo de células, como matrizes cromatográficas ou como matrizes para eletroforese.
Géis criotrópicos (criogéis)	Gelificação induzida pelo congelamento de um sistema inicial	- Géis de poliacrilamida - Géis de polivinil álcool.	Géis aplicados como suportes na separação e purificação de biomacromoléculas

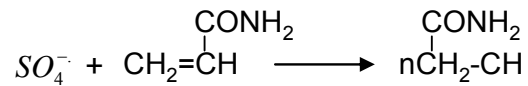


Figura 2 – Reações envolvidas na polimerização da acrilamida

A acrilamida “ativada” pode então reagir da mesma maneira com sucessivas moléculas de acrilamida na produção de longas cadeias de polímero. Uma solução destes polímeros, embora viscosa, não forma gel. A geleificação não ocorre porque as longas cadeias podem deslizar passando uma sobre a outra. A formação do gel requer o enlace de várias cadeias unidas. Isto é feito, por meio da polimerização na presença de N, N'-metileno-bis(acrilamida), um composto com duas moléculas de acrilamida acopladas nas extremidades em terminações não reativas (Cooper, 1977).

A polimerização acontece de forma a produzir redes de cadeias de acrilamida (Figura 3). O tamanho dos poros da rede é determinado por dois parâmetros: (1) o conteúdo de acrilamida utilizado por unidade de volume de reação do meio e (2) o grau de ligação-cruzada.

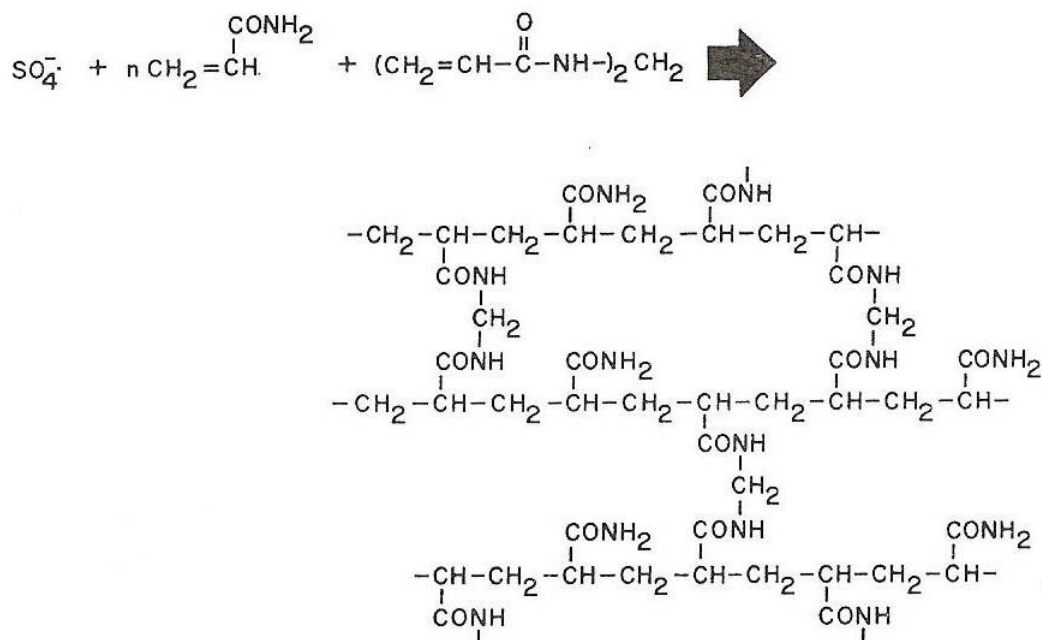


Figura 3 – Reações envolvendo ligações cruzadas em cadeias de acrilamida.

Tabela 4. Efeito da concentração de bis(acrilamida) no tamanho médio dos poros^a (raio em Å°).

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

^a Fonte: Cooper, 1977.

Independente do conteúdo total de acrilamida por unidade de volume, a média do tamanho dos poros alcança um mínimo quando 5% do total de acrilamida usado é N, N'-metileno-bis(acrilamida) (Tabela 4). Portanto, em muitas formulações o conteúdo de bis(acrilamida) é fixado em 5% do total de acrilamida e não é alterado como um meio de controle do tamanho dos poros. Por outro lado, o tamanho dos poros é controlado através da variação no conteúdo total de acrilamida. A Figura 4 indica uma aproximação, por ser a porosidade uma distribuição, do diâmetro dos poros produzidos sobre várias concentrações (m/v) de acrilamida.

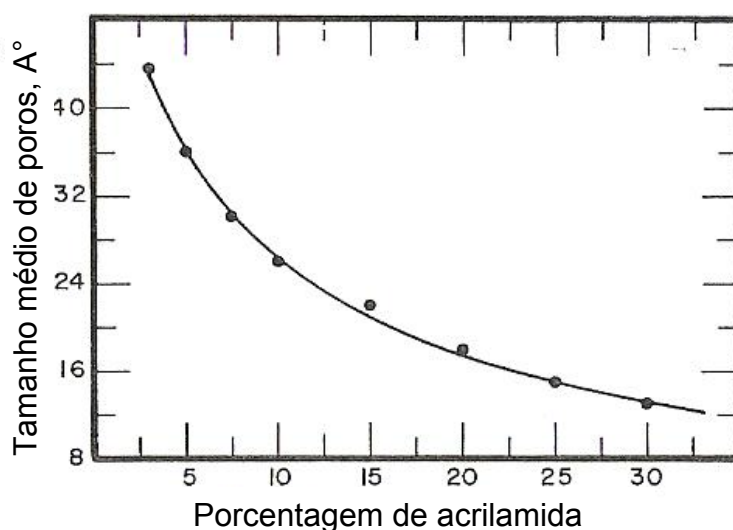


Figura 4 – Influência da concentração do gel no tamanho médio dos poros (fonte: Cooper, 1977).

A solução tampão TEMED é usualmente adicionada para servir como catalisadora da formação do gel por causa da sua existência na forma de radicais livres. A natureza dos tampões é um outro fator a ser considerado na produção dos géis de poli(acrilamida). Os tampões servem (1) para manter o pH constante dentro do gel de acrilamida e/ou (2) como o eletrólito onde conduz corrente através de um campo elétrico.

A gelatinização criotrópica em sistemas poliméricos é considerada como uma polimerização comum (como explicado anteriormente), porém em condições de congelamento, da acrilamida (AAM) e da bis(acrilamida) (BisAAM). Surge então a seguinte pergunta: Por que os criogéis têm morfologia completamente diferente dos géis tradicionais? Para responder essa questão, vamos discutir o processo que ocorre a nível micro e macroscópico do congelamento das soluções de onde a criogelatinização acontece.

Em estudos pioneiros, Butler e Bruice (1964) e Pinock (1966 e 1969) demonstraram que em soluções moderadamente congeladas, parte do solvente permanece, entretanto, não estruturado (a também chamada microfase líquida não congelada). Substâncias dissolvidas nestes sistemas concentram-se nesta região de solvente não congelado (também chamado de crioconcentração) permitindo assim que posteriores reações químicas aconteçam embora toda a amostra pareça ser um bloco sólido. Experimentos detalhados de cinética e termodinâmica das reações envolvidas provam a existência dessa microfase não congelada (Sergeev e Batyul, 1976). Fica claro agora que, em temperaturas moderadamente baixas, um sistema macroscopicamente sólido consiste de duas fases, uma fase policristalina do solvente puro congelado e a outra uma microfase líquida não congelada contendo quase todos os componentes dissolvidos presentes na solução inicial. Como o volume da microfase é menor que o volume da solução inicial, ocorre acentuadas concentrações das substâncias dissolvidas. Assim, altas concentrações na microfase aceleram as reações químicas, e elas podem se propagar mais rapidamente que reações em uma solução homogênea acima do ponto de congelamento, apesar do fato da temperatura ser mais baixa.

Quando a solução inicial contém moléculas de massa molar baixa, ou precursores de gel macromolecular, o congelamento moderado promove a formação criotrópica dos géis (Figura 5). É importante que a taxa de

polimerização não seja alta, senão a formação do gel começará antes da amostra líquida ser congelada.

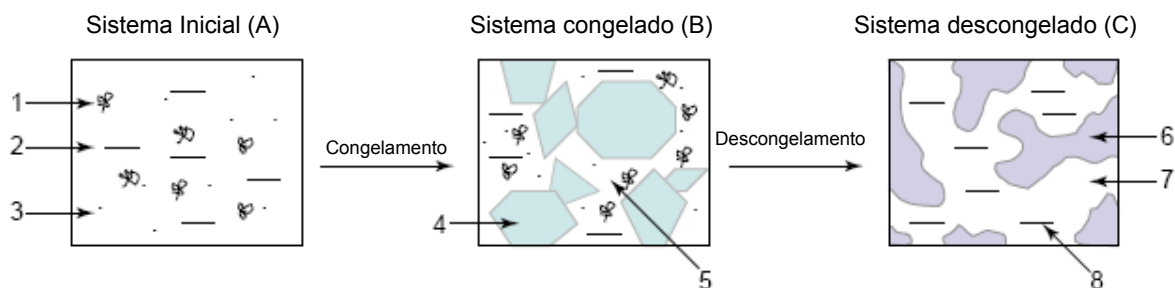


Figura 5 – Esquema principal para a formação dos criogéis poliméricos (Lozinsky, 2003): 1, precursor de alto peso molecular; 2, solvente; 3, precursor de baixo peso molecular ou substâncias solúveis; 4, policristais do solvente congelado; 5, microfase líquida não congelada (ULMP); 6, rede polimérica do criogel; 7, macroporos e 8, solvente descongelado.

O sistema congelado é heterogêneo (Figura 5B) e consiste em uma fase sólida (cristais de solvente congelado) e microfase líquida não congelada. O volume da microfase depende da natureza do solvente, da concentração inicial das substâncias dissolvidas, da presença de misturas solúveis e insolúveis. A microfase não congelada é apresentada na Figura 5 numa escala que não reflete a verdadeira relação entre as partes congeladas e não congeladas. Esta última usualmente constitui de 0,1 – 10% do total da amostra (Gusev et al., 1990, 1993; Konstantinova & Lozinsky, 1997; Lozinsky et al., 1989, 2000; Mikhalev et al., 1991). Deve-se considerar o fato que, em altas concentrações, as substâncias dissolvidas começam a precipitar fora da microfase líquida devido a solubilidade limitada. Por outro lado, se as substâncias dissolvidas são consumidas em uma reação química, por exemplo, formação do gel, substâncias precipitadas redissolvem na microfase.

A cristalização do solvente congelado é uma etapa crucial para a formação satisfatória de supermacroporos homogêneos e interconectados dentro do criogel. Após o descongelamento das amostras congeladas, o gel formado tem uma estrutura macroporosa (Figura 5C). Os cristais congelados do solvente desempenham o papel do agente formador de poros. O derretimento desses cristais forma as cavidades nos criogéis. Devido ao abaixamento da entropia, causado pela diminuição no excesso da energia livre

de Gibbs na interface gel-solvente, a tensão superficial do sistema aumenta a medida que a temperatura abaixa, isto causa cavidades inicialmente com ângulos acentuados para depois se tornarem arredondados devido a variação da temperatura no tratamento criogênico exerce um grande efeito na porosidade dos criogéis esponjosos (Lozinsky, 2008). O arranjo das partículas, e a sua persistência no lugar que ocupam na malha cristalina, são determinados pela existência de um mínimo energético na posição, correspondente à otimização das interações formadas entre as partículas. A quantidade de núcleos formados em temperaturas mais distante do ponto de congelamento da água é maior que em temperaturas mais próximas do ponto de congelamento, sendo assim cristais de gelo formados por moléculas de água que se arranjam ao redor desses núcleos possuem menor diâmetro em ambientes onde a temperatura é mais distante do ponto de congelamento da água.

Foi mostrado por Lozinsky que para criogéis de poliacrilamida (PAAM) formados em três temperaturas negativas (-10°C , -20°C e -30°C), poros maiores foram formados no ponto de congelamento mais alto, enquanto que os poros menores foram obtidos a temperaturas mais baixas (Figura 6).

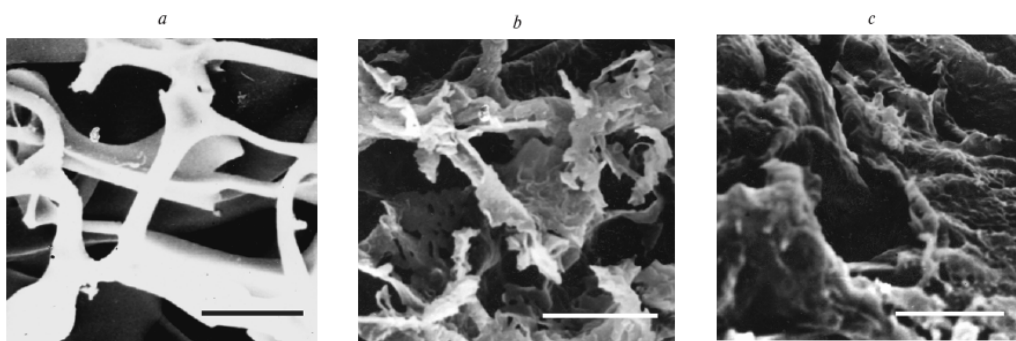


Figura-6 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de criogéis PAAM formadas de uma solução aquosa 3% de acrilamida e N, N'-metileno-bisacrilamida (relação molar de monômeros 30:1), em -10 (a), -20 (b) e -30°C (c) Lozinsky, 1986.

A forma dos poros interconectados de tamanho capilar também é observada. Não só pela transferência de massa por difusão de uma substância, mas também pelo processamento de líquidos bem como suspensões não muito viscosas de espécies biológicas (vírus, organelas, células) é possível por tais poros.

As características hidrodinâmicas das matrizes de criogel podem ser controladas pela variação da concentração inicial dos agentes formadores de gel e pelas condições do tratamento criogênico. Na Figura 7 está apresentada a dependência da vazão de água em função da relação de AAm/BisAAm através da coluna onde os criogéis PAAm foram preparados em diferentes concentrações de co-monômeros de acrilamida/N, N'-metileno-bis(acrilamida) e em diferentes temperaturas de gelatinização criotrópica (Lozinsky, 2008). Poros maiores levam a uma maior vazão na mesma diferença de pressão. Quanto menor o grau de ligação cruzada do polímero na parede do macroporo (menor o conteúdo de N, N'-metilenobisacrilamida) mais forte é a expansão da água na fase de geleificação, diminuindo assim aberturas dos capilares e reduzindo a resistência ao escoamento.

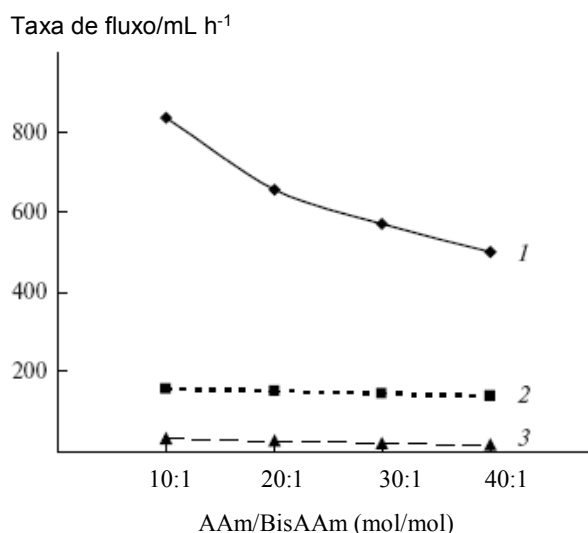


Figura 7 - Propriedades hidrodinâmicas das colunas de criogéis PAAm formadas em -10 (1), -20 (2) e -30°C (3) de uma solução aquosa 3% de acrilamida e N, N'-metilenobisacrilamida com várias relações de monômeros (pressão hidrostática de 300mm de H₂O). (Fonte: Lozinsky, 2008)

Métodos de caracterização do criogel

Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho que varia de 10-100 μm e se diferenciam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho. Estas características concedidas a essas

matrizes cromatográficas fornecem vantagens quando comparadas a cromatografia em leito expandido onde equipamentos especiais são requeridos para, por exemplo, processar caldos não clarificados (Chang et al., 1996 e Ujam et al., 2000) ou na cromatografia tradicional de leito fixo, com sua fase estacionária empacotada em uma coluna por ser incapaz de processar soluções contendo materiais particulados, como suspensões de células ou homogenados celulares não clarificados, apesar de sua alta capacidade e resolução. O material particulado contido nestas soluções diminui a porosidade do leito, resultando, conseqüentemente, num aumento da resistência ao escoamento na coluna, culminando com seu bloqueio. Os criogéis macroporosos (especialmente quando em forma de colunas monolíticas) são atualmente a única forma disponível de cromatografia em leito macroporoso para o processamento de células microbianas e de mamíferos em caldos não clarificados (Dainiak et al., 2007a).

Algumas metodologias, descritas a seguir, são utilizadas para caracterizar essas matrizes cromatográficas. Como por exemplo, a estrutura dos poros que pode ser visualizada pelo uso da microscopia eletrônica de varredura. O método de pulso de um traçador pode ser aplicado para medir a distribuição do tempo de residência (RTD) de um líquido na coluna de criogel sob diferentes vazões. Mais detalhes sobre esse método pode ser encontrado em Persson et al., 2004.

O comportamento da resistência ao escoamento das matrizes de criogéis pode ser avaliado pela relação da queda de pressão hidrostática através da coluna *versus* a vazão da água. O valor correspondente de permeabilidade hidráulica pode ser então determinada segundo a equação 1 (Yao et al., 2006):

$$k_w = \frac{Q_w \mu_w L}{\Delta p_w A} \quad (1)$$

onde Q_w é a vazão de água pela coluna, μ_w é a viscosidade da água, L é o comprimento da coluna, A é a secção transversal e Δp_w é a queda de pressão.

A água no interior do criogel inchado é encontrada em diferentes formas: polímero ligado a água, a água dentro de pequenos poros e água dentro de

grandes poros. Esta última, responsável pela porosidade da matriz de criogel, poderá ser removida mecanicamente por compressão do criogel devido à elasticidade do material. Assim a porosidade, pode ser estimada medindo-se o conteúdo de água livre presente e o volume do leite, como descrito previamente por Yao et al., 2006. A porosidade é dada pela equação 2

$$\varphi = \frac{m_w - m_s}{\rho_w V_0} \quad (2)$$

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, como relatado por Arvidsson et al., 2003 e Plieva et al., 2004, 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 de criogel em uma proveta graduada contendo água e V_1 é o volume conhecido de água em uma proveta graduada.

A elasticidade da matriz de criogel pode ser calculada através de teste de compressão e deformação por meio da equação 3:

$$E = \frac{F / A}{\Delta h / h} \quad (3)$$

onde E é o módulo da elasticidade, F é a força aplicada, A é a área da amostra, Δh variação no comprimento com a compressão da amostra, e h é o comprimento inicial da amostra.

Aplicações

Criogéis foram introduzidos recentemente como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de bioseparação (Lozinsky, et al., 2002). Os criogéis possuem poros interconectados de diversos tamanhos, o que permite que o escoamento de massa através dos poros seja puramente convectivo e à resistência a transferência de massa seja baixa. Assim, estes suportes são meios atrativos para a captura direta de biomacromoléculas.

No campo da microbiologia, recentes pesquisas têm demonstrado eficiência no processamento de suspensões de células e vírus, purificação de células e aplicações em culturas celulares. Isto se deve à combinação de

propriedades tais como macroporosidade, boa elasticidade e biocompatibilidade, estabilidade química e física e facilidade de preparo, o que permite a esses materiais uma ampla gama de aplicações dentro da pesquisa em microbiologia.

A procura por alta pureza de bioprodutos, incluindo vírus e DNA plasmidial, como vetores de genes terapêuticos e partículas de vírus como componentes de vacinas, revelou-se de grande influência no desenvolvimento de processos *downstream*. Assim, tecnologias envolvendo o uso de materiais poliméricos supermacroporosos (ou criogéis), onde se aplicam no processamento de diferentes populações de células é de grande interesse. Uma das características mais atraentes dos criogéis é sua macroporosidade para o processamento de fluidos particulados incluindo suspensões de células microbianas (Lozinsky et al., 2003, Plieva et al., 2007 e Dainiak et al., 2007b). Esses macroporos são obtidos pela síntese de hidrogéis por criogelatinização (ou gelatinização em temperaturas abaixo de 0°C), como foi mostrado na Figura 5.

O uso dos criogéis na microbiologia foi iniciado por volta dos anos de 1980 quando foram propostos como matrizes para a imobilização de células via concentração mecânica (ver Lozinsky e Plieva, 1998). No entanto, o potencial dos criogéis para o isolamento de células e aplicações em culturas celulares foi descoberto apenas muito recentemente (Lozinsky et al., 2003, Plieva et al., 2007 e Dainiak et al., 2007c).

A estrutura peculiar dos poros do criogel em combinação com sua elasticidade e alta estabilidade mecânica tem motivado o seu uso como matrizes para a imobilização de células. Duas principais maneiras para imobilizar células são normalmente usadas a depender do potencial de aplicação das células biocatalizadoras imobilizadas (ICBs) bem como do tamanho do poro desejado para a matriz de criogel (Plieva, 2008). As duas maneiras são: imobilização por concentração mecânica nos criogéis (Figura 8a) e imobilização nas superfícies dos poros dentro do criogel via interações específicas ou através da adsorção (Figura 8b).

Segundo Plieva (2008), normalmente, a imobilização de células microbianas via concentração mecânica em criogéis é simples. A suspensão de células é misturada em uma solução de monômeros (polímeros) de géis

precursores até que uma suspensão celular estável seja alcançada. Após a adição de compostos polimerizantes (neste caso polimerização dos radicais livres), a suspensão de células é congelada com regimes de temperatura que variam de acordo com a forma geométrica requerida. Estes criogéis podem ser preparados em formato de esferas, folhas, e monólitos, ou podem ser sintetizados dentro de um plástico protetor aberto (Figura 8a). ICBs com tamanho de poros de até 1-2 μm são produzidos, na maioria dos casos, como esferas ou folhas (Lozinsky e Plieva, 1998, Martins et al., 2003). ICBs com grandes poros interconectados de tamanhos até 200 μm são frequentemente preparados para altas taxas de fluxo em colunas monolíticas ou discos (Lusta et al., 2000 e Hedström et al., 2008) ou são produzidos dentro de um plástico protetor aberto (definido como partícula de gel macroporoso, MGP) para manter as ICBs estáveis sob intensa agitação. (Plieva et al. 2008 e Nilsang et al., 2008).

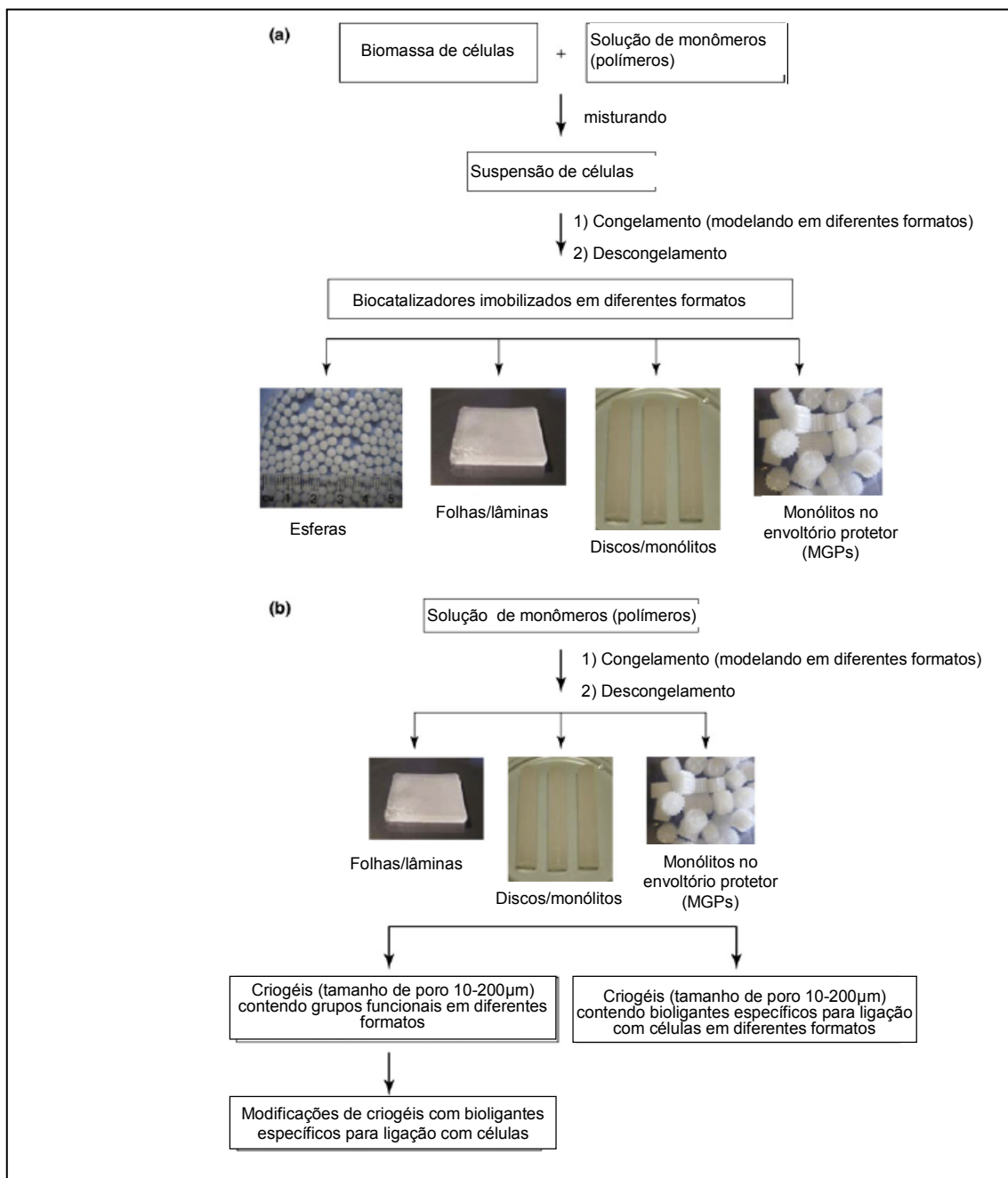


Figura 8 – Representação esquemática das duas principais abordagens para a imobilização celular. (a) via concentração mecânica de células dentro dos criogéis durante o preparo sob diferentes formatos, e (b) pela ligação de células no sistema de criogel já preparado carregando ligantes específicos. (Fonte: Plieva, 2008).

O uso a longo prazo de um único ICB é importante para o desenvolvimento de um processo industrial eficiente. Uma questão importante diz respeito à regeneração do ICB por simples incubação em uma taxa média de crescimento para restaurar a atividade de bioconversão. Outra preocupação importante é a preservação dos ICBs para evitar a contaminação após a

utilização prolongada. Assim, microrganismos selecionados em meios extremamente desfavoráveis, constituiria a melhor escolha para o preparo dos ICBs (Plieva,2008).

Outra estratégia de imobilização inclui a preparação de criogéis com grupos de ligantes específicos utilizados para ligações com as células (Figura 8b). A presença desses ligantes apropriados na superfície dos poros dentro dos criogéis macroporosos tem tornado possível ligações específicas com microrganismos (Plieva et al., 2004, Dainiak et al., 2007b, Arvidsson et al., 2002 e Dainiak et al., 2008) e células de mamíferos (Kumar et al., 2003 e Kumar et al., 2005).

Suspensões celulares de alta densidade podem ser aplicadas em colunas monolíticas de criogel sem que haja bloqueio dos macroporos (Plieva, 2008). Desta forma, células de leveduras podem ser imobilizadas sobre a superfície de colunas monolíticas de criogel de troca iônica carregadas com grupos amina terciária por circulação contínua de uma suspensão densa das células através da coluna.

Quanto ao isolamento e separação de células usando criogéis, a separação cromatográfica de células microbianas é geralmente considerada como uma etapa difícil e muitos fatores devem ser levados em conta, incluindo o grande tamanho das células que reflete na sua baixa difusividade, superfície química complexa, entre outros (Plieva, 2008). De fato, devido a falta de adsorventes apropriados com porosidade suficientemente alta para o processamento de células, a cromatografia de células não tem sido até agora usada com muita frequência (Dainiak et al., 2007). Em decorrência da presença de grandes poros (10-100 μm) interconectados e a paredes dos poros mecanicamente fortes, os criogéis podem suportar altas vazões sem praticamente nenhuma compressão, permitindo assim o transporte de massa convectivo dos solutos e de partículas de pelo menos 10 μm de tamanho (Plieva et al., 2004 e Persson et al, 2004). Quando não há ligantes específicos na matriz de criogel, as células passam livremente através da coluna monolítica sem bloquear os poros. No entanto, quando ligantes específicos estão presentes na superfície dos poros, as células microbianas podem se ligar a eles e serem eluídas da coluna de criogel com alto rendimento e com

viabilidade regida por meio dos métodos convencionais de eluição (Plieva et al., 2004, Dainiak et al., 2004, Arvidsson et al., 2002 e Dainiak et al., 2006).

Os criogéis com metais quelatados têm sido usados como suportes eficientes na cromatografia por afinidade. A técnica de cromatografia por afinidade com metal imobilizado, do inglês, *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), introduzida por Porath et al., 1975, é baseada na capacidade que as proteínas têm de serem reversivelmente ligadas aos íons metálicos através de ligações de coordenação, onde a proteína atua como uma base de Lewis, doando elétrons para o íon metálico, (Ueda et al., 2003). O metal que interage com a proteína encontra-se imobilizado por meio de um agente quelante, que por sua vez está ligado covalentemente, via um espaçador, à matriz. Os compostos utilizados como agentes quelantes são: tris(carboximetil)etilenodiamina (TED) (pentadentado), ácido nitrilotriacético (NTA) (tetradentado), ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) (tetradentado), e ácido iminodiacético (IDA) (tridentado). O número de ligações formadas entre o íon metálico e o quelante imobilizado determina a afinidade total do adsorvente pela proteína, sendo assim quanto mais forte a imobilização do metal, mais fraca será a interação com a proteína. O IDA por ser um quelante tridentado é o mais comumente utilizado. As interações entre o íon metálico imobilizado e a proteína são complexas e combinam efeitos eletrostáticos, hidrofóbicos e de coordenação.

Criogéis baseados em poliacrilamida carregados com Cu^{2+} por meio do ligante IDA (criogel- IDA- Cu^{2+}) têm sido investigado por vários grupos de pesquisa (Arvidsson et al., 2003, Dainiak et al., 2004, Plieva et al., 2004, Kumar et al., 2006, Teilum et al., 2006, Dainiak et al., 2005, Hanora et al., 2005, Dainiak et al., 2007). Plieva et al, 2004, usaram criogel-IDA- Cu^{2+} para a adsorção da lisozima e Teilum et al, 2006, imobilizaram mitocôndrias de fígado em criogéis-IDA- Cu^{2+} e estudaram a proteína específica que é liberada por essas mitocôndrias isoladas. Recentemente, criogéis com metais quelatados foram também usados para a análise de superfícies e quantificação de células (Dainiak et al., 2007).

Com o objetivo de isolar e purificar uroquinase, Kumar et al. (2006) desenvolveram um processo de isolamento dessa enzima vinda de cultura celular em um biorreator. Foi descrito, para esse propósito, a aplicabilidade de

criogéis de poli(acrilamida) como matrizes utilizadas em cromatografia por afinidade em metais imobilizados (IMAC). Um estudo comparativo foi realizado entre a matriz de criogel e uma matriz de afinidade baseada em sepharose convencional para a captura contínua da uroquinase. A ativação das matrizes (criogel de poli(acrilamida) e sepharose) foi feita com o Cu^{2+} (utilizando o ácido iminodiacético-IDA) por ser um bom ligante para IMAC devido a sua afinidade para ligações com proteínas e por ser um metal de baixo custo além de facilitar a regeneração da fase estacionária. Segundo os autores, a uroquinase demonstrou considerável afinidade com o cobre devido principalmente a presença de 17 resíduos de histidina (His) na sua superfície, os quais contêm grupos imidazol que interagem com o Cu^{2+} . Quanto ao estudo comparativo entre a eficiência do criogel-IDA- Cu^{2+} de poli(acrilamida) e a coluna de sepharose-IDA- Cu^{2+} para a captura da uroquinase, foi mostrado que o criogel apresentou melhor seletividade e eficiência operacional comparado com a coluna de sepharose. Assim, os autores concluíram que a IMAC, acoplada ao uso de matrizes supermacroporas de criogel, é uma técnica ideal para a captura da uroquinase em condições de pH fisiológico em um sistema contínuo. Arvidsson et al. (2002) mostraram que matrizes de criogel supermacroporoso são atrativas para a manipulação de células microbianas em cromatografia de afinidade com recuperações de *Escherichia coli* que variaram de 70-80%.

Apesar da maioria dos estudos focarem na aplicação de criogéis-IDA- Cu^{2+} para separação e purificação de biomoléculas ou células microbianas, outros íons metálicos de transição, tal como Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} e Co^{2+} são também adequados para a IMAC (Pearson, 1968; Ueda et al., 2001).

Estudos com criogéis aplicados à nanotecnologia tem sido recentemente apresentados. Yao et al, 2006 propuseram um novo criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com partículas de tamanho nanométrico para a utilização em cromatografia de proteínas (BSA). A síntese dos criogéis foi feita pela co-polimerização criogênica dos radicais de uma solução de acrilamida (AAm), N, N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAm), alil glicidil éter (AGE) e nanopartículas de Fe_3O_4 sob temperatura de congelamento. A matriz, além de alta porosidade (poros 10-50 μm), possuiu alta permeabilidade e baixo coeficiente de dispersão axial em uma ampla faixa de velocidade do fluido. A

capacidade de adsorção da proteína (BSA) na matriz de criogel foi superior quando comparada com a mesma matriz de criogel (reportada em trabalhos anteriores) sem as nanopartículas imobilizadas.

Os criogéis apresentam-se também como alternativa para a solução de problemas em alimentos processados. López-Fouz et al, (2007) propuseram a retirada do gosto amargo de sucos cítricos pelo uso de criogéis de polivinil álcool (PVA-PEG) imobilizados com *Rhodococcus fascians*. Este microrganismo produz enzimas que metabolizam o limonin, (composto da família dos limonóides que são principais responsáveis pelo gosto amargo de sucos cítricos). O efeito da concentração de PVA e PEG, carga de células, e pH sobre a eficiência do *R. fascians* na degradação do limonin foi estudado. A estabilidade dos leitos de PVA-PEG-*R.fascians* com a passagem de suco de laranja foi outro foco do estudo. As células concentradas puderam ser usadas por 3 ciclos completos (corridas de 24h a 20°C) restando 35,6% da eficácia na hidrólise do limonin. Além disso, o processo, segundo os autores, não alterou os principais parâmetros físico-químicos do suco cítrico, exceto no decréscimo do gosto amargo.

Naringin é outro composto responsável pelo gosto amargo de sucos de frutas cítricas. Busto et al (2007) estudaram a imobilização de naringinase (vindas de culturas CECT 2088 de *Aspergillus niger*) em matrizes poliméricas de criogel polivinil álcool (PVA) contendo atividade biocatalítica. O efeito da concentração da matriz, carga de enzima e pH na eficiência da imobilização foram os principais focos do estudo. A naringinase imobilizada pode ser reutilizada por 6 ciclos (corridas de 24hs a 20°C), restando 36% da eficiência na hidrólise da naringin em suco concentrado.

A combinação única das propriedades de criogéis, tais como sua estrutura macroporosa, biocompatibilidade e robustez química e mecânica, abrem novas oportunidades para a concepção desses materiais macroporosos. Condições moderadas para a imobilização e uma elevada estabilidade mecânica dos criogéis permitem a preparação de biocatalizadores eficientes para serem empregados em soluções aquosas ou pouco viscosas. A liberação de células ligadas por afinidade assegura a alta viabilidade e recuperação das células desorvida durante a cromatografia de células. Além disso, a grande dimensão de poros interligados no criogel monolítico permite um rápido

processamento de volumes consideráveis de fase líquida. Assim, colunas de criogel macroporoso podem ser utilizadas para a detecção analítica e captura seletiva de células específicas em efluentes de água.

6. Referências bibliográficas

Arnold, F. H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology*, v. 9, p. 151-156, 1991.

Arvidsson, P, Plieva, F. M, Lozinsky, V. I, Galaev, I. Y, Mattiasson, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *Journal of Chromatography A* 986 275–290, 2003.

Arvidsson, P, Plieva, F. M, Savina, I. N, Lozinsky, V. I, Fexby, S, Bülow, L, Galaev, I. Y and Mattiasson, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal Chromatography A* 977, 27–38, 2002.

Blackberg, L & Hernell, O. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step, *FEBS Letters*, 109: 180 184, 1980.

Brock, J. H. The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 1 6, 2002.

Bruice, T. C e Butler, A. R. Catalysis in water and ice. II. The reaction of thiolactones with morpholine in frozen systems, *J. Am. Chem. Soc.* 86: 4104–4108, 1964.

Bullerman, L. B, & Berry, E.C. Use of cheese whey for vitamin B12 production, *Applied Microbiology* 14: 353 355, 1966.

Busto, M.D, Meza, V, Ortega, N, Perez-Mateos, M. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry* 104 1177–1182, 2007.

Butler, A. R e Bruice, T. C. Catalysis in water and ice. I. A comparison of the kinetics of hydrolysis of acetic anhydride, β -propiolactone, and *p*-nitrophenyl acetate and the dehydration of 5-hydro-6-hydroxy-deoxyuridine in water and in ice, *J. Am. Chem.*

Soc. 86: 313–319, 1964.

Carey, K, Larsen, A, Rowney, M, and Cameron-Smith, D. Application of whey proteins to enhance the molecular adaptations and strength gains following resistance exercise training, *Proceedings of the fourth international whey conference*, Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA, 36 46, 2006.

Chang, Y.K. and Chase, H.A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 204–216, 1996.

Chatterton, D. E. W. Digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Relationship to bioactivity, *Proceedings of the fourth international whey conference*, Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA, 170 184, 2006.

Chen, L, Guo, C, Guan, Y & Liu, H. Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Separation and Purification Technology*, 56: 168 174, 2007.

Clussler, E.L. Diffusion, Mass Transfer in Fluid Systems, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

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

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: 4366 4374, 2004.

Dainiak, M.B, Savina I. N, Musolino I, Kumar A, Mattiasson B, Galaev I Y. Biomimetic macroporous hydrogel scaffolds in a high throughput screening format for cell-based assays. *Biotechnol.* 24 1373–1383, 2008.

Dainiak, M.B, Galaev, I.Y and Mattiasson, B. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *Journal of Chromatography A* 1123, 145–150, 2006.

Dainiak, M.B, Galaev, I.Y, Hatti-Kaul, R. Mattiasson, B. Macroporous monolithic

hydrogels in a 96-minicolumn plate format for cell surface-analysis and integrated binding/quantification of cells. *Enzyme Microb. Technol.* 40 688–695, 2007.

Dainiak, M.B, Galaev, IY, Kumar, A, Plieva, F.M and Mattiasson, B. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 106, 101–127, 2007.

Dainiak, M.B, Kumar, A, Galaev I Y and Mattiasson B. Methods in cell separations. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 106, 1–18, 2007.

Dainiak, M.B, Kumara, A, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B, Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A* 1045 93–98, 2004.

Dainiak, M.B. et al. Cell chromatography. Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns. *Biotechnol. Prog.* 21, 644–649, 2005.

Das-Bradoo, S. et al. Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. *J. Biotechnol.* 110, 273–285, 2004.

Deraz, S, Plieva, F. M, Galaev, I. Y, Karlsson, E. N & Mattiasson, B. Capture of bacteriocins directly from non-clarified fermentation broth using macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 786–793, 2007.

Farnaud, S & Evans, R. W. Lactoferrin A multifunctional protein with antimicrobial properties, *Molecular Immunology*, 40: 395–405, 2003.

Farnfield, A, Carey, K & Cameron-Smith, D. Whey protein supplementation and resistance training to enhance muscle growth in young and older adults, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14: S69, 2005.

Food outlook N^o 2, December 2006,
<http://www.fao.org/docrep/009/j8126e/j8126e11.htm>.

Gesser, H. D and Goswami, P. C. Aerogels and Related Porous materials, *Chem. Rev.* 89. 765–788, 1989.

Gill, H. S & Cross, M. L. Anticancer properties of bovine milk, *British Journal of Nutrition*, 84: S161–S166, 2000.

Grosova, Z, Rosenberg, M, Rebros, M, Sipocz, M & Sedlackova, B. Entrapment of β -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel, *Biotechnology Letters*, 30: 763 767, 2008.

Gusev, D.G, Lozinsky, V.I & Bakhmutov, V.I. Study of cryostructurization of polymer systems. X. 1H- and 2H-NMR studies of the formation of crosslinked polyacrylamide cryogels, *Eur. Polym. J.* 29: 49–56, 1993.

Gusev, D.G, Lozinsky, V.I, Vainerman ES & Bakhmutov VI. Study of the frozen water-poly(vinyl alcohol) system by 2H and 13C NMR spectroscopy, *Magn. Res. Chem.* 28: 651–655, 1990.

Hahn, R, Panzer, M, Hansen, E, Mollerup, J & Jungbauer, A. Mass transfer properties of monoliths, *Separation Science and Technology*, 37(7): 1545 1565, 2002.

Hahn, R, Schulz, P.M. Schaupp, C & Jungbauer, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*, 795(2): 277 287, 1998.

Hanora, A, Bernaudat, F, Plieva, F.M, Dainiak, M.B, Bülow, L, Galaev, I.Y, Mattiasson, B. Screening of peptide affinity tags using immobilized metal affinity chromatography in 96-well plate format, *Journal of Chromatography A* 1087 38–44, 2005.

Hedström, M, Plieva, F.M, Galaev I Y, and Mattiasson, B. Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 907–912, 2008.

Hjertén, S, Liao, J & Zhang, R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography A*, 473: 273 275, 1989.

Hochuli, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of Chromatography*, v. 444, p. 293-302, 1988.

Hoffmann, K. F. On the history of whey cures, especially in the 17th, 18th, and 19th centuries, *Medizinische Monatsschrift*, 15: 411 414, 1961.

Iberer, G, Hahn, R & Jungbauer, A. Monoliths as stationary phases for

separating biopolymers - Fourth- generation chromatography sorbents, *LC GC North America* 17(11): 998, 1999.

Jungbauer, A & Hahna, R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies, *Journal of Chromatography A*, 1184: 62 79, 2008.

Konstantinova, N. R e Lozinsky, V. I. Cryotropic gelation of ovalbumin solutions, *Food Hydrocolloids* 11: 113–123, 1997.

Korhonen, H. Technological and health aspects of bioactive components of milk, *International Dairy Journal*, 16: 1227 1426, 2006.

Kumar, A, Bansal, V, Arvidsson, P, Roychoudhury, P.K, Mattiasson, B, Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line, *Journal of Chromatography A* 1103 35–42, 2006.

Kumar, A, Bansal, V, Nandakumar, K. S, Galaev, I. Y, Roychoudhury, P. K, Holmdahl, R, Mattiasson, B. Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices, *Biotechnol. Bioeng.* 93 636–646, 2006.

Kumar, A, Plieva, F.M, Galaev, I. Y and Mattiasson, B. Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel. *J. Immunol. Methods* 283, 185– 194, 2003.

Kumar, A, Rodríguez-Caballero, A, Plieva, F. M, Galaev, I. Y, Nandakumar, K S, Kamihira, M, Holmdahl, R, Orfao, A, Mattiasson, B. Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: effect of ligand coupling and matrix architecture. *J. Mol. Recognit.* 18, 84–93, 2005.

Lonnerdal, B, Carlsson, J & Porath, J. Isolation of lactoferrin from human milk by metal chelate affinity chromatography, *FEBS Letters*, 75: 89 92, 1977.

López-Fouz, M, Pilar-Izquierdo, M. C, Martínez-Mayo, I, Ortega N, Pérez-Mateos M, Busto, M. D. Immobilization of *Rhodococcus fascians* cells in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of citrus juices. *Journal of Biotechnology*, 131, 2007.

Lozinsky, V.I, Galaev, I.Y, Plieva, F.M, Savina, I.N, Jungvid, H and Mattiasson, Bo. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *TRENDS in Biotechnology* Vol.21 No.10 445-451, 2003.

Lozinsky, V.I, Golovina, T.O & Gusev, D.G. Study of cryostructuration of polymer systems. XIII. Some characteristic features of the behaviour of macromolecular thiols in frozen aqueous solutions, *Polymer* 41: 35–47, 2000.

Lozinsky, V.I, Plieva, F.M, Galaev, I.Y and Mattiasson, Bo. The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation* 10: 163–188, 2002(b).

Lozinsky, V.I, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10(4-5): 163 188, 2001.

Lozinsky, V.I, Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 57, No. 5, pp. 1015—1032, 2008.

Lozinsky, V.I, Vainerman ES, Domotenko LV, Blumenfel'd AL, Rogov VV, Barkovskaya EN, Fedin EI & Rogozhin SV. Characteristic features of the freezing of concentrated aqueous poly(vinyl alcohol) solutions: their relation to the properties of hydrogels obtained after thawing, *Colloid Journal* 51: 685–690, 1989.

Lozinsky, V.I, Vainerman, E.S, Ivanova, S. A, Titova, E.F, Shtilman, M.I, Belavtseva, E. M, Rogozhin, S. V. *Acta Polymerica*, 37, 142, 1986.

Lozinsky, V.I. and Plieva, F.M. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 227–242, 1998.

Lozinsky, V.I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and areas of implementation. *Russ. Chem. Rev.* 71, 489–511, 2002a.

Lusta, K.A, Chung, I. K, Sul, I. W, Park, H. S., Shin, D. I. Immobilization of fungus *Aspergillus* Sp. by a novel cryogel technique for production of extracellular hydrolytic enzymes. *Process Biochem.* 35, 1177–1182, 2000.

Lysogorskaya, E. N, Roslyakova, T. V, Belyaeva, A. V, Bacheva, A. V, Lozinskii, V. I & Filippova, Y. Preparation and Catalytic Properties of Trypsin Immobilized on

Cryogels of Polyvinyl Alcohol, *Applied Biochemistry and Microbiology*,44(3): 241-246, 2008.

Martins, R.F. Plieva, F.M, Santos, A and Hatti-Kal, R. Integrated immobilized cell reactor/adsorption system for β -cyclodextrin production: a model study using PVA-cryogel entrapped *Bacillus agaradhaerens* cells. *Biotechnol. Lett.* 25, 1537–1543, 2003.

Maruska, A & Kornýová, O. Continuous beds (monoliths): stationary phases for liquid chromatography formed using the hydrophobic interaction-based phase separation mechanism, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59 (1): 1-48, 2004.

Mikhalev, O.I, Serpinski, M, Lozinsky, V.I, Kapanin, P.V, Chkeidze, I & Alfimov, M.V. Method for determination of liquid microphase volume: application to the investigation of frozen H₂O-poly(vinyl alcohol) system, *CryoLetters* 12: 197–206, 1991.

Naidu, A. S, Tulpinski, J, Gustilo, K, Knowles, J. R, Tips, P. D & Nimmagudda, R. Activated lactoferrin A natural antimicrobial intervention for beef safety. *Proceedings of the 49th international congress of meat science and technology*, 2003.

Nilsang, S, Nandakumar, K. S, Galaev, I. Y, Rakshit, S. K, Holmdahl, R, Mattiasson, B & Kumar, A. Monoclonal Antibody Production Using a New Supermacroporous Cryogel, Bioreactor, *Biotechnology Progress*, 23(4): 932-939, 2007.

Nilsang, S, Nehru, V; Plieva, F.M; Nandakumar, K.S; Sudip, K. R, Holmdahl, R, Mattiasson, B, Kumar, A. Three-dimensional culture for monoclonal antibody production by hybridoma cells Immobilized in macroporous gel particles. *Biotechnol.* 24 , 1122–1131, 2008.

Noppe, W, Plieva, F. M, Galaev, I. Y, Vanhoorelbeke, K, Mattiasson, B e Deckmyn, H. Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands purification of lactoferrin from defatted milk, *Journal of Chromatography A*, 1101: 79-85, 2006.

Noppe, W, Plieva, F. M, Vanhoorelbeke, K, Deckmyn, H, Tuncel, M, Tuncel, A. Galaev, I. Y & Mattiasson, B. Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast

development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds, *Journal of Biotechnology* , 131(3): 293-299, 2007.

Ohr, L. M. Nutraceuticals and functional foods, *Food Technology*, 58: 71-74, 2004.

Pearson, R.G. Hard and soft acids and bases. HSAB. Part I. Fundamental principles, *J. Chem. Educ.* 45 581–587, 1968.

Persson, P., Baybak, O., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Nilsson, B., Axelsson, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 224, 2004.

Pincock, R. E e Kiovsky, T. E. Kinetics of reactions in frozen solutions, *J. Chem. Educ.* 43: 358–360, 1966.

Pincock, R.E. Reactions in frozen systems, *Acc. Chem. Res.* 2: 97–103. 1969.

Pins, J.J, Harminder, K. & Keenan, J. M. The effects of hydrolyzed whey peptides on cardiovascular disease risk factors in mildly hypertensive men and women, *Proceedings of the fourth international whey conference*, Chicago, USA, American DairyProducts Institute, Elmhurst, IL, USA, 99-114 2006.

Plieva, F.M, Galaev, I Y, Mattiasson, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. *J. Sep. Sci.* 30, 1657– 1671, 2007.

Plieva, F.M, Oknianska, A, Degerman, E and Mattiasson, B. Macroporous gel particles as robust macroporous matrices for cell immobilization. *Biotechnol. J.* 3, 410–417, 2008.

Plieva, F.M, Savina, I.N, Deraz, S, Andersson, J, Galaev, I.Y, Mattiasson, B, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography B* 807 129–137, 2004.

Plieva, F.M, Yu, I. Galaev, Noppe, W and Mattiasson, B. Cryogel applications in microbiology *Trends in Microbiology* 16 543-551, 2008.

Podgornik, A, Barut, M & Trancar, A. Construction of Large-Volume Monolithic

Columns, *Analytical Chemistry*, 72 (22): 5693-5699, 2000.

Porath, J; Carlsson, J; Olsson, I; Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

Rankin, D & Darragh, A. Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage: What is the value of whey?, *Proceedings of the fourth international whey conference*, Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA, 13-24 2006.

Sergeev, G. B & Batyuk, V. A. Reactions in multicomponent frozen systems, *Uspekhi khimii* 45: 793-826, 1976.

Siso, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review, *Bioresource Technology*, 57: 1-11, 1996.

Smilowitz, J.T, Dillard, C.J & German, J.B. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food, *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 77-83, 2005.

Smithers, F. J, Ballard, A. D, Copeland, K. J, Dionysius, D. A, and Francis, G. L. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins, *Journal of Dairy Science*, 79: 1454-1459, 1996.

Smithers, G. W. Review: Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold', *International Dairy Journal* 18: 695-704, 2008.

Stickel, J.J & Fotopoulos, A. Pressure-Flow Relationships for Packed Beds of Compressible Chromatography Media at Laboratory and Production Scale, *Biotechnology Progress*, 17(4): 744-751, 2001.

Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1985.

Teilum, M, Hansson, M.J, Mansson, R, Surve, S, Elmer, E, Onnerfjord, P, Mattiasson, B. Binding mitochondrial to cryogelmonoliths allows detection of proteins specifically released following permeability transition, *Anal. Biochem.* 348: 209-211, 2006.

Tipton, T. A, Elliott, M. G, Cree, S. E, Sanford, A. P & Wolfe, R. R. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance

exercise, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36: 2073-2081, 2004.

Tome, D. Whey proteins and their consequences in weight control, glucose homeostasis, and insulin sensitivity, *Proceedings of the fourth international whey conference*, Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA, 70-81, 2006.

Ueda, E.K.M, Gout, P.W, Morganti, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 1-23, 2003.

Ueda, E.K.M, Gout, P.W, Morganti, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts, *Journal of Chromatography A* 922 165–175, 2001.

Ujam, L.B, Clemmitt, R. H, Chase, H. A. Cell separation by expanded bed adsorption: use of ion exchange chromatography for the separation of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Bioprocess Eng.* 23, 245–250, 2000.

Vijayalakshmi, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 71-76, 1989.

Wakabayashi, H, Yamauchi, K, Takase, M. Lactoferrin research, technology and applications, *International Dairy Journal*, 16: 1241-1251, 2006.

Yao, K, Yun, J, Shen, S, Wang, L, He, X, Yu, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109 103–110, 2006.

Yoshida, S, & Ye, X. Y. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography, *Journal of Dairy Science*, 74: 1439-1444, 1991.

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

Zemel, M. B. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 907S-912S, 2004.

CAPÍTULO 2 – Captura direta da lactoferrina de soro de queijo em coluna supermacroporosa de criogel de poliacrilamida ativada com íons de cobre

Resumo

Criogéis supermacroporosos com metal imobilizado são suportes eficazes na separação por afinidade de biomoléculas em processos *downstream*. Neste trabalho, criogel de poliacrilamida foi preparado e carregado com íons de Cu^{2+} utilizando ácido iminodiacético (IDA). Este adsorvente de afinidade foi produzido com o objetivo de capturar a proteína lactoferrina presente no soro de queijo. A matriz de criogel foi analisada por microscopia de varredura eletrônica (MEV) e caracterizada por medidas de coeficientes de dispersão axial do leito supermacroporoso em diferentes vazões, obtidos por medidas de distribuição do tempo de residência (DTR) usando o método de pulso de um traçador, capacidade de inchamento, porosidade e resistência ao escoamento. Soro de queijo ultrafiltrado foi carregado ao sistema criogel-IDA- Cu^{2+} . Os eluídos obtidos no processo cromatográfico foram submetidos a análises de proteína total, eletroforese e cromatografia de exclusão molecular. Os resultados experimentais mostraram que os coeficientes de dispersão axial, em diferentes velocidades superficiais de líquido, variaram na faixa de $10^{-6} - 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$. O criogel obteve boa permeabilidade hidráulica, $4,7086 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ e porosidade em torno de 78,2%. Os resultados mostraram, também, boa resposta da matriz de criogel-IDA- Cu^{2+} na captura da lactoferrina, sendo que o tempo de retenção dos eluidos, obtidos do processo purificação, foi semelhante ao tempo de retenção da lactoferrina na coluna de exclusão molecular, em torno de 250(s) e as bandas característica no processo de eletroforese foram detectadas. A matriz de criogel-IDA- Cu^{2+} apresenta-se como excelente sistema de captura de proteínas por cromatografia de afinidade em íons metálicos imobilizados o que a torna uma tecnologia promissora na área de bioseparações.

Palavras chaves: Purificação IMAC, Lactoferrina, Soro de queijo, Criogéis supermacroporosos.

1. Introdução

A lactoferrina do soro de queijo é uma glicoproteína de massa molar em torno de 80 kDa com um átomo de ferro ligado à molécula, além de possuir os efeitos nutricionais e fisiológicos, exerce atividade bacteriostática contra alguns microrganismos patogênicos do leite, bem como no intestino de animais que ingerem o leite. A lactoferrina é considerada uma molécula de defesa importante e tem uma diversidade de outras funções fisiológicas, tais como atividades antiviral/antimicrobiana, atividade imunomodulatória e atividade antioxidante. Durante a última década, tornou-se evidente que administrações orais de lactoferrina exerciam vários benefícios na saúde de humanos e animais, incluindo efeitos anticâncer e antiinflamatórios (Wakabayashi et al., 2006).

Todas essas características benéficas da proteína lactoferrina têm levado ao aumento do potencial de aplicação como aditivo em alimentos. Algumas pesquisas, feitas anteriormente, tiveram como objetivo a purificação da lactoferrina por cromatografia de troca catiônica (Hahn et al., 1998, Yoshida & Ye, 1991), cromatografia por afinidade a heparina-Sepharose (Blackberg & Hernell, 1980), por afinidade em peptídeos (Noppe et al., 2006) e por afinidade em heparina-poliglicidil metacrilato (Chen et al., 2007).

Colunas cromatográficas de fases contínuas conhecidas como criogéis (géis poliméricos formados em meio moderadamente congelado), tem se tornado uma tecnologia muito útil na área de bioseparação. Os criogéis foram introduzidos recentemente como uma nova matriz de separação (Lozinsky et al., 2001). Devido à estrutura de poros interconectados de grandes dimensões, o escoamento através dos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa (Hahn et al., 2002, Podgornik et al., 2000). Os criogéis apresentam-se, portanto, como um excelente material cromatográfico permitindo a captura direta de proteínas e outras biomoléculas de extratos brutos não processados ou mesmo de meios de fermentação.

A cromatografia por afinidade em íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida por Porath e colaboradores em 1975, tem se mostrado eficaz

para o isolamento de proteínas a partir de misturas não clarificadas (Feldman et al., 1994, Porath, 1992). Em IMAC utiliza-se íons metálicos quelatados tais como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , dentre outros, como ligantes de afinidade para a ligação da proteína. A cromatografia por afinidade com metais imobilizados tem sido usada em colunas contínuas supermacroporosas de criogéis de poli(acrilamida), modificadas com resíduos de ácido iminodiacético, para captura direta de enzimas de homogenizados celulares, tais como lactato desidrogenase (Arvidsson et al., 2003), urokinase (Kumar et al., 2006a, Kumar et al., 2006b), tripsina (Lysogorskaya et al., 2008), β -galactosidase (Grosova et al., 2008), Lactoferrina (Noppe et al., 2007), anticorpos monoclonais (Nilsang et al., 2007) e bacteriocinas (Deraz et al., 2007).

A aplicação de matrizes de criogel unidas à técnica por IMAC abre novas perspectivas nos processos cromatográficos de proteínas. Neste âmbito, o trabalho teve como objetivo a purificar lactoferrina do soro de queijo utilizando criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de Cu^{2+} .

2. Experimental

2.1. Materiais

Acrilamida (AAm, 99.9% grau eletroforético), *N,N'*-Metilenobisacrilamida (MBAAm, 99%), Per-sulfato de Amônio (APS, 98%), $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (98%), ácido Iminodiacético (IDA), N-2 Hidroxietil Piperazina-*N'*-2-Acido Etanosulfênico (HEPES), *N,N,N',N'*- Tetrametil-etilenodiamina (TEMED, 99%) e alil glicidil eter (AGE, 99%) foram adquiridos da Sigma- Aldrich (Steinheim, Germany). Imidazol foi adquirido da Merck (Germany). O soro de queijo ultrafiltrado (12% de sólidos totais) foi obtido pela produção de queijo minas frescal e processado em um sistema de ultrafiltração WGM com membranas de 10.000Da. Durante os experimentos foram utilizados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA), reagentes químicos de alto grau analítico e padrões de proteínas da Sigma Aldrich.

2.2. Produção das matrizes de criogel contínuo supermacroporoso

A matrizes foram produzidas segundo delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições. A síntese das matrizes referentes ao tratamento 1, 2, 3 e 4 foi realizada de acordo com Arvidsson et al., 2003, com pequenas adaptações. Monômeros de acrilamida e *N,N'*-Metilenobisacrilamida de acordo com as seguintes relações; tratamento 1: AAm/MBAAm (mol/mol) = 30:1, tratamento 2: AAm/MBAAm (mol/mol) = 20:1, tratamento 3: AAm/MBAAm (mol/mol) = 10:1, tratamento 4: AAm/MBAAm (mol/mol) = 5:1, foram dissolvidos em 30mL de água ultra pura MilliQ e a mistura foi degaseificada, usando banho ultra-som por 5 minutos para a eliminação do oxigênio solúvel. A polimerização dos radicais livres foi iniciada com a adição de TEMED e APS. Após da adição de TEMED (15 μ L) a solução foi resfriada em banho gelado (em torno de 5°C) por 2-3min. Então, APS (7,5 mg) foi adicionado e a mistura agitada por 1 min. Cinco mililitros desta mistura foram adicionados em seringas plásticas de 5mL. As soluções das seringas foram congeladas a -11°C, mantidas nesta temperatura por 24h. Após esta etapa, as colunas foram levadas em condições de temperatura ambiente para descongelamento e em seguida foram lavadas com 200 mL de água ultra pura MilliQ a uma vazão de 1 ml/min. As amostras foram secas à temperatura de 60°C até peso constante.

A formação da matriz de criogel referente ao tratamento 5 foi feita de acordo com Kumar et al., 2006. Monômeros (4, 74 g de acrilamida, 1, 27 g de MBAAm e 1,0 mL de AGE) foram dissolvidos em água deionizada MilliQ até uma concentração final de 6%. A mistura foi degaseificada, usando banho ultra-som por 5 minutos para a eliminação do oxigênio solúvel. Os géis foram produzidos por polimerização de radicais livres que foi iniciada com a adição de TEMED (95 μ L) e APS (110 mg) sob condições de refrigeração. A mistura foi adicionada em seringas plásticas (5 mL) e congelada à -12°C por 16 hs. A matriz de criogel foi lavada com 200 mL de água ultra pura MilliQ a vazão de 1 ml/min. As amostras foram secas à temperatura de 60°C até peso constante

2.3. Caracterização das matrizes de criogel

2.3.1. Capacidade de Inchamento

A capacidade de inchamento do criogel ($S_{w/w}$) foi determinada por meio da imersão das matrizes em recipientes contendo água por um intervalo de 2 horas. A cada 15 minutos os recipientes foram agitados manualmente e de forma lenta. Em seguida, retirou-se o excesso de água das matrizes e então obteve-se o peso úmido (m_w) das mesmas. As matrizes foram secas à 60°C até peso constante, as massas das amostras secas (m_d) foram determinadas e a capacidade de inchamento foi calculada pela Equação 1.

$$S_{w/w} = (m_w - m_d) / m_d \quad (1)$$

Onde $S_{w/w}$ é a capacidade de inchamento (g H₂O/ g de gel seco) e m_w e m_d são as massas (g) da amostra em peso úmido e seco, respectivamente.

2.3.2. Porosidade

A porosidade do monólito de criogel foi estimada através da medição do teor de água livre e do volume de monólito (Yao et al, 2006). Uma amostra de cerca de 3 cm de comprimento foi cortada a partir do meio do monólito de criogel e saturada com água deionizada. Em seguida, a amostra foi imersa em uma proveta contendo água deionizada de volume V_1 , previamente conhecido, e, após a imersão da amostra na proveta o novo volume, V_2 , foi determinado. O volume da amostra V_0 foi calculado pela diferença do volume, ou seja, $V_0 = V_2 - V_1$. A massa da amostra úmida saturada com água, m_w , foi pesada. A amostra foi comprimida para remover a água livre dentro dos poros grandes, do mesmo modo como o procedimento relatado em Yao et al., (2006), e a massa da amostra, sem água livre, m_s foi pesada. A porosidade foi, então, calculada pela Equação 2.

$$\varphi = \frac{m_w - m_s}{\rho_w V_0} \quad (2)$$

Onde ρ_w é a densidade da água deionizada. Em seguida, a amostra foi seca em uma estufa a 60 °C até que se atingisse peso constante. A massa seca m_d foi então determinada e utilizada para calcular a fração total de água, ou seja,

$$m_w = m_d / p_w V_o$$

2.3.3. Resistência ao escoamento

Um sistema cromatográfico de alta eficiência (Shimadzu, Japão) foi usado para efetuar as medidas. A resistência ao escoamento apresentada pela coluna foi avaliada através da relação da queda de pressão hidrostática através da coluna versus a vazão da fase móvel. A permeabilidade hidráulica, k_w , foi determinada segundo a lei de Darcy de acordo com a seguinte equação:

$$k_w = \frac{Q_w \mu_w L}{\Delta p_w A} \quad (3)$$

onde Q_w é a vazão de água através da coluna, μ_w a viscosidade da água, L o comprimento da coluna, A é a área da secção transversal e Δp_w é a queda de pressão.

Água deionizada passando pela coluna em diferentes vazões (0,1-5mL/min) e o ΔP em cada vazão foram medidas e usadas no cálculo da permeabilidade hidráulica.

2.3.4. Dispersão axial

Um sistema cromatográfico de alta eficiência (Shimadzu, Japão) foi usado para efetuar as medidas. A dispersão axial no leito foi avaliada através da medida da distribuição do tempo de residência (DTR) usando o método de pulso de um traçador sob diferentes taxas de fluxo. Este estudo se baseia no escoamento de um traçador e na análise da distribuição de idade de saída (E) ou distribuição de tempo de residência (DTR) do fluido. O termo idade, nesse

caso, é usado para representar o intervalo de tempo que um elemento da corrente de fluido permaneceu dentro da coluna.

A dispersão axial foi medida da seguinte maneira; água deionizada foi bombeada através da coluna a uma vazão constante. Um pulso de traçador (0, 15 mL de acetona a 3% v/v) foi injetado na coluna e a resposta correspondente na saída da coluna foi medida por um detector de absorvância na região do UV 280nm. Os dados registrados para os diferentes valores de vazão do líquido foram usados para o cálculo do DTR. O coeficiente de dispersão axial foi determinado através da variância e do tempo de residência médio da curva de DTR correspondente (Yao et al., 2006), de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} = 2\left(\frac{D_{ax}}{\nu L}\right) - 2\left(\frac{D_{ax}}{\nu L}\right)^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{\nu L}{D_{ax}}\right)\right] \quad (4)$$

onde σ_t^2 e \bar{t} são a variância e o tempo de residência médio da curva de RTD, D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial, L é o comprimento da coluna e u é a velocidade intersticial do fluido através da coluna ($\nu = U_L / \phi$, ϕ é a porosidade do leito e U_L a velocidade superficial do líquido). O número de pratos teóricos (N) foi calculado a partir dos resultados da DTR e os valores da altura equivalente a um prato teórico (HETP) calculado com o comprimento da coluna (Yao et al., 2006). Um termo adimensional, o número Bodenstein ($Bo = \nu L / D_{ax}$), razão entre o transporte convectivo pelo transporte dispersivo (Bruce e Chase, 2001), foi calculado e usado para descrever a eficiência e o grau de dispersão na coluna de criogel.

2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Amostras secas das matrizes de cada tratamento foram coladas com fitas adesivas no suporte de porta-amostras do microscópio (*stub*). Em seguida, as amostras foram levadas ao metalizador (*Balzers Union FDU 010*) e submetidas ao processo de metalização com uma fina camada de ouro de 15 a 25 nm, com a finalidade de tornar as amostras boas condutoras elétricas (Silveira, 1989). A cobertura ultrafina foi depositada por evaporação a alto

vácuo na amostra. Isto é feito para prevenir a acumulação de campos elétricos estáticos nas amostras devido à irradiação elétrica durante a produção da imagem. Outra razão para a metalização é que mesmo quando há condução mais do que suficiente ela melhora o contraste. Por fim, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP), com aumentos de 200 X a 15.000 X.

2.5. Ativação dos criogéis com íons metálicos

Nesta etapa pretendeu-se estudar a retenção dos íons de cobre na matriz de criogel. Para isso foi retirada uma amostra do primeiro tratamento descrito no item 2.2.

Solução de Na_2CO_3 (50 mL, 0,5 M) foi bombeada através do criogel a uma vazão de 1 mL/min, seguida da solução de Na_2CO_3 1 M (50 mL) na mesma vazão. A solução de IDA (0,5 M em 1,0 M de Na_2CO_3 , pH 10,0) foi aplicada na coluna a uma vazão de 1 mL/min em modo de refluxo, durante 24 h à temperatura ambiente. Após isto, o gel modificado foi lavado com Na_2CO_3 0,5 M (100 mL) e em seguida com água deionizada até pH 8,0. Solução de 0,1 M de sulfato de cobre (30 mL dissolvidos em água deionizada) foi bombeada pela coluna em modo de refluxo a uma vazão de 1 mL/min, durante 2 h para a ligação do metal na matriz. Finalmente, o criogel foi lavado com água deionizada para remover o metal não ligado e, em seguida, com tampão de imidazol (15 mM em HEPES e 0,2 M de NaCl, pH 7,0) para remoção do metal fracamente ligado.

2.6. Captura cromatográfica de lactoferrina de soro de queijo

A captura da lactoferrina foi realizada de acordo com Cheeks e colaboradores (2008), com algumas modificações. Um volume do soro de queijo ultrafiltrado (20 mL) foi inserido na coluna cromatográfica (HR5/5 Pharmacia Biotech), contendo o criogel imobilizado com íons de Cu^{2+} previamente equilibrado com 6 volumes de coluna (VC) do tampão de equilíbrio (20mM HEPES em 200mM de NaCl), a uma vazão de 1 mL/min. Após a

passagem do soro ultrafiltrado, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (8VC). A eluição da proteína adsorvida foi feita pela aplicação de 4VC de tampão imidazol (200mM, pH 7,4) a 1 mL/min. As frações de proteína coletadas na saída da coluna, durante a etapa de eluição foram liofilizadas e seguiram para as determinações analíticas em termos de concentração de proteína total, eletroforese em gel e cromatografia de exclusão molecular.

2.6.1. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas das frações cromatográficas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino, BSA (Sigma, EUA), como proteína de referência.

2.6.2. Eletroforese SDS-PAGE

As frações protéicas obtidas nas etapas de adsorção, lavagem e eluição da cromatografia IMA foram analisadas e comparadas com padrões de proteínas do soro de queijo, por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Sigma Chemical (modelo Z35,280-2), em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%. Todas as amostras foram tratadas com tampões contendo SDS e β -mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. Alíquotas de 10 a 15 μ L de cada amostra foram aplicadas ao gel que foi submetido a uma voltagem de 180V, em cuba horizontal e colorido com azul de cromassie.

2.6.3. Cromatografia de filtração em gel

O fracionamento das proteínas por cromatografia de filtração em gel (exclusão molecular) foi conduzida em coluna Agilent ZORBAX (Bio Series GF-450), sendo equilibrada inicialmente com 4 VC de tampão 0,2M fosfato Na₂HPO₄ em 0,8M de NaCl e 5% de metanol, pH 8,5 a uma vazão de 1 mL/min. Amostra proveniente da eluição da proteína do IMAC-criogel (50 μ L) foi injetada junto com o tampão na coluna, a uma vazão de 1 mL/min. O eluente foi monitorado por detecção no UV a 280

nm. A identificação da proteína foi feita de acordo com uma curva de calibração, anteriormente confeccionada, por meio da aplicação de padrões das principais proteínas encontradas no soro de queijo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Preparo e caracterização dos criogéis sob diferentes concentrações de monômeros e a presença de AGE

O criogel contínuo supermacroporoso é um adsorvente esponjoso e elástico. O cilindro de adsorvente pode ser removido e colocado de volta em uma coluna (Figura 1a e 1b). A remoção é feita simplesmente retirando o excesso de líquido e, em seguida, com uma leve pressão entre a parede interior da seringa e o gel. Cerca de 4 ml de água pode ser extraído de 5 ml de gel, que corresponde ao fluxo estimado através do volume de poros. O adsorvente pode ser seco e hidratado sem perder suas propriedades.



(a)



(b)

Figura 1 – (a) Coluna contínua supermacroporosa, (b) adsorvente removido da coluna.

A microscopia de varredura eletrônica dos criogéis (Figura 2) demonstra claramente a diferença entre os diversos tratamentos aplicados na confecção das matrizes, além da presença de poros largos 10-100 μ m interconectados de parede lisa e espessa. Com a mudança na relação AAm/MBAAm nos tratamentos de 1 a 4 (Figura 2) percebeu-se uma mudança na estrutura dos poros. À medida que essa relação diminui, os poros se tornaram mais finos.

O criogel formado com grupos epóxi (Figura 2e), quando comparado aos outros tratamentos, possui visível diferença em sua estrutura externa e interna. A palavra epóxi vem do grego “EP”(sobre ou entre) e do inglês “OXI”(oxigênio), literalmente o termo significa oxigênio entre carbonos. A polaridade desses grupos serve para criar forças de interação entre a molécula epóxi e a superfície adjacente a ela. Os monólitos obtidos nesse tratamento com AGE se mostraram com maior resistência e melhor manuseio devido a sua estrutura mais firme. Como consequência da polaridade dos grupos éteres e hidroxilas alifáticas que, frequentemente, constituem a cadeia da matriz inicial e a rede do sistema curado.

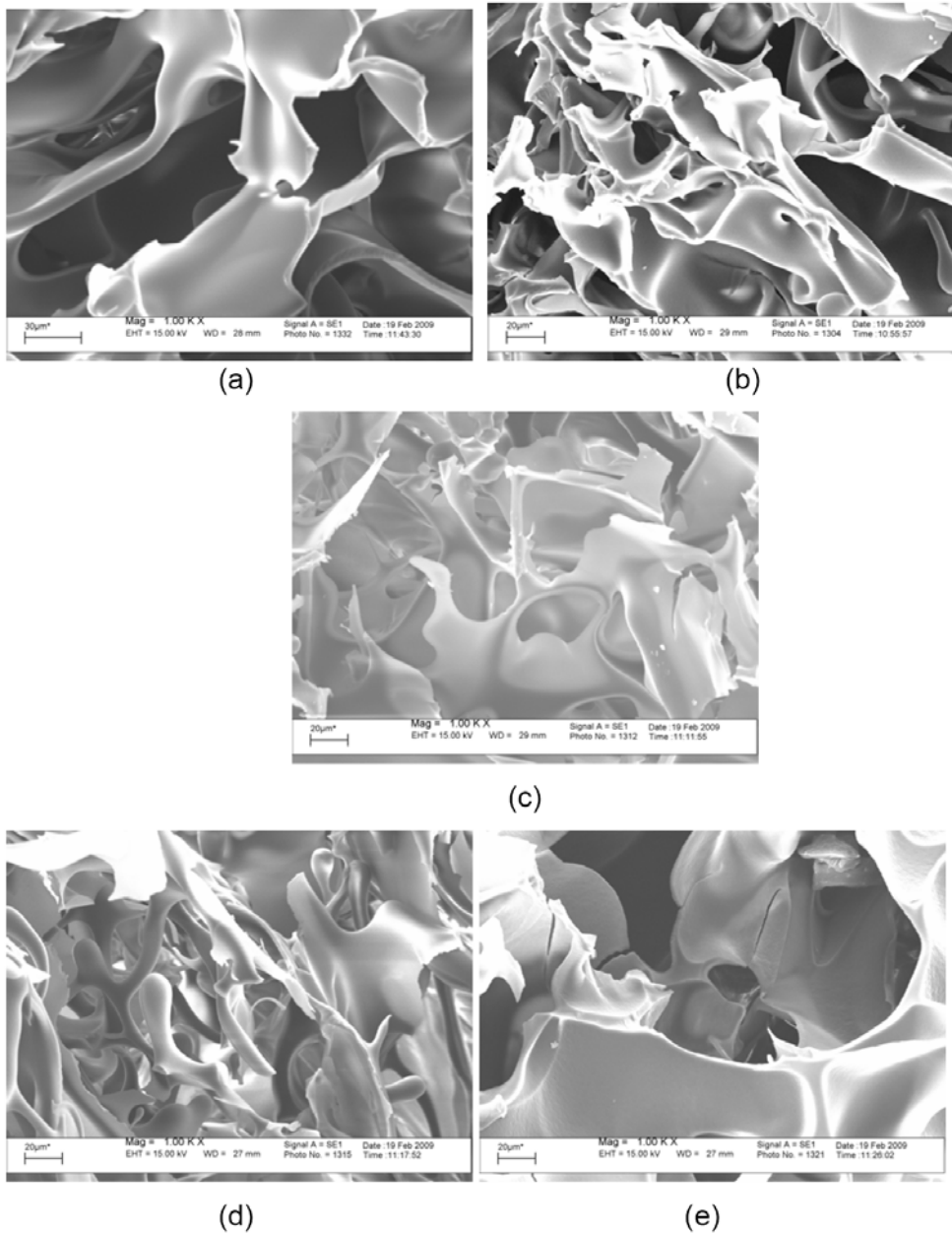


Figura 2. Imagens de MEV de matrizes de criogel sintetizadas variando a concentração de monômeros: (a) AAm/MBAAm = 30:1, (b) AAm/MBAAm = 20:1, (c) AAm/MBAAm = 10:1, (d) AAm/MBAAm = 5:1 e (e) AAm/MBAAm = 30:1 +AGE.

A capacidade de inchamento das matrizes submetidas nos diferentes tratamentos de síntese é apresentada na Figura 3.

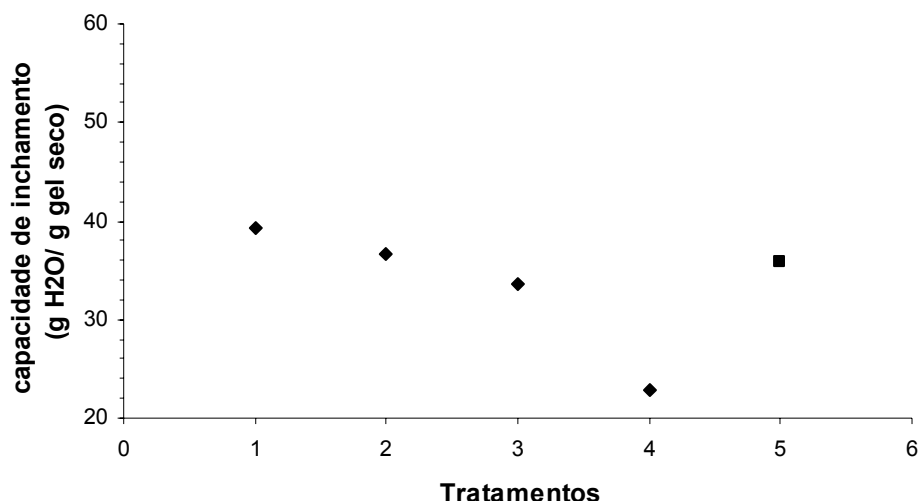


Figura 3. Capacidade de inchamento S_{ww} dos criogéis (losango) preparados por criopolimerização por 24 h a -11°C : Tratamento 1) AAm/MBAAm = 30:1, 2) AAm/MBAAm = 20:1, 3) AAm/MBAAm = 10:1, 4) AAm/MBAAm = 5:1 e criogel contendo grupo epóxi (quadrado) preparado por criopolimerização por 16 h a -12°C : Tratamento 5) AAm/MBAAm = 30:1 +AGE

Observa-se que a capacidade de inchamento nos tratamentos isentos de AGE diminui com a relação AAm/MBAAm. Enquanto a AAm é a responsável pela linearidade das cadeias, a MBAAm fornece as ligações cruzadas na etapa de polimerização. Assim, quanto mais próxima for a relação AAm/MBAAm, mais a estrutura formada foi compacta refletindo em uma capacidade de inchamento menor. Pela Figura 3, observa-se também, que a matriz contendo grupos epóxi, obteve valor intermediário de capacidade de inchamento, quando comparada com os demais tratamentos. A estrutura mais rígida observada nesse tratamento pode ter contribuído para tal resultado. A avaliação da capacidade de inchamento é uma medida de expansão da matriz de criogel. Assim, para as análises posteriores, optou-se por escolher matrizes de criogel que não obtivessem valores altos de capacidade de inchamento. Quanto maior esse valor, mais maleáveis são as matrizes (após inchamento) e, provavelmente, menores pressões suportariam.

As porosidades dos criogéis monolíticos, φ , encontram-se na Tabela 1. Os resultados indicam que os criogéis contendo grupos epóxi, vindo do alil glicidil eter (AGE), possuem também, valor intermediário de porosidade comparado aos demais tratamentos.

Tabela 1 – Valores de porosidade e fração total de água dos monólitos de criogéis dos cinco tratamentos.

Tratamentos	AAm/MBAAm = (30:1)	AAm/MBAAm = (20:1)	AAm/MBAAm = (10:1)	AAm/MBAAm = (5:1)	AAm/MBAAm = (30:1) + AGE
Porosidade (%)	88,3	86,9	75,4	71,2	78,2
Fração total de água (v/v)	97,5	94,4	91,8	90,4	92,8

Os resultados encontrados estão próximos aos resultados obtidos por outros autores (Arvidsson et al., 2003, Kumar et al., 2003, Persson et al., 2004, Jungbauer et al., 2004, Plieva et al., 2004, Dainiak et al., 2004, Williams et al., 2005, Paredes et al., 2004). O conteúdo de água total no monólito de criogel escolhido para a purificação da proteína, o tratamento com AGE, foi de 92,8% (v/v). Assim, aproximadamente 14,6% da água total ficaram presas pela matriz de polímero e pelos poros pequenos por onde quase nenhum fluido corrente passa.

Os resultados experimentais da resistência ao escoamento são mostrados na Figura 4. A permeabilidade da água obtida k_w no leito do criogel monolítico foi $4,7086 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Este valor foi superior aos de outros autores relatados para monólitos poliméricos orgânicos ($1,812 \times 10^{-14} \text{ m}^2$) (Yao et al., 2006).

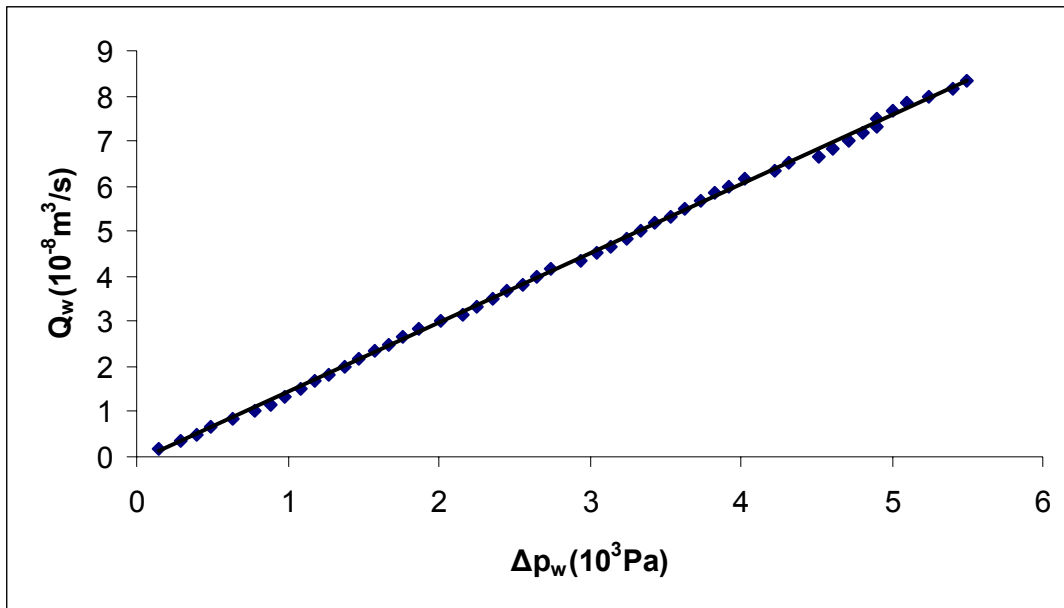


Figura 4 – Vazões experimentais e teóricas como uma função da queda de pressão na coluna de criogel contendo grupos epóxi ($\mu_w = 1,0030 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$, $L = 6,0 \times 10^{-2} \text{ m}$). (♦) dados experimentais e (-) dados teóricos.

A distribuição do tempo de residência (DTRs) no criogel foi medido em velocidades superficiais de líquido de 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 cm / min, respectivamente. A Figura 5 exibe as DTRs em algumas velocidades superficiais de líquido. Como se pode observar, as curvas de DTR espalham a sua forma com a diminuição da velocidade de escoamento do líquido. Com o aumento da velocidade do líquido, a dispersão convectiva no interior dos poros no leito do criogel foi reforçada, o que, correspondentemente, induziu o aumento da dispersão axial.

Coefficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de líquido foram calculados, segundo a Equação 4, e os resultados são mostrados na Figura 6. Pode-se observar que os coeficientes de dispersão axial, nas presentes condições estão na faixa de 10^{-6} a $10^{-5} \text{ m}^2 / \text{s}$.

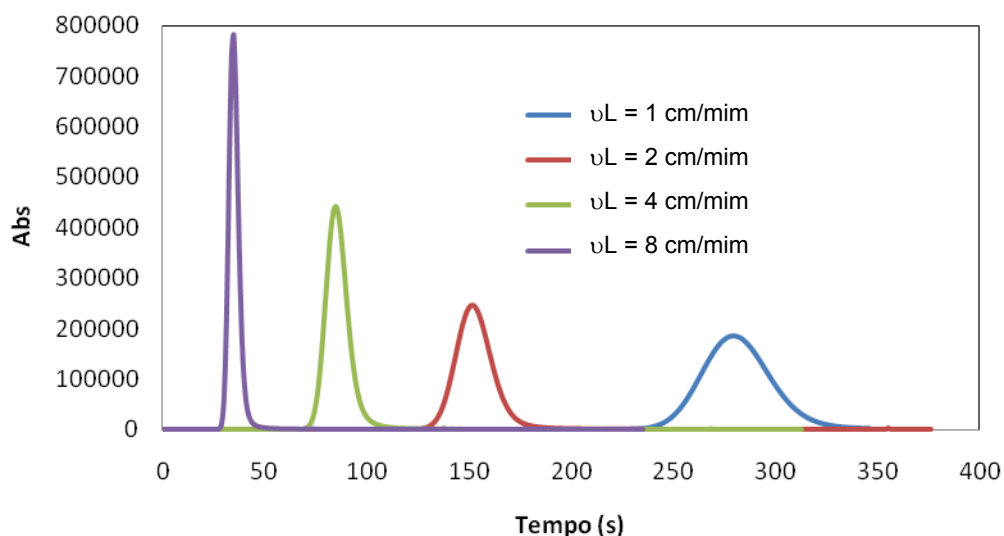


Figura 5 – Curvas de distribuição do tempo de residência em algumas velocidades superficiais de líquido na matriz de criogel-IDA-Cu²⁺.

Os valores obtidos de altura equivalente a um prato teórico (HEPT) da RTDs estão na faixa de 0,61-0,77 mm, que são semelhantes aos relatados em Yao et al.(2006) que foram de 0,56-0,75. Esses autores caracterizaram matrizes de criogel contínuo supermacroporoso contendo nanopartículas magnéticas. Os valores obtidos do coeficiente de dispersão axial encontrados foram inferiores aos obtidos em leitos expandidos ou leitos fluidizados sob as condições de escoamento similares (Yun et al., 2004, Yun et al., 2005, Ghoreishi et al., 2004). Uma explicação para tal resultado se deve ao fato de que nesses tipos de leito, a fase móvel mantém em suspensão as partículas do adsorvente, aumentando suficientemente a porosidade do leito, permitindo assim, que o fluido passe pela coluna sem aumentar a resistência ao escoamento. Portanto, a dispersão do líquido dentro da coluna criogel é fraca, nas presentes condições de medição. A partir da Figura, observa-se também que o coeficiente de dispersão axial aumenta com o aumento da velocidade do líquido.

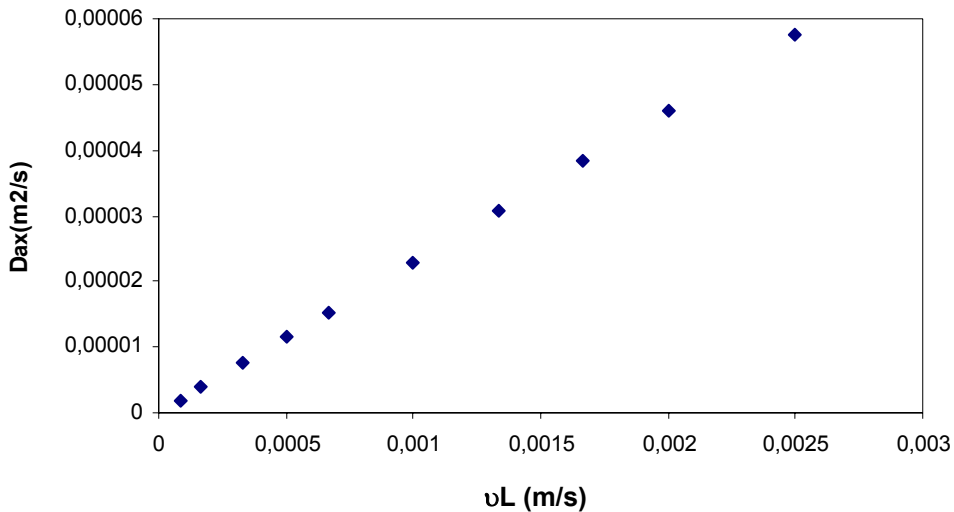


Figura 6 – Coeficientes de dispersão axial em diferentes velocidades superficiais de fluxo na coluna de criogel.

Números de Bodenstein foram calculados e os resultados encontram-se na Figura 7. Houve uma tendência constante nas várias velocidades superficiais de líquido no leito do criogel. Esse comportamento foi semelhante, porém com valores inferiores, aos relatados por Yao et al.(2006) (em torno de $Bo=100$) em algumas condições de velocidades superficiais, o que indica uma mistura mais fraca do leito de criogel em estudo, culminando em um menor grau de dispersão na coluna.

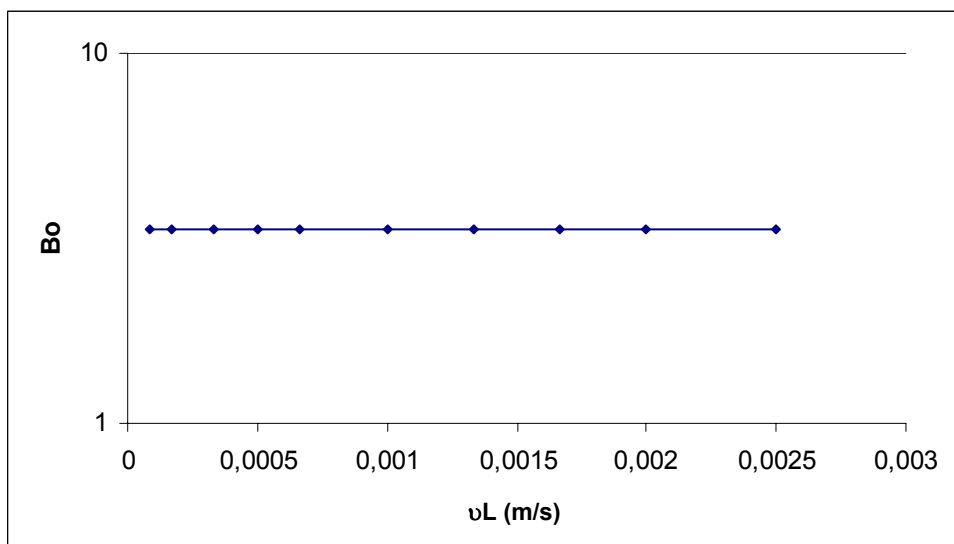


Figura 7 – Números de Bodenstein em várias velocidades superficiais de líquido no leito do criogel produzido na presença de grupos epóxi.

3.2. Microscopia do criogel ativado

Pontos com luminosidade perceptível podem ser visto nas imagens de microscopia eletrônica de varredura da matriz de criogel ativada (Figura 8).

Quando um agente quelante, IDA, é immobilizado em uma matriz sólida por ligações covalentes, um íon metálico que venha a ser quelatado origina um centro de adsorção, apresentando sítios livres para interação com biomoléculas. Assim, os pontos luminosos na superfície dos poros da Figura 8, provavelmente são íons de cobre immobilizados na matriz via espaçador IDA. Resultado parecido foi encontrado por Arvidsson et al. (2003), ao estudar a captura de enzimas utilizando matrizes de criogel immobilizado com Cu^{2+} e Wang et al. (2008) ao estudar a aplicabilidade de matrizes de criogel immobilizadas com Zn^{2+} (criogéis-IDA- Zn^{2+}) na adsorção da proteína albumina do soro bovino.

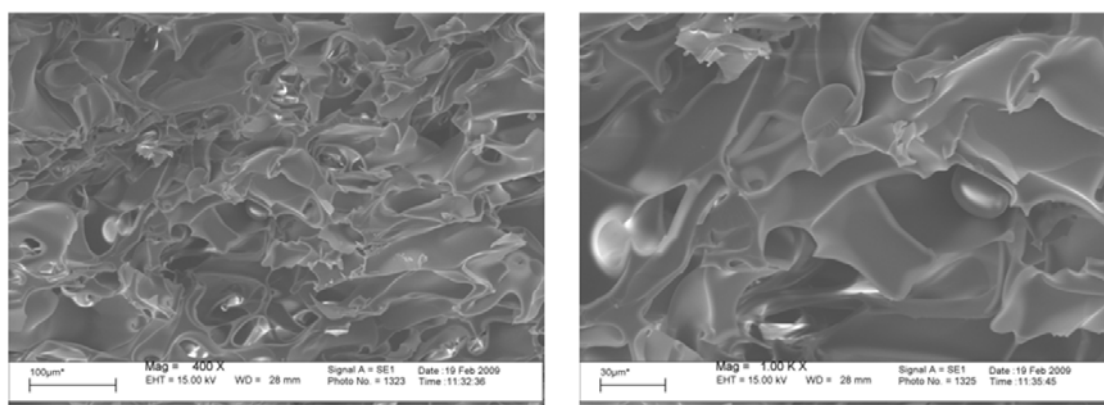


Figura 8 - Imagens de MEV de criogel-IDA- Cu^{2+} .

3.3. Purificação de lactoferrina de soro de queijo por IMAC em criogel-IDA- Cu^{2+} .

A Tabela 2 apresenta os tempos de retenção das principais proteínas do soro de queijo (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, BSA, GMP e Lactoferrina) e dos eluídos obtidos do soro ultrafiltrado após ser carregado em criogel-IDA- Cu^{2+} . Pode ser observada a diferença entre os tempos de retenção referente a cada padrão de proteína, em decorrência da diferença do peso molecular das mesmas. Observa-se ainda, a semelhança entre os tempos de retenção da

lactoferrina (padrão) e dos eluídos obtidos do processo cromatográfico de purificação, o que implica na presença de lactoferrina nos eluídos coletados.

Tabela 2 – Tempos de retenção de proteínas padrões e eluídos (obtidos da purificação da lactoferrina em Criogel-IDA-Cu²⁺ usando soro de queijo ultrafiltrado).

Amostra	Tempo de Retenção* (s)
Lactoferrina	250
BSA	283
GMP	315
Alfa-lactoalbumina	327
Beta-lactoglobulina	339
Eluído I	248
Eluído II	248

* Coluna Agilent ZORBAX (Bio Series GF-450), equilibrada com tampão 0,2M fosfato Na₂HPO₄ em 0,8M de NaCl e 5% de metanol, pH 8,5 a uma vazão de 1 mL/min.

Neste trabalho, foi utilizado o cobre como íon para interação com a proteína. Este íon metálico foi selecionado com base nos estudos de Sulkowski, 1989, que demonstrou que a força de retenção em IMAC, de proteínas com histidinas acessíveis em sua superfície (como no caso em estudo), seguem a seguinte ordem: Cu⁺² > Ni⁺² > Zn⁺² = Co⁺². Confirmações podem ser encontradas em trabalhos de alguns autores como o de Plieva et al. (2004) que usaram criogel-IDA-Cu²⁺ na purificação de biopartículas e obtiveram excelentes resultados. O sistema tamponante empregado no trabalho foi HEPES-imidazol, uma vez que, segundo Wang et al., 2008, promove melhor seletividade para o sistema criogel-IDA-Cu²⁺.

Para a determinação da pureza da proteína, a análise SDS-PAGE das frações eluídas do criogel-IDA-Cu²⁺ revelou que a lactoferrina foi adsorvida pelo ligante (Cu²⁺) (Figura 9). A banda densa em torno de 80kDa foi encontrada nas faixas dos eluídos (F e G), esse resultado confirma a pureza da proteína purificada como sendo a lactoferrina de 80kDa encontrada no soro de queijo. Comportamentos semelhantes foram encontrados por Billakanti et al. (2009). Os pesquisadores estudaram a aplicabilidade de criogéis para a extração de

proteínas do leite bovino por interação de troca catiônica. Os resultados encontrados pelos pesquisadores mostraram-se promissores

Segundo Billakanti (2009), os monólitos de criogel possuem aproximadamente 25 vezes menor capacidade dinâmica de ligação em comparação, por exemplo, com um leito comercial de esferas SP Sepharose. No preparo do criogel, os poros obtidos ocupam cerca de 80% do volume total da coluna. Assim, a área superficial disponível para a ligação com proteínas é inferior comparada a outros sistemas de adsorção. Altas vazões e grandes volumes de carregamento foram alcançados nos criogéis, mas o principal desafio no desenvolvimento desses materiais reside na melhoria das capacidades de ligação. Outros fatores, tais como baixo custo do material e a grande variedade de grupos funcionais disponíveis para ligação sugerem que os criogéis sejam um meio alternativo para a extração de proteínas secundárias do leite e do soro.

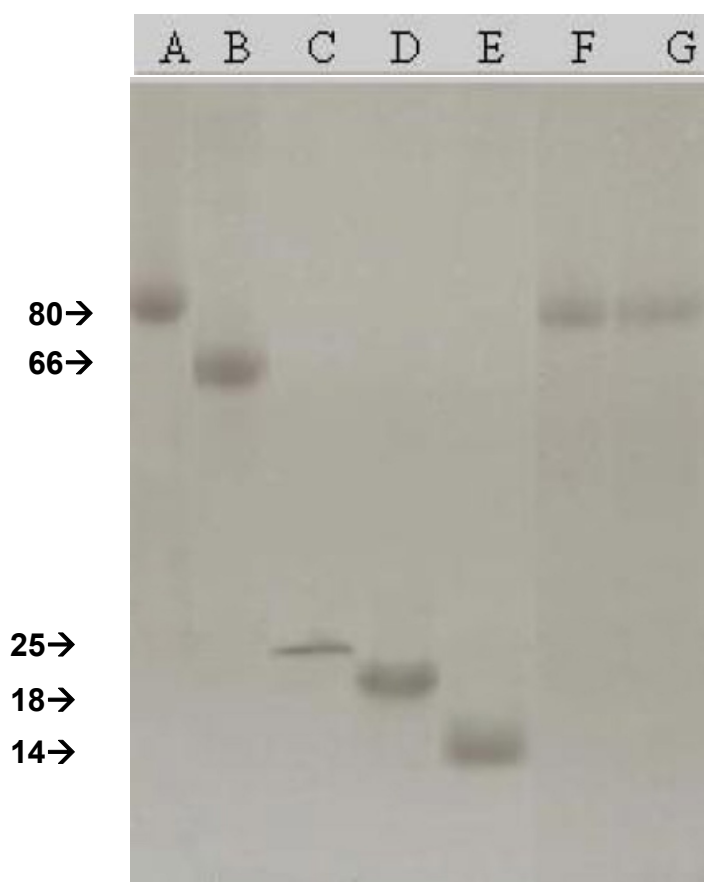


Figura 9 – SDS-PAGE 7,5% (corrida em 180V): (A) lactoferrina (10mg/mL), (B) BSA(5mg/mL), (C) GMP(10mg/mL), (D) β -lactoglobulina(10mg/mL), (E) α -lactoalbumina (10 mg/mL), (F) Eluido I, (G) Eluido II.

A cromatografia por afinidade em íons metálicos imobilizados (IMAC) foi utilizada para a separação de diferentes tipos de células microbianas, uma vez que estas, quando possuíam resíduos de histidina acessíveis, apresentavam a capacidade de serem adsorvidas em criogel-IDA-Cu²⁺ (Dainiak et al., 2005). Proteínas que contêm naturalmente resíduos de histidinas acessíveis (recombinantes ou não) e apresentam importância comercial no campo terapêutico e diagnóstico, como proteínas do soro humano (Porath, 1983), imunoglobulinas (Ribeiro et al., 2008), e hormônio de crescimento humano (Liesiene et al., 1997), foram purificadas por IMAC utilizando os metais de transição Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ e Co²⁺ imobilizados. Outros íons metálicos, diferentes dos metais de transição, tais como Al³⁺, Ca²⁺ e Yb³⁺, foram empregados para purificação de transferrina, albumina, α2-macroglobulina e γ-globulinas, alcançando-se elevadas seletividades, mostrando-se uma alternativa atrativa para o fracionamento seletivo de proteínas do soro humano (Zachariou 2000).

A afinidade entre proteínas e íons metálicos imobilizados pode ser também explorada em outras técnicas, diferentes da cromatografia. Dentre as várias técnicas utilizando quelatos metálicos imobilizados, pode-se citar, como exemplos de separação de células, proteínas e ácidos nucleicos, a partição em duas fases aquosas por afinidade (Sila & Franco, 2000), a precipitação por afinidade (Tan et al., 2007), e a técnica de eletroforese de afinidade (Anissimova et al., 2006).

4. Conclusões

O tamanho e a morfologia dos poros de criogéis supermacroporosos preparados pela crio-copolimerização de monômeros de acrilamida sob condições de congelamento foram influenciados pela variação na relação da concentração dos monômeros acrilamida e bis-acrilamida e a presença/ausência do grupo epóxi (doados pelo reagente alil glicidil eter). Os criogéis contendo grupo epóxi obtiveram, visualmente, melhor morfologia dos poros, valores de porosidade e capacidade de inchamento intermediários, porém maior firmeza na estrutura. Estes criogéis apresentaram, também, alta

permeabilidade líquida e baixo coeficiente de dispersão axial em uma larga faixa de velocidade.

No que se refere à purificação da lactoferrina, uma característica interessante deste estudo é que essa proteína demonstrou boa afinidade de ligação com o cobre. Isso provavelmente pode ser explicado pela presença dos resíduos de histidina presentes em sua superfície. A adsorção de proteínas por IMAC é determinada principalmente pela presença de seus resíduos expostos na superfície. Fatores como acessibilidade, microambiente do resíduo de ligação (isto é, histidina, cisteína e triptofano), cooperação entre grupos vizinhos e conformações locais desempenham papel importante na retenção de proteína. No caso de íons de cobre, a adsorção ocorre através de um único resíduo de histidina. A estrutura primária da lactoferrina possui 2 resíduos de histidina. Essa pode ser então, a justificativa para a boa retenção da lactoferrina no criogel-IDA-Cu²⁺. A matriz criogel-IDA-Cu²⁺ mostrou-se assim promissora na separação e purificação da lactoferrina do soro de queijo.

5. Referências bibliográficas

Anissimova, M. V, Baek, W. O, Varlamov, V. P, Mrabet, N. T, Vijayalakshmi, M. A. Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure--function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels. *J. Mol. Recognit.*, 19, 287, 2006.

Arvidsson, P, Plieva, F. M, Lozinsky, V. I. Galaev I. Y, Mattiasson B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *Journal of Chromatography A* 986, 275–290, 2003.

Arvidsson, P, Plieva, F. M, Savina, I. N, Lozinsky, V. I, Fexby, S, Bülow, L, Galaev, I. Y and Mattiasson, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A* 977, 27–38, 2002.

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.

Blackberg, L and Hernell, O. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step, *FEBS Letters*, 109: 180 184, 1980.

Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248 254, 1976.

Bruce, L.J. Chase, H.A. Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chemical Engineering Science* 56, 3149, 2001.

Cheeks, M.C, Kamal, N, Sorrell, A, Darling, D, Farzaneh, F, Slater, N.K.H. Immobilized metal affinity chromatography of histidine-tagged lentiviral vectors using monolithic adsorbents. *Journal of Chromatography A*,13 2705–2711 2008.

Chen, C. Guo, Y. Guan and Liu, H. Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Separation and Purification Technology*, 56: 168 174, 2007.

Dainiak, M.B et al. Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns. *Biotechnol. Prog.* 21, 644–649, 2005.

Dainiak, M.B, Kumara, A, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B. Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A* 1045 93–98, 2004.

Deraz, S, Plieva, F. M, Galaev, I. Y, Karlsson, E. N, Mattiasson, B. Capture of bacteriocins directly from non-clarified fermentation broth using macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 786 793, 2007.

Feldman, P.A, Bradbury, P.I, Williams, J.D, Sims, G.E, McPhee, J.W, Pinnell, M.A, Harris, L, Crombie, G.I, Evans, D.R, Blood Coagul. Fibrinolysis 5 939 1994.

- Ghoreishi, S.M, Akgerman, A. Innovative strategies for engineering mannitol production. *Sep. Purif. Technol.* 39, 39 2004.
- Grosova, Z, Rosenberg, M, Rebros, M, Sipocz, M and Sedlackova, B. Entrapment of β -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel, *Biotechnology Letters*, 30: 763 767, 2008.
- Hahn, R, Panzer, M, Hansen, E, Mollerup, J and Jungbauer, A. Mass transfer properties of monoliths, *Separation Science and Technology*, 37(7): 1545 1565, 2002.
- Hahn, R, Schulz, P.M, Schaupp, C and Jungbauer, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*, 795(2): 277 287, 1998.
- Jungbauer, A, Hahn, R. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *J. Sep. Sci.* 27, 767–778 2004.
- Kumar, A, Bansal, V, Arvidsson, P, Roychoudhury, P.K, Mattiasson, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line, *Journal of Chromatography A* 1103 35–42, 2006.
- Kumar, A, Bansal, V, Nandakumar, K. S, Galaev, I. Y, Roychoudhury, P. K, Holmdahl, R, Mattiasson, B. Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices, *Biotechnol. Bioeng.* 93, 636–646, 2006.
- Kumar, A, Plieva, F.M, Galaev, I. Y and Mattiasson, B. Affinity fractionation of lymphocytes using supermacroporous monolithic cryogel. *J. Immunol. Methods* 283, 185– 194, 2003.
- Kumar, A, Rodriguez-Caballero, A, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Nandakumar, K.S, Kamihira, M, Holmdahl, R, Orfao, A, Mattiasson, B. Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: effect of ligand coupling and matrix architecture, *J. Mol. Recognit.* 18 84–93, 2005.

Liesiene, J, Racaityte, K, Morkeviciene, M, Valancius, P, Bumelis, V. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone, Effect in ligand densit. *J. Chromatogr., A*, 764, 27, 1997.

Lozinsky, V.I, Galaev, I.Y, Plieva, F.M, Savina, I.N, Jungvid, H and Mattiasson, Bo. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *TRENDS in Biotechnology* Vol.21 No.10 445-451, 2003.

Lozinsky, V.I, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10(4-5): 163 188, 2001.

Lozinsky, V.I, Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 57, No. 5, pp. 1015—1032, 2008.

Lozinsky, V.I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and areas of implementation. *Russ. Chem. Rev.* 71, 489–511, 2002.

Lysogorskaya, E. N, Roslyakova, T.V, Belyaeva, A. V, Bacheva, A.V, Lozinskii, V.I. and Filippova, I.Y. Preparation and Catalytic Properties of Trypsin Immobilized on Cryogels of Polyvinyl Alcohol, *Applied Biochemistry and Microbiology*,44(3): 241 246, 2008.

Nilsang, S, Nandakumar, K.S, Galaev, I. Y, Rakshit, S.K, Holmdahl, R, Mattiasson, B and Kumar, A. Monoclonal Antibody Production Using a New Supermacroporous Cryogel, Bioreactor, *Biotechnology Progress*, 23(4): 932 939, 2007.

Noppe, W, Plieva, F. M, Vanhoorelbeke, K, Deckmyn, H, Tuncel, M, Tuncel, A, Galaev, I. Y and Mattiasson, B. Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds, *Journal of Biotechnology*, 131(3): 293 299, 2007.

Noppe, W, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Vanhoorelbeke, K, Mattiasson, B and Deckmyn, H. Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands purification of lactoferrin from defatted milk, *Journal of Chromatography A*,

1101: 79 85, 2006.

Paredes, B, González, S, Rendueles, M, Díaz, J.M. Chromatographic separation at a preparative scale of egg white ovalbumin and its application in the elaboration of yogurt mousse. *Sep. Purif. Technol.* 40, 243, 2004.

Persson, P, Baybak, O, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B, Nilsson, B, Axelsson, A. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 224, 2004.

Plieva, F.M, Andersson, J, Galaev, I.Y, Mattiasson, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns, *J. Sep. Sci.* 27 828–836, 2004.

Plieva, F.M, Galaev, I Y, Mattiasson, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. *J. Sep. Sci.* 30, 1657– 1671, 2007.

Plieva, F.M, Oknianska, A, Degerman, E and Mattiasson, B. Macroporous gel particles as robust macroporous matrices for cell immobilization. *Biotechnol. J.* 3, 410–417, 2008.

Plieva, F.M, Savina, I.N, Deraz, S, Andersson, J, Galaev, I.Y, Mattiasson, B, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography B* 807 129–137, 2004.

Plieva, F.M. et al. Novel supermacroporous dextran gels. *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 17, 1075–1092, 2006.

Podgornik, A, Jancar, J, Merhar, M, Kozamernik, S, Glover, D, Cucek, K, Barut, M, Strancar, A. Large-scale methacrylates monolithic columns: design and properties. *J. Biochem. Biophys. Methods* 60, 179 2004.

Porath, J, Carlsson, J, Olsson, I, Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598,1975.

Porath, J, Olin, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of Biomaterials. Serum protein affinities for

- geimmobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 22, 1621-1630, 1983.
- Porath, J. Protein purification on immobilized metal affinity resins effected by elution using a weak ligand. *Prot. Expres. Purific.* 3 263 1992.
- Ribeiro, M.B, Vijayalakshmi, M, Todorova-Balvay, D, Bueno, S.M.A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. *J. Chromatogr., B* 861, 64 2008.
- Savina, I.N, Mattiasson, B, Galaev, I.V. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate, *Polymer* 46 9596–9603, 2005.
- Savina, I.N. et al. Cryogels from poly(2-hydroxyethyl methacrylate): macroporous, interconnected materials with potential as cell scaffolds. *Soft Matter* 3, 1176–1184, 2007.
- Silva, M. E and Franco, T.T. Purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr., B.* 743, 287, 2000.
- Silveira, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. USP, São Paulo: v.1, p.71-79, 1989.
- Sulkowski, E. The saga of IMAC and MIT. *Bioessays*, 10, 170,1989.
- Tan, L.H, Kim, D.S, Yoo, I.K, Choe, W.S. Harnessing metal ion affinity for the purification of plasmid DNA. *Chem. Eng. Sci.*, 62, 5809, 2007.
- Teilum, M, Hansson, M.J, Mansson, R, Surve, S, Elmer, E, Onnerfjord, P, Mattiasson, B. Binding mitochondrial to cryogelmonoliths allows detection of proteins specifically released following permeability transition, *Anal. Biochem.* 348 209–211, 2006.
- Wakabayashi, H, Yamauchi, K, Takase, M. Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16:1241 1251, 2006.

- Wang, L, Shen, S, He, X, Yun, J, Yao, K, Yao, S.J. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal* 42 237–242 2008.
- Williams, S.L, Eccleston, M.E, Slater, N.K.H. Affinity capture of a biotinylated retrovirus on macroporous monolithic adsorbents: towards a rapid single-step purification process. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 783–787 2005.
- Yao, K, Yun, J, Shen, S, Wang, L, He, X, Yu, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1109, 103–110, 2006.
- Yao, K.J, Shen, S.C, Yun, J.X, Wang, L.H, Chen, F, Yu, X.M. Protein adsorption in supermacroporous cryogels with embedded nanoparticles, *Biochem. Eng. J.* 36 139–146, 2007.
- Yao, K.J, Yun, J.X, Shen, S.C, Chen, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns, *J. Chromatogr. A* 1157 246–251, 2007.
- Yoshida, S and Ye, X.Y. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography, *Journal of Dairy Science*, 74: 1439–1444, 1991.
- Yun, J.X, Lin, D.Q, Yao, S.J. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43,8066 2004.
- Yun, J.X, Yao, S.J, Lin, D.Q. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. *Chem. Eng. J.* 109, 123 2005.
- Zachariou, M, Hearn, M. T. W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. *J. Chromatogr., A*, 890, 95, 2000.

CAPÍTULO 3 – Termodinâmica e modelagem da adsorção de lactoferrina em criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de Cu²⁺

Resumo

A adsorção de lactoferrina do soro de leite bovino em criogel monolítico supermacroporoso por afinidade foi analisada usando dados de equilíbrio adsorptivo e a microcalorimetria de titulação isotérmica para medir informações termodinâmicas que regem o processo. Dados de isotermas foram obtidos em temperatura de 20, 30 e 40°C, pH 6.0, 7.0, e 8.0 e força iônica de 200, 400, 600, 800 e 1000mM de NaCl. Os modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich, Freundlich, Temkin e SMA(steric mass-action) foram ajustados aos dados de equilíbrio. Foi observado que, além da temperatura afetar de maneira positiva a interação entre a proteína e o adsorvente, o seu efeito também é dependente da concentração de sal. Em todos os casos o estudo microcalorimétrico indicou uma entalpia de adsorção endotérmica, exceto em 40°C, pH 6,0 e pH 8 e força iônica 200mM. O processo de adsorção foi verificado como entropicamente dirigido em quase todas as condições analisadas. Os resultados encontrados no presente trabalho permitem o aprimoramento de técnicas mais eficazes dos processos de separação de proteína por afinidade.

Palavras chave: IMAC, lactoferrina, equilíbrio adsorptivo, microcalorimetria.

1. Introdução

A lactoferrina (LF), também conhecida como lactotransferrina (LTF), é uma proteína multifuncional da família das transferrinas. A lactoferrina é uma glicoproteína globular com massa molecular em torno de 80kDa amplamente encontrada em várias secreções, como leite, lágrimas, salivas e secreções nasais. A lactoferrina é um dos componentes do sistema imunológico do organismo, tem atividade antimicrobiana (bactericida, fungicida) e faz parte da defesa natural, principalmente em mucosas (Tozzi et al., 2003). Em particular, lactoferrina oferece atividade antibacteriana de bebês humanos (Galaev et al., 1994; Plate et al., 2006).

As características de adsorção de proteínas em sistemas por afinidade é função de vários parâmetros, tais como temperatura, pH da fase móvel, resina e natureza e concentração dos íons na fase móvel. Embora a adsorção seja um fenômeno amplamente explorado em importantes técnicas de purificação de proteínas, o seu mecanismo ainda não é totalmente compreendido (Bresolin et al., 2009). As diferentes formas de adsorção de proteínas, incluindo afinidade, fase reversa, interação hidrofóbica e troca iônica foram elucidadas pela interação da proteína com a interface. Destas formas de separação, a adsorção por afinidade bioespecífica exhibe uma alta seletividade para a separação biológica e tem sido amplamente utilizada em laboratórios e aplicações industriais. No entanto, a estabilidade e as condições de eluição são as restrições inerentes à adsorção de afinidade bioespecífica.

Em 1975, Porath e colaboradores introduziram a cromatografia por afinidade em metal imobilizado (IMAC). IMAC emprega o íon metálico como o ligante de afinidade para exercer a afinidade de ligação na separação de proteínas. É uma técnica que tem sido amplamente aplicada para a separação de proteínas (Sulkowski, 1989; Burks & Iverson, 1995; Dubel et al., 1995; Herve et al., 1993).

Em geral, a topografia da superfície da proteína e a natureza química e física das condições de interação afetam a forma com que a proteína interage com os íons metálicos imobilizados. O complexo de coordenação, formado pelo grupo doador de elétrons acessíveis na superfície da proteína e os íons metálicos imobilizados são os responsáveis pela interação. Interações múltiplas, incluindo a interação específica (ligação de coordenação), a interação não-específica (ligação eletrostática e hidrofóbica), a força de hidratação dos íons metálicos imobilizados e da proteína (Chen et al., 1996; Walenius et al., 1992), e o possível rearranjo estrutural da proteína (Hanson et al., 1994; Lundstrom & Elwing, 1990) podem influenciar no comportamento da adsorção em IMAC.

Fatores que influenciam na interação da proteína com o ligante imobilizado incluem o número de grupos doadores de elétrons na superfície da proteína (Sulkowski, 1985; Suh, 2009; Wuenschell et al., 1990), o valor do pH de interação (Wu et al., 1995; Kato et al., 1986), tipo e concentração de sal

(Chen et al., 1996; Hemdan & Porath, 1985), temperatura (Hemdan & Porath, 1985; Wu et al., 1995), estrutura e grau de hidratação da proteína.

Os fatores anteriormente descritos parecem ser uma base adequada para o emprego da IMAC na separação de proteínas, mas não é suficiente para a compreensão do mecanismo de adsorção entre os íons metálicos e as proteínas. Obscuridades levam à complexidade da adsorção em IMAC, pois a maioria dos estudos analisa os fatores que influenciam a adsorção/dessorção entre a proteína e o íon imobilizado. Entretanto, poucas pesquisas termodinâmicas têm se dedicado a elucidar o mecanismo de adsorção em IMAC. Essa falta de investigação é devido à complexidade de adsorção em IMAC, os efeitos irregulares da temperatura e a possível natureza irreversível da adsorção IMAC (Jen et al., 1992). Parâmetros termodinâmicos fornecem informações valiosas para o entendimento da adsorção de proteínas. Tais parâmetros não podem ser obtidos por medidas simples. Além disso, um cálculo estatístico direto da entropia de adsorção em IMAC é difícil, pois o rearranjo da estrutura da proteína e a redistribuição das moléculas de solvente e sal são imprevisíveis. Assim, quantificar a entalpia de adsorção, ΔH°_{ads} , é um aspecto importante da investigação termodinâmica.

Neste estudo foram obtidas isotermas de adsorção em diferentes condições de pH (6,0-8,0), concentração de sal (200-1000mM de NaCl) e temperatura (20-40°C). Foi empregada a microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC), técnica altamente sensível, que permite a medição da variação de entalpia da solução de lactoferrina titulada em matriz de criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons metálicos de Cu^{2+} . Os dados de adsorção obtidos foram, ainda, modelados segundo 5 modelos teóricos, Langmuir, Langmuir-Freundlich, Freundlich, Temkin e SMA (steric mass-action).

2. Experimental

2.1. Materiais

Lactoferrina (80kDa e pI 7,8) – Sigma Aldrich, adsorvente criogel-IDA- Cu^{2+} sintetizado no laboratório de desenvolvimento e simulação de processos da Universidade Federal de Viçosa - UFV. A matriz adsortiva possui diâmetro médio de poros de 10-100 μm . Os reagentes químicos utilizados foram de alto grau cromatográfico e a água purificada pelo sistema Milli-Q.

2.2. Métodos

2.2.1. Experimentos de adsorção

Foram pesados em torno de 30 mg da matriz de criogel, com auxílio de uma balança analítica (Adventure Pro, Ohaus), diretamente em tubos eppendorf de 2,0 mL. Antes da realização dos experimentos, a resina foi equilibrada com tampão de equilíbrio (20mM de HEPES contendo 0,2M de NaCl, pH 7.0). Para isso foi transferido cerca de 400 μL do tampão para tubos de eppendorf que já continham a matriz pesada. Os tubos foram deixados sob leve agitação por um período de 2 horas para condicionamento da resina. Após este tempo, nos vários tubos contendo a resina pré-condicionada, foram adicionados diferentes volumes (0 a 300) μL de uma solução de lactoferrina 10mg/mL, de forma a obter diferentes concentrações de proteína nos tubos (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 e 2.2 mg/mL). Em seguida, foi adicionado tampão de equilíbrio, na condição desejada, para completar o volume de solução para 1200 μL . Os tubos foram agitados por 24 horas, sob temperatura controlada (DBO Mod. 101M/3 Eletrolab®, Brasil), de forma a se estabelecer o equilíbrio. Posteriormente a resina foi retirada dos tubos de eppendorf e a concentração de proteínas contida no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 495nm (Thermo Scientific modelo Biomate 3) usando o método de Bradford. A concentração de proteína na fase sólida foi determinada de acordo com a equação (1):

$$q = \frac{V(C_0 - C)}{M} \quad (1)$$

onde $q(\text{mg.g}^{-1})$ é a concentração de proteína na fase sólida, $V(\text{mL})$ volume da fase líquida, $M(\text{g})$ é a massa da fase sólida, $C(\text{mg.mL}^{-1})$ é concentração de proteína na fase líquida depois que o equilíbrio foi estabelecido. O experimento foi delineado usando um esquema fatorial com três temperaturas (20, 30 e 40°C), cinco concentrações de sal (200mM, 400mM, 600mM, 800mM e 1000mM) e três pH's(6,0; 7,0 e 8,0).

2.2.2. Modelagem dos dados de equilíbrio

Vários pesquisadores têm demonstrado que a relação de equilíbrio entre um adsorbato livre e ligado pode ser descrito por uma isoterma do tipo Langmuir (1916). Chase (1984) descreveu uma equação de transferência de massa, que é coerente com a isoterma de Langmuir. A transferência de massa do adsorbato para a fase imobilizada pode ser descrita por:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C(q_{m(L)} - q) - k_2 q \quad (2)$$

Onde C é a concentração do adsorbato livre, q é a concentração do adsorbato ligado, q_m é a capacidade máxima de ligação do adsorbato e t é o tempo. As taxas, k_1 e k_2 , são parâmetros que representam a taxa de adsorção e desorção do adsorbato com o ligante imobilizado. Com as suposições de que todos os sítios ligantes têm igual energia, independente da natureza, e únicos sítios de interação ocorre entre a proteína e o ligante, em equilíbrio, a equação 2 pode ser reduzida à isoterma de adsorção.

$$q = \frac{q_{m(L)} C^*}{(k_d + C^*)} \quad (3)$$

onde q_m é a capacidade máxima adsortiva do adsorvente, K_d é a constante de equilíbrio da adsorção, q e C^* são as concentrações da proteína no adsorvente e na fase líquida, respectivamente, em condições de equilíbrio.

Para estabelecer a validade das suposições que os sítios de interação, independente de afinidade, estão presentes na superfície do adsorvente, diversas transformações lineares da equação 3 podem ser aplicadas, incluindo duplo recíproco, semirecíproco (Hanes, 1932) e gráficos Scatchard (1949), respectivamente:

Duplo recíproco:

$$\frac{1}{q^*} = \frac{1}{q_{m(L)}} + \frac{K_d}{q_{m(L)}} \cdot \frac{1}{C^*} \quad (4)$$

Semirecíproco

$$\frac{C^*}{q^*} = \frac{K_d}{q_{m(L)}} + \frac{C^*}{q_{m(L)}} \quad (5)$$

Scatchard

$$\frac{q^*}{C^*} = \frac{q_{m(L)}}{K_d} - \frac{q^*}{K_d} \quad (6)$$

As formas dos gráficos de q^*/C^* vs q^* são particularmente sensíveis nos processos de interação independente, dependente não idêntico ou cooperativo na ligação da proteína com os ligantes imobilizados. Se q^*/C^* vs q^* é convexo, cooperativismo negativo é observado. Se a relação é linear, interação independente entre a proteína e sítios ligantes é ressaltada. E, se o gráfico q^*/C^* vs q^* é côncavo, cooperativismo positivo é observado.

Como as interações proteína-ligante são freqüentemente caracterizadas pela participação de sítios ligantes não independentes, a isoterma de Langmuir se torna incapaz de descrever a comportamento da isoterma experimental de forma satisfatória. Outra isoterma bem conhecida, que é normalmente usada para descrever o comportamento da adsorção, é a isoterma de Freundlich (Hutchens & Yip, 1990). Ela relaciona a concentração adsorvida como função da concentração do soluto na fase líquida.

$$q^* = KC^n \quad (7)$$

Onde K e n são as constantes de equilíbrio de Freundlich e fator capacidade da isoterma de Freundlich, respectivamente. K e n são constantes para um sistema particular proteína-íon metálico imobilizado. Apesar de usualmente aplicada em um sentido estritamente empírico, esta pode conter interesse teórico em termos de adsorção em uma superfície energeticamente heterogênea. Uma limitação da isoterma de Freundlich é que o conteúdo adsorvido aumenta indefinidamente com a concentração da solução.

Adsorção reversível de proteínas podem também ser descritas pela isoterma de Temkin, modelo originalmente desenvolvido para a adsorção de gases em superfícies heterogêneas (Sips, 1950):

$$q^* = q_T \ln(1 + K_T C^*), \quad (8)$$

Onde K_T (M^{-1}) é a constante de equilíbrio de ligação correspondente à máxima energia de ligação ($K_T = \exp(-\Delta G_{\max}/RT)$), C^* (M) é a concentração da proteína na solução em equilíbrio, e q_T (mg proteína/ mL suporte) é a capacidade diferencial da superfície para a adsorção da proteína por unidade de energia. A isoterma de Temkin possui duas vantagens quando comparada a outros modelos de isoterma para esclarecer a natureza heterogênea da adsorção da proteína em vários sorventes de troca-iônica e afinidade (Johnson & Arnold, 1995a e Johnson & Arnold, 1995b). Primeiro, a adsorção é descrita por dois parâmetros fisicamente significativos, onde pode ser determinados por experimentos de equilíbrios de adsorção. Segundo, a isoterma de Temkin satisfaz a lei de Henry, um quesito necessário para explicar a teoria do equilíbrio local para comportamento da cromatografia preditiva das expressões do equilíbrio de adsorção.

A isoterma de Langmuir-Freundlich tem sido fundamentada a ser adequada para descrever o comportamento das proteínas em adsorventes de afinidade. Os dois modelos podem ser combinados para formar uma equação composta Langmuir-Freundlich (Andrade, 1985).

$$q^* = \frac{q_{m(LF)} (C^*)^\eta}{K_d^* + (C^*)^\eta}, \quad (9)$$

Onde K_d^* é a constante de dissociação aparente que inclui as contribuições vindas das ligações dos ligantes em monômeros, dímero-monômeros e mais altamente associado a formas das proteínas, q_m (LF) é a capacidade máxima de ligação, e η é o coeficiente numérico da isoterma de Langmuir-Freundlich. Por analogia com as interações múltiplas das proteínas, pode ser sugerido que a equação 9 sirva como modelo de adsorção cooperativista. Como a equação possui três termos para ajustamento, é muito melhor para a aproximação de uma adsorção de natureza heterogênea e explicação da cooperatividade da adsorção. Por razões puramente independentes sítios não interativos possuem $\eta=1$. Quando $\eta > 1$, supõe-se cooperativismo positivo, enquanto que se $0 < \eta < 1$ supõe-se cooperativismo negativo no processo de ligação. O valor de η pode, assim, ser empregado como um coeficiente empírico, que representa o tipo e a extensão da cooperatividade presente na ligação por interação.

O modelo SMA

No presente trabalho, foi examinada ainda a aplicabilidade do modelo SMA nos dados de equilíbrio de adsorção da proteína lactoferrina em adsorvente contínuo supermacroporoso. Para este sistema, o modelo foi construído com base no estudo feito por Chen et al. (2006) na qual utilizaram hipóteses anteriormente descritas por Brooks e Cramer (1992).

Considere uma superfície contendo íons de cobre imobilizados, com uma densidade total de cobre de L_t (mM). Após a ligação, a proteína interage com uma série de sítios de afinidade do cobre dado pelo número característico de sítios de ligação, n_i . Além disso, durante a adsorção pode haver um número de blindagem da proteína dada pelo seu fator estérico, σ_i . Finalmente, o equilíbrio do processo de interação por afinidade pode ser apresentado por uma constante de equilíbrio, K_i . Para um sistema de N proteínas, N expressões de equilíbrio que representam as interações das proteínas individuais com o ligante imobilizado pode ser escrita como:

$$C_i + n_i \bar{L}_v \Leftrightarrow Q_i \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (10)$$

onde C_i e Q_i representam as concentrações de proteína em solução e no complexo proteína-íon metálico imobilizado na fase estacionária, respectivamente. \bar{L}_v representa os sítios livres de afinidade do cobre na superfície do adsorvente que são acessíveis para a adsorção de proteínas. A constante de equilíbrio K_i para a adsorção por afinidade é dada por:

$$K_i = \frac{Q_i}{\bar{L}_v^{n_i} C_i} \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (11)$$

Após a ligação, cada molécula de proteína pode estericamente blindar alguns sítios de afinidade dos íons metálicos sobre a superfície adsorção. A quantidade de íons bloqueados por uma proteína específica, $\hat{L}_{s,i}$ (mM), é proporcional à concentração dessa proteína adsorvida na superfície:

$$\hat{L}_{s,i} = \sigma_i Q_i \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (12)$$

O balanço de massa do íon ligado na fase estacionária fornece:

$$L_t \equiv \bar{L}_v + \sum_{i=1}^N (\sigma_i + n_i) Q_i \quad (13)$$

As equações (11) e (13) fornecem $N+1$ equações que definem implicitamente o equilíbrio multicomponente das N proteínas e do cobre ligado. Substituindo a Eq. (13) na Eq. (11) fornece a seguinte isoterma implícita de equilíbrio multicomponente:

$$K_i = \frac{Q_i}{\left[L_t - \sum_{i=1}^N (\sigma_i + n_i) Q_i \right]^{n_i} C_i} \quad (14)$$

Neste trabalho, o equilíbrio de adsorção da lactoferrina como proteína modelo foi estudado para examinar a utilidade do modelo SMA que, para este sistema, Eq. (14) pode ser então reduzida para:

$$C = \frac{Q}{K[L_t - (\sigma + n)Q]^n} \quad (15)$$

A equação 15 indica que o modelo SMA envolve três parâmetros (K , n e σ) para cada solução, semelhante ao desenvolvido por Brooks e Cramer para sistemas de troca iônica. Em uma solução diluída de proteínas, a concentração C , se aproxima de zero e, portanto, Q se aproxima de zero. Como resultado, a isoterma se reduz a:

$$K = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{Q}{CL_t^n} \quad (16)$$

A Equação (16) é usada para determinar os parâmetros do modelo linear K e n que serão discutidos mais adiante.

2.2.3. Experimentos de microcalorimetria

As variações de entalpias foram medidas com o uso de um microcalorímetro de titulação isotérmica (CSC, modelo ITC 4200), de acordo com Lira et al., (2009). As medidas foram feitas em duas temperaturas (20°C e 40°C), duas concentrações de sal NaCl (200mM e 1000mM) e dois pH's (6,0 e 8,0). Para as medidas ITC, o sistema de microreações consistiu em uma ampola de aço inoxidável de 1,8mL, que foi preenchida com o adsorvente de criogel equilibrado em solução tampão. Quando o equilíbrio térmico entre a ampola e o dissipador de calor foi atingido, a solução de proteína foi titulada (10µL) por meio de uma seringa de Hamilton, com agulha de aço inoxidável, acionado por uma bomba controlada por computador, em intervalo de tempo de 60mim. O sinal de saída, coletado em potência, $P(\mu J)$, versus tempo, $t(s)$, foi integrado e quantificado pela quantidade de proteína adsorvida para fornecer a variação de entalpia de adsorção. O calor resultante da titulação foi corrigido pelo calor de diluição da proteína para obter o calor líquido de interação entre a proteína e o adsorvente. Assim, a variação de entalpia de adsorção ($\Delta_{ads}H$) pode ser calculada por meio da seguinte equação:

$$\Delta_{ads}Q = Q_r - Q_d = Mq\Delta_{ads}H \quad (17)$$

onde $\Delta_{ads}Q$ é o calor líquido atribuído à adsorção de proteína no adsorvente de criogel, Q_r é o calor de adsorção adicional à diluição da proteína, Q_d é o calor de diluição da proteína e M é a massa adsorvente de criogel. Em processos onde a adsorção ocorre de maneira espontânea, como nos casos em estudo, a variação de energia livre de Gibbs ($\Delta_{ads}G$) deve ser negativa. Há duas contribuições para $\Delta_{ads}G$, a variação da entalpia de adsorção $\Delta_{ads}H$ e a variação da entropia $\Delta_{ads}S$ de modo que a relação Gibbs-Helmholtz sugere:

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S \quad (18)$$

A energia livre $\Delta_{ads}G$ pode ser calculada pela constante de equilíbrio termodinâmico K de acordo com a equação (19):

$$\Delta_{ads}G = -RT \ln K \quad (19)$$

onde R é a constante universal dos gases e K é a constante de equilíbrio termodinâmico:

$$K = \left(\frac{\partial q}{\partial C} \right)_{C \rightarrow 0} \quad (20)$$

3. Resultados e discussão

3.1. Equilíbrio de adsorção por afinidade da lactoferrina em criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de cobre

Em IMAC, a retenção depende do número e tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com o metal, sendo influenciada por variáveis independentes tais como pH, temperatura, tipo de sistema tamponante, tipo e concentração do sal, natureza do metal imobilizado, densidade de ligantes e tamanho da proteína (Wong et al., 1991). Neste trabalho o sistema tamponante utilizado foi o HEPES (ácido *N*-[2-hidroxietil]piperazina-*N'*-[2-etanolssulfônico]), por não possuir afinidade com íons metálicos (Bresolin et al., 2009) e ser o mais comumente utilizado nesses tipos de sistema; os íons escolhidos para a imobilização na matriz foi o Cu^{2+} a 0,5M por apresentar interação com os

resíduos de histidina, triptofano e cisteína presente na superfície da lactoferrina. Porath e Olin (1983) mostraram que a quantidade de proteínas adsorvidas na presença de 1M de cloreto de sódio pode ser maior que a quantidade de proteínas adsorvidas a uma mesma força iônica, porém utilizando-se sulfato de sódio, por esse motivo o sal escolhido para a execução do trabalho foi o cloreto de sódio (NaCl).

Os experimentos de adsorção da lactoferrina foram realizados sob diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de sal NaCl. A Figura 1a mostra o efeito da concentração de NaCl sobre o equilíbrio de adsorção no valor de pH 6.0 e temperatura de 40°C e a Figura 1b demonstra o efeito da temperatura no valor de pH 8.0 e com 200mM de NaCl.

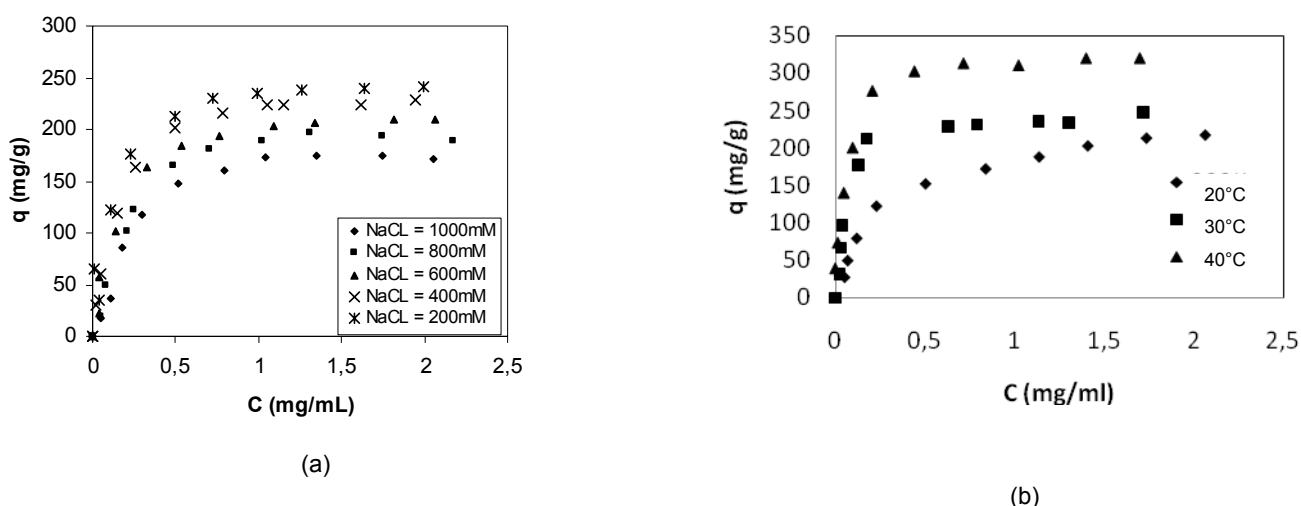


Figura 1 – Perfil isotérmico de adsorção no criogel; (a) efeito da concentração de NaCl, pH 6.0, 40°C e (b) efeito da temperatura, pH 8.0, 200Mm de NaCl.

Pode-se observar que a capacidade adsortiva diminui com o aumento da força iônica. Esse resultado confirma a revisão feita por Bresolin (2009). Embora a adição de sal reduza interações eletrostáticas, por um lado, ela reforça as interações de coordenação e hidrofóbica por outro. Como consequência, diferentes tendências podem ser obtidas para diferentes proteínas, de acordo com a sua hidrofobicidade. O aumento da adsorção da lactoferrina com a diminuição da força iônica encontrado neste estudo indica a predominância de interações eletrostáticas em relação às interações por coordenação, comportamento já esperado. O efeito da temperatura, porém, é

um fenômeno mais complexo, que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do adsorvente, quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais de proteínas (Mihelič *et al.*, 2003). Pela figura 1b, pode ser perceber o aumento direto da capacidade adsortiva com o aumento da temperatura.

Os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich, Temkin e Langmuir-Freundlich foram ajustados em todos os dados experimentais. Como apresentado na Figura (2a—2e) para a condição de pH 6.0, temperatura de 40°C e em toda faixa de força iônica estudada, os resultados obtidos confirmam um ajuste satisfatório dos modelos aos dados experimentais.

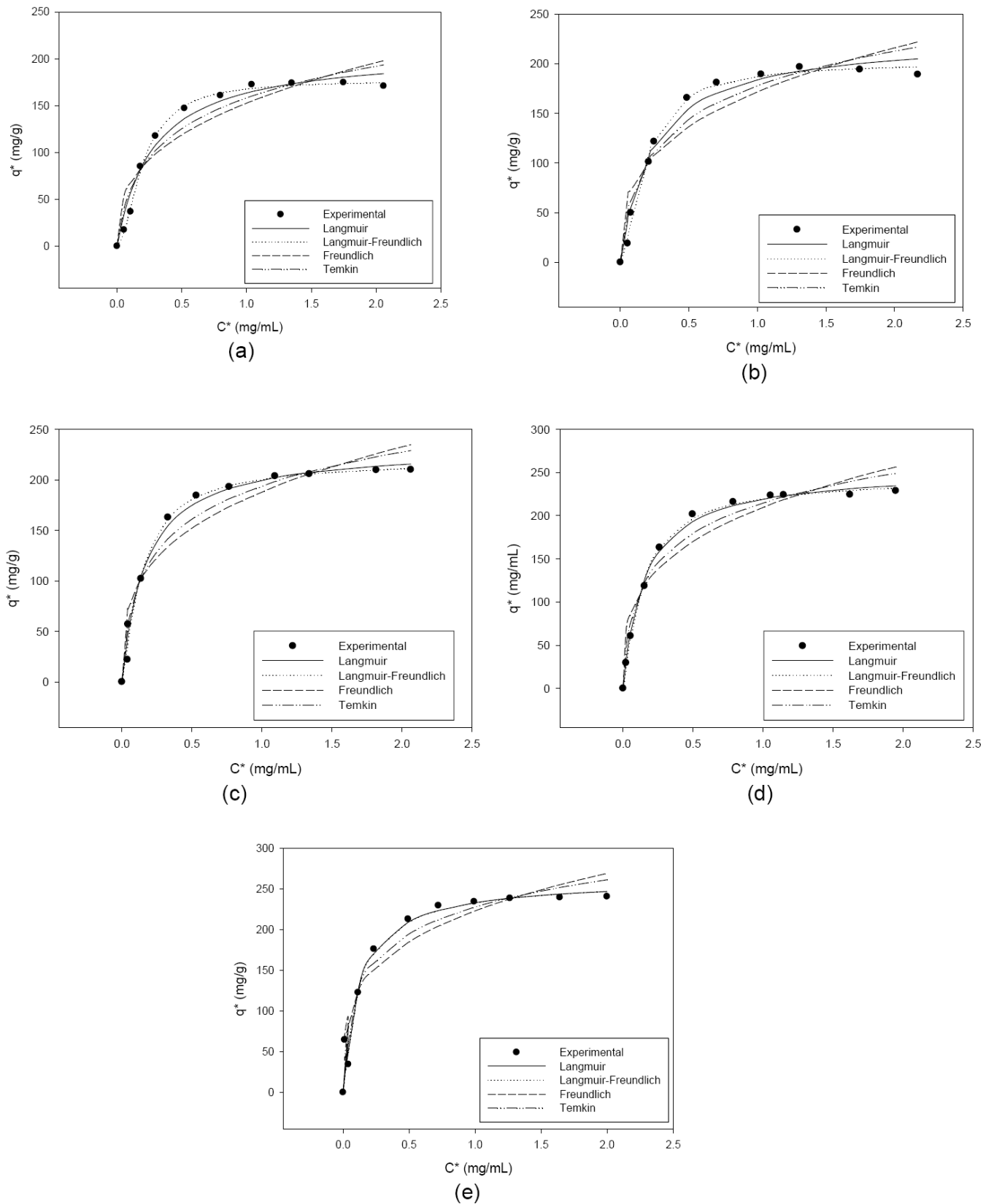


Figura 2 – Comparação de vários modelos de isothermas de adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em várias condições de força iônica em temperatura de 40°C e pH 6,0; (a) 1000mM, (b) 800mM, (c) 600mM, (d) 400mM, (e) 200mM.

As Tabelas 1 a 4 apresentam os valores dos parâmetros de cada um dos quatro modelos ajustados aos dados experimentais de adsorção, na matriz de criogel contínuo supermacroporoso imobilizado com íons de cobre em função das concentrações de NaCl, pH e temperatura avaliados. Pode-se observar um ajuste satisfatório de todos os modelos aos dados experimentais, com coeficientes de determinação que variaram entre 0,96 a 0,99.

Tabela 1 – Parâmetros do modelo de Langmuir

T (°C)	pH	NaCl (mM)	q_m	k_d	R^2
20	6	1000	178,738	0,4626	0,96
20	6	800	196,5085	0,4602	0,97
20	6	600	200,2693	0,3562	0,99
20	6	400	218,7434	0,3329	0,99
20	6	200	211,1383	0,2071	0,99
20	7	1000	165,2006	0,5264	0,97
20	7	800	191,7888	0,4663	0,96
20	7	600	207,426	0,4171	0,97
20	7	400	224,2391	0,3658	0,98
20	7	200	236,184	0,3375	0,99
20	8	1000	274,4003	1,1984	0,99
20	8	800	268,8999	0,8472	0,99
20	8	600	264,5521	0,6374	0,99
20	8	400	263,5963	0,5092	0,99
20	8	200	241,614	0,2751	0,99
30	6	1000	213,6377	0,6491	0,98
30	6	800	230,274	0,597	0,98
30	6	600	245,7864	0,4991	0,98
30	6	400	248,3392	0,319	0,99
30	6	200	241,0432	0,2021	0,99
30	7	1000	218,917	0,5624	0,98
30	7	800	216,8056	0,3439	0,98
30	7	600	235,6222	0,2863	0,99
30	7	400	241,9541	0,2121	0,99
30	7	200	254,6384	0,1515	0,99
30	8	1000	224,1743	0,4248	0,98
30	8	800	216,2201	0,2554	0,98
30	8	600	231,0241	0,1692	0,97
30	8	400	246,4659	0,1466	0,98
30	8	200	256,7178	0,0724	0,98
40	6	1000	209,0465	0,2787	0,99
40	6	800	227,3493	0,2352	0,99
40	6	600	233,01	0,1665	0,99
40	6	400	253,2589	0,1547	0,99
40	6	200	262,2724	0,1258	0,98
40	7	1000	194,029	0,2361	0,99
40	7	800	214,874	0,2159	0,99
40	7	600	229,9674	0,152	0,99
40	7	400	248,903	0,1274	0,99
40	7	200	266,7214	0,0811	0,99
40	8	1000	218,8919	0,2459	0,99

40	8	800	267,9468	0,2384	0,99
40	8	600	296,6033	0,1834	0,99
40	8	400	314,5071	0,1119	0,99
40	8	200	336,3949	0,061	0,99

Tabela 2– Parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich

T (°C)	pH	NaCl (mM)	k_d	q_m	n	R^2
20	6	1000	0,0217	135,8	3,0933	0,999177
20	6	800	0,0273	148,9	2,737	0,999721
20	6	600	0,0811	166,2	1,804	0,999778
20	6	400	0,1451	191,6	1,3917	0,998539
20	6	200	0,1552	203,1	1,1192	0,999652
20	7	1000	0,0342	121,8	2,7933	0,999108
20	7	800	0,016	142,7	3,0147	0,995492
20	7	600	0,037	160,4	2,3573	0,998518
20	7	400	0,0294	177,6	2,3286	0,997382
20	7	200	0,0794	196,2	1,7007	0,997727
20	8	1000	0,318	178,5	1,85	0,999526
20	8	800	0,5684	232,9	1,1937	0,998117
20	8	600	0,4502	237,8	1,1602	0,99742
20	8	400	0,3872	244,7	1,1244	0,999212
20	8	200	0,2785	242,2	0,9955	0,997844
30	6	1000	0,1216	157,4	2,1462	0,997718
30	6	800	0,1285	174	1,9901	0,997661
30	6	600	0,1407	196,6	1,7819	0,997755
30	6	400	0,01	192	3	0,986532
30	6	200	0,0728	218,1	1,4662	0,999679
30	7	1000	0,01	155	4	0,992866
30	7	800	0,0926	182,6	1,7128	0,997147
30	7	600	0,0802	202,7	1,6619	0,996655
30	7	400	0,045	212,4	1,7087	0,998474
30	7	200	0,0209	226,6	1,8394	0,998352
30	8	1000	0,0688	177,7	2,0811	0,998909
30	8	800	0,0278	181,9	2,1301	0,999034
30	8	600	0,0199	204	1,9956	0,997052
30	8	400	0,00797	217,8	2,3016	0,997051
30	8	200	0,0083	237,3	1,6814	0,997699
40	6	1000	0,0562	177,2	1,79	0,999406
40	6	800	0,0746	201,4	1,5462	0,998796
40	6	600	0,0896	218,8	1,243	0,99813
40	6	400	0,1065	243,3	1,1493	0,999502
40	6	200	0,1279	262,7	0,9936	0,992664
40	7	1000	0,0636	170,6	1,6339	0,999513
40	7	800	0,0464	188,2	1,7114	0,998379
40	7	600	0,0398	209,1	1,5673	0,998809
40	7	400	0,0311	228,1	1,5613	0,999217
40	7	200	0,0175	249,2	1,5206	0,999524
40	8	1000	0,058	189,9	1,7086	0,999156
40	8	800	0,0611	233,3	1,6498	0,998656
40	8	600	0,0684	269,3	1,4216	0,998164
40	8	400	0,0596	299,6	1,2403	0,998293
40	8	200	0,063	337,1	0,9897	0,997533

Tabela 3 – Parâmetros do modelo de Temkin

T (°C)	pH	NaCl (mM)	q _t	k _t	R ²
20	6	1000	49,269	9,8837	0,969282
20	6	800	54,6302	9,7325	0,974854
20	6	600	50,5992	15,6644	0,986547
20	6	400	54,9449	17,0565	0,991776
20	6	200	40,495	40,0969	0,995359
20	7	1000	47,2276	8,117	0,975906
20	7	800	53,088	9,7302	0,975218
20	7	600	56,0338	11,4428	0,980628
20	7	400	58,3251	14,0806	0,983912
20	7	200	60,9088	15,6483	0,988851
20	8	1000	95,5819	2,594	0,991589
20	8	800	83,3876	4,5021	0,996345
20	8	600	77,4595	6,6284	0,99565
20	8	400	72,7051	9,3452	0,997423
20	8	200	57,9874	22,5191	0,99685
30	6	1000	64,1152	6,0805	0,981179
30	6	800	68,1865	6,7728	0,984104
30	6	600	68,1015	9,2883	0,985509
30	6	400	59,3114	20,7695	0,988191
30	6	200	52,0209	40,777	0,990045
30	7	1000	62,7752	7,6073	0,981221
30	7	800	54,6413	16,2929	0,983606
30	7	600	57,1689	21,4893	0,984804
30	7	400	54,2153	34,2068	0,984529
30	7	200	52,4088	60,698	0,986802
30	8	1000	60,287	11,4368	0,981774
30	8	800	51,1347	24,9828	0,977884
30	8	600	48,7144	50,4522	0,975489
30	8	400	50,3291	63,98	0,978658
30	8	200	46,5463	168,3	0,980238
40	6	1000	50,2854	22,268	0,986022
40	6	800	51,5094	30,7222	0,986441
40	6	600	48,813	52,3305	0,990678
40	6	400	51,7853	62,4462	0,993927
40	6	200	48,5115	108,5	0,988347
40	7	1000	43,6799	31,1827	0,988935
40	7	800	48,017	34,3303	0,98784
40	7	600	46,6768	63,0651	0,98756
40	7	400	48,9383	81,075	0,985454
40	7	200	48,0922	159	0,985716
40	8	1000	50,6788	27,7526	0,985652
40	8	800	62,6127	27,8939	0,985355
40	8	600	65,3464	41,9033	0,987721
40	8	400	60,1016	104,4	0,989863
40	8	200	53,6308	372,3	0,991591

Tabela 4 – Dados de equilíbrio do modelo de Freundlich.

T (°C)	pH	NaCl (mM)	K	n	R ²
20	6	1000	112,5	2,3572	0,954267
20	6	800	124	2,3043	0,961174
20	6	600	136,7	2,5998	0,974801
20	6	400	153	2,5583	0,981171
20	6	200	163,5	3,1062	0,986993
20	7	1000	99,6877	2,2082	0,962762
20	7	800	120,5	2,3027	0,963632
20	7	600	135,5	2,3859	0,968755
20	7	400	151,8	2,4687	0,973846
20	7	200	165,2	2,4821	0,979862
20	8	1000	116,7	1,6259	0,984178
20	8	800	135,7	1,8562	0,990348
20	8	600	150,7	2,0082	0,989576
20	8	400	163,3	2,1891	0,99118
20	8	200	176,2	2,6207	0,99102
30	6	1000	119,8	2,0441	0,968656
30	6	800	133,8	2,066	0,972952
30	6	600	152,1	2,2657	0,9736
30	6	400	176,7	2,7257	0,978099
30	6	200	188,1	3,1997	0,979956
30	7	1000	129	2,1831	0,968823
30	7	800	149,5	2,5888	0,970457
30	7	600	171,8	2,6879	0,972321
30	7	400	186,4	3,0459	0,97256
30	7	200	210,4	3,4156	0,976951
30	8	1000	145,8	2,3992	0,968923
30	8	800	160,6	2,8889	0,964549
30	8	600	185,9	3,3793	0,962124
30	8	400	204,2	3,4262	0,96639
30	8	200	234,2	3,9536	0,969054
40	6	1000	152,6	2,7743	0,974121
40	6	800	171,9	3,0174	0,974104
40	6	600	188,2	3,2703	0,980251
40	6	400	209,8	3,3165	0,98448
40	6	200	223	3,6903	0,982052
40	7	1000	146,6	3,0298	0,978904
40	7	800	164,7	3,0468	0,978021
40	7	600	188,6	3,4713	0,97727
40	7	400	209,8	3,6364	0,974082
40	7	200	238,5	4,0139	0,974105
40	8	1000	164,5	2,9256	0,973724
40	8	800	203,8	2,8608	0,972588
40	8	600	238,9	3,0513	0,975366
40	8	400	274,5	3,5835	0,97822
40	8	200	315	4,3336	0,982707

A Figura 3 apresenta alguns parâmetros dos modelos de isotermas avaliados vs temperatura avaliada no trabalho para os quatro modelos de isotermas aplicados. Observa-se que para alguns modelos o parâmetro avaliado aumenta com o aumento da temperatura. Uma justificativa para tal comportamento pode ser dada devido a capacidade de adsorção aumentar com o aumento da temperatura (Figura 4a-4c). Na cromatografia por afinidade por metais imobilizados, a influência da temperatura na capacidade de coordenação dos sítios ativos ainda não é um fato elucidado. Sabe-se, no entanto, que um aumento na temperatura induz um rearranjo estrutural nas moléculas de proteína Gerard et al., (1997). Esse rearranjo pode ter contribuído para a exposição de grupos doadores de elétrons da proteína, histidina no caso da lactoferrina, acessíveis na superfície, facilitando sua adsorção.

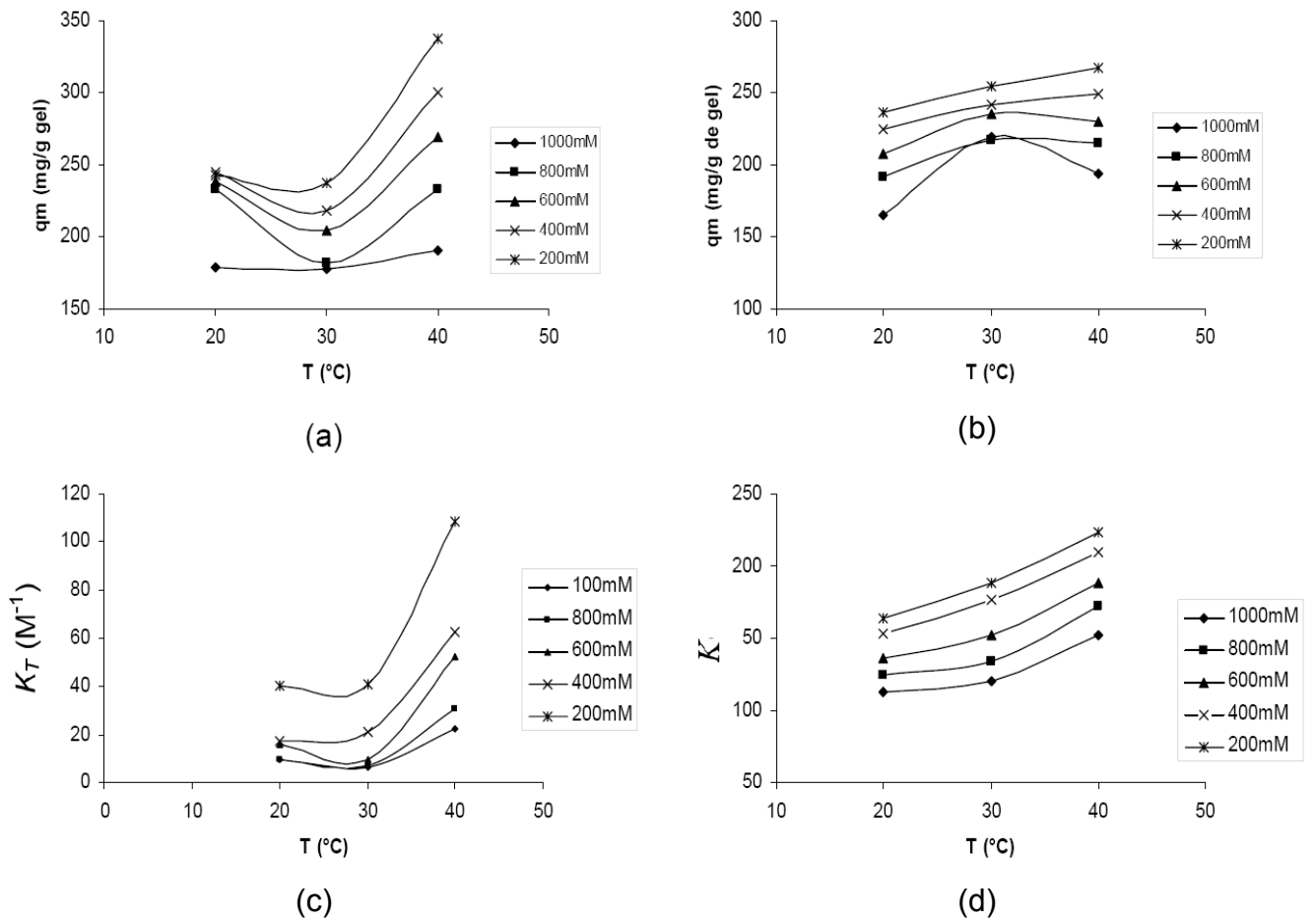
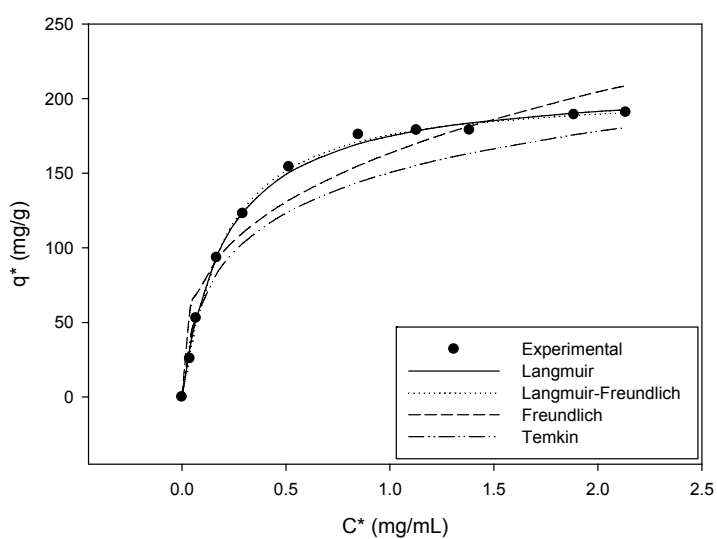
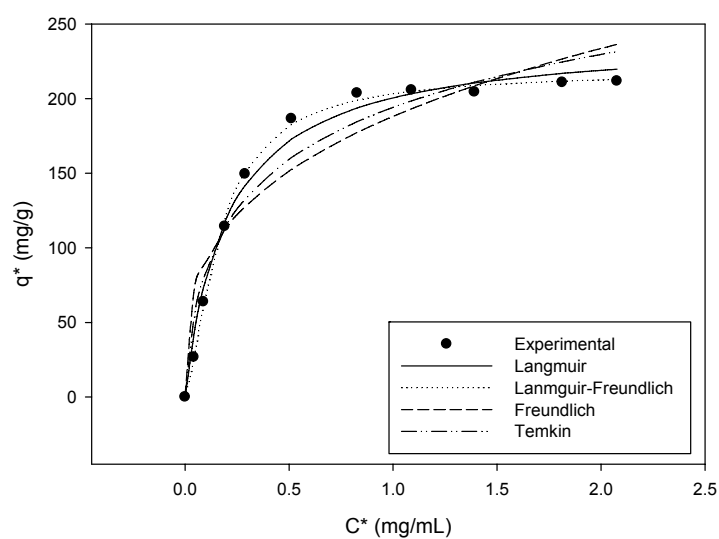


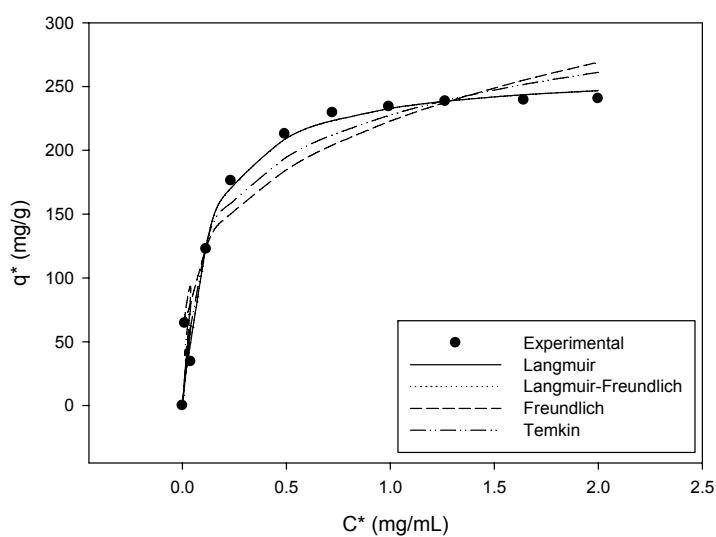
Figura 3 – Alguns parâmetros dos modelos de isotermas versus temperatura. (a) Langmuir-Freundlich, pH 8,0; (b) Langmuir, pH 7,0; (c) Temkin, pH 6,0; (d) Freundlich, pH 6,0.



(a)



(b)



(c)

Figura 4 - Isothermas de adsorção de lactoferrina em diferentes temperaturas pH 6.0 e 200mM de NaCl. (a) 20°C; (b) 30°C e (c) 40°C..

A Figura 5 apresenta as isothermas de adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em diferentes pH 's.

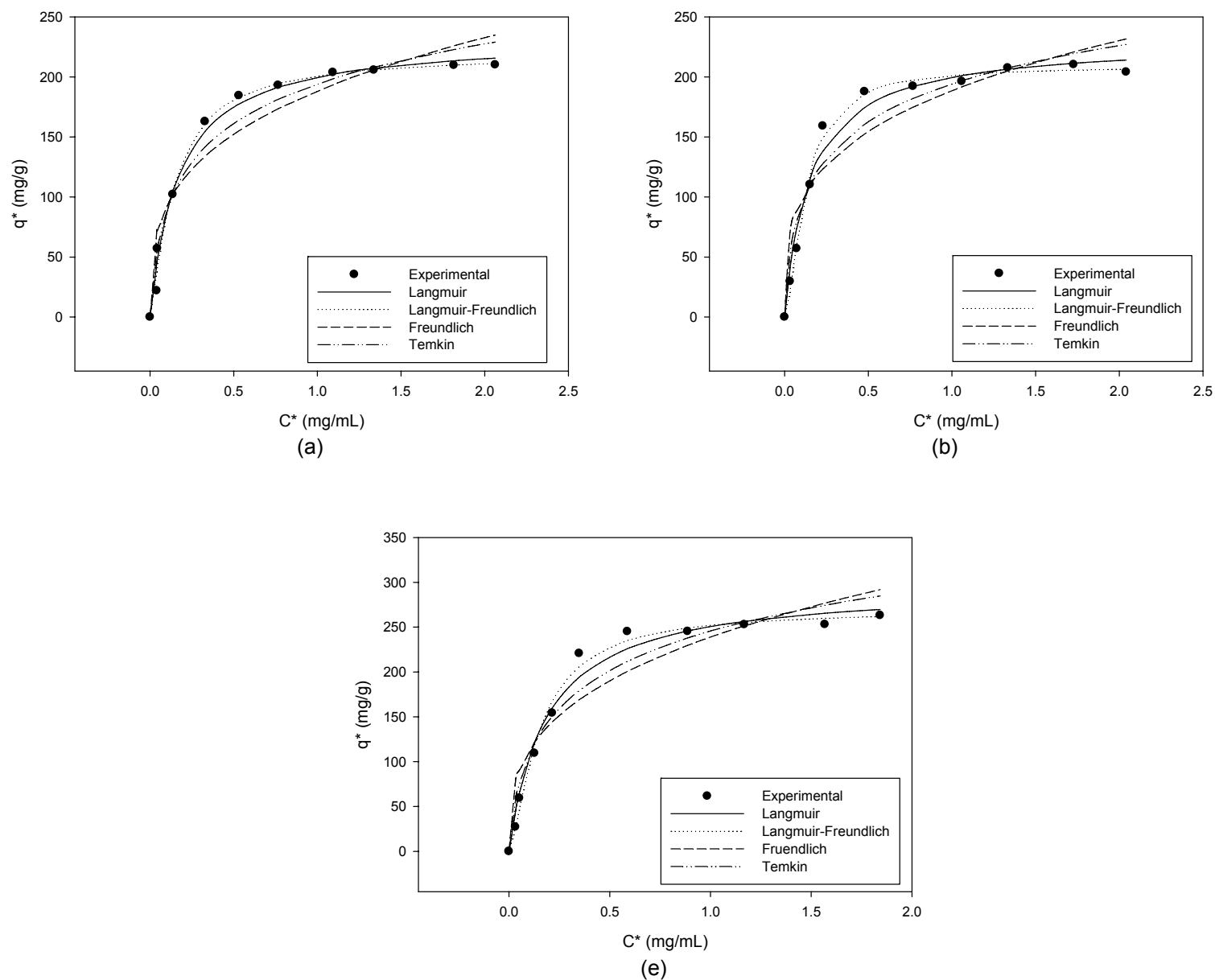


Figura 5 - Isothermas de adsorção de lactoferrina em diferentes pH's, 40°C e 600M de NaCl. (a) pH 6,0 (b) pH 7,0 e (c) pH 8,0.

Observa-se que a adsorção da lactoferrina foi influenciada, de maneira positiva, pelo aumento do pH. De modo geral, o pH ótimo de adsorção depende do íon metálico e dos grupos doadores de elétrons envolvidos na interação (Bresolin, 2009). A adsorção, em IMAC, é favorecida numa faixa de valores de pH entre 6,0 e 8,0 para proteínas que possuem resíduos de histidinas e cisteínas, acessíveis quando se utiliza Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} imobilizado,

como foi o caso em estudo. Para proteínas ricas em ácidos carboxílicos ou grupos fosfato (fosfoproteínas), a adsorção ocorre a valores de pH mais baixos (pH 5,0), quando se utiliza Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} (Bresolin et al, 2009).

Segundo Sulkowski (1989), quando uma molécula de proteína que possui grupos doadores de elétrons (histidina, cisteína e triptofano) acessíveis em sua superfície é inserida, em pH neutro, em uma coluna cromatográfica contendo íons metálicos imobilizados (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), a ligação de coordenação é estabelecida resultando na retenção da proteína e possibilitando sua purificação. Esta pode ser a justificativa para o comportamento adsortivo favorável da lactoferrina nos diferentes pH's avaliados, ambos neutro ou próximo da neutralidade.

Nas temperaturas de 20°C e 40°C, pH 6.0 e na temperatura de 30°C, pH 8.0 a capacidade de adsorção da lactoferrina foi maior quando comparada aos resultados no pH 7.0, nas respectivas temperaturas, uma explicação para o ocorrido, seja talvez pela distribuição das cargas na superfície da proteína ser influenciada pelo pH, sendo assim, outros tipos de interações que não só a por afinidade podem ter ocorrido nos pH's fora da neutralidade. Esses comportamentos, porém, são semelhantes aos encontrados por Vunum et al, (1995) ao estudarem a modelagem do equilíbrio multicomponente não linear, na cromatografia por afinidade em metais imobilizados.

SMA-Parâmetros do modelo

O modelo de equilíbrio de adsorção discutido anteriormente requer a determinação de três parâmetros independentes para a proteína lactoferrina: o número característico de sítios de ligação, n , a constante de equilíbrio, K , e o fator estérico, σ .

Na cromatografia de troca iônica, os parâmetros lineares do modelo, ou seja, a carga característica e constante de equilíbrio de proteína são geralmente estimados usando o gráfico de $\log k'$ vs $\log C_S$ através de experimentos de cromatografia de eluição isocrática sob condições lineares em diferentes concentrações de sal da fase móvel de acordo com a seguinte equação (Wankat, 1990):

$$k' \equiv \beta \left(\frac{Q}{C} \right) = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (21)$$

Onde β , Q , C , t_R e t_0 representam, respectivamente, a relação de fase da coluna, concentração de proteína adsorvida no adsorvente (mM), concentração de proteína na fase líquida (mM), tempo de retenção da proteína (s) e tempo de retenção do soluto livre(s)

Para uma solução diluída de proteínas, o coeficiente de partição da proteína entre as fases sólida e líquida em equilíbrio é definido como:

$$m = \frac{Q}{C} \quad (22)$$

Embora este método funcione bem para a retenção de proteínas em cromatografia de troca iônica (Gallant et al., 1996, Gadma et al., 1993, Freitag et al., 2000), é complexo determinar o coeficiente de partição do soluto com alta afinidade à fase estacionária (Gadma et al., 1993). Tem sido sugerido que, para a caracterização de compostos de alta afinidade, experimentos de cromatografia frontal sejam mais apropriados. Por esta abordagem, a carga característica do soluto pode ser obtida pela determinação do gradiente de sal induzido durante o experimento frontal (Gadma et al., 1993). No entanto, verifica-se que nenhum destes dois métodos de eluição isocrática e cromatografia frontal, sejam adequados para a cromatografia de afinidade devido a fatores como a alta afinidade de interação entre a proteína e o ligante imobilizado (Scopes, 1987) e ao gradiente de sal, exigido na cromatografia frontal e, que não pode ser usado no sistema em estudo.

É reconhecido que o modelo SMA seja equivalente ao equilíbrio de Langmuir apenas sob determinadas condições (Brooks & Cramer, 1996). No entanto, é falho aplicar o modelo SMA para calcular os dados das isotermas, utilizando a constante de equilíbrio derivada do SMA entre o soluto e o trocador iônico. Como alternativa, bons resultados foram obtidos usando a constante de equilíbrio derivada do modelo de Langmuir (Freitag et al., 2000). Assim, neste trabalho, a isoterma de Langmuir foi usada para ajustar os dados experimentais, pois a equação de Langmuir (Eq. (23)) pode se ajustar à

adsorção de proteínas por afinidade em adsorventes contendo íons imobilizados.

$$Q = \frac{Q_m C}{(K_d + C)} \quad (23)$$

Quando C se aproxima de zero, o coeficiente de partição da proteína é igual à inclinação da isoterma de adsorção, isto é:

$$m = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{Q}{C} = \frac{Q_m}{K_d} \quad (24)$$

Assim, o coeficiente de partição pode ser estimado a partir Eq. (24). Substituindo a Eq. (24) na Eq. (16) e reorganizando os termos obtém-se a seguinte equação:

$$m = KL_t^n \quad (25)$$

Assumindo que os parâmetros lineares do modelo, K e n são independentes da densidade de cobre imobilizado, os valores de K e n podem ser obtidos tomando o logaritmo de ambos os lados da Eq. (25):

$$\ln m = \ln K + n \ln L_t \quad (26)$$

Plotando-se o logaritmo do coeficiente de partição versus o logaritmo da concentração de cobre imobilizado obtém-se uma linha reta onde a inclinação representa o número característico de sítios ligantes e o intercepto fornece o $\ln K$.

Como pode ser visto na Figura 6, o gráfico do logaritmo do coeficiente de partição derivado da equação de Langmuir, $\ln m$ vs $\ln L_t$ é uma linha reta em cada pH e temperatura onde a inclinação fornece o n e o intercepto o $\ln K$. A relação linear entre $\ln m$ e $\ln L_t$ indica que a hipótese da independência dos parâmetros lineares do modelo na densidade do íon imobilizado seja aceitável. Os coeficientes de determinação para os dados em estudo da Figura 6 foram a 20°C: pH 6,0, $R^2=0,9897$; pH 7,0, $R^2=0,8888$; pH 8,0, $R^2=0,9791$; 30°C: pH 6,0, $R^2=0,9879$; pH 7,0, $R^2=0,9343$; pH 8,0, $R^2=0,9609$; 40°C: pH 6,0, $R^2=0,9013$; pH 7,0, $R^2=0,9813$; pH 8,0, $R^2=0,9954$.

A Tabela 5 apresenta os valores dos dois parâmetros lineares do modelo SMA de acordo com a temperatura e pH. Verifica-se que, o parâmetro n aumenta com o aumento do pH e, os valores do parâmetro K , exceto para o pH 6 aumentaram com o aumento da temperatura.

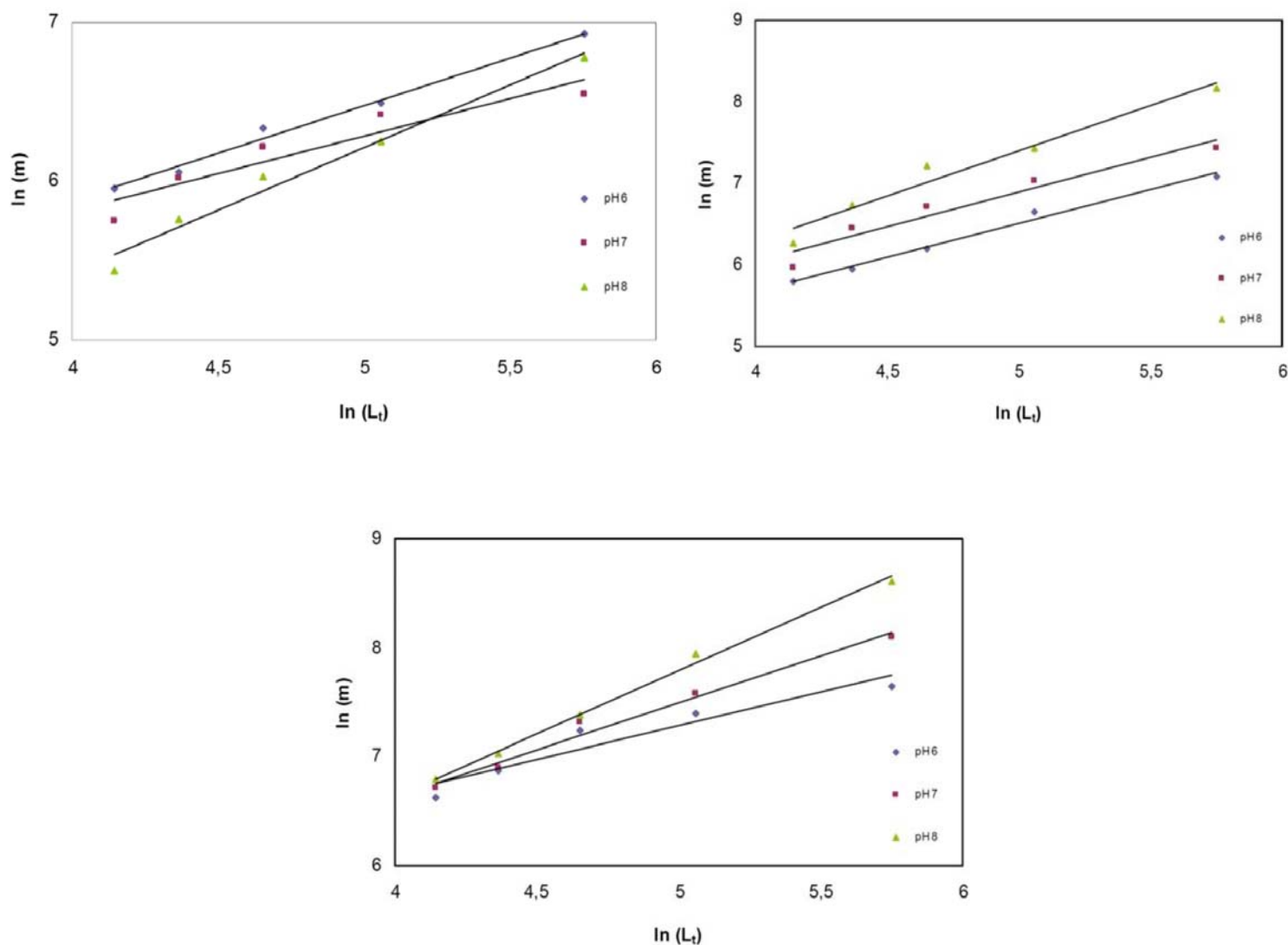


Figura 6 – Logaritmo do coeficiente de partição *versus* logaritmo da concentração de íons de cobre imobilizados para a adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em tampão HEPES 20mM em diferentes pH e temperatura: (a) 20°C, (b) 30°C e (c) 40°C.

Os parâmetros lineares do modelo para o sistema de troca iônica, determinada pelo gráfico de $\log K$ vs $\log C_s$ são geralmente considerados como constantes e independentes da concentração de sal (Brooks & Cramer, 1992, Gadma et al., 1993). No entanto, estudos sobre a retenção de proteínas em

trocadores catiônicos mostrou que o número de pontos de ligação entre a proteína e o trocador em diferentes faixas de força iônica não é, necessariamente, constante. Um aumento moderado do número de ligações pode ser observado quando a força iônica diminui (Wu & Walters, 1992). Liu e Stellwagen (1987) estudaram a interação entre a matriz de Sepharose imobilizada com o corante CB (Cibacron Blue) e a lactato desidrogenase usando o método de análise por cromatografia zonal e verificou-se a diminuição da valência média e da constante de ligação com o aumento da concentração de fosfato. Eles atribuíram esse fenômeno à forte ligação por afinidade do corante na superfície da matriz de Sepharose em altas concentrações de sal, porque a alta força iônica pode desfavorecer as interações eletrostáticas entre o corante e a matriz, resultando na diminuição da densidade do ligante acessíveis para a adsorção de proteínas (Liu e Stellwagen, 1987). Isso também pode explicar a dependência do número característico de sítios de ligação, n , e a constante de equilíbrio, K , com a força iônica observadas neste estudo

Tabela 5 – Parâmetros lineares do modelo SMA obtidos dos experimentos de adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺.

Temperatura	pH	K	n
293K	6	370,184	0,602
	7	345,848	0,472
	8	238,651	0,791
303K	6	310,443	0,826
	7	446,304	0,849
	8	577,668	1,11
313K	6	822,213	0,611
	7	810,783	0,859
	8	823,036	1,155

Uma vez que os parâmetros lineares K e n foram determinados, o fator estérico σ pode ser estimado, minimizando a soma de quadrados dos desvios obtidos com a isoterma SMA da equação (15) (Gallant, 1995 e 1996). No procedimento da estimativa, os resíduos entre a concentração de proteína

experimental e a concentração de proteína estimada pela Eq. (15), foram calculados em função do fator estérico. Então, a minimização da soma dos quadrados dos resíduos forneceu um melhor valor ajuste do fator estérico.

Os fatores estéricos assim obtidos são apresentados na Tabela 6 e o cálculo das isotermas SMA da adsorção de lactoferrina no sistema criogel-IDA-Cu²⁺ são apresentadas na Figura 7. Como apresentado na Tabela 6, para a maioria dos casos estudados o valor do fator estérico diminuiu com o aumento da temperatura, sendo que, em alguns casos, os valores passam por um mínimo na temperatura 30°C. De fato, como observado na Figura 7, o aumento da temperatura acarreta no aumento da capacidade de adsorção da lactoferrina no criogel-IDA-Cu²⁺. Quando ocorre a elevação da temperatura no processo de adsorção, ocorre uma diminuição nas energias de interação proteína-água o que acarreta no aumento das interações por coordenação íon-proteína. Dessa forma o aumento na temperatura é suficiente para desestruturação da região difusa da dupla camada elétrica e, assim, as moléculas de proteína interagem mais fortemente com a resina o que favorece o fenômeno adsortivo.

Quanto ao comportamento dos valores do fator estérico, σ , em relação à força iônica e ao pH, foi observado, o fator estérico diminuiu com o aumento da força iônica, exceto para as condições de pH 8, 20°C e a 30°C. No que se refere ao pH, observa-se que em alguns casos o fator estérico diminuiu com o aumento do pH. Sendo que, em alguns casos, houve um valor máximo na condição de pH 7,0. Justificativas para tais comportamentos podem ser discutidas devido ao fato de que em IMAC, a seletividade e capacidade de adsorção dependem, além dos quelatos metálicos imobilizados na matriz cromatográfica, da composição da fase móvel. A retenção de proteínas em adsorventes IMAC ocorre devido à contribuição de diversas interações físico-químicas, que podem ser intensificadas ou minimizadas dependendo da composição da fase móvel. Quando IMAC é operado em alta concentração de sal (0,5 a 1,0 mol L⁻¹ de NaCl, por exemplo), predominam as ligações de coordenação entre íons metálicos imobilizados e resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície das proteínas e, em menor intensidade, ocorrem interações eletrostáticas. Os efeitos eletrostáticos são mais intensos quando se emprega uma fase móvel com baixa força iônica. Estes efeitos ocorrem entre

proteínas carregadas e as cargas positivas dos íons metálicos ou as cargas negativas remanescentes na superfície da matriz (grupos funcionais não reagidos durante a ativação e o acoplamento do agente quelante ou grupo carboxílico residual de agentes quelantes, devido à quelação incompleta dos íons metálicos) (Winzerling et al., 1992, Ueda et al., 2003, Gutiérrez et al., 2007).

Tabela 6 – Fator estérico da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em diferentes concentrações de sal, pH e temperatura.

[NaCl] (mM)	Fator estérico								
	Temperatura 20°C			Temperatura 30°C			Temperatura 40°C		
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
200	26,89	29,88	17,31	22,39	21,84	21,32	22,90	24,34	21,85
400	24,40	25,01	17,67	20,74	22,06	22,12	21,01	22,27	17,74
600	23,93	23,08	17,97	19,40	20,25	20,67	20,49	20,76	15,97
800	21,86	21,31	18,04	19,19	19,70	19,33	18,80	19,14	15,02
1000	20,67	20,20	19,74	19,78	18,69	18,54	18,13	17,82	14,01

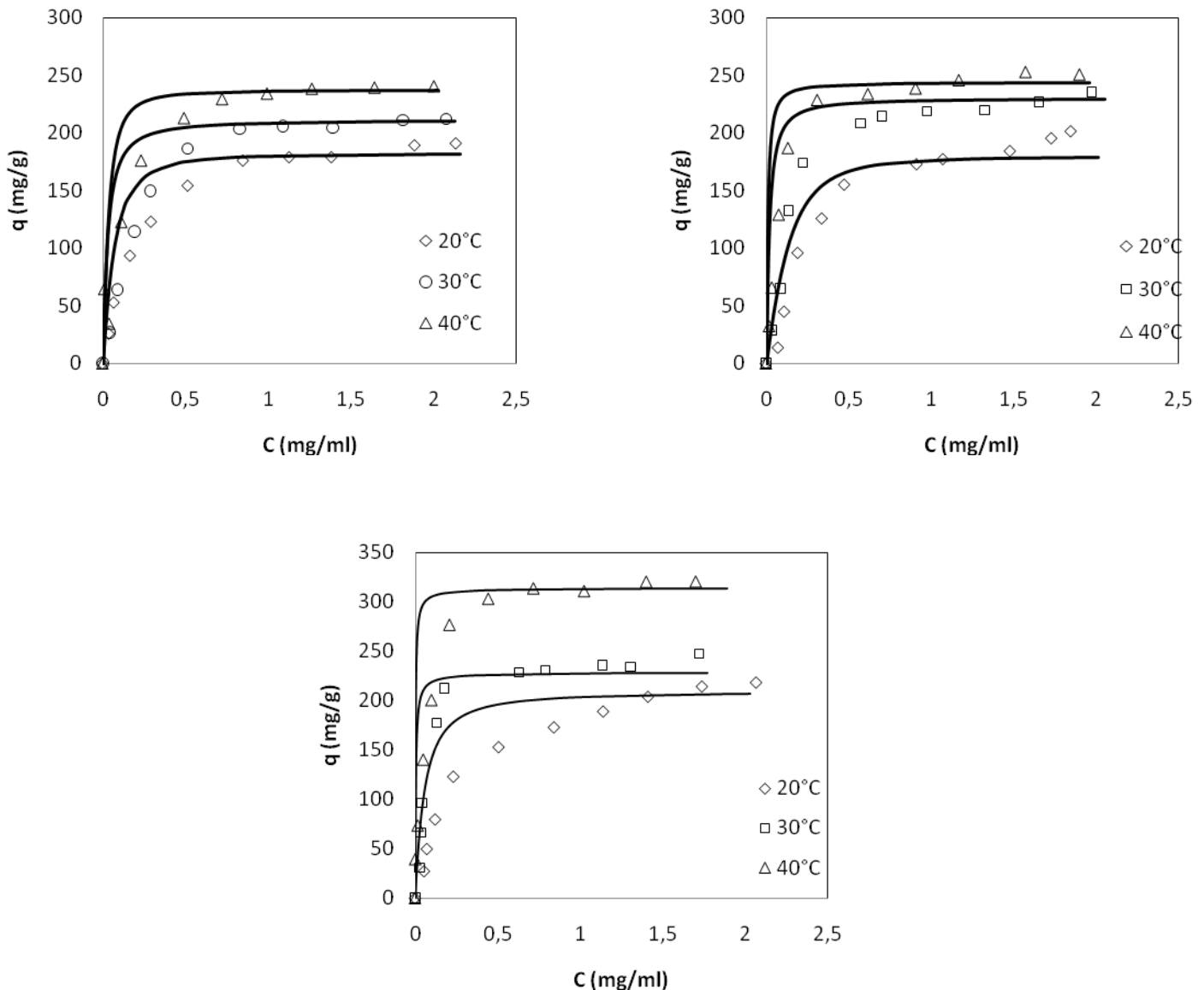


Figura 7 – Isothermas de adsorção de lactoferrina de soro bovino em 200mM de NaCl e (a) pH 6,0, (b) pH 7,0 e (c) pH 8,0. Linhas sólidas foram calculadas a partir do modelo SMA

Quanto ao pH em IMAC, a ligação de coordenação é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da biomolécula estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em uma condição na qual o valor de pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis. Além disso, como as ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados podem ocorrer simultaneamente com interações eletrostáticas, a adsorção de proteínas em IMAC é dependente do pH. Porém, os efeitos de cada interação na adsorção da proteína são parâmetros difíceis de serem determinados.

Apesar de, por um lado, a alta força iônica culminar na forte ligação do íon na superfície do criogel e, essa ligação conduzir a um “carregamento” deste íon ligante, o que diminui o número de sítios acessíveis à proteína (Liu & Stellawagen, 198, Liu et al., 1984) via interação eletrostática, por outro lado há uma maior seletividade da ligação de coordenação, que por sua vez é favorecida em altas concentrações salinas. Um resultado direto do “carregamento” do íon ligante é a diminuição da capacidade de adsorção que aparece no modelo SMA como um aparente aumento do fator estérico. Assim, o fator estérico deve ser considerado como um parâmetro que representa a blindagem estérica da proteína adsorvida e o “carregamento” do íon ligante em si.

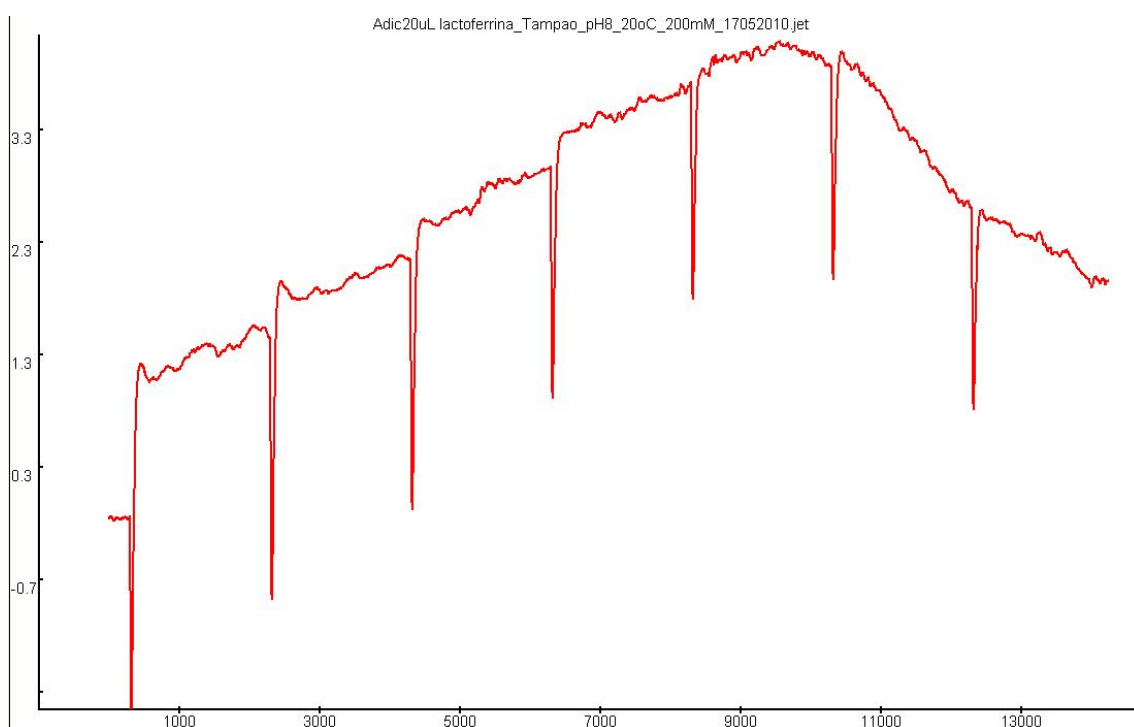
A aplicabilidade do modelo SMA

Uma vez que a dependência dos parâmetros do modelo SMA em relação a força iônica, pH e temperatura foi determinada (Tabelas 5 e 6), as isotermas de equilíbrio de adsorção puderam então serem previstas usando a equação 15. A Figura 7 mostra a comparação entre as simulações do modelo SMA e os dados de equilíbrio por afinidade, no sistema criogel-IDA-Cu²⁺, a 200mM de concentração do NaCl e nas temperaturas (20°C, 30°C e 40°C) e valores de pH (6,0, 7,0 e 8,0) avaliados no trabalho. Verifica-se que a capacidade de adsorção prevista pelo modelo foi maior do que os correspondentes valores experimentais na maioria dos casos avaliados. No pH próximo do ponto isoelétrico da lactoferrina (pI 8.7) a previsão do modelo diminuiu ainda mais. Sabe-se que a carga líquida e a estrutura tridimensional das proteínas são influenciadas pelo pH da solução tampão. Como a lactoferrina possui 9 resíduos de histidina (principal responsável pela retenção dessa proteína no sistema criogel-IDA-Cu²⁺) que possui pka = 6,5, em condições acima desse valor o meio se encontra desprotonado favorecendo outros tipos de ligação que não somente a por afinidade. Assim, nessas condições, o modelo SMA não conseguiu prever tal variação de comportamento.

3.2. Análise termodinâmica

Termograma microcalorimétrico

A Figura 8 resume os dados de titulação da lactoferrina no sistema criogel-IDA-Cu²⁺ por microcalorimetria de titulação isotérmica. Cada termograma contém cerca de 8 picos que correspondem à solução de lactoferrina na suspensão de criogel. A figura contendo picos para cima representa um processo exotérmico de adsorção, enquanto que a figura contendo picos para baixo representa um processo endotérmico de adsorção. A variação da entalpia de titulação da lactoferrina na célula do microcalorímetro foi calculada integrando a área sob cada pico.



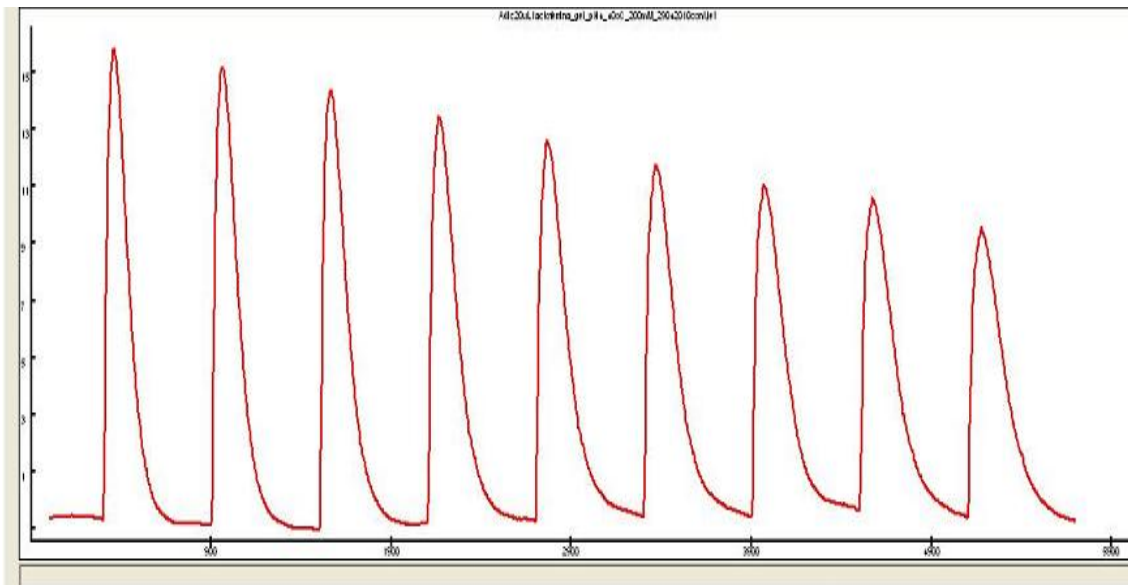


Figura 8 – Termograma microcalorimétrico típico de titulação da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ sob diferentes condições de operação: (a) termograma endotérmico, (b) termograma exotérmico.

O processo de adsorção é determinado termodinamicamente pela variação da energia livre de Gibbs de adsorção, $\Delta_{ads}G^\circ$. Esta função termodinâmica fornece informações associadas à interação intermolecular, $\Delta_{ads}H^\circ$, e à configuração molecular do sistema, $\Delta_{ads}S^\circ$. A relação entre estas variáveis é dada pela equação de Gibbs-Helmoholtz $\Delta_{ads}G^\circ = \Delta_{ads}H^\circ - T\Delta_{ads}S^\circ$. Assim, para elucidar a termodinâmica de adsorção da lactoferrina é necessário obter os valores de $\Delta_{ads}G^\circ$, $\Delta_{ads}H^\circ$ e $\Delta_{ads}S^\circ$.

Para a obtenção de $\Delta_{ads}G^\circ$, por meio da Equação 19, o valor k' foi calculado de acordo com Jacobson e colaboradores (1984):

$$k' = q_m \cdot b \cdot \varphi \quad (26)$$

Onde b e q_m são parâmetros do modelo de Langmuir e φ é a razão das fases.

A Tabela 7 mostra os valores de k' , $\Delta_{ads}G^\circ$ e q_m para os valores de concentração de NaCl, pH e temperatura testados.

Tabela 7 - Valores de energia livre de Gibbs e capacidade máxima aparente de adsorção para diferentes temperaturas e concentrações de NaCl

Temperatura (°C)	pH	Conc.NaCl (mM)	k'	q_m (mg/g)	$\Delta_{ads}G^\circ$ (kJ/mol)
20	8,0	200	328,8413	241,614	-14,1188
20	8,0	1000	66,46801	274,4003	-10,2238
40	6,0	200	58,26126	262,2724	-10,5787
40	6,0	1000	32,99387	209,0465	-9,09893
40	8,0	200	53,82552	336,3949	-10,3726
40	8,0	1000	20,52009	218,8919	-7,86299

O aumento da concentração do sal ocasionou em uma diminuição na quantidade máxima de proteína adsorvida na temperatura de 40° C. Resultado que não pode ser observado na temperatura de 20°C.

Quando uma molécula se aproxima de outra há alteração de suas propriedades moleculares, devido à interação intermolecular ocorrida. Esta alteração pode ser mais pronunciada devido a alguns fatores como temperatura, pH e presença de sal. Para este último, ocorre adsorção competitiva entre a proteína e os ânions de Cl⁻ do sal NaCl adicionado. Pela Tabela 7, observa-se também que os valores de energia livre de Gibbs tornaram-se menos negativos, em termos de valor absoluto, com o aumento da temperatura, do pH e da concentração de NaCl. Neste caso, uma análise mais detalhada da dependência do $\Delta_{ads}H^\circ$ em relação à esses parâmetros se faz necessária para explicar tal comportamento.

O efeito do pH

Em IMAC, a ligação de coordenação é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da biomolécula estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em uma condição na qual o valor do pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis. A figura 9 resume os resultados obtidos de $\Delta_{ads}H^\circ$ (variação da entalpia) na adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺, nos diferentes pH's com temperatura e concentração fixos.

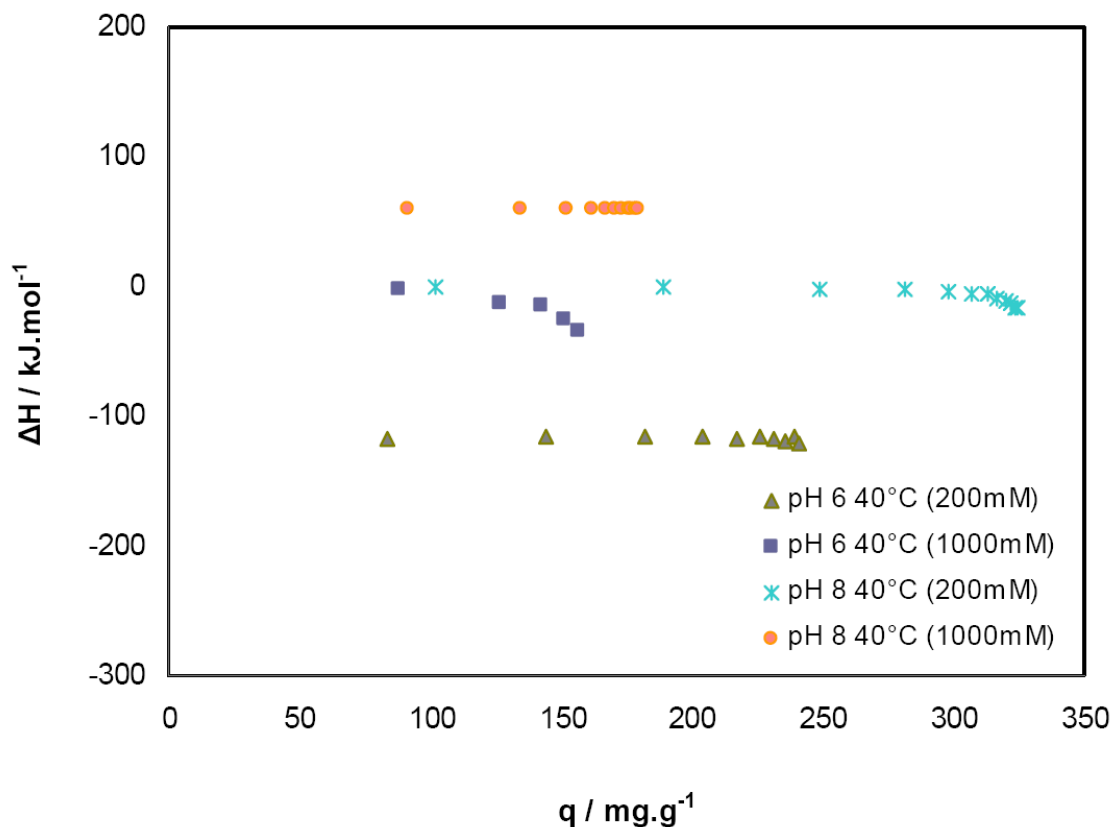


Figura 9 – Entalpia de adsorção ($\Delta_{\text{ads}}H^\circ$) da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em valores de pH (6,0 e 8,0) e concentração de sal (200 e 1000 mM) e temperatura de 40°C.

A entalpia endotérmica de adsorção em pH 8,0, apresentado na Figura 9, é tão alta quanto a valores próximos de 100 kJ /mol (mol adsorvido lactoferrina). Portanto, o estudo conclui que a adsorção de lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ é um fenômeno entropicamente dirigido. Uma discussão mais profunda da lactoferrina adsorvida no criogel necessitou considerar os seguintes processos: (a) as moléculas de água ou íons circundantes ao imidazol foram eliminadas, isto é, processo de desidratação ou de ionização (retirada da dupla camada elétrica) da lactoferrina, (b) moléculas de água em torno do íon metálico imobilizado foram excluídos, isto é, processo de desidratação ou de coordenação dos íons metálicos imobilizados; (c) interação por coordenação e / ou interação não-específica foi formada entre a lactoferrina e do íon metálico imobilizado, (d) a conformação da lactoferrina foi reorganizada, e (e) a reorganização da água excluída ou moléculas de íons na solução aumentou a entropia. Tanto a desidratação como os processos de ionização, ou seja, (a) e (b), são processos endotérmicos. Além disso, a

lactoferrina é uma macromolécula (peso molecular ~ 77kDa), e mais um mol de moléculas de água ou íons é removido ou desidratado quando um mol de lactoferrina coordena com os íons de cobre imobilizados. O processo exotérmico(c), de acordo com a Figura 9, está em seu mínimo quando o pH =6: A formação de um composto de coordenação é improvável porque o átomo de nitrogênio do grupo imidazol está em um estado protonado. É difícil quantificar o calor necessário para a remoção do contra-íon da dupla camada elétrica (EDL) dos arredores do resíduo de histidina, ou seja, o processo (a). Outra possível explicação para o fato é que os resíduos de histidina expostos podem localizar em uma região hidrofóbica da lactoferrina. Assim, a lactoferrina teria que reorganizar a sua conformação (tais como quebra na ligação de hidrogênio ou ponte de sal) para reduzir a tensão superficial de contato entre a região hidrofóbica em torno do resíduo de histidina e a superfície hidrofílica do criogel-IDA-Cu²⁺.

Rearranjos na molécula da proteína lactoferrina em solução tampão HEPES com crescente concentração de NaCl, causa um aumento na entropia do sistema, o que a torna a força motriz da adsorção espontânea em condições em que o processo global se mostra endotérmico. A partir dos resultados da Tabela 8, pode-se concluir, também, que o processo de adsorção foi espontâneo ($\Delta_{ads}G^\circ < 0$) e entropicamente dirigido para alguns casos (Temperatura 20°C e Temperatura de 40°C, pH 8, 1000mM).

Tabela 8 – Média das propriedades termodinâmicas em função da temperatura, concentração de NaCl e pH.

Temperatura (°C)	Concentração de sal (mM)	pH	$\Delta_{ads}G^\circ$ *	$\Delta_{ads}H^\circ$ *	$\Delta_{ads}S^\circ$ *	T* $\Delta_{ads}S^\circ$ *
20	200	8	-14,1188	61,91484	0,259501	76,0338
20	1000	8	-10,2238	30,323	0,138385	40,5468
40	200	6	-10,5787	-116,706	-0,33906	-106,1258
40	1000	6	-9,09893	-65,3897	-0,17984	-56,2899
40	200	8	-10,3726	-7,38989	0,00953	2,9828
40	1000	8	-7,86299	59,93621	0,216611	67,7992

* Parâmetros termodinâmicos dados em kJ/mol.

Efeito da concentração de sal

Trabalhos anteriores têm discutido os efeitos da concentração de sal sobre a capacidade de ligação de proteínas com íons metálicos imobilizados (Wu et al., 1995; Hemdan & Porath, 1985; Belew & Porath, 1990). Do ponto de vista do mecanismo de ligação, a entalpia de adsorção ($\Delta_{ads}H^\circ$) pode ser afetada pela concentração de sal na interação hidrofóbica e eletrostática entre a lactoferrina e o íon metálico imobilizado. Neste trabalho, foram realizados experimentos variando a temperatura (20 e 40°C) concentração de NaCl (200mM e 1000mM) em valores de pH inferiores (6,0) e superiores (8,0) ao valor de pKa (6,5) do grupo imidazol do resíduo de histidina expostos na superfície da lactoferrina, em 20mM de tampão HEPES. A Figura 12 resume os resultados obtidos a partir da variação da entalpia de adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em condição fixas de pH e temperatura e nas duas diferentes concentrações de sal avaliadas.

É interessante notar que o processo de adsorção foi exotérmico em 200mM e 40°C quando o valor de pH foi menor (pH 6,0) e maior (pH 8,0) que o valor do pKa (~6,5) do grupo imidazol do resíduo de histidina. O conteúdo endotérmico tanto da desidratação quanto do processo de reorganização estrutural não foram grandes o suficiente em 200mM e 40°C para superar o montante exotérmico das interações por coordenação e eletrostáticas. A variação de entalpia de adsorção de um valor positivo para o valor negativo pode ser observado na Figura 10 (condição: pH 8 40°C). Possíveis explicações são: (i) um aumento do conteúdo endotérmico de desidratação e a remoção da dupla camada elétrica (isto é processos (a) e (b)) em altas forças iônicas, (ii) um decréscimo no conteúdo exotérmico da interação de coordenação (processo (c)), e a predominância das ligações de coordenação entre os íons metálicos imobilizados e a proteína. O processo de desidratação não é uma função da concentração de sal, como o mecanismo de ligação entre moléculas de água com proteína é, por natureza, uma interação hidrofílica ou pontes de hidrogênio do momento dipolo induzido. Essa mudança de sinal de negativo para positivo nos valores de ΔH_{ads} com o aumento da força iônica, na condição de pH 8,0 e 40°C, pode indicar ainda que a formação da dupla camada elétrica (EDL) parece ser influenciada pela mudança na carga da cadeia lateral do

resíduo histidina. Portanto, a concentração de sal contribui de forma decisiva para o calor liberado por ligações não específicas e para o calor exigido pela remoção da EDL da histidina e de seus resíduos vizinhos.

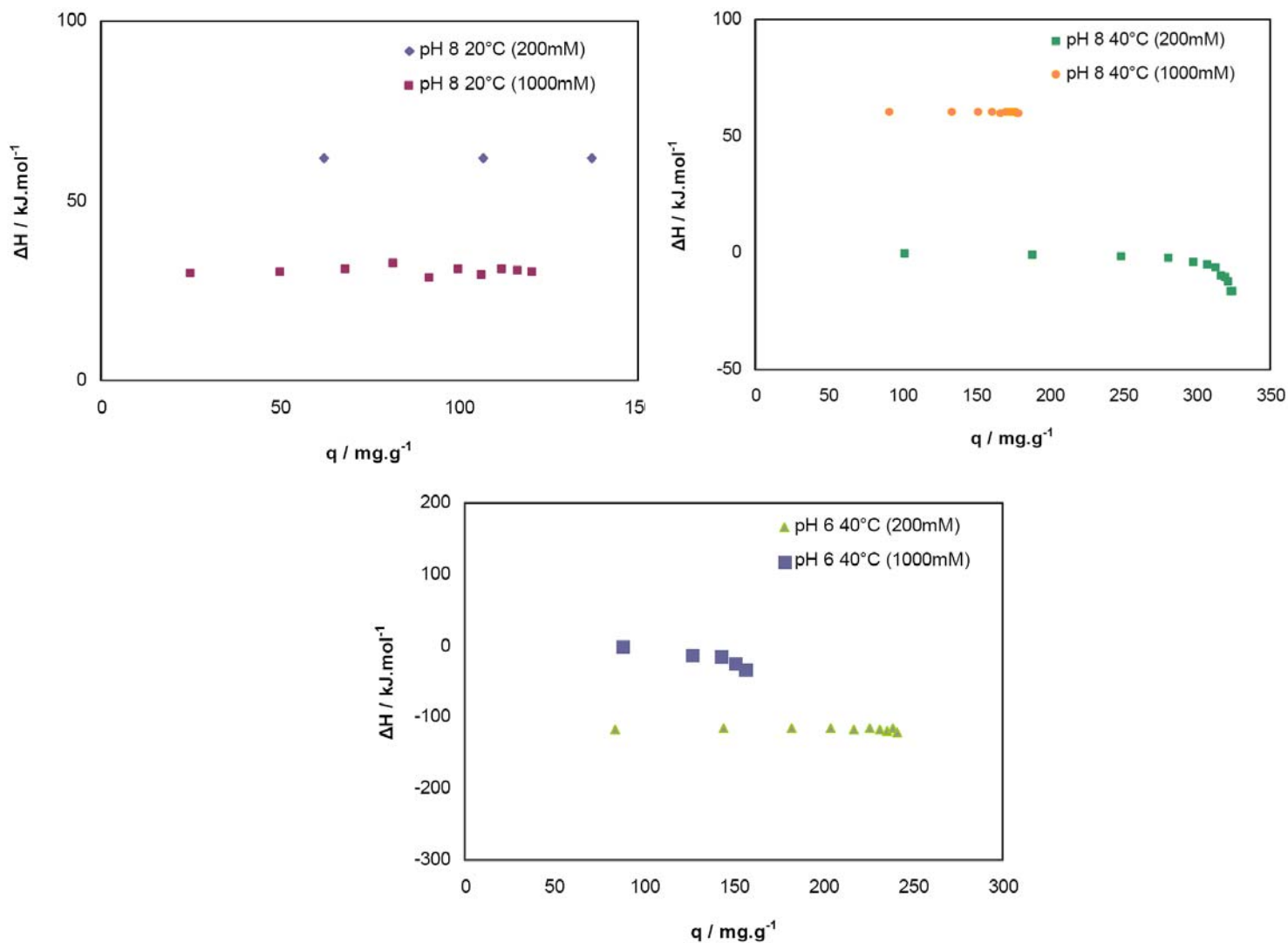


Figura 10 - Entalpia de adsorção ($\Delta_{\text{ads}}H^\circ$) da lactoferrina em criogel-IDA- Cu^{2+} nas concentrações de sal NaCl (200 e 1000 mM) e: (a) pH 8,0; 20°C, (b) pH 8,0; 40°C, (c) pH 6,0; 40°C.

Efeito da temperatura

A Figura 11 resume os resultados obtidos a partir da variação da entalpia na adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ nas duas temperaturas avaliados no trabalho (20 e 40°C), pH 8,0 e em 200 e 1000mM de concentração do sal NaCl.

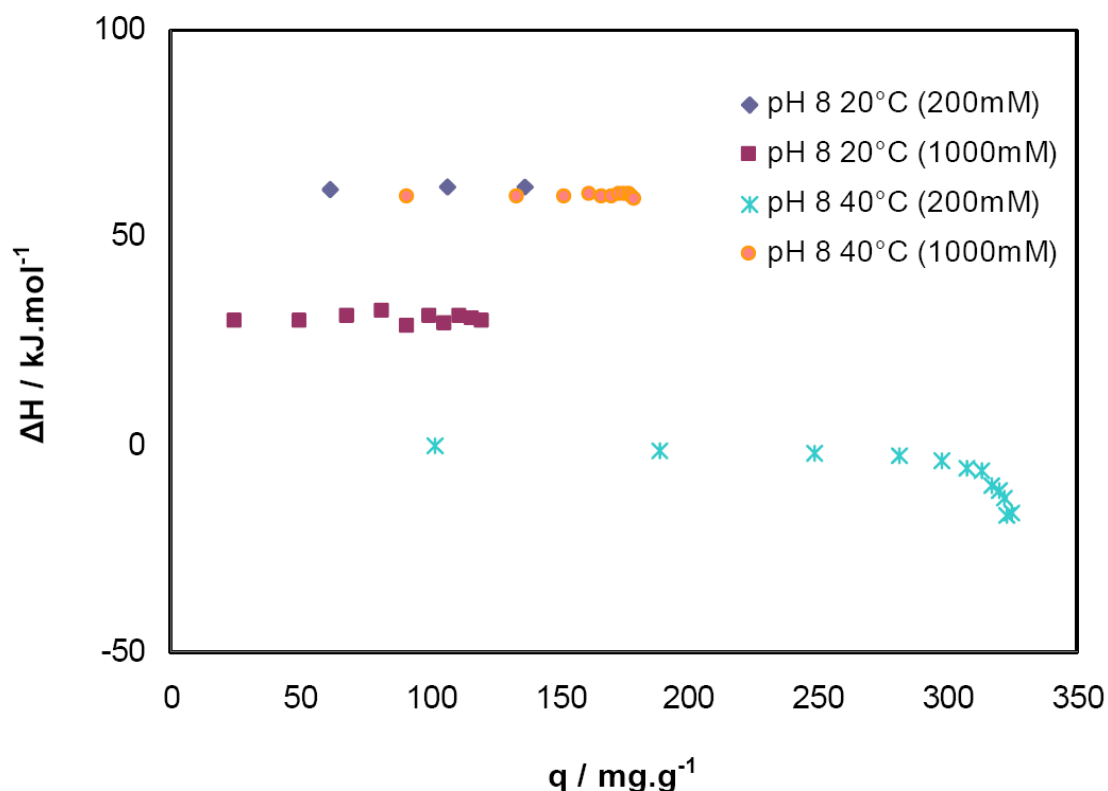


Figura 11 – Entalpia de adsorção ($\Delta_{\text{ads}}H^\circ$) da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ nas temperaturas (20° e 40°C), concentrações de sal (200 e 1000 mM) e pH = 8,0.

Os comportamentos confirmam que o efeito da temperatura sobre o equilíbrio de adsorção da lactoferrina no sistema criogel-IDA-Cu²⁺ é dependente da concentração de sal. O processo de adsorção a 40°C, pH 8,0 em 200mM de sal NaCl é endotérmico e entropicamente dirigido. Analisando o efeito da temperatura sob o $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ é possível observar que com 200 mM de NaCl ocorre uma diferença no balanço energético entre as duas temperaturas avaliadas. Quando ocorre a elevação da temperatura de 20° para 40°C no processo de adsorção em solução tampão HEPES a 200mM de NaCl, há uma diminuição na energia de interações proteína-água e um incremento nas interações por coordenação e eletrostáticas íon-íon e íon-proteína existentes

na dupla camada elétrica. Dessa forma o aumento na temperatura é suficiente para desestruturação da região difusa da dupla camada elétrica. Assim as moléculas de proteína interagem mais fortemente com a resina o que favorece o fenômeno adsorptivo e conseqüentemente leva ao aumento da energia liberada na adsorção tornando o processo exotérmico.

Com o aumento na concentração de NaCl de 200mM para 1000mM, o processo adquiriu um comportamento exclusivamente endotérmico nas duas temperaturas avaliadas (20 e 40°C). Isso sugere que a contribuição do eletrólito na região difusa causa uma desestruturação das moléculas de água de solvatação. Dessa forma, a energia necessária para retirar os contra-íons ligados à resina e da água ligada à proteína é maior que as contribuições de interação proteína-adsorvente e contra-íon/água, tornando o processo de adsorção nessas condições endotérmico. O efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção da lactoferrina no sistema de afinidade criogel-IDA-Cu²⁺, pode ser esclarecido levando em consideração as seguintes sugestões: (i) a energia necessária para desidratação e remoção da dupla camada elétrica é reduzida com a elevação da temperatura quando o processo é conduzido em solução com 200mM de NaCl, (ii) as forças de interação se tornam mais significantes quanto à liberação de energia com a elevação da temperatura para o processo em solução com 1000mM de NaCl, (iii) a energia necessária para o rearranjo conformacional da proteína após a adsorção sugestivamente diminui com o aumento da temperatura no processo com 200mM de NaCl.

Os resultados apresentados até o momento enfatizam os fundamentos do efeito da temperatura sobre a natureza da carga líquida da proteína que, por sua vez, diminui com o aumento da temperatura. Efeito semelhante pode ser observado no estudo microcalorimétrico do mecanismo de interação de moléculas de proteína com gel contendo metal quelatado, realizado por Lin et al., 2001.

O presente estudo ainda leva as seguintes conclusões, em baixa força iônica (200mM) as forças de interação por coordenação e eletrostáticas predominam, pois a utilização de fase móvel com baixa força iônica permite que ocorram, predominantemente interações eletrostáticas, fazendo com que o comportamento do quelato se assemelhe ao de uma resina de troca iônica. Essa pode, então, ser a explicação para os valores de $\Delta_{ads}H^\circ$ na temperatura

de 40°C e força iônica de 200mM serem negativos, constatando o processo de adsorção da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ como exotérmico, nessas condições. As interações por coordenação tornam-se mais apreciáveis com o aumento da concentração salina, devido à diminuição ou supressão das interações eletrostáticas, comportamento esse verificado pelos valores positivos de $\Delta_{ads}H^\circ$ em ambas as temperaturas e em alta concentração salina (1000mM).

4. Conclusão

Neste trabalho foi estudada a interação entre a lactoferrina e um adsorvente de afinidade em íons metálicos, em relação à concentração de sal, pH e temperatura. O aumento da temperatura e do pH afetou positivamente a capacidade máxima do adsorvente, enquanto que o oposto foi observado para a concentração de sal.

A variação da entalpia de ligação da lactoferrina em criogel-IDA-Cu²⁺ em relação à variação de pH, concentração de sal e temperatura foi discutido. Com base na análise pode-se concluir que: a medida direta de entalpia entre a lactoferrina e o íon metálico imobilizado pode ser obtida por titulação microcalorimétrica. Esta abordagem pode ser estendida para a adsorção de outras proteínas em íons metálicos imobilizados em géis, além de facilitar uma compreensão mais profunda do mecanismo de interação de possíveis novas aplicações em IMAC. A interação entre a proteína e o íon metálico foi considerado em cinco processos seqüenciais, e a remoção da dupla camada elétrica do sítio de ligação da lactoferrina foi responsável pela mudança de entalpia endotérmica para exotérmica em concentração de sal de 200mM, pH 8 e temperatura de 40°C.

Como conclusão, a microcalorimetria de titulação é uma poderosa ferramenta para medir diretamente a entalpia no estudo de ligação entre a biopartícula e o suporte sólido. Os resultados deste estudo podem fornecer informações termodinâmicas valiosas sobre o mecanismo de ligação.

5. Referências bibliográficas

Belew, M and Porath, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *J. Chromatography* 516, 333, 1990.

Bradford M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

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

Brooks, C.A and Cramer, S.M. Solute affinity in ion-exchange displacement chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, 51 3847, 1996.

Brooks, C.A and Cramer, S.M. Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal*. 38, 1992.

Burks, E.A, and Iverson, B. L. In vitro scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Biotechnol. Prog.* 11, 112, 1995.

Chase, H.A. Prediction of the performance of macropreparative affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 297, 179, 1984.

Chen, L, Guo, C, Guan, Y and Liu, H. Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Separation and Purification Technology*, 56: 168-174, 2007.

Chen, W.D, Hu, H.H, Wang, Y.D. Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. *Chemical Engineering Science*, 61 7068 – 7076 2006

Chen, W.-D, Sun, Y. Analysis of steric mass-action model for protein ion-exchange equilibrium. *Journal of Chemical Industry and Engineering* 53, 88–91 2002.

Chen, W.-Y, Wu, C.-F, and Liu, C.-C. Microcalorimetric Studies of the Interactions of Lysozyme with Immobilized Cu(II): Effects of pH Value and Salt Concentration. *Journal Colloid Interface Science* 180, 135, 1996.

Dubel, S, Breitling, F, Kontermann, R, Schmidt, T, Skerra, A and Little, M. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies. *J. Immunol. Methods* 178, 201, 1995.

Freitag, R and Vogt, S. Comparison of particulate and continuous-bed columns for protein displacement chromatography. *Journal Biotechnology* 78 69, 2000.

Gadma, S.D, Jayaraman, G, Cramer, S.M. A Predictive Model for Salt Effects on the Dye-Ligand Affinity Adsorption Equilibrium of Protein. *J. Chromatography A* 630-37, 1993.

Galaev, I.Y, Garg, N and Mattiasson, B. Affinity Extraction of Dye- and Metal Ion-Binding Proteins in Polyvinylpyrrolidone-Based Aqueous Two-Phase System. *J. Chromatogr. A*, 684 45, 1994.

Gallant, S.R, Kundu, A, Cramer, S.M. Optimization of step gradient separations: Consideration of nonlinear adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 47 355, 1995.

Gallant, S.R, Vunnum, S, Cramer, S.M. Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: linear gradient separations. *Journal of Chromatography A* 725 295, 1996.

Gerard, F, Mao, M-Q and Hearn, M. Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. *Journal Chromatography A*, v. 763, p.71-90, 1997.

Gill, D.S, Roush, D.J, Shick, K.A and Willson, R.C. Microcalorimetric characterization of anion-exchange adsorption of recombinant cytochrome b₅ and its surface-charge mutants. *Journal of Chromatography A*. v . 715, p. 81-93, 1995.

Gutiérrez, R, Martín del Valle, E.M and Galán, M.A. Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. *Sep. Purif. Rev.*, 36, 71, 2007.

Hanes, C.S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Journal Biochemistry* 26, 1406-1421 1932.

Hanson, M, Unger, K.K, Denoyel, R and Rouquerol, J. Interactions of lysozyme with hydrophilic and hydrophobic polymethacrylate stationary phases in reversed phase chromatography (RPC *J. Biochem. Biophys. Methods* 29, 283, 1994.

Hemdan, E. S and Porath, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. II: Interaction of amino acids with immobilized Nickel Iminodiacetate. *J. Chromatogr.* 323, 255, 1985.

Herve, F, Gomas, E, Duche, J.-C and Tillement, J.-P. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein. *J. Chromatogr.* 615, 47, 1993.

Hutchens, T. W and Yip, T. T. Protein interactions with immobilized transition metal ions: Quantitative evaluations of variations in affinity and binding capacity. *Analytical. Biochemistry.* 191, 160, 1990.

Jen, S.-C.D and Wang, N.-H. "Displacement Competition of Proteins and Imidazole in Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography," in *AIChE Annual Meeting*, Miami, FL, Nov., 1992.

Johnson, R.D and Arnold, F.H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. *Biotech. Bioeng.* 48, 437, 1995a.

Johnson, R.D and Arnold, F.H. The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta* 1247, 293, 1995b.

Kato, Y, Nakamura, K and Hashimoto, T. Macroporous synthetic hydrophilic resin-based packings for the separation of biopolymers. *J. Chromatogr.* 354, 511, 1986.

Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *Journal of American Chemical Society.* V.30,p.2263-2295, 1916.

Lin, F.Y, Chen, C.S, Chen, W.Y and Yamamoto, S. Microcalorimetric studies of interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) – effects of NaCl concentration, pH value and temperature. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 281-289, 2001.

Lira, R.A, Minim, L.A, Bonomo, R.C.F, Minim, V.P.R., da Silva, L.H.M, da Silva, M.C.H. Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropeptide on anion-exchange chromatography adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 1216 4440–4444, 2009.

Liu, Y.C and Stellwagen, E. Accessibility and multivalency of immobilized Cibacron Blue F3GA. *Journal of Biological Chemistry* 262, 583–588, 1987.

Liu, Y.C. Accessibility and multivalency of immobilized Cibacron Blue F3GA. *Journal of Biological Chemistry* 262 583, 1987.

Lundstrom, I and Elwing, H. A Mechanistic Approach to Modeling Single Protein Adsorption at Solid–Water Interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 136, 68, 1990.

Noppe, W, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Vanhoorelbeke, K, Mattiasson, B, Deckmyn, H. Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands purification of lactoferrin from defatted milk, *Journal of Chromatography A*, 1101: 79 85, 2006.

Plate, K, Beutel, S, Buchholz, H, Demmerc, W, Fischer-Fruhholz, S, Reif, O, Ulber, R, Scheper, T. Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1117 81–86, 2006.

Porath, J and Olin, B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 22, 1621–1630, 1983.

Porath, J, Carlsson, J, Olsson, J and Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598–599, 1975.

Scatchard, G. The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.*

Y. Acad. Sci. 51, 658, 1949.

Scopes, R.K. Dye-ligands and multifunctional adsorbents: An empirical approach to affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 165 235, 1987.

Sharma, S, Agarwal, G.P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, 37, 3491, 2002.

Sips, R. Effects of surface heterogeneity in adsorption from binary liquid mixtures. I. Adsorption from ideal solutions. *Advances in Chemical Engineering. Chemical Engineering* 18, 1024, 1950.

Songping, Zhang, Yan, Sun. Steric mass-action model for dye–ligand affinity adsorption of protein. *Journal of Chromatography A*, 957 89–97, 2002.

Suh, S.-S and Arnold, F. H. A mathematical model for metal affinity protein partitioning. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 682, 1990.

Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. *Chemistry Macromolecular Symp.* 17, 335, 1988.

Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotech.* 3, 1, 1985.

Sulkowski, E. The saga of IMAC and MIT. *BioEssays* 10, 170, 1989 .

Tozzi, C, Anfossi, L, Giraudi, G. Affinity chromatography techniques based on the immobilisation of peptides exhibiting specific binding activity. *J. Chromatogr. B*, 797 289, 2003.

Ueda, E.K.M, Gout, P. W, Morganti, L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. *Journal Chromatography A*, 988, 1, 2003.

Vanum, E and Blowers, D.P. Affinity Separatoin:Immobilized Metal Ion Chromatography.*Encyclopedia of Separation Science*, 277-283, 1995.

Walenius, M, Flodin, P and Porath, J. Metal-uptake behaviour by a novel pyrazole-containing ligand immobilised on to poly(glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate). *J. Chromatogr.* 604, 5, 1992.

Wankat, P.C. Rate Controlled Separations, Elsevier, NewYork, 1990.

Wirth, H.J, Unger, K.K, Hearn, M.T.W. Influence of Ligand Density on the Properties of Metal-Chelate Affinity Supports. *Analytical Biochemistry*, 208: 16-25, 1993.

Wong, W. J, Albright, R. L, and Wang, N.-H.L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) Chemistry and bioseparation applications. *Separ. Purif. Method* 20, 49, 1991.

Wu, C.-F, Chen, W.-Y, and Liu, H.-S. Microcalorimetric Study of the Interaction of Imidazole with Immobilized Cu(II): Effects of pH and Salt Concentrations. *J. Chem. Eng. Jpn.* 28(4), 419, 1995 .

Wu, D.L and Walters, R.R. Effects of stationary phase ligand density on high-performance ion-exchange chromatography of proteins. *Journal Chromatography A.* 598 7, 1992.

Wuenschell, G. E, Narajo, E and Arnold, F. H. Aqueous Two-Phase Metal Affinity Extraction of Heme Proteins. *Bioprocess. Eng.* 5, 199, 1990.

Conclusões Gerais

A partir dos resultados obtidos por meio do estudo da captura direta da lactoferrina de soro de queijo ultrafiltrado em colunas monolíticas de criogel imobilizadas com ions de cobre foi possível observar o alto grau de afinidade dos residuos de histidina encontrados na superfície da lactoferrina para com os ions de cobre imobilizados na matriz. A matriz de criogel, que possui supermacroporos (10-100 μ m) se mostrou apta a processar materiais particulados, como no caso do soro de queijo em estudo.

No estudo da adsorção da lactoferrina no sistema criogel-IDA-Cu²⁺ por cromatografia por afinidade em ions metálicos imobilizados foi observado que o processo é dependente da concentração de sal, pH e temperatura.

Na simulação do processo de adsorção, foi observado ajuste de todos os modelos entre os dados experimentais e calculados, principalmente no modelo de Langmuir-Freundlich.

A adsorção da lactoferrina de soro de queijo em adsorvente criogel-IDA-Cu²⁺ foi estudada utilizando a microcalorimetria de titulação isotérmica para medir informações termodinâmicas sobre esse processo. Dados de isoterma foram obtidos nas temperaturas de 20 e 40°C, pH 6,0 e 8,0 e concentração de sal NaCl 200mM e 1000mM. Os dados de equilíbrio foram ajustados usando o modelo de Langmuir e o processo foi observado como espontâneo. A temperatura e pH afetaram positivamente a interação da proteína e o adsorvente. Os estudos microcalorimétricos indicaram entalpia de adsorção endotérmica para alguns casos (20°C e 40°C pH 8,0, 1000mM), sendo o processo de adsorção entropicamente dirigido para tais condições