

DÉBORA MARA DE JESUS CASSIMIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DE AVIDINA E
LISOZIMA DA CLARA DE OVO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C345d
2018
Cassimiro, Débora Mara de Jesus, 1985-
Desenvolvimento de uma estratégia de purificação de
avidina e lisozima da clara de ovo / Débora Mara de Jesus
Cassimiro. – Viçosa, MG, 2018.
x, 75f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Antônio Minim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Proteínas - Purificação. 2. Avidina. 3. Lisozima.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.02

DÉBORA MARA DE JESUS CASSIMIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DE AVIDINA E
LISOZIMA DA CLARA DE OVO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de março de 2018

Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
(Coorientadora)

Valéria Paula Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal

Andréa Alves Simiqueli

Luis Antonio Minim
(Orientador)

*Aos meus pais, Vanilda e Claudomir, e aos meus irmãos Cláudia, Rochelle e João,
Pelo apoio e torcida para que eu evoluísse sempre.
Aos meus sobrinhos Luís Eduardo e Nicolý,
Por fazerem meus dias mais felizes.
Ao meu esposo Eluane, por dedicar seu amor a mim e estar sempre ao meu lado.
À dindinha Leninha, que sempre me incentivou a seguir estudando.*

Dedico esta dissertação

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me desamparar em nenhum momento, por me possibilitar chegar até aqui e por todas as pessoas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais Claudomir e Vanilda, aos meus irmãos Cláudia, Rochelle e João, por todo incentivo, amor incondicional e apoio.

Ao meu esposo Eluane, por estar ao meu lado desde o início, pela amizade, por me entender, apoiar, auxiliar e dedicar seu amor a mim.

À minha madrinha, dindinha Leninha, por desde cedo me incentivar, apoiar e ajudar no que fosse necessário.

A toda minha família e amigos pelas alegrias compartilhadas e pelas orações.

À Professora Vânia, pela torcida, incentivo e amizade.

Ao meu orientador, Professor Luis Antonio Minim, pelos esclarecimentos, paciência, ensinamentos e confiança.

À Lizzy, à Paula Chéquer e à Isabelle Neves, por tanto auxílio, paciência, ensinamentos, por estarem sempre disponíveis para auxiliar e pela amizade.

À Professora Valéria pelas contribuições.

Aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento e simulação de Processos (LADESP), em especial ao Gabriel Luz, que sempre me auxiliou mesmo ante às dificuldades que enfrentou, e se tornou um grande amigo, dividindo essa caminhada comigo, compartilhando conhecimentos e por sempre ter torcido por mim.

Aos colegas de curso Bruna Fernanda, Rafaela Teixeira e Thamiris Dutra pela torcida, ajuda e apoio.

Ao meu eterno amigo Gabriel Dias, que desde o curso técnico sempre contribuiu muito para meu crescimento.

Aos meus primeiros orientadores, Adriano Aguiar Mendes e Christiano Vieira Pires, pelo incentivo, por acreditarem em mim desde o início e pela amizade que persiste.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Débora Mara de Jesus Cassimiro, filha de Claudomir Cassimiro e Vanilda Mara de Jesus Cassimiro. Nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, em 1º de junho de 1985.

Em agosto de 2009 iniciou a graduação em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de São João del-Rei - *Campus* Sete Lagoas, colando grau em julho de 2015. Em agosto de 2015, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 1	4
1. REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1 CLARA DE OVO	4
1.1.1. Avidina	6
1.1.2 Lisozima.....	9
1.2. Criogéis.....	12
1.3. Cromatografia.....	15
1.3.1 Cromatografia por Afinidade (CLAF)	17
1.3.2 Cromatografia por Troca Iônica (CTI).....	21
1.4. Referências	25
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO INOVADOR E DE BAIXO CUSTO PARA PURIFICAÇÃO DE AVIDINA E LISOZIMA DA CLARA DE OVO36	
1. Introdução.....	36
2. Materiais e Métodos	38
2.1 MATERIAIS	38
2.2 MÉTODOS.....	38
2.2.1 Síntese dos Criogéis	38
2.2.2 Ativação do criogel com TRIS	39
2.2.3 Ativação do criogel com AMPSA	39
2.2.4 Determinação do grau de ligação (G), densidade (D) e rendimento (E) do processo de ativação para o criogel de troca catiônica	40
3.0 Caracterização dos Criogéis	40
3.1 CAPACIDADE DE INCHAMENTO	41
3.2 GRAU DE EXPANSÃO (ED).....	41
3.3 Distribuição de tempos de residência (DTR).....	42
3.4 Porosidade.....	43
3.5 Dispersão Axial	43
3.6 Altura equivalente a pratos teóricos (AEPT)	43
3.6 PERMEABILIDADE HIDRÁULICA	44
3.7 CAPACIDADE IÔNICA DO CRIOGEL ATIVADO COM AMPSA (Λ)	44
4. ESTRATÉGIA DE CAPTURA DA AVIDINA E LISOZIMA DA CLARA DE OVO.....	45

4.1	PREPARO DA CLARA DE OVO.....	45
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
	<i>ESTUDO DA CAPTURA DA LISOZIMA.....</i>	<i>46</i>
	<i>ESTUDO DA CAPTURA DA AVIDINA.....</i>	<i>46</i>
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA AVIDINA E DA LISOZIMA.....	47
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS.....	47
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LISOZIMA.....	48
4.6	RECUPERAÇÃO E FATOR DE PURIFICAÇÃO.....	48
4.7	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO CRIOGEL.....	50
	<i>CAPACIDADE DE INCHAMENTO (S) E GRAU DE EXPANSÃO (ED).....</i>	<i>50</i>
	<i>POROSIDADE.....</i>	<i>51</i>
	<i>DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA, DISPERSÃO AXIAL E ALTURA EQUIVALENTE A PRATOS</i> <i>TEÓRICOS.....</i>	<i>53</i>
	<i>PERMEABILIDADE AO ESCOAMENTO.....</i>	<i>56</i>
	<i>GRAU, DENSIDADE E RENDIMENTO DO PROCESSO DE ENXERTIA DO CRIOGEL ATIVADO COM AMPSA</i> <i>.....</i>	<i>58</i>
	<i>ESTUDO DA CAPTURA DA LISOZIMA.....</i>	<i>59</i>
	<i>ESTUDO DA CAPTURA DA AVIDINA.....</i>	<i>61</i>
6.	Conclusões.....	67
7.	Referências.....	68
	VETTER, S.; MIRON, T.; WILCHECK, M. Affinity purification of the avidin protein family, based on crystal structures of avidin-HABA complexes. Journal of Chromatography B, v. 1093- 1094, p. 113-118, 2018.....	74

RESUMO

CASSIMIRO, Débora Mara de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018.
Desenvolvimento de uma estratégia de purificação de avidina e lisozima da clara de ovo.
Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadoras: Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo e Valéria Paula Rodrigues Minim.

As diversas propriedades tecnológicas da avidina e da lisozima propiciam o desenvolvimento de técnicas visando a purificação dessas proteínas a partir da clara de ovo. É desejável que os processos para purificação das proteínas apresentem número de etapas reduzidas, que sejam de baixo custo, além de apresentarem eficiência na separação e elevada pureza das proteínas purificadas. A utilização da cromatografia de troca iônica para a purificação da lisozima apresenta o inconveniente da presença da avidina nas frações de lisozima, devido à similaridade entre o ponto isoelétrico (pI) das proteínas. Para purificação da avidina a cromatografia por afinidade se torna inviável devido ao alto custo do ligante, bem como a baixa vida útil da matriz cromatográfica. Neste estudo, foi utilizado um criogel supermacroporoso ativado com tris hidroximetil aminometano (TRIS) para captura da lisozima da clara de ovo. Em uma segunda etapa, a cromatografia de troca catiônica, através de um criogel ativado com AMPSA (ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico), foi utilizada para captura da avidina da clara de ovo. Os criogéis utilizados apresentaram estrutura esbranquiçada e esponjosa. A matriz utilizada para captura da lisozima apresentou porosidade igual a 0,79 e a utilizada para captura da avidina 0,90, ambas apresentaram baixa resistência ao escoamento bem como baixa dispersão axial. A capacidade de inchamento, o grau de expansão para o criogel ativado com TRIS e AMPSA foram, respectivamente 15,15 Kg/Kg e 18,34 L/Kg; 19,56 Kg/Kg e 21,05 L/Kg. O coeficiente de dispersão axial variou de 0,0954 a 0,739 cm²/min para o criogel de afinidade e de 0,0954 a 5958 cm²/min para o criogel de troca catiônica. A altura equivalente (HETP) a pratos teóricos situou-se entre 0,100 e 0,148 cm para o criogel de afinidade e 0,122 a 0,168 cm para o criogel de troca catiônica. A matriz de afinidade apresentou permeabilidade ao escoamento de 3,34 x 10⁻¹³ m² e a de troca catiônica de 2,0 x 10⁻¹³ m². Para o criogel de troca catiônica calculou-se também o grau da enxertia (34,15%), a densidade de ligação (1,65 x 10⁻³ mol/Kg), o rendimento da enxertia (4%) e a capacidade iônica de ligação (582,74 x 10⁻³ mol_{Na+}/Kg_{criogel seco}). Na etapa de captura da lisozima, a proteína purificada apresentou pureza média de 90%, fator de purificação igual a 19,42 e rendimento de 30,07%. O efeito da variação do pH sobre o rendimento e a concentração na captura da avidina foi avaliado, sendo que em pH 9,0 maior rendimento médio foi obtido (46,8%) e em pH 10,0 maior concentração média (0,0043 mg/mL)

foi recuperada. A lisozima foi purificada satisfatoriamente através da utilização do criogel funcionalizado com o TRIS, evidenciando que o ligante é realmente específico para essa proteína. O novo protocolo para purificação da avidina permitiu que fossem alcançados rendimento e pureza superiores à maioria dos trabalhos relatados na literatura para a mesma proteína, além disso, o protocolo utilizado nesse trabalho utilizou um número de etapas reduzido, bem como reagentes baratos (que conferiram funcionalização à matriz), viabilizando a utilização do mesmo para purificação da proteína e caracterizando-o como uma técnica rápida e de baixo custo.

ABSTRACT

CASSIMIRO, Débora Mara de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Development of a strategy for the purification of avidin and lysozyme egg white.** Advisor: Luis Antonio Minim. Co-Advisors: Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo and Valéria Paula Rodrigues Minim.

The various technological properties of avidin and lysozyme facilitate the development of techniques for the purification of these proteins from egg white. It is desirable that the processes for purifying the proteins have a number of reduced steps that be low cost, in addition to having efficiency in the separation and high purity of the purified proteins. The use of ion exchange chromatography for the purification of lysozyme has the drawback of the presence of avidin in the lysozyme fractions. This occurs because there is a similarity between the isoelectric point (pI) of proteins. In the purification process of avidin, affinity chromatography becomes infeasible. First because of the high cost of the binder and second because of the low life of the chromatographic matrix. In this study, a supermacroporous cryogel activated with tris hydroxymethyl aminomethane (TRIS) was used to capture egg white lysozyme. In the second stage of this study, cation exchange chromatography was performed using an AMPSA (2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) activated cryogel to capture egg white avidin. The cryogels used at this stage had a spongy, whitish structure. The matrix used to capture the lysozyme had a porosity equal to 0.79 and the one used to capture the avidin 0.90, both presented low resistance to the flow as well as low axial dispersion. The swelling capacity, the degree of expansion for cryogel activated with TRIS and AMPSA were, respectively 15.15 kg / kg and 18.34 L / kg; 19.56 kg / kg and 21.05 L / kg. The coefficient of axial dispersion ranged from 0.0954 to 0.739 cm² / min for the affinity cryogel and from 0.0954 to 5958 cm² / min for the cation exchange cryogel. The equivalent height at theoretical plates (HETP) was between 0.100 and 0.148 cm for the affinity cryogel and 0.122 to 0.168 cm for the cation exchange cryogel. The affinity matrix showed permeability to the flow of 3.34 x 10⁻¹³ m² and the cation exchange of 2.0 x 10⁻¹³ m². For the cation exchange cryogel the density (1.65 x 10⁻³ mol / kg), the grafting yield (4%) and the ionic bond strength (582, 74 x 10⁻³ mol_{Na+} / Kg_{cryogel}). In the lysozyme capture step, the purified protein had a mean purity of 90%, a purification factor of 19.42 and a yield of 30.07%. The effect of pH variation on yield and concentration on avidin capture was evaluated, and at pH 9.0 higher average yield was obtained (46.8%) and at pH 10,0 higher mean concentration (0.0043 mg / mL) was found. Lysozyme was satisfactorily purified by the use of TRIS-functionalized cryogel, evidencing that the linker is actually specific for this protein. The new protocol for purification of avidin allowed higher yield and purity to be

achieved than most of the literature reported for the same protein, and the protocol used in this work used a reduced number of steps as well as cheap reagents (which confer functionalization to the matrix), making possible the use of the same for purification of the protein and characterizing it as a fast and low cost technique.

INTRODUÇÃO GERAL

Na clara do ovo estão presentes diversas proteínas com considerável valor biológico que desempenham funções relevantes, podendo ser aplicadas em processos industriais. Exemplo dessas proteínas são a avidina e a lisozima, que podem ser utilizadas em alguns produtos alimentícios para o controle e/ou minimização da ação dos microrganismos.

A avidina disponível comercialmente é extraída da clara do ovo. Essa proteína possui grande afinidade pela biotina (vitamina do complexo B), sendo utilizada como uma proteína de defesa contra bactérias e leveduras biotina dependentes. A atividade antimicrobiana da mesma é devido à capacidade que ela possui de ligar-se a algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A lisozima encontra-se presente na clara do ovo e sua atividade antimicrobiana está relacionada à capacidade que possui de hidrolisar a ligação entre dois ácidos encontrados na parede celular de bactérias (N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina), atuando como agente bacteriostático. Devido a esse fato, a Organização Mundial de Saúde (OMS) permite que a lisozima seja utilizada como conservante em produtos alimentícios, fazendo parte da formulação de queijos e vinhos.

Algumas estratégias de purificação dessas proteínas já foram utilizadas, tais como precipitação salina e extração com solventes, porém, apresentam como inconveniente a desnaturação das proteínas e o baixo grau de pureza, o que limita a utilização dessas técnicas. Com intuito de superar inconvenientes, métodos diversificados vêm sendo desenvolvidos e propostos. Dentre esses métodos os processos cromatográficos destacam-se, por possibilitar a obtenção de um produto final com grau de pureza satisfatório e na maioria das vezes o rendimento da purificação é alto.

Trabalhos publicados sobre a purificação da avidina encontram-se em número limitado. Para sua purificação, o uso da cromatografia por afinidade foi utilizado. A biotina ou a iminobiotina foram imobilizadas na fase estacionária explorando a ligação entre a proteína e vitamina, que é bastante forte. Nos trabalhos em que essa técnica foi utilizada, o grande número de etapas, baixo rendimento de purificação e baixo grau de pureza do eluído, além de fatores como alto custo dos ligantes e a curta vida útil da coluna inviabilizaram o processo.

Com relação à lisozima, a cromatografia por troca catiônica foi comumente utilizada para purificação da mesma. No entanto, alguns autores verificaram que além da lisozima, a

avidina também estava presente nos eluídos oriundos da coluna de troca iônica. A presença da avidina nos eluídos de lisozima possivelmente ocorreu devido à proximidade do ponto isoelétrico entre essas proteínas ($pI_{\text{lisozima}} 10,7$; $pI_{\text{avidina}} 10-10,5$), ainda assim a concentração de lisozima foi bem superior ao da avidina ali presente.

Devido às suas propriedades, os processos que visam a separação das proteínas da clara para aplicações industriais vêm sendo desenvolvidos desde meados de 1900, e ao longo do tempo eles vêm sendo estudados mais criteriosamente, visando a obtenção de produtos com maior grau de pureza, através da utilização de processos mais simplificados e ao mesmo tempo mais baratos e rentáveis. No grupo das proteínas da clara, a lisozima e a avidina possuem aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica, além de aplicações analíticas, despertando portanto um crescente interesse na obtenção das mesmas de forma isolada (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013).

As técnicas para purificação da avidina e da lisozima utilizadas até o momento não originaram alto rendimento das proteínas. Os ligantes utilizados possuíam alto valor agregado, os processos possuíam grande número de etapas, e as proteínas não apresentaram um grau de pureza alto, o que é extremamente importante nesses processos. Dessa forma é necessário que sejam desenvolvidas técnicas viáveis para obtenção da avidina e da lisozima com alto grau de pureza e com número de etapas reduzido, além de possuírem baixo custo, originando assim processos economicamente viáveis e produtos altamente puros.

Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo integrado para purificação da avidina e da lisozima que estão presentes em baixa concentração na clara de ovo, utilizando duas colunas de criogel supermacroporoso. Uma coluna funcionalizada com AMPSA (Ácido 2- acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico) para purificação da avidina através da cromatografia de troca catiônica, e outra com TRIS (Tris (hidroximetil) aminometano), para purificação da lisozima, através da cromatografia por afinidade.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é desenvolver um protocolo de purificação de avidina e da lisozima da clara de ovo, por meio da integração da cromatografia de troca catiônica e da cromatografia por afinidade.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar os criogéis de poliacrilamida em termos de suas propriedades químicas (grau de ligação, densidade e rendimento do processo de ativação), morfológicas (porosidade, capacidade de inchamento e grau de expansão) e hidrodinâmicas (permeabilidade ao escoamento e dispersão axial).
- Ativar os criogéis através da utilização do ligante de afinidade TRIS e do de troca catiônica, AMPSA.
- Estudar o processo integrado de utilização da cromatografia de afinidade e de troca iônica para purificação das proteínas lisozima e avidina.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Clara de Ovo

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), à designação ovo, entende-se o ovo de galinha em casca, sendo os demais acompanhados da indicação da espécie de que procedem (BRASIL, 1990). O ovo de galinha (*Gallus domesticus*) se constitui de quatro partes principais: casca, membrana, gema e clara (ou albúmen); possuindo também outras partes em menor proporção: o disco germinativo, a calaza, a câmara de ar, a cutícula e as membranas da casca (ALCÂNTARA, 2012).

A Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), relatou que no ano de 2016 a produção de ovos foi de 39,1 bilhões de unidades. Os estados que mais produziram foram: São Paulo (33,09%), seguido por Minas Gerais (11,31%) e Mato Grosso (6,45%). Dessa produção, 16% foi exportado na forma industrializada e 84% “*in natura*”.

Grande parte dos aminoácidos essenciais ao homem estão contidos nos ovos, dessa forma o produto representa uma fonte expressiva de proteína animal (ANDRADE et al., 2004). A composição do ovo permite que ele seja classificado como um dos alimentos mais completos utilizados na alimentação humana. Trata-se de um alimento rico em vitaminas, ácidos graxos, sais minerais, além de proteínas que possuem em sua estrutura diversos aminoácidos essenciais de excelente valor biológico (RÊGO et al., 2012).

As diversas proteínas presentes nos ovos têm uma vasta aplicação na indústria de alimentos, de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1: Propriedades tecnológicas e aplicação dos ovos na indústria de alimentos.

Propriedade	Componente responsável	Uso na indústria	Exemplo
Emulsificante	Lecitinas, lipoproteínas (gema)	Molhos, condimentos, produtos de panificação e doces	Maionese
Espumante	Ovalbuminas e ovoglobulinas (clara)	Doces e produtos de panificação.	Mousses, suspiros e marshmallow
Coagulante/gelificante	Proteínas da clara e da gema que sofrem termocoagulação e gelificação	Doces e produtos de panificação	Quindim

Fonte: KOBLITZ (2011).

O albúmen ou clara, representa uma das fontes de proteínas mais conhecidas e estudadas, possui baixo custo e pode ser utilizado em diversas áreas (HONG et al., 2017).

A clara de ovo constitui 60% do ovo de galinha, sendo um material viscoso e elástico (ALLEONI, 2003). Segundo Koblitz (2011), a elasticidade da clara deve ser mantida pelas proteínas da mesma, para que haja uma boa capacidade espumante. Conseguindo-se manter essa capacidade, as bolhas suportarão bem a expansão do ar e não se romperão antes da desnaturação térmica, quando por exemplo, o alimento no qual o ovo faz parte da formulação é aquecido.

Na composição da clara existe basicamente água e proteínas, apresentando uma ínfima quantidade de carboidratos (cerca de 0,8%), podendo estes estarem em solução ou mesmo

associados às proteínas. Existem pequenas quantidades de manose, galactose, glicosamina, e galactosamina, havendo ainda glicose, sendo essa o principal carboidrato (KOBLITZ, 2011).

Na Tabela 2 estão representadas as proteínas da clara, bem como o percentual de cada uma delas.

Tabela 2: Proteínas presentes na clara.

Proteína	Percentual aproximado (%)
Ovalbumina	54,0
Conalbumina	12,0
Ovomucóide	11,0
Ovomucina	3,5
Lisozima	3,4
Ovoglobulina G2	4,0
Ovoglobulina G3	4,0
Avidina	0,05

Fonte: MINE e KOVACS-NOLAN (2004).

Dentre as proteínas da clara de ovo, muitas têm papel funcional de grande importância. Como exemplo, na indústria de alimentos a conalbumina é utilizada em produtos fortificados com ferro (já que se trata de uma proteína de ligação ao metal). Ela possui ainda a capacidade de sequestrar o ferro, essencial para o crescimento microbiano, dessa forma, sua capacidade antimicrobiana também é explorada (BRAND et al., 2016). Já a ovalbumina possui propriedades de gelificação e capacidade de formação de espuma, sendo portanto empregada na formulação de diversos produtos alimentícios (KOBLIZ, 2011).

1.1.1. Avidina

A avidina é uma proteína homotetramérica, glicosilada, apresentando peso molecular combinado de aproximadamente 68,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) igual a 10,0-10,5. Cada uma de suas quatro subunidades idênticas (Figura 1) possui peso molecular de cerca de 15 kDa e pode ligar-se à uma molécula de biotina, sendo essa uma vitamina do complexo B que atua como coenzima essencial para algumas carboxilases. Essa ligação entre as duas proteínas (avidina e biotina) é uma das ligações não covalentes mais fortes de que se tem conhecimento,

sendo a região cataliticamente ativa da molécula de biotina a que interage mais fortemente com a avidina (MINE, 1995; HEIKKINEN et al., 2011). Como consequência, o complexo avidina-biotina tem sido utilizado como um sistema para propósitos de diagnóstico clínico (LIVNAH et al., 1993).

A proteína possui caráter básico, comportando cerca de 128 resíduos de aminoácidos, existindo em cada uma das suas subunidades uma cadeia polipeptídica (GREEN, 1963).

Além de poder ser extraída da clara de ovo de galinha (principal fonte), a avidina pode ser encontrada em oviduto de répteis, anfíbios e pássaros, podendo ser também extraída da clara, ou albúmen de seus ovos. Alguns organismos geneticamente modificados, como *E. coli*, *Pitua pastoris* e plantas transgênicas também podem ser utilizados para produzir avidina (DIDERICH et al, 2013; HEIKKINEN et al., 2011; JUNGO et al., 2007; HOOD et al., 1997).

As proteínas da clara do ovo representam de 9,7-10,6% (m/m) do albúmen. A avidina representa 0,05% do total de proteínas, cerca de 50 mg/L, estando compreendida entre as proteínas minoritárias. Por esse fato, os processos utilizados para sua obtenção são onerosos e extensos (MINE, 1995; GREEN 1975; DIDERICH et al, 2013).

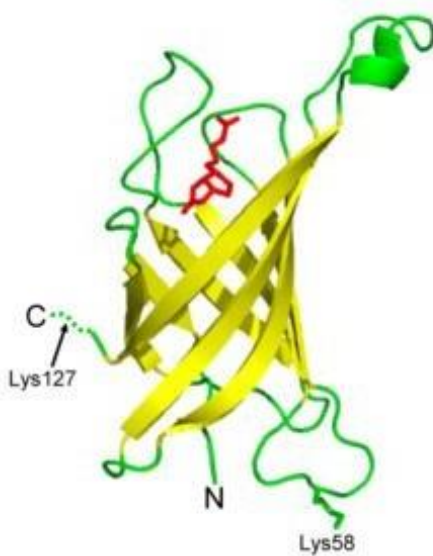


Figura 1: Estrutura 3D do monômero de avidina. A molécula de biotina é mostrada em vermelho.

Fonte: SPOLAORE et al., (2014).

Mine e Kovacs-Nolan (2004) reportaram que a avidina possui atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias e leveduras que requerem biotina para seu crescimento. Essa atividade foi atribuída à capacidade que a proteína possui de se ligar a várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, dentre elas *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis*. Além disso, a avidina já foi usada no tratamento de câncer, para localizar as células cancerosas. Sua ligação forte à biotina e sua estrutura tetramérica levam ao acúmulo de doses mais elevadas e eficazes das drogas para tratamento da doença. Em comparação com outros processos de imunoterapia, o uso da avidina leva a um aumento da persistência de tais drogas anti-cancerosas biotiniladas no organismo. Em cromatografia de afinidade, colunas com avidina imobilizada constituem-se de ferramentas para purificação de biotina e de moléculas biotiniladas (HAYAKAWA et al., 2008).

A literatura aponta alguns métodos utilizados para purificação da avidina. Dhyse (1954) foi quem testou o primeiro método para purificação dessa proteína em larga escala, onde foram utilizadas seis etapas sucessivas: precipitação com acetona, lavagem, extração com soluções de cloreto de sódio; diálise para precipitar as proteínas, resolubilização em soluções salinas e uma segunda precipitação com etanol.

Durance e Nakai (1988), relataram a purificação de avidina por cromatografia de troca iônica, gel filtração (como etapa adicional de purificação), interação com metal quelatado e interação hidrofóbica. Ainda segundo Durance, a cromatografia de troca iônica e a precipitação salina eram as técnicas mais utilizadas para a purificação da avidina. Porém, através da utilização da cromatografia de troca iônica, ocorre a co-eluição da lisozima, devido à proximidade dos pontos isoelétricos entre as duas proteínas (AWADE, 1996).

A cromatografia por afinidade pôde ser utilizada para purificação da avidina da clara de ovo através da utilização de ligantes biotinilados na fase estacionária a ser utilizada. No entanto, o custo do adsorvente é um inconveniente, assim como a possibilidade da perda do ligante ao longo do tempo (HERMANSON, 2013). Além disso, a ligação da avidina à biotina é muito forte, o que pode impossibilitar a liberação da proteína, característica indesejável na cromatografia por afinidade (STRZELCZYK e BUJACZ, 2016). A busca por compostos que se liguem de forma reversível à avidina faz-se necessária, com intuito de viabilizar o uso da cromatografia por afinidade e a redução de custos durante os processos de purificação da proteína.

Diderich et al. (2013) relataram o uso de um sistemas aquosos bifásicos (SAB), compostos por polietilenoglicol (PEG) / fosfato de sódio para purificação da avidina. Nesse estudo as condições dos sistemas foram variadas (pH, massa molar do PEG, e concentração de NaCl) descobrindo-se que a proteína particionou-se para a fase rica em sal. Além disso, ofator de purificação obtido foi de 5,7 e o rendimento da avidina na fase inferior foi de 92%.

Diderich, Hoffmann e Hubbuch (2015) usaram um SAB, seguido de cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia para purificação da avidina. O uso das técnicas integradas nesse estudo levou a uma grande diferença na distribuição da avidina de suas impurezas (ovalbumina, lisozima, ovotransferrina e ocomucoide) entre as fases do sistema. Ao final, a avidina possuía 61% de pureza e um rendimento de 96%.

Outras técnicas como precipitação salina, precipitação isoelétrica, ultrafiltração, e cromatografia líquida são utilizadas para purificação das proteínas da clara do ovo (ZUÑIGA et al., 2003). Porém, pelo alto desempenho na purificação, eficácia e bons resultados, os processos envolvendo técnicas cromatográficas são os mais utilizados.

1.1.2 Lisozima

A lisozima (E.C.3.2.17) também conhecida como muramidase, é uma enzima secretora que possui atividade catalítica, catalisando a hidrólise de polissacarídeos específicos existentes na parede celular de bactérias. Sua ocorrência se dá em quase todas as secreções, fluidos corporais e tecidos dos organismos humanos e animais, além de plantas, micro-organismos e vírus. A enzima apresenta atividade antimicrobiana, especialmente frente às bactérias gram-positivas, pois as bactérias gram-negativas possuem uma estrutura de envelope mais complexa, dificultando a ação da mesma. Ela cliva as ligações do tipo β (1 \rightarrow 4) existentes entre o N-acetilglucosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmico (NAM), estando esses ácidos presentes na parede celular de muitas células bacterianas (LESNIEROWSKI e KIJOWSKI, 2007).

A principal fonte comercial de lisozima é a clara de ovo de galinha. Trata-se de uma enzima que contém 129 resíduos de aminoácidos, em uma única cadeia polipeptídica (Figura 2). A lisina é o aminoácido da extremidade inicial e a leucina é o que se encontra na extremidade terminal. A massa molecular aproximada dessa enzima é de 14,7 kDa, estando ela compreendida entre as principais proteínas do albúmen, representando cerca de 3,5% das proteínas totais. (CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, LESNIEROWSKI, KIJOWSKI, 2008; LESNIEROWSKI e KIJOWSKI, 2007; STADELMAN e COTTERILL, 2001).

com um controle, as amostras com revestimento de colágeno-lisozima, tiveram sua qualidade preservada durante o armazenamento refrigerado (4 ° C) (WANG et al., 2017).

Em peixes, aves e alguns vegetais a lisozima é eficaz para controle da formação da toxina botulínica, produzida por *Clostridium botulinum* (ABEYRATHNE, 2013). Ela tem ainda a capacidade de controlar o desenvolvimento dos principais patógenos em alimentos: *Listeria e Clostridium botulinum* (CEGIELSKA -RADZIEJEWSKA et al., 2008).

Métodos diversificados vêm sendo utilizados para a purificação da lisozima da clara de ovo de galinha levando a resultados bons resultados. Porém, apenas alguns deles são realmente utilizados na indústria. Dentre as técnicas utilizadas para separação ou purificação encontram-se a cristalização direta da proteína a partir da fonte, técnicas baseadas no fenômeno de adsorção da enzima por certas substâncias (técnicas cromatográficas) ou ainda, técnicas de membrana, especialmente a ultrafiltração (CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, LESNIEROWSKI, KIJOWSKI, 2008).

Recentemente Fontan (2013), Mól (2016), e Veríssimo et al. (2017) utilizaram respectivamente a cromatografia por troca iônica (CTI) e a cromatografia por afinidade (CLAF) para purificação da lisozima. Todos obtiveram bons resultados em seus trabalhos. O grau de pureza alcançado no processo de purificação da proteína no trabalho desenvolvido por Fontan foi de até 78%, já os trabalhos de Mól e Alcântara et al., alcançaram um grau de pureza superior, sendo eles de 81% e o outro uma pureza maior que 78%.

A cristalização é uma técnica que também tem sido utilizada para purificar lisozima. Maosoongnern et al. (2017), estudaram a cristalização da lisozima a partir de uma mistura contendo lisozima e ovalbumina, variando a concentração de NaCl. A lisozima foi separada com êxito da ovalbumina através da utilização dessa técnica e o grau de pureza obtido foi superior a 98%, mantendo-se sua atividade. Outros autores, como Yu, Wang e Ulrich (2014), Borbón e Ulrich (2012) também relatam o uso da cristalização para purificação da lisozima. A técnica também foi usada para purificar urease e L-asparaginase (YU, WANG e ULRICH, 2015; LIU, PIETZSCH e ULRICH, 2014).

Outra técnica que tem sido explorada para purificação da lisozima é a ultrafiltração. Uma das vantagens frente à cromatografia em leite empacotado é a possibilidade de utilização de soluções contendo material particulado, sem que haja a necessidade de filtração. Brand et al. (2016) utilizaram membranas de fluxo tangencial contendo ligantes de troca iônica para purificação da lisozima da clara de ovo. O processo foi realizado variando-se diferentes modos

de carga, vazão e a quantidade de solução na alimentação. Usando o modo de recirculação, a ligação da proteína (lisozima) foi bem melhor (65%) quando comparada ao modo de passagem única (49%), embora o tempo de contato com a membrana fosse o mesmo. Variando-se a vazão (1 a 10 volumes de coluna/min), a capacidade de ligação da proteína à membrana aumentou à medida que houve aumento desse parâmetro. Com relação à quantidade de lisozima na alimentação, quanto maior a quantidade, mais proteína ligou-se à membrana.

A literatura também aponta o uso de membranas de filtração por afinidade para purificação da lisozima. Um macroligante, Cibracon Blue 3FGA, foi imobilizado covalentemente em células de levedura, ele possui afinidade pela lisozima, formando um complexo macroligante-proteína. O princípio da técnica consiste na filtração de uma solução contendo diversas proteínas realizada por uma membrana de tamanho de poro adequado, onde o complexo de interesse macro ligante-proteína fica retido, enquanto as outras proteínas da solução passam através dos poros. O complexo é concentrado, e através da utilização de uma membrana, o macro ligante é retido e a proteína de interesse passa pela membrana. Após esse processo, verificou-se que a lisozima presente na solução de clara de ovo utilizada adsorveu-se seletivamente ao macro ligante, com um grau de pureza final superior a 90% (FERRARIS et al., 2016).

Abeyrathne et al. (2013) relataram que devido ao alto pI da lisozima, sua separação se dá especialmente por cromatografia de troca iônica. Dentre as técnicas citadas anteriormente, a cromatografia vem sendo utilizada mais rotineiramente, pelo fato de ser mais eficaz e gerar produtos com grau de pureza satisfatórios.

1.2. Criogéis

Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados para produção de fases estacionárias a serem aplicadas como matrizes cromatográficas. Os materiais poliméricos macroporosos têm se destacado devido à sua versatilidade, podendo ser aplicados em diferentes áreas tais como química, biotecnologia, bioengenharia, biologia, permitindo a purificação e um rápido isolamento de ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos e outras biomoléculas (ERTÜRK e MATIASSEN, 2014).

Um monólito consiste de um meio de separação contínuo. É um suporte ou uma fase contendo um “bloco” único que possui uma estrutura sólida, porosa com poros relativamente

grandes e interconectados, permitindo uma alta permeabilidade, o que melhora a eficiência da coluna utilizada como fase estacionária em técnicas cromatográficas (MACHADO et al., 2015). As colunas monolíticas são comumente preparadas dentro da coluna cromatográfica, através da polimerização *in situ*, podendo ser constituídas de polímeros ou sílica, a partir de uma mistura de monômeros, monômeros reticulantes e solvente formador de poros (agente porogênico) (FARIA et al., 2006; GUICHON, 2007).

Os criogéis são monólitos poliméricos que foram relatados pela primeira vez há 40 anos, e suas características distintas logo atraíram a atenção de vários pesquisadores. (LOZINSKY et al., 2001; LOZINSKY et al., 2003). Essas colunas possuem características de leito fixo, porém com tamanho de poro suficientemente grandes, permitindo que soluções viscosas ou contendo materiais particulados sejam escoadas facilmente por elas. Comparado com as colunas clássicas, o escoamento em criogéis pode ser amplamente aumentado, sem aumentar significativamente a perda de carga (FONTAN, 2013).

Esses materiais são produzidos a partir da utilização de monômeros ou precursores poliméricos adequados, por uma técnica conhecida como criopolimerização. O processo ocorre em meio líquido semicongelado, com temperaturas variando entre -5 e -20 °C, originando uma matriz altamente porosa com tamanho dos poros compreendido entre 10 e 100 µm, que aparecem após o descongelamento. Os poros permitem a passagem de fragmentos de células e até mesmo de células inteiras (ERTÜRK e MATIASSON, 2014).

A polimerização de uma solução contendo monômeros, acrescida de catalisadores adequados, sob temperaturas abaixo de zero darão origem ao criogel. Quando o processo de congelamento tem início, ocorre a concentração dos monômeros em uma micro fase, que ainda não se congelou. A concentração dos monômeros nesta fase permitirá a formação de um gel resistente. Os cristais de gelo formados darão origem aos poros do criogel, e, ao final do processo tem-se uma estrutura esponjosa e macroporosa. A forma e o tamanho dos cristais de gelo serão responsáveis pela forma e tamanho dos poros (Figura 3) (LOZINSKY et al., 2001).

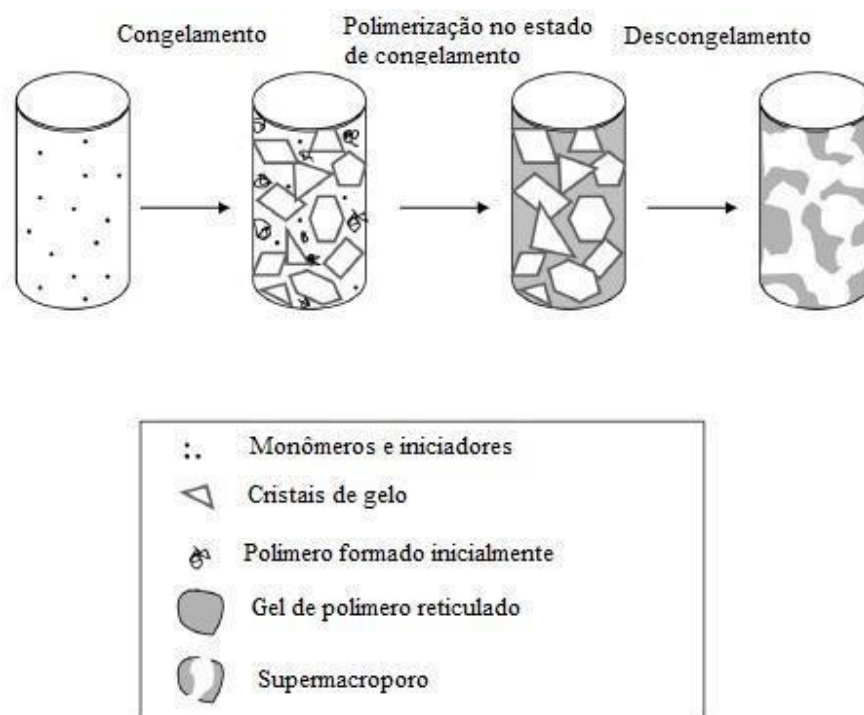


Figura 3: Esquema da produção do criogel. (Fonte: PLIEVA et al., 2004).

Os criogéis existem em diferentes morfologias, podendo ser obtidos a partir de qualquer precursor com capacidade de formar gel. Os monômeros acrilamida (AAm) e bis acrilamida (BAAm- agente de ligações cruzadas) têm sido frequentemente utilizados para essa finalidade, sendo a solução constituída por ambos acrescida de persulfato de amônio e TEMED, catalisadores da reação. Pode-se ainda utilizar outros monômeros, como é o caso do alil-glicidil éter – AGE. Estando a mistura reacional pronta, deve-se vertê-la em um molde (frequentemente usam-se colunas de vidro) e submeter a temperatura entre -5 e -20 °C para que ocorra a polimerização, por um período compreendido entre 16 e 24 horas (PLIEVA et al., 2008; PLIEVA et al., 2004b).

O tamanho elevado dos poros existentes nos criogéis originam uma área superficial limitada, o que resulta em um gel com baixa capacidade de ligação. Tal fato conseqüentemente limitará a quantidade de grupos funcionais disponíveis sobre a superfície, acarretando em uma menor capacidade de ligação, o que diminui a eficiência de purificação (FONTAN, 2013). Para superar esse inconveniente as colunas podem sofrer modificações químicas, com a finalidade de torná-los capazes de adsorver diferentes biomoléculas por meio de técnicas adsortivas, como troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade por metais, etc. Tais modificações podem ser feitas na superfície dos monólitos, usualmente por meio da circulação de soluções contendo os

agentes de ativação, a fim de permitir que haja um maior rendimento nos processos de separação em que serão utilizados (ZHANG et al., 1999; SAVINA et al., 2005).

Os criogéis têm sido utilizados nas mais diversas áreas, como por exemplo, para purificação de proteínas, em microbiologia, no campo da biotecnologia (MÓL et al., 2017; PLIEVA et al., 2008; LOZINSKY et al., 2003).

Criogéis foram utilizados com êxito para captura da lisozima da clara de ovo, através da imobilização do Tris (tris hidroximetil aminometano) em sua superfície. A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando um criogel com íons Cu^{2+} foi realizada para adsorção da hemoglobina a partir de solução aquosa. Criogéis com grupos ligantes trocadores de íons também foram utilizados para captura direta de biomoléculas, como BSA, DNA plasmidial e lactoferrina do soro de leite (QUAN et al., 2009; BARAN, ACET E ODABASI, 2017; SAVINA et al., 2005a; HANORA et al., 2006; FIDELIS, 2011).

A literatura reporta o uso criogéis de polietilenoimina, um polímero comercialmente disponível, para sorção de íons metálicos e corantes (PRIVAR et al., 2018; SAHINER e DEMIRCI, 2016). Criogéis de poiliacrilamida com íons Cu^{2+} imobilizados também foram utilizados em IMAC para captura direta de lactoferrina de soro de leite, sendo a proteína purificada com sucesso (CARVALHO et al., 2014).

Outras técnicas de purificação usando criogéis como fase estacionária incluem a cromatografia por afinidade a corantes (ÇIMEN et al., 2015), cromatografia por interação hidrofóbica (TÜRKMEN et al., 2015) e cromatografia por imunoafinidade (MEMMEDOVA et al., 2015).

1.3. Cromatografia

Diversos são os produtos originados dos processos biotecnológicos, e quase sempre eles se encontram em ínfimas concentrações nos resíduos industriais, caldos de fermentação e em sobrenadantes de culturas celulares. Devido à variabilidade de espécies químicas e à diluição dos produtos de interesse, os processos de recuperação, fracionamento e purificação final se tornam mais trabalhosos e difíceis, como também têm seu custo aumentado (FIDELIS, 2011). Uma variedade de técnicas para purificação das moléculas de interesse encontram-se disponíveis, porém, as técnicas cromatográficas se sobressaem, devido ao alto poder de resolução e eficiência do método (COLLINS et al., 2006).

Os primeiros relatos acerca da cromatografia datam de 1906, ano em que os primeiros artigos foram publicados por Michael Tswett, um botânico russo que realizou a separação de algumas pigmentos oriundos de extratos de plantas. Daquele tempo até os dias de hoje a técnica sofreu inúmeros avanços, ampliando-se a uma forma instrumental sofisticada (MÜHLEN e LANÇAS, 2004). Atualmente o desenvolvimento de suportes antes inexistentes têm permitido o crescimento de técnicas de alta resolução, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), existindo colunas de tamanho utilizados em escala laboratorial chegando até colunas de centenas de volumes de litros, usadas em escala industrial (JANSON e RYDÉN, 2011).

A cromatografia é uma técnica que envolve o uso de uma fase móvel e uma fase estacionária, onde as moléculas a serem separadas estão distribuídas entre ambas. Moléculas que se movem pelo sistema a uma velocidade mais baixa, tendem a permanecer na fase estacionária, o oposto ocorre para aquelas que têm maior afinidade pela fase móvel. A cromatografia em coluna, configuração mais comum do método, faz uso de uma coluna onde a fase estacionária está acondicionada, através do qual a fase móvel é bombeada. A amostra contendo as moléculas que deseja-se separar é introduzida em uma extremidade da coluna e seus componentes se movem a diferentes velocidades, sendo detectados e coletados na outra extremidade (JANSON e RYDÉN, 2011). Denomina-se cromatografia líquida aquela em que a fase móvel é um líquido, e cromatografia gasosa aquela em que a fase móvel é um gás, sendo essa utilizada para separação de compostos voláteis (COLLINS et al. 2006).

Para separação de proteínas, várias técnicas de cromatografia líquida podem ser utilizadas, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Tipos de cromatografia utilizados para separação de proteínas

Princípio de Separação	Tipo de Cromatografia
Forma e Tamanho	Filtração em gel/Exclusão de tamanho
Carga Líquida	Troca iônica
Ponto Isoelétrico	Cromatofocagem
Hidrofobicidade	Interação hidrofóbica/ Fase reversa
Função Biológica	Cromatografia por afinidade
Antigenicidade	Imunoadsorção
Teor de Carboidratos	Cromatografia por afinidade de lectina
Ligação de Metais	Cromatografia por afinidade a metais

Fonte: JANSON e RYDÉN, 2011.

Métodos mais específicos para purificação de proteínas, como a cromatografia de afinidade, permitem que essas biomoléculas sejam purificadas em uma única etapa e com elevada pureza. Do contrário, se o método cromatográfico não é específico, deve-se utilizar técnicas combinadas para que sejam obtidos melhores resultados (MÓL, 2016).

É importante que novas técnicas para purificação de proteínas sejam desenvolvidas, pois elas permitem avanços no campo da pesquisa (em biotecnologia, biociências, dentre outras), além de serem importantes para que se possa caracterizar a função, estrutura, propriedades físico-químicas das proteínas e assim serem utilizadas nos diversos segmentos industriais (ZHANG et al., 2011).

1.3.1 Cromatografia por Afinidade (CLAF)

A cromatografia por afinidade é um método físico-químico de separação que se baseia na adsorção reversível de uma molécula (comumente uma proteína) a um ligante imobilizado na matriz sólida. Ocorre que a proteína possui afinidade específica por um grupo químico, dessa forma ela será adsorvida à coluna tendo sua migração retardada (ARAÚJO et al., 2014).

A técnica recebeu esse nome devido à exploração das várias interações biológicas (por afinidade) que utilizavam uma fase sólida para adsorver a molécula de interesse, tais como interações DNA-proteína, antígeno-anticorpo, moléculas bioinformadoras-hormônios, dentre

outras (VIEIRA, JANSON e CARLSSON, 2011). Na Tabela 4 estão listados exemplos de interações biológicas onde a CLAF é utilizada.

Tabela 4: Exemplos do uso da CLAF em interações biológicas.

Ligante	Molécula alvo
Anticorpo	Antígeno, vírus, células
Inibidor	Enzima (os ligantes são frequentemente análogos de substrato ou análogos de cofatores)
Lecitina	Polissacarídeo, glicoproteína, receptor de superfície celular, proteína de membrana
Ácido nucléico	Proteína de ligação ao ácido nucleico (enzima ou histona)
Hormônio, vitamina	Receptor, proteína transportadora
Açúcar	Lectina, enzima ou outra proteína ligada a açúcares

Fonte: JANSON e RYDÉN (2011).

A cromatografia por afinidade é considerada como um método novo por alguns pesquisadores, mas na verdade é uma das formas mais antigas de cromatografia líquida. O conhecimento da utilização da cromatografia líquida pela primeira vez data do ano de 1910, quando o cientista alemão Emil Starkenstein examinou a ligação de amido insolúvel à enzima alfa-amilase, dessa forma os ligantes de afinidade foram introduzidos nos métodos de análise cromatográfica (HAGE e RUHN, 2005). Mais tarde, em 1968, Cuatrecasas; Wilchek e Anfinsen (1968) aplicaram efetivamente a técnica à purificação de proteínas, substituindo as tradicionais técnicas de purificação. Elas eram baseadas no pH, força iônica ou temperatura. Nos dias atuais a cromatografia por afinidade tem sido amplamente utilizada para purificação de diversas biomoléculas, apresentando-se muito eficaz.

Em casos onde a molécula a ser capturada está presente em baixas concentrações em uma mistura complexa, a cromatografia por afinidade é uma ferramenta bastante útil (VIEIRA, JANSON e CARLSSON, 2011). Tal caso se aplica à lisozima da clara de ovo, visto que esta representa cerca de 3,4% das proteínas totais. Quan e colaboradores (2008), realizaram um

trabalho onde explicam e comprovam a interação específica entre a lisozima e o ligante Tris (trishodroximetil aminometano). O Tris foi imobilizado em esferas de sílica macroporosas e foram testadas a interação entre oito proteínas e o ligante. Os resultados mostraram que somente a lisozima tem a capacidade de se ligar especificamente ao Tris, pois após serem injetadas as proteínas na coluna de afinidade, todas foram eluídas, à exceção da lisozima. Para eluição da lisozima, utilizou-se uma solução de força iônica moderada, indicando que a interação embora seja específica não é forte, o que demonstra que a interação entre proteína e ligante é suficiente para reter a proteína, conseguindo ainda manter sua estrutura e atividade. Como conclusão, tem-se que o Tris é uma promissora opção para ligante de afinidade quando se quer obter a lisozima isolada.

O Tris liga-se especificamente à lisozima devido à estrutura molecular e à sequência de aminoácidos da proteína. Em valores de pH menores que 11, a estrutura molecular se mantém com cargas positivas (catiônica), dessa forma, apresenta grupamentos amino (NH_2) que irão se ligar especificamente às hidroxilas (OH) presentes na estrutura do Tris. Os grupamentos OH do tris formam ligações de hidrogênio com três aminoácidos presentes na estrutura da lisozima, sendo eles Asp52, Glu35 e Ala107.

A purificação através da utilização por CLAF envolve três passos principais:

1. Aplicação da amostra na coluna sob condições que favoreçam a máxima interação com o ligante imobilizado;
2. Lavagem da coluna para eliminar componentes que não se ligaram ao suporte;
3. Eluição (dissociação e recuperação) da molécula de interesse a partir do ligante imobilizado, podendo esta ser realizada a partir de modificações nas condições do eluente (tampão), não possibilitando a interação de ligação entre ligante e proteína (MAGDELDIN e MOSER, 2012). As etapas de purificação utilizando cromatografia por afinidade podem ser observadas na Figura 4.

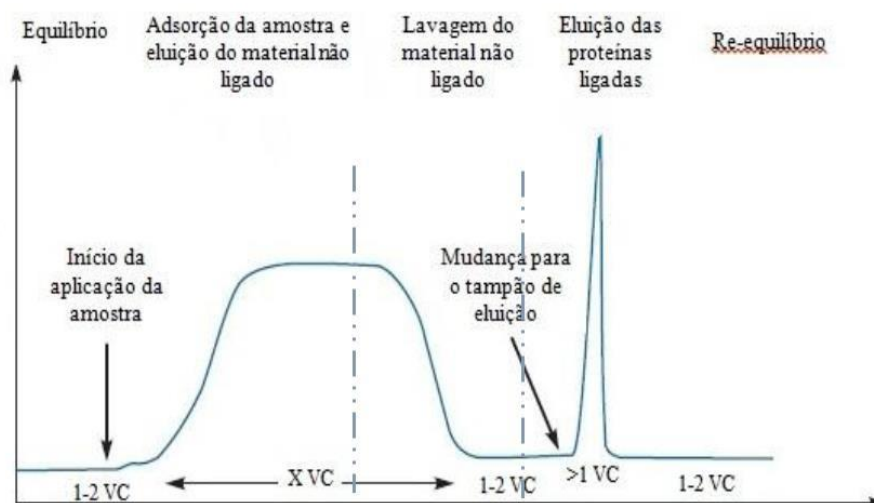


Figura 4: Etapas da purificação por afinidade.

Fonte: Adaptado de MAGDELDIN E MOSER, (2012).

Vários materiais podem ser utilizados como adsorventes ou suportes para realização da CLAF, e vários fatores, tais como inércia química, estabilidade química e mecânica, tamanho de poro e de partícula devem ser considerados para que se obtenha sucesso na condução do experimento (MAGDELDIN e MOSER, 2012). “A matriz sólida deve possuir mínima interação com as proteínas em geral, antes e depois da imobilização do ligante específico; a formação de uma rede frouxa e porosa, que facilite a entrada e saída das macromoléculas e que seja capaz de manter as propriedades de fluxo favoráveis durante o uso, e para finalizar, a estrutura química do suporte deve permitir a ligação do ligante sob condições moderadamente suaves, sendo que essas ligações devem ser estáveis às condições de adsorção e eluição” (CUATRECASAS et al., 1968).

A CLAF vem sendo utilizada para purificação de biomoléculas, como mostram os trabalhos desenvolvidos por Mól et al. (2017) e Alcântara et al. (2017), que utilizaram colunas supermacroporosas ativadas com o ligante Tris para purificação da lisozima.

A literatura aponta o uso de carboidratos imobilizados na superfície da fase estacionária para purificação de lectinas (proteínas que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos e moléculas como glicoproteínas, que contém açúcares em sua estrutura). A CLAF é a técnica mais indicada e utilizada para purificação de lectinas, devido à característica exposta anteriormente (GONÇALVES, et al., 2017).

Gonçalves et al. (2016) utilizaram quatro métodos diferentes (epóxi, base de Schiff, glutaraldeído e etilenodiamina) para imobilizar um carboidrato (*N*-acetil- D –glucosamina) na superfície de criogéis macroporosos e purificar lectina, obtendo maior êxito quando o método do glutaraldeído foi utilizado. Em outro trabalho, Gonçalves e colaboradores (2017) avaliaram diferentes carboidratos aminados (*N*-acetil- D –glucosamina, *N*-acetil- D –manosamina e *N*-acetil- D –galactosamina) imobilizados pelo método do glutaraldeído na superfície da fase estacionária para purificação de lectinas por CLAF. As matrizes onde *N* – acetil – D-manosamina e *N* – acetil – D- galactosamina estavam imobilizados foram as que apresentaram os melhores valores de açúcares imobilizados por massa seca do adsorvente.

Cuatrecasas e Wilcheck (1968) utilizaram uma coluna de biocitina-Sepharose para purificação da avidina por cromatografia de afinidade. A eluição ocorreu de forma lenta através da utilização de uma solução guanidina-HCl 6M e a avidina encontrou-se muito diluída no eluído, no devido à utilização de um ácido forte na coluna afetando também capacidade de adsorção (foi diminuída). Heney e Orr (1981) também exploraram a cromatografia por afinidade para purificação de avidina, porém a 2-iminobiotina foi utilizada como ligante para a avidina. Alguns trabalhos utilizando ligantes de afinidade para purificar a proteína alcançaram altos rendimentos, porém os ligante utilizados eram de alto valor e baixa vida útil. Isso pode explicar o fato da técnica não ser comumente utilizada para purificar a avidina.

1.3.2 Cromatografia por Troca Iônica (CTI)

A cromatografia de troca iônica, é uma modalidade da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e tem sido comumente utilizada há pelo menos 50 anos com intuito de separar e purificar proteínas (KARLSSON e HIRISH, 2011). Way e Thompson foram os responsáveis pelos primeiros registros da cromatografia de troca iônica, em 1850, quando observaram que amostras de solo possuíam capacidade de adsorver íons de amônia e potássio de soluções que as atravessavam (SPADARO, 2006).

A técnica pode ser definida como um fenômeno físico-químico em que há uma troca de íons entre uma solução carregada (fase móvel) e um sólido poroso (fase estacionária) (GUICHON, 2002). A fase estacionária encontra-se altamente carregada, e os solutos com cargas opostas oriundos da fase móvel se adsorvem na mesma. Estes podem ser seguidamente eluídos através do deslocamento por íons que possuem o mesmo tipo de carga, porém, com

maior força iônica, ou seja, a interação desses íons com a fase estacionária é mais elevada (SPADARO, 2006).

O processo de troca iônica é semelhante à uma reação estequiométrica. Para que haja adsorção de determinada quantidade de cargas de uma espécie (positivas ou negativas) à matriz, a mesma quantidade de cargas da outra espécie deve ser liberada (GALLANT, 2005). Os distintos graus de afinidade eletrostática entre a fase estacionária e os íons da fase móvel regem esse tipo de cromatografia (PESSOA E KILIKIAN, 2005).

O processo de separação por troca iônica ocorre como demonstrado na Figura 5. No primeiro estágio há um equilíbrio entre os trocadores de íons, comumente se utiliza ânions e cátions simples como o cloro e o sódio como contra-íons, ou seja, aqueles íons que se encontram presentes na matriz. O segundo estágio se dá pela aplicação e adsorção da amostra, onde os íons liberados são equivalentes aos íons adsorvidos, eles se diferem apenas pela posição e origem do sítio de troca. O terceiro estágio ocorre quando as substâncias que estavam adsorvidas são removidas, ou seja, desorvidas pela troca do eluente. Esse processo pode ser feito mais rapidamente através da utilização de um gradiente crescente de concentração de um sal, força iônica. A retirada das substâncias que não foram eluídas anteriormente sob as condições iniciais de operação e o reequilíbrio da coluna estão compreendidos na quarta e quinta etapa. Devido à diferentes graus de interação da substância com a fase estacionária é que a separação se faz possível, sendo que essas interações podem ser controladas pela força iônica, eluente, pH dentre outros (YAGINUMA, 2007).

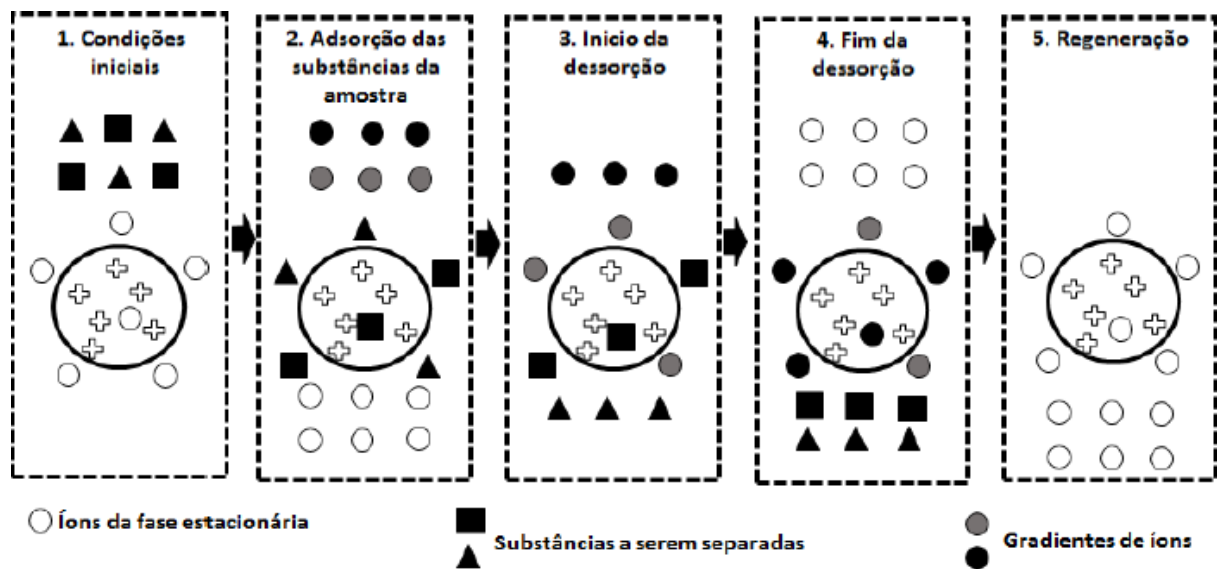


Figura 5: Esquema do mecanismo de separação por cromatografia de troca iônica.

Fonte: Adaptado de YAGINUMA, (2007).

A CTI é comumente utilizada para purificação de proteínas, porque quando comparada a outros métodos de purificação ela apresenta algumas características, tais como facilidade da técnica e de ampliação de escala, alta resolução e capacidade de adsorção, além da versatilidade, podendo ser aplicada analiticamente e preparativamente tanto em pesquisa como em indústrias (PESSOA E KILIKIAN, 2005). Devido à diferença no ponto isoelétrico (pI) entre as proteínas, é amplamente utilizada para recuperação e purificação dessas macromoléculas, sendo aplicada nas etapas iniciais do processo de purificação (FIDELIS, 2011).

Na superfície das proteínas existem grupos com cargas positivas e negativas, sendo as cargas positivas provenientes principalmente dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e das aminas terminais, já as cargas negativas se devem ao ácido aspártico e glutâmico, e dos grupos carboxílicos terminais. Para que o processo de purificação ocorra, proteínas que possuem carga líquida negativa devem se adsorver em uma matriz carregada positivamente (troca aniônica) e aquelas proteínas que possuem carga líquida positiva irão se adsorver em uma matriz carregada negativamente (troca catiônica) (PESSOA E KILIKIAN, 2005).

A cromatografia de troca iônica apresenta vantagem quando utilizada para purificação de proteínas, pois a adsorção pode ser facilmente reversível com as mudanças das condições de processo (FIDELIS, 2011). A técnica já foi utilizada com êxito para recuperação de lactoferrina

de soro de leite, purificação de lisozima e adsorção de ácido láctico (FIDELIS, 2011; FONTAN, 2013; ARCANJO, 2014).

1.4. Referências

ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as a nutraceutical and pharmaceutical agents – a review. **Journal of Poultry Science**, v. 92, p. 3292-3299, 2013.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: < <https://www.google.com.br/search?btnG=Pesquisar&q=associa%C3%A7ao+brasileira+de+prote%C3%ADna+animal> >. Acesso em 23 de novembro de 2016.

ALCÂNTARA, J. B. (2012). **Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade**. Seminário de doutorado em Ciência Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos. Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO. p. 31.

ALLEONI, A. C. C. **Propriedades Funcionais do Albúmen e Qualidade de Ovos de Galinha Cobertos com Concentrado Proteico de Soro de Leite Bovino**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 2003.

ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B.; JAYME, V. S.; ROCHA, P. T.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, p. 221-228, 2004.

ARAÚJO, J. M. et al. Determinação da atividade antitriptica em proteínas de produtos do amendoim isoladas por cromatografia de afinidade. **Revista Química Nova**, v. 37, nº10, p. 1618-1623, 2014.

ARCANJO, M. R. A. **Estudo da adsorção de ácido láctico por cromatografia de troca iônica**. 2014. 99f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. 2014.

AWADE, A. C. On hen egg fractionation: applications of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 202, p. 1-14, 1996.

BARAN, N. Y.; ACET, O.; ODABASI, M. Efficient adsorption of hemoglobin from aqueous solutions by hybrid monolithic cryogel column. **Materials Science and Engineering C**, v.73, p. 15-20, 2017.

BORBÓN, V. D; ULRICH, J. Solvent freeze out crystallization of lysozyme from a lysozyme-ovalbumin mixture. **Crystal Research and Technology**, v. 47, p. 541-547, 2012.

BRAND, J.; DACHMANN, E.; PICHLER, M.; LOTZ, S.; KULOZIK, U. A novel approach for lysozyme and ovotransferrin fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 44-52, 2016.

BRAND, J.; VOIGT, K.; ZOCHOWSKI, B.; KULOZIK, U. Lysozyme fractionation from egg white at pilot scale by means of tangential flow membrane adsorbers: Investigation of the flow conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1438, p. 143-149, 2016.

BRASIL, Portaria nº1, de 21 de fevereiro de 1990. MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/PORTARIA%20MAPA%2001_90_normas%20gerais%20inspe%C3%A7%C3%A3o%20ovos%20e%20derivados.pdf>. Acesso em 23 de novembro de 2016.

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

CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; LESNIEROWSKI, G.; KIJOWSKI, J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations- a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, p. 5-10, 2008.

ÇIMEN, D.; YILMAZ, F.; PERÇIN, I.; TÜRKMEN, D.; DENIZLI, A. Dye affinity cryogels for plasmid DNA purification. *Materials Science and Engineering C*, v. 56, p. 318-324, 2015.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Biochemistry**, v. 61, p. 636-643, 1968.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M. Single-Step of avidin from egg white by affinity chromatography on Biocitin-Sepharose columns. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 33, n° 2, p. 235-239, 1968.

DHYSE, F. G. A practical laboratory preparation of avidin concentrates for biological investigation. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, p. 515-517, 1954.

DIDERICH, P.; AMRHEIN, S.; HÄMMRELLING, F.; HUBBUCH, J. Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-throughput techniques. **Chemical Engineering Science**, v. 104, p. 945-956, 2013.

DIEDERICH, P.; HOFFMAN, M.; HUBBUCH, J. High-Throughput process development of purification alternatives for the protein avidin. **Biotechnology Progress**, v. 31, n°4, p. 957-973, 2015.

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

DRAGAN, E. C. Advanced separation by specialized sorbents, **CRC Press**, Boca Raton, p. 358, 2014.

DURANCE, T. D.; NAKAI, S. Purification of Avidin by Cation Exchange, Gel Filtration, Metal Chelate Interaction and Hydrophobic Interaction Chromatography. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 21, p. 279-286, 1988.

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

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Revista Química Nova**, v. 29, p. 306-309, 2006.

FERRARIS, M. P.; GONZALEZ, U. F.; AGUILLAR, F.; RODRÍGUEZ, J. A. An experimental model of affinity filtration for the isolation of egg white Lysozyme using Cibacron Blue immobilized to yeast cells. **Journal of Chromatography B**, v. 1020, p. 129-133, 2016.

FIDELIS, P. C. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2011.

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

GALLANT, S. R. Modeling ion-exchange adsorption of a protein in a spherical particle. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 189-195, 2004.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F. B.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN, R. I. C. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F. B.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. I. C. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, v. 1033-1034, p. 406-412, 2016.

GREEN, N. Avidin. The nature of the Biotin-Binding Site. **The Biochemical Journal**, v. 89, p. 599-609, 1963.

GREEN, N. M. Avidin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 29, p. 85-133, 1975.

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

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

HAGE, D. S. e RHUN, P.F. An introduction to affinity chromatography. In: HAGE, D. S. (editor). **Handbook of affinity chromatography**. CRC Press, p. 3-13, 2005.

HANORA, A.; SAVINA, I., PLIEVA, F. M.; IZUMRUDOV, A.; MAYIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 343-355, 2006.

HAYAKAWA, K.; KATSUMATA, N.; HIRANO, M.; YOSHIKAWA, K.; OGATA, T.; TANAKA, T.; NAGAMINE, T. Determination of biotin (vitamin H) by the high-performance affinity chromatography with a trypsin-treated avidin-bound column. **Journal of Chromatography B**, v. 869, p. 93-100, 2008.

HEIKKINEN, J. J.; KIVIMAKI, L.; MÄÄTTÄ, J. A. E; MÄKELÄ, I.; HAKALAHTI, L.; TAKKINEN, K.; KULOMAA, M.; HYTÖNEN, V.P; HORMI, O. E. O. Versatile bio-ink for covalent immobilization of chimeric avidin on sol-gel substrates. **Colloids and SurfacesB: Biointerfaces**, v. 87, p. 409-414, 2011.

HENEY, G.; ORR, G. A. The purification of avidin and its derivatives on 2-aminobiotin-6-aminohexyl-Sepharose 4B. **Analytical Biochemistry**, v. 114, p. 92-96, 1981.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 3ª edição. San Diego: Academic Press, 2013. 1017 p.

HONG, T.; IWASHITA, K.; HANDA, A.; SHIRAKI, K. Arginine prevents thermal aggregation of hen egg white proteins. **Food Research International**, v. 97, p. 272-279, 2017.

HOOD, E. E.; WITCHER, D. R.; MADDOCK, S.; MEYER, C. B.; BAILEY, M.; FLYNN, P.; REGISTER, J.; MARSHALL, L.; BOND, D.; KULISEK, E.; KUSNADI, A.; EVANGELISTA, R.; NIKOLOV, Z.; WOOGHE, C.; MEHIGH, R.; HERNAN, R.; KAPPEL, W. K.; RITLAND, D.; PING, C.; HOWARD, J. A. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 291-306, 1997.

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. Affinity chromatography. In JANSON, J.C. (editor) **Protein purification: principles, high resolution methods and applications**. New York, John Wiley & Sons, p. 221-258, 2011.

JUNGO, C.; SCHENK, J.; PASQUIER, M.; MARISON, I. W.; STOCKAR, U. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 57-66, 2007.

KARLSSON, E.; HIRISH, I. Ion exchange Chromatography. In JANSON, J. C.; RYDÉN, L. **Protein Purification: principles, high resolution methods and applications**. New York, John Wiley & Sons, p. 93-134, 2011.

KOBLITZ, M.G.B. **Matérias primas alimentícias: composição e controle de qualidade**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 301 p.

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

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

LIAO, Y. H. BROWN, M. B.; MARTIN, G. P. Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 549-554, 2001.

LESNIEROWSKI, G. e KIJOWSKI, J. In: HUOPALATHI, R. **Bioactive Egg Compounds**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2007, p. 33-42.

LIU, Y.; PIETZSCH, M.; ULRICH, J. Determination of the phase diagram for the crystallization of L-asparaginase II by a turbidity technique. **Crystal Research Technology**, v. 49, p. 262-268, 2014.

LIVNAH, O.; BAYER, E. A; WILCHECK, M.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 5076-5080, 1993.

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

LOZINSKY, V. I.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, p. 163-188, 2001.

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

MAGDELDIM, S. e MOSER, A. Affinity chromatography: Principles and applications. In: MAGDELDIN, S. (editor). **Affinity chromatography**. In Tech, p. 3-28, 2012.

MAOSOONGNERN, S.; FLOOD, C.; FLOOD, A. E.; ULRICH, J. Crystallization of lysozyme from lysozyme – ovalbumin mixtures: Separation potential and crystal growth kinetics. **Journal of Crystal Growth**, v. 469, p. 2-7, 2017.

MEMMEDOVA, T.; ARMUTCU, C.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Polyglycidyl methacrylate based immunoaffinity cryogels for insulin adsorption. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 178-185, 2015.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science Technology**, v. 6, p. 225-232, 1995.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Biologically active hen egg components in human health and disease. **Journal of Poultry Science**, v. 41, p. 1-29, 2004.

MÓL P. C. G. **Purificação de lisozima da clara de ovo por cromatografia de afinidade em criogéis supermacroporosos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER, M. R.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of Chromatography B**, v. 1044-1045, p. 17-23, 2017.

MÜHLEN, C. V.; LANÇAS, F. M. Cromatografia Unificada. **Revista Química Nova**, v. 27, nº5, p.747-753, 2004.

OZER, B. B. P. O.; UZ, M.; OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging film. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 877-886, 2016.

PESSOA, A. JR. Cromatografia de troca iônica. Em PESSOA, A. JR.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, Editora Manole, p. 196-211, 2005.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 543-551, 2008.

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

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

PRIVAR, Y.; MALAKHOVA, I.; PESTOV, A., FEDORETS, A.; AZAROVA, Y.; SCHWARZ, S.; BRATSKAYA, S. Polyethyleneimine cryogels for metal ions sorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 1392-1398, 2018.

QUAN, L.; WEI, D.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F.; LAI, L. Resurveying the Tris buffer solution: The specific interaction between tris (hydroxymethyl)aminomethane and lysozyme. **Analytical Biochemistry**, v.378, p. 144-150, 2008.

QUAN, L.; CAO, Q.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Highly efficient and low-cost purification of lysozyme: A novel tris (hydroxymethyl) aminomethane immobilized affinity column. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 594-598, 2009.

RÊGO, I. O. P.; CANÇADO, S. V.; FIGUEIREDO, T. C.; MENEZES, L. D. M.; OLIVEIRA, D. D.; LIMA, A. L.; CALDEIRA, L. G. M.; ESSER, L. R. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 64, p. 735-742, 2012.

SAHINER, N.; DEMIRCI, S. Poly ionic cryogel of polyethyleneimine: Synthesis, characterization, and testing in absorption studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, p. 1-13, 2016.

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

SAVINA, I. N.; MATIASSON, B.; GALAEV, I. G. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v.46, p. 9596-9603, 2005a.

SPADARO, A. C. Cromatografia de troca iônica. Em COLLINS, C.; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, Editora Unicamp, p. 103-136, 2006.

SPOLAORE, B.; DAMIANO, N.; RABONI, S.; FONTANA, A. Site-Specific Derivatization of Avidin Using Microbial Transglutaminase. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, p. 120-128, 2014.

STADELMAN, W. J., and COTTERILL, O. J. 2001. **Egg Science and Technology**. 4th ed. Avi Publ. Co., Westport, CT.

STRZELCZYK, P.; BUJACZ, G. Crystal structure and ligand affinity of avidin in the complex with 4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1109, p. 232-238, 2016.

TÜRKMEN, D. et al. Megaporous poly (hydroxy ethylmethacrylate) based poly (glycidylmethacrylate-N-methacryloyl-(l)-tryptophan) embedded composite cryogel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 61-68, 2015.

VERÍSSIMO, L. A. A.; PAGANOTO, F. H.; MÓL, P. C. G.; FONTAN, R. C. I.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, p. 1-10, 2017.

VIEIRA, F. B.; JANSON, J. C.; CARLSSON, J. Protein **Purification: principles, high resolution methods and applications**. In JANSON, J. C.; RYDÉN, L. Ney York, John Wiley & Sons, 2011. p. 221-256.

WANG, Z.; HU, S.; GAO, Y.; YE, C.; WANG, H. Effect of collagen-lysozyme coating on fresh-salmon fillets preservation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 59-64, 2017.

YAGINUMA, S. R. **Extração e purificação parcial de inulina a partir de Yacon (*Smallanthus sonchifolius* por adsorção em resinas de troca iônica. 2007. 76f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.**

YU, X.; WANG, J.; ULRICH, J. Effect of additives on the purification of urease. **Journal of Crystal Growth**, v. 432, p. 64-68, 2015.

YU, X.; WANG, J.; ULRICH, J. Purification of lysozyme from protein mixtures by solvent-freeze-out technology. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, p. 1353-1357, 2014.

ZHANG, G.; CAO, Q.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Tris (hydroxymethyl)aminomethane-modified magnetic microspheres for rapid affinity purification of lysozyme. **Talanta**, v. 83, p.1515-1520, 2011.

ZHANG, X.; LIU, W.; CHEN, Y.; GONG, A.; CHEN, C.; XI, F. Self-condensing vinyl polymerization of acrylamide. **Polymer Bulletin**, v. 43, p. 29-34, 1999.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** (B. Ceppa), v. 21, p. 61-82, 2003.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO INOVADOR E DE BAIXO CUSTO PARA PURIFICAÇÃO DE AVIDINA E LISOZIMA DA CLARA DE OVO

1. Introdução

Uma diversidade de técnicas têm sido utilizadas para purificação das proteínas avidina e lisozima. Dentre elas, a literatura aponta o uso da cromatografia de troca iônica (FONTAN, 2013; DISMER e HUBUCH, 2007; CUATRECASAS et al., 1968, BRAND et al, 2016), cromatografia por afinidade (MÓL et al., 2017; HAN et al., 2012; CUATRECASAS et al., 1968), interação hidrofóbica (ALTINTAS, 2007; DURANCE e NAKAI, 1988), partição (DIDERICH et al., 2013, SU e CHIANG, 2006), e cristalização (ALDERTON e FEVOLD, 1946).

Em relação à avidina, trabalhos desenvolvidos para purificação da proteína encontram-se em número limitado na literatura (DIDERICH et al., 2013). Uma das dificuldades encontradas está relacionada à sua baixa concentração na clara de ovo. Trabalhos desenvolvidos para purificação da avidina acarretaram na obtenção da proteína com baixo grau de pureza, o que pode ser atribuído à sua baixa concentração na clara de ovo. Outra limitação está associada ao custo do processo, através da utilização da cromatografia por afinidade. O alto custo do ligante e a baixa vida útil da fase estacionária inviabilizam a utilização da técnica (CUATRECASAS e WILCHECK, 1968; HENEY e ORR, 1981).

A purificação da proteína através da utilização de uma coluna de biocitina-Sepharose foi testada por Cuatrecasas et al. (1968) com rendimento de 90%. Ao ser eluída, a proteína foi desnaturada, contudo a renaturação foi possível através da diluição. Já Heney e Orr (1981) usaram a iminobiotina como um ligante de afinidade para purificar avidina, alcançando entre 95 e 99% de pureza. O alto custo do ligante gera um impasse para a utilização da cromatografia por afinidade. Nos trabalhos citados, os ligantes possuíam alto custo e o número de reutilização da coluna foi baixo (vida útil curta), fato este que torna a cromatografia por afinidade um processo inviável para obtenção de avidina em larga escala.

As técnicas cromatográficas com ligantes de afinidade imobilizados têm sido utilizadas com êxito para purificação da lisozima. Trabalhos para purificação da proteína estão reportados na literatura, como o realizado por Quan et al. (2009), que estudaram a purificação da lisozima através da utilização de microesferas macroporosas de sílica contendo tris imobilizado. A

matriz apresentou-se específica para a proteína, além de ser reproduzível e estável, sendo utilizada por 20 ciclos e para testes durante 6 meses.

Mól et al. (2017) e Veríssimo et al. (2017) utilizaram o tris imobilizado em criogéis supermecroporosos para purificação da lisozima. Em ambos os trabalhos a proteína foi purificada, alcançando-se respectivamente 72% e até 92% de pureza. Além do grau de pureza elevado, o ligante utilizado era de baixo custo, fator relevante para qualquer, e a proteína foi purificada através de um processo com uma única etapa.

Estratégias menos onerosas, com menor número de etapas e que resultem na obtenção da avidina e da lisozima com alto grau de pureza devem ser buscadas, viabilizando a obtenção das proteínas em maior escala. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo integrado para purificação da avidina e da lisozima presentes na clara de ovo. Inicialmente, foi utilizado uma coluna ativada com Tris para captura específica da lisozima. Em seguida, foi utilizada uma coluna de troca catiônica para captura da avidina presente na solução contendo as proteínas que não foram adsorvidas na etapa anterior.

Palavras-chave: avidina, lisozima, purificação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Para a produção dos criogéis foram utilizados os monômeros acrilamida (AAm, 99%), N, N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAm), persulfato de amônio (APS), N, N, N', N'-tetrametilenodiamino (TEMED, 99%), alil glicidil éter (AGE, 99%), ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA), tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), as proteínas lisozima e avidina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis). Ainda foram utilizadas soluções de Tris-HCl, borohidreto de sódio, carbonato de sódio, tampão fosfato de sódio, tampão fosfato de potássio, acetonitrila, ácido trifluoracético (TFA), dodecil sulfato de sódio (SDS), corante azul de comassie G 250, metanol, β-mercaptoetanol e ácido acético. Os reagentes químicos utilizados para realização do experimento possuem, no mínimo, grau de pureza PA. Água ultra pura (Sistema Milli-Q, Millipore EUA) foi utilizada em todos os experimentos necessários para o preparo das soluções.

Para ativação das colunas supermacroporosas foram utilizados como reagentes: solução de diperiodato cuprato de potássio (solução de $K_5[Cu(HIO_6)_2]$): sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), periodato de potássio (KIO_4), persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), KOH (hidróxido de potássio), solução de NaOH, água deionizada ultra pura.

2.2 Métodos

2.2.1 Síntese dos Criogéis

A metodologia utilizada para a produção dos criogéis foi adaptada à metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006). Dessa forma, uma solução aquosa contendo 8% (m/m) de monômeros (1,185 g de AAm, 0,3175 g de MBAAm e 1 mL de AGE) foi preparada, dissolvendo-os em 25 mL de água deionizada e desgaseificada sob vácuo durante 10 min. Para o criogel de troca catiônica, utilizou-se um volume de 0,25 mL de AGE. Em seguida, a solução foi resfriada em banho de gelo por 5 min. Os criogéis foram produzidos pela reação de polimerização iniciada por TEMED e APS. Após o resfriamento da solução, 48 µL de TEMED foi adicionado à mistura e agitada por 1 min. Subsequentemente, 100 µL de APS foi adicionado à mistura e novamente agitada por 1 min. A mistura reativa foi vertida em colunas cromatográficas com 10 mm de diâmetro interno e 200 mm de altura (Tricorn 10/200, GE Healthcare®) previamente climatizadas em banho termostático (Ultracriostato Quimis

Q214S, São Paulo) contendo etanol à temperatura de $(-12 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C})$. As colunas foram mantidas nesta temperatura por 24 h, para em seguida serem descongeladas em refrigerador (temperatura de aproximada de $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Após o descongelamento, as colunas foram lavadas com 200 mL de água desionizada ultrapura através da utilização de uma bomba peristáltica (BT/F Series Intelligent Displaying) a uma vazão de 1 mL/min. Após a lavagem, os criogéis foram secos em estufa BOD à temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e armazenados em ambiente seco até o momento de sua utilização.

2.2.2 Ativação do criogel com TRIS

Para ativação do criogel de afinidade, utilizou-se a metodologia adaptada de Quan et al. (2008). Inicialmente, o criogel foi imerso em metanol (30 mL) à temperatura ambiente durante 6 h. Em seguida foi imerso em 50 mL de uma solução de fosfato de potássio (2,5 mmol / L, pH 9,0) contendo 18,8g tris hidroximetil aminometano à temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, por um período de 48 h. Após esse tempo, o criogel foi imerso em 50 mL de uma solução de carbonato de sódio (0,2 mol / L, pH 9,2) contendo 5,78 g de borohidreto de sódio. Ao final desse processo, o criogel foi lavado com água ultrapura para remoção de agentes de ativação residuais.

2.2.3 Ativação do criogel com AMPSA

O diperiodato cuprato de potássio (DCP) foi utilizado como solução iniciadora, conforme metodologia adaptada de Savina et al. (2005). Para o preparo da solução de diperiodato cuprato de potássio ($\text{K}_5[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]$), com concentração final de Cu (III) igual a $0,0562 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, sulfato de cobre penta-hidratado (3,54 g), periodato de potássio (6,82 g), persulfato de potássio (2,2 g) e hidróxido de potássio (9,0 g) foram solubilizados em 250 mL de água deionizada. Essa mistura foi levada à ebulição por 40 min, resfriada à temperatura ambiente (25°C) e filtrada em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi diluído com água deionizada para 250 mL, para posterior uso.

Para a ativação dos criogéis, utilizou-se a mistura de uma solução de NaOH 1,0 mol / L e diperiodato cuprato de potássio, na proporção de 1:3. A mistura foi bombeada através dos criogéis em circuito fechado durante 90 min (recirculação) a uma vazão de 1,0 mL / min e a temperatura de $(45 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$ foi mantida, utilizando-se uma estufa BOD (Ultracriostato Q214S, Quimis, São Paulo). Após isso, 25 mL de solução de AMPSA (2,0 mol / L) foi bombeada

através do criogel em circuito fechado a uma vazão de 1 mL / min e temperatura de $(45 \pm 0,2)$ ° C por 2 h. Em seguida, 200 mL de HCl ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foram bombeados através da coluna a uma vazão de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ à temperatura de 45 ° C. Por fim, 400 mL de água deionizada foram bombeados à mesma vazão e temperatura ambiente para lavagem da coluna e remoção de reagentes livres. A coluna foi armazenada em recipiente e local seco até o momento do uso.

2.2.4 Determinação do grau de ligação (G), densidade (D) e rendimento (E) do processo de ativação para o criogel de troca catiônica

Foram determinados o grau de ligação (G), a densidade de ligação (D) e a eficiência de ligação (E) (SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005) a fim de avaliar-se a eficiência no processo de ligação dos criogéis de troca catiônica. Para determinação desses parâmetros foram utilizados monólitos produzidos em seringas plásticas. Os cálculos desses parâmetros foram feitos utilizando-se as equações abaixo:

$$G = \frac{(m_1 - m_0)}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

$$D\left(\frac{\text{mol}}{\text{Kg}}\right) = \frac{(m_1 - m_0)}{m_0} \times \frac{1}{MM_{AMPSA}} \quad (2)$$

$$E = \frac{(m_1 - m_0)}{m_2} \times 100 \quad (3)$$

onde m_0 é a massa (g) do criogel original desidratado, m_1 é a massa (g) do criogel ativado desidratado, m_2 é a massa (g) de AMPSA que escoou através do criogel e MM massa molar (g / mol) do AMPSA.

3.0 Caracterização dos Criogéis

3.1 Capacidade de Inchamento

A capacidade de inchamento (S) dos criogéis, por imobilização do Tris e por enxertia do AMPSA foi avaliada secando-se os monólitos em estufa até peso constante. Após secos, eles foram levados ao dessecador para esfriarem (25° C) e suas massas verificadas. Em seguida, os criogéis foram reidratados, por imersão em 50 mL de água (25° C), por 24 h. Decorrido este tempo eles foram retirados da água e tiveram suas massas novamente registradas. A equação (4) foi utilizada para o cálculo do valor de (S) (SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005).

$$S(g/g) = \frac{m_w - m_s}{m_s} \quad (4)$$

Em que m_w corresponde à massa (g) do criogel saturado com água e m_s corresponde à massa (g) do criogel desidratado.

3.2 Grau de Expansão (ED)

O grau de expansão (ED) do criogel é útil para conversão entre a massa do criogel desidratado (armazenado) e seu volume hidratado (quando em uso). Os criogéis ativados foram desidratados e tiveram suas massas determinadas. Depois, foram saturados com água ultrapura durante 24 h. Após hidratados, foram transferidos para uma proveta graduada contendo um determinado volume de água (V_1) e o novo volume final (V_2) foi determinado. A diferença entre V_2 e V_1 foi utilizada para calcular o grau de expansão do criogel, a por meio da equação 5.

$$ED (mL/g) = \frac{V_2 - V_1}{m_s} \quad (5)$$

em que V_1 é o volume inicial de água na proveta (mL); V_2 é o volume final de água na proveta (mL) após a mesma comportar o criogel, e m_s é a massa do criogel desidratado (g).

3.3 Distribuição de tempos de residência (DTR)

As medidas da distribuição de tempos de residência (DTR) foram realizadas utilizando o método de pulsos de um traçador (acetona), de acordo com Mól et al., (2017). Água ultrapura foi bombeada sob diferentes vazões (0,5 a 8 mL/min) e um pulso de traçador (100 µL de uma solução de acetona 5% v/v) foi injetado na coluna, onde a resposta correspondente na saída da coluna foi medida por um detector de radiação na região do UV (280 nm).

Os tempos de retenção (t_r) e as variâncias (σ^2) para os pulsos observados foram calculados utilizando-se método dos momentos. Foi calculado o primeiro momento estatístico (ou tempo de retenção) para os pulsos injetados de acordo com Equação 6:

$$M_1 = t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad (6)$$

Onde: M_1 é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, t_R é o tempo de retenção (s), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$) e Abs_i é a absorvância registrada no tempo t_i .

O segundo momento, que representa a variância da DTR, centrada no valor do tempo de retenção calculado no primeiro momento, é dado pela Equação 7:

$$M_2 = \sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (7)$$

onde: M_2 é o segundo momento estatístico (s^2), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, σ^2 é a variância do pulso observado (s^2), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$), Abs_i é a absorvância registrada no tempo t_i e t_R é o tempo de retenção do pulso observado (s).

O efeito que o próprio equipamento poderia gerar nas medidas realizadas foi corrigido para o primeiro e segundo momentos determinados, usando-se valores experimentais nas mesmas condições avaliadas, porém sem o criogel.

3.4 Porosidade

A porosidade será determinada através da Equação 8 (FURUSAWA; SUZUKI; SMITH, 1976).

$$t_r = \frac{L}{U} \frac{\varepsilon_t}{\varepsilon_r} \quad (8)$$

onde ε_t é a porosidade total da coluna, t_r é o tempo de residência, L é o comprimento da coluna e U é a velocidade de escoamento da fase móvel.

3.5 Dispersão Axial

Uma vez determinados t_r e σ^2 , o coeficiente de dispersão axial aparente para cada velocidade de escoamento estudada será calculado por regressão não-linear, resolvendo-se a Equação 9.

$$\frac{\sigma_t^2}{t_r^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(\frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad (9)$$

onde D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial aparente (m^2/s), e u é a velocidade intersticial do fluido através do criogel ($u = U\varepsilon_T$), onde ε_T é a porosidade do criogel e U é a velocidade de escoamento do líquido.

3.6 Altura equivalente a pratos teóricos (AETP)

Os valores da altura equivalente de pratos teóricos (AETP) será calculado conforme a Equação 10:

$$AETP = L \frac{t_r^2}{t_r^2} \quad (10)$$

3.6 Permeabilidade hidráulica

A queda de pressão hidrostática (ΔP_w) através da coluna foi medida em um cromatógrafo líquido (Äkta Pure, GE Healthcare, Suécia) utilizando-se água deionizada em diferentes velocidades superficiais (0,6 a 12,7 cm/min). A permeabilidade hidráulica (K_w) foi determinada por regressão linear da equação de Darcy (Eq. 11):

$$\frac{\Delta P_w}{L} = - \frac{\mu_w}{K_w} \cdot U \quad (11)$$

Em que μ_w (Pa/s) representa a viscosidade da água; L (cm) é o comprimento da coluna e U (cm/min) é a velocidade superficial da fase móvel. O experimento foi repetido com a coluna sem o criogel para correção do efeito da queda de pressão devido ao equipamento e tubulações.

3.7 Capacidade iônica do criogel ativado com AMPSA (Λ)

A capacidade máxima de trocar cátions que o criogel possui é expressa pela capacidade iônica do mesmo. Para sua determinação um método titulométrico foi utilizado. Três criogéis produzidos em seringas foram desidratados e cortados com o auxílio de uma lâmina de aço inox em pedaços cúbicos de cerca de 2,0 mm de aresta, sendo homogeneizados para que a utilização fosse aleatória. Em três tubos de centrífuga de 50 mL foram pesados aproximadamente 50 mg de criogel e adicionados 45 mL de uma solução de HCl 1,0 mol / L. Os tubos foram mantidos sob agitação orbital por 12 h a 25 rpm e temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi retirada e os criogéis que estavam nos tubos foram submetidos a uma tripla lavagem com 45 mL de água deionizada seguido de agitação dos tubos por 3 h. Antes de cada lavagem, os tubos contendo os pedaços de criogel foram rinsados com aproximadamente 90 mL de água para retirada do excesso de íons H^+ livres em solução.

Os tubos foram levados para secagem a $(60 \pm 2)^\circ C$ por 24h, resfriados e acrescentou-se 45 mL de uma solução de NaCl 2,0 mol / L deixando-se em agitação orbital por 12 h a 25 rpm. Uma alíquota de 40 mL de solução foi retirada de cada um dos tubos e titulada com uma solução de NaOH 0,01 mol / L padronizada. A solução de NaCl também foi titulada, representando o branco da análise. O número de íons H^+ quantificados foi igual ao número de

íons Na^+ trocados com o criogel. A capacidade iônica total do criogel em termos de massa de criogel desidratado (Λ_m), expressa em mol / kg foi determinada por meio da equação 12.

$$\Lambda_m = \frac{V_t}{m} \left(\frac{M_{\text{NaOH}} f V_{\text{NaOH}}}{V} \right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{M_{\text{NaOH}} f V_{\text{NaOH}}}{V} \right)_{\text{NaCl}} \quad (12)$$

Em que: V_t é o volume total de solução de NaCl colocada no tubos (L), m é a massa de criogel desidratado no tubos (kg), M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH utilizada para a titulação ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), f é o fator de correção da solução de NaOH, V_{NaOH} é o volume da solução de NaOH gasta na titulação e V é o volume de solução titulada com NaOH (L). Os parênteses com a notação ‘*amostra*’ indicam a solução salina após o contato com o criogel e os parênteses com a notação ‘*NaCl*’ indicam a solução salina antes do contato com o criogel.

A capacidade iônica total do criogel hidratado (Λ) foi determinada de acordo com a equação 13:

$$\Lambda = \frac{\Lambda_m}{ED} \quad (13)$$

Em que: Λ_m é a capacidade iônica total por massa de criogel desidratado (mol / kg) e ED é o grau de expansão do criogel (L / kg).

4. Estratégia de captura da avidina e lisozima da clara de ovo

4.1 Preparo da clara de ovo

Para captura da avidina e lisozima da clara de ovo, foram utilizados ovos de galinha. Primeiramente, a clara foi manualmente separada da gema e filtrada utilizando uma peneira plástica com diâmetro de 5,0 cm e malha de 1,0 mm, para remoção da chalaza. Em seguida, as claras foram homogeneizadas em alta pressão (Homogeneizador Emulsiflex/C5 da Safetyglass), sendo submetidas a três ciclos de homogeneização a uma pressão de 250 Bar. Após essa etapa, centrifugou-se as claras a 12000 x g por 10 min, à temperatura de 4 ° C. Recolheu-se o sobrenadante, que foi filtrado a vácuo em membrana de acetato de celulose (diâmetro de poro de 1,2 μm). O sobrenadante foi diluídas com tampão fosfato de sódio 0,02

mol·L⁻¹ na proporção de 1:4 e o pH ajustado para 7,5, pois esse valor encontra-se distante do ponto isoelétrico (pI) da lisozima (pI_{lisozima}: 10,7), favorecendo a interação da proteína com o ligante imobilizado no criogel de afinidade.

4.2 Procedimento experimental

Estudo da captura da lisozima

Para a captura da lisozima utilizou-se um criogel ativado com Tris. O processo adsorptivo foi conduzido utilizando-se clara de ovo na diluição 1:4 como solução de alimentação; utilizou-se como fase móvel tampão fosfato de sódio 0,02 mol / L, pH 7,5 a uma vazão constante de 3 mL / min. A fase móvel foi continuamente monitorada por um detector UV-Vis (280 nm).

Inicialmente a coluna foi equilibrada com 4 volumes de coluna (VC) de tampão fosfato de sódio, em seguida 30 mL da solução de alimentação foi bombeada através da coluna. Utilizou-se 4 VC de tampão nas mesmas condições descritas anteriormente, para lavagem da coluna (retirada do material que não foi adsorvido), até que a linha de base fosse estabilizada. Para a dessorção das proteínas que foram adsorvidas, utilizou-se tampão fosfato de sódio 0,02 mol / L acrescido de cloreto de sódio (NaCl) 1M. O eluído foi armazenado para posteriormente ser analisado em HPLC. O reequilíbrio da coluna foi realizado com 4 VC da fase móvel, para que o tampão de eluição (fosfato de sódio 0,02 mol / L acrescido de NaCl 1M) fosse removido. Após o reequilíbrio a coluna estava novamente pronta para uso. A solução que passou pela coluna contendo as proteínas não adsorvidas, denominada FMSL, foi armazenada para ser usada como solução de alimentação na etapa de captura da avidina (segunda etapa do experimento).

Estudo da captura da avidina

Inicialmente equilibrou-se a coluna com 4 VC de tampão fosfato de sódio 0,02 mol / L. Em seguida, 30 mL da solução FMSL, com pH ajustado utilizando solução de HCl 1M ou NaOH 2M (dependendo da necessidade) para os valores de 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 foram bombeadas pelo criogel funcionalizado com AMPSA (troca catiônica) para captura da avidina. Em seguida, a coluna foi lavada com 4 VC de tampão fosfato de sódio 0,02 mol / L para retirada do material não adsorvido. A dessorção foi realizada com uma solução tampão fosfato de sódio

0,02 mol / L acrescida de NaCl 1 mol / L, com pH ajustado aos valores anteriormente citados. Finalmente, após a dessorção, equilibrou-se a coluna com 4 VC de tampão-fosfato 0,02 mol / L para uso posterior. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, em triplicata utilizando-se o sistema Äkta-Pure.

4.3 Determinação da concentração da avidina e da lisozima

A quantificação da avidina e da lisozima foi realizada de acordo com Liao et al. (2001), utilizando-se uma coluna de fase reversa (C18 Shim-pack GIST/GISS Series, 250 x 4,6 mm, Shimadzu), através de um gradiente de acetonitrila e TFA 0,1% (ácido trifluoroacético) como fase móvel, acoplada ao sistema Äkta Pure, com detector UV-Vis e comprimento de onda de 280nm. O procedimento foi realizado a uma vazão de 0,5 mL/ min, à temperatura ambiente (25 ° C). Uma curva de calibração foi preparada utilizando-se soluções de lisozima e outra utilizando soluções de avidina, em diferentes concentrações, a fim de determinar-se a concentração de cada uma das proteínas estudadas nos eluídos coletados. O gradiente utilizado para quantificação das proteínas está apresentado na Tabela 5:

Tabela 5: Programação do gradiente da fase móvel utilizado para eluição das proteínas estudadas.

Tempo (min)	Percentual de Acetonitrila (%)
0-40	10-40
40-45	40
45-50	40-80
50-55	80
55-60	80-10
60-70	10

Fonte: LIAO et al., 2001.

4.4 Determinação da concentração total de proteínas

O conteúdo total de proteínas foi determinado espectrofotometricamente, de acordo com o método de Bradford (1976). A absorbância foi determinada utilizando-se um

espectrofotômetro (Modelo Libra S70, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) em comprimento de onda de 595 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm e volume nominal de 1,0 mL. A curva de calibração foi elaborada com soluções de BSA (albumina do soro bovino) a diferentes concentrações.

4.5 Determinação da atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima nos eluídos da coluna de afinidade (criogel ativado com TRIS) foi determinada pelo método de Shugar (1952), através da utilização de um kit comercial, Lysozyme Activity Kit (código LY0100) da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Uma solução de *Micrococcus lysodeikticus* de aproximadamente 0,1% m/v foi preparada em solvente oferecido no Kit. Pipetou-se 800 µL dessa solução e em seguida acrescentou-se 30 µL das amostras dos diferentes eluídos contendo as lisozimas, o que também foi realizado para as amostras da alimentação. O branco foi constituído de 30 µL do solvente oferecido no Kit. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro à medida que decrescia, por um tempo de 5 min em comprimento de onda de 450 nm, para que se obtivesse a velocidade linear máxima ($\Delta A_{450}/\text{min}$). A atividade enzimática (U / mL) foi calculada por meio da equação 14:

$$Ativ. = \frac{(\Delta A_{450} / \text{min})_{amostra} - (\Delta A_{450} / \text{min})_{branco}}{0,001 \times 0,03} \times (df) \quad (14)$$

Em que *df* é o fator de diluição.

Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir um decréscimo de 0,001 na densidade óptica por minuto.

4.6 Recuperação e fator de purificação

Para a verificação da eficiência do processo de purificação das proteínas estudadas, foi determinada a recuperação (Rp) dos eluídos contendo avidina e lisozima adsorvidas ao criogel de troca iônica e de afinidade respectivamente. A recuperação (Rp) de cada proteína foi

calculada como razão entre a massa de proteína que entrou no leite e a massa recuperada na eluição, por meio da equação 15

$$Rp(\%) = \frac{m_{elu}}{m_{per}} \times 100 = \frac{m_{elu}}{C_0 V_{per}} \times 100 \quad (15)$$

Em que: m_{per} é a massa de avidina ou lisozima que percolou a coluna (mg), m_{elu} é a massa de avidina ou lisozima recuperada na eluição, C_0 é a concentração de avidina ou lisozima na solução de entrada ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e V_{per} é o volume de solução de alimentação que percolou o leite (mL).

A determinação do grau de pureza da avidina e da lisozima foi realizada com relação às proteínas totais, por meio da equação 16:

$$P_{prot} (\%) = \frac{m_{prot} (av ou lz)}{m_{prot total}} \times 100 \quad (16)$$

Em que: m_{lis} é a massa de lisozima extraída (mg) e $m_{prot total}$ é a massa de proteína total obtida na extração (mg).

O fator de purificação (F_p) também foi determinado em termos de massa ($F_{p,m}$), sendo dado como a razão entre a pureza da avidina ou da lisozima no eluído e a pureza de avidina ou lisozima na solução de alimentação (equação 17). Também determinou-se em termos de atividade (somente para a lisozima, $F_{p,ali}$), sendo a razão entre a atividade da lisozima no eluído e a atividade específica na alimentação (equação 18):

$$F_{P,m} = \frac{P_{proteína,elu}}{P_{proteína,ali}} \quad (17)$$

$$F_{P,ali} = \frac{A_{esp lisozima,elu}}{A_{esp lisozima,ali}} \quad (18)$$

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese descontínua (SDS-PAGE) foi realizada usando um sistema de eletroforese vertical (BioRad, CA, USA) a uma tensão de 100 V. O gel de empilhamento foi sintetizado à concentração de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl (1,0 mol / L, pH6,8) e o gel de separação à concentração de 12% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl (1,5 mol L, pH 8,9).

Alíquotas de 100 µL das amostras dos eluídos do criogel de cada criogel (afinidade e troca catiônica) foram misturadas com 500 µL de solução tampão desnaturante (glicerol, Tris-HCl), SDS (dodecil sulfato de sódio), β-mercaptoetanol e azul de bromofenol), levadas ao banho termostático à temperatura de 90 ° C por 10 minutos para desnaturação das amostras. Volumes de 40 µL foram aplicados no gel de separação, sendo a eletroforese conduzida a 100V. Após a corrida, as proteínas foram fixadas ao gel utilizando-se uma solução de metanol e ácido acético (proporção de 1:4) por 12 h. Após a fixação utilizou-se solução corante contendo Comassie Blue (G 250) dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de ácido acético, durante 24 h. A descoloração foi realizada durante a noite (*overnight*) com uma solução contendo metanol e ácido acético, proporção de 1:2.

5. Resultados e Discussão

5.1 Avaliação das características do criogel

Capacidade de inchamento (S) e grau de expansão (ED)

Para o presente trabalho os valores de capacidade de inchamento foram de $15,15 \pm 0,82$ kg/kg e $19,56 \pm 1,24$ kg/kg (criogéis de afinidade e de troca catiônica, respectivamente). Os valores aqui encontrados indicam a quantidade de água necessária para hidratar completamente

1 Kg de criogel, trata-se da medida do quanto essa matriz pode expandir-se (CARVALHO et al., 2014). Esses valores estão próximos ao encontrado por Paganoto (2014) e por Veríssimo et al. (2017) que também utilizaram criogéis de poliacrilamida, onde obtiveram 13,73 kg / kg e 14,55 kg / kg.

Já o grau de expansão (*ED*) encontrado foi de $18,34 \pm 2,99$ L / kg (afinidade) e $21,05 \pm 0,41$ L / kg (troca catiônica). O AGE (alil glicidil éter) foi adicionado em diferentes quantidades na formulação dos criogéis de afinidade (1 mL) e de troca catiônica (0,25 mL), esse composto apresenta característica hidrofóbica, tendendo a repelir a água que estaria presente nos poros. A presença dessa água nos poros é que permite-nos mensurar o quanto a matriz consegue expandir-se, dessa forma a utilização de uma maior quantidade de AGE na formulação do criogel de afinidade impactou em menor valor de *ED* do que no criogel de troca catiônica devido a essa hidrofobicidade conferida à matriz. Ao repelir a água dos poros a expansão da matriz foi “limitada”, o que não deixou de ocorrer no criogel de troca catiônica, porém em menor intensidade, visto que, a quantidade do monômero (AGE) utilizada foi quatro vezes menor que na matriz de afinidade. Para o criogel de afinidade o valor de *ED* está próximo ao encontrado por Mól (2016), em seu trabalho utilizando um criogel ativado da mesma forma que nesse trabalho. O valor encontrado para o mesmo parâmetro no trabalho desenvolvido por Gonçalves et al. (2016) foi de 25,12 L / kg quando utilizaram um criogel de poliacrilamida.

Porosidade

A porosidade de um criogel pode ser definida, de forma geral, como a capacidade que ele tem de armazenar fluidos em seus espaços interiores (PLIEVA et al., 2004a e 2004b). O método utilizado para determinação da porosidade dos criogéis foi baseado em FURUSAWA et al. (1976). Na figura 6 estão representados os dados experimentais do tempo de residência em função de (L/U), obtidos utilizando-se pulsos de acetona e água como fase móvel para o criogel ativado com AMPSA e para o criogel ativado com Tris. A porosidade do leite (criogel ativado com AMPSA) foi de aproximadamente 0,9069, e para o criogel ativado com Tris de 0,7935. Tais valores indicam que a água livre, aquela que está dentro de todos os poros, encontra-se em aproximadamente 91% e 79% da massa dessas matrizes. A porosidade da coluna de troca iônica foi maior que a da coluna de afinidade devido à quantidade de AGE (alil glicidil éter) utilizado. O AGE aumenta a polimerização durante o processo de síntese do criogel. Assim, o fato de ter sido utilizada em quantidade quatro vezes maior no criogel de

afinidade (1mL) do que no de troca catiônica (0,25mL) pode ter acarretado em maior polimerização, possivelmente, a “rede” de monômeros do monólito apresentou-se mais entrelaçada, o que acarretou em menor porosidade na coluna de afinidade. Aliado a essa possibilidade, a polimerização por enxertia do AMPSA nesse trabalho não apresentou-se alta (34,15%), mesmo que as moléculas desse composto apresentem grande tamanho, a polimerização das moléculas na superfície do criogel não foi capaz de promover uma redução significativa sobre a porosidade da coluna. O mesmo pode ser observado no trabalho de Yao et al., 2007, quando trabalharam com criogel ativado com AMPSA para troca catiônica, obtendo porosidade de 85% para o monólito.

O resultado encontrado nesse trabalho para o criogel de troca iônica (90,62%) está de acordo com valores encontrados por FONTAN (2013), PLIEVA (2004a e 2004b). Já para o criogel de afinidade o valor foi um pouco menor do que o encontrado por MÓL (2016), mas próximo ao obtido por PAGANOTO (2014) e ao encontrado por outros autores que trabalharam com criogéis de poiliacrilamida (ARDVISSON et al., 2002; Yao et al., 2006a e 2006b; DAINIAK, 2006), que apresentaram valores variando entre 70 e 85%.

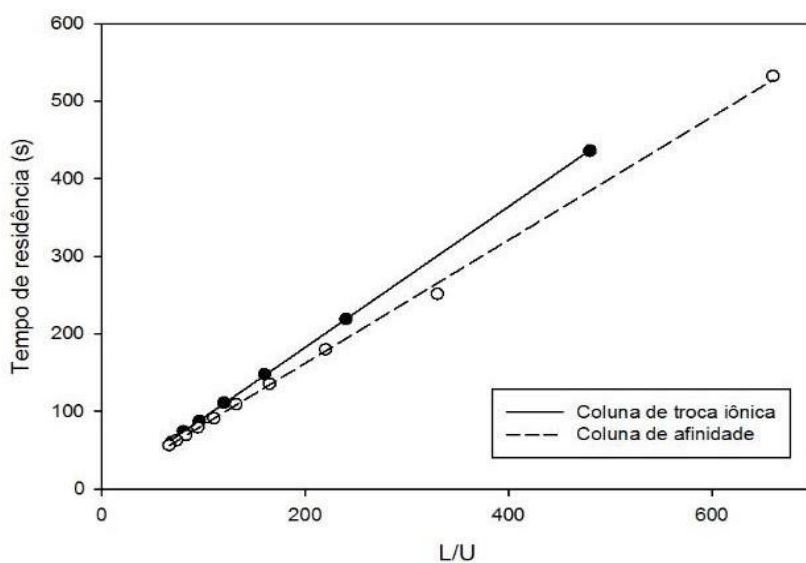
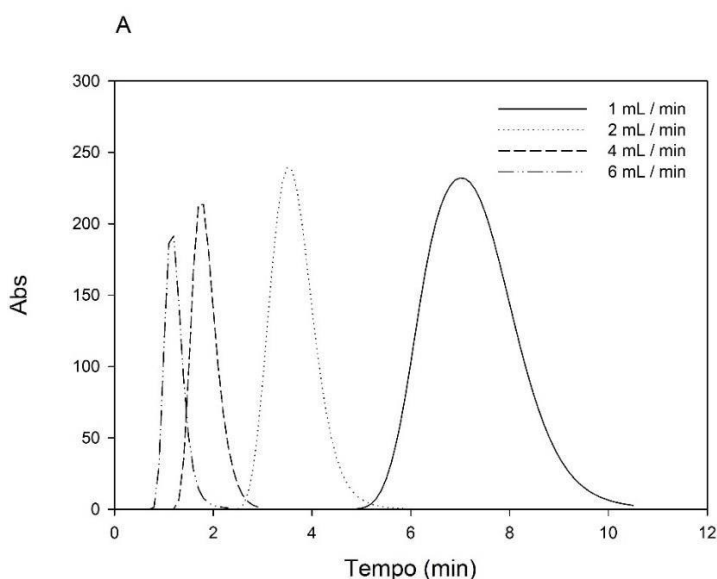


Figura 6: Dados experimentais para $(L/U) / s$ versus t_R (●) para pulsos de acetona, utilizando-se o método dos momentos. Criogel de troca iônica (—), criogel de afinidade (- - -).

Distribuição do tempo de residência, dispersão axial e altura equivalente a pratos teóricos

Água foi utilizada como fase móvel para determinação das curvas de distribuição do tempo de residência (DTR), quando se utilizou pulsos de acetona na coluna. A DTR foi determinada variando-se a velocidade superficial da fase móvel, utilizando-se vazões de 1 a 7 mL / min. As curvas correspondentes à DTR podem ser observadas na Figura 7.

Avaliando-se os perfis das curvas para os dois criogéis, nota-se que à medida em que a velocidade superficial aumenta, os picos se tornam mais estreitos. O grau de mistura no escoamento através do leito monolítico é representado pela dispersão axial. Através da observação das curvas de DTR (Figura 7) pode-se observar que quanto menor a vazão maior a largura da base do pico. Quanto menor a largura da base do pico, mais simétricas são as curvas, significando que houve um menor grau de mistura durante o escoamento da fase móvel que percolou o leito. Percebe-se ainda que as curvas obtidas foram simétricas, o que pode ser atribuído à homogeneidade na estrutura dos poros e tamanho uniforme dos mesmos. De acordo com Yao et al. (2006a), a assimetria nas curvas de DTR está diretamente relacionada a uma estrutura porosa não homogênea ou à falta de uniformidade na distribuição dos poros que são formados no criogel durante o processo de produção, acarretando em uma mistura e dispersão intensas dentro da coluna.



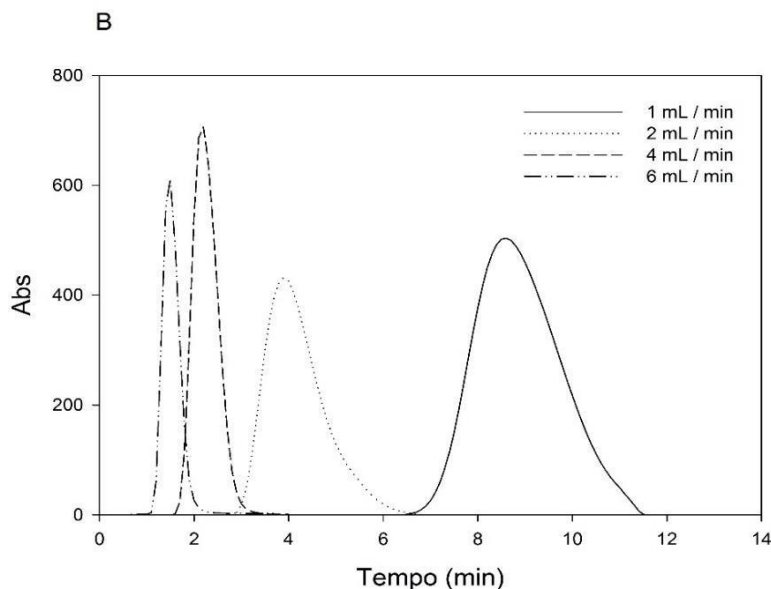


Figura 7: Curvas de DTR para pulsos de acetona em (A) criogel ativado com AMPSA e (B) criogel ativado com Tris, utilizando água como fase móvel a diferentes velocidades de escoamento.

Os coeficientes de dispersão axial (D_{ax}) em função da velocidade superficial da fase móvel correspondente às duas colunas de criogel são apresentados na Figura 8. Para a coluna de troca iônica os valores de D_{ax} variaram de 0,0128 e 0,5958 cm^2/min e para a de afinidade entre 0,0954 e 0,739 cm^2/min . Observa-se que à medida que velocidade superficial do líquido aumenta, o coeficiente de dispersão axial também aumenta. Esse mesmo comportamento foi reportado por Yao et al. (2006a). Os valores para o D_{ax} (bem como sua variação) foram baixos, indicando que o grau de mistura na coluna no momento em que a fase móvel percolava o leito não foi intenso, o que é desejável. Os resultados desse trabalho estão similares aos obtidos por Fontan (2013), Mól (2016), Yao et al. (2006a e 2006b) para criogéis sintetizados a partir de acrilamida e bis-acrilamida.

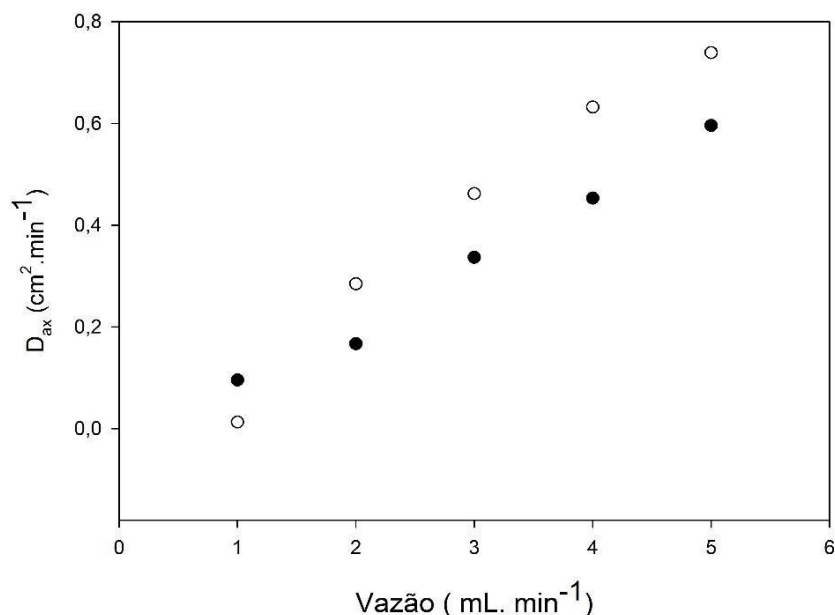


Figura 8: Coeficientes de dispersão axial (D_{ax}) para criogéis de poiliacrilamida, (●) criogel ativado com AMPSA e (○) criogel ativado com Tris, utilizando pulsos de cetona a diferentes velocidades superficiais de escoamento.

A altura equivalente a pratos teóricos (AETP) foi outro parâmetro calculado para as diferentes velocidades de escoamento da fase móvel. A AETP refere-se à altura equivalente a um estágio de equilíbrio em uma coluna cromatográfica. É como se a coluna fosse dividida em “estágios”, cada estágio corresponde a uma determinada região da coluna onde existe um equilíbrio entre a concentração de soluto na fase móvel e a concentração de soluto na fase estacionária, sendo a altura do estágio equivalente a uma AETP. Esse parâmetro é um indicativo do quão eficiente pode ser a coluna cromatográfica. Quanto menor o valor encontrado para a AETP mais eficiente será a mesma. Os valores encontrados foram próximos entre si, variando entre 0,122 e 0,168 cm para o criogel ativado com AMPSA e entre 0,100 e 0,148 cm para o criogel ativado com Tris, como pode ser observado na Figura 9. Tais valores indicam que a velocidade de escoamento da fase móvel exerce um efeito pequeno sobre a AETP. Os valores encontrados para o criogel ativado com TRIS foram menores que os encontrados por Mól et al. (2017), quando trabalharam com um criogel de afinidade para purificação da lisozima (variaram entre 0,370 e 0,454 cm), mas maiores que os encontrados por Veríssimo et al. (2017). Para o criogel de troca catiônica os resultados do parâmetro no presente trabalho foram maiores que

os reportados por Machado et al. (2015), que obtiveram os valores de HETP entre 0,08 e 0,13 cm e que os encontrados por Perçin et al. (2015) (valores de AETP entre 0,4 e 0,6 mm), quando trabalharam com criogéis de troca catiônica.

De modo geral, os valores desse trabalho encontram-se baixos, indicando que os criogéis (de afinidade e troca catiônica) apresentam baixa dispersão axial, o que é compatível com o relato de Plieva et al. (2004b), que diz que o transporte em colunas de criogel está relacionado especialmente ao fluxo convectivo e não ao difusivo.

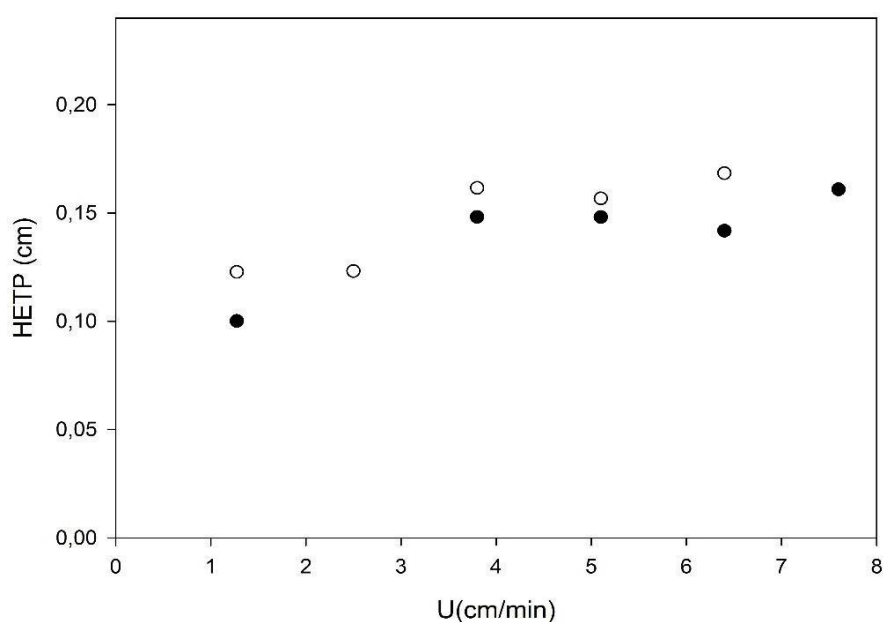


Figura 9: AETP em função das diferentes velocidade superficiais da fase móvel para (●) criogel ativado com AMPSA e (○) criogel ativado com Tris.

Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento de um meio expressa a capacidade que ele possui em deixar-se atravessar por fluidos. Esse parâmetro está relacionado à resistência da coluna frente ao escoamento dos fluidos através dela. Na Figura 10 estão apresentados os resultados experimentais referentes à queda de pressão hidrostática em função da velocidade superficial de escoamento.

Para o criogel de troca catiônica o valor de K_w encontrado foi de $2,0 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ e para o criogel de afinidade o valor foi de $3,34 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. O valor desse parâmetro indica que quanto maior o valor calculado, menor a resistência ao fluxo. Yao et al, (2007) trabalhando com criogéis de troca catiônica encontraram valores de $0,96 \times 10^{-11}$ e $0,47 \times 10^{-11}$ quando utilizou soluções de AMPSA à concentração de 1M e 2 M respectivamente, enquanto que Carvalho et al., (2014) encontraram um K_w de $4,70 \times 10^{-13}$. Mól et al. (2017) e Alcântara et al. (2017) encontraram o valor de K_w igual a $5,9 \times 10^{-13}$, trabalhando com criogéis de afinidade. Os valores encontrados no presente trabalho encontram-se similares aos reportados na literatura.

A estrutura com grande número de poros bem como os grandes poros interconectados são fatores que contribuem diretamente para a baixa resistência ao fluxo, o que possibilita que criogéis supermacroporosos sejam utilizados como fase estacionária em técnicas cromatográficas, podendo-se ainda empregar altas vazões sem que elevados valores de pressão sejam atingidos. O tamanho elevado dos poros e a interconectividade dos mesmos favorece para que a transferência de massa ocorra principalmente por convecção. A resistência à transferência de massa é praticamente negligenciável, devido ao fluxo predominantemente convectivo da solução através dos poros (DERAZSHAMSHIR et al., 2008).

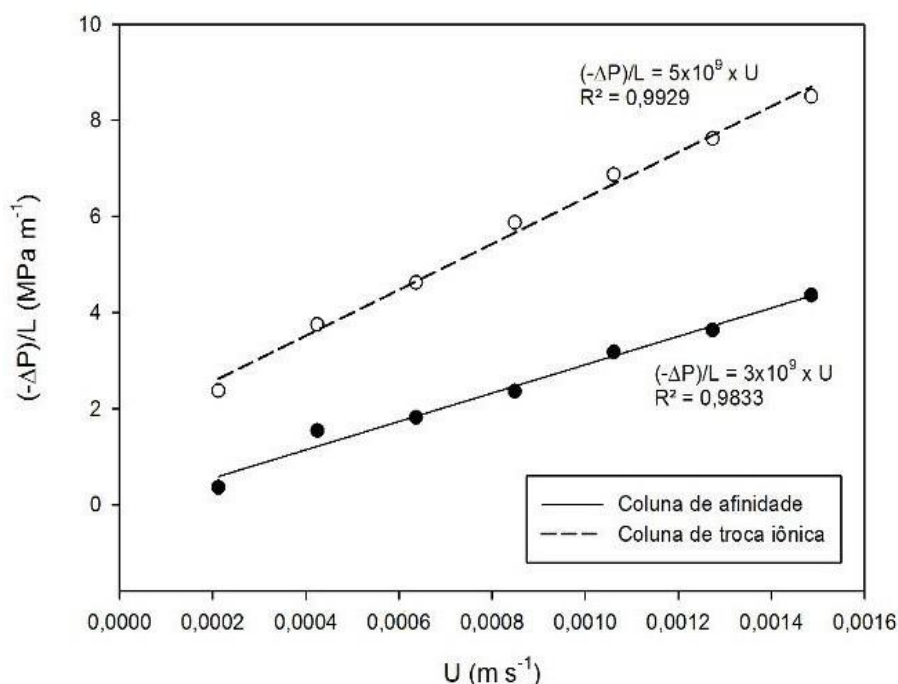


Figura 10: Dados experimentais da variação de $(-\Delta P) / L$ em função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel para (---) criogel de troca iônica (—) criogel de afinidade.

Grau, densidade e rendimento do processo de enxertia do criogel ativado com AMPSA

A Figura 11 apresenta imagens da matriz de criogel desidratada e hidratada, sendo possível observar que o criogel hidratado apresenta uma expansão de volume quando comparado ao desidratado. Essas matrizes possuem a capacidade de serem hidratadas e desidratadas sem que percam suas propriedades originais. As matrizes produzidas apresentaram-se com coloração esbranquiçada, homogêneas e ao serem hidratadas o aspecto esponjoso pôde ser observado.

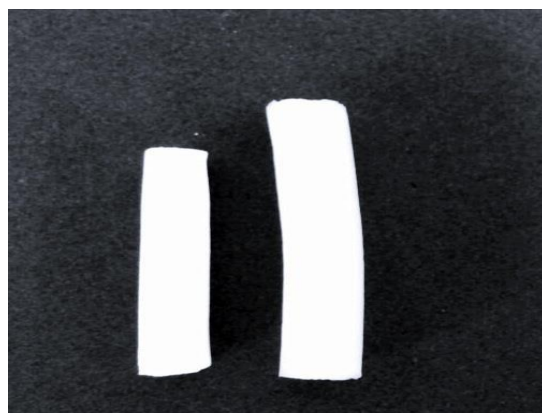


Figura 11: Imagem do criogel desidratado (A) e criogel hidratado (B). Fonte: Autoria própria.

O grau de enxertia (G) para o criogel utilizado nesse trabalho foi de 34,15%, sendo similar ao encontrado por Fontan (2013) e bem próximo ao encontrado por outros autores, sendo respectivamente 34% e 37% (HANORA et al., 2006; SAVINA et al., 2006). Para a

densidade de enxertia (D) encontrou-se um valor de $1,65 \times 10^{-3} \text{ mol / kg}$, valor próximo a $1,48 \times 10^{-3} \text{ mol / kg}$ reportado por Fontan (2013). Esses valores encontram-se um pouco distintos dos encontrados por Savina et al. (2005a), que foram entre $4 \times 10^{-3} \text{ mol / kg}$ e $9 \times 10^{-3} \text{ mol / kg}$. Porém, vale ressaltar que os valores associados a esse parâmetro dependem diretamente de alguns fatores, tais como a temperatura e o tempo de polimerização para que a enxertia ocorra, além da concentração de monômeros e de iniciador (SAVINA et al., 2005a; 2005b).

Com relação ao rendimento da enxertia (E), encontrou-se um valor de 4%, sendo próximo ao encontrado por SAVINA et al. (2006), porém inferior ao reportado em outros trabalhos (SAVINA et al, 2005 a; 2005b), que foi entre 25 e 35%. No presente trabalho uma provável explicação para que o rendimento da enxertia tenha sido baixo está relacionado à quantidade da solução de AMPSA utilizado, possivelmente a quantidade foi excessiva, o que impactou em baixo valor de E .

Por fim, a capacidade iônica de ligação do criogel foi de $582,74 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} / \text{kg}_{\text{criogel seco}}$, próximo ao encontrado no trabalho de Fontan (2013). Tal parâmetro está associado ao potencial máximo que a matriz possui em trocar cátions.

Estudo da captura da lisozima

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes a parâmetros associados ao processo de purificação da lisozima, utilizando um criogel ativado com TRIS:

Tabela 6: Resultados médios obtidos para purificação da lisozima da clara de ovo por cromatografia de afinidade.

Amostra	Volume Amostra (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Clara de Ovo	30	246,72	228000	924,12	1	100
Eluído	6	3,92	69920	17951,06	19,42	30,07

O fator de purificação refere-se à quantidade de vezes em que a proteína foi purificada com relação à mesma proteína presente na solução de alimentação (clara de ovo 1:4, pH 7,5).

A clara de ovo é uma matriz que contém grande número e diversidade de proteínas. Esse fato pode ser um agravante quando se trata de processos de purificação, fazendo com que o mesmo seja laborioso, massivo e desafiador.

Nesse trabalho a pureza encontrada para a lisozima foi de 90%, sendo considerada uma pureza alta, e foi calculada pela razão entre a massa de lisozima (mg) e a proteína total multiplicando-se o resultado por 100 em cada eluído. Para determinação desse parâmetro Veríssimo et al. (2017) utilizaram criogéis de afinidade para purificação da lisozima, obtendo pureza superior a 79%, Mól et al. (2017) encontraram uma pureza de 87% para a mesma proteína, ambos os trabalhos utilizando o TRIS como ligante. O TRIS foi o ligante utilizado no presente trabalho, pois é um ligante que interage especificamente com a lisozima.

Na Figura 12 encontram-se os cromatogramas referentes à clara de ovo diluída 10 vezes (12A) bem como de amostra de um dos eluídos da coluna de afinidade (12B).

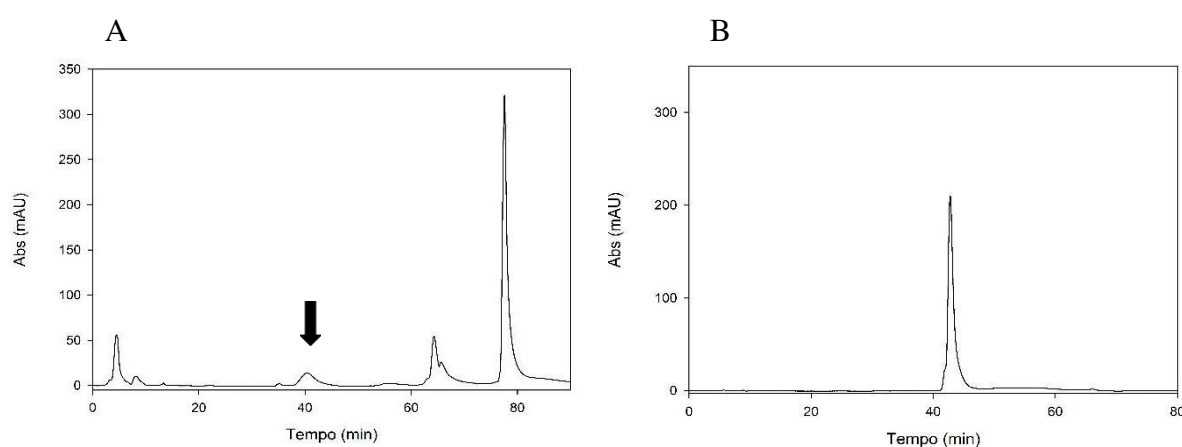


Figura 12: Perfil cromatográfico da (A) Clara alimentação (onde o pico correspondente à lisozima está indicado pela seta), (B) eluído da coluna ativada com Tris.

Ao observar-se os cromatogramas (Figura 12A e B) pode-se confirmar que o objetivo de purificar a lisozima presente na clara de ovo foi alcançado, pois o pico correspondente à lisozima é único no cromatograma referente à amostra eluída da coluna de criogel ativada com TRIS (Figura 12B), sendo possível também a observação do tempo de residência (T_R) da lisozima (Figura 12B).

Através da SDS-PAGE (Figura 13) também foi possível avaliar-se a pureza de cada um dos eluídos coletados da coluna de afinidade. Ao observar-se a banda que corresponde ao

padrão de lisozima (banda A) e compará-la com as bandas correspondentes aos eluídos da coluna de afinidade (bandas de C1 a C6), nota-se que a banda correspondente à lisozima é evidenciada e aparece praticamente única ao longo do gel de eletroforese.

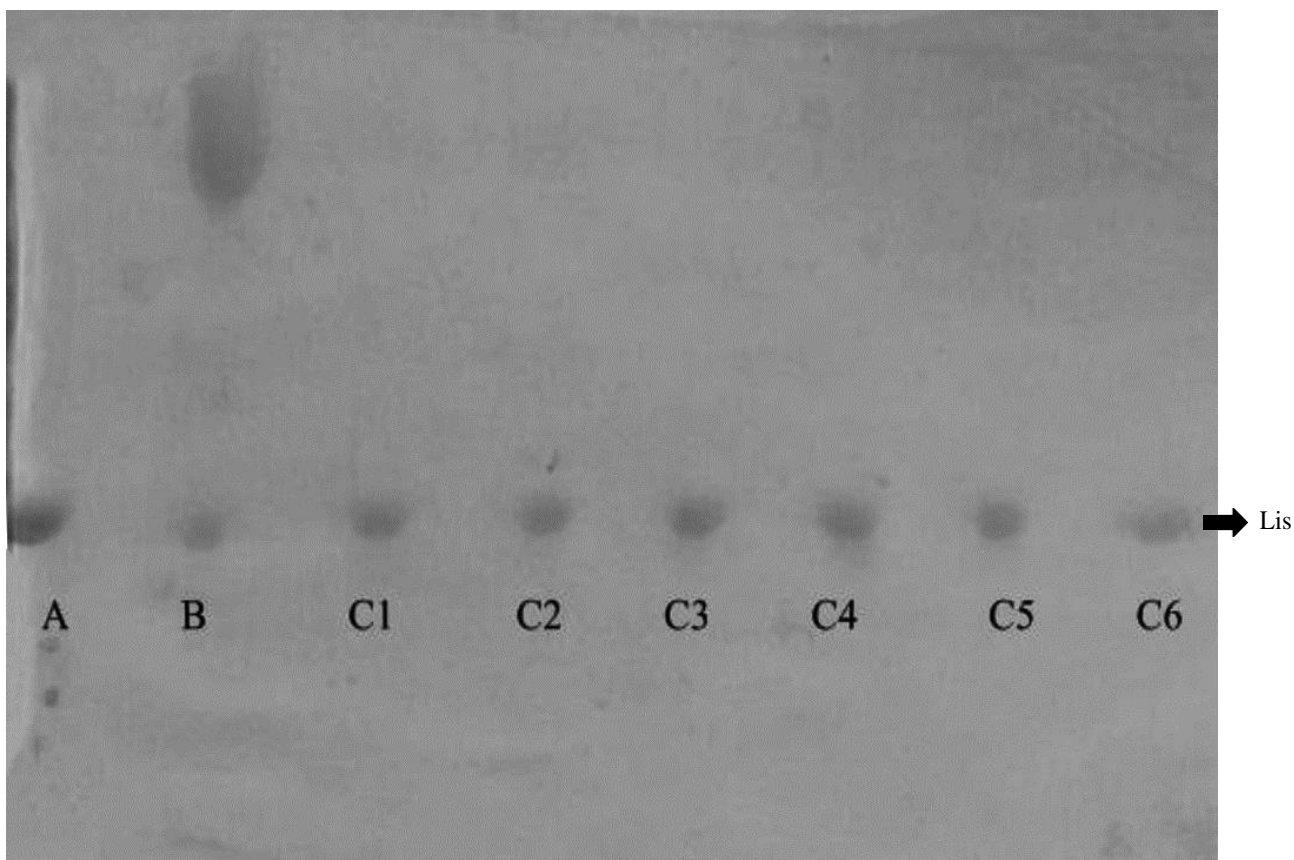


Figura 13: Gel de poliacrilamida 12%: (A) padrão de lisozima (B) clara de ovo diluída 10 vezes, eluídos coletados (pH 7,5) da coluna ativada com Tris (C1 a C6).

Estudo da captura da avidina

Nos experimentos para captura da avidina avaliou-se o efeito da variação do pH, através da utilização de soluções de clara de ovo em valores de pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0, sendo a concentração média de proteínas totais para essa faixa de pH de 7,52 mg/mL. A concentração média de foi de 0,023 mg/mL. Na Tabela 7 estão expressos os resultados referentes ao rendimento e ao fator de purificação da avidina avaliada nesse estudo.

Tabela 7: Resultados médios obtidos para purificação da avidina da clara de ovo através da cromatografia de troca catiônica.

pH	7,0	8,0	9,0	10,0
Rendimento	36,05 ± 3,3	41,6 ± 1,3	37,8 ± 1,21	46,8 ± 3,5
Fator de Purificação	2,45	2,2	2,55	2,1

Diante dos resultados pode-se observar que o maior rendimento para a captura da avidina foi obtido em pH 10,0. Durance (1987) utilizou a cromatografia de troca iônica para purificação da avidina e da lisozima. Nesse trabalho, apesar da obtenção de um alto rendimento para a avidina (72%) a pureza alcançada foi baixa, apenas 4,4%. Nesse trabalho o rendimento foi menor que no trabalho citado, porém, a pureza alcançada foi de 21,58%. Outros autores, trabalhando com a mesma proteína obtiveram rendimento de 17% (FRANKEL-CONRAT et al., 1952), 38% (DHYSE, 1954) e 39% (RHODES et al., 1958).

Trabalhos desenvolvidos para purificação da avidina encontram-se em número bastante limitado na literatura (DIDERICH et al., 2013). Esse fato pode ser justificado pela baixa concentração da mesma na clara de ovo, como também pela presença de diversas outras proteínas que se encontram em concentração maior, o que pode ocasionar impedimento estérico dificultando a adsorção da avidina no suporte. Estudos utilizando colunas de afinidade relatam que a vida útil do suporte bem como o alto valor do ligante imobilizado na coluna limitam muito a utilização da técnica para purificação da avidina (CUATRECASAS e WILCHECK, 1968; HENEY e ORR, 1981). Já os que utilizaram a troca catiônica relatam que o intuito de purificar a avidina foi alcançado, porém, nas frações de avidina havia a presença da lisozima, devido à similaridade do ponto isoelétrico entre as duas proteínas (lisozima 10,7 e avidina 10-10,5) (LI-CHAN et al., 1986). Esse conjunto de fatores dificulta o processo de purificação da avidina.

O fator de purificação nos dá uma ideia sobre quantas vezes a proteína obtida (após o processo de purificação) está mais pura com relação à mesma proteína presente na solução de

alimentação. Nas amostras eluídas da coluna de troca catiônica a avidina encontra-se cerca de 2,5 vezes mais pura do que a presente na clara de ovo “*in natuta*”.

A Figura 14 representa os perfis cromatográficos referentes à clara de ovo sem lisozima (FMSL) utilizada como alimentação (14A), onde o pico referente à avidina encontra-se indicado por uma seta e (14B). O Tr da avidina pode ser observado através dessas figuras, sendo cerca de 90 minutos.

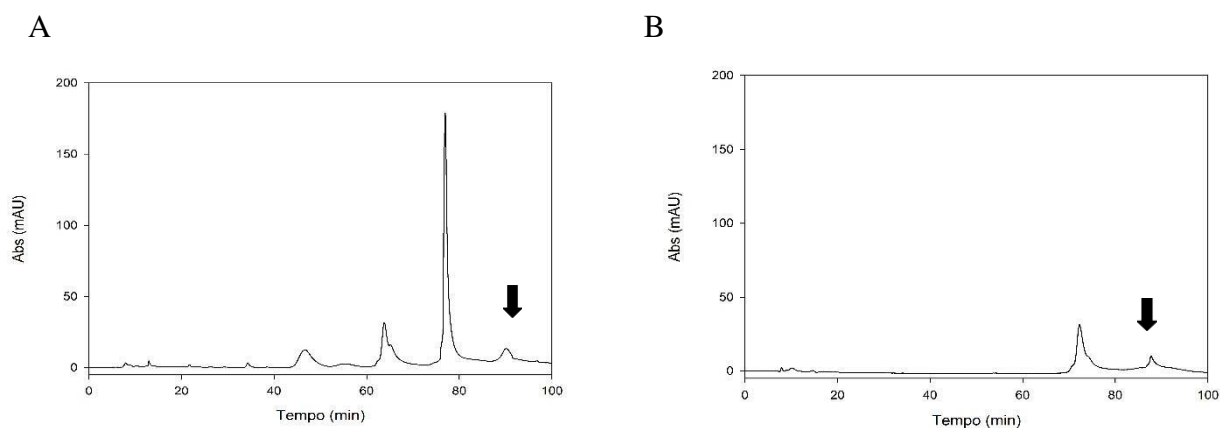


Figura 14: Perfil cromatográfico (A) Clara da alimentação (FMSL) e (B) eluído proveniente da coluna de troca catiônica. As setas indicam o pico referente à avidina.

No cromatograma referente ao eluído da coluna de troca catiônica (Figura 14B), nota-se a presença de um outro pico mais evidente que o da avidina. Através da realização de SDS-PAGE pode-se concluir esse pico trata-se da ovalbumina, sendo essa uma proteína majoritária na clara do ovo, representando cerca de 54% do total de proteínas (MINE e KOVACS-NOLAN, 2004).

A confirmação da presença da avidina de sua pureza nos eluídos e na clara de ovo também foi possível através da realização de uma SDS-PAGE, mostrada na Figura 15 (B).

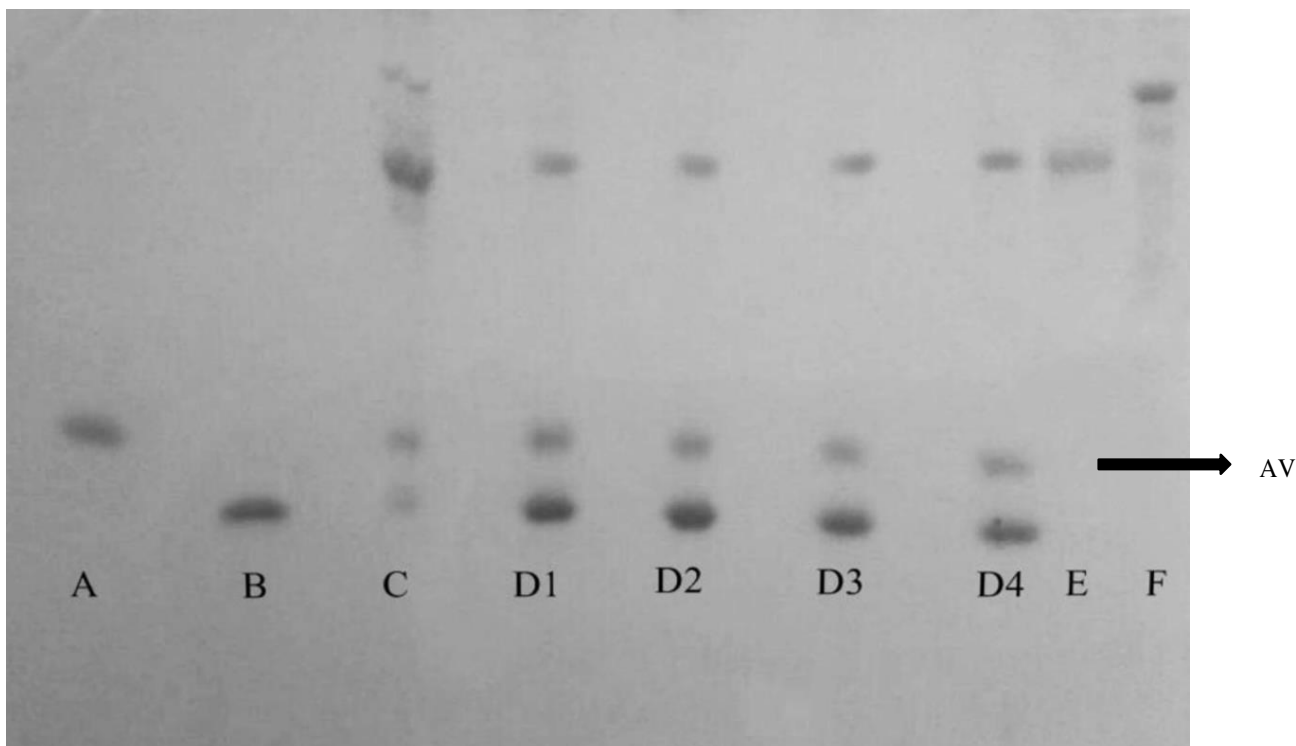


Figura 15: Gel de poliacrilamida 12%, (A): Padrão de avidina, (B) Padrão de lisozima; (C) Clara de ovo 10x diluída; (D1 a D4) eluídos da coluna de troca catiônica (em pH: 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 respectivamente); (E) Padrão de ovalbumina; (F) Padrão de conalbumina.

As bandas presentes no gel mostram a presença da avidina na segunda linha, da base para o topo do gel (Figura 15). Nota-se ainda a presença de outra banda (primeira linha da base para o topo do gel), referente à lisozima. Provavelmente a lisozima foi eluída junto com a avidina, visto que a lisozima é o principal contaminante nas frações de avidina, devido à similaridade nas propriedades de carga das proteínas, e ainda, devido à maior quantidade de lisozima do que de avidina presente na clara de ovo (DURANCE, 1987). Uma terceira banda, da base para o topo do gel, é correspondente à ovalbumina, proteína presente na clara de ovo com uma concentração de cerca de 54%, sendo a mais abundante dentre todas que compõem o albúmen (MINE e KOVACS-NOLAN, 2004).

Possivelmente a quantidade de TRIS imobilizado na coluna não foi suficiente para capturar a quantidade total de lisozima presente na clara utilizada como alimentação, mesmo o composto sendo um ligante específico para a proteína. No caso da ovalbumina, como dito anteriormente, é uma proteína que está presente em abundância na clara do ovo, o que não acontece com a avidina. Pode ter ocorrido impedimento estérico devido à alta concentração, impossibilitando que a avidina conseguisse acessar os sítios de ligação da matriz, ou ainda, a presença de outras

proteínas em grande quantidade, mesmo que essas proteínas estejam carregadas negativamente pode gerar competição por espaços dentro do criogel. Dessa forma, após a etapa de captura da lisozima a clara poderia ter sido submetida a algum tipo de processo que auxiliasse na diminuição da quantidade de ovalbumina antes de ser usada como alimentação na coluna de troca catiônica (FMSL).

A Tabela 8 apresenta a concentração e a pureza média da avidina em função do pH.

Tabela 8: Resultados da concentração e pureza médias obtidos para purificação da avidina da clara de ovo através da cromatografia de troca catiônica.

pH	7,0	8,0	9,0	10,0
Concentração (mg / mL)	0,032 ± 0,0006	0,034 ± 0,009	0,034 ± 0,006	0,043 ± 0,004
Pureza (%)	16,23	13,95	21,58	15,48

Observando-se os resultados, nota-se que à medida que o pH aumenta tem-se pouca variação no aumento na concentração da avidina, à exceção do pH 8,0 e 9,0, onde não houve variação. Em pH 10,0 foi onde houve maior concentração da avidina. Possivelmente, nesse pH a avidina apresentou-se com uma estrutura que favoreceu uma maior adsorção da proteína ao suporte, portanto acarretou em maior concentração da mesma. Porém, para confirmação dessa ocorrência, faz-se necessário a realização de análises adicionais da estrutura da avidina. Um estudo sobre a influência do pH sobre estrutura cristalina da proteína poderia levar à elucidação do comportamento da proteína em uma faixa de pH estabelecida. Vetter; Miron e Wilcheck (2018) tentaram purificar avidina através da utilização do HABA algumas vezes, sem sucesso. O êxito do trabalho foi alcançado quando as estruturas de raios-X do complexo HABA-avidina foram elucidadas.

Dentre os valores de pH estudados, a avidina apresentou maior pureza em pH 9,0. Tal resultado difere do reportado por Durance (1987), que avaliou a purificação da avidina foi em diferentes valores de pH (5,0, 7,5, 8,0 e 9,0), sendo encontrada maior pureza a pH 8,0 (3,8%), seguida de 3,3% quando testada em pH 9,0. No presente, trabalho a pureza alcançada foi, no mínimo, 3,5 vezes maior que a encontrada no trabalho desenvolvido por Durance (1987), quando se compara por exemplo, a pureza da avidina em pH 8,0; já quando se compara em pH 9,0, a pureza da avidina obtida foi cerca de 6,5 vezes maior.

Uma proposta para otimização do grau de pureza da avidina seria a utilização do hidroxiazobenzeno-2'-carboxílico (HABA) para dessorção da proteína, pois a mesma apresenta alta afinidade por esse composto. Em seu trabalho, Rao et al. (2003) utilizaram o HABA para dessorção da avidina, e relataram que devido à essa alta afinidade pela avidina, a proteína foi a única a ser dessorvida da matriz. Dessa forma, a utilização de um solvente com maior seletividade poderia elevar o grau de pureza nos processos de purificação da avidina.

Nesse trabalho a pureza da avidina purificada também foi superior à encontrada por Melamed e Green (1963), que utilizaram três etapas para purificação da avidina, sendo a pureza da proteína de apenas 1%. Já Dhyse (1954) e Fraenkel-Conrat et al. (1952), trabalhando com a mesma proteína alcançaram respectivamente 10% e em média 15% de pureza, quando trabalharam com purificação da avidina.

6. Conclusões

No presente trabalho foi desenvolvido um novo protocolo para purificação da lisozima e da avidina presentes na clara de ovo, permitindo que fossem alcançados rendimento e pureza superiores à maioria dos trabalhos relatados na literatura para a mesma proteína, considerando-se o fato de que na clara de ovo não diluída a avidina encontra-se em concentração ínfima. Além disso, o protocolo utilizado nesse trabalho utilizou um número de etapas reduzido, bem como reagentes de baixo custo (que conferiram funcionalização à matriz), o que viabiliza a utilização do mesmo para purificação da proteína, caracterizando-o como uma técnica rápida e de baixo custo. A lisozima foi purificada satisfatoriamente através da utilização do criogel funcionalizado com o TRIS, evidenciando que o ligante é realmente específico para essa proteína. Através da utilização da cromatografia de afinidade, alcançou-se pureza média de 90% com um rendimento de 30,07%. O grau de pureza médio da avidina para os diferentes valores de pH foi maior quando se trabalhou em pH 9,0, sendo de 21,58% e a maior concentração média de 0,043 mg/mL, quando se trabalhou em pH 10,0. O fator de purificação foi em média 2,33 e, sua recuperação média da proteína foi em torno de 46,8%.

7. Referências

ALDERTON, G.; FEVOLD, H. L. Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.164, p.1-5, 1946.

ALTINTAS, E. B.; CANDAN, N.; TUZMEN, N.; DENIZLI, A. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch systems. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 105-113, 2007.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; YU. GALAEV, I.; MATTIASSON, B. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, J.; DACHMANN, E.; PICHLER, M.; LOTZ, M.; KULOZIK, U. A novel approach for lysozyme and ovotransferrin fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 44-52, 2016.

CANFIELD, R. E; LIU, A. K. The disulfide bonds of egg white lysozyme. **Journal Biological Chemistry**, v. 240, p. 1997-2002, 1965.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA Jr., W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; DA SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamicryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Biochemistry**, v. 61, p. 636-643, 1968.

DAINIYAK, M. B.; GALAEV, I. Y.; MATIASSON, B. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatography separation of cells. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 145-150, 2006.

DERAZSHAMSHIR, A.; ERGUN, B.; PESINT, G.; ODABASI, M. Preparation of Zn²⁺ chelated poly (HEMA-HMA) cryogel for affinity purification of chicken egg lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2905-2913, 2008.

DHYSE, F. G. A practical laboratory preparation of avidin concentrates for biological investigation. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, p. 515-517, 1954.

DIDERICH, P., AMRHEIN, S.; HÄMMERLING, F.; HUBBUCH, J. Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-throughput techniques. **Chemical Engineering Science**, v. 104, p. 945-956, 2013.

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

DRAGAN, E. C. **Advanced separation by specialized sorbents**, CRC Press, Boca Raton, 358p. 2014.

DURANCE, T. D. Isolation of avidin and lysozyme from egg albumen. Tese (Doutorado em Filosofia), Department of Food Science, Universidad British Columbia, Vancouver, Canadá, 158 p., 1987.

DURANCE, T. D; NAKAI, S. Simultaneous isolation of avidin and lysozyme from egg white albumen. **Journal of Food Science**, v. 53, n°4, p. 1096-1102, 1988.

FONTAN, R. C. I. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas**. Tese de Doutorado em Ciência

e Tecnologia de Alimentos. Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 147p., 2013.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SNELL, N. S.; DUCAY, D. E. Avidin I. Isolation and characterization of the protein and nucleic acid. **Arch. Biochem. Biophys**, 39: 80, 1952.

FURUSAWA, T.; SUZUKI, M.; SMITH, J. M. Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse technique. **Catalysis Review: Science and Engineering**, v. 31, p. 43-76, 1976.

GREEN, N. M. Avidin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 29, p. 85-133, 1975.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, C. M. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. *Journal of Chromatography B*, v. 1033-1034, p. 406-412, 2016.

GUIOCHON, G. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2006.

HAN, B.; ZHAO, C.; YIN, J.; WANG, H. High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme. **Journal of Chromatography B**, v. 903, p. 112-117, 2012.

HANORA, A.; SAVINA, I.; PLIEVA, F. M.; IZUMRUDOV, V. A.; MATIASSEN, B.; GALAEV, I. Y. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. **Journal of Biotechnology**, v.123, p. 343-355, 2006.

HENEY, G.; ORR, G. A. The purification of avidin and its derivatives on 2-aminobiotin-6-aminohexyl-Sepharose 4B. **Analytical Biochemistry**, v. 114, p. 92-96, 1981.

HOOD, E. E.; WITCHER, D. R.; MADDOCK, S.; MEYER, C. B.; BAILEY, M.; FLYNN, P.; REGISTER, J.; MARSHALL, L.; BOND, D.; KULISEK, E.; KUSNADI, A.;

EVANGELISTA, R.; NIKOLOV, Z.; WOOGGE, C.; MEHIGH, R.; HERNAN, R.; KAPPEL, W. K.; RITLAND, D.; PING, C.; HOWARD, J. A. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. **Molecular Breeding**, v.3, p. 291-306, 1997.

HYTÖNEN, V. P.; LAITINEN, O. H.; AIRENNE, T. T.; KIDRON, H.; MELTOLA, N. J.; PORKKA, E. J.; HÖRHÄ, PALDANIUS, T.; MÄÄTTÄ, J. A. E.; NORDLUND, H. R.; JOHNSON, M. S.; SALMINEN, T. A.; AIRENNE, K. J.; YLÄ-HERTUALLA, S.; KULOMMA, M. S. Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. **The Biochemistry Journal**, v. 384, p. 385-390, 2004.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias primas alimentícias: composição e controle de qualidade**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 301p.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATIASSEN, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 35-42, 2006.

LASNIEROWSKI, G. and KIJOWSKI, J. Lysozyme. In: HUOPALAHTI, R; LÓPEZ-FANDIÑO, R; ANTON, M.; SCHADE, R. (Eds). **Bioactive Eggs Compounds**. Springs, 33-40p.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**. 3rd edition. John Wiley and Sons: New York, 1999.

LIAO, Y. H.; BROWN, M. B.; MARTIN, G. P. Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity. **Journal of Pharmacy Pharmacology**. 53, p. 549-554, 2001.

LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; SIM, J.; BRAGG, D.B.; LO, K.V. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. **Journal of Food Science**, v. 51:1032, 1986.

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

MELAMED, M. D.; GREEN, N. M. Avidin 2. Purification and composition. **Biochemistry Journal**, v. 89, p. 591-599, 1963.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Biologically active chicken egg white compounds in human health and disease. **Journal of Poultry Science**, v. 41, p. 1-29, 2004.

MÓL P. C. G. **Purificação de lisozima da clara de ovo por cromatografia de afinidade em criogéis supermacroporosos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER, M. R.; MINIM, V. R. P.; MINIM, L. A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044-1045, p. 17-23, 2017.

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

PERÇIN, I.; KHALAF, R.; BRAND, B.; MORBIDIELLI, M.; GEZICI, O. Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel. **Journal of Chromatography A**, v. 1386, p.13-21, 2015.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, O. Y.; MATIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v.27, p. 828-836, 2004a.

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**, v.807, 129-137, 2004b.

QUAN, L.; WEI, D.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, N.; LI, K.; LIU, F.; LAI, Resurveying the Tris buffer solution: The specific interaction between tris hydroxymethyl)aminomethane and lysozyme. **Analytical Biochemistry**, v.378, p. 144-150, 2008.

QUAN, L.; WEI, D.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, K.; LIU, F.; LAI, L. Highly efficient and low-cost purification of lysozyme: A novel tris(hydroxymethyl)aminomethane immobilized affinity column. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 594-598, 2009.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, p. 87-106, 2011.

RAO, M. V. S; GUPTA, M. N.; ROY, I. Process for the isolation and purification of the glycoprotein avidin. **International patent 03/099035 A1**, 2003.

RHODES, M. B., AZARI, P.R.; FREENEY, R. E. Analysis, fractionation and purification of egg white proteins with cellulose cation exchanger. **Journal Biological Chemistry**, 230:399, 1958.

SAVINA, I; GALAEV, I. Y.; MATIASSON, B. Ion-exchange macroporous hydrophilic gel monolith with grafted polymer brushes. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, p. 313-321, 2006.

SAVINA, I.; GALAEV, I. Y.; MATIASSON, B. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N, N-dimethylaminoethyl-methacrylate. **Journal of Chromatography A**, v.1092, 199-205, 2005b.

SAVINA, I.; MATIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, p. 9596-603, 2005a.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora Livraria Varela, 1996. 517 p, p. 139-157.

SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.8, p. 302-541, 1952.

SONG, D.; SEIBERT, F.; ROCHELLE, G. T. Effect of liquid viscosity on the liquid phase mass transfer coefficient of packing. **Energy Procedia**, v. 63, p. 1268-1286, 2014.

SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S (Orgs.). **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas-SP, 2006. p. 167-202.

SPADARO, A. C.; FONSECA, M. J. F. Cromatografia por bioafinidade. In: COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S (Orgs.). **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas-SP, 2006. p. 167-202.

SU, C. K.; CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 41, 257–263, 2006.

VERÍSSIMO, L. A. A.; PAGANOTO, F. S.; MÓL, P. C.; FONTAN, R. I. C.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, p. 1973-1982, 2017.

VETTER, S.; MIRON, T.; WILCHECK, M. Affinity purification of the avidin protein family, based on crystal structures of avidin-HABA complexes. **Journal of Chromatography B**, v. 1093-1094, p. 113-118, 2018.

WANG, L.; SHEN, S., YUN, J.; YAO, K.; YAO, S. J. Chromatographic separation of cytidine triphosphate from fermentation broth of yeast using anion-exchange cryogel. **Journal Separation Science**, v. 31, p. 689-695, 2008.

WETTER, L. R.; DEUTSCH, H. F. Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.192, p. 237-242, 1951.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F. In situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 246-251, 2007.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 6701-6708, 2006a.

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**, v. 1109, p. 103-110, 2006b.

ZHANG, G.; CAO, Q.; LI, N.; LI, K.; LIU, F. Tris (hydroxymethyl)aminomethane-modified magnetic microspheres for rapid affinity purification of lysozyme. **Talanta**, v. 83, p.1515-1520, 2011.