

PRISCILA CARDOSO FIDELIS

**DESENVOLVIMENTO DE UM ADSORVENTE CONTÍNUO  
SUPERMACROPOROSO DE TROCA CATIONICA PARA  
RECUPERAÇÃO DE LACTOFERRINA DE SORO DE LEITE**

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  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F451d  
2011

Fidelis, Priscila Cardoso, 1985-

Desenvolvimento de um adsorvente contínuo  
supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de  
lactoferrina de soro de leite / Priscila Cardoso Fidelis. –  
Viçosa, MG, 2011.  
xiv, 71f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luis Antonio Minim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-71

1. Adsorção. 2. Lactoferrina. 3. proteínas. 4. Soro de leite.  
5. Troca iônica. 6. Biomoléculas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.022

PRISCILA CARDOSO FIDELIS

**DESENVOLVIMENTO DE UM ADSORVENTE CONTÍNUO  
SUPERMACROPOROSO DE TROCA CATIONICA PARA  
RECUPERAÇÃO DE LACTOFERRINA DE SORO DE LEITE**

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: 28 de novembro de 2011.

---

Valéria Paula Rodrigues Minim  
(Coorientadora)

---

Maria do Carmo Hespanhol da Silva  
(Coorientadora)

---

Edimar Aparecida Filomeno Fontes

---

Ellen Silva Lago Vanzela

---

Luis Antonio Minim  
(Orientador)

Aos meus pais Valéria e Mário e a  
minha irmã Camila pelo incentivo e orações.

Ao Samuel pelo amor, motivação e  
companheirismo em todos os momentos.

**Dedico**

“Só sabemos com exatidão  
quando sabemos pouco; com o  
conhecimento vêm as dúvidas.”

GOETHE

## AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo pela sua presença constante e amorosa, por me amparar nos momentos de fraqueza e mostrar que Seu amor é maior que tudo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade e condições de realização do trabalho.

Ao CNPq, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Ao professor Luis Antonio Minim, pela orientação, confiança, motivação, paciência e amizade.

Às professoras Valéria Paula Rodrigues Minim e Maria do Carmo Hespanhol da Silva, pela gentileza, importantes sugestões e pela atenção dispensada.

Aos membros da banca examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edimar A. F. Fontes, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elen Silva L. Vanzela, que gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da banca que avaliou este trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, por todo amor e dedicação e pelos apoio e compreensão incondicionais para que eu vencesse essa etapa.

Ao Samuel, pelo amor, compreensão e apoio sempre que precisei.

A minha avó querida e meus tios, tias primos e primas, pelos incentivos e bons momentos compartilhados.

A todas minhas amigas, pelo companheirismo, apoio e motivação, mesmo não estando fisicamente próximas.

Aos amigos do laboratório, Janaína, Vanessa, Lizzy, Rafael, Léo, Milene, Moisés, Nayara, Roney, Isabella, Vanelle, Lílian, Cecília, Ana Paula e Guilherme pelos agradáveis momentos proporcionados e pelo aprendizado compartilhado.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos serviços prestados.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, o meu sincero agradecimento.

## **BIOGRAFIA**

Priscila Cardoso Fidelis, filha de Mário Fidelis e Valéria Cardoso, nasceu em 09 de dezembro de 1985 em Antônio Carlos-MG.

Em 2009, graduou-se no curso Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

No mesmo ano, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Defendeu sua dissertação em novembro de 2011.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIações .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1 SORO DE LEITE.....	4
3.2 BIOATIVIDADE DAS PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DO SORO .....	9
3.3 LACTOFERRINA.....	10
3.4 RECUPERAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR CROMATOGRÁFIA .....	13
3.5 TROCA IÔNICA .....	15
3.6 MEIOS ADSORVENTES CONTÍNUOS – MONOLITOS .....	18
3.7 CRIOGÉIS.....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 MATERIAIS .....	24
4.1.1 FORMAÇÃO DO CRIOGEL .....	24
4.1.1.1 ATIVAÇÃO DO CRIOGEL PAAM E IMOBILIZAÇÃO DO TROCADOR CATIÔNICO .....	25
4.1.2 MEDIDAS DAS PROPRIEDADES DO LEITO .....	25
4.1.2.1 ESTRUTURA DOS POROS .....	25
4.1.2.2 POROSIDADE.....	26
4.1.2.3 NÚMERO DE SÍTIOS ATIVOS.....	27
4.1.2.4 RESISTÊNCIA AO FLUXO .....	27
4.1.2.5 DISPERSÃO AXIAL .....	28
4.1.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO .....	29
4.1.4 CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA.....	30
4.1.4.1 ULTRAFILTRAÇÃO (UF) .....	30

4.1.4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SORO .....	32
4.1.4.3	CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA.....	32
4.1.4.4	ANÁLISE DE PROTEÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	34
4.1.4.5	ELETROFORESE EM GEL.....	35
4.1.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL .....	38
5.2	MEDIDAS DAS PROPRIEDADES DO LEITO.....	43
5.2.1	RESISTÊNCIA AO FLUXO .....	43
5.2.2	DISPERSÃO AXIAL.....	45
5.3	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO .....	48
5.4	CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA .....	50
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Valor nutricional da proteína do soro de leite comparada com outras proteínas comumente consumidas, medido pelo (A) valor biológico e (B) teor de aminoácidos essenciais (Fonte: SMITHERS, 2008).....6
- Figura 2** - Esquema representativo de uma molécula de lactoferrina bovina.  $\alpha$ -hélices são representadas por cilindros e  $\beta$ -folhas como setas. Os átomos de ferro estão representados por esferas e três moléculas de carboidratos encontram-se anexadas ao lobo C (Fonte: MOORE et al., 1997). ..... 11
- Figura 3** - Esquema da polimerização do monômero AMPSA em um criogel de poli(acrilamida) iniciada por diperiodatocuprato de potássio e álcali (YAO et al., 2007)..... 19
- Figura 4** - Representação da adsorção de uma proteína de carga positiva em um criogel com monômeros funcionais imobilizados na superfície, na forma de tentáculos (acima) e convencional (abaixo). (Fonte: SAVINA et al., 2005b) .....20
- Figura 5** - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a - 20 °C e (B) gel de dextrana convencional preparado em temperatura ambiente (Fonte: PLIEVA et al., 2007). .....22
- Figura 6** - Sistema de ultrafiltração montado em modo de reciclo total. (1) Tanque de alimentação; (2) Membrana; (3) Manômetro; (4) Válvulas; (5) Fluxômetros (Fonte: MILLIPORE CORPORATION, instrução n° P17512). .....31
- Figura 7** - Reação de copolimerização dos monômeros acrilamida, AGE e MBAAM para a preparação do criogel pAAM (Fonte: MALLIK e HAGE, 2006). .....38
- Figura 8** - Criogel pAAM-SO<sub>3</sub> seco (A), úmido (B) e encharcado (C).....39
- Figura 9** - Imagens da estrutura do criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV). ....40
- Figura 10** - Mecanismo de iniciação da reação de imobilização de monômeros funcionais na superfície de gel de poli(acrilamida) usando diperiodatocuprato (Fonte: SAVINA et al., 2005a). .....41
- Figura 11** - Queda de pressão em relação à velocidade superficial de criogel ( $\blacktriangledown$ ) pAAM-SO<sub>3</sub> e ( $\bullet$ ) pAAM. ....44

<b>Figura 12</b> - Curva de distribuição do tempo de residência em diferentes velocidades para o criogel não ativado (A) e criogel ativado (B).....	45
<b>Figura 13</b> - Coeficiente de dispersão axial (A) e número de Bodenstein (B) em diferentes velocidades superficiais para (○) pAAM-SO <sub>3</sub> , (●) pAAM.....	46
<b>Figura 14</b> - Distribuição de AEPT para diferentes velocidades superficiais (○) criogel-pAAM-SO <sub>3</sub> , (●) criogel-pAAM.....	47
<b>Figura 15</b> - Isotermas de adsorção da lactoferrina obtidas em diferentes valores de concentração de NaCl, pH 6,0 (A) e pH 7,0 (B). ....	49
<b>Figura 16</b> - Perfil cromatográfico do (A) soro e (B) soro concentrado (diluído 4x). Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L <sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min <sup>-1</sup> . Detecção a 210 nm.....	52
<b>Figura 17</b> - Comportamento da recuperação de lactoferrina em função dos diferentes níveis de razão de diluição.....	55
<b>Figura 18</b> - Gel de eletroforese para a alimentação, lavagem e eluído obtidos em pH's 6(1-3); 7(4-6) e 8 (7-9); e padrões de LF (10) e BSA (11). ....	58
<b>Figura 19</b> - Perfil cromatográfico de (A) Padrão da lactoferrina 0,75 mg mL <sup>-1</sup> ; (B) Padrão de GMP 2mg mL <sup>-1</sup> . Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L <sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min <sup>-1</sup> . Detecção a 210 nm.....	58
<b>Figura 20</b> - Perfil cromatográfico do (A) Alimentação; (B) Lavagem e (C) Eluído. Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L <sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min <sup>-1</sup> . Detecção a 210 nm.....	59
<b>Figura 21</b> - Comportamento do fator de purificação em função dos diferentes níveis de pH.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição aproximada do leite bovino e do soro de leite. ....	5
<b>Tabela 2</b> - Propriedades de proteínas do soro de leite bovino. ....	6
<b>Tabela 3</b> - Exigências qualitativas e quantitativas em termos de aminoácidos para proteínas e composição de aminoácidos essenciais das proteínas do soro e do leite. ....	7
<b>Tabela 4</b> - Proteínas encontradas em menores concentrações no soro. ....	9
<b>Tabela 5</b> - Composição de aminoácidos de Lactoferrina bovina e lactoferrina humana.....	11
<b>Tabela 6</b> – Programação do gradiente da fase móvel (CLAE). Vazão: 1 mL min <sup>-1</sup> . Solvente A (solução de cloreto de sódio 0,15 mol L <sup>-1</sup> e pH 2,5) e solvente B (acetonitrila 100 %). ....	34
<b>Tabela 7</b> - Condições experimentais testadas no Delineamento de Face Centrada.....	36
<b>Tabela 8</b> - Capacidade iônica para diferentes adsorventes.....	43
<b>Tabela 9</b> - Permeabilidade hidráulica ( <i>K<sub>a</sub></i> ) obtida para o criogel ativado e não ativado. ....	44
<b>Tabela 10</b> - Valores dos parâmetros <i>q<sub>m</sub></i> e <i>K<sub>d</sub></i> obtidos pelo ajuste da isoterma de Langmuir aos dados experimentais.....	50
<b>Tabela 11</b> - Caracterização do soro obtido da fabricação de queijo Minas Frescal e do soro concentrado por ultrafiltração.....	51
<b>Tabela 12</b> - Resultados experimentais obtidos para a recuperação de lactoferrina na eluição em uma coluna do tipo criogel-pAAM-SO <sub>3</sub> . ....	53
<b>Tabela 13</b> - Resumo da ANOVA para a recuperação da lactoferrina em criogel-pAAM-SO <sub>3</sub> , usando um delineamento de face centrada ( $R^2 = 62,2\%$ e $CV = 44,1$ ). ....	54
<b>Tabela 14</b> - Resultados experimentais obtidos para a pureza da lactoferrina na alimentação e na eluição em uma coluna do tipo criogel-pAAM-SO <sub>3</sub> .....	57
<b>Tabela 15</b> - Resumo da ANOVA para o fator de purificação em coluna criogel-pAAM-SO <sub>3</sub> , usando um delineamento central composto ortogonal ( $R^2 = 68,7\%$ e $CV = 38,5$ ). ....	60

## LISTA DE ABREVIações

A	Área da seção transversal	(m <sup>2</sup> )
AAm	Acrilamida	
AEPT	Altura equivalente a um prato teórico	(mm)
AGE	Alil-glicidil-éter	
AMP SA	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico	
APS	Persulfato de amônio	
BSA	Albumina de soro bovina	
C	Concentração da proteína na fase móvel	(mg mL <sup>-1</sup> )
C <sub>i</sub>	Capacidade de inchamento	(g H <sub>2</sub> O·g <sup>-1</sup> criogel)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência	
Criogel pAAM	Criogel não-ativado	
Criogel pAAm-SO <sub>3</sub>	Criogel ativado	
CTI	Cromatografia de troca iônica	
D <sub>ax</sub>	Coeficiente de dispersão	(cm <sup>2</sup> min <sup>-1</sup> )
DEAEMA	Dietilaminoetil metacrilato	
DFC	Delineamento de Face Centrada	
DTR	Distribuição do tempo de residência	
FNB/IOM	Conselho de Alimentação e Nutrição/ Instituto de Medicina	
F <sub>p</sub>	Fator de purificação	
GMP	Glicomacropéptido	
IDA	Ácido iminodiácetico	
K <sub>a</sub>	Permeabilidade hidráulica	(m <sup>2</sup> )
K <sub>d</sub>	Constante de equilíbrio da adsorção	(mg mL <sup>-1</sup> )
kDa	Unidade de massa molecular: 10 <sup>3</sup> Dalton	
L	Comprimento da coluna	(m)
LF	Lactoferrina	
MBAAm	N,N-metilenobisacrilamida	

MEV	Microscopia eletrônica de varredura	
N	Número de pratos teóricos	
pH	Potencial hidrogeniônico	
pI	Ponto isoelétrico	
PTN	Proteína	
q	Concentração da proteína no adsorvente	(mg mL <sup>-1</sup> criogel)
Q <sub>a</sub>	Vazão de água pela coluna	(mL min <sup>-1</sup> )
q <sub>m</sub>	Capacidade adsortiva máxima do adsorvente	(mg mL <sup>-1</sup> criogel)
R	Recuperação de lactoferrina	
RD	Razão de diluição	
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinação	
SDS	Dodecil sulfato de sódio	
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina	
t <sub>R</sub>	Tempo de residência	(s)
u	Velocidade intersticial do fluido na coluna	(m s <sup>-1</sup> )
U <sub>L</sub>	Velocidade superficial do líquido	(m s <sup>-1</sup> )
UF	Ultrafiltração	
UV	Ultravioleta	
VC	Volumes de coluna	
W <sub>1/2</sub>	Largura do pico medida à meia altura	(s)
Φ	Porosidade do criogel	
ΔP <sub>a</sub>	Queda de pressão na coluna	(MPa)
$\bar{t}$	Tempo de residência médio da curva de DTR	(s)
μ <sub>a</sub>	Viscosidade da água	(Ns m <sup>-2</sup> )
σ <sub>t</sub> <sup>2</sup>	Variância da curva de DTR	(s <sup>2</sup> )
μm	Unidade de medida: 10 <sup>-6</sup> m	

## RESUMO

FIDELIS, Priscila Cardoso, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2011. **Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

As proteínas do soro têm propriedades funcionais, nutricionais e tecnológicas que promovem a sua utilização como ingredientes e suplementos. Soro doce obtido a partir de produção de queijo Minas Frescal concentrado por ultrafiltração foi usado no processo de captura da lactoferrina em adsorvente contínuo supermacroporoso. O criogel foi preparado pela crio-copolimerização de acrilamida com comonômero funcional, éter alil glicidil e o monômero reticulante N, N-metileno-bis-acrilamida em colunas de vidro ( $\varnothing$  5 mm). A polimerização do trocador ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico na superfície do criogel foi usada para obtenção de grupos de ligação sulfônicos, projetado para troca catiônica. As colunas monolíticas apresentaram estrutura esponjosa e uniforme com supermacroporos interconectados de tamanho variando de 10-100  $\mu\text{m}$ . Os valores para a dispersão axial dentro do leito foram baixos para velocidades superficiais de 0,5 - 9  $\text{cm min}^{-1}$ . O coeficiente de dispersão axial aumentou exponencialmente com o aumento da velocidade superficial. Isotermas de adsorção da lactoferrina foram determinados para diferentes valores de pH e força iônica. Como esperado, a capacidade da coluna diminuiu com o aumento da concentração de NaCl. A capacidade iônica foi determinada ( $2,24 \pm 0,42 \text{ mmol SO}_3 \text{ g}^{-1}$  criogel seco) e a capacidade média de ligação de lactoferrina do criogel foi de 136  $\text{mg mL}^{-1}$  de criogel. A influência da razão de diluição, pH e vazão na adsorção de lactoferrina a partir do soro concentrado, em termos de recuperação e fator de purificação foi avaliada. Embora o eluído tenha obtido um alto fator de purificação (em média 11,3), a separação da lactoferrina do soro de leite concentrado não apresentou alta recuperação devido à presença de outras proteínas em maior quantidade. O fator de purificação foi influenciado positivamente pelo aumento do pH, sendo inversamente proporcional a adsorção de GMP. As melhores condições para a separação de lactoferrina do soro foram obtidas em pH 8,0 e razão de diluição igual a 0,33.

## ABSTRACT

FIDELIS, Priscila Cardoso, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Development of a cation exchange solid supermacroporous adsorbent for lactoferrin recovery from whey.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Whey proteins have functional, nutritional and technological properties promoting their use as ingredients and supplements. Sweet whey obtained from “Minas Frescal” cheese production and concentrated by ultrafiltration was used in the lactoferrin capture in a supermacroporous adsorbent. Supermacroporous monolithic columns have been prepared by radical cryo-copolymerization of acrylamide with functional co-monomer, allyl glycidyl ether, and cross-linker N,N-methylene-bis-acrylamide in glass columns ( $\varnothing$  5 mm). Graft polymerization of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid was used to achieve a cryogel with sulfo binding groups, designed for cation-exchange. The monolithic columns have uniform sponge-like structure with interconnected supermacropores of pore size 10–100  $\mu\text{m}$ . The experimental results showed that axial liquid dispersion within the bed was weak in a wide water flow rate of 0.5 - 9  $\text{cm min}^{-1}$ . The axial dispersion coefficient was found to increased exponentially with the increase of liquid flow rate. Adsorption isotherms for lactoferrina were determined a different pH and ionic strength. The ionic capacity was  $2.24 \pm 0.42$  ( $\text{mmol SO}_3 \text{ g}^{-1}$  dry cryogel) and the average binding capacity of lactoferrina was 136 ( $\text{mg mL}^{-1}$  cryogel). The influence of the dilution ratio, flow rate and pH on the adsorption of lactoferrin in terms of recovery and purification factor was evaluated. Although the eluate has reached a high purification factor (on average 11.3), the separation of lactoferrin from whey concentrate did not show high recovery due to the presence of other proteins in larger quantities. The purification factor was positively influenced by the increase in pH which is inversely proportional to the adsorption of GMP. The best conditions for separation of lactoferrin from whey were obtained at pH 8.0 and dilution ratio of 0.33.

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos cromatográficos para a separação de biomoléculas a partir soluções complexas tem como principal entrave a diminuição da porosidade do leito pelos materiais particulados resultando, conseqüentemente, num aumento da resistência ao fluxo na coluna, culminando no seu bloqueio.

O estudo e otimização desses processos cromatográficos tornam-se necessários para um maior aproveitamento de moléculas de alto valor agregado e para redução de custos.

Colunas cromatográficas com características do leito fixo, mas com poros suficientemente grandes poderiam permitir que soluções contendo fragmentos celulares e materiais particulados pudessem ser escoados pela coluna sem sua obstrução. Essas estruturas são inerentes aos denominados criogéis, que são géis poliméricos formados em condições de congelamento. Têm um sistema de poros contínuos interconectados, ao invés de partículas porosas, onde o processo convectivo é limitado apenas aos espaços intersticiais interpartículas. Criogéis supermacroporosos de fase estacionária contínua são monolitos que possuem poros de tamanhos que variam entre 10 a 100  $\mu\text{m}$ , o que possibilita a separação de grandes biomoléculas presentes em soluções não clarificadas. As colunas monolíticas macroporosas constituem de meios cromatográficos com propriedades únicas, tais como resistência ao fluxo extremamente baixa, estabilidade mecânica e química, resistência a ciclos de secagem, umedecimento e esterilização.

O soro de leite é um coproduto da fabricação de queijos e caseína, produzido em grandes quantidades e que pode gerar um problema ambiental caso não seja aproveitado ou tratado adequadamente. A utilização do soro de leite como ingrediente e a recuperação de suas proteínas apresenta um grande potencial comercial, por diminuir a poluição orgânica gerada pelos resíduos do soro de leite quando são descartados e, principalmente, por uma melhor utilização das propriedades nutricionais e funcionais das proteínas do soro.

A lactoferrina é uma importante proteína do soro de leite, presente em baixas concentrações, que tem diversas propriedades bioativas, incluindo atividade antimicrobiana de largo espectro, promoção da transferência e absorção de ferro, prevenção do câncer e atividade antiviral, que conferem a essa proteína alto valor agregado. É utilizada como um ingrediente natural bioativo em alimentos, como fórmulas para lactentes e suplementos alimentares, cosméticos e produtos para cuidados com a saúde bucal. Está presente em baixas quantidades no soro, mas devido a suas propriedades tem alto valor agregado, justificando o estudo de formas de separá-las de outras proteínas.

Considerando as características favoráveis das colunas monolíticas e a possibilidade de pós-processamento do soro de leite para recuperação da lactoferrina, neste trabalho estudou-se a recuperação de lactoferrina de soro do leite, em coluna de troca catiônica supermacroporosa de criogel de poliacrilamida, ativada com resíduos de ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA), definido como criogel pAAm-SO<sub>3</sub>. A presente proposta tem como grande vantagem a possibilidade de utilização de soro de leite concentrado, o que não seria possível ao se trabalhar com colunas de leito fixo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolvimento de uma nova metodologia para separação de lactoferrina do soro de leite em coluna monolítica macroporosa de troca catiônica a partir de soro concentrado.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar e caracterizar uma coluna monolítica em relação às suas propriedades morfológicas (estrutura e tamanho dos poros, porosidade, teor de água, capacidade de inchamento e número de sítios ativos);
- Caracterizar o escoamento dentro da coluna por medidas de suas propriedades hidrodinâmicas (resistência ao fluxo, dispersão axial e altura equivalente a um prato teórico);
- Obter isotermas de adsorção curvas de ruptura para a lactoferrina em coluna monolítica;
- Estudar a captura da lactoferrina do soro de leite em coluna monolítica, em termos da recuperação e do grau de pureza da lactoferrina na eluição.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 SORO DE LEITE**

O soro de leite é uma substância líquida aquosa derivada da fabricação de queijos e caseína. Atualmente, o soro de leite é o coproduto mais abundante das modernas indústrias de laticínios. Em média, o volume mundial de soro está crescendo na mesma taxa do crescimento da produção de leite que corresponde a mais de 2 % ao ano.

A produção mundial de leite em 2010 foi de 439,2 milhões de toneladas, das quais foram produzidos 14,8 milhões de toneladas de queijo. No Brasil, neste mesmo ano, a produção de queijo foi de aproximadamente 648.000 toneladas (USDA - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, Julho/2011).

Levando-se em conta que o soro representa 90 % do volume de leite gasto para produção de um queijo, deduz-se que são gerados anualmente cerca de 133 milhões de toneladas de soro a nível mundial, deste montante 5,8 milhões de toneladas são geradas no Brasil. Apesar do avanço tecnológico e das pesquisas na área de beneficiamento do leite temos, ainda hoje, que apenas parte do soro gerado é aproveitada pelas indústrias, para fabricação de ricotas, produção de bebidas lácteas e principalmente para produção de isolado ou concentrado de soro. O restante é destinado aos reservatórios de água ou rios e ou para o tratamento de resíduos, acarretando num aumento de custo.

O soro de leite pode ser obtido por três processos distintos: a) coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria prima para a produção de queijos e soro doce; b) precipitação ácida no ponto isoelétrico (pI), resultando caseinatos e em soro ácido; e c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se concentrado de micelas e as proteínas do soro na forma de concentrado ou isolado proteico (SGARBIERI, 2004).

No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, proveniente da fabricação de queijos com coagulação enzimática como os do tipo Minas Frescal, Cheddar, Meia Cura, Prato, Muçarela entre outros. Já para o soro ácido, obtido a partir da fabricação de queijo tipo Cottage, a quantidade de soro gerada pela produção de queijo é insignificante (VIOTTO, 1993).

Uma análise da composição aproximada do leite bovino e do soro de leite (Tabela 1) revela que 50 % (m/v) dos sólidos do leite estão presentes no soro, sendo essencialmente 70 % (m/v) da lactose e 20 % (m/v) das proteínas. A lactose se apresenta numa proporção aproximada de 60 % (m/m) do total de sólidos do soro e contribui em grande parte pelo alto potencial poluidor do soro (DBO > 35000 mg L<sup>-1</sup>; DQO > 60000 mg L<sup>-1</sup>), que é um relevante coproduto poluente da indústria alimentícia (BULLERMAN e BERRY, 1966; SISO, 1996).

Apesar de seu potencial poluidor bem conhecido, o soro representa uma excelente fonte de proteínas e peptídeos funcionais, lipídios, vitaminas, minerais e lactose.

**Tabela 1-** Composição aproximada do leite bovino e do soro de leite.

Componentes	Conteúdo (% m/m)	
	Leite	Soro
Proteínas	3,15	0,79
Caseínas	2,51	0,12
<i>Proteínas do soro</i>	0,7	0,64
Caseína	2,7	<0,1
Gorduras	3,0	0,18
Cinzas	0,72	0,50
Lactose	4,6	3,5
Sólidos totais	12,9	6,3

Fonte: Adaptado de MILLER et al., 2007; SMITHERS, 2008.

As proteínas remanescentes no soro de leite (Tabela 2) apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, sendo assim consideradas de elevado valor

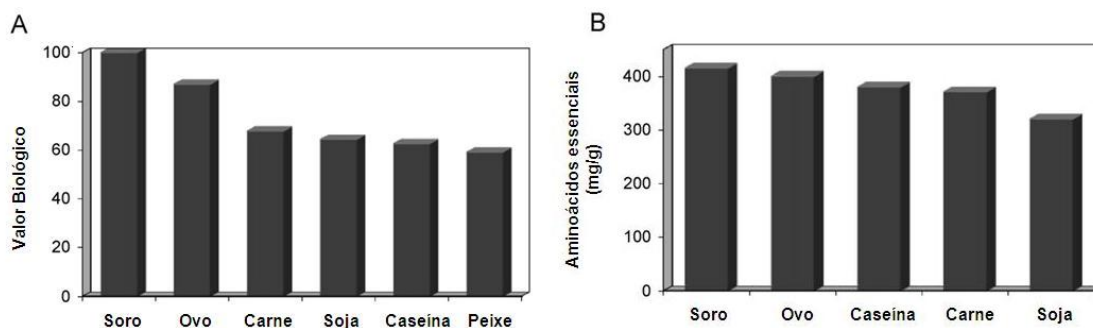
nutritivo. O perfil desses aminoácidos atende ou supera todas as exigências qualitativas ou quantitativas estabelecidas pela FNB/IOM, conforme pode ser observado na Tabela 3 e na Figura 1. Devido à quantidade de aminoácidos essenciais e da elevada qualidade proteica, as proteínas do soro podem aumentar o valor nutricional de alimentos usados na dieta humana.

**Tabela 2** - Propriedades de proteínas do soro de leite bovino.

Proteína	Massa molar (kDa)	Ponto isoelétrico	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
β-lactoglobulina	18,3	5,2	2,0 – 4,0
α-lactoalbumina	14,1	4,2 – 4,8	0,6 – 11,7
Albumina de soro bovino (BSA)	69,0	4,7 – 4,9	0,1 – 0,4
Glicomacropéptido	7,0	4,7 – 4,8	1,2 – 1,5
Imunoglobulina	15,0 – 160,0	5,5 – 8,3	0,6 – 1,0
Proteose-peptona	4,1 – 80,0	3,3 – 3,7	1,4
Lactoferrina	78,0	8,2 – 9,0	0,02-0,4
Lactoperoxidase	89,0	9,0 – 9,5	0,02

Fonte: Adaptado de MIZUBUTI, 1994; MILLER et al., 2007.

As proteínas do soro possuem valor nutricional elevado, conferido pelo alto teor de aminoácido essenciais.



**Figura 1** - Valor nutricional da proteína do soro de leite comparada com outras proteínas comumente consumidas, medido pelo (A) valor biológico e (B) teor de aminoácidos essenciais (Fonte: SMITHERS, 2008).

**Tabela 3** - Exigências qualitativas e quantitativas em termos de aminoácidos para proteínas e composição de aminoácidos essenciais das proteínas do soro e do leite.

Aminoácidos essenciais	Teor de aminoácidos essenciais			Teor de AA <sup>1</sup> essenciais (mg g <sup>-1</sup> proteína)	
	IDR <sup>2</sup> g/dia	Leite 2 % de gordura g/copo	Soro seco g/100g de soro	Padrão FNB/IOM <sup>3</sup>	Soro seco g/100g de proteína
Histidina	0,98	0,230	0,25	18	20
Isoleucina	1,33	0,517	0,74	25	59
Leucina	2,94	0,835	1,28	55	103
Lisina	2,66	0,676	1,10	51	88
Metionina	1,33	0,213	0,50	25	41
Fenilalanina	2,31	0,412	0,77	47	62
Treonina+cisteína	1,4	0,385	0,85	27	68
Triptofano	0,35	0,120	0,30	7	24
Valina + tirosina	0,28	0,571	0,73	32	59

<sup>1</sup>Aminoácidos; <sup>2</sup> IDR (ingestão diária recomendada) -Valores calculados para um adulto de 70 kg; <sup>3</sup> Conselho de Alimentação e Nutrição/ Instituto de Medicina - Baseado nos Requerimentos Médios Estimados para crianças de 1 a 3 anos para aminoácido essenciais e proteína total.

Fonte: Adaptado de INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2005 e MIZUBUTI, 1994.

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro possuem propriedades funcionais e tecnológicas quando utilizadas como ingredientes alimentícios. As proteínas do soro apresentam excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, gelificação, formação de filmes e cápsulas protetoras (SGARBIERI, 2004). Notavelmente, as proteínas e suas propriedades funcionais e nutricionais ajudaram a transformar o soro em um coproduto, contendo grande variedade de componentes disponíveis para utilização na agroindústria, biotecnologia, medicina e mercados relacionados. Como fonte de proteínas, o soro é usado

em aplicações médicas, na indústria alimentícia e como suprimento para crescimento de culturas microbiológicas.

Na alimentação humana o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó. A forma em pó é geralmente preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos. A presença de determinados constituintes confere ao soro, características funcionais excelentes para aplicações na indústria de alimentos, tais como: capacidade de absorção de água, capacidade de formação e estabilização de espuma, capacidade de formação e estabilidade da emulsão, capacidade de gelificação, viscosidade e solubilidade. Essas características permitem a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico para a manufatura de novos produtos alimentares. Industrialmente o soro pode ser processado mediante diversas técnicas, tais como filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, osmose reversa, tratamento térmico, fermentação, desmineralização, cristalização e outras. O método convencional mais utilizado de concentração de soro é a evaporação térmica. As principais desvantagens deste método são o elevado consumo energético e o elevado teor de sais e açúcares no produto concentrado. Os fatores que determinam a dificuldade no aproveitamento das proteínas do soro de leite são os elevados teores de água, sais e lactose.

Vários pesquisadores relatam os processamentos e as várias possibilidades de utilização do soro na alimentação humana como: produtos de padaria e confeitaria, bebidas não alcoólicas e alcoólicas, produtos infantis e geriátricos, doce de leite, iogurte, temperos, sorvetes, molhos de carne e salsichas, sobremesas geladas e outros (MIZUBUTI, 1994).

As restrições ambientais em relação à disposição do soro têm desencadeado estudos mais aprofundados sobre o conhecimento das propriedades dos componentes do soro, notavelmente suas proteínas e peptídeos. Embora a qualidade nutricional (fonte de energia e perfil de aminoácidos), propriedades funcionais (gelificação, formação de espuma, retenção de água, etc.) e funcionalidades fisiológicas das proteínas do soro tenham sido reconhecidas há algum tempo, há vários fatores que limitam o uso ainda mais difundido das proteínas do soro como ingrediente. Dentre eles destaca-se: (i) conhecimento limitado das propriedades tecnológicas dos

componentes do soro; (ii) base restrita de aplicações dado que o soro e suas proteínas tem sido vistos somente como ingredientes de baixo valor; (iii) desempenho imprevisível e inconsistente em sistemas alimentícios, principalmente na área de funcionalidades tecnológicas; (iv) falta de tecnologias industriais viáveis de baixo custo para isolamento e purificação (SMITHERS, 2008).

### 3.2 BIOATIVIDADE DAS PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DO SORO

Além das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) e glicomacropéptido presentes em maior quantidade (50, 20 e 15 % m/m proteínas, respectivamente), o soro proveniente da fabricação de queijo contém um grande número de outras proteínas com potente bioatividade (Tabela 4).

**Tabela 4** - Proteínas encontradas em menores concentrações no soro.

Proteína	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
Lactoferrina	50-100
Lactoperoxidase	8-20
Imunoglobulinas	300-1000
Fatores de crescimento	<0,06
IGF-I	<0,001
IGF-II	<0,001
PDGF	<0,0002
TGF- $\beta$	<0,01
FGF	<0,0001
B-celulina	<0,002

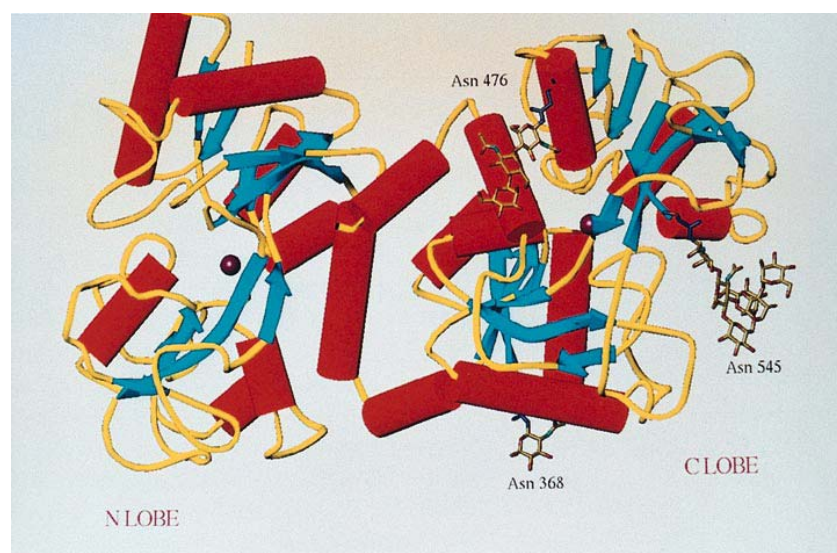
\* fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento beta de transformação (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

Todas estas proteínas têm sido implicadas numa variedade de efeitos nutricionais e fisiológicos, dos quais destacam-se: (i) desempenho físico, recuperação após exercícios e prevenção de atrofia muscular (TIPTON et al., 2004; FARNFIELD et al., 2005; CAREY et al., 2006; RANKIN e DARRAGH, 2006); (ii) saciedade e controle de peso (OHR, 2004; ZEMEL, 2004; TOME, 2006); (iii) saúde cardiovascular (OHR, 2004; PINS et al., 2006); (iv) efeitos anticâncer (GILL e CROSS, 2000); (v) nutrição infantil (CHATTERTON, 2006); (vi) envelhecimento saudável (SMILOWITZ et al., 2005; KORHONEN, 2006).

### **3.3 LACTOFERRINA**

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína de 80 kDa pertencente à família de proteínas transportadoras de ferro, chamado transferrinas. É produzida pelas células epiteliais das mucosas de mamíferos, possuindo alta homologia entre as espécies, sendo localizada nas secreções mucosas, como lágrimas, saliva, líquido seminal e vaginal (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2009). No entanto, é no leite e, particularmente, no colostro, onde se encontra em maior concentração. A concentração de lactoferrina no leite humano e colostro é de aproximadamente 2 mg mL<sup>-1</sup> e 7 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto no leite bovino e colostro é de aproximadamente 0,2 mg mL<sup>-1</sup> e 1,5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (LEVAY e VILJOEN, 1995). A lactoferrina também é encontrada em neutrófilos e em pequenas quantidades no plasma sanguíneo (0,2 mg L<sup>-1</sup>).

A molécula de LF (Figura 2) consiste de uma única cadeia polipeptídica, dobrado em dois lóbulos simétricos globulares (lobos N e C) ligados por uma região da dobradiça. Cada lobo é capaz de se ligar a um átomo de Fe<sup>+2</sup> ou Fe<sup>+3</sup>, mas também pode se ligar ao Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup>. Esta glicoproteína tem uma carga líquida positiva, provenientes principalmente dos aminoácidos arginina e lisina (Tabela 5), com um ponto isoelétrico (pI), entre 8,0 e 8,5 e 4 sítios potenciais de N-glicosilação (STEIJNS e VAN HOOIJDONK, 2000).



**Figura 2** - Esquema representativo de uma molécula de lactoferrina bovina.  $\alpha$ -hélices são representadas por cilindros e  $\beta$ -folhas como setas. Os átomos de ferro estão representados por esferas e três moléculas de carboidratos encontram-se anexadas ao lobo C (Fonte: MOORE et al., 1997).

**Tabela 5** - Composição de aminoácidos de Lactoferrina bovina e lactoferrina humana.

Resíduos de aminoácidos	Lactoferrina Bovina	Lactoferrina Humana
Alanina	67	63
Prolina	30	35
Arginina	39	43
Lisina	54	46
Asparagina	29	33
Valina	47	48
Triptofano	13	10
Cisteína	34	32
Treonina	36	31
Isoleucina	15	16
Serina	45	50
Glutamina	29	27
Ácido Glutâmico	40	42
Fenilalanina	27	30
Metionina	4	5
Leucina	65	58
Glicina	48	54
Tirosina	22	21
Ácido Aspártico	36	38
Histidina	9	9
Número total de resíduos	689	691

Uma das funções dessa proteína é o transporte de metais, mas também é um componente importante do sistema imune não específico. Tanto a LF humana quanto a bovina exibem amplo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e vários vírus. Inicialmente as propriedades de defesa do hospedeiro atribuídas a lactoferrina eram creditadas às suas propriedades de ligação com ferro, no entanto, sabe-se agora que outros mecanismos contribuem para o papel antimicrobiano desta glicoproteína (FARNAUD e EVANS, 2003).

A LF pode ser isolada do leite bovino desnatado ou do soro de leite por vários métodos. Os mais usados em larga escala são a cromatografia de troca catiônica e, recentemente, a ultrafiltração. A produção mundial de LF bovina é estimada em mais 60 ton/ano (TOMITA et al., 2009).

A LF é considerada uma molécula de defesa importante e tem uma grande diversidade de funções fisiológicas, tais como atividades antiviral, antimicrobiana, imunomodulatória e antioxidante. Durante a última década, tornou-se evidente que administrações orais de LF exerciam vários benefícios na saúde de humanos e animais, incluindo efeitos anticâncer e anti-inflamatórios. Isto aumentou o potencial de aplicações da LF como um aditivo em alimentos (WAKABAYASHI et al., 2006).

A disponibilidade de grandes quantidades de LF na forma purificada tem permitido estudos dos efeitos biológicos desta proteína, *in vitro* e *in vivo* (BROCK, 2002; WAKABAYASHI et al., 2006). Os mecanismos dos efeitos antimicrobianos conhecidos da LF foram bem estabelecidos (FARNAUD e EVANS, 2003) permitindo sua aplicação no aumento da segurança de produtos cárneos (NAIDU, 2002). A LF possui ainda a propriedade de estimular o crescimento ósseo, pela estimulação de osteoblastos e inibição de osteoclastos (CORNISH et al., 2004), sendo seu uso sugerido como um complemento a várias estratégias na prevenção de tratamento de osteoporose e perda óssea em mulheres na menopausa (PALMANO et al., 2011). A LF é apontada como um composto natural com atividade carcinogênica, sendo sua ingestão efetiva e segura (TSUDA et al., 2010).

Dado sua ampla gama de aplicações na medicina, biologia, indústria farmacêutica e alimentícia, muitas tecnologias de processamento foram estudadas e desenvolvidas para o isolamento da LF em níveis de pureza

elevados, e a maioria destes processos são focados em processos cromatográficos (LÖNNERDAL et al., 1977; BLÄCKBERG e HERNELL, 1980; SHIGERU e YE, 1991; HAHN et al., 1998; NOPPE et al., 2006; CHEN et al., 2007, BEN OUNIS et al., 2008, MEYER et al., 2007, NG e YOSHITAKE, 2010). Todavia, a recuperação desta proteína a partir do soro é uma tarefa difícil, por estar bastante diluída, grandes volumes de soro devem ser processados, além de que as outras proteínas presentes em maiores concentrações dificultam sua separação (SHIGERU e YE, 1991; HAHN et al., 1998).

### **3.4 RECUPERAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR CROMATOGRAFIA**

Os produtos de origem biotecnológica possuem grande diversidade e estão geralmente presentes em baixas concentrações em caldos de fermentação, sobrenadante de culturas celulares e resíduos industriais. A alta diluição dos produtos de interesse, assim como a grande variedade de espécies químicas que interferem nos processos de recuperação, fracionamento e purificação final tornam essas tarefas difíceis e onerosas, respondendo na maioria dos processos pelo maior percentual dos custos de produção de biomoléculas.

As operações de processamento na indústria de separação química têm visado à melhoria da qualidade de seus produtos, principalmente quando se refere ao rendimento. A eficiência dos processos de separação tem um impacto importante na qualidade e no custo final dos produtos. Várias situações que envolvem a separação de componentes químicos similares ou a remoção de produtos que estão presentes em baixas concentrações estão sujeitas a terem reduzidas eficiências de separação quando são usadas as técnicas de separação como destilação, cristalização ou extração por solvente. Para esses casos de difícil separação pelas técnicas convencionais a cromatografia se apresenta como uma técnica eficaz, gerando produtos de alta pureza e alta eficiência de separação.

Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio da separação se baseia na

existência de interações entre os constituintes da amostra com a fase móvel e a fase estacionária. As moléculas possuem interações diferentes com a fase estacionária, sendo transportadas a velocidades diferentes separando-se assim uma das outras.

Entre os vários processos adsorptivos, a adsorção em leito fixo possui a maior eficiência, sendo uma técnica de fácil implementação nos processos produtivos e os equipamentos, adsorventes e protocolos de purificação são prontamente disponíveis. A presença de grandes estruturas biomoleculares e materiais altamente concentrados, no entanto, desafiam sua capacidade e produtividade. Além disso, a ampliação de escala em leitos empacotados contendo adsorventes pouco resistentes é muito limitada, devido a fatores mecânicos e instabilidade do leito (STICKEL e FOTOPOULOS, 2001).

A cromatografia de leito fixo, apesar de sua tradição e alto poder de resolução, tem uma grande limitação: a incapacidade de processamento de partículas que contenham fluidos, como suspensões de células ou homogenatos celulares brutos não clarificados. Este material particulado pode acumular-se nos distribuidores de fluxo da coluna ou nos espaços vazios existentes entre as partículas no leito fixo, ocasionando o entupimento do leito, proporcionando um aumento na queda de pressão do sistema, inviabilizando o processo.

A cromatografia por adsorção em leito expandido permite o uso de alimentação contendo material particulado, eliminando a necessidade do uso de clarificação inicial do meio ou de concentração ou mesmo da pré-purificação no processo (JANSON e RYDEN, 1998; SUBRAMANIAM, 1998), reduzindo o número de etapas no processo e evitando a perda da atividade da biomolécula.

No entanto, apesar de todas as suas vantagens, a cromatografia de leito expandido exige tipos especiais de colunas e acessórios que não podem ser instalados em sistemas tradicionais de cromatografia de leito empacotado.

Devido especialmente a problemas de transferência de massa, desenvolveu-se monolitos para propósitos de separação industrial, que apresentam como vantagens poros maiores, o que possibilita a separação de grandes macromoléculas e o uso de baixa pressão (GUIOCHON, 2007). Esta fase estacionária apresenta uma baixa resistência ao fluxo, devido à estrutura de supermacroporos interconectados.

O fluxo de água em uma matriz contínua de criogel poli(acrilamida-ácido iminodiácetico) (pAAM-IDA) de 4 cm de altura ocorre livremente a uma velocidade superficial de 750-2000 cm h<sup>-1</sup> a uma pressão de 0,01 Mpa (ARVIDSSON et al., 2003). Para efeito de comparação, colunas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) operam com fluxos de 300-1700 cm h<sup>-1</sup> a pressões elevadas de 2-10 MPa e a cromatografia de leito expandido com fluxos de 200-400 cm h<sup>-1</sup> a pressão de 0,01 Mpa (LOZINSKY et al., 2003).

Com isso, pressupõe-se que o uso de colunas monolíticas supermacroporosas permitiria processos cromatográficos a velocidades superficiais comparáveis com as usadas em CLAE e superior às utilizadas em cromatografia de leito expandido, utilizando apenas pressões mínimas típicas de cromatografia de proteínas de baixa pressão.

### **3.5 TROCA IÔNICA**

A cromatografia de troca iônica (CTI) pode ser definida como um fenômeno físico-químico em que uma solução troca íons com a superfície de um sólido poroso (GUIOCHON, 2002).

A estrutura de um trocador de íons consiste de uma matriz sólida com grupos iônicos carregados (positivos ou negativos) ligados a essa matriz. Íons de cargas opostas, denominados contra-íons, neutralizam essas cargas, mantendo o sistema em equilíbrio. Ao colocar o trocador de íons em contato com uma solução eletrolítica, ocorre uma perturbação do sistema até que um novo equilíbrio seja estabelecido (SAMUELSON, 1963).

A troca iônica ocorre de maneira similar a uma reação estequiométrica. À medida que a concentração de contra-íons sobre a superfície do adsorvente diminui, sua concentração em solução aumenta. Do mesmo modo, a concentração dos íons que estavam em solução é reduzida, à medida que a concentração dos mesmos aumenta na superfície do adsorvente (GALLANT, 2004).

As moléculas de proteína têm em sua superfície grupamentos com cargas positivas e negativas. As cargas positivas são oriundas, sobretudo, dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e das aminas terminais, e as cargas negativas são devidas ao ácido aspártico e glutâmico e aos grupamentos carboxílicos terminais (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Valendo-se das diferenças entre os pontos isoelétricos, a cromatografia de troca iônica tem sido amplamente usada na recuperação e purificação de proteínas, sendo usualmente empregada nas etapas iniciais de purificação.

A vantagem do uso da cromatografia de troca iônica para proteínas é que a adsorção pode ser facilmente reversível com a mudança das condições de processo. O desempenho do processo de cromatografia de troca iônica segue uma sequência específica de estágios que incluem condicionamento, adsorção, lavagem, dessorção e regeneração.

Para a otimização do processo cromatográfico de purificação de proteínas por troca iônica é necessário conhecer o equilíbrio de adsorção para os compostos de interesse. Usualmente, o equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que relacionam a concentração de um composto, em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentração de interesse (JACOBSON et al., 1987).

Vários parâmetros experimentais podem alterar o comportamento de adsorção das proteínas na CTI, e conseqüentemente seu equilíbrio e a isoterma de adsorção. Dentre eles o tipo de tampão utilizado, a natureza do co e contra-íons em solução, a temperatura, a força iônica e a vazão do eluente, dentre outros (GUIOCHON, 2002).

O efeito da temperatura é um fenômeno complexo, que pode afetar tanto as propriedades físico-químicas do adsorvente, como as constantes de dissociação de eletrólitos quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais em proteínas (MIHELÍČ et al., 2003).

Em alguns casos, a elevação na temperatura aumenta a capacidade adsortiva do leito (MIHELÍČ et al., 2003), enquanto que em outros, ocorre o inverso (HUANG et al., 1990). Tais diferenças ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que quando o processo de adsorção é exotérmico, o fenômeno é entálpicamente dirigido e a capacidade adsortiva da

resina aumenta com a elevação da temperatura. Já para o processo de adsorção endotérmico, a contribuição entrópica é maior, ocorrendo o comportamento inverso (FANG et al., 1996; MIHELIČ et al., 2003).

O raio iônico, a valência dos íons e a eletronegatividade do sal influenciam o comportamento da adsorção de proteínas em trocadores aniônicos (FANG et al., 1996).

Quanto à concentração de sal em solução, na CTI quanto maior a concentração de sal, menor a capacidade adsorviva da resina (HUANG et al., 1990; FANG et al., 1996) indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica é a atração eletrostática (LIN et al., 2001).

Lin et al. (2001) verificaram, pela variação no pH, que forças não-iônicas, como a interação hidrofóbica, também atuam no processo de troca iônica. Esses autores observaram que a adsorção de  $\beta$ -lactoglobulina em uma resina aniônica ocorria de maneira espontânea (variação da energia livre de Gibbs negativa) mesmo quando a carga líquida da proteína era positiva ( $\text{pH} < \text{pI}$ ).

Dependendo da composição de aminoácidos, a proteína poderá ter um variado número de grupos carregados, levando a diferentes valores de  $\text{pI}$  e arranjos espaciais, em função de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A distribuição das cargas em seu interior e na superfície contribui para a orientação espacial da proteína ao ser adsorvida (KOPACIEWICZ et al., 1983).

Além da diferença de carga líquida entre as proteínas, a diferença na massa molar também pode influenciar o processo adsorvivo. Moléculas menores podem exibir maior capacidade de adsorção, dentre outros motivos, por terem maior facilidade em penetrar nos poros do adsorvente (SKIDMORE e CHASE, 1990).

### 3.6 MEIOS ADSORVENTES CONTÍNUOS – MONOLITOS

Um monolito pode ser considerado como uma fase estacionária moldada em um único bloco e inserida em uma coluna cromatográfica (GUIOCHON, 2007) e é considerado como um material cromatográfico de quarta geração.

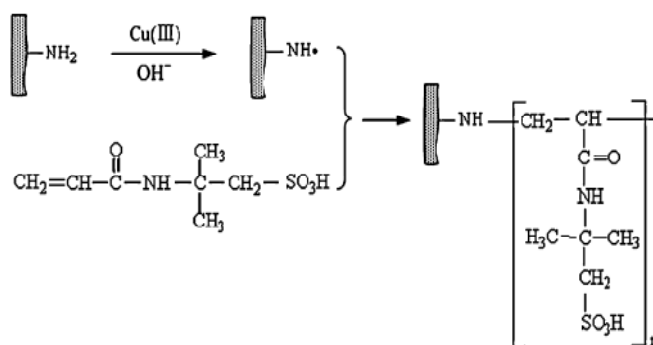
Colunas cromatográficas monolíticas em escala preparativa e industrial, também referidas por colunas de fases contínuas, tem se tornado uma tecnologia muito útil na área de biosseparação. Devido à estrutura de poros interconectados de grandes dimensões, o fluxo pelos poros é puramente convectivo e a resistência à transferência de massa é baixa (PODGORNIK et al., 2000; HAHN et al., 2001), tornando os monolitos uma fase estacionária muito atrativa para cromatografia, principalmente no processamento de grandes biomoléculas como proteínas, vírus, pDNA e nanopartículas. Além disso, podem ser usados diretamente na captura de biomoléculas a partir de soluções concentradas ou contendo partículas. Os monolitos ou colunas cromatográficas de leito contínuo representam uma nova classe de fases estacionárias introduzidas como uma alternativa às colunas tradicionais de leito fixo (HJERTÉN et al., 1989; MARUSKA e KORNYSOVA, 2004).

As colunas monolíticas podem ser constituídas por sílica ou polímeros. Em contraste com as constituídas de fases poliméricas, as colunas com fase base de sílica monolítica em tamanhos analíticos típicos não podem ser preparadas *in situ* por causa da retração que acompanha a solidificação que ocorre durante sua policondensação.

Os monolitos poliméricos são produzidos a partir da mistura de monômeros, monômeros reticulantes e solvente formador de poros (agente porogênico), que são polimerizados *in situ* em um molde. A imensa variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície permite que os monolitos poliméricos se adequem a quase qualquer tipo de separação (GUIOCHON, 2007).

A superfície do monolito pode ser modificada a fim de se introduzir funcionalidades, dependendo da aplicação a que se destina. Essa modificação pode ser obtida pela copolimerização de monômeros funcionais (HAHN et al.,

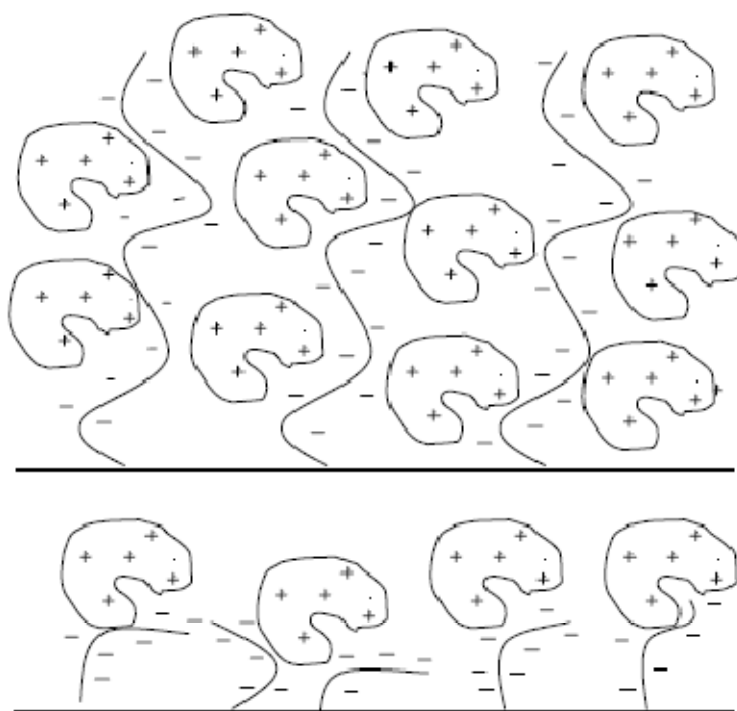
2001; WIEDER et al., 2006; LI et al., 2009), pela modificação dos grupos funcionais da superfície (SVEC e FRECHET, 1992; WANG et al., 1995; PAN et al., 2002; BUCHMEISER, 2007) ou imobilização de monômeros funcionais na superfície após a polimerização (Figura 3) (TRIPP et al., 2001; SAVINA et al., 2005a; HANORA et al., 2006; YAO et al., 2007).



**Figura 3** - Esquema da polimerização do monômero AMPSA em um criogel de poliacrilamida iniciada por diperiodatocuprato de potássio e álcali (YAO et al., 2007).

Uma das desvantagens dos materiais monolíticos altamente porosos é a limitada área superficial e, conseqüentemente, a quantidade limitada de grupos funcionais disponíveis sobre a superfície. Enquanto a modificação dos grupos funcionais fornece apenas um grupo funcional por sítio reativo presente na superfície, o processo de imobilização de monômeros funcionais na superfície pode aumentar drasticamente a densidade dos grupos funcionais de superfície, gerando uma maior capacidade para a coluna. Além disso, ocorre um aumento de área superficial à medida que esses ligantes poliméricos formam estruturas em forma de cerdas ou tentáculos (ARRUA et al., 2009).

Essa característica leva a um aumento da capacidade de adsorção do criogel com o aumento da polimerização do ligante a coluna, o que pode ser explicado pela formação desse tipo de estruturas (Figura 4).



**Figura 4** - Representação da adsorção de uma proteína de carga positiva em um criogel com monômeros funcionais imobilizados na superfície, na forma de tentáculos (acima) e convencional (abaixo). (Fonte: SAVINA et al., 2005b)

A cromatografia em meios porosos baseia-se no contato da amostra com a superfície que suporta os sítios de interação. Deseja-se assim uma grande superfície, que pode ser obtida pela presença de microporos (menores que 2 nm) e mesoporos (entre 2 e 50 nm). Os macroporos (maiores que 50 nm) contribuem insignificamente para a área superficial total, entretanto, a presença desses poros em monolitos é essencial de forma a permitir que o escoamento pelo material ocorra a uma pressão razoável. Essa pressão, por sua vez, depende das propriedades globais de porosidade do material. Sendo assim, a distribuição de tamanho dos poros de um monolito deve ser corretamente ajustada durante a sua preparação a fim de se adequar a aplicação desejada (SVEC, 2010).

Dentre as variáveis responsáveis pela definição dos tamanhos dos poros tem-se a temperatura, a composição da mistura de solventes porogênicos, o modo de iniciação e teor de monômero reticulante (SVEC, 2010). Em contraste com os três primeiros fatores, que afetam as propriedades de porosidade do material resultante, mas não a sua composição, a variação na relação entre o monômero reticulante e o monômero principal induz não apenas a formação de

diferentes estruturas porosas, mas também leva a materiais com diferentes composições.

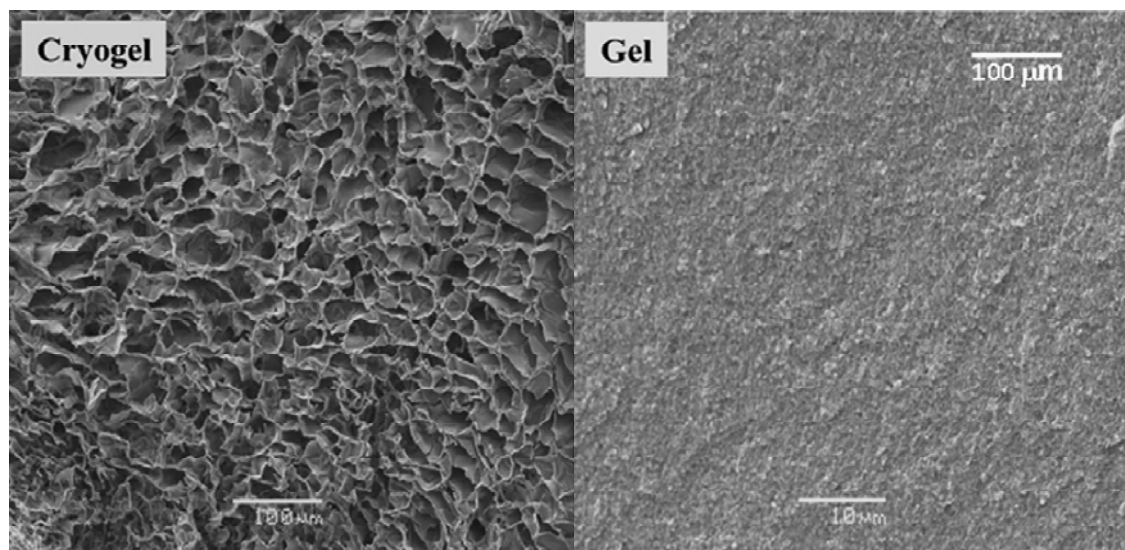
### 3.7 CRIOGÉIS

Criogéis são géis poliméricos formados em meio congelado e foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação no final da década de 90 (LOZINSKY et al., 2001). Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho.

Dois métodos principais para produção de criogéis tem sido utilizados: (i) reticulação de polímeros, tais como álcool polivinílico, dissolvidos em água (PLIEVA et al., 2005) e (ii) polimerização de monômeros dissolvidos na água. Em ambos casos a solução deve ser congelada antes da reação. Usando o último método, uma grande variedade de criogéis foi preparada a partir de monômeros, incluindo 2-hidroxietil metacrilato (PLIEVA et al., 2007), acrilamida (PLIEVA et al., 2004a; YAO et al., 2006b; YAO et al., 2007; CHEN et al., 2008), dimetilacrilamida (KUMAR et al., 2003), N-isopropilacrilamida (GALAEV et al., 2006; PEREZ et al., 2007), e N- N-vinilcaprolactama (PETROV et al., 2009).

Reticuladores como metilenobisacrilamida e poli(etileno glicol diacrilato) são utilizados na mistura de polimerização para reforçar a estrutura macroporosa e prevenir a dissolução do monolito na fase aquosa móvel durante sua aplicação. A polimerização é normalmente iniciada com um sistema redox solúvel em água, incluindo persulfato de amônio e N, N, N, N tetrametil-etilenodiamina. A polimerização iniciada por radiação ultravioleta (UV) também pode ser utilizada (PETROV et al., 2009). A mistura de polimerização é preparada dissolvendo todos os componentes em água. Esta mistura é vertida em um molde como uma coluna e rapidamente resfriada para uma temperatura abaixo de zero sendo a polimerização realizada por até 24 h.

Na Figura 5 observa-se micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de estruturas preparadas a partir de uma mistura idêntica via polimerização em temperaturas de -20 e 20 °C. Enquanto que a estrutura do material preparado à temperatura ambiente é compacta e praticamente sem funcionalidade para cromatografia, o criogel apresenta grandes poros interconectados, separados por paredes sólidas poliméricas, que permitem o fluxo por sua estrutura.



**Figura 5** - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de (A) criogel a base de dextrana preparado a - 20 °C e (B) gel de dextrana convencional preparado em temperatura ambiente (Fonte: PLIEVA et al., 2007).

Durante a produção do criogel sob condições de congelamento, os cristais de gelo em crescimento atuam como agentes porogênicos. A forma e o tamanho dos cristais determinam a forma e o tamanho dos poros que se desenvolvem após o descongelamento da água presente. Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008).

Os criogéis supermacroporosos tem sido usados com bastante sucesso no fracionamento de linfócitos de sangue de humano (KUMAR et al., 2003), cromatografia de células de *E. coli* (ARVIDSSON et al., 2002) e captura direta de biomoléculas a partir de homogenados celulares (ARVIDSSON et al., 2003).

A cromatografia por afinidade com metais imobilizados tem sido usada em colunas contínuas supermacroporosas (monolitos) de criogéis de poliacrilamida, modificadas com resíduos de ácido iminodiacético, para captura direta de enzimas de homogenados celulares, tais como lactato desidrogenase (ARVIDSSON et al., 2003), uroquinase (KUMAR et al., 2006a; KUMAR et al., 2006b), tripsina (LYSOGORSKAYA et al., 2008),  $\beta$ -galactosidase (GROSOVÁ et al., 2008), LF (NOPPE et al., 2006), anticorpos monoclonais (NILSANG et al., 2007; JAIN et al., 2010) e bacteriocinas (HANORA et al., 2005; DERAZ et al., 2007). Criogéis com ligantes trocadores de íons tem atraído a atenção de pesquisadores devido ao seu elevado potencial de aplicações na captura direta de biomoléculas tais como BSA (SAVINA et al., 2005a; 2006), lisozima (SAVINA et al., 2005b) e DNA plasmidial (HANORA et al., 2006).

Colunas monolíticas tem sido, portanto, testadas numa vasta área da biotecnologia e tem demonstrado suas importantes características na biosseparação de grandes biomoléculas. Criogéis apresentam-se, portanto, como um material cromatográfico atrativo permitindo a captura direta de proteínas e outras biomoléculas de extratos brutos não processados ou mesmo de meios de fermentação. Estes materiais abrem novas perspectivas nos processos cromatográficos de proteínas, além de outras biomoléculas como células, vírus e nanopartículas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

Acrilamida (AAm), ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPSA), alil-glicidil-éter (AGE), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina (TEMED), N,N-metilenobisacrilamida (MBAAm) e persulfato de amônio (APS), todos com 99 % de pureza, e albumina de soro bovino (BSA, 85 % de pureza) foram obtidos da Sigma Aldrich Inc (EUA). A lactoferrina (95 % de pureza) foi obtida da Glanbia Nutritionals (EUA). Outros reagentes químicos usados foram de grau analítico.

#### **4.1.1 FORMAÇÃO DO CRIOGEL**

A matriz de criogel de poli(acrilamida) foi produzida pela copolimerização dos monômeros AAm e AGE e do monômero reticulante MBAAm, iniciada por TEMED e APS, dentro de uma coluna de vidro HR 5/5, de 5 mm de diâmetro (Pharmacia Biotech, Suécia), sob condições de temperatura de congelamento. Os monômeros foram pesados em balança analítica (Ohaus Adventurer Pro, EUA) e dissolvidos em água ultrapura (MilliQ, Millipore, EUA). A mistura foi degaseificada em banho ultrassom (Branson 1510R-MT, EUA) por 5 min e o pH da solução ajustado para 6,5 com HCl (1 mol L<sup>-1</sup>). A concentração final de monômeros foi de 6 % (4,74 g de AAm, 1,27 g de MBAAm e 1 mL de AGE). Após a adição de 110 mg de APS, a solução foi resfriada em banho de gelo por 5 min. A polimerização foi então iniciada pela adição de 95 µL de TEMED, também resfriado em banho de gelo, sendo a mistura agitada com bastão de vidro por 1 min (KUMAR et al., 2006a).

A mistura foi então adicionada à coluna de vidro, selada em suas extremidades e imersa em etanol a -12 °C, permanecendo congelada por 16h. Após isto, o gel foi descongelado em temperatura ambiente e lavado com 300 mL de água ultrapura. A coluna foi preenchida por uma solução de azida de sódio 0,02 % (m/v) para conservação e armazenada a 4 °C.

#### **4.1.1.1 ATIVAÇÃO DO CRIOGEL PAAM E IMOBILIZAÇÃO DO TROCADOR CATIÔNICO**

Para o preparo da solução de diperiodato-cuprato de potássio  $0,031 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{K}_5(\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2)$ ) foram adicionados 1,97 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 3,79 g de  $\text{KIO}_4$ , 1,22 g de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e 5,0 g de  $\text{KOH}$  a 100 ml de água ultrapura e mantidos sob ebulição por 40 min. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em filtro de acetato de celulose ( $0,45 \mu\text{m}$ ) e diluída para 250 ml com água ultrapura.

A ativação do criogel foi baseada no trabalho de Yao et al., (2007). Uma solução iniciadora contendo 5 mL de  $\text{NaOH}$  ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 15 mL de  $\text{K}_5(\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2)$  ( $0,031 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi percolada pela coluna contendo o criogel preparado anteriormente a uma velocidade de  $1 \text{ cm min}^{-1}$  sob condição de temperatura controlada de  $41 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa B.O.D. (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil), durante 30 min. Em seguida, 10 mL da solução de monômeros de AMPSA ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram bombeados na coluna para sua imobilização. A reação na coluna foi mantida por 1 h sob temperatura de  $41 \text{ }^\circ\text{C}$ , com recirculação do monômero. Por fim, a coluna foi lavada com 200 mL de solução de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , seguido de 800 mL de água ultrapura, a uma vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  para remoção dos resíduos dos monômeros (AMPSA), obtendo-se então a coluna denominada criogel pAAm- $\text{SO}_3$ .

#### **4.1.2 MEDIDAS DAS PROPRIEDADES DO LEITO**

##### **4.1.2.1 ESTRUTURA DOS POROS**

Pequenos discos de um criogel não ativado e de um ativado foram cortados da parte média da coluna monolítica e secos em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 h. As amostras secas foram coladas com fita adesiva em um suporte porta-amostra (stub) e revestidas com uma camada de 20 nm de ouro em um metalizador (modelo 550X, SEM Electron Microscopy Sciences, Kent, Inglaterra). Foram então examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo 1430 VP, LEO, Zeiss, Jena, Alemanha) operado a 10 kV. As

análises foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

#### 4.1.2.2 POROSIDADE

A porosidade do criogel ( $\varphi$ ) foi estimada medindo-se o conteúdo de água livre presente e o volume do gel de uma dada amostra, segundo Yao et al., (2006b). Um pedaço em torno de 3 cm de comprimento foi cortado da parte central do gel e saturado com água ultrapura. Para tanto, a amostra foi imersa em uma proveta graduada contendo água ultrapura, com volume  $V_1$ , conhecido, por um intervalo de 2 h. O volume final  $V_2$  foi então lido, e o volume da amostra  $V_0$  foi calculado por diferença, ou seja,  $V_0 = V_2 - V_1$ . As massas do criogel saturado com água ( $m_{sat}$ ) e do criogel úmido ( $m_u$ ) após sua compressão para remoção da água livre dentro dos poros foram determinadas por pesagem em balança analítica. A porosidade foi então determinada pela equação:

$$\varphi = \frac{m_{sat} - m_u}{\rho_a V_0} \times 100\% \quad (1)$$

onde  $\rho_a$  é a densidade da água. Em seguida, a amostra foi seca em estufa a temperatura constante de 60 °C por 24 h para determinação da massa da amostra seca  $m_s$ . O teor total de água foi então determinado por:

$$\text{Teor de água} = \frac{m_{sat} - m_s}{\rho_a V_0} \times 100\% \quad (2)$$

A capacidade de inchamento ( $C_i$ ), que corresponde à quantidade da água absorvida pelo criogel foi determinada por:

$$C_i = \frac{m_u - m_s}{m_s} \quad (3)$$

### 4.1.2.3 NÚMERO DE SÍTIOS ATIVOS

O número total de grupos sulfônicos (-SO<sub>3</sub>) no criogel pAAm-SO<sub>3</sub> foi determinado pela conversão da forma aniônica do criogel para a forma protonada, utilizando uma solução de HCl 2M, e quantificação dos íons H<sup>+</sup> retidos na coluna.

A coluna foi percolada com 50 mL de HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. O excesso de ácido foi então removido por lavagem com 100 mL de água ultrapura. O criogel foi seco em estufa a 60 °C, cortado em pequenos pedaços e pesado. Os pedaços de criogel foram adicionados a 25 mL de uma solução de NaCl 2 mol L<sup>-1</sup>. A reação ocorreu por 24 h, sob agitação, para garantir a troca completa dos íons H<sup>+</sup> por íons Na<sup>+</sup> (SAVINA et al., 2005b).

Em seguida, a solução foi centrifugada e 10 mL da solução sobrenadante foram retirados e titulados com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sob baixa agitação, utilizando vermelho de metila como indicador (pH 6,9-7,3). Os dados da titulação foram utilizados para calcular o número de mols de íons H<sup>+</sup> em solução, que representa o número de sítios ativos, dado como mmol de grupos sulfônicos por grama de criogel seco.

### 4.1.2.4 RESISTÊNCIA AO FLUXO

A resistência ao fluxo apresentada pela coluna foi caracterizada pela permeabilidade hidráulica ( $K_a$ ), que indica a relação da queda de pressão hidrostática da coluna versus a vazão da fase móvel (0,1-1,5 mL min<sup>-1</sup>), de acordo com a Lei de Darcy (equação 4):

$$Q_a = - \frac{K_a A \Delta P_a}{\mu_a L} \quad (4)$$

onde  $Q_a$  é a vazão de água pela coluna,  $\mu_a$  é a viscosidade da água,  $L$  é o comprimento da coluna,  $A$  é a área da seção transversal e  $\Delta P_a$  é a queda de pressão na coluna.

#### 4.1.2.5 DISPERSÃO AXIAL

A dispersão axial no leito foi avaliada pela medida da distribuição do tempo de residência (DTR) usando o método de pulso de um traçador sob diferentes vazões (0,1-2 mL min<sup>-1</sup>), como descrito a seguir. Água ultrapura foi bombeada na coluna a uma vazão constante. Um pulso de traçador (0,15 mL de acetona a 1 % v/v) foi injetado na coluna e a resposta correspondente na saída da coluna foi medida por um detector de absorvância na região do UV (280 nm). Os dados registrados para os diferentes valores de vazão do líquido foram usados para o cálculo da DTR. O coeficiente de dispersão axial foi determinado pela variância e o tempo de residência médio da curva de DTR correspondente (YAO et al., 2006a), de acordo com a equação:

$$\frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} = 2 \left( \frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left( \frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad (5)$$

onde  $\sigma_t^2$  e  $\bar{t}$  são a variância e o tempo de residência médio da curva de DTR,  $D_{ax}$  é o coeficiente de dispersão,  $L$  é o comprimento da coluna e  $u$  é a velocidade intersticial do fluido na coluna ( $u = U_L/\varphi$ ,  $\varphi$  é a porosidade do leito e  $U_L$  a velocidade superficial do líquido).

O número de pratos teóricos ( $N$ ) foi calculado a partir dos resultados da DTR usando a seguinte equação (YAO et al., 2006a):

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (6)$$

onde  $t_R$  é o tempo de residência e  $w_{1/2}$  é a largura do pico de resposta medida à meia altura. Os valores da altura equivalente a um prato teórico (AEPT) foram calculados com o comprimento da coluna:

$$AEPT = \frac{L}{N} \quad (7)$$

### 4.1.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O método de análise frontal foi usado para determinação das condições de equilíbrio de adsorção da lactoferrina no criogel (isotermas de adsorção) a 25 °C, em diferentes valores de pH e concentrações de NaCl.

Esse método consiste na modificação da concentração do soluto na coluna em diferentes passos, sendo que após a formação da curva de ruptura, passou-se ao próximo passo, aumentando a concentração de proteína.

A coluna foi inicialmente equilibrada pela percolação de tampão fosfato (0,01 mol L<sup>-1</sup>) a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. Em seguida, a solução do tampão contendo a proteína em diferentes concentrações (0,2 a 3 mg mL<sup>-1</sup>) foi bombeada na coluna a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> até a completa formação da curva de ruptura. Após a estabilização na saída da coluna, a concentração foi aumentada para um novo valor. Esse procedimento foi realizado sucessivamente até a concentração de 3 mg mL<sup>-1</sup>. Após cada experimento, a coluna foi regenerada com 6 volumes de coluna (VC) de tampão contendo NaCl (2 mol L<sup>-1</sup>) e, em seguida, com 4 VC de tampão fosfato.

A quantidade de proteína adsorvida à coluna foi obtida pela equação 8:

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(C_{i+1} - C_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (8)$$

onde  $q_{i+1}$  e  $q_i$  representam as massas de soluto adsorvido por volume de adsorvente (expressas em mg mL<sup>-1</sup>) no  $i$ -ésimo e no  $(i+1)$ -ésimo passo, quando no equilíbrio com as concentrações na fase líquida  $C_{i+1}$  e  $C_i$ , respectivamente (também expressas em mg mL<sup>-1</sup>).  $V_{F,i+1}$  é o volume (mL) entre o ponto de inflexão da  $i$ -ésima e a  $(i+1)$ -ésima curva de ruptura,  $V_0$  é o volume (mL) vazio da coluna e  $V_a$  é o volume (mL) de adsorvente na coluna.

O modelo de Langmuir (Equação 9) foi ajustado aos dados experimentais e a capacidade de adsorção do leite foi determinada para as diferentes condições experimentais.

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (9)$$

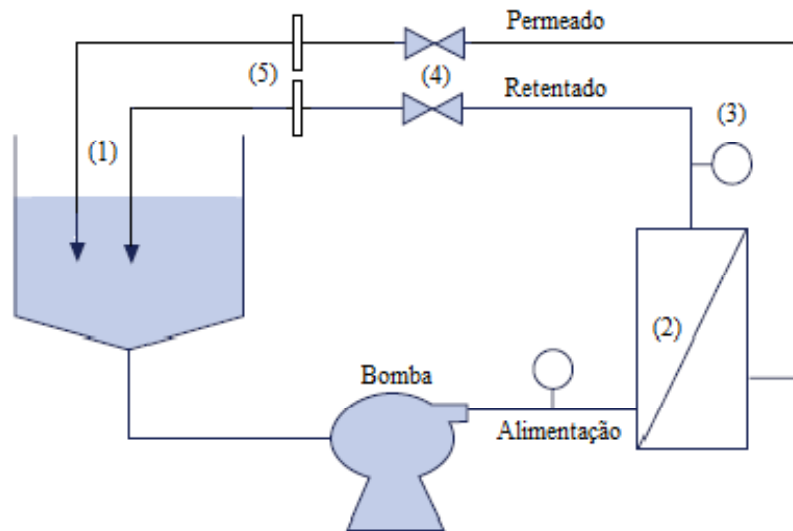
onde  $q_m$  é a capacidade adsorptiva máxima do adsorvente,  $K_d$  é a constante de equilíbrio da adsorção,  $q$  e  $C$  são as concentrações da proteína no adsorvente e na fase móvel, respectivamente, em condições de equilíbrio.

#### **4.1.4 CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA**

##### **4.1.4.1 ULTRAFILTRAÇÃO (UF)**

Para a concentração do soro foi utilizado soro de leite obtido do processo de fabricação de queijo Minas Frescal. O soro obtido foi centrifugado (4.000 x g por 20 min), o sobrenadante filtrado em membrana de nylon de 80 µm e usado para obtenção do soro concentrado por meio de ultrafiltração.

Uma bomba peristáltica (Masterflex I/P, EUA) foi utilizada para impulsionar o fluido através do módulo de UF, utilizando a membrana de celulose regenerada com limite nominal de massa molecular de 5 kDa e área superficial de 0,5 m<sup>2</sup>. Um balão de vidro de 20 litros foi utilizado como tanque de alimentação. A pressão foi monitorada na entrada do módulo e na saída do retentado utilizando manômetros e a vazão de alimentação e do retentado foram monitoradas por meio de fluxômetros instalados após as válvulas (Figura 6).



**Figura 6** - Sistema de ultrafiltração montado em modo de reciclo total. (1) Tanque de alimentação; (2) Membrana; (3) Manômetro; (4) Válvulas; (5) Fluxômetros (Fonte: MILLIPORE CORPORATION, instrução nº P17512).

Inicialmente 15 L de soro de leite foram adicionados ao reservatório de alimentação. Em seguida a válvula do retentado foi aberta completamente, o sistema configurado para que o reservatório fosse alimentado pelos fluxos de permeado e retentado (modo de reciclo total) e o bombeamento iniciado. Ajustes na válvula de retentado e na velocidade da bomba foram realizados de maneira a alcançar inicialmente fluxos de  $5 \text{ L min}^{-1} \text{ m}^{-2}$  e pressão transmembrana (PTM) mínima entre 2 a 5 psi que foram mantidas entre 10 a 15 min de modo a garantir que a estabilidade do fluxo fosse alcançada.

Após a estabilidade do fluxo ter sido alcançada o permeado foi direcionado para um recipiente diferente do utilizado na alimentação, de maneira que o volume fosse reduzido e a concentração da lactoferrina promovida.

Utilizando a mesma alimentação descrita anteriormente adicionou-se água destilada passando a operar em modo de diafiltração. O fluxo de retentado foi operado em reciclo e o fluxo de permeado coletado a parte, enquanto um fluxo semelhante de água destilada foi adicionado ao recipiente de alimentação. A diafiltração do produto foi realizada até que 12 diavolumes fossem obtidos.

Ao final dos experimentos o sistema foi submetido às etapas de lavagem, limpeza, sanitização e estocagem da membrana de acordo com os

procedimentos especificados pelo fabricante (MILLIPORE CORPORATION, instrução n° P17512).

#### **4.1.4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SORO**

Análises relativas à caracterização da composição química do soro e do concentrado obtido por ultrafiltração foram realizadas. As amostras foram homogeneizadas, deixadas à temperatura ambiente e então analisadas.

A quantificação de proteínas totais foi conduzida por espectrofotometria (Espectrofotômetro Biomate 3, Thermo Scientific, EUA), de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), pela leitura de absorbância no comprimento de onda de 595 nm, usando BSA como padrão.

A determinação do teor de lactose foi feita utilizando o método de DNS (3-5 ácido di-nitro salicílico), de acordo com MILLER, 1959. As medidas de pH foram feitas utilizando um pHmetro de bancada, devidamente calibrado e a quantificação da lactoferrina foi feita por CLAE (item 4.1.4.4). A medida de viscosidade das amostras foi realizada a uma taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$ , durante 2 min em um reômetro MARS (HAAKE MARS, Thermo Electron Corp., Alemanha) equipado com um sensor do tipo cilindros coaxiais.

#### **4.1.4.3 CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA**

Estudos de adsorção para captura da LF foram conduzidos a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , variando o pH, a razão de diluição e a vazão.

A coluna criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> foi inicialmente equilibrada com tampão fosfato ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) no pH indicado pelo delineamento experimental. Um volume do soro de leite concentrado (2 mL) foi aplicado na coluna na vazão desejada. Após adsorção e lavagem da coluna com o mesmo tampão (10 VC), a eluição da proteína foi feita usando 5 VC do mesmo tampão, contendo  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl. Ao final a coluna foi regenerada com 6 VC do tampão, para

análises posteriores ou armazenada pela percolação de 20 VC de solução de azida de sódio 0,2 % (m/v).

Alíquotas referentes a cada uma das frações (alimentação, lavagem e eluição) foram coletadas para posterior caracterização. As amostras do eluído foram liofilizadas (Liofilizador Christ Alpha 2-4, LDplus, Alemanha). As alíquotas coletadas, alimentação, lavagem e eluição, correspondem, respectivamente, ao volume de soro percolado pela coluna, volume de tampão utilizado para lavagem e solução de eluição contendo as proteínas eluídas, ambos recolhidos na saída da coluna.

As amostras foram caracterizadas em termos de recuperação de lactoferrina (R) e fator de purificação ( $Fp$ ). Para isto foram usadas as técnicas de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras secas foram diluídas adequadamente com água ultrapura para as análises subsequentes.

A recuperação de lactoferrina (R) corresponde à porcentagem de lactoferrina que ficou adsorvida na coluna ( $m_{LF,elu}$ ) em relação à massa total de lactoferrina que foi adicionada à coluna ( $m_{LF,al}$ ), calculada pela equação 10.

$$R = \frac{m_{LF,elu}}{m_{LF,al}} \times 100 \% \quad (10)$$

A pureza de lactoferrina ( $p_{LF}$ ) em relação às proteínas totais foi avaliada pela razão entre a área do pico correspondente a LF pela área total do cromatograma e o fator de purificação ( $Fp$ ) foi dado pela razão da pureza da lactoferrina no eluído ( $P_{LF,elu}$ ) pela pureza da lactoferrina na alimentação ( $P_{LF,al}$ ), conforme a equação 11.

$$Fp = \frac{P_{LF,elu}}{P_{LF,al}} \quad (11)$$

#### 4.1.4.4 ANÁLISE DE PROTEÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras foram analisadas utilizando um sistema SHIMADZU modelo LC-10AD VP detector UV-Visível e integrador-processador Shimadzu SCL-10A VP, com duas bombas e injeção automática. Foi utilizada uma coluna de fase reversa apHera™ C18 Polymer (25 cm × 4,6 mm; 5 µm), Supelco.

A metodologia utilizada nas análises de proteína foi adaptada de Ferreira, (2001). A análise foi conduzida a temperatura de 40 °C com uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, formada por um gradiente contendo um solvente A (solução de cloreto de sódio 0,15 mol L<sup>-1</sup> e pH 2,5) e um solvente B (acetonitrila 100 %) (Tabela 6).

**Tabela 6** – Programação do gradiente da fase móvel (CLAE). Vazão: 1 mL min<sup>-1</sup>. Solvente A (solução de cloreto de sódio 0,15 mol L<sup>-1</sup> e pH 2,5) e solvente B (acetonitrila 100 %).

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0-3	100-64	0-36
3-20	64-45	36-55
20-23	45	55
23-27	45-100	55-0
27-28	100	0

A quantidade de amostra injetada, o comprimento de onda e o tempo de eluição foram de 10 µL, 210 nm e 28 min, respectivamente. As amostras foram previamente filtradas em filtros de nylon de 0,22 µm e as soluções foram desgaseificadas e filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Millipore, Bedford MA, EUA).

Para a quantificação da proteína foi utilizada uma curva analítica com concentrações conhecidas da proteína lactoferrina (0,25 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup>) como padrão.

#### **4.1.4.5 ELETROFORESE EM GEL**

SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 5 % (m/v) em tampão Tris-HCl (0,5 mol L<sup>-1</sup>; pH 6,8) e géis de separação com 12 % (m/v) de poliacrilamida em tampão Tris-HCl (1,5 mol L<sup>-1</sup>; pH 8,8), contendo 0,4 % (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) (ALFENAS, 2006).

As amostras de proteína (100µL) e padrão foram dissolvidos em 500 µL de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1 % de SDS e 5 % de β-mercaptoetanol e em seguida aquecidos a 100 °C por 15 min. Foram aplicados nos géis volumes de 40 µL das amostras desnaturadas, e a corrida foi feita com voltagem fixa de 70 e 100 V, para os géis de empilhamento e de separação, respectivamente.

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel com 10 % de ácido tricloroacético em metanol 50 % durante 12 horas e, em seguida, coradas com 0,2 % de azul de Coomassie, dissolvido em uma mistura de 50 % de etanol e 9 % de ácido acético, durante 6 horas. A descoloração foi realizada durante a noite com uma solução a 30 % de etanol e 7,5 % de ácido acético.

#### **4.1.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A matriz de criogel foi produzida em batelada e foi distribuída em seringas de 5 mL e em uma coluna de vidro HR 5/5. A ativação foi realizada individualmente em cada unidade experimental (seringa e coluna). Para os experimentos destrutivos foi utilizada uma seringa para cada repetição. Para as análises feitas na coluna, as repetições foram realizadas com a mesma coluna.

A caracterização do criogel foi realizada em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e os valores expressos em média e desvio padrão, pela análise das propriedades morfológicas (porosidade e número de sítios ativos) e hidrodinâmicas (resistência ao fluxo, dispersão axial e altura equivalente a um prato teórico).

O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais por regressão não linear. A avaliação da qualidade do ajuste foi feita pela análise

de variância (ANOVA) pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ), pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pela falta de ajuste.

Para os experimentos de captura da lactoferrina, empregou-se um Delineamento de Face Centrada (DFC), no qual foram avaliados os fatores significativos ( $p < 0,05$ ) para a recuperação da lactoferrina e fator de purificação. A Tabela 7 apresenta as condições experimentais testadas no DFC.

As razões de diluição (RD) 0,33; 0,67 e 1,0 correspondem, respectivamente, a diluições 1:2, 2:1 e 1:0 (soro:tampão).

**Tabela 7** - Condições experimentais testadas no Delineamento de Face Centrada.

TRAT	Codificados			Não-codificados		
	pH	RD	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	pH	RD	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	6	0,33	1,0
2	-1	-1	1	6	0,33	4,0
3	-1	1	-1	6	1,00	1,0
4	-1	1	1	6	1,00	4,0
5	1	-1	-1	8	0,33	1,0
6	1	-1	1	8	0,33	4,0
7	1	1	-1	8	1,00	1,0
8	1	1	1	8	1,00	4,0
9	-1	0	0	6	0,67	2,5
10	1	0	0	8	0,67	2,5
11	0	-1	0	7	0,33	2,5
12	0	1	0	7	1,00	2,5
13	0	0	-1	7	0,67	1,0
14	0	0	1	7	0,67	4,0
15	0	0	0	7	0,67	2,5
16	0	0	0	7	0,67	2,5
17	0	0	0	7	0,67	2,5
18	0	0	0	7	0,67	2,5

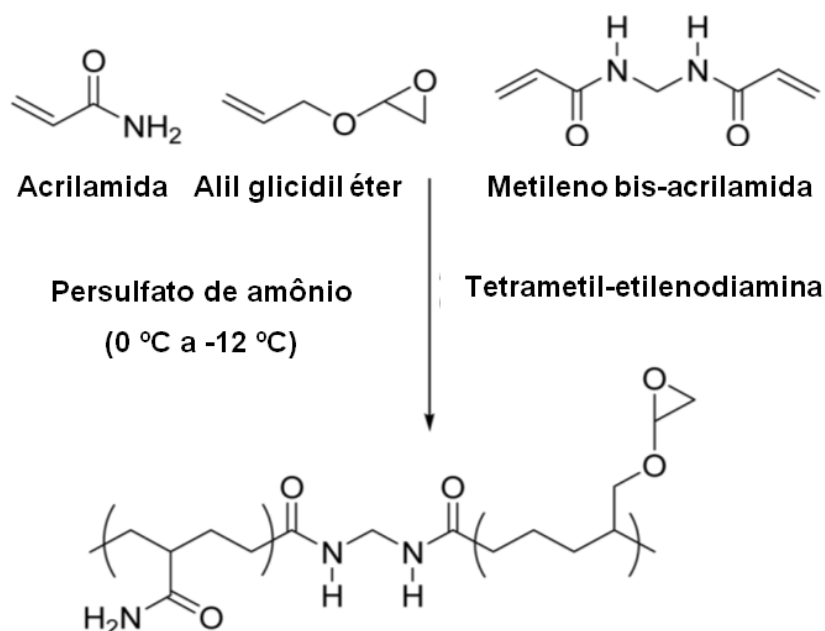
O módulo utilizado para a construção da matriz com as condições experimentais testadas no DFC foi o SAS 9.2 / ADX® (Interface for Design of Experiments).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico *Statistical Analysis System*® versão 9,0, procedimento RSREG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. A confiabilidade do modelo obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo (FAJ), o coeficiente de determinação  $R^2$ , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Fisher (F). Os coeficientes do modelo foram analisados empregando o procedimento GLM e REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student ( $t$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL

Uma matriz monolítica contínua supermacroporosa (com 41 mm de altura) foi produzida pela crio-copolimerização dos monômeros AAm e AGE e o agente reticulante MBAAm (Figura 7), em solução aquosa diretamente em uma coluna de vidro de 5 mm de diâmetro.



**Figura 7** - Reação de copolimerização dos monômeros acrilamida, AGE e MBAAM para a preparação do criogel pAAM (Fonte: MALLIK e HAGE, 2006).

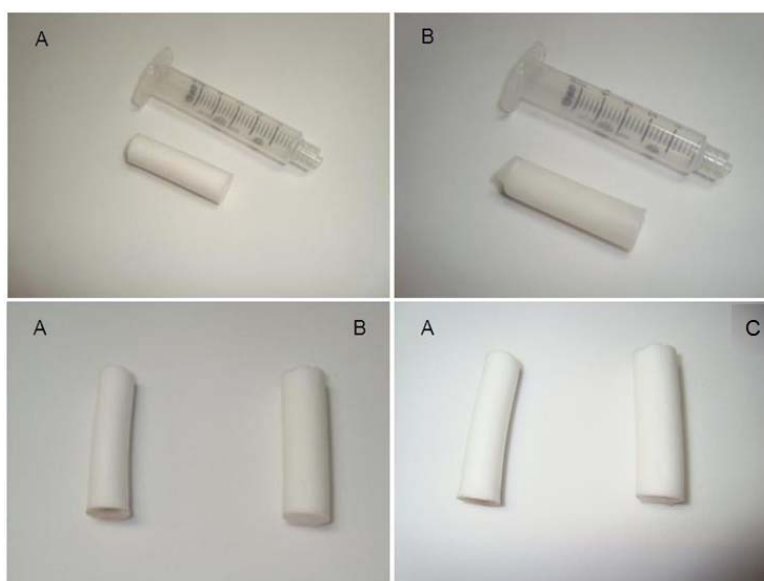
A maior parte do solvente (neste caso, água) congela-se a temperaturas abaixo de zero, fazendo com que as substâncias dissolvidas sejam concentradas em pequenas regiões não congeladas. O processo de polimerização acontece nessas regiões e os cristais de gelo atuam como agentes porogênicos. Após o descongelamento dos cristais de gelo, um sistema de grandes poros interconectados é formado.

O criogel (pAAM-SO<sub>3</sub>) apresentou características elásticas e esponjosas, conforme relatado na literatura para outros tipos de criogéis (PERSSON et al.,

2004, ARVIDSSON et al., 2002). Pode-se remover água dos seus poros apenas pela compressão e o criogel retornou a sua forma e tamanho originais após umedecimento.

Na Figura 8 observam-se os cilindros de criogel produzidos em seringas de 5 mL, que apresentam-se com cor esbranquiçada quando seco e aspecto gelatinoso quando molhado.

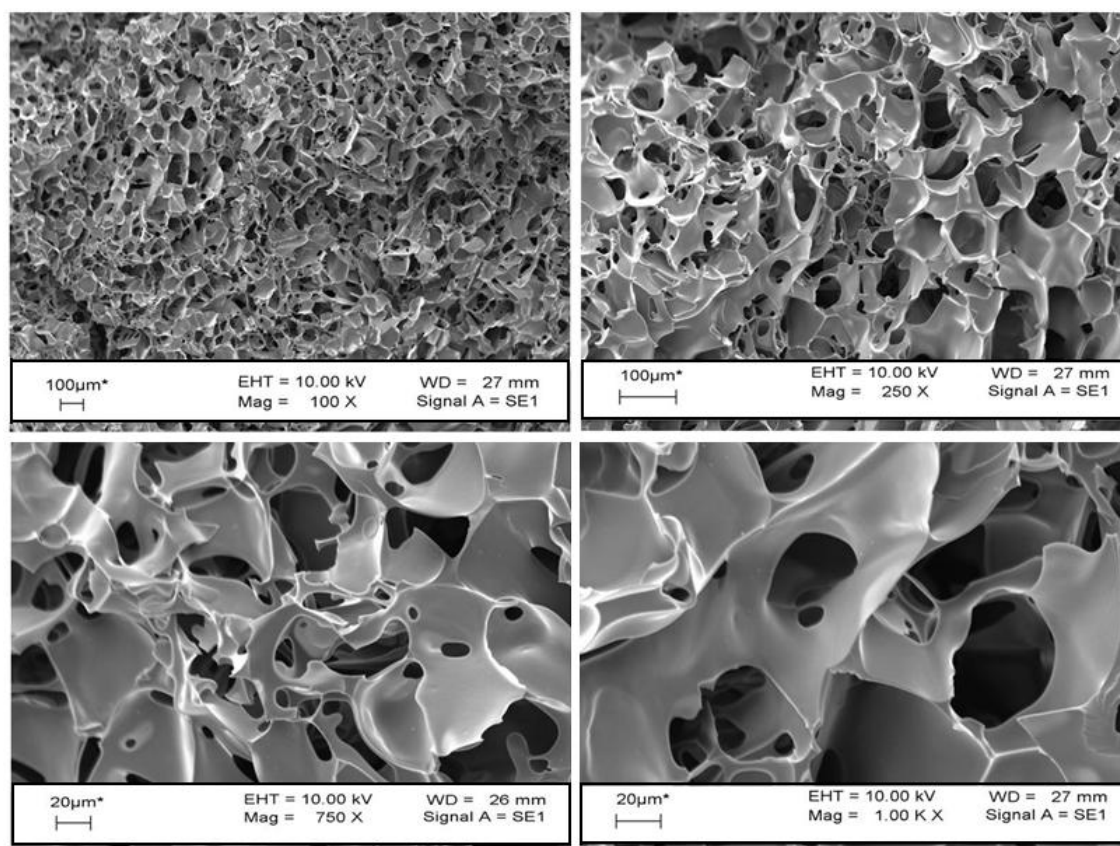
O criogel pode ser seco (Figura 8-A) e reidratado sem perder suas propriedades originais. A capacidade de inchamento obtida ( $C_i=3,48 \pm 0,66$ ) encontra-se próxima ao relatado em outros trabalhos usando colunas de poliacrilamida e  $\text{Cu}^{+2}$ -IDA-Sepharose (ARVIDSSON et al., 2002; ARVIDSSON et al., 2003). Isso indica que 1 g do criogel seco pode absorver 3,48 g de água, que se encontrará ligada a sua estrutura.



**Figura 8** - Criogel pAAM-SO<sub>3</sub> seco (A), úmido (B) e encharcado (C).

A estrutura dos poros pode ser observada nas micrografia obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 9). A matriz monolítica produzida apresentou poros largos e interconectados, de tamanho variando de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e ausência de poros fechados, em concordância com o relatado em outros estudos (ARVIDSSON et al., 2002). Esse tamanho de poros permite a passagem de células microbianas, fragmentos celulares, homogenatos de células ou soluções contendo partículas. Para efeito de comparação, uma

célula de *E. coli* tem em média dimensões de 1 x 3  $\mu\text{m}$  e uma proteína como BSA tem um raio de Stokes igual a 35,5 Å.



**Figura 9** - Imagens da estrutura do criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV).

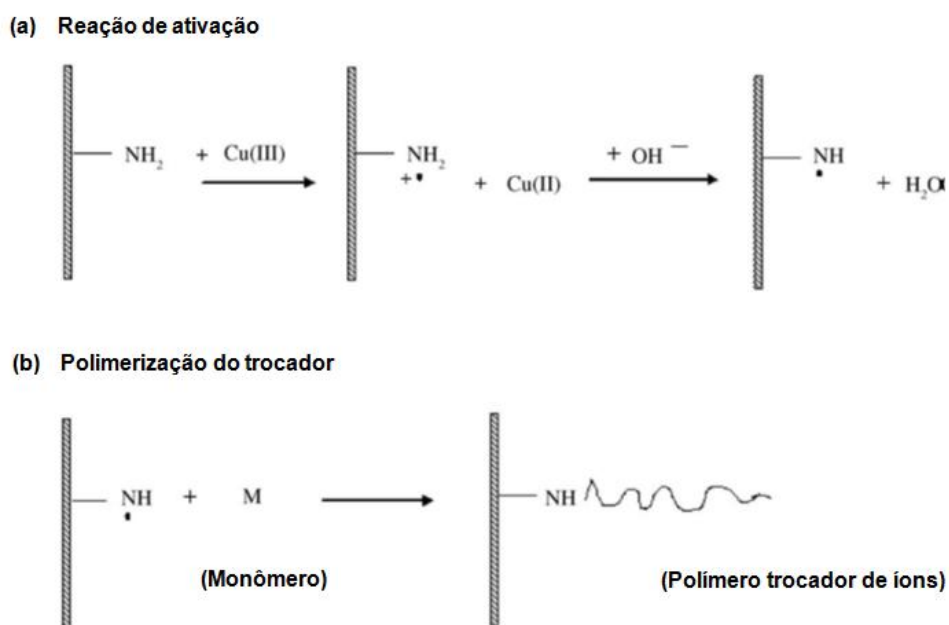
A porosidade do monolito ( $\phi$ ) foi de  $0,790 \pm 0,056$ , o que indica que 79 % da massa de criogel é composta de poros, que foram preenchidos com água livre. Por esses poros passam a maior parte do fluido que escoar pelos canais do criogel.

Este valor encontra-se próximo ao reportado em outras publicações para criogéis, no entanto, é superior ao valor reportado para outros monolitos orgânicos e colunas empacotadas convencionais (LI et al., 2009, GUAN e GUIOCHON, 1996)

O conteúdo total de água foi de  $88,6 \pm 1,7$  %. Considerando que o conteúdo de água livre foi de 79 %, aproximadamente 9,6 % da água total

encontra-se ligada à matriz polimérica ou presa em pequenos poros fechados, nos quais a passagem de líquido é quase inexistente.

Os grupamentos amina ( $\text{NH}_2$ ) presentes na matriz do criogel de acrilamida foram ativados pela reação redox com o cátion  $\text{Cu}^{3+}$  do diperiodatocuprato de potássio ( $\text{K}_5(\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2)$ ). Um elétron do átomo de nitrogênio foi passado para o cátion  $\text{Cu}^{3+}$  formando um radical cátion. Esse radical cátion subsequentemente perde um próton para o meio alcalino, resultando em um radical amidil, que é capaz de iniciar a polimerização de monômeros vinil, conforme pode ser visto na Figura 10.



**Figura 10** - Mecanismo de iniciação da reação de imobilização de monômeros funcionais na superfície de gel de poliacrilamida usando diperiodatocuprato (Fonte: SAVINA et al., 2005a).

A polimerização do trocador catiônico não alterou visivelmente a estrutura dos criogéis, não sendo observadas diferenças na estrutura dos criogéis ativados e não ativados. De fato, Chen et al. (2008), em um estudo sobre a influência da concentração da solução de AMPSA usada para a ativação do criogel, observaram que o uso de concentrações de monômero entre  $0,5$  e  $2 \text{ mol L}^{-1}$  durante a polimerização do trocador não alterou os valores de AEPT e da resistência hidráulica, sendo que para concentrações de AMPSA

de 3 a 4 mol L<sup>-1</sup>, ocorria um aumento dessas propriedades. Isso indica que a imobilização de monômeros funcionais causa mudanças na dispersão no criogel, sendo esse efeito mais pronunciado para maiores concentrações de AMPSA. A razão para isso é que em criogéis ativados com altas concentrações de AMPSA cadeias maiores ou mais longas polimerizadas podem estar localizadas na superfície dos poros. Ainda, alguns poros poderiam ter sido completamente preenchidos durante a polimerização, o que causaria mudanças da rede de microporos por onde o fluxo escoar. No entanto, a capacidade de ligação para criogéis formados com baixas concentrações de AMPSA é menor que para aqueles com maior concentração. A imobilização de monômeros funcionais traz uma vantagem complementar aos criogéis que é o aumento da área superficial. Isto se deve ao fato que a polimerização dos monômeros na superfície do criogel leva à formação de uma estrutura parecida com tentáculos, que se projetam para o espaço intraporoso.

A fim de se determinar a capacidade de troca catiônica da coluna os grupos SO<sub>3</sub> presentes no criogel foram titulados, obtendo 2,24 ± 0,42 (mmol SO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> criogel seco). O número obtido é inferior ao obtido para resinas comerciais, fazendo com que os criogéis tenham menor capacidade. Isso se deve a uma menor área superficial resultante da alta porosidade apresentada pelo adsorvente monolítico.

Na Tabela 8 pode-se visualizar uma comparação entre o número de sítios ativos do criogel obtido nesse trabalho e de outros adsorventes. Pode-se observar que a capacidade iônica dos criogéis obtidos neste trabalho foi menor que a capacidade iônica de adsorvente comerciais, usados para cromatografia de troca iônica em leito fixo, principalmente devido a maior área superficial exibida por essas resinas. No entanto, ao compararmos com outros criogéis, tanto para troca aniônica quanto para catiônica observou-se que a capacidade do criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> encontra-se condizente com outros estudos.

**Tabela 8** - Capacidade iônica para diferentes adsorventes.

Adsorvente	Grupo iônico	Capacidade iônica	Referência
Criogel AAm+AGE+MBAA <sup>2</sup>	AMPESA	2,24 ± 0,42 mmol g <sup>-1</sup> ou 0,22 ± 0,04 mmol mL <sup>-1</sup>	Este trabalho
Criogel AAM+MBAA+DEAEMA <sup>1</sup>	DEAEMA	1,010 ± 0,15 mmol g <sup>-1</sup>	ARVIDSSON et al., 2002
Criogel pAAm+DEAEMA <sup>1</sup>	DMAEMA	0,130 e 0,380 mmol mL <sup>-1</sup>	HANORA et al., 2006
Criogel AAm+MBAA+AAc <sup>2</sup>	Ácido acrílico	4,0 a 9,0 mmol g <sup>-1</sup>	SAVINA et al., 2005b
CM Sephadex <sup>2</sup>	Carboximetil	4–5 mmol g <sup>-1</sup>	GE Healthcare, 2007
SP Sephadex <sup>2</sup>	Sulfopropil	2–2,6 mmol g <sup>-1</sup>	GE Healthcare, 2007
DEAE Sephadex <sup>1</sup>	Dietilaminoetil	3-4 mmol g <sup>-1</sup>	GE Healthcare, 2007
QAE Sephadex <sup>1</sup>	Amina Quartenária	2,6–3,4 mmol g <sup>-1</sup>	GE Healthcare, 2007

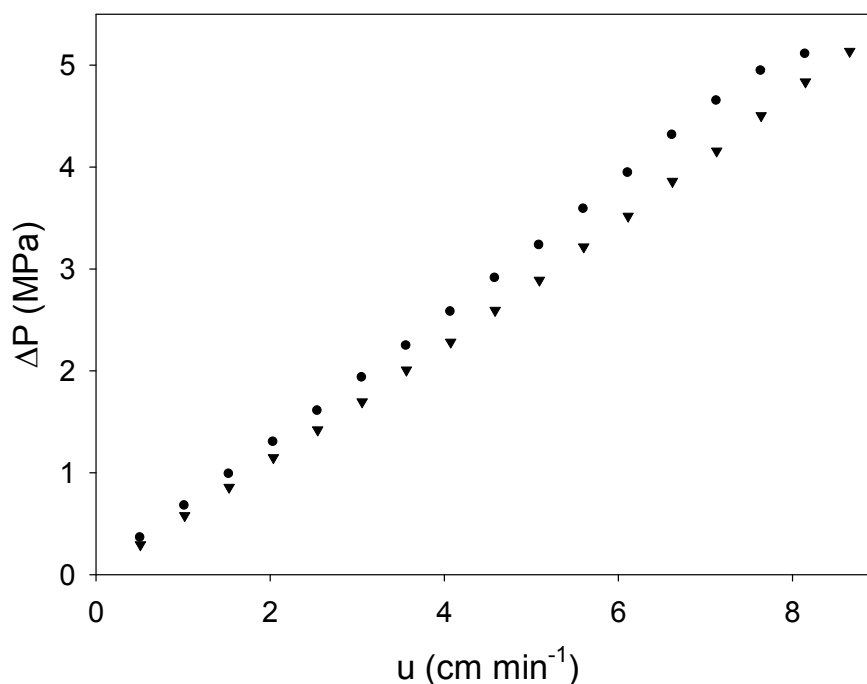
<sup>1</sup>Troca aniônica, <sup>2</sup> Troca catiônica.

## 5.2 MEDIDAS DAS PROPRIEDADES DO LEITO

### 5.2.1 RESISTÊNCIA AO FLUXO

A permeabilidade ( $K_a$ ) de um meio poroso é uma medida de sua capacidade de se deixar atravessar por fluidos. Assim, quanto maior for o valor de  $K_a$  exibido pelo material, menor será a resistência ao fluxo.

Nota-se uma relação linear entre a queda de pressão e o fluxo para quedas de pressão no intervalo de 0 a 5 MPa (Figura 11) tanto para o criogel não ativado quanto para o criogel ativado. Isso indica que não ocorreram deformações na estrutura do criogel com o aumento da vazão.



**Figura 11** - Queda de pressão em relação à velocidade superficial de criogel (▼) pAAM-SO<sub>3</sub> e (●) pAAM.

A permeabilidade hidráulica para os criogéis ativado e não ativado foi calculada pela Lei de Darcy (Tabela 9), e permitiu avaliar o efeito da polimerização na resistência hidráulica da matriz monolítica.

**Tabela 9** - Permeabilidade hidráulica ( $K_a$ ) obtida para o criogel ativado e não ativado.

Coluna	$K_a$ ( $10^{12}$ m <sup>2</sup> )
pAAM	2,02 ± 0,03
pAAM-SO <sub>3</sub>	8,20 ± 0,01

Os resultados obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza da permeabilidade obtida trabalhos como, por exemplo, Yao et al., (2006b), ( $1,18 \cdot 10^{-14}$  m<sup>2</sup>), para criogel com nanopartículas embebidas e He et al., (2007) para criogéis pAAM-MBAAM-AGE ( $2,7 \cdot 10^{-13}$  e  $3,3 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup>).

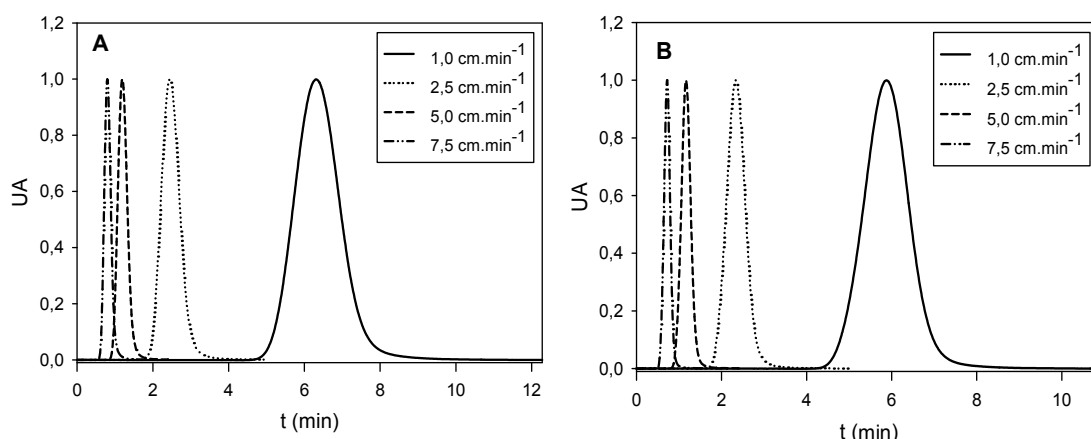
A baixa resistência ao fluxo observada para os criogéis se deve à presença de grandes poros interconectados. Essa característica suporta o uso

de colunas monolíticas macroporosas em cromatografia, permitindo alcançar altas vazões sem o emprego de valores elevados de pressão.

### 5.2.2 DISPERSÃO AXIAL

As curvas de distribuição de tempo de residência (DTR) foram medidas em velocidades superficiais de 0,5 a 9  $\text{cm min}^{-1}$ . As curvas de DTR foram bastante próximas para cada repetição.

Conforme pode ser observado na Figura 12 houve um alargamento do pico com a diminuição da velocidade superficial, que pode ser explicado por um aumento da dispersão axial com a diminuição da velocidade.



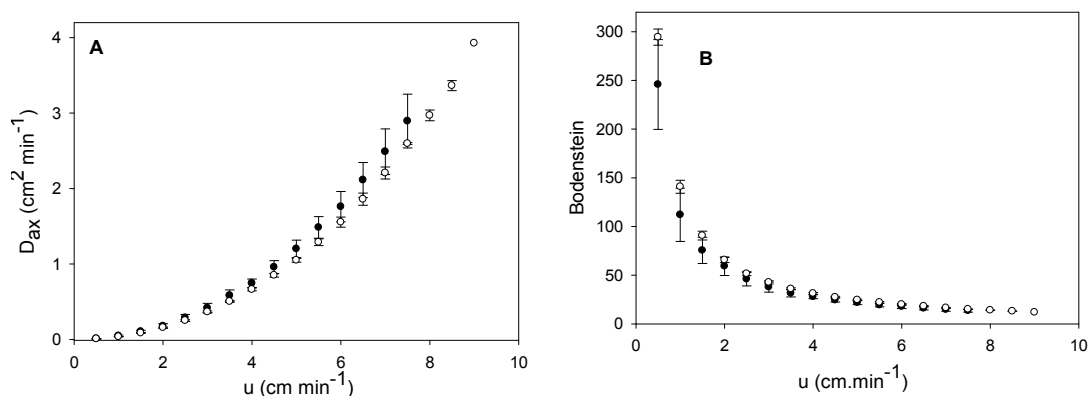
**Figura 12** - Curva de distribuição do tempo de residência em diferentes velocidades para o criogel não ativado (A) e criogel ativado (B).

A transferência de massa dentro de uma coluna pode ser de natureza difusiva e convectiva. A força motriz para o transporte de massa por difusão é a diferença de uma concentração. Geralmente, o fluxo de massa total de espécies é a soma dos fluxos difusivos e convectivos. As colunas monolíticas têm uma estrutura tal que a maior parte da transferência de massa ocorre por convecção, onde o fluxo é usado para aumentar a transferência de massa das moléculas pelos poros (HUANG et al., 2010).

Os coeficientes de dispersão axial foram calculados segundo a equação 4) e encontram-se na Figura 13-A. A dispersão axial encontrada foi menor que

a dispersão usualmente encontrada para leitos expandidos ou fluidizados sob condições similares de escoamento (YAO et al., 2006b).

O número de Bodenstein (Bo) é um número adimensional que expressa a razão entre o transporte convectivo e transporte dispersivo (BRUCE e CHASE, 2001). Seus valores encontram-se na Figura 13-B. O número de Bodenstein diminui com o aumento da velocidade, indicando um aumento do transporte dispersivo que coincide com o aumento no coeficiente de dispersão.



**Figura 13** - Coeficiente de dispersão axial (A) e número de Bodenstein (B) em diferentes velocidades superficiais para (○) pAAM-SO<sub>3</sub>, (●) pAAM.

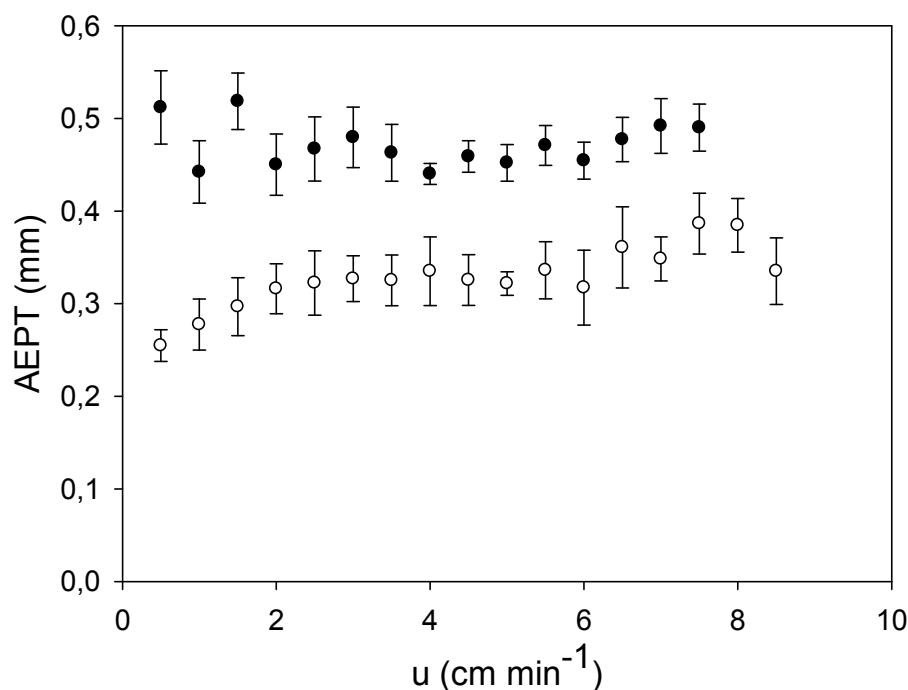
Observou-se que o coeficiente de dispersão axial aumentou com o aumento da velocidade superficial de maneira exponencial. A relação pode ser expressa pelas equações 12 e 13, para o criogel ativado e não ativado, respectivamente.

$$D_{ax} = 0,1744 \times e^{0,3513.u} \quad (12)$$

$$D_{ax} = 0,1416 \times e^{0,4094.u} \quad (13)$$

Quanto maior o coeficiente de  $u$  maior o incremento em  $D_{ax}$  com o aumento na velocidade. Pela comparação dos coeficientes observa-se que a dispersão diminui após a polimerização do criogel com AMPSA devido a mudanças nos espaços dos canais porosos dentro do criogel.

A altura equivalente de pratos teóricos (Figura 14) é função de ambas as propriedades da coluna e do soluto variando de uma coluna para outra e, mais importante, entre diferentes solutos eluídos de uma mesma coluna em um mesmo cromatograma.



**Figura 14** - Distribuição de AEPT para diferentes velocidades superficiais (○) criogel-pAAM-SO<sub>3</sub>, (●) criogel-pAAM.

O criogel ativado apresentou valores menores de AEPT que o criogel não-ativado, indicando uma menor dispersão, conforme observado para o coeficiente de dispersão.

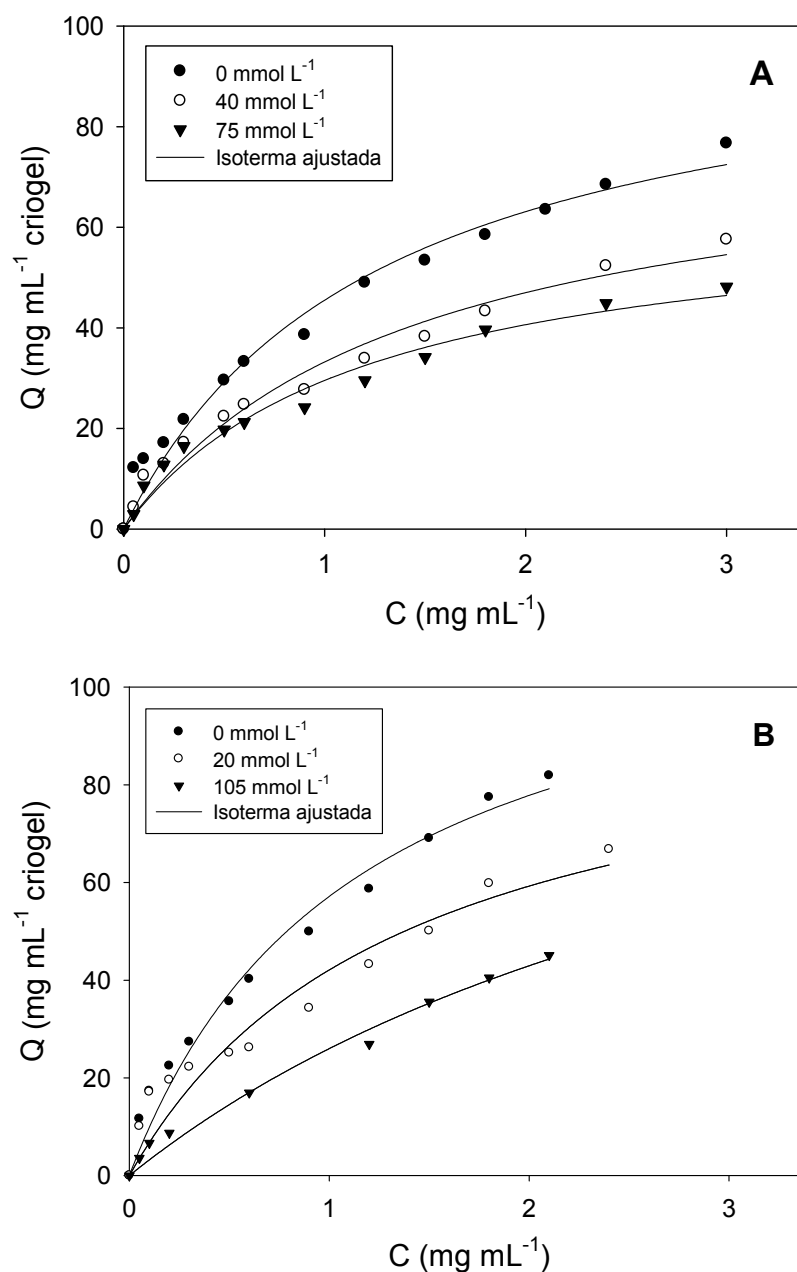
Os valores encontrados para a altura de pratos teóricos para o criogel ativado variaram de 0,2548 a 0,3865 mm e para o criogel não ativado de 0,4401 a 0,5185mm. Esses valores são menores que os obtidos por Yao et al., (2006b) para criogéis com partículas imobilizadas que variaram de 0,56 a 0,75 mm, Plieva et al., (2004a; 2004b) (0,50 a 0,96 mm) para criogéis e Wang et al. (2008a; 2008b) (0,7 a 1,0 mm) para criogéis Ni<sup>2+</sup>-IDA.

PLIEVA et al., 2004b observou que os valores de AEPT para uma coluna monolítica produzida a -12 °C são independentes do tamanho do soluto, para acetona (58 Da), BSA (69 kDa), azul de dextrana (2000 kDa) e *E. coli* (1x3 µm)

e em ampla gama de fluxo de 0,2 -10 ml min<sup>-1</sup>. Deve-se ressaltar que mesmo materiais relativamente grandes como células de *E. coli* podem ser transportados pelos poros largos do criogel com a mesma eficiência de substâncias solúveis.

### **5.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO**

O método de análise frontal foi usado para determinação das condições de equilíbrio para a adsorção da lactoferrina no criogel-pAAm-SO<sub>3</sub>. A adsorção da lactoferrina no criogel seguiu o modelo de Langmuir (Figura 15).



**Figura 15** - Isothermas de adsorção da lactoferrina obtidas em diferentes valores de concentração de NaCl, pH 6,0 (A) e pH 7,0 (B).

O modelo de Langmuir foi ajustado por regressão não-linear dos dados de equilíbrio e o ajuste foi satisfatório para todos os casos, apresentando  $R^2$  mínimo de 97,6 %. Os parâmetros ajustados ( $q_m$  e  $K_d$ ) determinados pelo modelo de Lagmuir estão presentes na Tabela 10.

**Tabela 10** - Valores dos parâmetros  $q_m$  e  $K_d$  obtidos pelo ajuste da isoterma de Langmuir aos dados experimentais.

pH	[NaCl] (mmol L <sup>-1</sup> )	$q_m$	$K_d$
6	0	129,7 ± 3,9	1,64 ± 0,67
6	40	80,3 ± 2,7	1,42 ± 0,52
6	75	65,0 ± 5,4	1,20 ± 0,47
7	0	137,3 ± 3,1	2,17 ± 0,48
7	20	126,7 ± 4,5	1,47 ± 0,70
7	105	111,0 ± 5,0	3,20 ± 1,03

Para os dois valores de pH observou-se uma diminuição na capacidade adsorptiva do criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> com o aumento da força iônica. Quanto à concentração de sal em solução, na cromatografia de troca iônica quanto maior a concentração de sal, menor a capacidade adsorptiva da resina (HUANG e HORVÁTH, 1987; FANG et al., 1996) indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica é a atração eletrostática (LIN et al., 2001).

Observou-se também que a capacidade máxima de adsorção para a lactoferrina foi maior para o pH 7,0. A influência do pH no processo de troca iônica de proteínas está associada ao ponto isoelétrico (pI) da proteína e, conseqüentemente, à sua carga líquida em diferentes valores de pH. Quanto mais distante do pI, maior é a carga líquida da proteína e maior poderá ser a interação entre ela e o adsorvente. No entanto, a diminuição do pH pode levar a alterações conformacionais que aumentam a hidrofobicidade da proteína, reduzindo sua interação com o trocador iônico.

#### 5.4 CAPTURA CROMATOGRÁFICA DA LACTOFERRINA

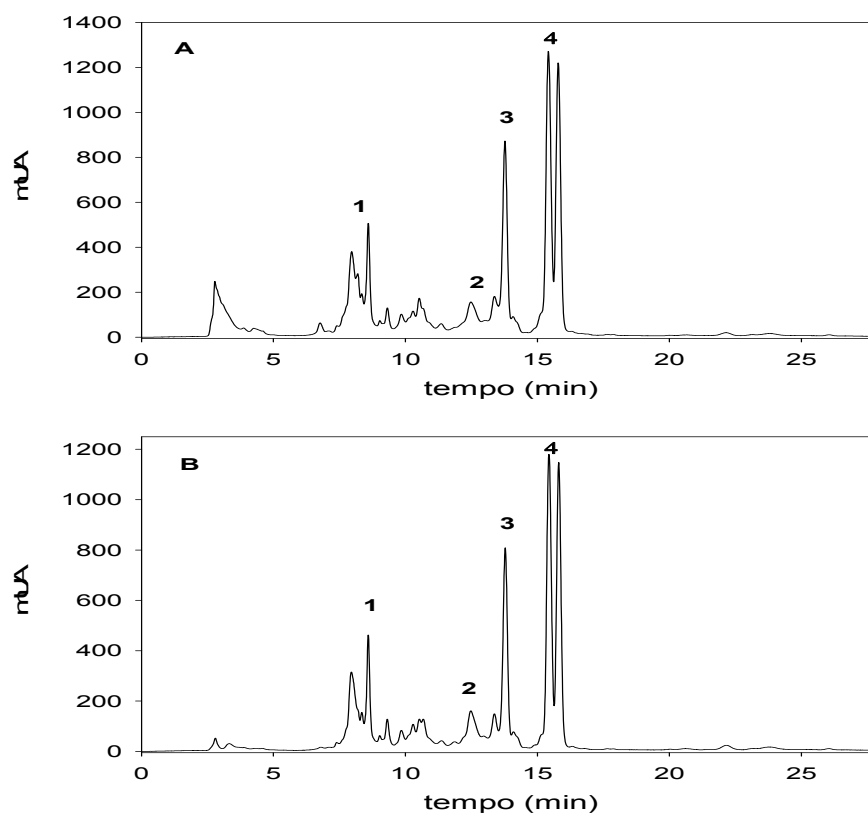
O resultado das análises relativas à caracterização da composição química do soro e do concentrado obtido por ultrafiltração estão apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11** - Caracterização do soro obtido da fabricação de queijo Minas Frescal e do soro concentrado por ultrafiltração.

	Soro	Concentrado
Lactose (g L <sup>-1</sup> )	52,4	2,9
Proteínas totais (g L <sup>-1</sup> )	2,15	12,11
Lactoferrina (g L <sup>-1</sup> )	0,32	2,05
pH	5,9	6,1
Viscosidade (Pa s <sup>-1</sup> )	1,442	1,834

Por esses resultados pode-se dizer que a lactose foi reduzida a 95 % de sua concentração inicial durante a filtração e que houve uma concentração de proteínas de 5,6 vezes. A concentração volumétrica foi de 10 vezes, uma vez que o volume inicial foi 15 L obtendo ao final 1,5 L de soro concentrado.

A concentração de lactoferrina nas amostras de soro foi calculada de acordo com uma curva analítica, com coeficiente de determinação R<sup>2</sup> de 0,998. Os cromatogramas obtidos para o soro e para o concentrado são exibidos na Figura 16.



**Figura 16** - Perfil cromatográfico do (A) soro e (B) soro concentrado (diluído 4x). Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L<sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min<sup>-1</sup>. Detecção a 210 nm.

Estudos de adsorção para captura da LF foram conduzidos a 25 °C, variando o pH, a razão de diluição e a vazão. Após adsorção e lavagem da coluna foi feita a eluição da lactoferrina e alíquotas referentes a cada uma das frações (alimentação, lavagem e eluição) foram coletadas.

A quantificação de lactoferrina presente nas amostras foi feita por CLAE e os dados podem ser visualizados na Tabela 12. Esses dados permitiram avaliar o efeito das variáveis independentes (pH, RD e vazão) sobre a recuperação de lactoferrina.

**Tabela 12** - Resultados experimentais obtidos para a recuperação de lactoferrina na eluição em uma coluna do tipo criogel-pAAM-SO<sub>3</sub>.

pH	RD	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Massa de LF (mg)			Recuperação (%)
			Alimentação	Lavagem	Eluído	
6	0,33	1,0	1,15	1,75	0,06	4,95
6	0,33	4,0	1,18	2,45	0,06	4,68
6	1,00	1,0	3,37	3,27	0,23	6,82
6	1,00	4,0	4,75	3,46	0,09	1,85
8	0,33	1,0	1,35	2,30	0,11	8,11
8	0,33	4,0	1,42	2,21	0,11	7,44
8	1,00	1,0	4,31	3,32	0,07	1,72
8	1,00	4,0	4,56	3,34	0,15	3,25
6	0,67	2,5	2,48	2,40	0,06	2,31
8	0,67	2,5	1,96	2,49	0,13	6,78
7	0,33	2,5	1,35	2,55	0,13	9,40
7	1,00	2,5	4,63	3,54	0,16	3,49
7	0,67	1,0	2,60	2,69	0,15	5,77
7	0,67	4,0	2,56	2,95	0,24	9,57
7	0,67	2,5	2,61	2,73	0,17	6,36
7	0,67	2,5	2,03	2,55	0,06	2,76
7	0,67	2,5	1,82	2,46	0,05	2,88
7	0,67	2,5	1,97	2,46	0,09	4,72

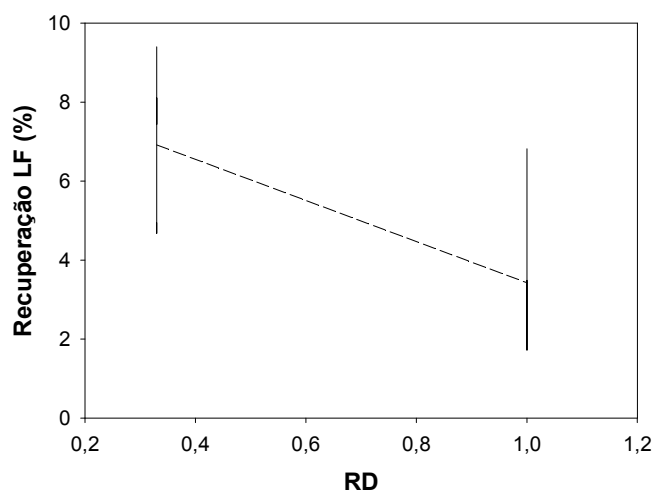
Os dados foram submetidos à análise de variância a fim de se verificar a influência dos fatores estudados sobre a recuperação de lactoferrina. Os resultados da ANOVA referentes à recuperação de lactoferrina estão presentes na Tabela 13.

**Tabela 13** - Resumo da ANOVA para a recuperação da lactoferrina em criogel-pAAM-SO<sub>3</sub>, usando um delineamento de face centrada ( $R^2 = 62,2\%$  e  $CV = 44,1$ ).

FV	GL	QM	Pr > F
pH	1	4,48	0,395
RD	1	30,49	0,048
Vazão	1	0,03	0,939
pH*pH	1	6,26	0,319
RD*RD	1	0,58	0,753
Vazão*Vazão	1	4,11	0,414
pH*RD	1	11,58	0,188
pH*Vazão	1	4,64	0,387
RD*Vazão	1	0,78	0,716
Modelo	9	6,99	0,380
(FAJ)	5	6,43	0,350
(Erro puro)	2	3,03	
Erro Total	7	5,46	
Total	16		

Nota-se que apenas o efeito razão de diluição afetou a recuperação ( $p < 0,05$ ), calculada em termos de concentração de lactoferrina.

Por meio de um teste t para o fator significativo verificou-se que o incremento na razão de diluição exerceu um efeito negativo sobre a recuperação de lactoferrina. Foi possível avaliar graficamente essa influência em um intervalo de confiança de 95 % (Figura 17).



**Figura 17** - Comportamento da recuperação de lactoferrina em função dos diferentes níveis de razão de diluição.

A razão de diluição influenciou negativamente a recuperação de lactoferrina (Figura 17). A baixa concentração de lactoferrina no soro não parece ter sido a limitação para a separação e sim a alta concentração de outras proteínas em relação a lactoferrina. Dessa forma, espera-se que para sistemas menos concentrados, inclusive com o uso do soro obtido sem a etapa de ultrafiltração, ocorra um aumento na recuperação da lactoferrina do soro. A lactoferrina é uma proteína de alto valor agregado e uma alta recuperação é desejável de modo que não ocorram perdas durante a etapa de lavagem.

O efeito da razão de diluição sobre a recuperação da lactoferrina se deve provavelmente a impedimento estérico devido às altas concentrações de outras proteínas presentes no soro. Com o aumento da razão de diluição a alimentação fica mais concentrada, e a presença das outras proteínas em grande quantidade gera uma competição pelos sítios no criogel, mesmo que essas proteínas estejam negativamente carregadas e não adsorvam.

O tamanho dos poros e a alta permeabilidade indicam a possibilidade do uso de soluções mais concentradas e com maior viscosidade. No entanto, devido à baixa concentração de LF e alta concentração de outras proteínas presentes no soro, a cromatografia de troca iônica apresentou baixa capacidade de adsorção para a lactoferrina do soro concentrado. No entanto, não foi observado aumento na queda de pressão do sistema ocasionado por acúmulo de material na coluna, indicando que esse sistema cromatográfico

pode ser adequado à separação de moléculas presentes em suspensões mais concentradas e viscosas, desde que a molécula alvo tenha alta concentração.

A separação de outras proteínas do soro como a  $\beta$ -lactoglobulina, a  $\alpha$ -lactalbumina e o glicomacropéptido que estão presentes em maior concentração no soro apresenta-se como uma alternativa, devendo preceder a separação da lactoferrina.

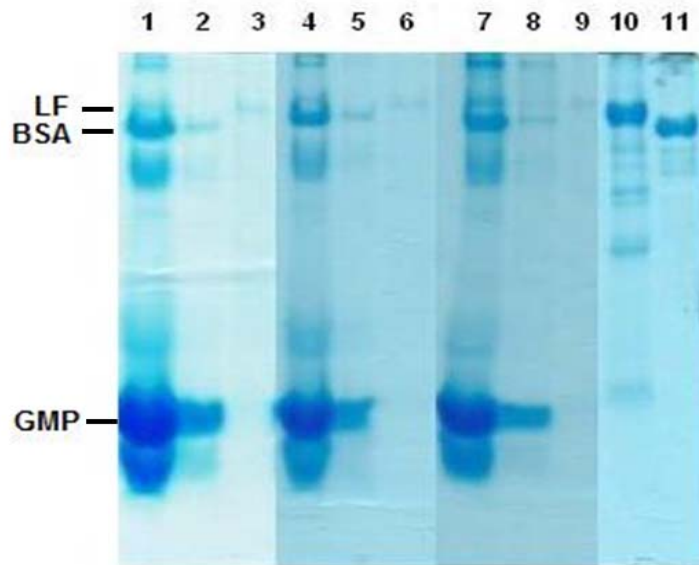
Ao contrário do que se esperava a variação do pH não afetou a recuperação da lactoferrina do soro. Com o distanciamento do pI a carga líquida das proteínas se altera. Para a lactoferrina (pI de 8,2 a 9,0) a diminuição do pH aumenta a densidade de cargas positivas e favorece a adsorção na coluna de troca catiônica. Esse efeito não foi significativo no intervalo estudado (pH de 6,0 a 8,0). Esse intervalo foi definido de forma a não se aproximar do pI da  $\beta$ -lactoglobulina (pI = 5,2) nem ultrapassar o pI da própria lactoferrina. Contudo, o aumento da densidade de cargas positivas na lactoferrina parece não ter sido suficiente para aumentar a adsorção, talvez por ter sido sobreposto pelo efeito da alta concentração de proteínas no soro, que mesmo não estando positivamente carregadas, competem por espaços dentro da coluna, impedindo a lactoferrina de se ligar aos sítios de adsorção.

Na Tabela 14 encontram-se os dados para o fator de purificação de lactoferrina.

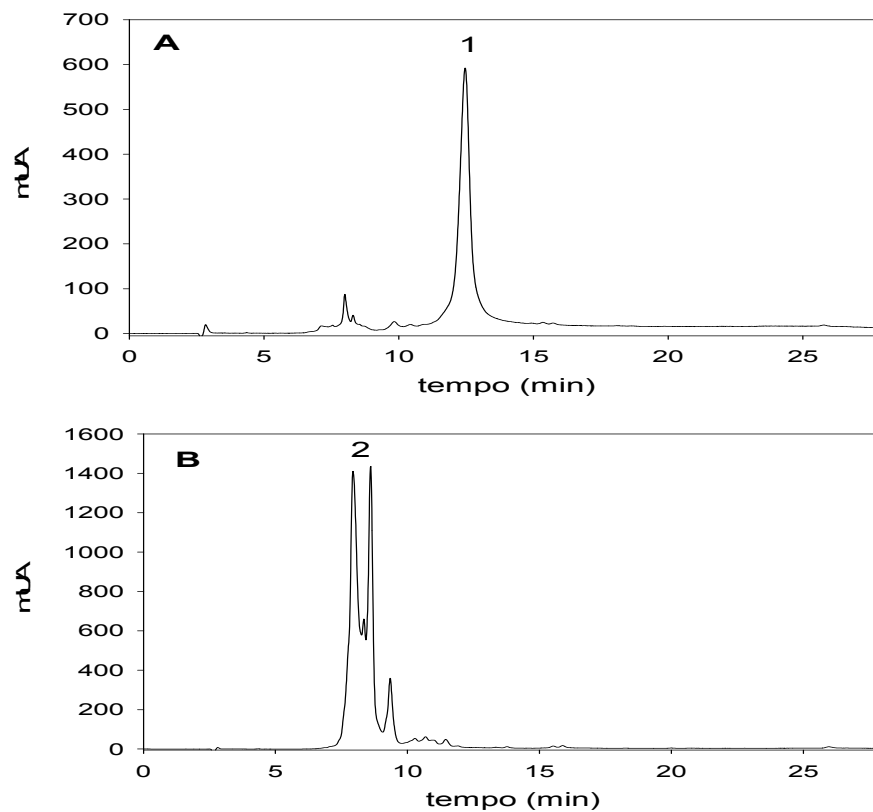
**Tabela 14** - Resultados experimentais obtidos para a pureza da lactoferrina na alimentação e na eluição em uma coluna do tipo criogel-pAAM-SO<sub>3</sub>.

EXP	pH	RD	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Concentração (% m/m PTN)		Fator de purificação
				Alimentação	Eluído	
1	6	0,33	1,0	1,84	11,6	6,3
2	6	0,33	4,0	1,95	7,2	3,7
3	6	1,00	1,0	1,92	28,1	14,6
4	6	1,00	4,0	1,94	11,1	5,7
5	8	0,33	1,0	2,37	34,3	14,5
6	8	0,33	4,0	2,38	37,7	15,8
7	8	1,00	1,0	2,26	22,3	9,9
8	8	1,00	4,0	2,13	36,2	17,0
9	6	0,67	2,5	2,68	7,7	2,9
10	8	0,67	2,5	1,87	45,6	24,4
11	7	0,33	2,5	2,13	29,1	13,7
12	7	1,00	2,5	2,65	31,9	12,0
13	7	0,67	1,0	2,64	32,1	12,2
14	7	0,67	4,0	2,62	41,5	15,8
15	7	0,67	2,5	2,64	33,2	12,6
16	7	0,67	2,5	1,98	18,7	9,4
17	7	0,67	2,5	2,04	5,0	2,5
18	7	0,67	2,5	1,93	20,1	10,4

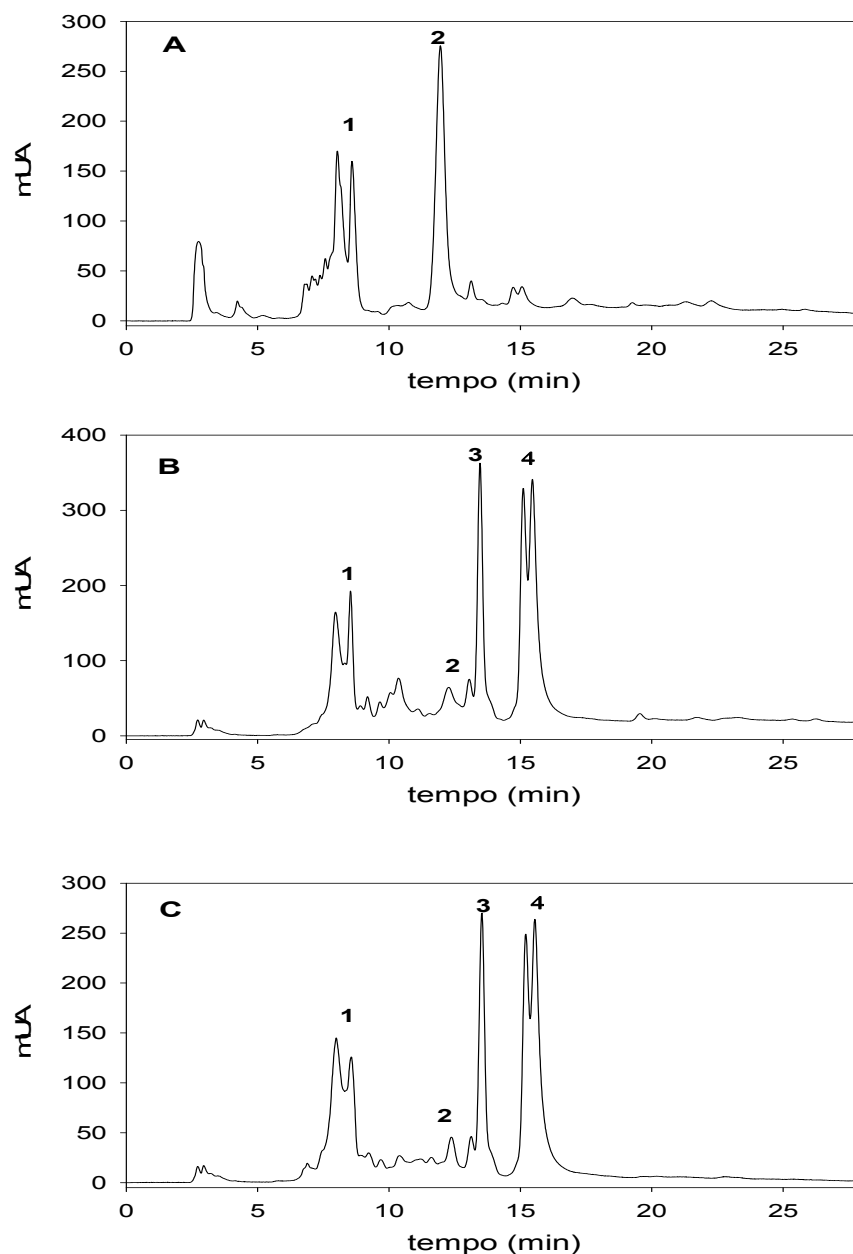
A pureza média de lactoferrina na alimentação foi de 2,22 % (m/m) e no eluído 25 % (m/m), indicando que a adsorção gerou um aumento na pureza da lactoferrina no eluído em relação à proporção originalmente encontrada no soro (Figura 18). A pureza no eluído só não foi maior devido à presença de GMP, que pode ser evidenciada na Figura 20.



**Figura 18** - Gel de eletroforese para a alimentação, lavagem e eluído obtidos em pH's 6(1-3); 7(4-6) e 8 (7-9); e padrões de LF (10) e BSA (11).



**Figura 19** - Perfil cromatográfico de (A) Padrão da lactoferrina 0,75 mg mL<sup>-1</sup>; (B) Padrão de GMP 2mg mL<sup>-1</sup>. Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L<sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min<sup>-1</sup>. Detecção a 210 nm.



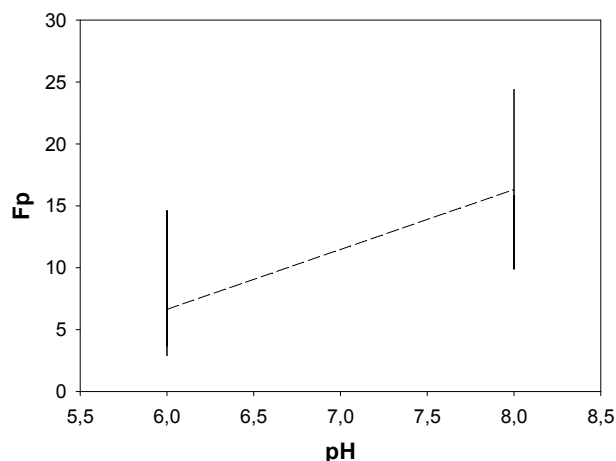
**Figura 20** - Perfil cromatográfico do (A) Alimentação; (B) Lavagem e (C) Eluído. Fase móvel: Cloreto de sódio 0,15 mol L<sup>-1</sup> pH 2,5 e Acetonitrila 100 %. Identificação dos picos: 1. GMP, 2. LF, 3. α-LA, 4. β-LG. Coluna C18 (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). Vazão: 1mL.min<sup>-1</sup>. Detecção a 210 nm.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância a fim de se verificar a influência dos fatores estudados sobre o fator de purificação. Os resultados da ANOVA referentes ao fator de purificação estão presentes na Tabela 15.

**Tabela 15** - Resumo da ANOVA para o fator de purificação em coluna criogel-pAAM-SO<sub>3</sub>, usando um delineamento central composto ortogonal ( $R^2 = 68,7 \%$  e  $CV = 38,5$ ).

FV	GL	QM	Pr > F
pH	1	233,61	0,012
RD	1	2,79	0,723
Vazão	1	0,04	0,965
pH*pH	1	2,81	0,723
pH*RD	1	3,40	0,696
pH*Vazão	1	0,01	0,981
RD*RD	1	23,84	0,318
RD*Vazão	1	50,11	0,163
Vazão*Vazão	1	0,04	0,967
Modelo	9	35,18	0,247
(FAJ)	5	27,88	0,086
(Erro puro)	2	2,57	
Erro Total	7	20,65	
Total	16		

Nota-se que apenas o efeito do pH afetou o aumento da proporção em área da lactoferrina ( $p < 0,05$ ). Pelo teste t para o fator significativo verificou-se que o incremento no pH exerceu um efeito positivo sobre o fator de purificação. Foi possível avaliar graficamente o modo como esse fator significativo influenciou a variável resposta, nesse caso, o fator de purificação, em um intervalo de confiança de 95 % (Figura 17).



**Figura 21** - Comportamento do fator de purificação em função dos diferentes níveis de pH.

Houve influência positiva do pH sobre o fator de purificação (Figura 21). Uma vez que o pH não afetou a recuperação de lactoferrina, uma possível explicação para o efeito do pH sobre o fator de purificação é que com o aumento do pH, uma menor quantidade de GMP foi adsorvida a coluna, aumentando a pureza da LF.

A superfície do criogel-pAAM contém grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) que são ativados para a ligação do AMPSA. Uma vez que nem todos esses grupamentos serão utilizados a superfície ainda terá alguns grupos  $\text{NH}_2$  remanescentes, que estão carregados positivamente nesse pH. As proteínas com  $\text{pI}$  menor de 6,0 estarão carregadas negativamente nos pH's estudados. Devido a seu tamanho (dez vezes menor que a lactoferrina) o GMP tem maior acesso aos sítios com grupamento amina.

A vazão não foi significativa para nenhum dos parâmetros avaliados. Isso pode ser explicado pela presença de inúmeros supermacroporos interligados, com diâmetro superior a muitos micrômetros dentro do leito criogel. Dessa forma a convecção, ao invés da transferência de massa difusiva, predomina para o transporte das moléculas de proteína a partir do fluxo principal para os sítios de ligação na superfície dos poros. Esse resultado é consistente com os resultados obtidos para a AEPT, a qual não apresentou diferenças no tamanho com o aumento da velocidade.

Isso indica que a vazão da alimentação tem um fraco efeito sobre a capacidade de ligação do criogel. Assim sendo, esse criogel poderia ser operado a vazões elevadas com uma perda limitada de capacidade de ligação.

## CONCLUSÃO

A coluna monolítica supermacroporosa de poliacilamida preparada pela crio-copolimerização radical de acrilamida, éter alil glicidil e bis-acrilamida apresentou alta porosidade, alta permeabilidade e baixo coeficiente de dispersão axial em uma ampla faixa de velocidades. ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico foi usado para obtenção de um criogel com grupos sulfônicos, a ser utilizado para troca catiônica. O número de sítios ativos e as isotermas de adsorção para a lactoferrina demonstram que esse criogel pode ser usado para separações cromatográficas baseadas em troca catiônica.

Pelos experimentos de adsorção foi possível observar que o comportamento no processo de adsorção de lactoferrina no criogel-pAAM-SO<sub>3</sub> é influenciado pela concentração de NaCl, ocorrendo um efeito de redução da capacidade de adsorção com o aumento da concentração salina, para os valores de pH avaliados.

A separação da lactoferrina do soro de leite concentrado não apresentou alta recuperação devido à presença de outras proteínas em maior quantidade que competem pelos sítios de ligação do criogel, mesmo sem adsorver. O fator de purificação foi influenciado positivamente pelo aumento do pH, devido a adsorção de GMP.

As melhores condições para a separação de lactoferrina do soro foram obtidas em pH 8,0 e razão de diluição de 0,33, que corresponde a uma diluição de uma parte de soro concentrado para duas partes de tampão fosfato.

Sugerem-se estudos futuros com a separação a priori das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e GMP, presentes em maior concentração a fim de se obter uma maior recuperação da lactoferrina.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Editora UFV, Viçosa. 627p, 2006.

ARRUA, R. D. et al. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 2429-2466, 2009. ISSN 1996-1944.

ARVIDSSON, P. et al. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003. ISSN 0021-9673.

ARVIDSSON, P. et al. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 27-38, 2002. ISSN 0021-9673.

BEN OUNIS, W. et al. Separation of minor protein components from whey protein isolates by heparin affinity chromatography. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 10-11, p. 1043-1050, 2008. ISSN 0958-6946.

BLÄCKBERG, L.e HERNELL, O. Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. **FEBS Letters**, v. 109, n. 2, p. 180-184, 1980. ISSN 0014-5793.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BROCK, J. H. The physiology of lactoferrin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, p. 1-6, 2002.

BRUCE, L. J.e CHASE, H. A. Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 10, p. 3149-3162, 2001. ISSN 0009-2509.

BUCHMEISER, M. R. Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications. **Polymer**, v. 48, n. 8, p. 2187-2198, 2007. ISSN 0032-3861.

BULLERMAN, L. B.e BERRY, E. C. Use of cheese whey for vitamin B12 production. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 353-355, 1966.

CAREY, K. et al. Application of whey proteins to enhance the molecular adaptations and strength gains following resistance exercise training. Proceedings of the fourth international whey conference, 2006. Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA. p.36-46.

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

CHEN, F. et al. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008. ISSN 0009-2509.

CHEN, L. et al. Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation. **Separation and Purification Technology**, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2007. ISSN 1383-5866.

CORNISH, J. et al. Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4366-4374, September 1, 2004 2004.

DERAZ, S. et al. Capture of bacteriocins directly from non-clarified fermentation broth using macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 786-793, 2007. ISSN 0141-0229.

FANG, F. et al. Influence of temperature on the retention behaviour of proteins in cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 729, n. 1-2, p. 49-66, 1996. ISSN 0021-9673.

FARNAUD, S.e EVANS, R. W. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395-405, 2003. ISSN 0161-5890.

FARNFIELD, A. et al. Whey protein supplementation and resistance training to enhance muscle growth in young and older adults. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 14:S69, 2005.

FERREIRA, R. C. **Separação de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leite fixo**. 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2001.

GALAEV, I. Y. et al. Effect of Matrix Elasticity on Affinity Binding and Release of Bioparticles. Elution of Bound Cells by Temperature-Induced Shrinkage of the Smart Macroporous Hydrogel†. **Langmuir**, v. 23, n. 1, p. 35-40, 2007/01/01 2006. ISSN 0743-7463.

GALLANT, S. R. Modeling ion-exchange adsorption of proteins in a spherical particle. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 2, p. 189-195, 2004. ISSN 0021-9673.

GE HEALTHCARE. Ion Exchange. Instructions 71-7104-00 AD. 2007. Disponível em: <  
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FEFD70E55FCAA964C1257628001D2717/\\$file/71710400AD.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FEFD70E55FCAA964C1257628001D2717/$file/71710400AD.pdf)>. Acesso em: Fev/2011.

GILL, H. S.e CROSS, M. L. Anticancer properties of bovine milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. SupplementS1, p. 161-166, 2000. ISSN 0007-1145.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A. et al. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009. ISSN 0924-8579.

GROSOVÁ, Z. et al. Entrapment of  $\beta$ -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 4, p. 763-767, 2008. ISSN 0141-5492.

GUAN, H.e GUIOCHON, G. Study of physico-chemical properties of some packing materials: I. Measurements of the external porosity of packed columns by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 731, n. 1-2, p. 27-40, 1996. ISSN 0021-9673.

- GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, n. 1-2, p. 129-161, 2002. ISSN 0021-9673.
- GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007. ISSN 0021-9673.
- HAHN, R. et al. Affinity Monoliths Generated by In Situ Polymerization of the Ligand. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5126-5132, 2001. ISSN 0003-2700.
- HAHN, R. et al. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 795, n. 2, p. 277-287, 1998. ISSN 0021-9673.
- HANORA, A. et al. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 4, p. 421-433, 2005. ISSN 0168-1656.
- HANORA, A. et al. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 3, p. 343-355, 2006. ISSN 0168-1656.
- HE, X. et al. Freezing characteristics of acrylamide-based aqueous solution used for the preparation of supermacroporous cryogels via cryo-copolymerization. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 5, p. 1334-1342, 2007. ISSN 0009-2509.
- HJERTÉN, S. et al. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. **Journal of Chromatography A**, v. 473, p. 273-275, 1989. ISSN 0021-9673.
- HUANG, J.-X.e HORVÁTH, C. Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents. : II. Proteins on cation exchangers with silica support. **Journal of Chromatography A**, v. 406, n. 0, p. 285-294, 1987. ISSN 0021-9673.
- HUANG, J.-X. et al. Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. **Journal of Chromatography A**, v. 504, n. 0, p. 335-349, 1990. ISSN 0021-9673.
- HUANG, Y.-P. et al. Characterization of Convection for Molecularly Imprinted Monolith. **Chromatographia**, v. 71, n. 7, p. 559-569, 2010. ISSN 0009-5893.
- INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. The National Academies Press, Washington, D.C. 2005.
- JACOBSON, J. M. et al. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 26, n. 1, p. 43-50, 1987/01/01 1987. ISSN 0888-5885.
- JAIN, E. et al. Supermacroporous polymer-based cryogel bioreactor for monoclonal antibody production in continuous culture using hybridoma cells. **Biotechnology Progress**, 2010. ISSN 1520-6033.
- JANSON, J. C.e RYDEN, L. **Protein purification**. 2° ed. Wiley-Liss, New York. 695p., 1998.
- KOPACIEWICZ, W. et al. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 266, n. 0, p. 3-21, 1983. ISSN 0021-9673.

- KORHONEN, H. J. Technological and health aspects of bioactive components of milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1227-1228, 2006. ISSN 0958-6946.
- KUMAR, A. et al. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006a. ISSN 0021-9673.
- KUMAR, A. et al. Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 636-646, 2006b. ISSN 1097-0290.
- KUMAR, A. et al. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1-2, p. 185-194, 2003. ISSN 0022-1759.
- LEVAY, P.e VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Haematologica**, v. 80, n. 3, p. 252-267, 1995 May-Jun 1995.
- LI, Y. et al. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 29, p. 5525-5532, 2009. ISSN 0021-9673.
- LIN, F.-Y. et al. Microcalorimetric studies of the interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI): Effects of NaCl concentration, pH value, and temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 281-289, 2001. ISSN 0021-9673.
- LÖNNERDAL, B. et al. Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography. **FEBS Letters**, v. 75, n. 1-2, p. 89-92, 1977. ISSN 0014-5793.
- LOZINSKY, V. et al. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001. ISSN 0923-179X.
- LOZINSKY, V. I. et al. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 445-451, 2003. ISSN 0167-7799.
- LYSOGORSKAYA, E. et al. Preparation and catalytic properties of trypsin immobilized on cryogels of polyvinyl alcohol. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 241-246, 2008. ISSN 0003-6838.
- MALLIK, R.e HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006. ISSN 1615-9314.
- MARUSKA, A.e KORNYSOVA, O. Continuous beds (monoliths): stationary phases for liquid chromatography formed using the hydrophobic interaction-based phase separation mechanism. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 59, n. 1, p. 1-48, 2004. ISSN 0165-022X.
- MEYER, A. et al. Direct capture of lactoferrin from whey using magnetic micro-ion exchangers in combination with high-gradient magnetic separation. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 12, p. 1577-1588, 2007. ISSN 1381-5148.
- MIHELIČ, I. et al. Temperature influence on the dynamic binding capacity of a monolithic ion-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 159-168, 2003. ISSN 0021-9673.

MILLER, G. D. et al. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. 3 ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2007.

MILLIPORE CORPORATION, B. M. **A hands-on guide to ultrafiltration/diafiltration optimization using ellicon Cassettes**.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Cio Agr.**, v. 15, n. 1, p. 80-94, 1994.

MOORE, S. A. et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, n. 2, p. 222-236, 1997. ISSN 0022-2836.

NAIDU, A. S. Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. **Food Technology**, v. 56, n. 3, p. 40-45, 2002.

NG, P. K.e YOSHITAKE, T. Purification of lactoferrin using hydroxyapatite. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 13-14, p. 976-980, 2010. ISSN 1570-0232.

NILSANG, S. et al. Monoclonal Antibody Production Using a New Supermacroporous Cryogel Bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 4, p. 932-939, 2007. ISSN 1520-6033.

NOPPE, W. et al. Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands: Purification of lactoferrin from defatted milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, n. 1-2, p. 79-85, 2006. ISSN 0021-9673.

OHR, L. M. Nutraceuticals and functional foods. **Food Technology**, v. 58, p. 71-74, 2004.

PALMANO, K. P. et al. Survival and bone-active properties of bovine lactoferrin supplemented into stirred yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 7, p. 477-483, 2011. ISSN 0958-6946.

PAN, Z. et al. Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, n. 1, p. 141-150, 2002. ISSN 0003-2670.

PEREZ, P. et al. Bioresorbable and Nonresorbable Macroporous Thermosensitive Hydrogels Prepared by Cryopolymerization. Role of the Cross-Linking Agent. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 66-74, 2008/01/01 2007. ISSN 1525-7797.

PERSSON, P. et al. Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 224-236, 2004. ISSN 1097-0290.

PESSOA, J.e KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Manole, Barueri, SP. 2005.

PETROV, P. et al. UV-assisted synthesis of super-macroporous polymer hydrogels. **Polymer**, v. 50, n. 5, p. 1118-1123, 2009. ISSN 0032-3861.

PINS, J. J. et al. The effects of hydrolyzed whey peptides on cardiovascular disease risk factors in mildly hypertensive men and women. Proceedings of the fourth international whey conference, Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA, 2006. p.99-114.

PLIEVA, F. M. et al. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004a. ISSN 1615-9314.

PLIEVA, F. M. et al. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007. ISSN 1615-9314.

PLIEVA, F. M. et al. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008. ISSN 0966-842X.

PLIEVA, F. M. et al. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, v. 1, n. 4, p. 303-309, 2005. ISSN 1744-683X.

PLIEVA, F. M. et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004b. ISSN 1570-0232.

PODGORNIK, A. et al. Construction of Large-Volume Monolithic Columns. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 22, p. 5693-5699, 2000. ISSN 0003-2700.

RANKIN, D.e DARRAGH, A. Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage. What is the value of whey? , Proceedings of the fourth international whey conference, 2006. Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA. p.13-24.

SAMUELSON, O. **Ion exchange separations in analytical chemistry**. John Wiley & Sons Inc., New York. 474 pp., 1963.

SAVINA, I. N. et al. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 2, p. 199-205, 2005a. ISSN 0021-9673.

SAVINA, I. N. et al. Ion-exchange macroporous hydrophilic gel monolith with grafted polymer brushes. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 4, p. 313-321, 2006. ISSN 1099-1352.

SAVINA, I. N. et al. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium doperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005b. ISSN 0032-3861.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004. ISSN 1415-5273.

SHIGERU, Y.e YE, X. Isolation of Lactoperoxidase and Lactoferrins from Bovine Milk Acid Whey by Carboxymethyl Cation Exchange Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1439-1444, 1991. ISSN 0022-0302.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996. ISSN 0960-8524.

SKIDMORE, G. L.e CHASE, H. A. Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. **Journal of Chromatography A**, v. 505, n. 2, p. 329-347, 1990. ISSN 0021-9673.

- SMILOWITZ, J. T. et al. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. **Australian Journal of Dairy Technology**, n. 60, p. 77-83, 2005.
- SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - From "gutter-to-gold". **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008. ISSN 0958-6946.
- STEIJNS, J. M.e VAN HOOIJDONK, A. C. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **The British journal of nutrition**, v. 84 Suppl 1, p. S11-S17, 2000.
- STICKEL, J. J.e FOTOPOULOS, A. Pressure-Flow Relationships for Packed Beds of Compressible Chromatography Media at Laboratory and Production Scale. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 4, p. 744-751, 2001. ISSN 1520-6033.
- SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and Bioprocessing**. New York. 474p, 1998.
- SVEC, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 6, p. 902-924, 2010. ISSN 0021-9673.
- SVEC, F.e FRECHET, J. M. J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 820-822, 1992. ISSN 0003-2700.
- TIPTON, K. D. et al. Ingestion of Casein and Whey Proteins Result in Muscle Anabolism after Resistance Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 36, n. 12, p. 2073-2081, 2004. ISSN 0195-9131.
- TOME, D. Whey proteins and their consequences in weight control, glucose homeostasis, and insulin sensitivity. Proceedings of the fourth international whey conference, 2006. Chicago, USA, American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL, USA. p.70-81.
- TOMITA, M. et al. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 52-57, 2009. ISSN 0300-9084.
- TRIPP, J. A. et al. Grafted Macroporous Polymer Monolithic Disks: □ A New Format of Scavengers for Solution-Phase Combinatorial Chemistry. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 216-223, 2001. ISSN 1520-4766.
- TSUDA, H. et al. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 399-409, 2010. ISSN 0966-0844.
- USDA - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Dairy: World Markets and Trade** Julho/2011.
- VIOTTO, W. H. **Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal. Efeito de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro**. 1993. 212 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas
- WAKABAYASHI, H. et al. Lactoferrin research, technology and applications. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1241-1251, 2006. ISSN 0958-6946.

WANG, L. et al. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 237-242, 2008a. ISSN 1369-703X.

WANG, Q. C. et al. Hydrophilization of Porous Polystyrene-Based Continuous Rod Column. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 670-674, 1995. ISSN 0003-2700.

WANG, Y. Z. et al. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 140, n. 3-4, p. 326-336, 2008b. ISSN 0377-8401.

WIEDER, W. et al. Monolithic poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) capillary columns functionalized to strong anion exchangers for nucleotide and oligonucleotide separation. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 16, p. 2478-2484, 2006. ISSN 1615-9314.

YAO, K. et al. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006a. ISSN 0009-2509.

YAO, K. et al. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1-2, p. 246-251, 2007. ISSN 0021-9673.

YAO, K. et al. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103-110, 2006b. ISSN 0021-9673.

ZEMEL, M. B. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 907S-912, May 1, 2004 2004.