

RAFAEL DA COSTA ILHÉU FONTAN

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TROCADOR
CATIÔNICO SUPERMACROPOROSO PARA A PURIFICAÇÃO DE
MACROMOLÉCULAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

F679d
2013

Fontan, Rafael da Costa Ilhéu, 1980-
Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico
supermacroporoso para a purificação de macromoléculas /
Rafael da Costa Ilhéu Fontan. – Viçosa, MG, 2013.
x, 137f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luis Antonio Minim
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Adsorção. 2. Troca iônica. 3. Biomoléculas - Purificação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.113

RAFAEL DA COSTA ILHÉU FONTAN

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TROCADOR
CATIÔNICO SUPERMACROPOROSO PARA A PURIFICAÇÃO DE
MACROMOLÉCULAS**

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

APROVADO: 22 de março de 2013.

Renata Cristina Ferreira Bonomo

Monique Renon Eller

Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Valéria Paula Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Luis Antonio Minim
(Orientador)

*Para Gabi, Tiago e Camila, amores da minha vida, por
me tornar uma pessoa melhor a cada dia.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo, sempre;

À minha esposa Gabi e aos meus filhos Tiago e Camila, pela paciência e momentos de ausência;

Ao Professor Luis Antonio Minim, pela compreensão, amizade e orientação;

Ao Professor Luis Henrique Mendes da Silva e à Professora Valéria Paula Rodrigues Minim pelos conselhos e colaboração;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela liberação das minhas atividades e auxílio financeiro;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela acolhida e estrutura;

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;

Aos amigos de longa data e ‘cumpadres’ Renata e Paulo Bonomo;

Ao Professor Sérgio Castro, pela valiosa contribuição;

Aos amigos Lizzy, Vanessa e Evaldo pela ajuda;

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos da UFV;

Aos amigos e alunos do Laboratório de Engenharia de Processos da UESB;

A todos que contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Rafael da Costa Ilhéu Fontan nasceu em 19 de maio de 1980, na cidade do Rio de Janeiro – RJ. Em 1998 ingressou no curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo-o como o melhor aluno do curso em março de 2003.

Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico (CNPq) no período de 1999 a 2002, sempre sob a orientação do Professor Luis Antonio Minim, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA). Neste período recebeu duas vezes a Menção Honrosa pelo melhor trabalho de Iniciação Científica do DTA.

Em 2003 iniciou o mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, ainda sob a orientação do Professor Luis Minim, tendo sido aprovado em primeiro lugar no processo seletivo. Em fevereiro de 2005 concluiu com êxito o mestrado e ingressou como docente no meio acadêmico.

Em 2005 foi contratado como Professor Substituto pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Itapetinga. Em 2006 foi aprovado em Concurso Público na mesma Instituição, lecionando atualmente as disciplinas Termodinâmica, Operações Unitárias III e Laboratório de Fenômenos de Transferência.

Em 2009 iniciou o doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV, também sob a orientação do Professor Luis Minim, eterno orientador e parceiro nas atividades científicas. Em março de 2013 defendeu a presente tese, obtendo o tão sonhado título de *Doctor Scientiae*.

Casou-se com Gabrielle Cardoso Reis em 2005, com quem tem dois filhos, Tiago e Camila, atualmente com 5 e 3 anos, respectivamente.

RESUMO

FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Luis Henrique Mendes da Silva.

A purificação de biomoléculas, em especial macromoléculas, desperta cada vez mais o interesse de pesquisadores em todo o mundo devido ao potencial de uso das mesmas. Para isso, novas técnicas e materiais vêm sendo desenvolvidos, como os criogéis poliméricos, considerados a nova geração de matrizes para os processos cromatográficos. Os criogéis permitem a produção de colunas monolíticas cromatográficas com elevada porosidade e com poros grandes o suficiente para permitir a passagem até mesmo de células inteiras, o que é altamente desejável para a purificação de macromoléculas a partir de meios viscosos e/ou não clarificados. Apesar do crescente interesse nos criogéis, estudos envolvendo as condições de equilíbrio e a dinâmica do deslocamento de fluidos e cinética de transferência de massa nos leitos monolíticos ainda são insuficientes para se caracterizar completamente essa classe de adsorventes. Assim sendo, neste trabalho um novo trocador iônico monolítico voltado para a purificação da proteína lisozima a partir da clara de ovo foi produzido e caracterizado sob diversos aspectos, dentre eles a estrutura física e as relações de equilíbrio de adsorção, bem como o efeito da temperatura e força-iônica da fase móvel nessas reações, o que permitiu compreender melhor o mecanismo de adsorção da lisozima no trocador iônico. O leito monolítico produzido também foi caracterizado quanto à sua hidrodinâmica e um modelo capilar foi proposto para descrever as curvas de ruptura no mesmo, permitindo maior compreensão dos efeitos dispersivos, difusivos e de transferência de massa no seu interior. Por fim, o leito produzido foi empregado com êxito na purificação da lisozima diretamente da clara de com um mínimo preparo da solução de alimentação e em apenas uma etapa cromatográfica.

ABSTRACT

FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Development and characterization of a supermacroporous cation exchanger to macromolecules purification.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Luis Henrique Mendes da Silva.

Researchers around the world are interested in the potential use of biomolecules, in special macromolecules, increasing the application of different techniques to purify its. New methodologies and materials are being developed, such as polymeric cryogels, considered the new generation of chromatographic matrices. Cryogels permit the production of high porosity monolithic columns with large pores that allow the passage even of whole cells, which is highly desirable for the macromolecules purification from viscous and non-clarified feedstock solutions. Despite the growing interest in cryogels, studies involving equilibrium conditions and the dynamics of fluid displacement and mass transfer in monolithic beds are still insufficient to adequately characterize this class of adsorbents. Thus, a new ion exchanger monolithic cryogel for the purification of lysozyme from chicken egg was produced and characterized at various aspects, as the physical structure and adsorption equilibrium relationships, including the effect of temperature and ionic-strength of the mobile phase, allowing a better understanding of the adsorptive mechanism of lysozyme on the ion exchanger. The monolithic bed was also characterized as the capillary hydrodynamic and a model was proposed to describe the breakthrough curves, allowing greater understanding of dispersive, diffusive and mass transfer effects. Finally, monolithic bed produced was successfully employed in the purification of lysozyme directly from egg white in a single chromatographic step, being possible its use with a minimum preparation of the feed solution.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
ARTIGO 01	9
<i>CARACTERIZAÇÃO DE UM TROCADOR IÔNICO MONOLÍTICO POLÍMÉRICO SUPERMACROPOROSO: UMA NOVA ABORDAGEM</i>	9
<i>Resumo</i>	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Reagentes	13
2.2. Síntese dos criogéis monolíticos	13
2.3. Ativação do criogel e enxertia do AMPSA	14
2.4. Caracterização dos criogéis pAAm-SO ₃	15
Grau, densidade e rendimento de enxertia	15
Capacidade de inchamento e grau de expansão	15
Capacidade iônica total (Λ) do monólito produzido	16
Microscopia ótica e eletrônica de varredura	17
Porosidade dos criogéis	18
Distribuição dos tempos de residência (DTR) e coeficientes de dispersão axial aparente	20
Altura dos pratos teóricos equivalentes (HETP)	21
Permeabilidade ao escoamento	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
Avaliação do processo de enxertia	23
Microscopia ótica e eletrônica	26
Porosidade	29
DTR, dispersão axial e HETP	31
Permeabilidade ao escoamento	35
4. CONCLUSÕES	38
5. AGRADECIMENTOS	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ARTIGO 02	43
<i>RELAÇÕES DE EQUILÍBRIO E TERMODINÂMICA DO PROCESSO DE TROCA CATIONICA DE LISOZIMA EM UM CRIOGEL POLIMÉRICO SUPERMACROPOROSO</i>	43
<i>Resumo</i>	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. TEORIA	46
Isotermas de adsorção	46
Propriedades termodinâmicas	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Reagentes	52
3.2. Obtenção dos dados experimentais	53
3.3. Determinação dos parâmetros dos modelos de isotermas ajustados	55
3.4. Determinação das propriedades termodinâmicas	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
Isotermas de adsorção	57
Propriedades termodinâmicas	62
5. CONCLUSÕES	68
6. AGRADECIMENTOS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ARTIGO 03	74
<i>MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE TROCA CATIONICA DE LISOZIMA EM UM LEITO MONOLITICO SUPERMACROPOROSO</i>	74
<i>Resumo</i>	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MODELAGEM MATEMÁTICA	77
Características da estrutura capilar	78
Balanços de massa	81
Isotermas de adsorção	82
3. MATERIAL E MÉTODOS	84
3.1. Reagentes	84
3.2. Obtenção das curvas de ruptura experimentais	85
3.3. Densidade e viscosidade da fase móvel	86
3.4. Métodos numéricos e ajuste de parâmetros	87
Ajuste da distribuição dos capilares	87

Ajuste do coeficiente de transferência de massa	90
Simulação das curvas de ruptura.....	94
Outras observações realizadas	94
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
Ajuste dos parâmetros físicos da estrutura capilar	95
Características hidrodinâmicas e dispersivas da estrutura capilar	97
Ajuste do coeficiente de transferência de massa.....	99
Simulação das curvas de ruptura.....	104
5. CONCLUSÕES	108
6. AGRADECIMENTOS	108
7. LISTA DE SÍMBOLOS	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ARTIGO 04	115
<i>PURIFICAÇÃO DA LISOZIMA A PARTIR DA CLARA DE OVO EM DIFERENTES DILUIÇÕES UTILIZANDO UM TROCADOR CATIONICO MONOLÍTICO POLIMÉRICO SUPERMACROPOROSO</i>	115
<i>Resumo</i>	115
1. INTRODUÇÃO	116
2. MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1. Material	118
2.2. Preparo das soluções de alimentação	118
2.3. Extração da lisozima das soluções de alimentação.	120
2.4. Análises realizadas	121
2.5. Grau de pureza, fator de purificação e rendimento obtidos	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
4. CONCLUSÕES	130
5. AGRADECIMENTOS	130
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CONCLUSÕES GERAIS	136

INTRODUÇÃO GERAL

Técnicas cromatográficas são as mais importantes no desenvolvimento de processos de purificação de biocompostos, compondo em média de duas a três etapas destes (Jungbauer e Hanh, 2008; Lenhoff, 2011). Ao se trabalhar com a purificação de biocompostos, as técnicas de troca iônica têm grande importância e aplicabilidade devido à seletividade e capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos. Esta técnica se baseia na adsorção diferenciada de compostos carregados (positiva ou negativamente) em uma superfície com carga oposta, e vem sendo empregada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas (Chen et al., 2010).

A demanda das indústrias farmacêutica e de alimentos por biocompostos ativos é crescente, buscando-se, portanto, o emprego de técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade dos mesmos (Guiochon e Beaver, 2011). Devido a isso, o desenvolvimento de novos adsorventes e trocadores iônicos é constante. Na vanguarda desse processo está a produção de monólitos, estruturas porosas altamente interconectadas formadas em corpo único, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (Jungbauer e Rahn, 2008).

Dentre estes, destacam-se os criogéis poliméricos, obtidos a partir do congelamento de uma mistura reativa em polimerização. São caracterizados por possuírem elevada porosidade com poros grandes (diâmetro acima de 10 μm) interconectados (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al. 2003). Esses compostos são versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e apresentam baixo custo se comparados a matrizes tradicionais na cromatografia (Guiochon, 2007).

Outra característica de interesse em tais matrizes é a baixa resistência ao escoamento e conseqüente manutenção de carga durante o escoamento de um fluido através de um leito monolítico. Com isso soluções mais viscosas podem ser usadas sem afetar a eficiência de purificação, com a vantagem de se poder utilizar soluções pré-concentradas ou menos diluídas, otimizando o tempo de processo (Lozinsky et al., 2003; Guiochon, 2007). Devido a estas características, um grande crescimento do uso de criogéis poliméricos para a purificação de macromoléculas vem sendo

observado (Billakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Çimen e Denizli, 2012; Srivastava et al., 2012; Sun et al., 2012; Uygun et al., 2012; Yun et al., 2012).

O processo de síntese de criogéis é estocástico e cada unidade produzida é única em sua estrutura. O comportamento hidrodinâmico e cromatográfico de um criogel torna-se individual e o uso de métodos não-destrutivos nos estudos físicos e hidrodinâmicos passa a ser essencial (Yun et al., 2011). A modelagem de tais sistemas é um desafio, dada a dificuldade em descrever a estrutura da matriz do criogel, bem como características do escoamento de fluidos, dispersão nos poros e transferência de massa entre o fluido e as paredes do criogel (Yun et al., 2009).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis poliméricos, sua estrutura física gera uma área superficial significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, o que pode diminuir sua eficiência. Por isso o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área essencial e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações, químicas ou físicas, podem ser feitas visando a aumentar a eficiência dos processos de separação (Arvidsson et al., 2002; Babac et al., 2006; Kumar et al., 2006; Yao et al., 2007; Yun et al., 2007; Wang et al., 2008). A caracterização de tais criogéis é de grande importância para se conhecer a dinâmica do escoamento de fluidos em seu interior, bem como o processo de interação dos sítios ativos com moléculas em solução, visando a predição desse comportamento no escalonamento do processo analisado e na otimização dos processos de purificação de diferentes biocompostos.

Uma macromolécula adequada aos estudos com novos trocadores iônicos, em especial os catiônicos, é a lisozima, uma proteína amplamente utilizada como modelo em ensaios teóricos e experimentais (Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010). É uma proteína pequena, de cadeia única, composta por 129 resíduos de aminoácidos e massa molar em torno de 14300 Da (Canfield, 1963). Entre os resíduos de aminoácidos de sua cadeia polipeptídica estão seis de lisina e nove de arginina, que lhe conferem um caráter básico (Dimer e Hubbuch, 2007), sendo seu ponto isoelétrico em torno de 11,3 (Wetter e Deutsch, 1951). Essa enzima possui atividade catalítica na hidrólise das β -ligações entre o ácido murâmico e a N-acetilglicosamina, componentes do mucopolissacarídeo das paredes celulares de bactérias, apresentando desse modo atividade antimicrobiana (Başar et al., 2007) e por isso sendo amplamente empregada na indústria farmacêutica e de alimentos (Bayramoğlu et al., 2007; Anirudhan e Rejeena, 2012).

A otimização de processos cromatográficos de separação de macromolécula como a lisozima demanda um profundo conhecimento das relações de equilíbrio e de características de escoamento e transferência de massa. Determinar o equilíbrio adsorptivo é normalmente o primeiro passo, fornecendo informações sobre condições ideais de separação (Tao et al., 2011). Diversos modelos vêm sendo utilizados para a descrição do equilíbrio nos processos adsorptivos de proteínas, sendo o mais comum o estudo sob condições isotérmicas utilizando-se modelos como o de Langmuir e o de Freundlich (Bayramoğlu et al., 2007; Lira et al., 2009; Bowes et al., 2009; Huang et al., 2010; Tao et al., 2011). Entretanto, Misak (1993 e 1995) observou que o uso de modelos de isothermas de adsorção para descrever o equilíbrio de troca iônica não era totalmente adequado. Ao se trabalhar com macromoléculas como proteínas o uso de modelos mais adequados à troca iônica é ainda mais recomendado, como é o caso do modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA) proposto por Brooks e Cramer (1992).

Além das relações de equilíbrio, a compreensão dos mecanismos envolvidos na adsorção (ou troca iônica) de proteínas é de fundamental importância (Lin et al. 2002). A adsorção de proteínas é complexa e somente um detalhado entendimento do efeito dos muitos parâmetros envolvidos (pH, temperatura, tipo e quantidade de sais) nos fenômenos pertinentes permite uma melhoria racional de tais processos (Dieterle et al., 2008). Vários estudos termodinâmicos vêm buscando elucidar tais mecanismos e suas implicações na estrutura das proteínas (Gerstner et al., 1994; Bayramoğlu et al., 2007; Dieterle et al., 2008; Dismar et al., 2008; Lira et al., 2009; Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010; Blaschke et al., 2011).

Várias alternativas vêm sendo propostas para descrever a estrutura dos leitos monolíticos (Meyers e Liapis, 1999; Miyabe e Guiochon, 2002; Koku et al., 2011). Em uma dessas abordagens, a estrutura dos monólitos foi descrita como um conjunto de canais capilares independentes por onde a fase móvel escoava (Persson et al., 2004). Tal modelagem capilar vem sendo aperfeiçoada, sendo que novos elementos vêm sendo incorporados ao modelo original com o avançar das pesquisas e das técnicas empregadas (Persson et al., 2004; Zabka et al., 2006; Yun et al., 2009 e 2011). Apesar da matriz monolítica porosa ser provavelmente interconectada, o emprego do modelo capilar é adequado para descrever tais sistemas, em especial aqueles macroporosos, uma vez que o fluxo convectivo sempre escoava pelo caminho de menor

resistência, gerando um padrão através de sua estrutura o qual é semelhante ao de um conjunto de canais capilares (Persson et al., 2004).

Assim, o objetivo neste trabalho foi desenvolver, caracterizar e aplicar um novo trocador catiônico monolítico polimérico supermacroporoso em um processo de purificação de uma macromolécula a partir de um meio pouco clarificado. Para isso, a descrição dos fenômenos foi dividida em quatro partes visando ao melhor detalhamento de cada um dos aspectos avaliados.

Na primeira parte foi descrito o processo de síntese de um criogel polimérico monolítico e sua modificação em um trocador catiônico, sendo avaliados os aspectos associados à sua porosidade, permeabilidade e dispersão axial.

Na segunda parte foram determinadas as isotermas de adsorção da lisozima no trocador catiônico produzido, sob diferentes condições de temperatura e força iônica da fase móvel. Além disso, foram avaliados de acordo com fundamentos termodinâmicos, os efeitos do fenômeno de adsorção da proteína dentro do processo de troca iônica como um todo.

Na terceira parte foi avaliada a modelagem capilar para descrever o processo de troca iônica da lisozima no leito monolítico utilizado. Os balanços de massa consideraram o fluxo convectivo e os efeitos dispersivos de mistura e de transferência de massa individuais nos capilares, que seguiam uma distribuição normal de probabilidade para o diâmetro e comprimentos diferenciados, variando segundo sua tortuosidade. Simulações foram realizadas a fim de verificar o efeito da vazão, concentração inicial e força iônica da fase móvel nas curvas experimentais de ruptura.

Por fim, foi avaliada a aplicação do leito monolítico desenvolvido para a extração da lisozima a partir da clara de ovo, abordando-se aspectos relacionados à pureza e rendimento do produto obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANIRUDHAN, T. S.; REJEENA, S. R. (2012). Poly(acrylic acid)-modified poly(glycidylmethacrylate)-grafted nanocellulose as matrices for the adsorption of lysozyme from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, v.187, 150-159.
- ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BÜLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2002). Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, v.977, 27-38.
- BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. (2006). Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive & Functional Polymers*, v.66, 1263-1271.
- BAŞAR, N.; UZUN, L.; GÜNER, A.; DENIZLI, A. (2007). Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.41, 234-242.
- BAYRAMOĞLU, G.; EKICI, G.; BEŞIRLI, N.; ARICA, M. Y. (2007). Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brushes grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. *Colloids and Surfaces A*, v.310, 68-77.
- BILLAKANTI, J. M.; FEE, C. J. (2009). Characterization of cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange. *Biotechnology and Bioengineering*, v.103, 1155-1163.
- BLASCHKE, T.; VARON, J.; WERNER, A.; HASSE, H. (2011). Microcalorimetric study of the adsorption of PEGylated lysozyme on a strong cation exchange resin. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 4720-4726.
- BOWES, B. D.; KOKU, H.; CZYMMEK, K. J.; LENHOFF, A. M. (2009). Protein adsorption and transport in dextran-modified ion-exchange media. I: Adsorption. *Journal of Chromatography A*, v.1216, 7774-7784.
- BROOKS, C.; CRAMER, S. (1992). Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal*, v.38, 1969-1978.
- CANFIELD, R. E. (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.238(8), 2698-2707.
- CHEN, X.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. (2010). Polymeric cation-exchange monolithic columns containing phosphoric acid functional groups for capillary liquid chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, v.1217, 3844-3854.
- ÇİMEN, D.; DENIZLI, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.93, 29-35.

- DIETERLE, M.; BLASCHKE, T.; HASSE, H. (2008). Microcalorimetric study of adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic materials. *Journal of Chromatography A*, v.1205, 1-9.
- DISMER, F.; HUBBUCH, J. (2007). A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. *Journal of Chromatography A*, v.1149, 312-320.
- DISMER, F.; PETZOLD, M.; HUBBUCH, J. (2008). Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography A*, v.1194, 11-21.
- GUIOCHON, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1168, 101-168.
- GUIOCHON, G.; BEAVER, L. A. (2011). Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8836-8858.
- HUANG, Y.; BI, J.; ZHAO, L.; MA, G.; SU, Z. (2010). Regulation of protein multipoint adsorption on ion-exchange adsorbent and its application to the purification of macromolecules. *Protein Expression and Purification*, v.74, 257-263.
- JUNGBAUER, A.; HAHN, R. (2008). Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, v.1184, 62-79.
- KOKU, H.; MAIER, R. S.; CZYMMEK, K. J.; SCHURE, M. R.; LENHOFF, A. M. (2011). Modeling of flow in a polymeric chromatographic monolith. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 3466-3475.
- KUBIAK-OSSOWSKA, K.; MULHERAN, P. A. (2010). Mechanism of hen egg white lysozyme adsorption on a charged solid surface. *Langmuir*, v.26, 15954-15965.
- KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. (2006). Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, v.1103, 35-42.
- LENHOFF, A. M. (2011). Protein adsorption and transport in polymer-functionalized ion-exchangers. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8748-8759.
- LIN, F.-Y.; CHEN, W.-Y.; HEARN, M. T. W. (2002). Thermodynamic analysis of the interactions between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, v.15, 55-93.
- LIRA, R. A.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, V. P. R.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. (2009). Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropptide on anion-exchange chromatography adsorbent. *Journal of Chromatography A*, v.1216, 4440-4444.
- LOZINSKY, V. I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, v.71, 489-511.

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

MEYERS, J. J.; LIAPIS, A. I. (1999). Network modeling of the convective flow and diffusion of molecules adsorbing in monoliths and in porous particles packed in a chromatographic column. *Journal of Chromatography A*, v.852, 3-23.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. (2002). The moment equations of chromatography for monolithic stationary phases. *Journal of Physical Chemistry B*, v.106, 8898-8909.

MISAK, N. Z. (1993). Langmuir isotherm and its application in ion-exchange reactions. *Reactive Polymers*, v.21, 53-64.

MISAK., N. Z. (1995). Adsorption isotherms in ion exchange reactions. Further treatments and remarks on the application of the Langmuir isotherm. *Colloids and Surfaces A*, v.97, 129-140.

PERSSON, P.; BAYBAK, O.; PLIEVA, F.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; NILSSON, B.; AXELSSON, A. (2004). Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, 225-236.

SRIVASTAVA, A.; SHAKYA, A. K.; KUMAR, A. (2012). Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, 373-381.

SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; GUOC, L.; ZHAO, Y.; CHANG, C. (2012). Monolithic cryogels made of agarose–chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, 1002-1007.

TAO, Y.; CARTA, G.; FERREIRA, G.; ROBBINS, D. (2011). Adsorption of deamidated antibody variants on macroporous and dextran-grafted cation exchangers: I. Adsorption equilibrium. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 1519-1529.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. (2012). Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.

WANG, L.; SHEN, S.; HE, X.; YUN, J.; YAO, K.; YAO, S.-J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, 237-242.

WETTER, L. R.; DEUTSCH, H. F. (1951). Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.192(1), 237-242.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2011). Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.

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

YUN, J.; JESPERSEN, G. R.; KIRSEBOM, H.; GUSTAVSSON, P.-E.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. (2011). An improved capillary model for describing the microstructure characteristics, fluid hydrodynamics and breakthrough performance of proteins in cryogel beds. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 5487-5497.

YUN, J.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2009). Modeling of breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. *Journal of Separation Science*, v.32, 2601-2607.

YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F.; YAO, K. (2007). One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. *Journal of Chromatography B*, v.860, 57-62.

YUN, J.; TU, C.; LIN, D.-Q.; XU, L.; GUO, Y.; SHEN, S.; ZHANG, S.; YAO, K.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. (2012). Microchannel liquid-flow focusing and cryopolymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1247, 81-88.

ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. (2006). Experimental and modeling study of adsorption in preparative monolithic silica column. *Chemical Engineering and Processing*, v.45, 150-160.

ARTIGO 01

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM TROCADOR IÔNICO MONOLÍTICO POLÍMÉRICO SUPERMACROPOROSO: UMA NOVA ABORDAGEM

Resumo

O desenvolvimento de novos adsorventes é um segmento estratégico na separação de biocompostos, tendo os criogéis poliméricos grande potencial para a purificação de macromoléculas a partir de meios não-clarificados. A caracterização desses compostos é de grande importância para a otimização das condições operacionais e adequação do seu uso às necessidades de pesquisadores e indústrias. Neste trabalho buscou-se uma nova abordagem, com alterações na síntese e uso de diferentes técnicas na caracterização de um criogel de poliacrilamida enxertado com o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA). A enxertia ocorreu de modo dinâmico, ao invés do modo estático usualmente empregado, sendo as soluções ativadora e de AMPSA circuladas em circuito fechado através dos criogéis produzidos a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tal alteração não provocou mudanças consideráveis na capacidade de inchamento (S), no grau (G) e densidade (D) de enxertia, mas sim no rendimento (E) da mesma, o qual foi inferior ao reportado na literatura. Foram comparadas as técnicas de microscopia ótica e eletrônica de varredura para a avaliação da estrutura dos criogéis não sendo observadas diferenças nos valores obtidos por ambas, que revelaram poros com diâmetro médio em torno de $70\text{ }\mu\text{m}$. O método dos momentos, mais adequado quando se verifica assimetria nas curvas de distribuição de tempos de residência, foi usado na determinação da porosidade do criogel, igual a 0,91, e do coeficiente de dispersão axial aparente em função da velocidade de escoamento. Tal método também foi usado para estimar a altura de pratos teóricos, em torno de 2,5 mm. A resistência ao escoamento foi avaliada variando-se a viscosidade de um fluido newtoniano à pressão constante, sendo o valor da constante de permeabilidade igual ao obtido utilizando-se água pura e variando-se a pressão hidrostática sobre a coluna. Os resultados obtidos demonstraram que o uso de tais técnicas foi adequado na síntese e caracterização de criogéis, abrindo novas perspectivas nesse segmento.

Palavras-chave: criogel, enxertia dinâmica, caracterização, microscopia ótica, método dos momentos, permeabilidade.

1. INTRODUÇÃO

Técnicas adsorptivas são utilizadas em pelo menos uma etapa de praticamente todos os processos de purificação de biocompostos existentes. A otimização dessas técnicas é de grande interesse, por trazer impacto direto no rendimento de tais processos.

Nesse sentido os monólitos poliméricos são considerados o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas. Caracterizam-se por uma estrutura em corpo único, com poros interconectados e grandes o suficiente para permitir a passagem até mesmo de células inteiras, o que leva a uma maior permeabilidade ao escoamento e a uma menor queda de pressão. São versáteis no seu uso, podendo ser produzidos na forma de colunas, discos ou membranas, e de baixo custo, se comparados a matrizes tradicionais utilizadas na cromatografia (Guiochon, 2007).

O desenvolvimento e utilização de monólitos poliméricos é recente, sendo observado um significativo aumento no número de trabalhos com tal material apenas na última década. (Arvidsson et al., 2002; Lozinsky et al., 2003; Plieva et al., 2004a e 2004b). Entre os possíveis polímeros empregados na síntese desses compostos, destacam-se os monólitos macroporosos de poli(acrilamida), obtidos da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N,N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE), sob condições de congelamento moderado (-10 °C a -20 °C), pela técnica conhecida como criogeleificação (Plieva et al., 2004b). Os monólitos assim produzidos são chamados de criogéis pAam, e sua utilização vem sendo reportada por diversos autores (Plieva et al., 2004a; Yao et al., 2007; Billakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Dragan et al., 2012).

Apesar das vantagens apresentadas pelos criogéis poliméricos, os grandes poros e conseqüentemente a elevada porosidade de sua estrutura fazem com que sua área superficial seja significativamente menor se comparada a de um leito fixo empacotado, levando a uma menor eficiência teórica. Por isso o estudo de modificações na estrutura dos criogéis é uma área essencial e que vem se desenvolvendo rapidamente. Modificações, químicas ou físicas, podem ser feitas visando a aumentar a eficiência dos processos de separação (Arvidsson et al., 2002; Babac et al., 2006; Kumar et al., 2006; Yao et al., 2007; Yun et al., 2007; Wang et al., 2008).

Entre tais modificações, uma técnica de grande interesse é a enxertia sobre o esqueleto polimérico utilizando um agente iniciador (técnica conhecida por *grafting from*), em que a ligação de grupos de interesse ocorre em regiões pré-ativadas da superfície do criogel (Savina et al., 2005a). A enxertia usualmente é realizada de modo estático, com a solução com o grupo a ser enxertado sendo deixada estagnada em contato com o criogel por um determinado período de tempo (Savina et al., 2005a e 2005b; Hanora et al., 2006; Yao et al., 2007; Chen et al., 2008; Srivastava et al., 2012). Entre os compostos químicos utilizados no processo de enxertia em criogéis pAAm estão o ácido acrílico, o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) e o ácido iminodiacético, 2-dimetilaminoetil metacrilato (Arvidsson et al., 2002; Plieva et al., 2004b; Savina et al., 2005a; Yun et al., 2007; Chen et al., 2008; Wang et al., 2008).

A caracterização dos criogéis é de grande importância para se conhecer a dinâmica do escoamento de fluidos em seu interior, bem como o processo de interação dos sítios ativos com as moléculas presentes na solução a ser purificada, visando a predição desse comportamento em um aumento de escala do processo analisado e na padronização da purificação de biocompostos.

A análise dos aspectos físicos (porosidade e tamanho de poros), hidrodinâmicos (permeabilidade ao escoamento, distribuição de tempos de residência e dispersão axial) e químicos (grau de enxertia, número de sítios ativos) desses géis vem sendo relatada por diversos autores, e os resultados correlacionados às alterações nos processos de obtenção dos criogéis, seja em relação às rotas criogênicas usadas, seja em relação à composição dos mesmos. (Savina et al., 2005a e 2005b; Yao et al., 2006a; Chen et al., 2008).

Dadas as características que os criogéis poliméricos apresentam, seu uso na forma de leito fixo na purificação de biocompostos a partir de meios concentrados ou não-clarificados apresenta grande potencial (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al., 2003). No entanto, muitas características dos criogéis são estimadas em batelada e com a utilização de técnicas que envolvem maiores erros por depender de características subjetivas do analista. Esse é o caso da obtenção da porosidade por meio da determinação do conteúdo de água livre (Plieva et al., 2004a, Erzenin et al., 2011), em que a quantidade de água retirada do criogel depende da força aplicada sobre ele. O uso de um método envolvendo a utilização de pulsos de solutos traçadores em

leitos fixos, como o método dos momentos (Furusawa et al., 1976; Guiochon, 2006), leva a resultados com menores erros e maior reprodutibilidade.

Além disso, existem ainda outros aspectos pouco explorados em relação aos métodos de análise empregados em criogéis. Por exemplo, os poros dos criogéis possuem dimensões micrométricas e sua estrutura em geral é avaliada por microscopia eletrônica de varredura (Plieva et al., 2004b; Yao et al., 2007; Dragan et al., 2012). Porém a estimativa do tamanho dos poros poderia ser feita, de modo alternativo, por técnicas de microscopia ótica, de menor custo e acessíveis a um maior número de pesquisadores. Outra característica importante, a permeabilidade ao escoamento, é determinada frequentemente pelo escoamento de água no leito de criogel submetido a diferentes pressões hidrostáticas (Yao et al., 2006b; Chen et al., 2008). Contudo, informações sobre a permeabilidade ao escoamento utilizando-se líquidos mais viscosos, de grande interesse ao se trabalhar com criogéis, são inexistentes na literatura.

Assim, o objetivo deste trabalho foi fazer uma nova abordagem sobre algumas técnicas utilizadas na síntese e caracterização de criogéis poliméricos usados na forma de leito fixo para a purificação de biocompostos a partir de meios concentrados. Em especial, foram avaliados o processo de enxertia dinâmica de moléculas de AMPSA, o uso de microscopia ótica para avaliar a estrutura dos criogéis produzidos, a utilização do método dos momentos para a determinação da porosidade, dispersão axial e número de pratos teóricos equivalentes e a determinação da constante de permeabilidade ao escoamento variando-se a viscosidade da fase móvel ao invés de se variar a queda de pressão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados AAm, BAAM, AGE, AMPSA, persulfato da amônio (APS), periodato de potássio, persulfato de potássio, lisozima, fosfato de sódio monobásico e bibásico e cloreto de sódio adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino (TEMED) adquirido da Merck Millipore (Billerica, EUA). Sulfato de cobre, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e sulfato de potássio foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes químicos utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultra-pura.

2.2. Síntese dos criogéis monolíticos

Na síntese dos criogéis, foram adaptadas as metodologia proposta por Kumar et al. (2006) e Yao et al. (2006a). Resumidamente, uma solução contendo 6% de monômeros (AAm+AGE+BAAM), na proporção mássica de 7:1 para (AAm+AGE):BAAM e 9:1 AAm:AGE foi preparada em banho de gelo. O AGE foi adicionado para aumentar a resistência estrutural do criogel (Arvidsson et al., 2003). Adicionou-se então 1,2% de APS e 1% de TEMED em relação à massa total de monômeros. Após a homogeneização da solução, a mesma foi imediatamente vertida em uma coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e mergulhada em um banho termostático (Modelo Q214S2, Quimis, São Paulo, Brasil) regulado à temperatura de $(-12,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, durante 24 h. A solução de monômeros preencheu uma altura de cerca de 12 cm, que foi mantida com a extremidade superior aberta, coberta por um pedaço de parafilme. Decorridas as 24 h, a coluna foi levada à temperatura de $4 ^\circ\text{C}$ por 4 h para o descongelamento da água existente. Não foi feita a lavagem da coluna após o descongelamento.

A coluna com o criogel foi seca em estufa a $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ por 48 h para a avaliação de falhas estruturais decorrentes do processo de síntese. Se o processo de polimerização da mistura reativa já estivesse avançado ao se colocar a amostra sob condições de congelamento; ou se a redução da temperatura de tal solução ocorresse lentamente, observava-se com o processo de secagem descrito um encolhimento excessivo do criogel produzido, e que o mesmo não apresentava a mesma capacidade de rehidratação de um criogel normal. Após tal verificação, foi colocado o pistão

adaptador AC10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) na coluna, que foi reidratada e lavada com 350 mL de água deionizada, utilizando-se uma bomba peristáltica (Masterflex Easy-Load II, Cole-Parmer, Vernon Hills, EUA) à vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Durante o processo o pistão foi ajustado de modo a reduzir a altura do leito em cerca de 5% a 10% (Hjertén et al., 1989). Em seguida, a coluna foi submetida então ao processo de ativação e enxertia do AMPSA.

Paralelamente à produção do leito na coluna cromatográfica, foram produzidos outros 20 criogéis em seringas plásticas com volume nominal de 5,0 mL, adotando-se a mesma metodologia. Tais criogéis foram secos em estufa à $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 48 h, esfriados em dessecador, pesados em uma balança analítica (precisão de 0,0001 g, Modelo AG200, Gehaka, São Paulo, Brasil) e novamente hidratados com água deionizada, para serem ativados e enxertados com AMPSA.

2.3. Ativação do criogel e enxertia do AMPSA

Os criogéis produzidos foram ativados com diperiodato cuprato de potássio, conforme metodologia adaptada de Savina et al. (2005a). Para o preparo da solução de diperiodato cuprato de potássio, $\text{K}_5[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]$, com concentração final de Cu(III) igual a $0,0562 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, foram adicionados à 200 mL de água deionizada 3,54 g de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 6,82 g de periodato de potássio (KIO_4), 2,20 g de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) e 9,00 g de hidróxido de potássio (KOH). Essa mistura foi levada à ebulição durante 40 min, resfriada à temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi diluído com água para 250 mL, sendo esta solução utilizada nos experimentos.

A solução ativadora foi uma mistura de uma solução de NaOH $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e diperiodato cuprato de potássio $0,0562 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na proporção de 1:3, que foi bombeada através dos criogéis em circuito fechado durante 90 min (re-circulação) a uma vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a uma temperatura de $(45,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, mantida constante com o uso de uma estufa BOD (Modelo TE-391, Tecnal, São Paulo, Brasil). O volume total da solução ativadora re-circulado em cada criogel foi de 3,0 mL de solução ativadora para cada mililitro de criogel hidratado.

Uma vez ativados, a enxertia com AMPSA foi feita segundo mecanismo adaptado de Yao et al. (2007). Para isso, foi utilizada uma solução de AMPSA $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a $45 ^\circ\text{C}$ e com uma vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em circuito fechado durante 120 min. O volume da solução de AMPSA utilizado foi de 3,0 mL para cada mililitro

de criogel hidratado. Em seguida, o criogel foi lavado com 200 mL de uma solução de HCl 0,1 mol·L⁻¹ (100 mL para os criogéis obtidos nas seringas), seguido de 400 mL de água deionizada (200 mL nas seringas), ambos à vazão de 1,0 mL·min⁻¹ e temperatura de 45 °C para assegurar a retirada das moléculas de AMPSA livres. Terminado esse processo os criogéis estavam prontos para o uso.

A coluna de criogel foi percolada por 120 mL de uma solução de acetato de sódio 0,2 mol·L⁻¹ em etanol 20% (fração volumétrica) e armazenada sob refrigeração (4 a 6 °C) até seu uso. Os criogéis gerados nas seringas foram novamente secos em estufa a (60 ± 2) °C por 48 h e armazenados desidratados até o uso. Em ambos os casos, para serem utilizados, os criogéis foram lavados (ou hidratados) abundantemente com água deionizada, seguido de lavagem com pelo menos vinte volumes da coluna de uma solução de HCl 0,1 mol·L⁻¹.

2.4. Caracterização dos criogéis pAAm-SO₃

Grau, densidade e rendimento de enxertia

Para se avaliar a eficiência no processo de enxertia do AMPSA, foram determinados o grau (G), a densidade (D) e o rendimento (E) de enxertia do AMPSA à matriz polimérica, utilizando metodologia descrita por Savina et al. (2005a). Para tanto, as análises foram realizadas em 10 criogéis produzidos nas seringas, e os parâmetros obtidos utilizando-se as equações 1 a 3.

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

$$D = \frac{(m_1 - m_0)}{m_0} \times \frac{1}{MM_{AMPSA}} \quad (2)$$

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

Onde: m_0 é a massa (kg) do criogel original desidratado, m_1 é a massa (kg) do criogel pAAm-SO₃ desidratado, m_2 é a massa (kg) de AMPSA recirculada e MM_{AMPSA} é a massa molar (kg·mol⁻¹) do AMPSA.

Capacidade de inchamento e grau de expansão

A capacidade de inchamento (S) foi avaliada nos criogéis com e sem a enxertia do AMPSA. Para isso 10 criogéis produzidos nas seringas plásticas foram secos em estufa a (60 ± 2) °C, esfriados em dessecador e tiveram as massas

verificadas em uma balança analítica. Posteriormente, os criogéis foram hidratados por imersão em 50 mL de água deionizada à temperatura ambiente, por 24 h, retirados da água e tiveram novamente as massas verificadas. O valor de S foi calculado utilizando-se a equação 4 (Savina et al., 2005a).

$$S = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \quad (4)$$

Onde: m_s é a massa (kg) do criogel hidratado e m_d é a massa (kg) do criogel desidratado.

Outra medida aqui introduzida foi o grau de expansão (ED) do criogel, útil para a conversão entre a massa desidratada do criogel (quando armazenado) e seu volume hidratado (quando em uso). Dez criogéis, com e sem enxertia do AMPSA, foram desidratados e tiveram suas massas verificadas em balança analítica. Posteriormente foram saturados com água deionizada, durante 24 h. Os criogéis hidratados foram transferidos para uma proveta graduada contendo um volume de água, V_1 , e o novo volume final, V_2 foi determinado. O volume do criogel hidratado foi calculado pela diferença entre V_2 e V_1 . O valor de ED foi calculado utilizando-se a equação 5.

$$ED = \frac{(V_2 - V_1)}{m_d} \quad (5)$$

Onde: V_1 é o volume inicial de água na proveta (L), V_2 é o volume final lido na proveta após a colocação do criogel (L) e m_d é a massa do criogel desidratado (kg).

Os valores médios de S e ED obtidos para os criogéis pAAm e pAAm-SO₃ foram comparados entre si aplicando-se um teste t de Student com 5% de probabilidade (Montgomery, 2001).

Capacidade iônica total (Λ) do monólito produzido

Tal parâmetro expressa a capacidade máxima de troca de cátions monovalentes dos criogéis sintetizados. Para a sua determinação, foi utilizado um método titulométrico. Cinco criogéis sintetizados nas seringas foram desidratados e cortados com uma lâmina de aço inox em pedaços cúbicos com cerca de 1,5 mm de aresta, sendo os mesmos misturados para tornar aleatória sua utilização. Em seis tubos de centrífuga de 50 mL foram pesados cerca de 50 mg de criogel e adicionados 45 mL de uma solução de HCl 1,0 mol·L⁻¹. Os tubos foram deixados em agitação orbital a 25 rpm durante 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi

retirada e os criogéis nos tubos foram submetidos a uma tripla lavagem com 45 mL de água deionizada seguido de agitação dos tubos durante três horas. Antes de cada lavagem, os tubos com os pedaços de criogel foram rinsados com cerca de 90 mL de água. Esse procedimento foi realizado para retirar o excesso de íons H^+ livres em solução. Os tubos foram então levados para secagem a $(60 \pm 2) ^\circ C$ por 24 h, resfriados, acrescidos de 45 mL de uma solução de NaCl $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e deixados em agitação orbital a 25 rpm por 12 h. Uma alíquota de 40 mL de solução foi retirada de cada tubo e titulada com uma solução de NaOH $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ padronizada. A solução de NaCl original também foi titulada, sendo o branco para análise. O número de íons H^+ quantificados foi igual ao número de íons Na^+ que foram trocados com o criogel. Determinou-se então a capacidade iônica total em termos de massa de criogel desidratado (Λ_m), expressa em $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, utilizando-se a equação 6. A capacidade iônica total por volume de criogel hidratado (Λ) foi determinada de acordo com a equação 7.

$$\Lambda_m = \frac{V_T}{m} \left[\left(\frac{M_{NaOH} f V_{NaOH}}{V} \right)_{amostra} - \left(\frac{M_{NaOH} f V_{NaOH}}{V} \right)_{NaCl} \right] \quad (6)$$

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

$$\Lambda = \frac{\Lambda_m}{ED} \quad (7)$$

Onde: Λ_m é a capacidade iônica total por massa de criogel desidratado ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) e ED é o grau de expansão do criogel ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Microscopia ótica e eletrônica de varredura

Para conhecer melhor a estrutura do criogel produzido, foram obtidas micrografias óticas e eletrônicas para o criogel antes e após a enxertia do AMPSA.

Para a obtenção das micrografias óticas, os criogéis produzidos nas seringas foram desidratados, e da região central longitudinal foram cortadas fatias finas utilizando-se uma lâmina de aço inoxidável. As fatias foram colocadas sobre uma

lâmina de vidro e coradas com duas gotas de uma solução de azul de metileno a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As lâminas secaram à temperatura ambiente por 24 h. Após esse tempo as fatias coradas foram fixadas com duas gotas de uma solução 1% de cola branca comercial e secas novamente à temperatura ambiente por 24 h. As lâminas foram observadas diretamente no aumento de $100\times$ em um microscópio ótico (modelo BX-51, Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera com *software* para aquisição de imagens (Image-Pro Plus v.6.2.0.424, Media Cybernetics, Rockville, EUA).

Também foram obtidas micrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos criogéis. Para tanto, três amostras com e sem enxertia foram desidratadas e quebradas manualmente próximo a região central dos criogéis, fixadas em suportes apropriados (*stubs*) e diretamente metalizadas com uma fina camada de ouro. Após a metalização as amostras foram levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1430 VP (Zeiss, Jena, Alemanha).

A partir das imagens obtidas foram estimados os valores para o diâmetro médio dos poros e espessura das paredes dos criogéis. Para tanto, selecionou-se aleatoriamente 100 locais de medição, que foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade (Montgomery, 2001).

Porosidade dos criogéis

Foram utilizados dois métodos para a determinação da porosidade dos criogéis produzidos. O primeiro e mais simples deles está amplamente difundido na análise de criogéis poliméricos e se baseia na medida do conteúdo de água livre dos criogéis monolíticos (Plieva et al., 2004a e 2004b; Erzengin et al., 2011). Para realizar essa análise, dez criogéis enxertados com AMPSA (pAAm-SO₃), desidratados e com as massas conhecidas, foram mantidos por quinze dias em um dessecador contendo uma solução saturada de sulfato de potássio, para que a umidade relativa do ar permanecesse em torno de 98% à temperatura ambiente ($(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$) (Greenspan, 1977), sendo as massas novamente determinadas ao fim deste período. Tal medida visou a determinar a quantidade de água de ligação do criogel (Plieva et al., 2004a e 2004b). Posteriormente os criogéis foram saturados com água deionizada durante 24 h, sendo suas massas obtidas novamente. Os criogéis foram então delicadamente espremidos e secos com lenços de papel para retirada da água livre no interior dos macroporos, sendo suas massas novamente medidas. A fração de macroporos (φ_M), com tamanho $\geq 1 \mu\text{m}$, fração de meso e

microporos (φ_m), com tamanho $< 1 \mu\text{m}$, fração de água ligada (φ_{wb}), fração do polímero seco (φ_d) e porosidade total (φ_T) dos criogéis pAAm-SO₃ foram calculadas utilizando-se as equações 8 a 12.

$$\varphi_M = \frac{m_s - m_e}{m_s} \quad (8)$$

$$\varphi_m = \frac{m_e - m_{wb}}{m_s} \quad (9)$$

$$\varphi_{wb} = \frac{m_{wb} - m_d}{m_s} \quad (10)$$

$$\varphi_d = \frac{m_d}{m_s} \quad (11)$$

$$\varphi_T = \frac{m_s - m_{wb}}{m_s} = \varphi_M + \varphi_m \quad (12)$$

Onde: m_s é a massa do criogel hidratado (kg), m_d é a massa do criogel desidratado (kg), m_e é a massa do criogel espremido (kg) e m_{wb} é a massa do criogel com água de ligação (kg).

O segundo método utilizado para determinação da porosidade total dos criogéis foi baseado no método dos momentos utilizado para leitos fixos empacotados (Furusawa et al., 1976). A coluna de criogel foi adaptada a um cromatógrafo líquido (Prominence, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com forno para controle de temperatura e detector de feixe de diodos com espectro no UV-Visível. A coluna foi equilibrada a $(30,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ com 20 volumes de coluna (VC) de água deionizada. Pulsos de 20 μL de uma solução de acetona 5% (em volume) foram injetados, em triplicata, em vazões variando de 0,23 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 0,86 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (para não exceder a pressão máxima de trabalho da coluna, cerca de 1,0 MPa), sendo as corridas monitoradas em $\lambda = 280\text{nm}$.

Foi calculado então o primeiro momento estatístico (ou tempo de retenção) para os pulsos injetados, que na forma discretizada e com a concentração do soluto linearmente proporcional à absorbância é dado por (Furusawa et al., 1976):

$$M_1 = t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} \quad (13)$$

Onde: M_1 é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento, t_R é o tempo de retenção (s), t_i é o tempo (s) em que a i -ésima

observação foi registrada, Δt_i é o intervalo de tempo (s) entre a i -ésima e a $(i-1)$ -ésima observação (para $i \geq 2$) e A_i é a absorvância registrada no tempo t_i .

Para a injeção dos pulsos de acetona no tempo de corrida igual a zero, Furusawa et al. (1976) demonstram que t_R é igual a:

$$t_R = \frac{L}{U} \varepsilon_T \quad (14)$$

Onde: L é o comprimento da coluna (m), U é a velocidade de escoamento da fase móvel ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e ε_T é a porosidade total da coluna.

Visando determinar a porosidade aparente da coluna (ε_{ap}) ao se utilizar uma macromolécula de interesse como soluto traçador, o mesmo procedimento foi adotado utilizando-se pulsos de 20 μL de uma solução de lisozima a 2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo a fase móvel uma solução-tampão de fosfato de sódio 0,02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,2 contendo 1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio, para se assegurar condições não-adsortivas na análise.

Distribuição dos tempos de residência (DTR) e coeficientes de dispersão axial aparente

Para a determinação das curvas de *DTR* e dos coeficientes de dispersão axial aparente foi utilizado um método adaptado de Yao et al. (2006a e 2006b). Para tanto, foram utilizados os dados obtidos dos mesmos pulsos de acetona descritos no item anterior. Além dos tempos de retenção, foram calculadas também as variâncias (σ^2) ou segundos momentos estatísticos (M_2) de cada pulso, utilizando-se a equação 15 (Furusawa et al.; 1976).

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 A_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n A_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (15)$$

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

Uma vez determinados t_R e σ^2 , o coeficiente de dispersão axial aparente para cada velocidade de escoamento estudada foi calculado por regressão não-linear, resolvendo-se a equação 16 (Yao et al., 2006a e 2006b) utilizando-se a ferramenta *solver* do *software* MS-Excel[®] 2007 (Microsoft, Redmond, EUA).

$$\frac{\sigma^2}{t_R^2} = 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[1 - \exp \left(- \frac{uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad (16)$$

Onde D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial aparente ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), L é a altura (m) do leito, u é a velocidade ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) intersticial da fase móvel ($u = U \varepsilon_T$), t_R é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

Os gráficos das curvas de *DTR* foram plotados na forma normalizada de acordo com a equação 17 (Zabka et al., 2006).

$$DTR^* = E = \frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t) dt} = \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (17)$$

Onde: $DTR^* = E$ é a função de distribuição de tempo de residência normalizada (s^{-1}) e Abs é a absorvância registrada em função do tempo.

O mesmo procedimento foi adotado para pulsos de lisozima, conforme descrito na seção anterior exceto pela utilização do valor de ε_{ap} ao invés de ε_T na equação 15.

Altura dos pratos teóricos equivalentes (HETP)

Para a determinação da *HETP* em função da velocidade de escoamento da fase móvel foram utilizados os dados obtidos das curvas de *DTR* mencionados. Os valores da *HETP* foram calculados utilizando-se a equação 18 (Bidleingmeyer e Warren Jr., 1984; Ortner e Rohwer, 1999; Guiochon, 2006).

$$HETP = L \frac{M_2}{M_1^2} = L \frac{\sigma^2}{t_R^2} \quad (18)$$

Onde: L é a altura do leito (m), t_R é o tempo de retenção do pulso (s) e σ^2 é a sua variância (s^2).

Permeabilidade ao escoamento

A permeabilidade ao escoamento foi determinada utilizando-se dois métodos diferentes, ambos baseados na equação de Darcy (equação 20), sendo os resultados comparados entre si.

No primeiro, o criogel pAAm-SO₃ produzido na coluna foi equilibrado com 50 VC de coluna de água deionizada e submetido à diferenças de pressão hidrostática sobre a coluna entre 1,5 kPa e 20,5 kPa (altura de coluna de água entre cerca de 15 cm e 210 cm, com precisão de 0,5 cm), sendo a vazão volumétrica registrada na saída do leito.

No segundo método, foram utilizadas como fase móvel soluções de poli(etilenoglicol) de massa molar $6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PEG 6000) contendo entre 0 e 0,12 de fração mássica. A diferença de pressão sobre a coluna foi mantida constante em 15 kPa, sendo a altura da coluna de líquido determinada utilizando-se a equação 19, após se obter as densidades das soluções a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em um densímetro vibratório (precisão de $0,001 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, modelo DMA 4500M, Anton-Paar, Graz, Áustria). Em ambos os casos, os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, com três repetições em triplicata cada.

$$\Delta P = \rho gh \quad (19)$$

Onde ΔP é a pressão hidrostática sobre a coluna (Pa), ρ é a densidade da fase móvel ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), g é a aceleração devido ao campo gravitacional da Terra ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$) e h é a altura da coluna de líquido (m).

Os dados experimentais obtidos utilizando-se o primeiro método foram ajustados à equação de Darcy para escoamento em meios porosos (Paredes et al., 2004; Guiochon, 2007), para a determinação da permeabilidade ao escoamento:

$$\Delta P = \frac{\eta L}{Ak_p} Q \quad \text{ou} \quad Q = \frac{Ak_p}{\eta L} \Delta P \quad (20)$$

Onde ΔP é a pressão hidrostática sobre a coluna (Pa), η é a viscosidade da fase móvel ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), Q é a vazão volumétrica ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$), A é a área transversal da coluna (m^2), L é a altura do leito (m) e k_p é a permeabilidade do leito (m^2).

Os dados obtidos com o segundo método também foram ajustados à equação 20. No entanto, como a variável independente nesse caso foi a viscosidade da fase móvel, a permeabilidade foi obtida a partir do coeficiente angular da reta em um diagrama do recíproco da viscosidade ($1/\eta$) pela vazão volumétrica (Q).

A viscosidade das soluções de PEG 6000 e da água deionizada foi determinada utilizando-se um viscosímetro rotacional de cilindros concêntricos (modelo DVII-Pro, Brookfield, Middlesboro, EUA), com o rotor (*spindle*) modelo SC4-18 e taxa de deformação variando de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a 260 s^{-1} . A temperatura foi mantida constante em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se um banho termostático (modelo TC-500, Brookfield, com precisão de $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$). Tal procedimento foi realizado com três repetições em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito previamente, após a síntese dos criogéis pAAm, os mesmos foram desidratados para uma avaliação preliminar do processo de polimerização da mistura de AAm-BAAm-AGE. Quando o processo transcorria normalmente, o criogel obtido apresentava-se cilíndrico, poroso, de cor branca e aspecto uniforme, semelhante a uma espuma rígida. Quando havia algum problema na síntese, devido principalmente à polimerização da solução de monômeros antes da redução adequada da sua temperatura, verificava-se que ao se desidratar os criogéis surgiam regiões de deformação na sua estrutura (Figura 1). Provavelmente nas regiões defeituosas dos criogéis ocorreu um processo de geleificação ao invés da criogeificação, levando a uma estrutura semelhante a um gel de eletroforese. Ao ser desidratados, os criogéis defeituosos deformaram-se por não possuir a estrutura definida dos criogéis produzidos corretamente. E ao reidratá-los verificou-se que eles não conseguiam recuperar a forma cilíndrica original (Figura 1B).

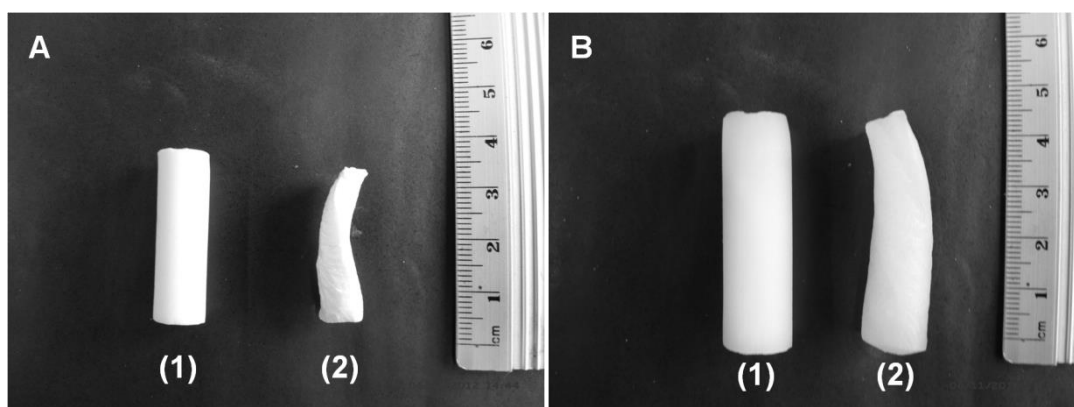


Figura 1: Imagens de criogéis pAAm normal (1) e defeituoso (2) produzidos neste trabalho, antes da enxertia do AMPSA. (A) criogéis desidratados; (B) criogéis reidratados.

Avaliação do processo de enxertia

Os criogéis que não apresentaram defeitos no processo de síntese foram reidratados com água, lavados abundantemente e novamente desidratados, para ter as massas determinadas. A capacidade de inchamento e grau de expansão foram determinados, e na sequência os criogéis foram submetidos ao processo de ativação e enxertia do AMPSA. Tais parâmetros foram novamente determinados e a diferença entre eles foi avaliada pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Os valores do grau, densidade e rendimento de enxertia também foram determinados, assim como a

capacidade iônica do criogel pAAm-SO₃. Todos os valores obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físicos associados ao processo de enxertia do criogel.

Parâmetro	Pré-enxertia	Pós-enxertia
$S / (\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1})$	$20,29^a \pm 1,33$	$19,73^a \pm 2,34$
$ED / (\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	$24,80^a \pm 1,37$	$25,30^a \pm 2,63$
$G / (\%)$	n.a.	$30,77 \pm 5,44$
$D / (10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1})$	n.a.	$1484,64 \pm 262,33$
$E / (\%)$	n.a.	$0,95 \pm 0,23$
$A_m / (10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ criog seco})$	n.a.	$666,57 \pm 76,69$
$A / (10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+}\cdot\text{L}^{-1} \text{ criog hidrat})$	n.a.	$25,72 \pm 2,96$

^a diferença não-significativa pelo teste *t* ($P > 0,05$), na mesma linha.
n.a. determinação de parâmetro não-aplicável.

Verificou-se que a enxertia do AMPSA não afetou a capacidade de inchamento, que apresentou um valor em torno de 20 kg de água para cada quilograma de criogel desidratado, próximo aos cerca de 18 kg·kg⁻¹ encontrados por Savina et al. (2005a) para um criogel com 6% de monômeros (AAm+BAAm) na síntese. Diversos autores relatam valores mais baixos para tal parâmetro, variando entre 3 e 15 kg·kg⁻¹, para os mais diversos tipos de criogéis poliméricos (Arvidson et al., 2002 e 2003; Bereli et al., 2012; Çimen e Denizli, 2012; Uygun et al., 2012). No entanto, em seus cálculos, tais autores não consideram a água livre no interior dos macroporos, retirando-a do seu interior utilizando vácuo. Calculando-se desse modo, no presente trabalho seria obtido um valor em torno de 4 kg·kg⁻¹, em acordo com os demais.

O grau de expansão também não foi afetado pelo processo de enxertia do AMPSA. Tal parâmetro possui grande importância, pois fornece uma relação entre a massa do criogel seco (em condição de armazenamento) e o volume que o mesmo ocupa em condições operacionais. O valor obtido para *ED* demonstrou que uma pequena massa de criogel ocupa um grande volume quando hidratado, o que reforça a natureza porosa de sua estrutura.

O grau de enxertia (*G*) obtido neste trabalho, 30,77%, se mostrou um pouco abaixo dos valores encontrados em geral na literatura (acima de 34%), apesar de em algumas condições terem sido observados valores em torno de 5% (Savina et al.,

2005a e 2005b; Hanora et al., 2006; Srivastava et al., 2012). O valor da densidade de enxertia (D) obtido, $1,48 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, foi intermediário ao encontrado em trabalhos com enxertia de outros grupos ativos em criogéis pAAm, como por exemplo, entre $6,5\times 10^{-5}$ e $1,9\times 10^{-4}$ mols de radicais amina terciária por mililitro de criogel obtidos por Hanora et al. (2006) e entre 4×10^{-3} e 9×10^{-3} mols de radicais carboxil por grama de criogel seco (Savina et al., 2005a). Apesar de existirem trabalhos em que foi feita a enxertia de AMPSA em criogéis de pAAm (Yao et al. 2007; Chen et al. 2008; Yan et al., 2011), não foi encontrado nenhum em que o valor de D foi calculado, não sendo possível a comparação com os resultados do presente trabalho. É importante destacar também que a composição do criogel (concentração e proporção de monômeros) e condições de enxertia afetam tal característica (Savina et al., 2005a).

A capacidade iônica estimada foi inferior ao valor obtido para D . Tal diferença provavelmente se deu devido à reação do grupo sulfona de algumas moléculas de AMPSA enxertadas com radicais aminados (ativados ou não) existentes na estrutura do criogel.

O valor para o rendimento de enxertia (E) obtido, 0,95%, foi inferior aos cerca de 25 a 35% conseguidos em outros trabalhos (Savina et al., 2005a; Srivastava et al., 2012). Provavelmente neste trabalho foi utilizada uma quantidade excessiva da solução de AMPSA, o que implicou no baixo valor de E . Contudo, apesar disso, os outros parâmetros avaliados (G e D) apresentaram-se em acordo com a literatura.

Em um grande número de trabalhos realizados, o processo de enxertia ocorreu de modo estático, com o criogel imerso por um período de tempo na solução ativadora e de enxertia, ou ambas, seguido da lavagem do mesmo (Savina et al., 2005a e 2005b; Hanora et al., 2006; Yao et al., 2007; Chen et al., 2008; Srivastava et al., 2012). Dos criogéis assim preparados, foram analisados apenas parâmetros de enxertia como G , D , E e S . Em outros trabalhos, os criogéis foram utilizados como leitos fixos, sendo as soluções bombeadas para seu interior e lá permanecendo por um certo tempo, estagnadas até a lavagem posterior (Yao et al., 2007; Chen et al., 2008). Criogéis utilizados desse modo são em geral avaliados em aspectos associados ao escoamento em leitos fixos, determinando-se o número de pratos teóricos equivalentes ($HETP$), a distribuição de tempos de residência, o coeficiente de dispersão axial e a permeabilidade ao escoamento (Guiochon, 2007).

No presente trabalho, o processo de ativação e enxertia foi feito de modo dinâmico, com as soluções circulando em circuito fechado continuamente por um período de tempo pré-determinado. Posteriormente os criogéis foram lavados, desidratados e retirados das colunas (seringas) para análises. Para o uso de tal metodologia não se verificou na literatura tamanha abrangência de parâmetros analisados, que permitissem uma caracterização mais completa do material desenvolvido. Possivelmente a lavagem dos criogéis na forma de leitos seja mais eficiente no processo de retirada de moléculas não enxertadas que o processo de lavagem por imersão, resultando consequentemente em menores valores para o grau e densidade de enxertia.

Microscopia ótica e eletrônica

Ao se avaliar a estrutura morfológica dos criogéis, a técnica mais recorrente é a microscopia eletrônica de varredura (MEV)(Arvidsson et al., 2002; Plieva et al., 2004a; Yao et al., 2006b; Dragan et al., 2012; Srivastava et al., 2012; Uygun et al., 2012). São apresentadas nas Figuras 2 A a H micrografias eletrônicas dos criogéis produzidos, antes e após o processo de enxertia.

A partir das micrografias apresentadas na Figura 2 verificou-se que o processo de enxertia do AMPSA não afetou de maneira significativa a estrutura dos poros, que se apresentou bem distribuída e interconectada, com diâmetro variando de 20 μm a 140 μm , condizente com o observado por outros autores (Plieva et al., 2004a e 2004b; Yao et al., 2006b e 2007; Dragan et al., 2012). As paredes dos poros apresentaram espessura variando entre 0,4 μm e 5,4 μm e superfícies com aspecto liso. Nas Figuras 2.G e 2.H são evidenciadas pequenas rugosidades nas superfícies, locais onde provavelmente que ocorreu a enxertia do AMPSA.

As técnicas de microscopia ótica (MO) convencionais são menos onerosas que as técnicas de MEV e seu uso na análise preliminar da estrutura de criogéis apresenta grande potencial, dada a facilidade de aquisição e operação de microscópios convencionais. Assim, foi testada a metodologia proposta para o preparo de lâminas para MO, sendo as micrografias óticas obtidas apresentadas na Figura 3.

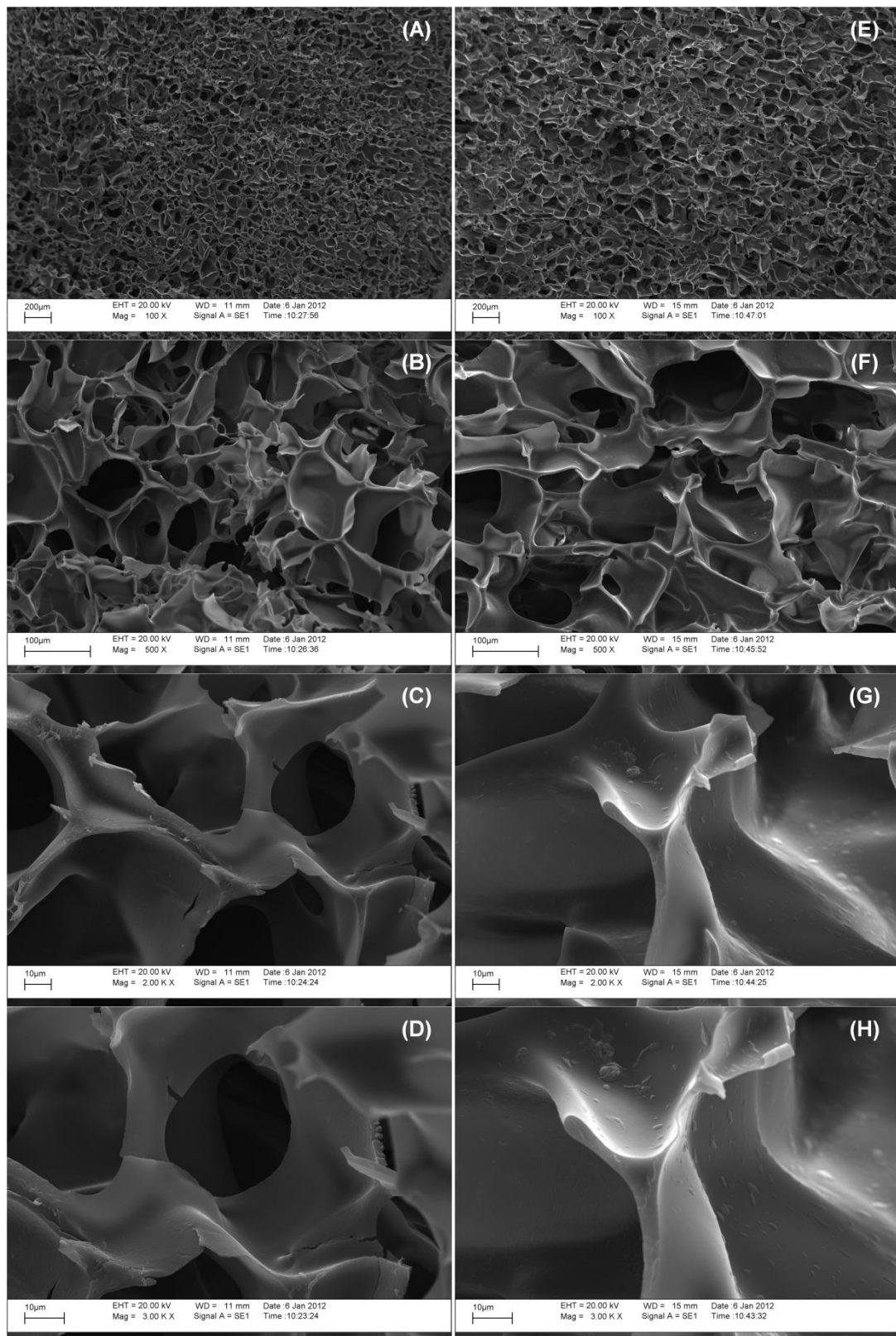


Figura 2: Micrografias de MEV dos criogéis produzidos. (A) a (D) criogel sem AMPSA. (E) a (H) criogel enxertado com AMPSA.

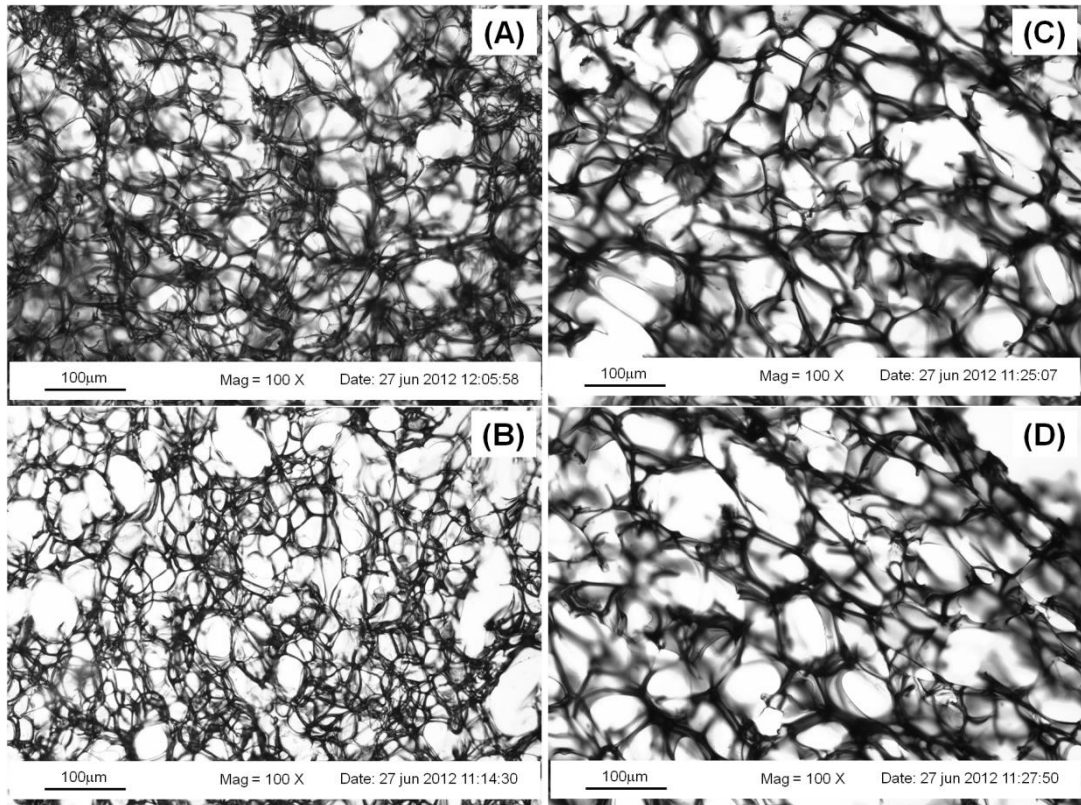


Figura 3: Micrografias óticas dos criogéis produzidos. (A) e (B) criogel sem AMPSA. (C) e (D) criogel enxertado com AMPSA.

Não foi possível visualizar diferenças entre os criogéis com e sem o AMPSA por MO. No entanto, a partir das micrografias óticas foi possível avaliar a estrutura porosa dos mesmos, observando-se poros com diâmetro entre cerca de 20 μm a 150 μm e paredes com espessura entre 0,6 μm a 7,0 μm , similar ao visto nas micrografias eletrônicas. Os valores médios para o diâmetro e espessura dos poros, obtidos a partir da observação nas micrografias óticas e eletrônicas são apresentados na Tabela 2.

Verificou-se que tanto pela técnica de MEV quanto pela técnica de MO foi obtido um diâmetro médio em torno de 70 μm , e que independente da técnica e do criogel ter sido enxertado ou não, em todos os casos verificou-se que havia a distribuição normal para os diâmetros dos poros, comprovado pelo Teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$). No entanto, não se verificou diferenças ao se comparar as técnicas de microscopia ou ao se comparar criogéis enxertados e não-enxertados, aplicando-se o teste t ($P > 0,05$). Já para a espessura dos poros, verificou-se que a partir das micrografias óticas houve uma estimativa superior para seu valor, em torno de 3,6 μm , quando comparado ao valor estimado a partir das micrografias eletrônicas,

em torno de 2,5 μm . Porém em nenhum dos casos, os conjuntos de valores analisados seguiram distribuição normal de probabilidade, verificados pelo teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$). Não é aplicável então a comparação com o teste t nesse caso.

O uso de microscopia ótica mostrou-se satisfatório na avaliação preliminar dos criogéis produzidos e para a estimativa do valor médio do diâmetro e espessura dos poros. O diâmetro dos poros apresentou distribuição normal de tamanho, enquanto que sua espessura não. Essa foi uma observação importante, pois mostra que na dinâmica de formação dos poros no processo de criogeleificação, o tamanho dos cristais de água formados (agentes porogênicos) afetou diretamente o tamanho dos poros, mas afetou pouco sua espessura. É conhecido que no processo de síntese dos criogéis ocorre um processo de concentração da solução em polimerização em regiões onde ainda não se formaram cristais de gelo (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al., 2003; Plieva et al., 2004a e 2004b). Os resultados obtidos sugerem que nesse processo, as regiões onde a polimerização efetivamente ocorre se distribuem de modo homogêneo por entre os cristais de gelo formados, levando à espessura mais uniforme dos poros.

Tabela 2: Diâmetro médio e espessura média dos poros para os criogéis produzidos.

Parâmetro	Micrografia ótica		Micrografia eletrônica	
	Não-enxertado	enxertado	Não-enxertado	enxertado
Diâmetro médio ^a / μm	73,8 \pm 26,8	68,2 \pm 27,2	69,4 \pm 27,4	71,1 \pm 28,1
Espessura média ^b / μm	3,8 \pm 1,4	3,5 \pm 1,3	2,1 \pm 1,8	2,9 \pm 1,2

^a para ambas as técnicas e criogéis enxertados ou não, o diâmetro apresentou distribuição normal, verificado com o teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$).

^b para ambas as técnicas e criogéis enxertados ou não, a espessura não apresentou distribuição normal, verificado com o teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$).

Porosidade

Os resultados obtidos para a porosidade a partir dos métodos testados são apresentados na Tabela 3. Utilizando-se os criogéis produzidos nas seringas verificou-se uma distribuição da água no criogel similar à encontrada por Plieva et al. (2004a e 2004b), com a água livre no criogel (dentro de todos os poros) perfazendo cerca de 91% da sua massa total. Tal valor difere da faixa de 70 a 85% observada para a porosidade em outros trabalhos com criogéis (Yao et al., 2006a, 2006b e 2007). No entanto, em todos eles o valor trabalhado como porosidade refere-se

apenas à fração de macroporos, desconsiderando-se os poros de demais tamanhos. Tal consideração não é errada, dada a importância dos macroporos para os criogéis e suas aplicações com macromoléculas e células inteiras (Arvidsson et al., 2002; Lozinsky et al., 2003), mas pode gerar dúvidas se não for explicitada quando utilizada, principalmente ao se trabalhar com moléculas de menor tamanho, que tenham acesso aos poros menores.

Por isso o método dos momentos com pulsos de acetona também foi usado para avaliar a porosidade no criogel produzido na coluna (um leito monolítico com 9,4 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro), sendo os dados experimentais apresentados na Figura 4 e o valor para a porosidade total apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Porosidade e frações constituintes dos criogéis produzidos.

Método	Parâmetro	Valor
Conteúdo de água	fração de macroporos ($\geq 1 \mu\text{m}$) (φ_M)	$0,755 \pm 0,040$
	fração meso e microporos ($< 1 \mu\text{m}$) (φ_m)	$0,151 \pm 0,033$
	fração de água ligada (φ_{wb})	$0,045 \pm 0,016$
	fração do polímero seco (φ_d)	$0,049 \pm 0,005$
	porosidade total (φ_T)	$0,906 \pm 0,021$
Método dos momentos	porosidade total (ε_T) ^a	$0,912 \pm 0,003$
	porosidade aparente (ε_{ap}) ^{a,b}	$0,829 \pm 0,003$

^a valores obtidos para o criogel na coluna. O erro apresentado é o intervalo de confiança (IC_{95%}) do parâmetro ajustado por meio de regressão linear.

^b valor obtidos para pulsos de lisozima em condições não-adsortivas.

Verificou-se que o valor obtido para a porosidade total foi próximo entre os dois métodos utilizados, mostrando que a utilização da técnica baseada na injeção de pulsos de um traçador, desenvolvida originalmente para leitos fixos empacotados, pode ser usada na determinação da porosidade de um leito monolítico polimérico de pAAm.

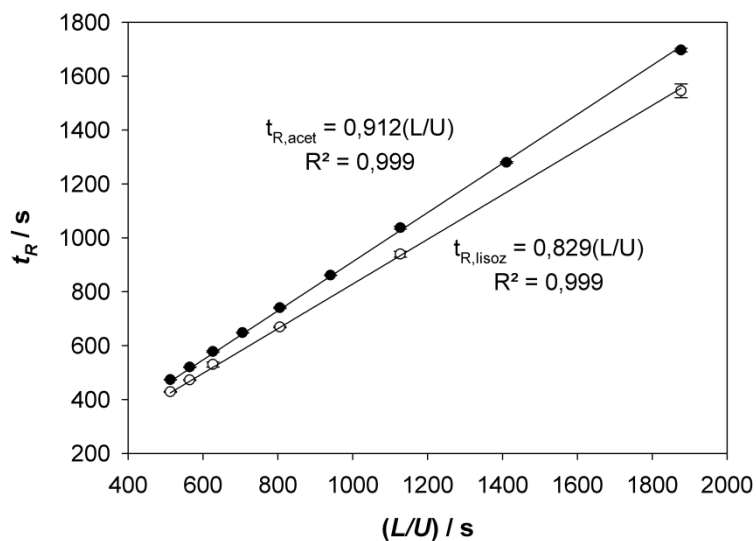


Figura 4: Dados experimentais e equações ajustadas na determinação da ε_T e ε_{ap} com pulsos de acetona (●) e lisozima (○), respectivamente, utilizando-se o método dos momentos (coluna com 9,4 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro).

Também foi estimado o valor da porosidade aparente do criogel específica para a lisozima, uma macromolécula com massa molar em torno de 14 kDa e raio de giração em torno de 15 Å (Tyn e Gusek, 1990), de grande interesse industrial (Mecitoğlu et al., 2006). O valor encontrado de cerca de 83% mostra que a lisozima possui acesso aos macroporos (~75%) e a parte dos poros de menor dimensão, que têm contribuição na dinâmica do escoamento dessa molécula por tal matriz. Logo se torna importante considerar a fração de poros menores ao se trabalhar com macromoléculas, como a apresentada.

DTR, dispersão axial e HETP

A distribuição dos tempos de residência (*DTR*) para pulsos de acetona e lisozima em diferentes velocidades de escoamento da fase móvel são apresentadas na Figura 5.

Para ambos traçadores verificou-se assimetria nas curvas, com a formação de caudas estendidas, indicando que efeitos de dispersão axial e mistura são significativos na coluna produzida. Tal fato pode ser atribuído à falta de homogeneidade na estrutura ou distribuição dos poros, que surgem quando do processo de síntese do criogel (Yao et al., 2006a). Provavelmente os efeitos observados neste caso ocorreram mais devido à grande variação no tamanho dos poros (de 20 μm a 140 μm, aproximadamente) do que da sua distribuição pelo

criogel, uma vez que a partir das micrografias obtidas não se constatou regiões específicas com tamanhos de poros diferenciados, com a formação de *clusters*.

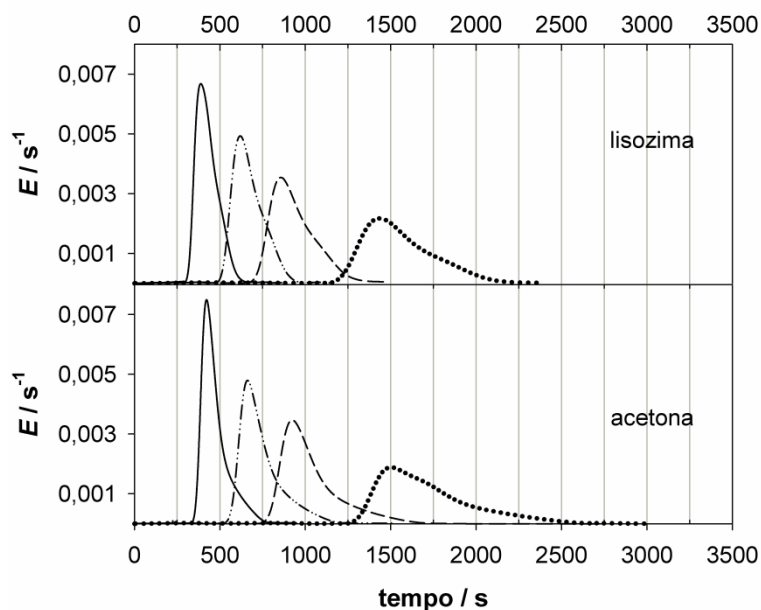


Figura 5: *DTR* para pulsos de lisozima e acetona a diferentes velocidades superficiais de escoamento, na coluna de criogel pAAm-SO₃ (● $5,01 \times 10^{-5} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; – – $8,34 \times 10^{-5} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; -·-·- $1,17 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; — $1,83 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

A partir dos dados experimentais dos pulsos de acetona e lisozima foram determinados os valores para o tempo de retenção e variância dos picos, utilizando-se as equações 11 e 13. O uso do método dos momentos para determinar tais valores mostrou-se adequado, visto que, dada a assimetria observada, outros métodos, como o da altura de meio-pico, 3σ , 4σ e 5σ , podem incorrer em maiores erros (Bidlingmeyer e Warren Jr., 1984; Ortner e Rohwer, 1999; Guiochon, 2006). Os valores obtidos para o coeficiente de dispersão axial aparente e *HETP* são apresentados nas Figuras 6 e 7.

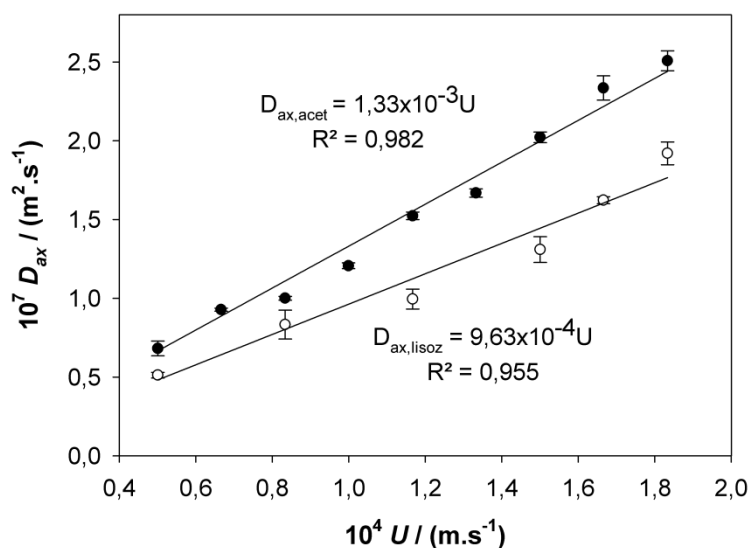


Figura 6: Coeficientes de dispersão axial aparente para acetona (●) e lisozima (○) a diferentes velocidades superficiais de escoamento, em condições não-adsortivas na coluna de criogel produzida.

Os valores observados, entre $5,0 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, são similares aos observados por Yao et al. (2006a) e Yun et al (2009) para colunas de criogéis de pAAm com o mesmo diâmetro e comprimento do leito semelhante (9,5 cm e 9,7 cm, respectivamente) ao do presente trabalho.

A partir da Figura 7 verificou-se que a *HETP* da coluna produzida pouco variou em função da velocidade de escoamento da fase móvel, sendo observado um valor em torno de 2,3 mm utilizando-se pulsos de lisozima e em torno de 2,8 mm utilizando-se pulsos de acetona. Outros autores também verificaram para criogéis pAAm um pequeno efeito da velocidade de escoamento sobre a *HETP*. No entanto, os valores reportados foram menores (entre 0,4 mm e 2,0 mm) que os observados no presente trabalho (Arvidsson et al., 2003; Plieva et al., 2004a e 2004b; Yao et al., 2006a e 2007; Yun et al., 2007; Xu et al., 2010; Yan et al., 2011).

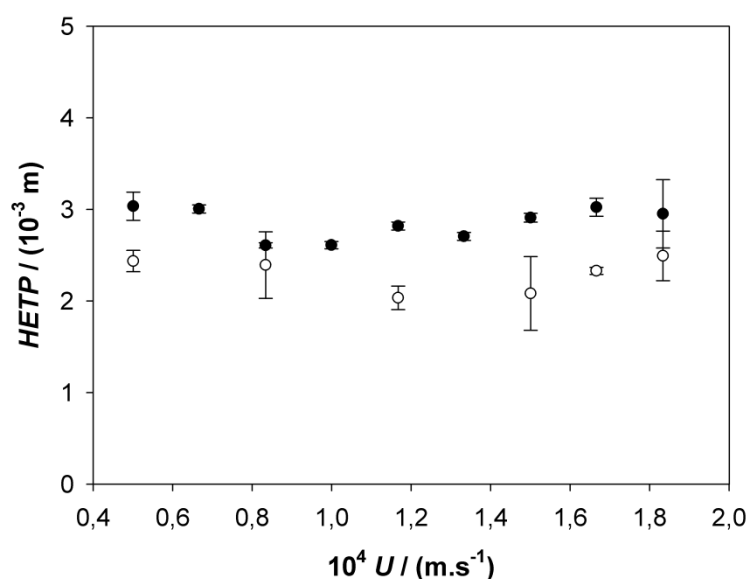


Figura 7: *HETP* da coluna de criogel produzida em função da velocidade superficial de escoamento, para pulsos de acetona (●) e lisozima (○).

Diversos fatores afetam a *HETP* e o coeficiente de dispersão axial em criogéis por alterar sua estrutura de poros, como a composição e condições de síntese, entre outras (Arvidsson et al., 2003; Plieva et al., 2004b). No entanto, nesse trabalho possivelmente a diferença na *HETP* observada foi devida ao método utilizado. Em alguns trabalhos com criogéis foi relatada assimetria nas curvas experimentais de *DTR* (Yao et al., 2006a; Yao et al., 2007) e o uso do método da altura de meio-pico para a determinação do número de pratos teóricos totais e consequentemente da *HETP* (Bidleingmeyer e Warren Jr., 1984). No entanto, segundo Bidleingmeyer e Warren Jr. (1984), Ortner e Rohwer (1999) e Guiochon (2006), o método dos momentos incorre em menores erros nos resultados, não sendo afetado pela assimetria dos picos, o que não ocorre com outros métodos, como o da altura de meio-pico, 3σ , 4σ e 5σ , entre outros.

Para efeito de comparação são apresentados na Figura 8 os valores obtidos da *HETP* da coluna produzidos com pulsos de acetona, utilizando-se o método dos momentos e o método da altura de meio-pico. Ficou evidente que com a utilização do método da altura de meio-pico, os valores da *HETP* se aproximaram da faixa encontrada por outros autores (Plieva et al., 2004a e 2004b; Yao et al., 2006a; Yao et al., 2007). Contudo, o maior erro associado a esse método devido à assimetria das curvas de *DTR* pode levar a uma superestimação do número de pratos teóricos totais do criogel produzido, não sendo recomendado o seu uso nestes casos.

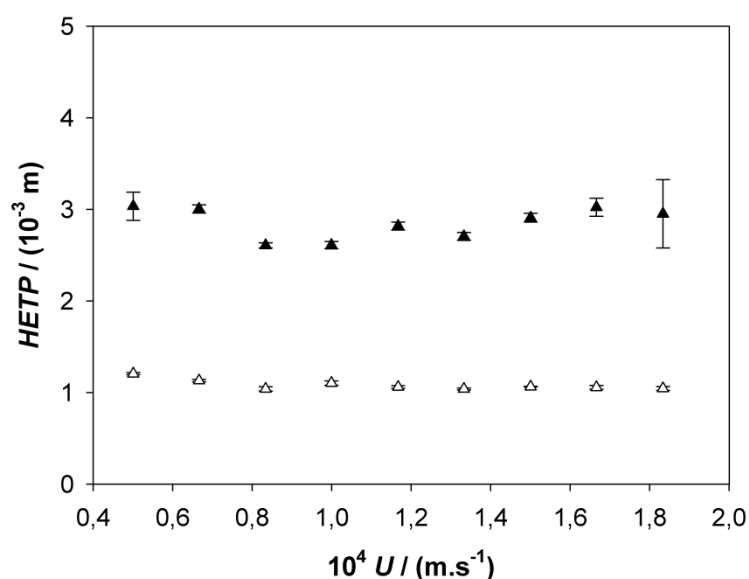


Figura 8: Comparação entre o método dos momentos (▲) e o método da altura de meio-pico (△) na determinação da *HETP* da coluna de criogel produzida, utilizando-se pulsos de acetona.

Permeabilidade ao escoamento

A resistência ao escoamento em leitos porosos é um dos parâmetros frequentemente avaliados no desenvolvimento de novos criogéis. O estudo dessa resistência evoluiu da medição da vazão da fase móvel a uma pressão constante (Arvidsson et al., 2002 e 2003), passando pela comparação entre a vazão nominal de uma bomba e o valor real percolado através do leito de criogel (Plieva et al., 2004a e 2004b) até a medição da vazão da fase móvel na saída da coluna em função da pressão hidrostática sobre ela, determinando-se a constante de permeabilidade ao escoamento com base na lei de Darcy (Yao et al., 2006b e 2007; Chen et al., 2008). Este último é o método mais usado na atualidade, sendo a água o fluido usado em tais experimentos.

A potencial aplicação de criogéis na purificação de biocompostos a partir de meios concentrados ou não-clarificados (Arvidsson et al., 2002; Lozinsky et al., 2003) implicaria na necessidade de percolar os leitos com soluções mais viscosas que a água pura, o que não havia sido avaliado nos estudos anteriores de permeabilidade ao escoamento. Essa foi a proposta desenvolvida no presente trabalho.

Para tanto, foram utilizadas soluções de PEG 6000 em concentrações variando de 0 a 0,12 (fração mássica). Segundo Minim et al. (2010), nesta faixa de concentração e temperatura as soluções de PEG 6000 exibem comportamento

newtoniano, sendo adequadas para a determinação da constante de permeabilidade a partir da metodologia proposta. Os valores experimentais de densidade e viscosidade para as soluções de PEG 6000 utilizadas como fase móvel são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores experimentais de densidade (ρ) e viscosidade (η), a 25 °C, das soluções de PEG 6000 utilizadas nos ensaios.

<i>Fração mássica de PEG 6000 (x_m)</i>	ρ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	η^a ($10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$)
0,00 (água pura)	997,24 ± 0,04	1,023 ± 0,003
0,02	1000,52 ± 0,02	1,475 ± 0,005
0,04	1003,82 ± 0,07	1,927 ± 0,006
0,06	1007,19 ± 0,14	2,432 ± 0,007
0,08	1010,61 ± 0,22	3,104 ± 0,005
0,10	1014,03 ± 0,25	3,965 ± 0,004
0,12	1017,58 ± 0,26	5,010 ± 0,004

^a O erro apresentado é o intervalo de confiança (IC_{95%}) do parâmetro ajustado por meio de regressão linear aos dados de tensão × deformação para cada fração mássica usada.

Os resultados experimentais para a obtenção da constante de permeabilidade ao escoamento do leito do criogel produzido variando-se a pressão hidrostática sobre a coluna ou a viscosidade da fase móvel são apresentados na Figura 9. A partir dos coeficientes angulares das retas ajustadas estimou-se o valor para a constante de permeabilidade ao escoamento (k_p), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores estimados para a contante de permeabilidade ao escoamento, k_p , a partir da variação da pressão hidrostática sobre a coluna ou da viscosidade da fase móvel.

Método	k_p^a (10^{-13} m^2)
variando a queda de pressão	8,48 ± 0,43
variando a viscosidade da fase móvel	8,46 ± 0,37

^a Os erros apresentados foram calculados a partir do intervalo de confiança (IC_{95%}) dos coeficientes angulares das equações ajustadas e das incertezas experimentais

Verificou-se que os valores obtidos foram próximos entre si, sendo ambos métodos satisfatórios na determinação de k_p . O uso de um fluido viscoso com comportamento newtoniano, que se assemelha mais a um sistema real utilizado em processos de purificação, mostrou-se adequado na determinação da constante de permeabilidade ao escoamento. Os valores obtidos também se apresentaram dentro da faixa observada para criogéis, entre 10^{-14} m² e 10^{-11} m², nos casos em que se utilizou a água como fase móvel (Yao et al., 2006b; Yun et al., 2007; Chen et al., 2008; Li et al., 2009; Xu et al., 2010).

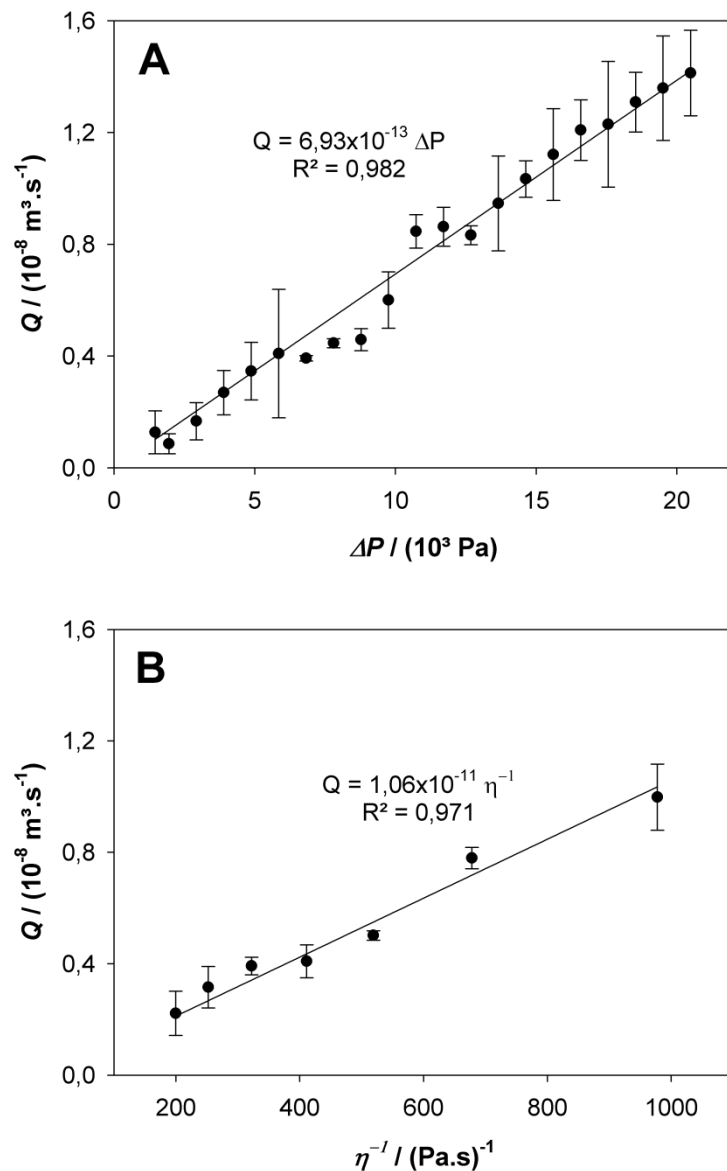


Figura 9: Dados experimentais (●) e equações ajustadas para a vazão volumétrica em função da queda de pressão (A) e do recíproco da viscosidade (B) na coluna de criogel produzida.

De modo geral, a resistência ao escoamento pelos criogéis supermacroporosos é baixa, tendo Plieva et al. (2004a) observado que o efeito destes é muito pequeno quando comparado à resistência da coluna vazia. Provavelmente no presente trabalho o efeito das tubulações de entrada e saída da coluna, com 1,0mm de diâmetro interno, foi mais relevante na resistência ao escoamento que o criogel em si.

4. CONCLUSÕES

Foram avaliadas algumas modificações no processo de produção e caracterização de criogéis. A enxertia ocorreu de modo dinâmico, ao invés do estático, com as soluções ativadora e de AMPSA sendo bombeadas em circuito fechado através dos criogéis. Tal alteração não provocou mudanças consideráveis na capacidade de inchamento (*S*) e no grau (*G*) e densidade (*D*) de enxertia, mas o rendimento (*E*) da mesma foi inferior ao reportado na literatura. O uso da microscopia ótica para estimar o tamanho dos poros mostrou-se adequado, sendo os valores obtidos similares aos encontrados por microscopia eletrônica. O método dos momentos, mais adequado quando é verificada assimetria nas curvas de *DTR*, foi usado na determinação da porosidade total do criogel, coeficiente de dispersão axial aparente e *HETP*. O valor para porosidade total foi igual à fração total de água no criogel, mostrando coerência nos resultados; o coeficiente de dispersão axial foi similar e a *HETP* foi maior que o observado na literatura. No entanto o método da altura de meio-pico, o mais utilizado atualmente em criogéis, pode levar a um número de pratos teóricos superestimado. A determinação da resistência ao escoamento variando-se a viscosidade de um fluido newtoniano à pressão constante, ao invés do método tradicional, com água pura e variando-se a pressão hidrostática sobre a coluna, também apresentou resultados satisfatórios, com grande concordância entre os métodos. O uso das alternativas propostas foi adequado na caracterização de criogéis, abrindo novas perspectivas nesse segmento.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pelas análises de microscopia ótica e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. (2006). Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive & Functional Polymers*, v.66, 1263-1271.

BERELI, N.; TÜRKMEN, D.; KÖSE, K.; DENIZLI, A. (2012). Glutamic acid containing supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel disks for UO_2^{2+} removal. *Materials Science and Engineering C*, v.32, 2052-2059.

BIDLINGMEYER, B. A.; WARREN, Jr., F. V. (1984). Column efficiency measurement. *Analytical Chemistry*, v.56, 1583A-1596A.

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

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. (2008). 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, 71-77.

ÇİMEN, D.; DENIZLI, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.93, 29-35.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. (2012). Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. *Chemical Engineering Journal*, v.204-206, 198-209.

ERZENGIN, M.; ÜNLÜ, N.; ODABAŞI, M. (2011). A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu^{2+} -attached sporopollenin particles. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 484-490.

FURUSAWA, T.; SUZUKI, M.; SMITH, J. M. (1976). Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques. *Catalysis Review: Science and Engineering*, v.13, 43-76.

GREENSPAN, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry*, v.81A, 89-96.

GUIOCHON, G. (2006). The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1126, 6-49.

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

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

HJERTÉN, S.; LIAO, J.-L.; ZHANG, R. (1989). High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *Journal of Chromatography A*, v.473, 273-275.

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

LI, Y.; GU, B.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. (2009). 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, 5525-5532.

LOZINSKY, V. I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, v.71, 489-511.

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

MECITOĞLU, Ç.; YEMENICIOĞLU, A.; ARSLANOĞLU, A.; ELMACI, Z. S.; KOREI, F.; ÇETIN, A. E. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, v.39, 12-21.

MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; AMARAL, I. V.; REIS, M. F. T.; OLIVEIRA, A. A. A.; MINIM, V. P. R. (2010). Density and viscosity of binary and ternary mixtures of poly(ethylene glycol) and poly(acrylic acid, sodium salt) at temperatures of (288.15 to 318.15) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.55, 2328-2332.

MONTGOMERY, D.C. (2001). *Design and analysis of experiments*, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 684p.

ORTNER, E.K.; ROHWER, E. R. (1999). Trapping efficiency of aqueous pollutants in multichannel thick-film silicone-rubber traps for capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.863, 57-68.

PAREDES, B.; GONZÁLEZ, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, J. M. (2004). Particulate poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) material for protein

separation by anion-exchange chromatography. *Separation and Purification Technology*, v.40, 243-250.

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

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

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

SAVINA, I.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. (2005a). Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. *Polymer*, v.46, 9596-9603.

SRIVASTAVA, A.; SHAKYA, A. K.; KUMAR, A. (2012). Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, 373-381.

TYN, M. T.; GUSEK, T. W. (1990). Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, 327-338.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. (2012). Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.

WANG, L.; SHEN, S.; HE, X.; YUN, J.; YAO, K.; YAO, S.-J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, 237-242.

XU, P.; YAO, Y.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2010). Preparation of supermacroporous composite cryogel embedded with SiO₂ nanoparticles. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.18, 667-671.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2011). Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.

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

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. (2006b). Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1109, 103-110.

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

YUN, J.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2009). Modeling of breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. *Journal of Separation Science*, v.32, 2601-2607.

YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F.; YAO, K. (2007). One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. *Journal of Chromatography B*, v.860, 57-62.

ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. (2006). Experimental and modeling study of adsorption in preparative monolithic silica column. *Chemical Engineering and Processing*, v.45, 150-160.

ARTIGO 02

RELAÇÕES DE EQUILÍBRIO E TERMODINÂMICA DO PROCESSO DE TROCA CATIÔNICA DE LISOZIMA EM UM CRIOGEL POLIMÉRICO SUPERMACROPOROSO

Resumo

Técnicas cromatográficas são essenciais na purificação de biocompostos e os processos de troca iônica estão entre os métodos mais usados. É constante o desenvolvimento de novos materiais e, neste sentido, os criogéis poliméricos supermacroporosos estão entre o que existe de mais moderno. Compreender as relações de equilíbrio e os fenômenos envolvidos em tais processos é de grande importância para a melhoria e aplicação dos mesmos. Assim sendo, neste trabalho foram determinadas as isotermas de adsorção da lisozima em um criogel polimérico supermacroporoso trocador catiônico (criogel pAAm-SO₃) e foi avaliado o efeito da temperatura e força iônica nas isotermas, verificando-se o ajuste do modelo de Langmuir, sob o ponto de vista da troca iônica, e do modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA). Além disso, foi proposta uma nova abordagem na análise termodinâmica dos fenômenos envolvidos que permitiu avaliar o processo de troca iônica como um todo e, de forma independente, os processos de adsorção da proteína e dessorção dos contraíons. Verificou-se que o aumento da temperatura aumentou a capacidade adsorptiva do trocador, ocorrendo o inverso para o aumento da força iônica. Os modelos testados ajustaram-se satisfatoriamente, e os parâmetros obtidos estão em acordo com informações da literatura que sugerem que a interação lisozima-trocador ocorrem prioritariamente em uma região limitada da proteína, próxima ao resíduo Arg128 e que a orientação da mesma quando adsorvida tende de vertical para lateral com o aumento da concentração de sal. Com base na análise termodinâmica, verificou-se que os processos ocorrem de forma espontânea e que o processo de troca iônica foi mais afetado pela adsorção da proteína do que pela dessorção dos contraíons. O processo de troca iônica mostrou-se endotérmico e entropicamente dirigido, com o fenômeno dominante provavelmente associado à desestruturação das duplas camadas elétricas das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

Palavras-chave: isotermas, Langmuir, SMA, troca iônica, cromatografia, análise termodinâmica.

1. INTRODUÇÃO

Técnicas cromatográficas são as mais importantes no desenvolvimento de processos de purificação de biocompostos, compondo em média de duas a três etapas destes (Jungbauer e Hanh, 2008; Lenhoff, 2011). A cromatografia de troca iônica tem grande importância ao se trabalhar com macromoléculas biológicas, devido à seletividade e capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos. É muito usada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas, baseada na adsorção diferenciada de compostos carregados (positiva ou negativamente) em uma superfície com cargas opostas (Chen et al., 2010).

O desenvolvimento de novos adsorventes e trocadores iônicos que visam a otimizar tais processos é constante. Na vanguarda deste desenvolvimento estão os monólitos, estruturas porosas altamente interconectadas formadas em corpo único, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (Jungbauer e Rahn, 2008). Dentre estes, destacam-se os criogéis poliméricos, caracterizados por possuírem elevada porosidade com poros grandes (diâmetro acima de 10 μm) interconectados (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al. 2003). Tais criogéis podem ser facilmente modificados, sendo verificado um grande crescimento do seu uso para a purificação de macromoléculas (Bilakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Çimen e Denizli, 2012; Srivastava et al., 2012; Sun et al., 2012; Uygun et al., 2012; Yun et al., 2012).

A otimização de processos cromatográficos de separação demanda um profundo conhecimento das relações de equilíbrio e de características de escoamento e transferência de massa. Determinar o equilíbrio adsorptivo é normalmente o primeiro passo para essa caracterização, pois fornece as informações sobre condições individualizadas de separação (Tao et al., 2011).

Diversos modelos vêm sendo utilizados para descrever o equilíbrio nos processos adsorptivos de proteínas, sendo o mais comum o estudo em condições isotérmicas utilizando-se modelos como os de Langmuir e o de Freundlich (Bayramoğlu et al., 2007; Lira et al., 2009; Bowes et al., 2009; Huang et al., 2010; Tao et al., 2011). Misak (1993 e 1995) observou que o uso de modelos de isotermas de adsorção para descrever o equilíbrio de troca iônica, apesar das similaridades, não é totalmente adequado, devendo as diferenças entre as mesmas ser consideradas. Ao se trabalhar com macromoléculas como proteínas o uso de modelos mais adequados

à troca iônica é ainda mais recomendado, como é o caso do modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA) proposto por Brooks e Cramer (1992).

Além das relações de equilíbrio, compreender os mecanismos envolvidos na adsorção (ou troca iônica) de proteínas é de fundamental importância (Lin et al. 2002), pois este é um processo complexo e somente um profundo entendimento do efeito dos muitos parâmetros envolvidos (pH, temperatura, tipo e quantidade de sais) permite sua melhoria racional (Dieterle et al., 2008). Estudos utilizando técnicas calorimétricas, correlações matemáticas, modelagem computacional, entre outras, vêm sendo feitos visando a elucidar tais mecanismos e suas implicações na estrutura das proteínas (Gerstner et al., 1994; Bayramoğlu et al., 2007; Dieterle et al., 2008; Dimer et al., 2008; Lira et al., 2009; Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010; Blaschke et al., 2011).

Uma proteína adequada aos estudos com novos trocadores catiônicos é a lisozima, uma proteína amplamente utilizada como modelo em ensaios teóricos e experimentais (Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010). É uma proteína pequena, de cadeia única, composta por 129 resíduos de aminoácidos e massa molar em torno de 14300 Da (Canfield, 1963). Entre os resíduos de aminoácidos estão seis lisinas e nove argininas, o que lhe conferem um caráter básico (Dimer e Hubbuch, 2007), sendo seu ponto isoelétrico em torno de 11,3 (Wetter e Deutsch, 1951). Possui atividade catalítica na hidrólise das β -ligações entre o ácido murâmico e a N-acetilglicosamina componentes do mucopolissacarídeo das paredes celulares de bactérias, apresentando desse modo atividade antimicrobiana (Başar et al., 2007). Por isso, essa enzima vem sendo amplamente empregada na indústria farmacêutica e de alimentos (Bayramoğlu et al., 2007; Anirudhan e Rejeena, 2012).

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi determinar as isotermas de adsorção da lisozima da clara do ovo em um novo trocador catiônico polimérico supermacroporoso sob diferentes condições de temperatura e força iônica da fase móvel, além de avaliar, de acordo com fundamentos termodinâmicos, os efeitos do fenômeno de adsorção da proteína dentro do processo de troca iônica como um todo.

2. TEORIA

Isotermas de adsorção

Apesar do fenômeno da adsorção poder ocorrer em qualquer tipo de interface, na aplicação de técnicas cromatográficas para a purificação de biocompostos tal fenômeno só tem relevância quando uma das fases é sólida. Assim, temos que as isotermas de adsorção são relações de equilíbrio, à temperatura constante, entre a quantidade de um determinado soluto adsorvido na superfície de um sólido (denominado adsorvente) e sua concentração na fase fluida (LeVan et al., 1997).

Entre os modelos de isotermas de adsorção existentes, um dos mais simples e utilizados é o modelo de Langmuir (1918), que considera a adsorção em uma monocamada, sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos. Tal modelo foi proposto inicialmente para a adsorção de gases em superfícies sólidas, sendo posteriormente estendido o seu uso para a adsorção de solutos a partir de soluções líquidas (Guiochon et al., 1994; Gritti et al., 2003). O modelo de Langmuir é apresentado abaixo na equação 1.

$$q = q_s \frac{bC}{1 + bC} \quad (1)$$

Onde q é a quantidade de soluto adsorvido ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) no equilíbrio, q_s é a capacidade máxima de saturação do adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), b é relacionada à constante de equilíbrio de adsorção ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$) e C é a concentração de soluto em solução, também no equilíbrio ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Apesar das similaridades com o processo de adsorção e a possibilidade de utilização dos mesmos modelos para descrever o equilíbrio entre as fases, o processo de troca iônica efetivamente envolve a competição entre diferentes espécies iônicas por sítios ativos na superfície de materiais adsorventes carregados positivamente ou negativamente. Tal fato deve ser considerado, alterando-se o modo de utilização e interpretação de modelos tradicionalmente empregados na adsorção (Boyd et al., 1947; Misak, 1993 e 1995).

O processo de troca iônica entre uma molécula de interesse em solução e os contraíons (monovalentes) que neutralizam uma superfície carregada eletricamente pode ser representado genericamente pela equação 2.



Onde C e q são as concentrações nas fases móvel e estacionária ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) respectivamente, e ν indica a quantidade de contraíons trocados por unidade de moléculas de interesse. O subscrito I denota o contraíon.

Assumindo que no processo de troca iônica as mesmas considerações do modelo de Langmuir são válidas, teremos que para cada contraíon deslocado uma molécula ocupará seu lugar. Neste caso, temos que $\nu = I$, e a constante de equilíbrio para o processo em questão é igual a:

$$K_{TI} = \frac{qC_I}{Cq_I} \quad (3)$$

Onde K_{TI} é a constante de equilíbrio para o processo de troca iônica (adimensional), C e q são, respectivamente, as concentrações de soluto na solução e no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e C_I e q_I são, respectivamente, as concentrações do contraíon na solução e no adsorvente C e q são, respectivamente, as concentrações de soluto na solução e no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

O total de sítios ativos é o máximo valor possível de moléculas que interagem com a superfície:

$$q_{max} = q + q_I \quad (4)$$

Onde: q_{max} é a capacidade máxima adsortiva do trocador ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), q é a concentração de soluto no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e q_i é a concentração de contraíons no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Substituindo a equação 4 na equação 3:

$$K_{TI} = \frac{q}{C} \frac{C_I}{(q_{max} - q)} \quad (5)$$

Re-arranjando:

$$q = \frac{q_{max}K_{TI}C}{C_I + K_{TI}C} \quad (6)$$

Sendo a fase móvel uma solução-tampão, com a concentração do contraíon muito maior que a da molécula de interesse (diluída), tem-se que o valor de C_I é aproximadamente constante.

Fazendo $K_I = K_{TI}/C_I$, temos:

$$q = q_{max} \frac{K_1 C}{1 + K_1 C} \quad (7)$$

Onde K_1 é um parâmetro da equação ($L \cdot mol^{-1}$)

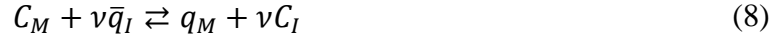
A equação 7 é matematicamente idêntica à equação proposta por Langmuir para a adsorção. Entretanto, deve-se destacar que seu significado não é o mesmo, o que deve ser considerado nos cálculos e interpretação dos fenômenos observados.

Apesar de tal modelo ser amplamente empregado com sucesso para descrever o equilíbrio de adsorção e troca iônica de macromoléculas como proteínas, as equações ajustadas adquirem certo caráter empírico, uma vez que a consideração do modelo de Langmuir de que cada sítio de adsorção interage com apenas uma única molécula, e vice-versa, dificilmente será atendida.

Outro modelo, mais adequado para descrever o equilíbrio de troca iônica de macromoléculas em um sistema líquido-sólido, é o modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas, ou modelo SMA, proposto por Brooks e Cramer (1992). Tal modelo considera que macromoléculas carregadas, como proteínas, ao interagirem com o trocador iônico podem, através de um impedimento estérico, recobrir alguns sítios de troca, que então se tornam indisponíveis no sistema. O formalismo do modelo SMA é específico para representar o equilíbrio multicomponente sal-proteína em processos de troca iônica, sendo baseado nas seguintes considerações (Brooks e Cramer, 1992; Jozwik et al., 2005):

- 1) A solução e a fase adsorvente são termodinamicamente ideais, permitindo o uso de valores de concentração ao invés da atividade;
- 2) A natureza multiponto de interações da proteína com o adsorvente pode ser expressa por uma carga característica determinada experimentalmente;
- 3) Interações competitivas podem ser representadas pela lei de ação das massas, onde a eletroneutralidade da fase estacionária é mantida;
- 4) A interação de macromoléculas com o adsorvente causa uma cobertura sobre alguns contraíons ligados à fase estacionária, que ficam indisponíveis para a troca com outros solutos;
- 5) O efeito do coíon pode ser desprezado no processo de troca iônica;
- 6) Os parâmetros de equilíbrio no formalismo do modelo SMA são constantes e independentes das concentrações de proteína e sal. Assim, efeitos não-ideais, como formação de agregados ou mudanças na estrutura terciária não são considerados.

Adotando-se o modelo SMA, o processo de troca iônica entre uma macromolécula proteína e os contraíons monovalentes de sal disponíveis é dado por:



Onde a barra no termo \bar{q}_I se refere aos contraíons de sal disponíveis para troca. O subscrito M denota a proteína (macromolécula) ν agora passa a ser a carga característica da macromolécula.

A constante de equilíbrio para o processo de troca iônica é definida por:

$$K_{TI} = \left(\frac{q_M}{C_M}\right) \left(\frac{C_I}{\bar{q}_I}\right)^\nu \quad (9)$$

Onde: K_{TI} é a constante de equilíbrio para o processo de troca iônica (adimensional), C_M e q_M são, respectivamente, as concentrações da macromolécula na solução e no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), C_I e \bar{q}_I são, respectivamente, as concentrações do contraíon na solução e no adsorvente ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), e ν é a carga característica da macromolécula (adimensional).

A concentração de contraíons de sal estericamente recobertos, indisponíveis para a troca com a macromolécula é dada por:

$$\hat{q}_I = \sigma q_M \quad (10)$$

Onde \hat{q}_I é a concentração de contraíons no adsorvente estericamente recobertos ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e σ é o fator estérico da proteína.

Depois que ocorre a adsorção da proteína, no equilíbrio, a concentração total dos contraíons presentes na fase sólida é dada por:

$$Q_I = \bar{q}_I + \sigma q_M \quad (11)$$

Como a eletroneutralidade é requerida:

$$\Lambda \equiv \bar{q}_I + (\sigma + \nu)q_M \quad (12)$$

Onde Λ é a capacidade iônica total do trocador ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), expressa em íons monovalentes

Substituindo a equação 12 na equação 9, temos que o modelo SMA para a troca iônica entre uma única espécie de proteína e um contraíon monovalente é dado por (suprimindo-se o índice M):

$$C = \left(\frac{q}{K_{TI}}\right) \left(\frac{C_I}{\Lambda - (\nu + \sigma)q}\right)^\nu \quad (13)$$

Propriedades termodinâmicas

Compreender e caracterizar os mecanismos envolvidos na adsorção ou troca iônica de proteínas é de grande importância para se conhecer melhor esse fenômeno (Lin et al. 2002; Dieterle et al., 2008). A magnitude destas interações é governada pela energia livre do sistema antes e após as interações ocorrerem, e podem ser atribuídas às mudanças na entalpia e entropia do sistema (Lin et al., 2002). Assim torna-se de grande importância a determinação da variação destas propriedades.

A variação de energia livre de Gibbs padrão para o processo de troca iônica pode ser estimada utilizando-se a seguinte equação (Gerstner et al., 1994):

$$\Delta G_{TI}^0 = -RT \ln K_{TI} \quad (14)$$

Onde ΔG_{TI}^0 é a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) para o processo de troca iônica, R é a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K) e K_{TI} é a constante de equilíbrio (adimensional) obtida do modelo SMA ou do modelo de Langmuir.

Tal variação de energia considera o processo de adsorção da proteína e dessorção do contraíon de sal. A fim de se avaliar exclusivamente a variação de energia livre de Gibbs padrão para o processo de adsorção da proteína, pode-se assumir que o processo de troca iônica ocorre em duas etapas. Na primeira ocorre a dessorção do contraíon salino e na segunda ocorre a adsorção da proteína.

$$\Delta G_{TI}^0 = \Delta G_{sal}^0 + \Delta G_{ads}^0 \quad (15)$$

Onde ΔG_{TI}^0 é a a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) para o processo de troca iônica, ΔG_{ads}^0 é a a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) apenas para o processo de adsorção da proteína e ΔG_{sal}^0 é a a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) apenas para o processo de dessorção dos contraíons.

Assim, a constante de equilíbrio exclusivamente para o processo de adsorção da proteína será dada pela razão entre as concentrações molares de proteína nas fases sólida e na solução. Para soluções diluídas, $C \rightarrow 0$, temos que $q \rightarrow 0$, e o número de sítios disponíveis para troca tende à capacidade iônica total (Gerstner et al., 1994).

Com essa aproximação e usando a constante de equilíbrio do modelo SMA, pode-se calcular a variação de energia livre de Gibbs padrão para o processo de adsorção, a diferentes temperaturas e forças iônicas da solução, usando as equações 16 e 17 (Gerstner et al., 1994; Ladiwala et al., 2005).

$$K_{ad} = K_{TI} \left(\frac{A}{C_s} \right)^v = \frac{q}{C} \quad (16)$$

E conseqüentemente:

$$\Delta G_{ad}^0 = -RT \ln K_{ad} \quad (17)$$

Onde K_{ad} é a constante de equilíbrio do processo de adsorção da proteína e ΔG_{ad}^0 é a variação da energia livre de Gibbs padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) para o processo de adsorção da proteína.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado a partir do modelo de Langmuir, assim tem-se que os valores de K_{TI} e K_{ad} obtidos a partir deste modelo são dados por:

$$K_{TI} = K_1 C_I \quad (18)$$

$$K_{ad} = \frac{q}{C} \Rightarrow K_{ad} = K_{TI} \frac{q_I}{C_I} \quad (19)$$

Para uma solução de proteína diluída, q tende a zero, e $q_{max} = q_I$. Assim:

$$K_{ad} = K_{TI} \frac{q_{max}}{C_I} = q_{max} K_1 \quad (20)$$

E os valores de K_{TI} e K_{ad} assim obtidos também podem ser usados para se determinar a variação de energia livre de Gibbs padrão para os processos em questão.

As técnicas de calorimetria são as mais adequadas para a determinação da variação de entalpia padrão para o processo em questão por fornecer resultados experimentais com alta precisão e repetibilidade (Dieterle et al., 2008). No entanto, quando isso não é possível o uso de correlações matemáticas podem prover boas informações que auxiliam na elucidação dos fenômenos observados. Entre elas, está a análise de van't Hoff, que na forma linear pode ser expressa como (Lin et al., 2002; Bayramoğlu et al., 2007):

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (21)$$

Onde: K é a constante de equilíbrio (adimensional) do processo de interesse (troca iônica ou adsorção), ΔH^0 e ΔS^0 são, respectivamente, a variação de entalpia padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) e a variação de entropia padrão ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) para o processo termodinâmico em questão; e K é a constante de equilíbrio para tal processo (troca iônica ou adsorção).

Assim, os valores de ΔH_{TI}^0 e ΔS_{TI}^0 podem ser calculados utilizando-se os valores de K_{TI} , enquanto que os valores para o processo de adsorção podem ser

obtidos utilizando-se os valores de K_{ad} . A partir da análise linear de van't Hoff é possível se estimar um único valor médio para a ΔH_{TI}^0 e outro para a ΔS_{TI}^0 , na faixa de temperatura avaliada, para cada valor de força iônica estudada (o mesmo vale para a adsorção). Os valores para o processo de dessorção dos contraíons foi obtido por diferença entre o processo de troca iônica e o processo de adsorção da proteína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados fosfatos de sódio monobásico e bibásico, ambos anidros, cloreto de sódio e lisozima de clara de ovo de galinha (pureza >90%, código L6876), adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Todos os reagentes químicos utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultra-pura. O teor de proteína da lisozima comercial foi avaliado pelo método de Kjeldhal, utilizando-se um fator de conversão igual a 6,25 (Chang, 1999).

O trocador catiônico utilizado nos experimentos foi um criogel polimérico constituído por acrilamida, bis-acrilamida e alil glicidil éter, enxertado com o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (criogel pAAm-SO₃), sintetizado no próprio laboratório, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (artigo 01). Algumas características físicas e químicas do trocador catiônico utilizado, bem como da proteína em estudo, são apresentadas na Tabela 1. A representação artística da proteína foi feita no *software* USCF Chimera package v.1.7 (Pettersen et al., 2004) com textos e modificações feitos no *software* MS-PowerPoint® 2007 (Microsoft, Redmond, EUA). Como referência para a estrutura da proteína foi utilizado o arquivo código 1AKI do *Protein Data Bank* (pdb).

Tabela 1: Características do adsorvente e da lisozima utilizados neste estudo.

Características do adsorvente	Valor
grau de expansão (ED) / (L·kg ⁻¹)	25,01
diâmetro médio de poro (d_m) / (µm)	70
cap. iônica mássica (A_m) / (10 ⁻³ mol _{Na} ⁺ ·kg ⁻¹ criog seco)	666,57
cap. iônica volumétrica (A) / (10 ⁻³ mol _{Na} ⁺ ·L ⁻¹ criog hidrat)	25,72
Características da lisozima	Valor
massa molar (MM) / (g·mol ⁻¹) ^a	14307
ponto isoelétrico (pI) ^b	11,35
carga líquida em pH 7,2 ^c	~7,3

^a Canfield (1963). ^b Wetter e Deutsch (1951). ^c Kuehner et al. (1999).

3.2. Obtenção dos dados experimentais

Para a obtenção dos dados experimentais foi utilizado o método estático ou de batelada. Os criogéis utilizados foram imersos por 24 h em uma solução de HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, lavados e imersos três vezes em água deionizada durante 4 h e então imersos em uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2 por 12 h (*overnight*) para seu condicionamento. Em seguida, os criogéis foram desidratados a $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 48 h, esfriados em dessecador, cortados manualmente em pequenos pedaços cúbicos com cerca de 1,5 mm de aresta, utilizando-se uma lâmina de aço inoxidável, e misturados em um frasco de vidro para uniformização do material adsorvente.

As isotermas de adsorção foram determinadas com os experimentos desenvolvidos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5^2 completo, com cinco temperaturas de trabalho (10°C , 20°C , 30°C , 40°C e 50°C) e cinco concentrações de NaCl na fase móvel ($0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), totalizando 25 curvas experimentais.

Para a obtenção de cada curva isoterma foram utilizados entre 8 e 10 pontos experimentais, com concentração inicial de lisozima variando de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a $40,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2,8 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com três repetições cada.

A fase móvel foi uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2, obtida da mistura em proporções adequadas de fosfato de sódio monobásico e dibásico, adicionada ou não de cloreto de sódio conforme a necessidade, sendo o valor final do pH conferido e ajustado com uma solução de NaOH $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando-se um potenciômetro de bancada (precisão de 0,01, Modelo Q400A, Quimis, São Paulo, Brasil). A solução-tampão sem adição de NaCl possuía uma concentração de íons Na^+ igual a $0,0299 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, calculada a partir da equação de Henderson-Hasselbach, utilizando-se o segundo pKa do ácido fosfórico (7,21).

Para cada ponto experimental, cerca de 0,01 g do adsorvente desidratado foi pesado em um microtubo de centrífuga com volume nominal de 1,5 mL, utilizando-se uma balança analítica (precisão de 0,0001 g, Modelo AG200, Gehaka, São Paulo, Brasil). Adicionou-se ao tubo 1,0 mL de solução-tampão com a força iônica e concentração inicial de proteína desejada, que foi deixado em agitação orbital a 25 rpm durante 12 h (*overnight*), à temperatura constante, mantida utilizando-se uma

estufa BOD (precisão de 0,2 °C, Modelo TE-391, Tecnal, São Paulo, Brasil). Uma representação esquemática do sistema de agitação é mostrada na Figura 1.

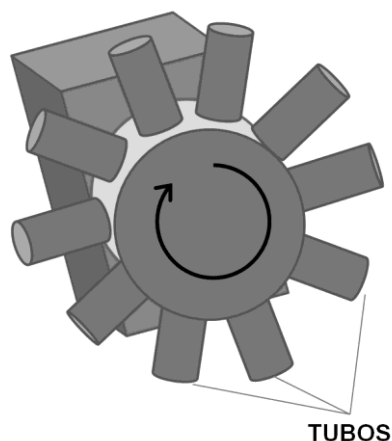


Figura 1: Representação esquemática do sistema de agitação de tubos nos experimentos de determinação das curvas de isotermas de adsorção.

Decorrido o tempo de agitação, alíquotas de 0,7 mL de cada tubo foram retiradas e transferidas para outros microtubos, que foram centrifugados a $2000 \times g$ por 5 minutos (modelo MPW-350, MPW Med. Instruments, Varsóvia, Polônia), para quantificação da proteína presente no sobrenadante por leitura direta em espectrofotômetro (modelo Libra S70, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) no comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se uma microcubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm e volume nominal de 1,0 mL. Todas as amostras foram diluídas com a respectiva solução-tampão usada, em fatores variáveis para que os valores encontrados se situassem no intervalo obtido da curva de calibração previamente determinada para cada força iônica utilizada no experimento, variando-se a concentração de lisozima entre $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($7,0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e $0,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com três repetições em duplicata. Para verificar se a concentração de NaCl adicionado à solução-tampão teve efeito nas curvas de calibração, foi realizado um teste estatístico de identidade de modelos de regressão, baseado no teste F a 5% de probabilidade (Regazzi, 1993).

A concentração de proteína adsorvida foi determinada a partir de balanços de massa, inicialmente por unidade de massa do criogel desidratado, e posteriormente por unidade de volume do criogel hidratado utilizando-se o grau de expansão do criogel (ver Tabela 1).

3.3. Determinação dos parâmetros dos modelos de isotermas ajustados

Uma vez obtidos os valores experimentais das isotermas de adsorção, dois modelos foram avaliados para se verificar o ajuste aos dados: o modelo de Langmuir (equação 7) e o modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA) (Brooks e Cramer, 1992, equação 13).

Os parâmetros q_{max} e K_I foram estimados por meio de regressão não-linear, utilizando-se o *software* SigmaPlot[®] v.11 (Systat Software, Inc., Chicago, EUA).

Para a determinação dos parâmetros do modelo SMA, foram utilizadas duas relações matemáticas obtidas a partir das equações 12 e 13. Na primeira delas, tem-se que para soluções diluídas ($C \rightarrow 0$) $q \approx 0$ e a equação 13 se reduz a (Brooks e Cramer, 1992; Gallant et al., 1995):

$$\lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{q}{C} \right) = K_{TI} \left(\frac{\Lambda}{C_I} \right)^v \quad (22)$$

Tal limite, utilizando-se o modelo de Langmuir, é igual a:

$$\lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{q}{C} \right) = q_{max} K_I \quad (23)$$

Combinando as equações 22 e 23, tem-se que:

$$q_{max} K_I = K_{TI} \left(\frac{\Lambda}{C_I} \right)^v \Rightarrow \log(q_{max} K_I) = \log(K_{TI} \Lambda^v) - v \log(C_I) \quad (24)$$

Desse modo, a partir do ajuste prévio do modelo de Langmuir aos dados experimentais em diferentes forças iônicas, foram obtidos os parâmetros K_I e q_{max} . Determinados K_I e q_{max} e conhecendo-se a concentração do íon Na^+ associada a cada par (C_I), foi plotado um gráfico do logaritmo de $(q_{max} K_I)$ versus o logaritmo da concentração do contraíon monovalente. Do coeficiente angular da reta foi obtido o valor da carga característica da proteína (v) e do coeficiente linear determinou-se o valor da constante de equilíbrio K_{TI} . Tal procedimento é similar ao realizado por Whitley et al. (1989).

A outra relação matemática, que permitiu estimar o valor do fator estérico (σ), foi obtida quando a concentração de proteína tende a um valor muito grande ($C \rightarrow \infty$). Nessa condição tem-se que $\bar{q}_I \rightarrow 0$ e:

$$\lim_{C \rightarrow \infty} (q) = \frac{\Lambda}{\sigma + v} = q_{max}^{SMA} \quad (25)$$

Em contraste com a isoterma de Langmuir, a capacidade de saturação máxima na isoterma SMA é independente da concentração do contraíon na fase móvel. Assim, pode-se dizer que o valor de q_{max}^{SMA} é igual ao valor de q_{max} obtido do modelo de Langmuir quando a concentração de NaCl adicionada é igual a zero. Na prática, no entanto, isso só é verificado para baixos valores da concentração do contraíon, o que limita o uso desta técnica (Brooks e Cramer; 1992).

Entretanto, é conhecido que a concentração de sal afeta a quantidade de proteína adsorvida em um trocador iônico (Vaňková et al., 2007; Lira et al., 2009; Tao et al., 2011). Chen et al. (2006) propuseram, uma alternativa ao modelo SMA tradicional, ajustando o valor da carga característica da proteína, ν , para cada concentração de contraíons utilizada, mantendo-se o fator estérico σ constante. No presente trabalho foi avaliada uma alternativa diferente, mantendo-se a carga característica constante e sendo o fator estérico calculado para cada diferente concentração de sal adicionada ao sistema. Com isso, vários valores de σ foram calculados utilizando-se a equação 25 e o valor de q_{max} do modelo de Langmuir ajustado para cada valor de temperatura e força iônica estudada. Tal alternativa foi proposta com base no fato de que para um valor de pH constante em torno de 7,0, a variação da concentração de contraíons em solução afeta mais os aspectos relacionados à conformação de proteínas do que aspectos relacionados à sua carga líquida (Khuener et al., 1999; Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010).

A avaliação do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi feita com base no coeficiente de determinação (R^2) e descrição do fenômeno observado.

3.4. Determinação das propriedades termodinâmicas

Buscando compreender melhor o fenômeno de troca iônica que envolve os contraíons de sódio e as moléculas de lisozima, foram determinados os valores de variação de entalpia padrão (ΔH^0), variação de entropia padrão (ΔS^0) e variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0) para o processo em questão.

Tais valores foram determinados estimando-se inicialmente os parâmetros dos modelos de isotermas de Langmuir e SMA. Então, foram determinados os valores de K_{TI} e K_{ad} a partir dos modelos de Langmuir e SMA.

Os valores para ΔG_{TI}^0 e ΔG_{ad}^0 foram estimados utilizando-se as equações 14, e 17, respectivamente. ΔH_{TI}^0 e ΔS_{TI}^0 foram estimados a partir da equação 20, utilizando-se os valores de K_{TI} obtidos anteriormente. O mesmo procedimento foi

adotado para se estimar ΔH_{ad}^0 e ΔS_{ad}^0 , utilizando-se valores previamente determinados para K_{ad} . Todas as três propriedades termodinâmicas estudadas foram estimadas utilizando-se os valores de K_{TI} e K_{ad} obtidos a partir do modelo de Langmuir e do modelo SMA. Valores de ΔG_{sal}^0 , ΔH_{sal}^0 e ΔS_{sal}^0 para o processo de dessorção dos contraíons também foram estimados, calculados a partir da diferença entre os respectivos valores para o processo de troca iônica e adsorção da proteína, obtidos a partir do modelo de Langmuir apenas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a quantificação da proteína, inicialmente uma curva-padrão para cada concentração de sal foi obtida, e os parâmetros ajustados foram submetidos a um teste para a verificação da identidade das equações obtidas (Regazzi, 1993). Verificou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as equações ajustadas, sendo adequada a quantificação de lisozima utilizando-se uma única equação apresentada abaixo.

$$Abs = 3,52 \times 10^4 C_{lis} + 2,76 \times 10^{-3} \quad ; \quad R^2 = 0,999 \quad (26)$$

Onde: Abs é o valor da absorvância observada (adimensional) e C_{lis} é o valor da concentração de lisozima ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Isotermas de adsorção

Na Figura 2 são apresentadas as curvas experimentais das isotermas de adsorção da lisozima no trocador catiônico pAAm-SO₃, assim como os ajustes dos modelos de Langmuir e SMA.

A quantidade de proteína adsorvida aumentou com o aumento da temperatura, sendo observado o inverso para o aumento da força iônica. Tal comportamento é similar ao relatado por diversos autores (Bayramoğlu et al., 2007; Vaňková et al., 2007; Dismer et al., 2008; Lira et al., 2009; Tao et al., 2011).

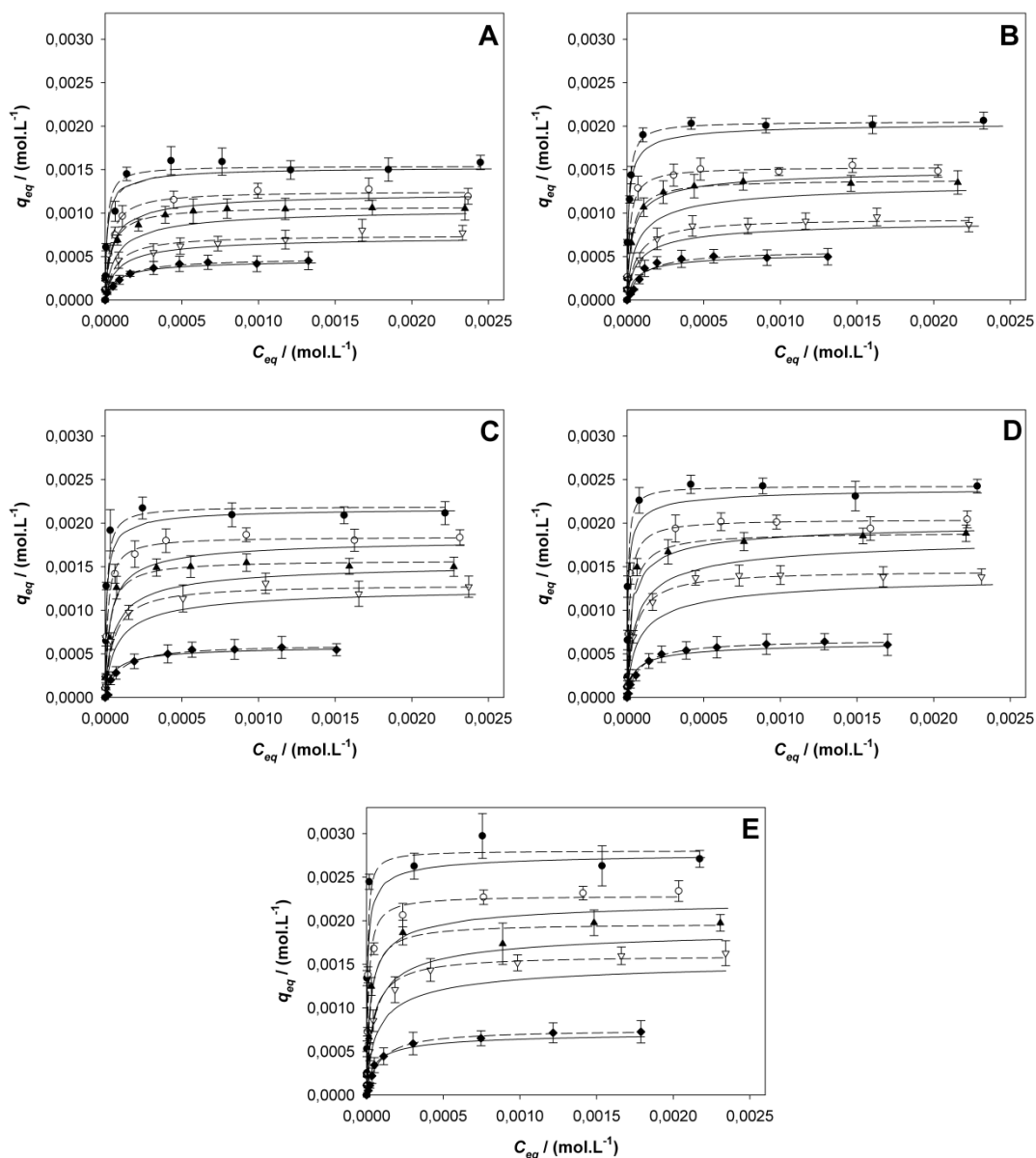


Figura 2: Isothermas de adsorção da lisozima no trocador catiônico pAAm-SO₃ a diferentes temperaturas e concentrações de NaCl adicionado. (A) 10 °C; (B) 20 °C; (C) 30 °C; (D) 40 °C; (E) 50 °C. (●) 0,0 mol·L⁻¹ NaCl; (○) 0,05 mol·L⁻¹ NaCl; (▲) 0,10 mol·L⁻¹ NaCl; (▽) 0,15 mol·L⁻¹ NaCl; (◆) 0,20 mol·L⁻¹ NaCl. (---) modelo de Langmuir; (—) modelo SMA.

Os parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir e SMA são apresentados na Tabela 2. O modelo de Langmuir apresentou melhor ajuste aos dados experimentais quando comparado ao modelo SMA, que tendeu a subestimar a concentração de proteína adsorvida no equilíbrio, principalmente para os valores intermediários de concentração de contraíons estudados.

Tabela 2: Parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir e SMA.

T (°C)	C _s (mol·L ⁻¹)	Modelo de Langmuir			Modelo SMA			
		q _{max} (10 ⁻³ mol·L ⁻¹)	K _l (10 ⁴ L·mol ⁻¹)	R ²	K _{TI}	v	σ	R ²
10	0,00	1,54	8,13	0,96	184,47	1,46	15,21	0,96
	0,05	1,25	3,02	0,99			19,05	0,99
	0,10	1,08	2,54	0,99			22,42	0,99
	0,15	0,75	1,55	0,95			32,89	0,97
	0,20	0,48	1,05	0,99			51,93	0,98
20	0,00	2,05	9,36	0,98	355,36	1,60	10,93	0,98
	0,05	1,53	5,82	0,99			15,20	0,97
	0,10	1,38	3,43	0,99			16,98	0,97
	0,15	0,94	1,61	0,97			25,79	0,98
	0,20	0,57	1,07	0,95			43,68	0,95
30	0,00	2,19	9,83	0,91	400,24	1,53	10,20	0,91
	0,05	1,85	5,95	0,99			12,41	0,98
	0,10	1,57	3,51	0,98			14,81	0,93
	0,15	1,3	1,84	0,97			18,31	0,95
	0,20	0,61	1,12	0,98			40,61	0,99
40	0,00	2,43	16,11	0,94	700,38	1,73	8,87	0,93
	0,05	2,04	6,55	0,98			10,85	0,94
	0,10	1,90	3,67	0,99			11,84	0,94
	0,15	1,46	2,05	0,99			15,91	0,97
	0,20	0,66	1,19	0,99			37,13	0,99
50	0,00	2,80	17,63	0,92	927,22	1,77	7,40	0,93
	0,05	2,29	8,24	0,94			9,48	0,91
	0,10	1,97	4,06	0,98			11,30	0,94
	0,15	1,60	2,33	0,99			14,26	0,99
	0,20	0,75	1,24	0,99			32,45	0,99

C_s => concentração de NaCl adicionada à solução-tampão.

Obs: a concentração de íons Na⁺ na solução-tampão original foi de 0,0299 mol·L⁻¹.

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que, dentro da faixa de temperatura estudada, o processo de troca iônica torna-se mais favorável com a elevação da temperatura, fato evidenciado pelo aumento nos valores de K_l e K_{TI} . A carga característica foi pouco afetada pelo aumento da temperatura, sendo observado um efeito maior no fator de impedimento estérico, principalmente em função da concentração de NaCl adicionada à solução-tampão. Tal fato, associado ao decréscimo dos valores de q_{max} com o incremento da força iônica sugere mudanças na conformação da lisozima ao interagir com o trocador catiônico. Tais considerações são discutidas com mais detalhes adiante.

A lisozima é uma proteína elipsoide, com dimensões de cerca de 45 Å no eixo maior e 30 Å no eixo menor, com dois domínios distintos. Um contendo os terminais amino e carboxil e a maior parte das α -hélices, e o outro contendo duas estruturas em β -folha, com o sítio catalítico da enzima (entre os resíduos de aminoácidos Glu35 e Asp52) localizado entre os domínios (Blake et al., 1967; Rupley e Gates, 1967; Strinadka e James, 1991). Apesar dos muitos resíduos de aminoácidos básicos conferirem à lisozima uma elevada carga líquida em pH neutro, muitos deles encontram-se localizados em uma região restrita do domínio que contém os aminoácidos terminais da proteína, sendo portanto esta a região preferencial de adsorção nos processos de troca catiônica (Dimer e Hubbuch, 2007; Dimer et al., 2008; Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010). Tais características podem ser observadas na Figura 3.

Dimer e Hubbuch (2007) observaram que a interação entre a lisozima e o trocador iônico ocorreu preferencialmente no entorno dos resíduos Lys1 e Lys33, e que com o aumento da quantidade de proteína adsorvida, ocorreu a mudança de uma orientação lateral (com o eixo maior sobre o adsorvente) para uma orientação mais vertical, reduzindo sua área sobre o adsorvente.

Kubiak-Orowska e Mulheran (2010) simulando a interação de lisozima com superfícies carregadas verificaram que o aumento da força iônica pouco alterou a estrutura da lisozima em solução, mas afetou a interação com a superfície adsorvente. Esses autores concluíram que foi o resíduo Arg128 quem prioritariamente fez interações eletrostáticas com a superfície, exercendo papel essencial na adsorção da lisozima em superfícies carregadas. Outros resíduos, como Arg5, Arg125 e Lys1, exerceram papel secundário por fazerem interações de hidrogênio com as camadas de água orientadas sobre a superfície adsorvente, colaborando na estabilização da molécula de proteína adsorvida, que adquiriu uma orientação intermediária entre a lateral e a vertical, tendendo a esta última com a redução da força iônica.

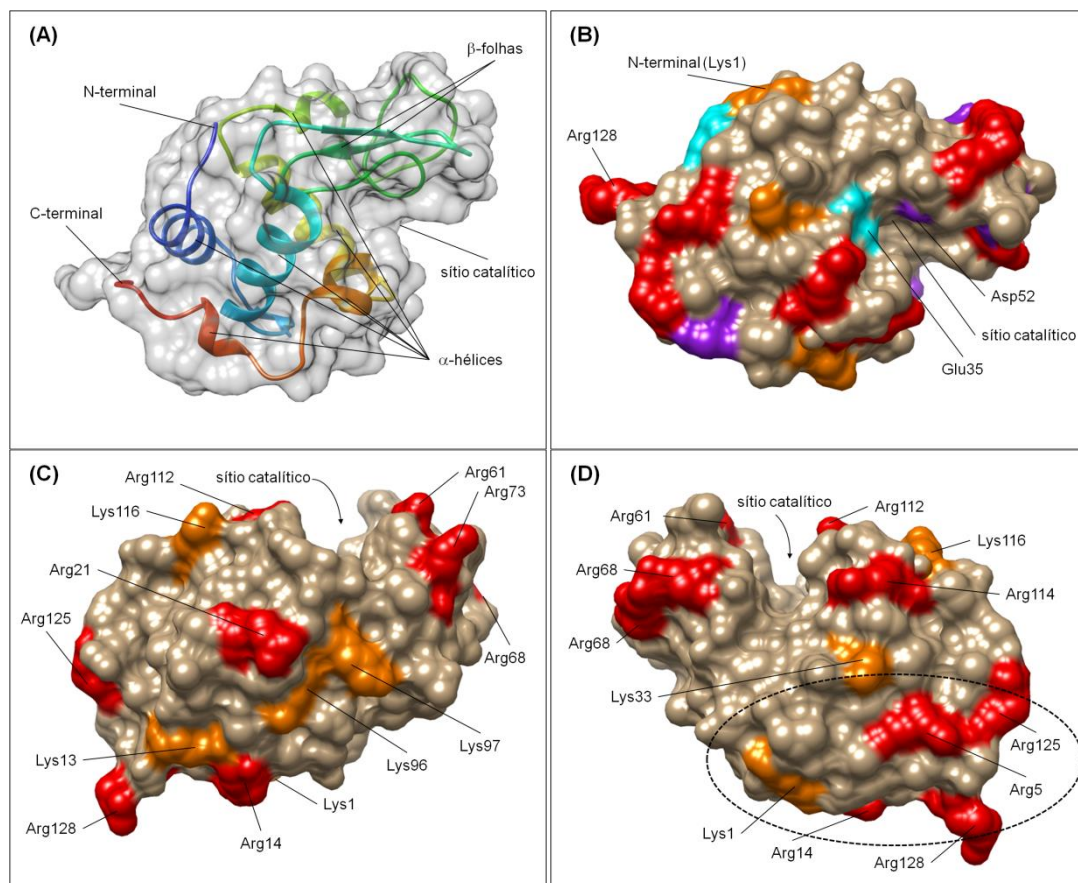


Figura 3: Representações artísticas para a lisozima. (A) destaque para a estrutura secundária da proteína. (B) destaque para os principais resíduos de aminoácidos carregados e o sítio catalítico. Vermelho: resíduos de arginina; laranja: lisina; roxo: ácido aspártico e azul: ácido glutâmico. (C) e (D) destaque para os resíduos básicos e para a região de maior preferência para interação no processo de troca catiônica.

As informações obtidas no presente trabalho se mostraram em acordo com o proposto por outros autores (Dimer e Hubbuch, 2007; Dimer et al., 2008, Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010). O reduzido valor ajustado para a carga característica reforçou o fato de que poucos resíduos de aminoácidos da proteína interagem com os sítios ativos do criogel pAAM-SO₃. O pequeno aumento observado em ν com o aumento da temperatura possivelmente indicou que outros resíduos além do Arg128 passaram a interagir mais fortemente com o trocador.

Já o aumento no valor do fator de impedimento estérico com o aumento da concentração de NaCl na solução-tampão demonstrou que a orientação da lisozima adsorvida tendeu a se tornar mais lateral, recobrindo um maior número de sítios de ligação. A redução de σ com o aumento da temperatura, para uma mesma concentração de NaCl, indicou que a orientação da lisozima tende a ser mais vertical,

aumentando a capacidade adsortiva do criogel, fato este observado experimentalmente. Maiores discussões sobre os fenômenos observados, embasados por fundamentos termodinâmicos, são relatadas na sequência.

Propriedades termodinâmicas

Os resultados obtidos para a variação de energia livre de Gibbs padrão para os processos estudados são apresentados na sequência (Figura 4 e Tabela 3).

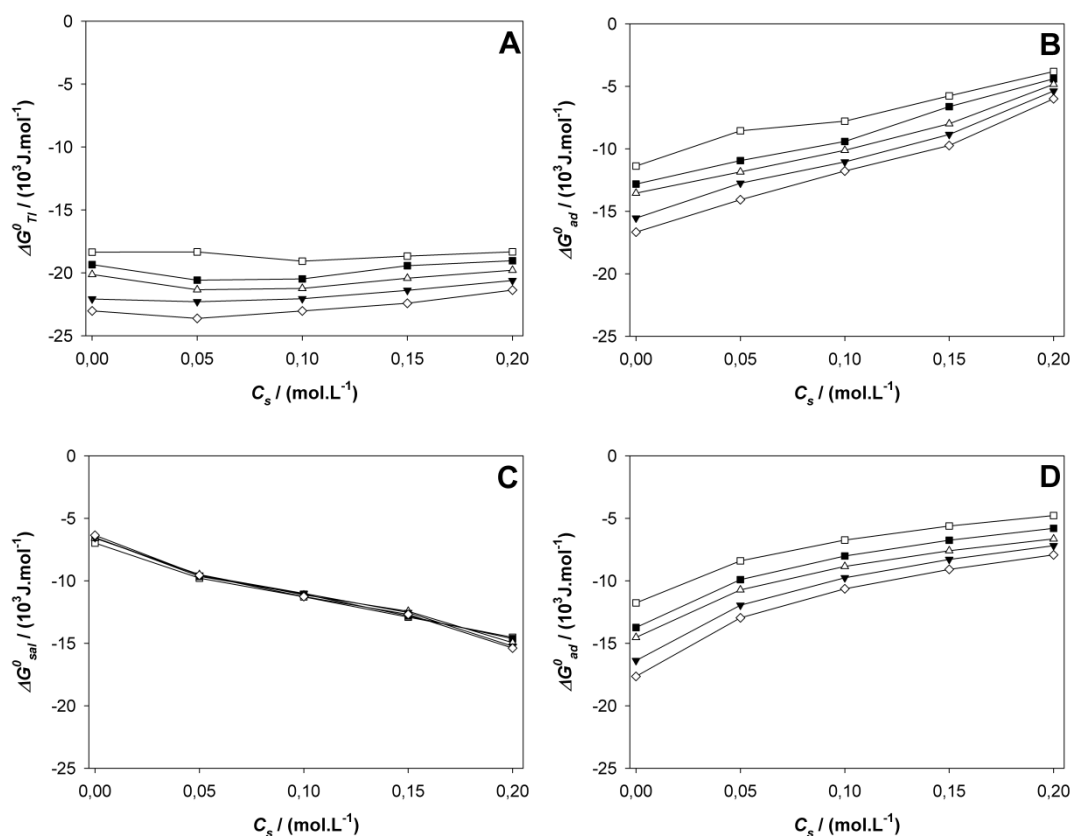


Figura 4: Valores experimentais de ΔG^0 em função da temperatura e concentração de NaCl (C_s). (A) processo de troca iônica como um todo; (B) processo de adsorção da proteína; (C) processo de dessorção do contraíon. Em (A), (B) e (C), valores calculados a partir do modelo de Langmuir. (D) ΔG^0 para o processo de adsorção da proteína, calculado a partir do modelo SMA. (\square) 10 °C; (\blacksquare) 20 °C; (\triangle) 30 °C; (\blacktriangledown) 40 °C; (\diamond) 50 °C.

O processo de troca iônica como um todo foi espontâneo ($\Delta G^0_{TI} < 0$) e pouco afetado pela concentração de NaCl (C_s) adicionada à fase móvel (Figura 4A), sendo maior o efeito causado pela temperatura, o que foi reforçado pelos valores apresentados na Tabela 3, obtidos a partir do modelo SMA. Os valores para o processo de adsorção (ΔG^0_{ad}) obtidos a partir dos modelos de Langmuir (Figura 4B)

e SMA (Figura 4D) apresentaram o mesmo comportamento, diminuindo com o aumento da temperatura e aumentando com o incremento da C_s . Já para o processo de dessorção dos contraíons, verificou-se (Figura 4C) que o aumento da C_s reduziu o valor de ΔG_{sal}^0 , tornando o processo mais espontâneo, não sendo observado efeito da temperatura neste caso.

Tabela 3: Valores de ΔG_{TI}^0 , ΔH_{TI}^0 e $T\Delta S_{TI}^0$ calculados a partir do modelo SMA.

T	ΔG_{TI}^0	ΔH_{TI}^0	$T\Delta S_{TI}^0$
(°C)	($10^3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$)	($10^3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$)	($10^3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
10	-12,28		
20	-14,32		
30	-15,10	29,78	45,21
40	-17,06		
50	-18,36		

Para o cálculo de $T\Delta S_{TI}^0$ foi utilizado o valor de $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (303,15 K)

Apesar do processo de dessorção dos contraíons ter se tornado mais espontâneo com o aumento da C_s , o inverso ocorreu para o processo de adsorção da proteína. Tais resultados sugerem que o processo de adsorção da proteína foi mais determinante para o processo de troca iônica avaliado que o processo de dessorção dos contraíons, visto que a quantidade de lisozima adsorvida diminuiu com o aumento da C_s . Tal informação, no entanto, não foi percebida quando o processo de troca iônica foi avaliado como um todo, em que se verificou pouco ou nenhum efeito do aumento da C_s sobre ΔG_{TI}^0 . O fato do aumento da temperatura não ter afetado a espontaneidade do processo de dessorção dos contraíons (Figura 4C) corroborou com tais afirmações, indicando que, com a variação da temperatura, foi o processo de adsorção da proteína quem mais contribuiu para as variações observadas no processo de troca iônica.

Valores experimentais para ΔH^0 e $T\Delta S^0$ para o processo de troca iônica como um todo e para os processos de adsorção da lisozima e dessorção dos contraíons, obtidos a partir do modelo de Langmuir, são apresentados na Figura 5. Na Figura 6, são comparados os valores obtidos para o processo de adsorção utilizando-se os modelos de Langmuir e SMA.

O processo de troca iônica da lisozima no criogel pAAm-SO₃ foi endotérmico e o valor de ΔH_{TI}^0 tendeu a se reduzir com o aumento da concentração de sal (Figura

5A). Verificou-se ainda que o processo de dessorção dos contraíons foi exotérmico, tendo o valor de ΔH^0_{TI} permanecido quase inalterado na faixa de C_s estudada, enquanto que o processo de adsorção foi endotérmico, com uma tendência de queda nas valores de ΔH^0_{ad} com o aumento da C_s .

Os valores para a variação na entropia padrão para os processos de troca iônica e adsorção mostraram-se favoráveis, sendo bastante semelhantes, à exceção para a maior concentração de sal estudada, quando ocorreu uma queda maior na entropia para o processo de troca iônica (Figura 5B). Comportamento inverso foi observado para o processo de dessorção dos contraíons, que se mostrou entropicamente desfavorável para todos os valores de C_s , exceto para o mais elevado, quando passou a ser favorável.

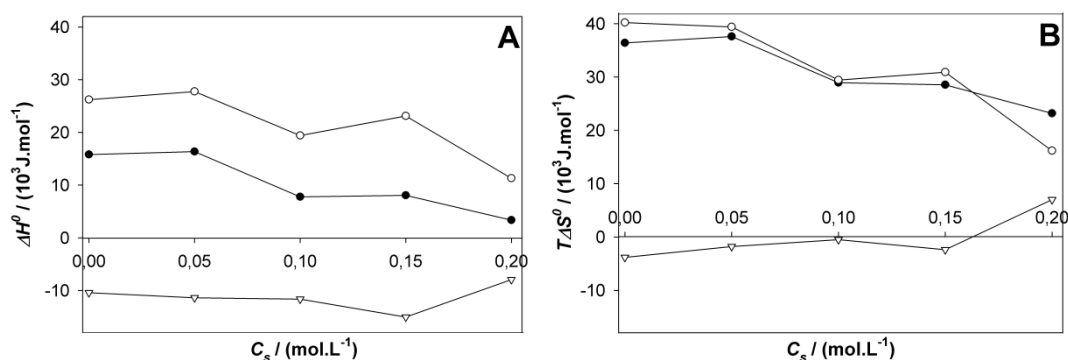


Figura 5: Valores experimentais de ΔH^0 (A) e $T\Delta S^0$ (B), calculados a partir do modelo de Langmuir, em função da concentração de NaCl (C_s). (●) processo de troca iônica como um todo; (○) processo de adsorção da proteína; (▽) processo de dessorção do contraíon. T = 30 °C (303,15 K).

A determinação das variações de entalpia entropia padrão para o processo de adsorção utilizando-se os dois modelos de isotermas apresentaram o mesmo comportamento, sendo semelhantes os valores obtidos com ambos os modelos (Figura 6).

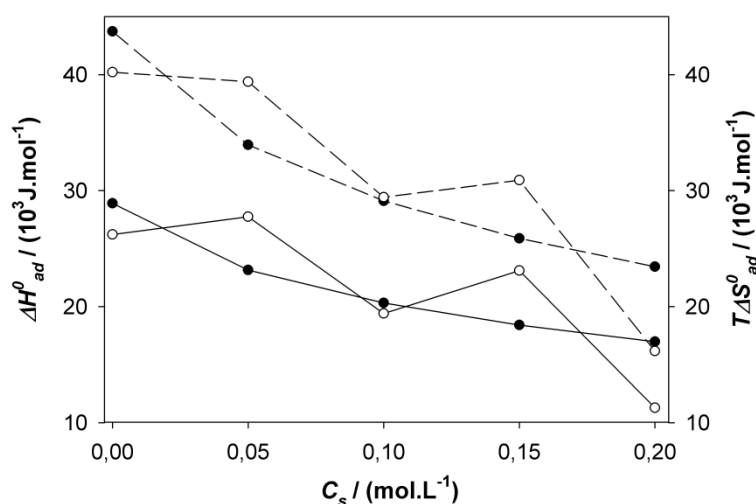


Figura 6: Valores experimentais de ΔH_{ad}^0 (—) e $T\Delta S_{ad}^0$ (- - -) em função da concentração de NaCl (C_s). Dados obtidos usando-se o modelo SMA(●) e Langmuir (○). T = 30 °C (303,15 K).

Assim como já foi observado ao se analisar a variação de energia livre de Gibbs padrão, a partir das informações acerca da variação de entalpia e entropia verificou-se que a contribuição da adsorção da lisozima para processo de troca iônica como um todo é mais relevante se comparada ao processo de dessorção dos contraíons.

Diversos autores relataram que o processo de adsorção ou troca iônica de proteínas pode ser endotérmico ou exotérmico, dependendo da natureza da proteína, do adsorvente, de outras espécies envolvidas e das condições utilizadas (Chen et al., 2003; Bayramoğlu et al., 2007; Dieterle et al., 2008; Lira et al., 2009). De um modo geral, quando ele é exotérmico, o processo é entalpicamente dirigido, enquanto que, se o mesmo é endotérmico, ele é entropicamente dirigido (Lira et al., 2009).

Lin et al. (2001) propuseram que o processo de adsorção poderia ser subdividido em várias etapas. Assim sendo, se assumiu neste trabalho que no processo de adsorção da lisozima foram considerados os fenômenos de remoção da dupla camada elétrica da proteína (dessolvatação e deionização da mesma), interação da proteína com os sítios ativos do adsorvente, rearranjo da conformação da proteína e redistribuição das moléculas e íons removidos da dupla camada elétrica na solução. No processo de dessorção dos contraíons foram consideradas a desidratação e deionização dos sítios ativos do adsorvente e a redistribuição e solvatação dos contraíons em solução.

Diante disso, uma explicação para o que foi observado foi proposta:

Do ponto de vista entálpico: O processo de dessorção dos contraíons foi exotérmico, porque, apesar da energia requerida para romper as interações eletrostáticas contraíons-sítios ativos e interações água-água em solução, a energia liberada ao se formar novas interações em solução (contraíons com ânions presentes, com a água e com a proteína) foi maior. No processo de adsorção da lisozima, apesar da quantidade de energia que pode ser liberada quando esta faz novas interações (principalmente eletrostáticas) com a superfície, a energia requerida no processo de desolvatação das duplas camadas e a energia envolvida na repulsão eletrostática entre moléculas de proteínas adsorvidas (e suas duplas camadas elétricas) foram dominantes no processo, o que fez com que o processo de troca iônica como um todo fosse endotérmico. Trash Jr. e Pinto (2002), trabalhando com a troca aniônica de albumina de soro bovino e albumina desnaturada concluíram que a repulsão entre moléculas de proteínas adsorvidas era o fenômeno de maior contribuição para a natureza endotérmica observada e que os íons de cargas opostas aos contraíons (neste caso ânions como fosfato e cloreto) também exerceram um importante papel no processo.

Logo, a redução no valor de ΔH_{ad}^0 com o aumento de C_s pode ser explicada, de acordo com Trash Jr. e Pinto (2001), pela a redução na repulsão entre moléculas de proteínas adsorvidas devido a sua neutralização pelos íons em solução. Além disso, o aumento da C_s levou a uma redução na repulsão entre as duplas camadas elétricas (Lira et al., 2009). O valor praticamente constante para a variação de entalpia padrão para o processo de dessorção (ΔH_{sal}^0) possivelmente se relacionou à pequena variação da carga característica (ν) ajustada no modelo SMA, em que praticamente um mesmo número de contraíons foi deslocado da superfície do adsorvente para todas as condições estudadas. O pequeno aumento observado no valor de ΔH_{sal}^0 para o maior valor avaliado de C_s pode ser atribuído à maior repulsão entre íons de mesma carga e à maior interação entre os contraíons e moléculas de água presentes em solução.

Do ponto de vista entrópico: Observou-se que o processo de troca iônica como um todo foi entropicamente dirigido, afetado pelos eventos associados à adsorção da proteína. A variação positiva na entropia padrão do processo de adsorção esteve associada principalmente ao aumento na entropia configuracional das espécies

(água e íons) liberadas e diluídas em solução quando da remoção da dupla camada elétrica. Diversos autores relataram que provavelmente esse foi o principal mecanismo para o aumento da entropia no processo de adsorção de proteínas (Trash Jr. et al., 2004; Dieterle et al., 2008; Lira et al., 2009). Alterações conformacionais da lisozima ao ser adsorvida podem ocorrer, porém tal contribuição no aumento da entropia deve ter sido pequena, visto que tal proteína tende a sofrer poucas alterações estruturais nas condições avaliadas (Dismer e Hubbuch, 2007; Dismer et al., 2008; Kubiak-Ossowska e Mulheran, 2010).

A redução nos valores de ΔS_{ad}^0 com o aumento da C_s pode indicar que uma menor quantidade de espécies presentes nas duplas camadas das proteínas esteja indo para a solução, aumentando menos a entropia associada. Conforme já discutido, o aumento da C_s levou a lisozima a uma orientação mais lateral com relação aos sítios ativos do adsorvente, reduzindo a repulsão proteína-proteína. Provavelmente tal redução na repulsão levou a uma maior preservação das duplas camadas elétricas das mesmas, reduzindo a liberação de íons e moléculas de água para a solução, causando o efeito mencionado na entropia. Com a orientação mais lateral da lisozima, pode ter ocorrido ainda uma redução na entropia das espécies químicas da dupla camada da proteína presentes em sua face voltada para os sítios ativos.

A variação de entropia padrão para o processo de dessorção dos contraíons foi pequena se comparada ao processo de adsorção, tendo pouca contribuição no processo como um todo. Em baixos valores de C_s , ΔS_{sal}^0 foi negativa, tendendo a ser tornar favorável com o aumento da C_s . Possivelmente para baixos valores de C_s , apesar da entropia configuracional dos contraíons aumentar ao deixarem de interagir com os sítios ativos, ocorreu uma redução maior na entropia de moléculas de água que passaram a solvatar tais contraíons. Com o aumento da C_s , tal efeito tendeu a ser minimizado, passando a ser mais importante para a variação de entropia deste processo a contribuição dos contraíons liberados.

Por fim, os resultados obtidos sugeriram que o processo de troca iônica avaliado de modo global apresentou grande compensação entalpia-entropia para o aumento da C_s , fato observado pela pequena variação de ΔG_{TI}^0 (Lira et al., 2009). Avaliando-se exclusivamente o processo de adsorção da proteína, este tendeu a ser menos espontâneo com o aumento da C_s , principalmente devido ao menor aumento na entropia associada à liberação de espécies químicas das duplas camadas elétricas

das proteínas para a solução. O processo de dessorção dos contraíons apresentou menor contribuição para a troca iônica como um todo, apesar de se tornar mais espontâneo com o aumento da C_s . A variação de entalpia foi negativa e praticamente constante na faixa de C_s avaliada e o aumento na variação da entropia com a elevação da C_s , passando de negativo para positivo sugeriu que o ganho na entropia configuracional dos contraíons liberados em solução passou a ser maior que a redução da entropia da água de solvatação dos mesmos para maiores valores de C_s .

A análise termodinâmica proposta a partir dos modelos de Langmuir e SMA permitiu uma ampla discussão acerca do processo de troca iônica de uma proteína de interesse, possibilitando a avaliação de características distintas para diferentes fenômenos associados ao processo em questão.

5. CONCLUSÕES

O processo de troca iônica entre a proteína lisozima e contraíons de Na^+ presentes em um criogel supermacroporoso polimérico modificado pela enxertia de grupos SO_3^- foi avaliado a diferentes temperaturas e concentrações de NaCl adicionada à fase móvel, tamponada em pH 7,2. As isotermas de adsorção obtidas demonstraram que o aumento da temperatura aumentou a capacidade adsorptiva do criogel, ocorrendo o inverso com o aumento da concentração de sal. Os modelos de Langmuir e SMA foram avaliados e o ajuste de ambos foi satisfatório. Os parâmetros ajustados do modelo SMA estão em acordo com informações da literatura que indicam que as interações entre o adsorvente e a proteína ocorrem prioritariamente em uma região limitada da proteína, próxima ao resíduo Arg128, e que a orientação da lisozima adsorvida tendeu de vertical para lateral aumentando-se a concentração de sal na fase móvel. A análise termodinâmica proposta, permitiu avaliar o processo de troca iônica como um todo e os processos de adsorção da proteína e dessorção dos contraíons separadamente, sendo útil para a compreensão dos fenômenos observados. Os processos ocorreram de forma espontânea e o processo de troca iônica foi mais afetado pela adsorção da proteína do que pela dessorção dos contraíons. O processo de troca iônica mostrou-se endotérmico e entropicamente dirigido, com o fenômeno dominante provavelmente associado à desestruturação das duplas camadas elétricas das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade da Califórnia, pela disponibilização gratuita do *software* UCSF Chimera package, no qual foram feitas as representações artísticas da estrutura da lisozima utilizadas neste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIRUDHAN, T. S.; REJEENA, S. R. (2012). Poly(acrylic acid)-modified poly(glycidylmethacrylate)-grafted nanocellulose as matrices for the adsorption of lysozyme from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, v.187, 150-159.

BAŞAR, N.; UZUN, L.; GÜNER, A.; DENIZLI, A. (2007). Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.41, 234-242.

BAYRAMOĞLU, G.; EKICI, G.; BEŞIRLI, N.; ARICA, M. Y. (2007). Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brushes grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. *Colloids and Surfaces A*, v.310, 68-77.

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

BLAKE, C. C. F.; MAIR, G. A.; NORTH, A. C. T.; PHILLIPS, D. C.; SARMA, V. M. (1967). On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v.167, 365-377.

BLASCHKE, T.; VARON, J.; WERNER, A.; HASSE, H. (2011). Microcalorimetric study of the adsorption of PEGylated lysozyme on a strong cation exchange resin. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 4720-4726.

BOWES, B. D.; KOKU, H.; CZYMMEK, K. J.; LENHOFF, A. M. (2009). Protein adsorption and transport in dextran-modified ion-exchange media. I: Adsorption. *Journal of Chromatography A*, v.1216, 7774-7784.

BOYD, G. E.; SCHUBERT, J.; ADAMSON, W. (1947). The exchange adsorption of ions from aqueous solutions by organic zeolites. I. Ion-exchange equilibria. *Journal of The American Chemical Society*, v.69, 2818-2829.

BROOKS, C.; CRAMER, S. (1992). Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal*, v.38, 1969-1978.

CANFIELD, R. E. (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.238(8), 2698-2707.

CHANG, S. K. C. (1999). Protein analysis (Chapter 15). In: Nielsen, S. S. (Ed.) *Food analysis*, 2nd ed. (pp.237-249). Norwell, USA: Kluwer Academic Publishers.

CHEN, W.-D.; HU, H.-H.; WANG, Y.-D. (2006). Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. *Chemical Engineering Research Science*, v.61, 7068-7076.

CHEN, W.-Y.; HUANG, H.-M.; LIN, C.-C.; LIN, F.-Y.; CHAN, Y.-C. (2003). Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. *Langmuir*, v.19, 9395-9403.

CHEN, X.; TOLLEY, H. D.; LEE, M .L. (2010). Polymeric cation-exchange monolithic columns containing phosphoric acid functional groups for capillary liquid chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, v.1217, 3844-3854.

ÇIMEN, D.; DENIZLI, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.93, 29-35.

DIETERLE, M.; BLASCHKE, T.; HASSE, H. (2008). Microcalorimetric study of adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic materials. *Journal of Chromatography A*, v.1205, 1-9.

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

DISMER, F.; PETZOLD, M.; HUBBUCH, J. (2008). Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography A*, v.1194, 11-21.

GALLANT, S. R.; KUNDU, A.; KRAMER, S. M. (1995). Modeling non-linear elution of proteins in ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.702, 125-142.

GERSTNER, J. A.; BELL, J. A.; CRAMER, S. M. (1994). Gibbs free of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems. *Biophysical Chemistry*, v.52, 97-106.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B. J.; GUIOCHON, G. (2003). Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.988, 185-203.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. (1994). *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Boston, USA: Academic Press, Inc., 700p.

HUANG, Y.; BI, J.; ZHAO, L.; MA, G.; SU, Z. (2010). Regulation of protein multipoint adsorption on ion-exchange adsorbent and its application to the purification of macromolecules. *Protein Expression and Purification*, v.74, 257-263.

JOZWIK, M.; KACZMARSKI, K.; FREITAG, R. (2005). Investigation of the steric mass action formalism in the simulation of breakthrough curves on a monolithic and a packed bed column. *Journal of Chromatography A*, v.1073, 111-121.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. (2008). Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, v.1184, 62-79.

KUBIAK-OSSOWSKA, K.; MULHERAN, P. A. (2010). Mechanism of hen egg white lysozyme adsorption on a charged solid surface. *Langmuir*, v.26, 15954-15965.

KUEHNER, D. E.; ENGMANN, J.; FERGG, F.; WERNICK, M., BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. (1999). Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.103, 1368-1374.

LADIWALA, A.; REGE, K.; BRENNEMAN, C. M.; CRAMER, S. M. (2005). A priori prediction adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v.102, 11710-11715.

LANGMUIR, I. (1918) The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361-1403.

LENHOFF, A. M. (2011). Protein adsorption and transport in polymer-functionalized ion-exchangers. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8748-8759.

LeVAN, M. D.; CARTA, G.; YON, C. M. (1997). Adsorption and ion exchange. In: PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. (Eds.) *Perry's Chemical engineers' handbook*, 7th ed. (Section 16). New York, USA: McGraw-Hill Companies, Inc.

LIN, F.-Y.; CHEN, C.-S.; CHEN, W.-Y.; YAMAMOTO, S. (2001). 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, 281-289.

LIN, F.-Y.; CHEN, W.-Y.; HEARN, M. T. W. (2002). Thermodynamic analysis of the interactions between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, v.15, 55-93.

LIRA, R. A.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, V. P. R.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. (2009). Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropeptide on anion-exchange chromatography adsorbent. *Journal of Chromatography A*, v.1216, 4440-4444.

LOZINSKY, V. I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, v.71, 489-511.

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

MISAK, N. Z. (1993). Langmuir isotherm and its application in ion-exchange reactions. *Reactive Polymers*, v.21, 53-64.

MISAK., N. Z. (1995). Adsorption isotherms in ion exchange reactions. Further treatments and remarks on the application of the Langmuir isotherm. *Colloids and Surfaces A*, v.97, 129-140.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v.25, 1605-1612.

REGAZZI, A. J. (1993). Teste para verificar a identidade de modelos de regressão e a igualdade de alguns parâmetros num modelo polinomial ortogonal. *Revista Ceres*, v.40(228), 176-195.

RUPLEY, J. A.; GATES, V. (1967). Enzymic activity of lysozyme, II. The hydrolysis and transfer reactions of *n*-acetylglucosamine oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.57, 496-510.

SRIVASTAVA, A.; SHAKYA, A. K.; KUMAR, A. (2012). Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, 373-381.

STRYNADKA, N. C. J.; JAMES, M. N. G. (1991) Lysozyme revisited: Crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. *Journal of Molecular Biology*, v.220, 401-424.

SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; GUOC, L.; ZHAO, Y.; CHANG, C. (2012). Monolithic cryogels made of agarose–chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, 1002-1007.

TAO, Y.; CARTA, G.; FERREIRA, G.; ROBBINS, D. (2011). Adsorption of deamidated antibody variants on macroporous and dextran-grafted cation exchangers: I. Adsorption equilibrium. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 1519-1529.

THRASH Jr., M. E.; PHILLIPS, J. M.; PINTO, N. G. (2004). An analysis of the interactions of bsa with an anion-exchange S under linear and non-linear conditions. *Adsorption*, v.10, 299-307.

THRASH Jr., M. E.; PINTO, N. G. (2001) Flow microcalorimetric measurements for bovine serum albumin on reversed-phase and anion-exchange supports under overloaded conditions. *Journal of Chromatography A*, v.908, 293-299.

THRASH Jr., M. E.; PINTO, N. G. (2002) Characterization of enthalpic events in overloaded ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.944, 61-68.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. (2012). Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.

VAŇKOVÁ, K.; ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. (2007). Adsorption equilibrium of fructosyltransferase on a weak anion-exchange resin. *Journal of Chromatography A*, v.1162, 56-61.

WETTER, L. R.; DEUTSCH, H. F. (1951). Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.192(1), 237-242.

WHITLEY, R. D.; WACHTER, R.; LIU, F.; WANG, N.-H. L. (1989). Ion-exchange equilibria of lysozyme, myoglobin and bovine serum albumin. *Journal of Chromatography*, v.465, 137-156.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2011). Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.

YUN, J.; TU, C.; LIN, D.-Q.; XU, L.; GUO, Y.; SHEN, S.; ZHANG, S.; YAO, K.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. (2012). Microchannel liquid-flow focusing and cryopolymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1247, 81-88.

ARTIGO 03

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE TROCA CATIÔNICA DE LISOZIMA EM LEITO MONOLÍTICO SUPERMACROPOROSO

Resumo

Novos materiais para a purificação de biomoléculas são continuamente desenvolvidos, e os leitos monolíticos poliméricos vêm ganhando destaque dada a facilidade de síntese e versatilidade que apresentam. Descrever sua estrutura e comportamento hidrodinâmico e de transferência de massa ainda é um desafio e para isso a modelagem capilar apresenta-se promissora. Processos de troca iônica de proteínas são em geral descritos por modelos de adsorção, sendo o uso de modelos mais adequados uma necessidade cada vez maior. Assim, avaliou-se a modelagem capilar para o processo de troca catiônica de uma proteína, a lisozima da clara de ovo, em um leito monolítico polimérico supermacroporoso, considerando-se a distribuição normal de probabilidade para os diâmetros capilares com comprimentos diferenciados, variando segundo sua tortuosidade. Os balanços de massa consideraram fluxo convectivo, efeitos dispersivos, de mistura e de transferência de massa individuais nos capilares, e o equilíbrio de troca iônica foi explicado pelo modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA). O ajuste das características físicas do sistema capilar (diâmetro médio, desvio-padrão, espessura do capilar, tortuosidade mínima e número total de capilares) foi pouco afetado pela velocidade de escoamento da fase móvel e foi possível o ajuste do coeficiente de transferência de massa para cada capilar ($k_{f,i}$) a partir das curvas de ruptura experimentais foi possível. A análise de sensibilidade do modelo mostrou que o efeito nas curvas até o ponto de ruptura, foi pequeno, apresentando potencial para o uso em processos de purificação. Isso é importante porque é nesse ponto que tais processos são interrompidos para a lavagem e eleuição dos leitos. O modelo proposto foi capaz de simular as curvas de ruptura obtidas em diferentes condições operacionais, no entanto mais estudos são necessários para melhorar sua capacidade preditiva.

Palavras-chave: modelagem capilar, tortuosidade, troca iônica, transferência de massa, curva de ruptura, análise de sensibilidade.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos adsorventes e trocadores iônicos a serem utilizados em processos de purificação de biomoléculas é contínuo. Na vanguarda deste desenvolvimento estão os monólitos, estruturas porosas altamente interconectadas formadas em corpo único, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (Jungbauer e Rahn, 2008). Dentre estes, destacam-se os criogéis poliméricos, caracterizados por possuírem elevada porosidade com poros grandes (diâmetro acima de 10 μ m) interconectados (Lozinsky, 2002; Lozinsky et al. 2003). Tais criogéis podem ser facilmente modificados, sendo verificado um grande crescimento do seu uso para a purificação de macromoléculas dada a versatilidade que apresentam (Guiochon, 2007; Bilakanti e Fee, 2009; Yan et al., 2011; Çimen e Denizli, 2012; Srivastava et al., 2012; Sun et al., 2012; Uygun et al., 2012; Yun et al., 2012).

A síntese de criogéis monolíticos consiste basicamente em congelar, sob certas condições, uma mistura reativa. Tal processo, portanto, é estocástico e cada criogel produzido é único em sua estrutura. O comportamento hidrodinâmico e cromatográfico de um criogel torna-se individual e o uso de métodos não destrutivos nos estudos passa a ser essencial (Yun et al., 2011). A modelagem de tais sistemas é um desafio, dada a dificuldade em descrever a estrutura da matriz do criogel, bem como características do escoamento de fluídos, dispersão nos poros e transferência de massa entre o fluido e as paredes do criogel (Yun et al., 2009).

Várias alternativas vêm sendo propostas para descrever a estrutura de leitos monolíticos. Meyers e Liapis (1999) propuseram que o leito monolítico poderia ser representado por uma rede cúbica de poros interconectados, sendo a distribuição do tamanho dos poros e o grau de conectividade dos mesmos essenciais no modelo. Miyabe e Guiochon (2002) assumiram que a estrutura dos monólitos era composta de macroporos interconectados, em que o esqueleto do leito monolítico era constituído por unidades repetidas de elementos com a estrutura cilíndrica porosa com diâmetro constante. Koku et al. (2011) utilizaram técnicas de análises de imagens e propuseram que a estrutura era composta de uma estrutura tridimensional unitária que se repetia nas três dimensões do leito monolítico. Em todos esses modelos, sempre foi considerado que a estrutura era formada de poros interconectados.

Em outra abordagem feita para descrever a estrutura de leitos monolíticos foram considerados estes como um conjunto de canais capilares por onde a fase móvel escoia (Persson et al., 2004). Zabka et al. (2006) assumiram que o monólito era composto de canais capilares cilíndricos com diâmetro constante e comprimento igual ao do leito como um todo, sendo o número de capilares determinado pelo volume externo do leito, conhecendo-se sua porosidade externa. Persson et al. (2004) propuseram um modelo semelhante, em que o diâmetro dos capilares variou segundo uma função estatística de densidade probabilidade. Para eles, os efeitos globais observados no leito foram devido ao somatório dos efeitos individuais observados nos capilares. Do mesmo modo, Yun et al. (2009 e 2011) propuseram que, além da variação no diâmetro, também existe uma variação no comprimento de cada capilar, avaliado pela estimativa da sua tortuosidade. Apesar da matriz monolítica ser provavelmente interconectada, o modelo capilar foi adequado para descrever tais sistemas, em especial aqueles macroporosos, porque o fluxo convectivo sempre escolhe o caminho de menor resistência, criando um padrão de escoamento através de sua estrutura que pode ser descrito por um conjunto de canais capilares (Persson et al., 2004). O modelo capilar foi uma simplificação para meios porosos com macroporos, como os criogéis poliméricos, onde se assumiu que cada canal não se comunica com outro até a saída do leito (Yun et al., 2011).

Em ambas as abordagens foram feitas adaptações dos balanços de massa usualmente empregados em processos cromatográficos, como o cinético agrupado, o da taxa geral e o do equilíbrio-dispersivo (Guiochon et al., 1994; Cavazzini et al., 2002; Piatkowski et al., 2003). Avaliações desses modelos utilizando-se efeitos individuais nos capilares ou combinados a efeitos globais do leito vêm sendo testados (Miyabe e Guiochon, 2002; Persson et al., 2004; Zabka et al., 2007; Yun et al., 2009 e 2011), em geral visando facilitar a capacidade preditiva e de simulação a partir de informações obtidas para o leito monolítico como um todo.

Ao se avaliar efeitos adsorptivos ou de troca iônica nesses modelos, em geral, são utilizados modelos mais simples de isotermas, como a isoterma linear (Zabka et al., 2006 e 2007) ou o modelo de Langmuir (Persson et al., 2004; Yun et al., 2009). Modelos de isotermas mais adequados ao processo de troca iônica como o de Ação do Impedimento Estérico de Massas (SMA) proposto por Brooks e Cramer (1992), específico para macromoléculas como proteínas, ainda não foram avaliados admitindo-se a estrutura capilar para um leito monolítico. Jozwik et al. (2005)

utilizaram o modelo SMA para simular as curvas de ruptura de proteínas em um leito monolítico, mas avaliaram o processo com efeitos globais, e não como uma estrutura capilar.

Assim sendo, o objetivo neste trabalho foi avaliar a modelagem capilar para o processo de troca iônica de uma proteína, neste caso a lisozima da clara de ovo, em um leito monolítico polimérico supermacroporoso trocador catiônico, considerando que os capilares possuem diâmetros seguindo uma distribuição normal de probabilidade e comprimentos diferenciados, variando segundo sua tortuosidade. Os balanços de massa consideraram fluxo convectivo, efeitos dispersivos, de mistura e de transferência de massa individuais nos capilares, e o processo de troca iônica foi explicado por um modelo de isoterma apropriado, o SMA. Simulações foram realizadas a fim de se verificar o efeito de algumas variáveis nas curvas de ruptura, como a vazão, concentração inicial do soluto e concentração de sal na fase móvel.

2. MODELAGEM MATEMÁTICA

Visando à descrição matemática do processo de troca iônica de uma macromolécula em um leito monolítico supermacroporoso, foi proposta uma modificação no modelo capilar, baseando-se nos modelos propostos por Persson et al. (2004) e Yun et al. (2009 e 2011). Resumidamente, o modelo proposto por Persson et al. (2004) assumiu que a estrutura do leito monolítico era composta de vários capilares com mesmo comprimento do leito e diferentes diâmetros, que seguiam uma distribuição estatística. Considerou-se efeitos dispersivos e adsorptivos na transferência de massa do soluto dentro de cada capilar, sendo o efeito observado nas curvas de ruptura um somatório dos efeitos individuais. O modelo usado por Yun et al. (2009) considerou efeitos dispersivos globais (para o leito como um todo) e efeitos adsorptivos em cada capilar, que neste caso possuíam, além de uma distribuição normal para o diâmetro dos capilares, diferentes comprimentos para cada um (devido à tortuosidade) em função do diâmetro. Por fim, o modelo de Yun et al. (2011) assumiu que a estrutura do leito monolítico era composta por capilares com diferentes diâmetros (distribuição normal) e comprimentos (tortuosidade em função do diâmetro), mas considerou apenas efeitos dispersivos dentro dos capilares, não considerando efeitos adsorptivos.

Na modificação proposta, assumiu-se que o fluxo convectivo que entrava na coluna monolítica era dividido entre muitos capilares de mesma espessura, mas

diferentes diâmetros que seguem uma distribuição normal unimodal, e com diferentes comprimentos, devido à tortuosidade dos mesmos. Uma representação do modelo proposto pode ser observada na Figura 1.

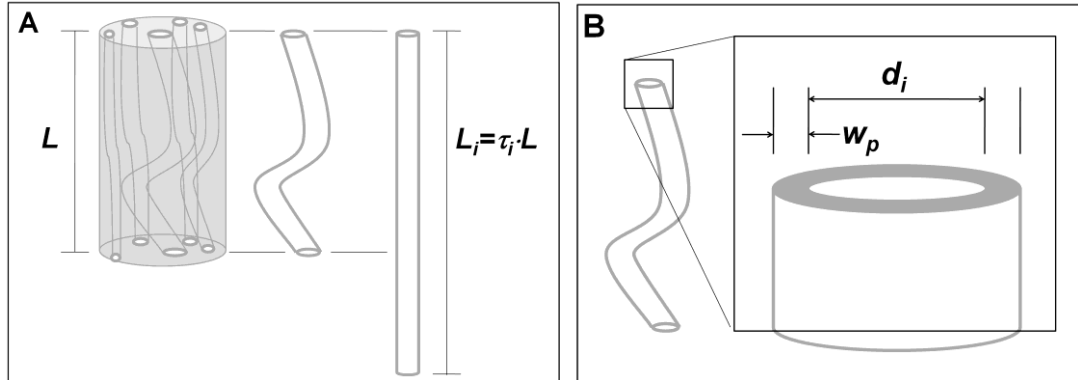


Figura 1: Representação esquemática para o modelo capilar proposto. A: destaque para a tortuosidade do capilar; B: destaque para o diâmetro e espessura do capilar.

A queda de pressão em cada capilar foi assumida como igual à queda de pressão total sofrida pela coluna. O modelo considerou a dispersão no fluxo convectivo e equilíbrio de adsorção em cada capilar, assim como possíveis efeitos de resistência à transferência de massa e dinâmica de adsorção, avaliados agrupados para o interior do filme líquido estagnado na superfície interna dos capilares. Considerou-se ainda que o soluto de interesse ao ser percolado no leito tivesse acesso a todos os capilares do sistema, ou seja, o menor diâmetro existente foi maior que o diâmetro hidrodinâmico do soluto.

Características da estrutura capilar

Assumiu-se a distribuição normal para os diâmetros dos capilares, ou seja, ajustada por uma função Gaussiana de dois parâmetros do tipo (Yun et al., 2005 e 2011; Kaczmariski e Bellot, 2005):

$$f(d_i) = \frac{1}{\sigma_d \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(d_i - d_m)^2}{2\sigma_d^2} \right] \quad (1)$$

Onde: σ_d é o desvio-padrão do diâmetro dos capilares, d_m é o diâmetro médio e d_i é o diâmetro do i -ésimo capilar.

Como, na prática, não existem capilares menores que um dado diâmetro mínimo, d_{min} , nem maiores que um dado diâmetro máximo, d_{max} , a função de densidade probabilidade para a distribuição de diâmetros de capilares foi modificada para a seguinte função (Yun et al., 2005 e 2011; Kaczmariski e Bellot, 2005).

$$F(d_i) = \frac{f(d_i)}{1 - \int_{-\infty}^{d_{min}} f(d_i) \delta d_i - \int_{d_{max}}^{\infty} f(d_i) \delta d_i} \quad (2)$$

Que satisfaz à seguinte condição:

$$\int_{d_{min}}^{d_{max}} F(d_i) \delta d_i = 1 \quad (3)$$

A tortuosidade de um capilar, τ_i , definida pela razão entre o comprimento real L_i e o comprimento do leito L , foi calculada utilizando-se a equação 4.

$$\tau_i = \frac{L_i}{L} \quad (4)$$

A porosidade do leito do criogel, φ , foi igual à razão entre a soma dos volumes internos dos capilares, V_i , e o volume total do leito, V , assumindo-se que para um dado grupo de capilares com diâmetro d_i , a tortuosidade fosse igual, e que a espessura de todos os capilares fosse igual a w_p (Yun et al., 2009 e 2011).

$$\varphi = \frac{\sum_{i=1}^N V_i n_i}{V} = \frac{1}{d_L^2} \sum_{i=1}^N d_i^2 \tau_i n_i \quad (5)$$

Onde: n_i é o número total de capilares com diâmetro d_i e d_L é o diâmetro do leito.

O volume do leito foi igual à soma dos volumes totais dos capilares (incluindo as paredes dos mesmos):

$$V = AL = \sum_{i=1}^N \frac{\pi(d_i + 2w_p)^2}{4} \tau_i L n_i \quad (6)$$

Onde: A é a área da seção transversal do leito.

Admitindo o escoamento laminar em cada capilar, podemos utilizar a equação de Hagen-Poiseuille para relacionar a queda de pressão, ΔP_i , com a vazão volumétrica, Q_i , ou a velocidade de escoamento, U_i (Yun et al., 2011):

$$Q_i = \frac{\pi d_i^4 \Delta P_i}{128 \eta L_i} \quad \text{ou} \quad U_i = \frac{d_i^2 \Delta P_i}{32 \eta L_i} \quad (7)$$

Onde: η é a viscosidade da fase móvel.

Sendo a queda de pressão em cada capilar igual à queda de pressão no leito como um todo (Persson et al., 2004; Yun et al., 2011), pode-se reescrever a equação 7 como:

$$Q_i = \frac{\pi d_i^4 \Delta P}{128 \eta \tau_i L} \quad \text{ou} \quad U_i = \frac{d_i^2 \Delta P}{32 \eta \tau_i L} \quad (8)$$

E sendo a vazão volumétrica no leito (Q) a soma das vazões volumétricas em cada capilar:

$$Q = \sum_{i=1}^N Q_i n_i = \frac{\pi \Delta P}{128 \eta L} \sum_{i=1}^N \frac{d_i^4 n_i}{\tau_i} \quad (9)$$

Para uma dada queda de pressão, a vazão volumétrica, Q , ou velocidade de escoamento no leito, U , também podem ser calculadas a partir da equação de Darcy (Guiochon, 2007).

$$Q = \frac{A k_p \Delta P}{\eta L} = \frac{\pi d_L^2 k_p \Delta P}{4 \eta L} \quad (10)$$

$$U = \frac{Q}{A} = \frac{k_p \Delta P}{\eta L} \quad (11)$$

Onde: k_p é a constante de permeabilidade ao escoamento.

Combinando as equações 9 e 10, tem-se que (Yun et al., 2009 e 2011):

$$\frac{\pi \Delta P}{128 \eta L} \sum_{i=1}^N \frac{d_i^4 n_i}{\tau_i} = \frac{\pi d_L^2 k_p \Delta P}{4 \eta L} \Rightarrow k_p = \frac{1}{32 \cdot d_L^2} \sum_{i=1}^N \frac{d_i^4 n_i}{\tau_i} \quad (12)$$

E combinando as equações 8 e 11:

$$U_i = \frac{d_i^2 U}{32 \tau_i k_p} \quad (13)$$

Para se determinar a tortuosidade de cada capilar, foi assumida uma relação linear com o diâmetro dos mesmos (Yun et al., 2009 e 2011).

$$\tau_i = \tau_{dmin} + \omega(d_i - d_{min}) \quad (14)$$

Onde: τ_{dmin} é a tortuosidade dos capilares com diâmetro d_{min} e ω é um parâmetro do modelo.

A tortuosidade dos capilares com diâmetro máximo foi obtida a partir de resultados experimentais de curvas de ruptura ou distribuição de tempos de residência para um traçador não-adsorvente. O tempo para um traçador atravessar o capilar com diâmetro máximo, t_{dmax} , foi igual a (Yun et al., 2009 e 2011):

$$t_{dmax} = \frac{\tau_{dmax} L}{U_{dmax}} = \tau_{dmax} L \frac{32 \tau_{dmax} k_p}{d_{max}^2 U} \quad (15)$$

Isolando τ_{dmax} na equação acima, e substituindo na equação 14 τ_i por τ_{dmax} e d_i por d_{max} , pode-se determinar o parâmetro ω . A equação 14 foi reescrita como (Yun et al., 2009 e 2011):

$$\tau_i = \tau_{dmin} + \frac{(d_i - d_{min})}{(d_{max} - d_{min})} \left(d_{max} \sqrt{\frac{t_{dmax} U}{32 L k_p}} - \tau_{dmin} \right) \quad (16)$$

Pode se observar a partir da equação de Hagen-Poiseuille que quanto maior o diâmetro do capilar, maior a velocidade de escoamento, o que poderia gerar forte dispersão no leito. No entanto, diversos autores têm relatado que a dispersão axial observada foi pequena para criogéis com diâmetro de poros entre 10 μm e 200 μm , com a distribuição de tempos de residência apresentando-se numa estreita faixa (Persson et al., 2004a; Yun et al., 2009). Tal fato sugeriu que os capilares de maior diâmetro também possuíam maior comprimento, o que resultaria na fraca dispersão observada (Yun et al., 2011).

Balanços de massa

O balanço de massa adimensional para a fase móvel em cada capilar, admitindo-se mistura dispersiva e adsorção na superfície interna foi dado por:

$$\frac{\partial C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial t_{D,i}} = \frac{1}{Pe_i} \frac{\partial^2 C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial z_{D,i}^2} - \frac{\partial C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial z_{D,i}} - \frac{dq_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{dt_{D,i}} \quad (17)$$

Sujeito às seguintes condições inicial e de contorno:

$$C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = 0 \quad ; \quad \text{para } t_{D,i} = 0 \text{ e } z_{D,i} > 0 \quad (18.a)$$

$$C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = 1 \quad ; \quad \text{para } z_{D,i} = 0 \quad (18.b)$$

$$\frac{\partial^2 C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial z_{D,i}^2} = 0 \quad ; \quad \text{para } z_{D,i} = 1 \quad (18.c)$$

Os termos adimensionais foram obtidos da seguinte maneira:

$$C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = \frac{C_i(z, t)}{C_0} \quad (19)$$

$$t_{D,i} = \frac{t U_i}{\tau_i L} \quad (20)$$

$$z_{D,i} = \frac{z}{\tau_i L} \quad (21)$$

$$Pe_i = \frac{\tau_i L U_i}{D_{ax,i}} \quad (22)$$

$$C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i}) = \frac{C_i^*(z, t)}{C_0} \quad (23)$$

E o balanço de massa para a fase sólida em cada capilar foi dado por:

$$\frac{dq_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{dt_{D,i}} = St_i [C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) - C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i})] \quad (24)$$

Com a seguinte condição inicial:

$$q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = 0 \quad ; \quad \text{para } t_{D,i} = 0 \quad (25)$$

Onde:

$$q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = \frac{q_i(z, t)}{C_0} \quad (26)$$

$$St_i = \frac{4k_{f,i}\tau_i L}{U_i d_i} \quad (27)$$

O perfil de concentração de soluto na saída do leito ($z = L$) foi dado então pela média das concentrações de saída em cada capilar, ponderadas pela vazão volumétrica, conforme a equação 28.

$$C(z = L, t) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N n_i Q_i} \sum_{i=1}^N C_i(z = L, t) n_i Q_i \quad (28)$$

Isotermas de adsorção

Entre os modelos de isotermas de adsorção existentes, um dos mais simples e utilizados é o modelo de Langmuir (1918), que considera a adsorção em uma monocamada, sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos. Tal modelo, apresentado na equação 29, vem sendo utilizado para explicar o processo em sistemas capilares (Persson et al., 2004; Yun et al., 2009).

$$q = q_s \frac{bC}{1 + bC} \quad (29)$$

Tal equação foi escrita na forma adimensional para cada capilar como (Yun et al., 2009):

$$q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i}) = q_{s,i} \frac{bC_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i})}{1 + bC_0C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i})} \quad (30)$$

Isolando $C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i})$:

$$C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i}) = \frac{q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{b[q_{s,i} - C_0q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})]} \quad (31)$$

Onde $q_{s,i}$ foi determinado como proposto por Yun et al., 2009.

$$q_{s,i} = \frac{d_L^2 q_s}{d_i \sum_{i=1}^N n_i d_i \tau_i} \quad (32)$$

Outro modelo utilizado, mais adequado para descrever o equilíbrio de troca iônica de macromoléculas em um sistema líquido-sólido, foi o modelo de Ação do Impedimento Estérico de Massas, ou modelo SMA, proposto por Brooks e Cramer (1992). Tal modelo considera que macromoléculas carregadas, como proteínas, ao interagirem com o trocador iônico podem, através de um impedimento estérico, ‘esconder’ alguns sítios de troca, que então não ficam mais disponíveis no sistema. O formalismo do modelo SMA é específico para representar o equilíbrio multicomponente sal-proteína em processos de troca iônica (Brooks e Cramer, 1992; Jozwik et al., 2005). Para a troca iônica entre uma única espécie de proteína e um contraíon monovalente, o modelo SMA é dado por:

$$C = \left(\frac{q}{K_{TI}} \right) \left(\frac{C_I}{\Lambda - (v + \sigma)q} \right)^v \quad (33)$$

Na forma adimensional, o modelo SMA para cada capilar foi escrito como:

$$C_{D,i}^*(z_{D,i}, t_{D,i}) = \frac{q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{K_{TI}} \left[\frac{C_I}{\Lambda_i - C_0(v + \sigma)q_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})} \right]^v \quad (34)$$

Onde Λ_i era a capacidade iônica volumétrica para o capilar de diâmetro d_i , obtida da seguinte maneira:

A quantidade máxima de íons (em mols) retida no leito monolítico foi igual a:

$$n_{ions} = \Lambda V = \Lambda \frac{\pi d_L^2}{4} L \quad (35)$$

A quantidade máxima de íons retida por unidade de área do sistema capilar total foi calculada a partir da equação 36.

$$\Lambda_{sup} = \frac{n_{ions}}{A_{sup}} \quad (36)$$

Em que:

$$A_{sup} = L\pi \sum_{i=1}^N d_i n_i \tau_i \quad (37)$$

Substituindo as equações 35 e 37 na equação 36:

$$\Lambda_{sup} = \frac{\Lambda d_L^2}{4 \sum_{i=1}^N d_i n_i \tau_i} \quad (38)$$

Sabendo-se o valor da quantidade máxima de íons retida por unidade de área do sistema capilar foi determinada a capacidade iônica por unidade de volume (Λ_i) em cada capilar com diâmetro d_i :

$$\Lambda_i = \frac{A_{sup,i} \Lambda_{sup}}{V_i} = \frac{\Lambda d_L^2}{d_i (\sum_{i=1}^N d_i n_i \tau_i)} \quad (39)$$

O procedimento para determinar Λ_i foi similar ao usado por Yun et al. (2009) para obter o valor de $q_{s,i}$ para a isoterma de Langmuir. Considerando que os sítios onde ocorreu a troca iônica se distribuíam homoganeamente nas superfícies internas dos capilares, aqueles com menor diâmetro possuem proporcionalmente maior área superficial em relação ao volume, e apresentariam maiores valores de Λ_i , bem como para $q_{s,i}$. Ressalta-se que nesse modelo foi assumido que os menores capilares existentes permitiam o acesso ao soluto de interesse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Fosfatos de sódio monobásico e bibásico, ambos anidros, e cloreto de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), bem como a proteína lisozima da clara de ovo (pureza > 90%, código L6876). Todos os reagentes químicos utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultra-pura.

Para a obtenção das curvas de ruptura foi utilizada uma coluna cromatográfica C10/20 com um pistão adaptador AC10 (ambos da GE Healthcare, Uppsala, Suécia), de modo que o leito monolítico apresentou 9,4 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro. O trocador catiônico utilizado como monólito foi um criogel

polimérico constituído por acrilamida, bis-acrilamida e alil glicidil éter, enxertado com o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (criogel pAAm-SO₃) sintetizado no próprio laboratório de acordo com a metodologia descrita anteriormente (artigo 01), cujas características físicas e químicas do leito são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características do leito monolítico catiônico utilizado.

Característica do adsorvente*	Valor
comprimento (L) / (cm)	9,4
diâmetro total (d_L) / (cm)	1,0
permeabilidade ao escoamento (k_p) / (m ²)	$8,47 \times 10^{-13}$
porosidade total (ε_T)	0,910
porosidade aparente com lisozima (φ)	0,829
altura equivalente a um prato teórico (HETP) / (mm)	2,3
diâmetro mínimo de poro observado (d_{min}) / (µm)	22
diâmetro máximo de poro observado (d_{max}) / (µm)	148
cap. iônica volumétrica (A) / ($10^{-3} \text{ mol}_{\text{Na}^+} \cdot \text{L}^{-1} \text{ criog hidrat}$)	25,72

* características determinadas no primeiro artigo da tese.

3.2. Obtenção das curvas de ruptura experimentais

A coluna contendo o leito monolítico foi adaptada a um sistema contendo uma bomba peristáltica (Masterflex Easy Load II, com cabeçote 77201-60 e mangueira de noreprene 6402-14, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, EUA), uma válvula manual de quatro vias (SRV-4, código 19-2099-01, GE Healthcare) e volume vazio de 1,88 mL (sem a coluna). O monitoramento contínuo da fase móvel foi feito utilizando-se um monitor UV-Vis920 (GE Healthcare) com filtro de 280 nm, conectado a um sistema de aquisição de dados Spider8 (HBM, Darmstadt, Alemanha) controlado por meio do *software* Catman v.4.5 (HBM). Os experimentos foram conduzidos à vazão constante e ambiente climatizado a (20 ± 1) °C.

A coluna utilizada inicialmente foi lavada com 200 mL de água deionizada, 100 mL de uma solução de HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e equilibrada com 100 mL de solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,2 com NaCl adicionado de acordo com o interesse, conforme Tabela 2. Em seguida a coluna foi percolada pela solução de alimentação contendo lisozima, observando-se a formação e estabilização da curva

de ruptura, seguida da lavagem com cerca de 30 mL da solução-tampão de equilíbrio para a retirada do material não-adsorvido e eluição do material adsorvido de modo isocrático utilizando-se cerca de 30 mL de uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2 contendo $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl. Feito isso, a coluna foi reequilibrada com 100 mL da solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,2 e concentração de NaCl desejada, reiniciando-se o processo.

Tabela 2: Características da fase móvel na obtenção das curvas de ruptura experimentais.

Tratamento	Q ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	U ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	C_{NaCl} ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	C_{lis} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	1,0	$2,12\times 10^{-4}$	0,00	4,0
2	2,0	$4,24\times 10^{-4}$	0,00	4,0
3	4,0	$8,49\times 10^{-4}$	0,00	4,0
4	2,0	$4,24\times 10^{-4}$	0,00	2,0
5	2,0	$4,24\times 10^{-4}$	0,00	6,0
6	2,0	$4,24\times 10^{-4}$	0,05	4,0
7	2,0	$4,24\times 10^{-4}$	0,10	4,0

Foram obtidas ao todo sete curvas de ruptura variando-se a vazão volumétrica, a concentração de NaCl e a concentração de lisozima na fase móvel. Cada curva foi obtida a partir da média de duas replicatas e os pontos experimentais foram coletados a cada cinco segundos. As curvas foram obtidas na forma adimensional para a concentração de proteína, dividindo-se o sinal observado no detector a um dado instante t pelo sinal máximo obtido quando da estabilização da curva de ruptura.

3.3. Densidade e viscosidade da fase móvel

A densidade das soluções utilizadas como fase móvel foram avaliadas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ em um densímetro vibratório (precisão de $0,001 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, modelo DMA 4500M, Anton-Paar, Graz, Áustria). A viscosidade das soluções foi determinada utilizando-se um viscosímetro rotacional de cilindros concêntricos (modelo DVII-Pro, Brookfield, Middlesboro, EUA), com o rotor (*spindle*) modelo SC4-18 e taxa de deformação variando de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a 260 s^{-1} . A temperatura foi mantida constante em $20 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se um banho termostático (modelo TC-500, Brookfield, com precisão de $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$). Em ambos procedimentos foram utilizadas duas repetições em triplicata.

3.4. Métodos numéricos e ajuste de parâmetros

A fim de realizar o ajuste de parâmetros necessários e a simulação das curvas de ruptura, foi desenvolvido um *software* com programação em linguagem VB no *software* MS-VisualBasic[®] 2008 (Microsoft, Redmond, EUA), para a implementação dos algoritmos e rotinas necessárias para tal. Tal *software* foi denominado SIMAD – SIMulador de ADSorção, apresentando três funcionalidades de uso. A primeira foi o ajuste de parâmetros relacionados à distribuição dos capilares no leito monolítico, a segunda foi o ajuste do coeficiente de transferência de massa, e o terceiro foi a simulação propriamente dita.

Ajuste da distribuição dos capilares

Para a resolução do modelo proposto e conseqüente simulação das curvas de ruptura, inicialmente foram ajustados os parâmetros d_m , σ_d , w_p , τ_{dmin} e n_T , referentes à distribuição dos capilares no leito monolítico. Para isso, faixas de valores para cada parâmetro (exceto n_T) foram selecionadas, bem como o incremento de variação das mesmas, com base em informações da literatura (Persson et al., 2004; Yun et al., 2009 e 2011) e experimentos prévios. Desse modo poderiam ser obtidas inúmeras combinações entre esses parâmetros. Para cada combinação de valores de d_m , σ_d , w_p e τ_{dmin} , uma faixa de valores para n_T foi determinada, com bases em restrições físicas associadas às dimensões do leito, bem como um intervalo de variação para o mesmo.

A faixa de valores em que o número total de capilares poderia se encontrar foi determinada conforme Yun et al. (2011). Se todos os capilares possuíssem um diâmetro mínimo, o número de capilares seria máximo, e vice-versa para o diâmetro máximo. Tais valores poderiam ser obtidos a partir da consideração de que o volume do leito fosse igual à soma dos volumes dos capilares (equação 6). Por outro lado, também seria verdade se a área transversal do leito fosse igual à soma das áreas transversais dos capilares. Assim outros valores para as quantidades máxima e mínima de capilares poderiam ser obtidos do mesmo raciocínio. Logo, o número total de capilares deveria estar entre os valores obtidos para o maior número mínimo e o menor número máximo de capilares possíveis, ou seja:

$$\frac{d_L^2}{(d_{max} + 2w_p)^2} \leq n_T \leq \frac{d_L^2}{(d_{min} + 2w_p)^2 \tau_{dmin}} \quad (40)$$

Vários testes preliminares foram realizados, e as condições finais utilizadas neste trabalho são listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições finais empregadas na rotina utilizada para estimar os valores de d_m , σ_d , w_p , τ_{dmin} e n_T .

Parâmetro avaliado	Varição
d_m (μm)	28 – 42
Δd_m (μm)	1
σ_d (μm)	6 – 20
$\Delta \sigma_d$ (μm)	1
w_p (μm)	1,5 – 3,0
Δw_p (μm)	0,1
τ_{dmin}	1,0 – 2,5
$\Delta \tau_{dmin}$	0,1
Δn_T	10

Para cada combinação de valores de d_m , σ_d , w_p , τ_{dmin} e n_T testada, foi avaliada a distribuição normal para os diâmetros dos capilares, variando entre d_{min} e d_{max} , determinando-se o número de capilares n_i associado a cada capilar de diâmetro d_i . Para isso a equação 2 foi resolvida, a fim de se obter a probabilidade p_i de se encontrar capilares com diâmetro d_i , do seguinte modo:

$$\int_{d_i - \frac{\Delta d_m}{2}}^{d_i + \frac{\Delta d_m}{2}} F(d_i) \delta d_i = p_i \quad (41)$$

Em que:

$$p_i = \frac{1}{2[1 - g(d_i) - h(d_i)]} \left\{ \text{erf} \left[\frac{\left(d_i + \frac{\Delta d_m}{2} \right) - d_m}{\sqrt{2}\sigma_d} \right] - \text{erf} \left[\frac{\left(d_i - \frac{\Delta d_m}{2} \right) - d_m}{\sqrt{2}\sigma_d} \right] \right\} \quad (42)$$

Onde:

$$g(d_i) \int_{-\infty}^{d_{min}} f(d_i) \delta d_i = \frac{1}{2} \left[1 + \text{erf} \left(\frac{d_{min} - d_m}{\sqrt{2}\sigma_d} \right) \right] \quad (43)$$

$$h(d_i) \int_{d_{max}}^{+\infty} f(d_i) \delta d_i = \frac{1}{2} \left[1 - \text{erf} \left(\frac{d_{max} - d_m}{\sqrt{2}\sigma_d} \right) \right] \quad (44)$$

Uma representação gráfica deste processo pode ser observada na Figura 2.

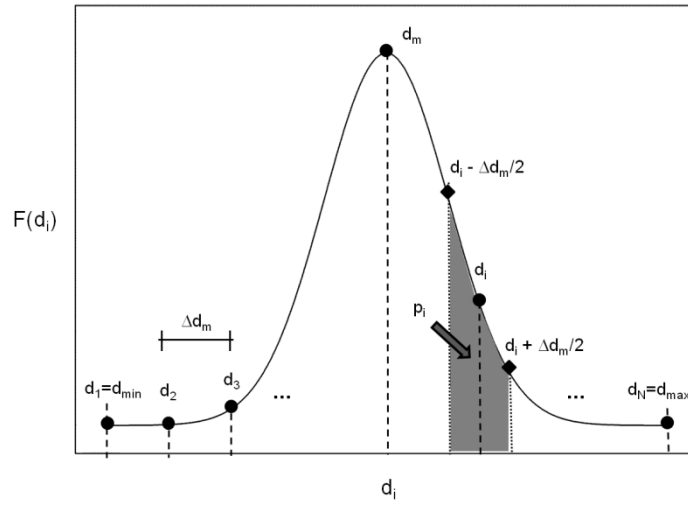


Figura 2: Representação gráfica da determinação da probabilidade p_i de se encontrar um capilar de diâmetro d_i entre os valores d_{min} e d_{max} .

Para os diâmetros d_{min} e d_{max} , a equação 41 foi modificada para:

$$p_{min} = 2 \int_{d_i=d_{min}}^{d_{min} + \frac{\Delta d_m}{2}} F(d_i) \delta d_i \quad e \quad p_{max} = 2 \int_{d_{max} - \frac{\Delta d_m}{2}}^{d_i=d_{max}} F(d_i) \delta d_i \quad (45.a) \text{ e } (45.b)$$

Uma vez determinado p_i para capilar com diâmetro d_i , foi determinado então o número de capilares n_i associado a cada uma, sabendo-se que:

$$p_i = \frac{n_i}{n_T} \Rightarrow n_i = n_T p_i \quad e \quad n_T = \sum_{i=1}^N n_i \quad (46.a) \text{ e } (46.b)$$

Após o cálculo de n_i , o valor de τ_i foi determinado para cada capilar de diâmetro d_i , utilizando-se a equação 16. Para o uso desta, o valor de t_{dmax} foi determinado utilizando-se pulsos de azul de dextrana em condições não-adsortivas, nas velocidades de escoamento da fase móvel avaliadas.

Tal procedimento foi realizado de modo iterativo e sequencial para todas as combinações de d_m , σ_d , w_p , τ_{dmin} e n_T avaliadas com o algoritmo desenvolvido e implementado no *software* SIMAD. O critério de seleção do melhor conjunto de parâmetros foi feito com base na minimização do erro normalizado combinado (*ECN*) entre os valores experimentais da porosidade efetiva ϕ e do volume do leito monolítico V , e os respectivos valores preditos, calculados a partir das equações 5 e 6. A equação do erro utilizada é apresentada abaixo:

$$ECN = \frac{|V_{exp} - V_{pred}|}{V_{exp}} + \frac{|\varphi_{exp} - \varphi_{pred}|}{\varphi_{exp}} \quad (47)$$

Teoricamente a estrutura física e consequentemente os parâmetros estimados não dependeriam da vazão ou velocidade da fase móvel. Por isso, a fim de se verificar tal fato, o procedimento acima descrito foi realizado para diferentes velocidades de escoamento da fase móvel, variando entre $2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e $8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (para o leito com 1,0cm de diâmetro, vazões volumétricas respectivamente entre $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Ajuste do coeficiente de transferência de massa

Uma vez determinados os parâmetros da estrutura física do modelo, que explicam a distribuição dos capilares ao longo do leito, seguiu-se o ajuste do coeficiente de transferência de massa $k_{f,i}$ em cada capilar com diâmetro d_i , necessário ao cálculo do número de Stanton, equação 27.

O coeficiente de transferência de massa em cada capilar foi relacionado à tortuosidade e ao diâmetro do capilar utilizando-se a seguinte correlação (Seguin et al., 1996):

$$k_{f,i} = \gamma \frac{D_0}{d_i} \left(Re_i Sc \frac{d_i}{\tau_i L} \right)^{1/3} \quad (48)$$

Onde D_0 é o coeficiente de difusão do soluto em solução livre e γ é um parâmetro empírico adimensional que depende de todo o sistema capilar do criogel formado (Yun et al., 2009). O número de Reynolds para cada capilar e o número de Schmidt para a fase móvel no leito foram calculados utilizando-se as equações 49 e 50.

$$Re_i = \frac{\rho U_i d_i}{\eta} \quad (49)$$

$$Sc = \frac{\rho \eta}{D_0} \quad (50)$$

Para o ajuste do parâmetro γ necessário ao cálculo de $k_{f,i}$, o modelo capilar (equações 17 e 24) foi resolvido em conjunto com suas equações complementares. Além destas, para o cálculo do número de Peclet para cada capilar com diâmetro d_i , o coeficiente de dispersão axial para cada capilar foi calculado utilizando-se a relação proposta por Gutsche e Bunke (2008).

$$D_{ax,i} = \frac{D_0}{\tau_i} + \frac{1}{\psi} \frac{U_i^2 d_i^2}{192 D_0} \quad (51)$$

Considerando-se o adsorvente irregular, ψ é um parâmetro dado por (Gutsche e Bunke, 2008):

$$\psi = 0,018 Pe_{0,i}^{0,775} = 0,018 \left(\frac{d_i U_i}{D_0} \right)^{0,775} \quad (52)$$

Para isso, foi desenvolvida outra rotina para o *software* SIMAD, em que a equação 17 foi discretizada e resolvida pelo método de Gauss-Seidel, em conjunto com a equação 25 resolvida pelo método de Runge-Kutta de Quarta Ordem (Yun et al., 2009). Para a implementação desta rotina, a equação 17 foi discretizada pelo método de diferenças finitas implícitas, centradas para as derivadas parciais no espaço e progressiva para a derivada parcial temporal (Chapra e Canale, 2006):

$$\frac{\partial C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial z_{D,i}} = \frac{C_{D,i;j+1}^{m+1} - C_{D,i;j-1}^{m+1}}{2\Delta z_{D,i}} \quad (53)$$

$$\frac{\partial^2 C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial z_{D,i}^2} = \frac{C_{D,i;j+1}^{m+1} - 2C_{D,i;j}^{m+1} + C_{D,i;j-1}^{m+1}}{(\Delta z_{D,i})^2} \quad (54)$$

$$\frac{\partial C_{D,i}(z_{D,i}, t_{D,i})}{\partial t_{D,i}} = \frac{C_{D,i;j}^{m+1} - C_{D,i;j}^m}{\Delta t_{D,i}} \quad (55)$$

A equação 17 na forma discretizada tornou-se:

$$-(\alpha + \beta)C_{D,i;j-1}^{m+1} + (1 + 2\alpha)C_{D,i;j}^{m+1} + (\beta - \alpha)C_{D,i;j+1}^{m+1} = C_{D,i;j}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_j^m \quad (56)$$

Onde:

$$\alpha = \frac{\Delta t_{D,i}}{Pe_i (\Delta z_{D,i})^2} \quad (57)$$

$$\beta = \frac{\Delta t_{D,i}}{2\Delta z_{D,i}} \quad (58)$$

$$\lambda = \Delta t_{D,i} \quad (59)$$

Aplicando-se as condições de contorno, equações 18.a, 18.b e 18.c, na forma discretizada (Chapra e Canale, 2006):

$$C_{D,i}^0 = 0 ; j > 1 \quad (60.a)$$

$$C_{D,i;1}^m = C_{0,D} = 1 ; 0 \leq m \leq M \quad (60.b)$$

$$\frac{C_{D,i;J+1}^m - 2C_{D,i;J}^m + C_{D,i;J-1}^m}{(\Delta z_{D,i})^2} = 0 ; j = J \text{ e } 0 \leq m \leq M \quad (60.c)$$

Tem-se que a matriz de resolução foi dada por:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -(\alpha + \beta) & (1 + 2\alpha) & (\beta - \alpha) & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -(\alpha + \beta) & (1 + 2\alpha) & (\beta - \alpha) & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -(\alpha + \beta) & (1 + 2\alpha) & (\beta - \alpha) & \dots & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & -(\alpha + \beta) & (1 + 2\alpha) & (\beta - \alpha) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & -(\alpha + \beta) & (1 + 2\alpha) & (\beta - \alpha) \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 1 & -2 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_{0,D} \\ C_{D,i;1}^{m+1} \\ C_{D,i;2}^{m+1} \\ \dots \\ C_{D,i;j}^{m+1} \\ \dots \\ C_{D,i;j-1}^{m+1} \\ C_{D,i;j}^{m+1} \\ C_{D,i;j+1}^{m+1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ C_{D,i;1}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_1^m \\ C_{D,i;2}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_2^m \\ \dots \\ C_{D,i;j}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_j^m \\ \dots \\ C_{D,i;j-1}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_{j-1}^m \\ C_{D,i;j}^m - \lambda \left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_j^m \\ 0 \end{bmatrix} \quad (61)$$

Em que a matriz dos coeficientes tem dimensões $(J+2) \times (J+2)$ e as demais tem dimensões $(J+2) \times 1$.

Foram utilizados dez nós para a discretização no espaço ($J = 10$) e para cada capilar com diferentes diâmetros d_i foi utilizado um mesmo número de intervalos $\Delta t_{D,i}$ de modo que equivalassem a uma variação no tempo real igual a 1 segundo.

Os valores de $\left(\frac{dq_{D,i}}{dt_{D,i}} \right)_j^m$ para cada nó j ao longo do capilar i foram obtidos a partir da resolução da equação 24 pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem, sendo o conjunto de equações necessário apresentado a seguir (Chapra e Canale, 2006).

$$q_{D,i}^{p+1} = y_j^{p+1} = y_j^p + \frac{h}{6} (k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad (62)$$

Utilizando-se o modelo de isoterma de Langmuir:

$$k_1 = St_i \left[C_{D,i;j}^m - \frac{q_{D,i;j}^p}{b (q_{s,i} - C_0 q_{D,i;j}^p)} \right] \quad (63.a)$$

$$k_2 = St_i \left\{ C_{D,i;j}^m - \frac{(q_{D,i;j}^p + 0,5k_1 h)}{b [q_{s,i} - C_0 (q_{D,i;j}^p + 0,5k_1 h)]} \right\} \quad (63.b)$$

$$k_3 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{(q_{D,i,j}^p + 0,5k_2h)}{b [q_{s,i} - C_0 (q_{D,i,j}^p + 0,5k_2h)]} \right\} \quad (63.c)$$

$$k_4 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{(q_{D,i,j}^p + k_3h)}{b [q_{s,i} - C_0 (q_{D,i,j}^p + k_3h)]} \right\} \quad (63.d)$$

Ou utilizando-se o modelo SMA:

$$k_1 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{q_{D,i,j}^p}{K_{TI}} \left[\frac{C_I}{\Lambda_i - C_0(\nu + \sigma)q_{D,i,j}^p} \right]^\nu \right\} \quad (64.a)$$

$$k_2 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{(q_{D,i,j}^p + 0,5k_1h)}{K_{TI}} \left[\frac{C_I}{\Lambda_i - C_0(\nu + \sigma)(q_{D,i,j}^p + 0,5k_1h)} \right]^\nu \right\} \quad (64.b)$$

$$k_3 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{(q_{D,i,j}^p + 0,5k_2h)}{K_{TI}} \left[\frac{C_I}{\Lambda_i - C_0(\nu + \sigma)(q_{D,i,j}^p + 0,5k_2h)} \right]^\nu \right\} \quad (64.c)$$

$$k_4 = St_i \left\{ C_{D,i,j}^m - \frac{(q_{D,i,j}^p + k_3h)}{K_{TI}} \left[\frac{C_I}{\Lambda_i - C_0(\nu + \sigma)(q_{D,i,j}^p + k_3h)} \right]^\nu \right\} \quad (64.d)$$

Sujeito à seguinte condição inicial:

$$q_{D,i,j}^p = 0 \quad ; \quad \text{para } m = 0 \quad (64.e)$$

Foram utilizados 20 subintervalos dentro de cada $\Delta t_{D,i}$ utilizado, ou seja, para o tempo mudar de m para $(m+1)$ no método de Gauss-Seidel, o tempo no método de Runge-Kutta mudará de p para $(p+1)$ 20 vezes.

Tal procedimento foi realizado de modo iterativo até a obtenção do perfil de ruptura na saída de cada capilar com diâmetro d_i . Então o perfil de ruptura médio na saída do leito foi obtido, na forma adimensional, utilizando-se a equação 28. Inicialmente foram avaliados valores para o parâmetro γ da equação 48 em diferentes intervalos entre 10^{-7} e 10^0 , refinando-se o ajuste na faixa entre 10^{-5} e 10^{-3} com variação de 10^{-5} . Foi obtido um valor para o parâmetro γ em cada condição estudada apresentada na Tabela 2. Os valores selecionados foram aqueles que minimizaram o erro quadrado médio (EQM), equação 65, entre os valores experimentais adimensionais e preditos para a curva de ruptura, para cada modelo de isoterma avaliado.

$$EQM = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R [C_D(t_r)_{exp} - C_D(t_r)_{pred}]^2 \quad (65)$$

Simulação das curvas de ruptura

Após o ajuste do parâmetro γ , procedeu-se à simulação das curvas de ruptura. Uma terceira rotina foi implementada no *software* desenvolvido. Nela, o mesmo algoritmo criado para a resolução das equações 17 e 24 foi utilizado, sem a necessidade de variação do parâmetro γ , obtendo-se o perfil de concentração na saída do leito. Como descrito anteriormente, os perfis de ruptura foram avaliados utilizando-se os modelos de Langmuir e SMA na resolução da equação 24. Foram simuladas curvas de ruptura para as condições apresentadas na Tabela 2, com os dois modelos de isothermas de adsorção empregados, totalizando 14 curvas.

Além da simulação das curvas de ruptura, foi realizada a análise de sensibilidade do modelo, utilizando-se o modelo de isoterma SMA, a vazão volumétrica de 2,0 mL·min⁻¹, concentração de lisozima igual a 4 mg·mL⁻¹ e sem adição de NaCl à fase móvel. Os parâmetros k_p , D_0 , γ , A , σ , ν foram variados entre valores 50% menores a 100% maiores dos que os utilizados nas simulações. Também avaliou-se o efeito da variação dos parâmetros do modelo de isoterma de Langmuir (q_s e b) e do parâmetro γ ajustado a partir do seu uso, nas mesmas condições operacionais mencionadas. Os resultados foram avaliados comparando-se o efeito observado nas curvas de ruptura no tempo de ruptura (quando $C/C_0 = 0,01$), de inflexão ($C/C_0 = 0,50$) e de saturação do leito ($C/C_0 = 0,99$).

Outras observações realizadas

Além das informações já mencionadas, também foram avaliadas para as diferentes condições testadas a variação nos valores de τ_i , U_i , Re_i , $D_{ax,i}$, Pe_i , $k_{f,i}$ e St_i em função do diâmetro d_i , utilizando-se as equações 13, 16, 22, 27, 48, 49 e 51, além do número de Sherwood para cada capilar com diâmetro d_i , utilizando-se a equação 66 (Persson et al., 2004; Cussler, 2007).

$$Sh_i = \frac{k_{f,i} d_i}{D_0} \quad (66)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização dos procedimentos de ajuste de parâmetros e simulação das curvas de ruptura, além das informações apresentadas na Tabela 1, foram utilizadas informações obtidas previamente para os modelos de Langmuir e SMA nas condições de temperatura e força-iônica desejadas (Tabela 4). Para a lisozima, admitiu-se a massa molar igual a $14307 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Canfield, 1963) e um coeficiente de difusão em solução livre (D_0) igual a $1,18 \times 10^{-10} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (Luzzati et al., 1961; Tyn e Guzek, 1990; He e Nyemeyer, 2003). A variação nos valores de densidade e viscosidade observados para as soluções utilizadas foi desprezível, admitindo-se a densidade igual a $1004,2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e viscosidade igual a $1,19 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

Tabela 4: Parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir e SMA utilizados no presente trabalho.

		Modelo de Langmuir			Modelo SMA			
T	C _{NaCl}	q _s	b	R ²	K _{TI}	v	σ	R ²
(°C)	(mol·L ⁻¹)	(10 ⁻³ mol·L ⁻¹)	(10 ⁴ L·mol ⁻¹)					
	0,00	2,05	9,36	0,98			10,93	0,98
20	0,05	1,53	5,82	0,99	355,36	1,60	15,20	0,97
	0,10	1,38	3,43	0,99			16,98	0,97

Parâmetros justados no segundo artigo da presente tese.

C_{NaCl} => concentração de NaCl adicionada à solução-tampão.

Obs: a concentração de íons Na⁺ na solução-tampão original foi de $0,0299 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ajuste dos parâmetros físicos da estrutura capilar

Verificou-se uma variação ao redor de 12% para os valores de d_m , σ_d , w_p e τ_{dmin} para as diferentes velocidades de escoamento avaliadas (Figura 3). A combinação desses parâmetros causou uma variação no número total de poros em torno de 10% e um erro combinado normalizado máximo igual a $4,8 \times 10^{-5}$.

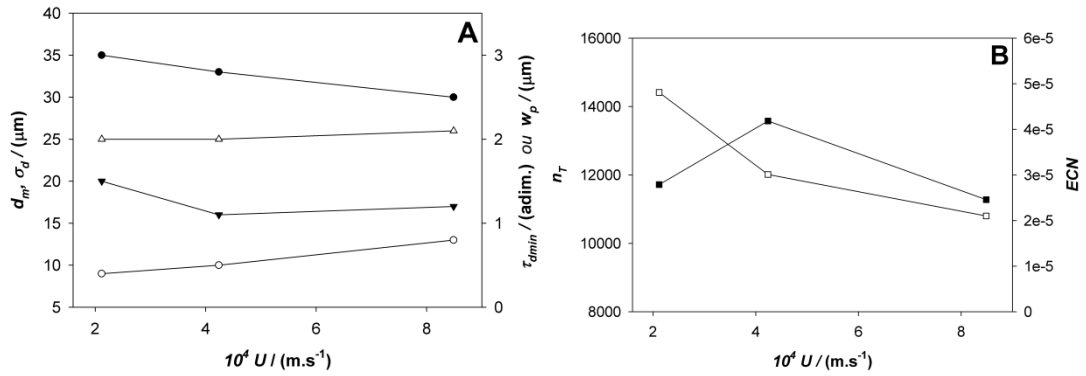


Figura 3: Parâmetros físicos do sistema capilar e erro obtido em função da velocidade de escoamento. **A:** ● d_m , ○ σ_d ; △ w_p e ▼ τ_{dmin} . **B:** ■ n_T e □ ECN .

Dado o grande número de combinações possíveis entre esses parâmetros, pode-se dizer que a variação observada esteve dentro de uma faixa aceitável, sendo utilizados para as etapas posteriores os valores médios de cada parâmetro (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios para os parâmetros físicos ajustados do sistema capilar.

Parâmetro	Presente trabalho	Yun et al. (2009)		Yun et al. (2011)	
		Criogel 1	Criogel 2	Criogel 1	Criogel 2
estrutura	pAAm	pDMAA	pAAm	pHEMA	pHEMA
L (mm)	94	75	97	48	65
d_L (mm)	10	10	10	5	10
d_m (μm)	33	75	47	51	46
σ_d (μm)	11	13,5	16,5	13	19,7
w_p (μm)	2,0	4,5	3,5	4,5	3,5
τ_{dmin}	1,3	1,44	1,0	2,36	2,1
n_T	12191	6466	11528	2306	7791
ECN	$3,3 \times 10^{-5}$	---	---	---	---

pAAm – poli(acrilamida); pDMAA – poli(dimetil acrilamida); pHEMA – poli(hidroxietil metacrilato)

Os valores obtidos no presente trabalho foram similares aos reportados em outros trabalhos utilizando-se a modelagem capilar para a descrição da estrutura dos criogéis (Yun et al., 2009 e 2011). Persson et al. (2004) obtiveram um diâmetro médio igual a 35,2 μm utilizando um modelo que não considerava a tortuosidade dos capilares. O erro observado foi pequeno e a faixa em que o número total de capilares poderia ser encontrado situou-se entre um mínimo de 4324 e um máximo de 116189, calculados utilizando-se a equação 40.

Diferentemente do relatado por outros autores (Yun et al., 2009 e 2011), a tortuosidade apresentou uma grande variação com o diâmetro dos capilares (Figura 4). Tal fato deveu-se à menor permeabilidade do leito do presente trabalho ($k_p \approx 8,5 \times 10^{-13} \text{ m}^2$) comparado aos dos leitos utilizados por eles (k_p entre 10^{-11} m^2 e 10^{-12} m^2). Uma permeabilidade menor ou resistência ao escoamento maior implica em uma maior dificuldade da fase móvel em percolar o leito, o que pode ser representado por uma tortuosidade elevada. Observou-se ainda que os valores para a tortuosidade variaram pouco em função da velocidade de escoamento, o que reforça a adequação do uso dos valores médios dos parâmetros ajustados para as diferentes velocidades de escoamento avaliadas.

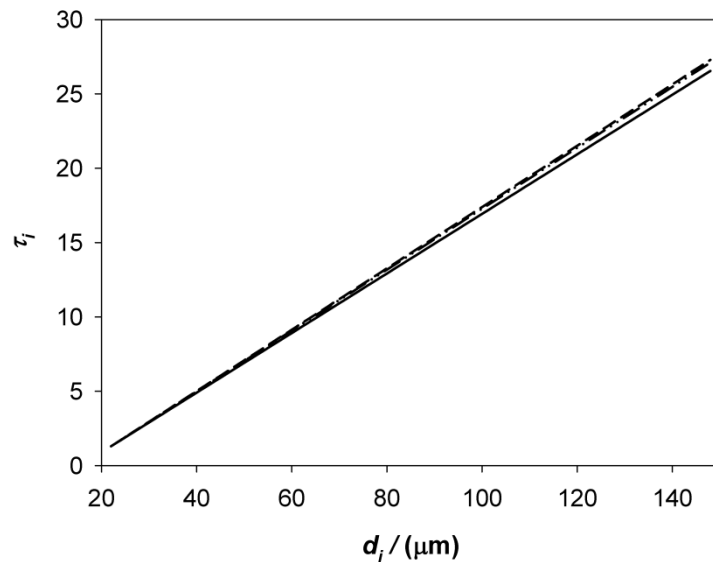


Figura 4: Tortuosidade dos capilares em função do diâmetro. (— · — $U = 2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; — $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; - - - $U = 8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Características hidrodinâmicas e dispersivas da estrutura capilar

A partir dos parâmetros físicos ajustados, foram obtidos os valores de U_i , Re_i , $D_{ax,i}$ e Pe_i para cada diâmetro capilar d_i . (Figura 5). A velocidade de escoamento tendeu a aumentar com o aumento do diâmetro capilar (Figura 5A). Isso era previsto, pois ao se admitir no modelo que a tortuosidade aumentou com o diâmetro capilar, o caminho percorrido por um pulso de soluto até a saída do leito também aumentou. Logo para os pulsos em cada capilar chegarem de modo simultâneo na saída do leito a velocidade de escoamento também deveria aumentar com o diâmetro. Uma pequena redução nos valores de U_i foi observada para valores de d_i inferiores a $30 \mu\text{m}$, o que ocorreu devido ao maior aumento da tortuosidade em relação ao

aumento da área da seção transversal dos capilares nessa faixa de diâmetros. O aumento dos valores de U_i se reflete no número de Reynolds, que apesar de se manter dentro do regime laminar tende a aumentar com o diâmetro. No entanto, o aumento de U_i foi linear com d_i , enquanto que os valores de Re_i aumentaram de maneira quadrática com o diâmetro, indicando um aumento nas forças inerciais mais acentuado se comparado às forças viscosas (Cussler, 2007). O aumento na velocidade de escoamento da fase móvel, como esperado, causou um aumento nos valores de U_i e Re_i .

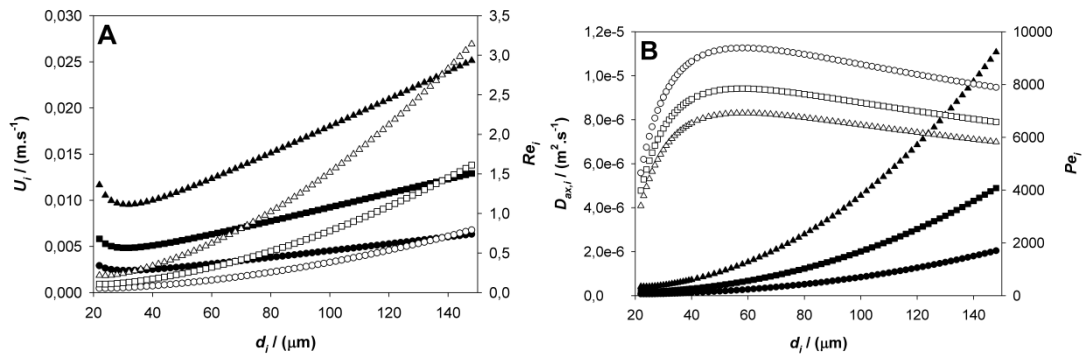


Figura 5: Algumas características de escoamento em função do diâmetro capilar. **A:** velocidade de escoamento e número de Reynolds. **B:** coeficiente de dispersão axial e número de Peclet. (● e ○: $U = 2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; ■ e □: $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; ▲ e △: $U = 8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Símbolos negros são lidos no eixo à esquerda e símbolos brancos no eixo à direita).

O coeficiente de dispersão axial aumentou com o diâmetro capilar e com o aumento da velocidade de escoamento (Figura 5B). Os valores obtidos situaram-se dentro da faixa de $10^{-8} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ e $10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, semelhante ao observado por Yun et al. (2009). Em todos os casos os valores observados foram superiores ao coeficiente de difusão em solução livre da lisozima, demonstrando a importância do efeito de mistura convectiva no escoamento ao longo dos capilares. Já o número de Peclet obtido foi bastante elevado, mostrando que os efeitos associados à velocidade do escoamento foram superiores aos efeitos dispersivos observados. Até o diâmetro capilar de cerca de 50 μm houve um incremento no número de Peclet, indicando que os efeitos dispersivos têm menor contribuição nessa faixa de valores. Para diâmetros superiores a 50 μm o número de Peclet diminuiu com o aumento do diâmetro capilar, indicando que os efeitos dispersivos aumentam mais rapidamente que o próprio aumento da velocidade de escoamento nos capilares. Verificou-se também que os

efeitos dispersivos são menores em velocidades globais de escoamento mais baixas, onde se observaram os maiores valores do número de Peclet.

Ajuste do coeficiente de transferência de massa

O coeficiente de transferência de massa engloba aspectos relacionados à difusão e convecção (Cussler, 2007). No entanto, nas correlações comumente utilizadas para se calcular o seu valor, alterações nos efeitos convectivos são consideradas, a partir da variação da velocidade ou número de Reynolds, mas não nos efeitos difusivos, utilizando-se usualmente um coeficiente de difusão livre constante (Seguin et al., 1996; Myiabe e Guiochon, 2002; Persson et al., 2004; Cussler, 2007; Yun et al., 2009). Por isso, optou-se neste trabalho pelo ajuste de um valor para o parâmetro γ da equação 48 para cada condição avaliada apresentada na Tabela 2, diferentemente do que foi realizado por Yun et al. (2009), que ajustaram γ para uma única velocidade de escoamento e utilizaram o valor obtido para as demais velocidades experimentais, sob condições constantes de concentração de sal e proteína.

Tabela 6: Valores ajustados para o parâmetro γ da equação 48 e erros obtidos, utilizando-se os modelos de Langmuir e SMA.

Perfil avaliado	U (m·s ⁻¹)	C_{NaCl} (mol·L ⁻¹)	C_{lis} (mg·mL ⁻¹)	γ (Langmuir)	γ (SMA)
1	$2,12 \times 10^{-4}$	0,00	4,0	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$
2	$4,24 \times 10^{-4}$	0,00	4,0	$3,7 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$
3	$8,49 \times 10^{-4}$	0,00	4,0	$7,9 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-4}$
4	$4,24 \times 10^{-4}$	0,00	2,0	$3,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$
5	$4,24 \times 10^{-4}$	0,00	6,0	$3,4 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$
6	$4,24 \times 10^{-4}$	0,05	4,0	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4}$
7	$4,24 \times 10^{-4}$	0,10	4,0	$3,4 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4}$

Os valores obtidos utilizando-se o modelo de Langmuir foram sempre superiores àqueles obtidos utilizando-se o modelo SMA, e para ambos os valores de γ aumentaram com o aumento da velocidade de escoamento e tenderam a permanecer constantes com o aumento da concentração de proteína na fase móvel (Tabela 6 e Figura 6). Já com o aumento da concentração de sal os valores de γ tenderam a permanecer constantes para o modelo de Langmuir e apresentaram uma queda ao se

utilizar o modelo SMA. Os valores do EQM obtidos no ajuste de γ variaram entre 0,07 e 0,26, com um valor médio igual a 0,16.

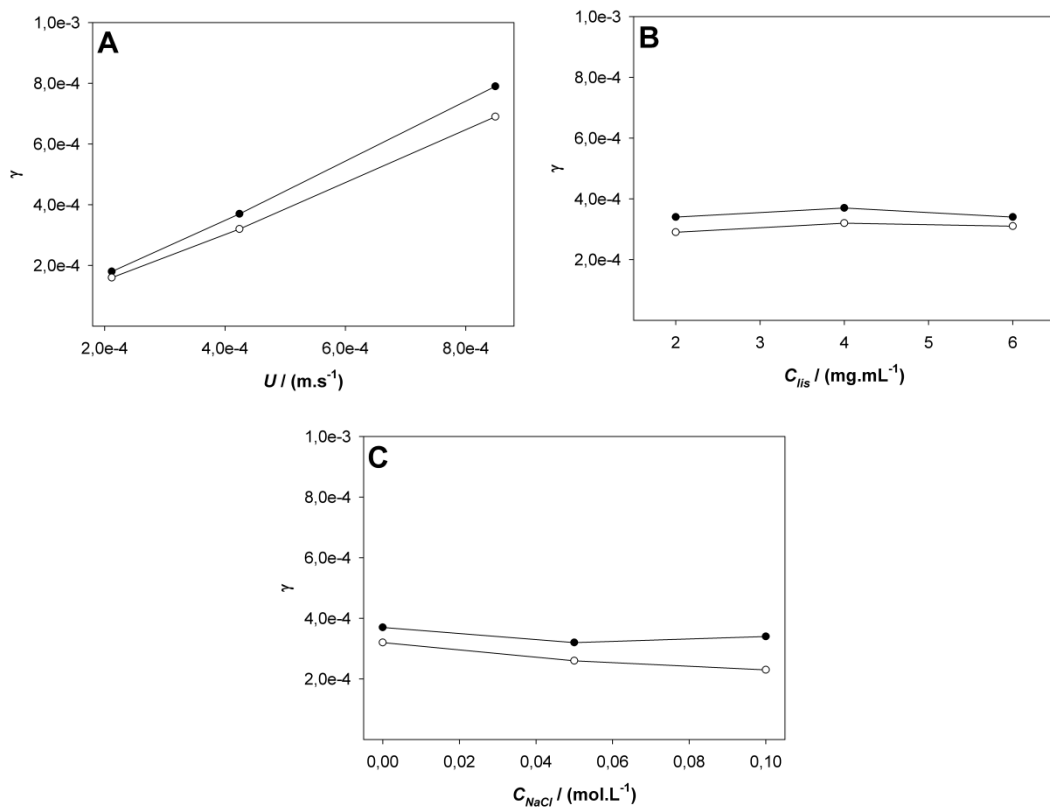


Figura 6: Valores de γ ajustados, utilizando-se os modelos de Langmuir (●) e SMA (○). A: Efeito da velocidade global de escoamento ($C_{lis} = 4,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). B: Efeito da concentração de proteína ($U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ e $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). C: Efeito da concentração de NaCl ($C_{lis} = 4,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Os valores obtidos neste trabalho foram inferiores aos encontrados por Yun et al. (2009), iguais a 0,08 e 0,34, para criogéis também utilizando modelagem capilar. No entanto, no modelo utilizado por esses autores apenas os efeitos de transferência de massa foram individualizados nos capilares, sendo os demais avaliados de modo global no leito. Tais autores não apresentaram explicações sobre as diferenças encontradas para γ , apenas atribuindo as diferenças observadas à estrutura física dos sistemas capilares avaliados, que fazem com que as características de transferência de massa sejam diferentes em cada criogel.

A partir dos valores de γ ajustados, foram calculados os valores de $k_{f,i}$, St_i e Sh_i , sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 7.

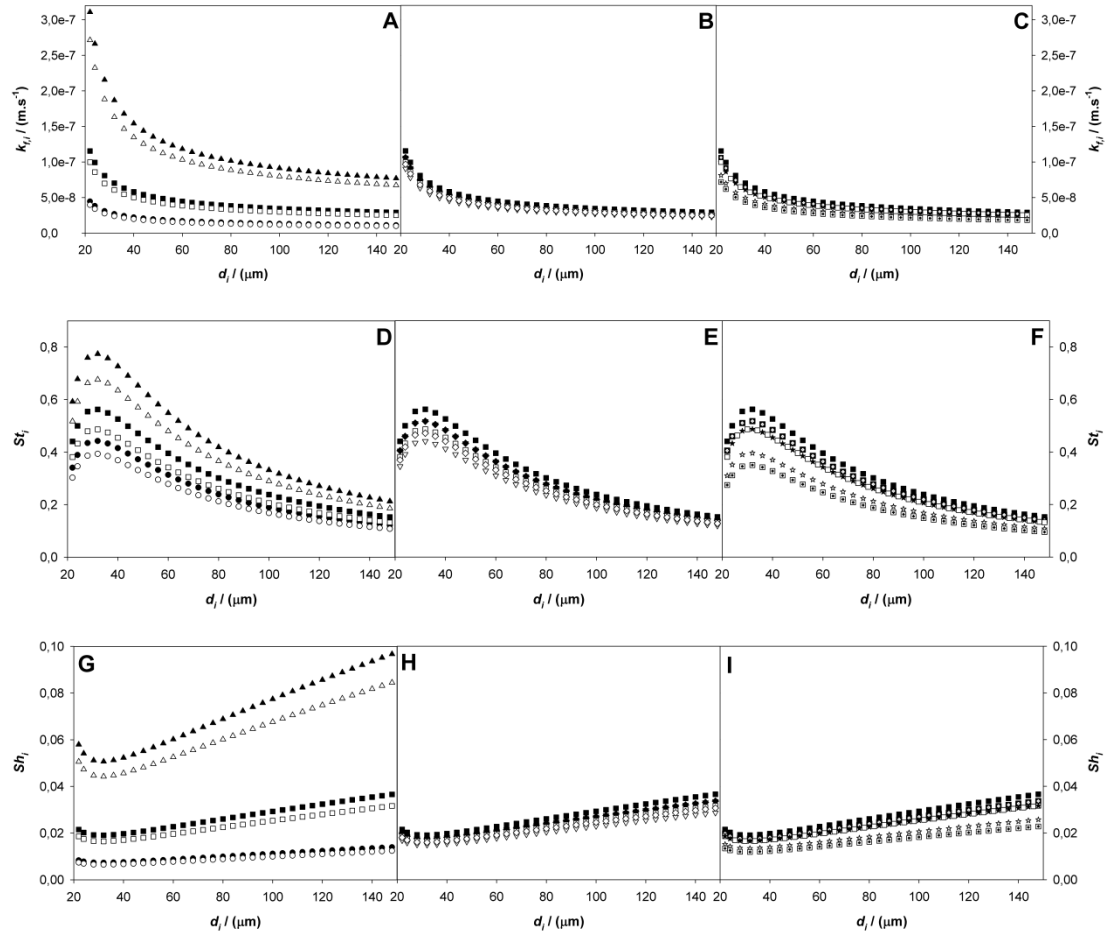


Figura 7: Valores de $k_{f,i}$, St_i e Sh_i obtidos a partir do ajuste de γ , em função do diâmetro capilar. **A**, **D** e **G**: efeito da velocidade global de escoamento, com $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (\bullet, \circ : $U = 2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; \blacksquare, \square : $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; $\blacktriangle, \triangle$: $U = 8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). (— · —). **B**, **E** e **H**: efeito da concentração de proteína, com $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\blacktriangledown, \triangledown$: $C_{lis} = 2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; \square, \square : $C_{lis} = 6,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **C**, **F** e **I**: efeito da concentração de sal, com $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ι, ϕ : $C_{NaCl} = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \blacksquare, \square : $C_{NaCl} = 0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Símbolos negros para valores obtidos a partir do modelo de Langmuir e símbolos brancos utilizando-se o modelo SMA.

Em todos os casos os valores de $k_{f,i}$ diminuíram com o aumento de diâmetro capilar, enquanto que os valores de St_i aumentaram até o diâmetro capilar de cerca de $30 \mu\text{m}$ e decaíram daí em diante com o incremento de d_i . O comportamento inverso foi observado para os valores de Sh_i . Observou-se ainda que para um mesmo capilar de diâmetro d_i , o valor de $k_{f,i}$ aumentou com o aumento da velocidade de escoamento. Gao et al. (2010) concluíram em seus estudos que a relação positiva entre o

coeficiente de transferência de massa e a velocidade de escoamento em sistemas cromatográficos sob condições de número de Reynolds muito baixo se deve à redução da camada limite estagnada sobre as superfícies por onde o fluido escoava.

Nas Figuras 7D a 7F observou-se a redução no número de Stanton com o aumento do diâmetro capilar a partir de 30 μm , indicando que a transferência de massa tendeu a ser reduzida, em comparação à velocidade de escoamento nos capilares. Já o aumento observado no número de Sherwood nas Figuras 7G a 7I a partir dos 30 μm de diâmetro indicou que o processo de transferência de massa na camada estagnada ganhou importância relativa quando comparado ao processo de difusão do soluto em questão (Cussler, 2007). Observou-se também que a mudança na vazão volumétrica afetou os valores de $k_{f,i}$, St_i e Sh_i , e sendo menos intenso o efeito da concentração de proteína na fase móvel. Já para a variação de sal na fase móvel verificou-se que ao se utilizar o modelo SMA os valores dos parâmetros avaliados mostraram-se mais sensíveis quando comparados àqueles obtidos utilizando-se o modelo de Langmuir, apresentando maior queda com o aumento da presença de sal em solução. Isso sugere que o modelo SMA pode ser melhor para descrever o equilíbrio de troca iônica nas condições estudadas, uma vez que é conhecido que o efeito do sal afeta tal equilíbrio (Jozwik et al., 2005).

Yun et al. (2009) observaram uma redução dos valores de $k_{f,i}$ com o aumento do diâmetro capilar, obtendo valores entre $5,0 \times 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e $8,0 \times 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, similares ao presente trabalho, sem, no entanto, não proporem explicações sobre o comportamento observado. Na Figura 8 verificou-se o efeito do diâmetro capilar na razão entre a velocidade de escoamento e a área da seção transversal dos mesmos, para cada velocidade global de escoamento avaliada. Observou-se um comportamento não-linear, indicando que U_i e A_i não aumentaram à mesma proporção com o aumento do diâmetro. Na Figura 8 ficou claro que a razão entre U_i e A_i decresceu com o incremento de d_i , comprovando que a área da seção transversal aumentou mais que a velocidade de escoamento.

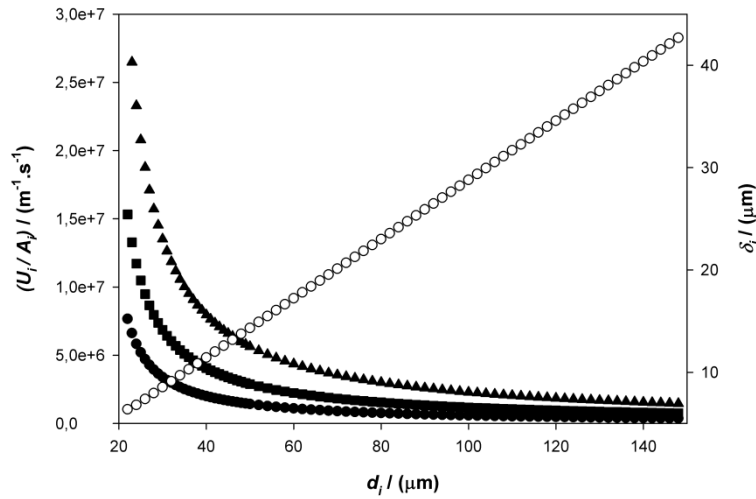


Figura 8: Razão entre a velocidade de escoamento e a área da seção transversal dos capilares, e espessura da camada limite, ambos em função do diâmetro d_i . (● $U = 2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; ■ $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; ▲ $U = 8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Símbolos negros são lidos no eixo à esquerda e símbolos brancos no eixo à direita).

Provavelmente, apesar do aumento do valor de U_i para capilares com maiores diâmetros e conseqüentemente maiores valores para o número de Reynolds, que se mantêm muito baixos no regime laminar, a área A_i aumentou mais rapidamente com o incremento do diâmetro dos capilares. Como consequência desse fato, a espessura da camada de fluido estagnado nas paredes internas dos capilares possivelmente não reduziu ou até mesmo aumentou com o aumento do diâmetro d_i , dificultando a transferência de massa nessa camada, o que resultaria na redução dos valores de $k_{f,i}$. A medição da camada estagnada em meios cromatográficos é uma complicada tarefa (Gao et al., 2010), mas uma simplificação foi feita para auxiliar esta discussão. Admitindo-se o escoamento laminar plenamente desenvolvido dentro dos capilares cilíndricos, tem-se que o perfil de velocidade em cada capilar foi dado por (Munson et al., 2002):

$$u_i = 2U_i \left[1 - \left(\frac{2r_i}{d_i} \right)^2 \right] \quad (67)$$

A espessura da camada limite, definida como a distância das paredes dos capilares em que, no perfil de velocidade, se chegue a 99% do valor da velocidade média de escoamento (Munson et al., 2002), pôde ser então calculada:

$$\delta_i = d_i - 2r_i \quad ; \quad \text{quando } u_i = 0,99U_i \quad (68)$$

Os valores para a espessura da camada limite, δ_i , em função do diâmetro capilar d_i , estão apresentados na Figura 8. Verificou-se que a espessura da camada limite aumentou com o aumento do diâmetro capilar. Com isso, a transferência de massa nessa camada foi prejudicada com o aumento de d_i , fazendo com que o coeficiente de transferência de massa tendesse a diminuir, o que de fato foi observado.

Simulação das curvas de ruptura

Uma vez ajustados os valores para o parâmetro γ e conhecidos os valores de $k_{f,i}$, as curvas de ruptura foram simuladas nas diferentes condições apresentadas na Tabela 2, utilizando-se o modelo capilar proposto. Os resultados experimentais e simulados obtidos são apresentados na Figura 9. Foram observadas distorções nas curvas de ruptura médias, causadas devido às diferenças no comportamento individual de cada capilar (Persson et al., 2004).

O aumento da velocidade de escoamento causou uma redução no tempo necessário à formação e estabilização das curvas de ruptura (Figura 9A), devido à maior quantidade de proteína entrando no leito e saturando-o mais rapidamente. Pelo mesmo motivo o aumento da concentração de lisozima na fase móvel também antecipou a formação das curvas de ruptura (Figura 9B). Já a antecipação nas curvas de ruptura observada com o aumento da concentração de NaCl (Figura 9C) ocorreu devido ao deslocamento do equilíbrio de troca iônica para uma condição menos favorável à adsorção da lisozima, reduzindo conseqüentemente a capacidade de saturação do leito.

De modo geral, o comportamento observado das curvas de ruptura simuladas utilizando-se o modelo de Langmuir foi semelhante ao observado quando o modelo SMA foi empregado. No entanto, este último demonstrou ser um pouco melhor, em especial com o aumento da concentração de sal na fase móvel (Figura 9C), condições em que o modelo SMA é mais adequado para se descrever o equilíbrio de troca iônica de macromoléculas.

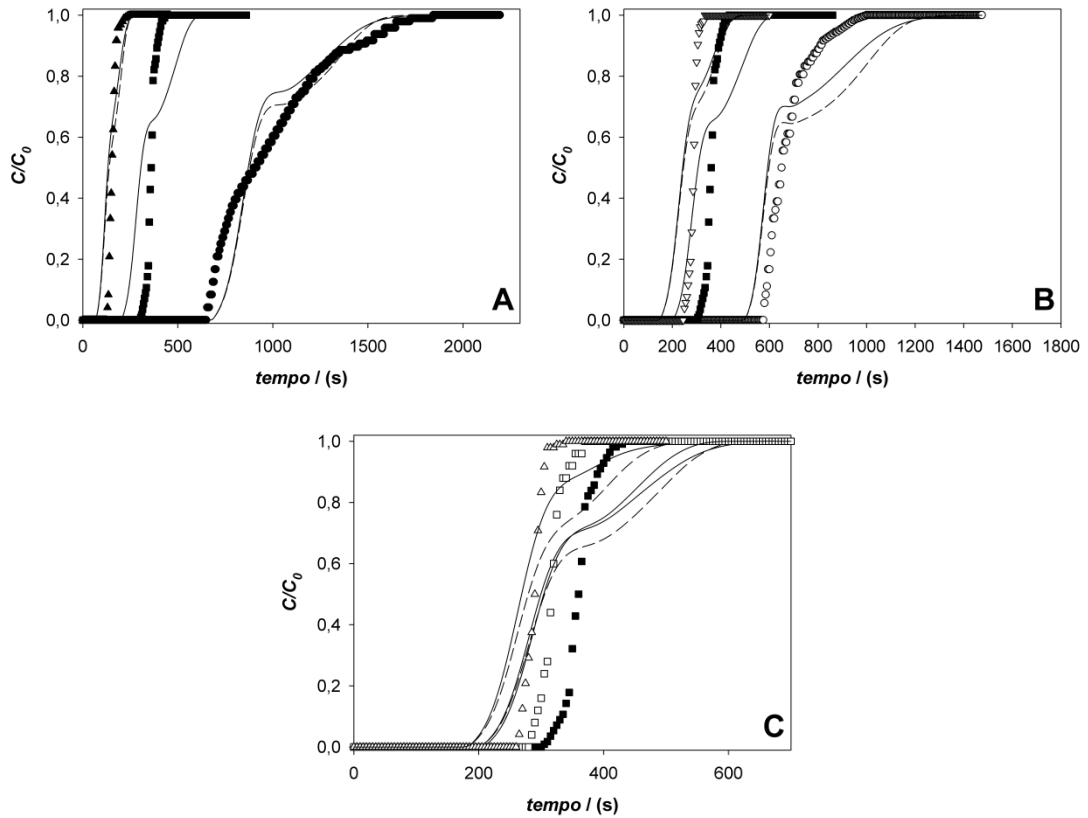


Figura 9: Curvas de ruptura experimentais (símbolos) e simuladas (linhas) para a lisozima, sob condições adsortivas. **A:** $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de escoamento variável (\bullet : $U = 2,12 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; \blacksquare : $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; \blacktriangle : $U = 8,49 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). **B:** $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e concentração de lisozima variável (\circ : $C_{lis} = 2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; \blacksquare : $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; ∇ : $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **C:** $C_{lis} = 4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $U = 4,24 \times 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e concentração de NaCl variável (\blacksquare : $C_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \square : $C_{NaCl} = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \triangle : $C_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Em todos os casos: - - - utilizando modelo de Langmuir e — modelo SMA.

A variação dos parâmetros avaliados teve um efeito nulo ou muito pequeno no tempo de ruptura (quando $C/C_0 = 0,01$) dos perfis obtidos (Figuras 10 e 11). As diferenças observadas foram crescentes para o ponto de inflexão ($C/C_0 = 0,50$) e de saturação ($C/C_0 = 0,99$) do leito. Verificou-se que a variável permeabilidade ao escoamento (k_p) tem forte efeito nos perfis obtidos, sendo de grande importância a determinação adequada deste parâmetro do leito.

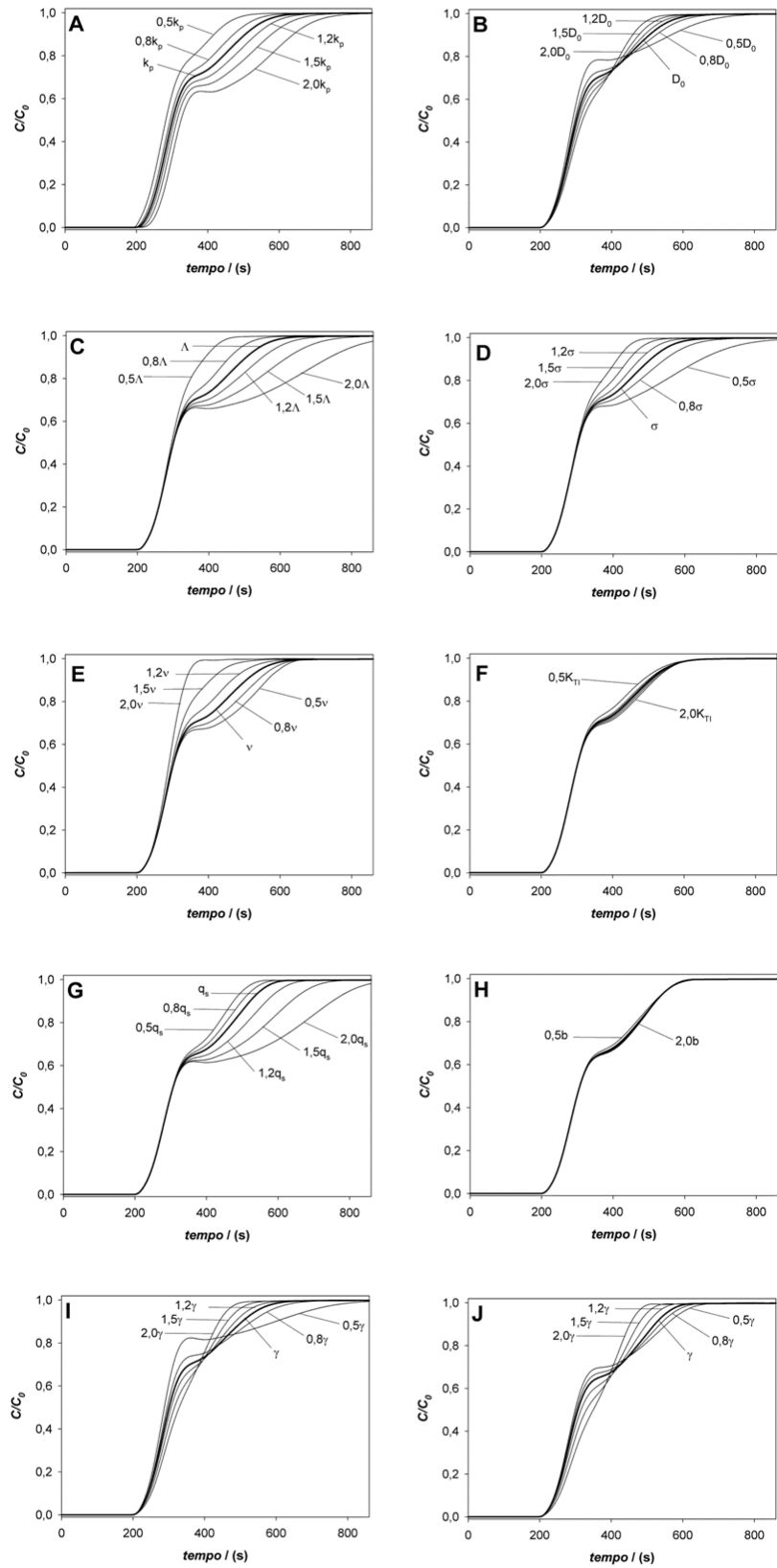


Figura 10: Perfis de ruptura obtidos na análise de sensibilidade do modelo proposto. Efeito da variação de k_p (A), D_0 (B), λ (C), σ (D), ν (E), K_{Tl} (F), q_s (G), b (H), γ_{SMA} (I) e $\gamma_{Langmuir}$ (J).

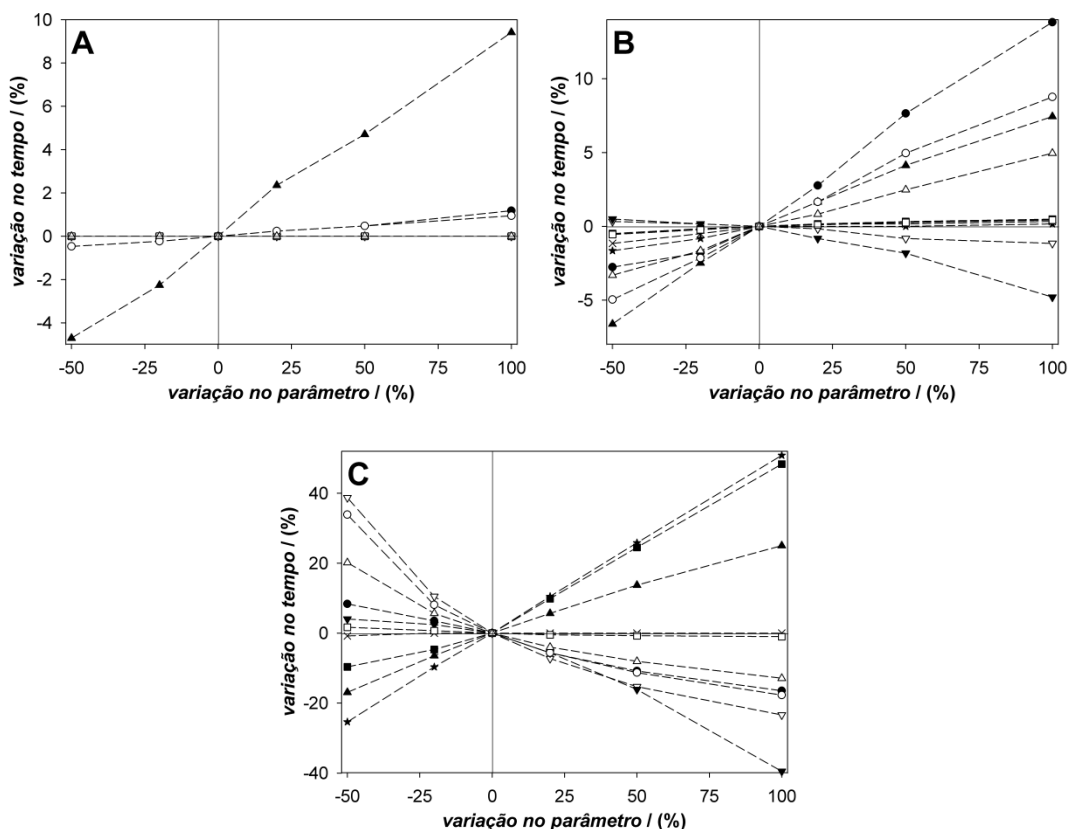


Figura 11: Efeito da variação dos parâmetros avaliados no tempo de ruptura (A), de inflexão (B) e de saturação (C). \blacktriangle k_p ; \triangle D_0 ; ι A ; ∇ σ ; \blacktriangledown ν ; \times K_{TI} ; \blacksquare q_s ; \square b ; \circ γ_{SMA} e \bullet $\gamma_{Langmuir}$.

O efeito da variação de K_{TI} (Figura 10F) e b (Figura 10H), relacionados ao equilíbrio de adsorção mostrou-se quase nulo, enquanto que a variação dos parâmetros associados à capacidade de saturação do leito, A , σ , ν e q_s apresentou uma variação maior nas curvas de ruptura, principalmente na parte final delas. A variação nos valores de γ ajustados a partir do uso dos modelos de SMA e Langmuir apresentaram efeitos similares nas curvas de ruptura. A capacidade preditiva do modelo proposto foi pouco afetada na região inicial da curva, próxima ao ponto de ruptura ($C/C_0 = 0,01$), demonstrando seu potencial de uso nos estudos de purificação ou recuperação de compostos, em situações em que normalmente o processo é interrompido neste ponto ou próximo a ele. Esse resultado tem grande importância prática, pois é a partir da porção inicial da curva de ruptura que se determina a capacidade dinâmica útil do leito (Hashim e Chu, 2007).

Foi possível o uso do modelo apresentado, considerando-se os efeitos dispersivos e de transferência de massa individuais em cada capilar, para descrever o

comportamento de troca iônica em um leito monolítico macroporoso. No entanto, mais estudos são necessários, para melhorar a capacidade preditiva do mesmo.

5. CONCLUSÕES

O sistema capilar utilizado para descrever a estrutura de um leito monolítico polimérico supermacroporoso apresentou distribuição normal de probabilidade, com diâmetro médio igual a 33 μm e desvio-padrão de 11 μm , sendo pequeno o efeito da velocidade da fase móvel nos valores observados. Um modelo capilar considerando-se efeitos dispersivos e adsorptivos dentro dos capilares foi proposto, verificando-se a partir do seu uso que o coeficiente de transferência de massa dentro dos capilares aumentou com o aumento da velocidade global de escoamento e foi pouco afetado por mudanças na concentração de proteína. Com o aumento da concentração de sal, os valores obtidos de $k_{f,i}$ com o uso do modelo SMA foram mais afetados do que com o uso do modelo de Langmuir. O valor de $k_{f,i}$ caiu com o aumento do diâmetro capilar, possivelmente devido ao aumento do tamanho da camada de fluido estagnado no seu interior. Verificou-se da avaliação dos números de Reynolds, Peclet, Stanton e Sherwood que o escoamento foi laminar, e que com o aumento do diâmetro capilar ocorreu um aumento da contribuição de efeitos dispersivos no escoamento e do processo de transferência de massa na camada estagnada de fluido em relação aos processos difusivos. O uso do modelo SMA mostrou-se adequado para descrever o equilíbrio de troca iônica, principalmente com o aumento da presença de contraíons em solução. O modelo capilar proposto foi capaz de descrever a complexa estrutura do leito monolítico polimérico estudado, no entanto necessitando de mais estudos para aumentar sua capacidade preditiva.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Professor Sérgio de Souza Castro da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela contribuição no desenvolvimento do *software* SIMAD e ao Professor Junxian Yun da Universidade de Tecnologia de Zhejiang pelas informações sobre a modelagem capilar.

7. LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área da seção transversal do leito monolítico (m ²)	EQM	Erro quadrado médio (-)
A_i	Área da seção transversal do capilar de diâmetro d_i (m ²)	h	Tamanho do passo no método de Runge-Kutta
A_{sup}	Área superficial total do sistema capilar (m ²)	i	Contador para os capilares de diferentes diâmetros (-)
$A_{sup,i}$	Área superficial interna do capilar com diâmetro d_i (m ²)	j	Contador para os nós no espaço na discretização da equação 17 (-)
b	Parâmetro do modelo de Langmuir (m ³ ·mol ⁻¹)	J	Número total de nós no espaço na discretização da equação 17 (-)
C	Concentração de soluto na fase móvel percolando o leito (mol·m ⁻³)	k_1, k_2, k_3, k_4	Constantes na resolução da equação 24 pelo método de Runge-Kutta
C_0	Conc. de soluto na fase móvel, na entrada do leito (mol·m ⁻³)	$k_{f,i}$	Coefficiente de transferência de massa para o capilar de diâmetro d_i (m·s ⁻¹)
$C_{0,D}$	Conc. adimensional de soluto na fase móvel, na entrada do leito (-)	k_p	Constante de permeabil. do leito (m ²)
$C_{D,i}$	Concentração adimensional de soluto na fase móvel no capilar de diâmetro d_i (-)	K_{TI}	Constante do processo de troca iônica no modelo SMA (-)
$C_{D,i}^*$	Conc. adim. de soluto na superf. interna do capilar de diâmetro d_i (-)	L	Comprimento total do leito (m)
C_i	Conc. de soluto na fase móvel no capilar de diâmetro d_i (mol·m ⁻³ _{capilar})	L_i	Comprimento do capilar de diâmetro d_i (m)
C_i^*	Conc. de soluto na superf. interna do capilar de diâmetro d_i (mol·m ⁻³ _{capilar})	m	Contador de passos temporais na discretização da equação 17 (-)
C_I	Concentração do contraíon monovalente na fase móvel (mol·m ⁻³)	M	Número total de passos temporais na discretização da equação 17 (-)
C_{lis}	Concentração de lisozima na fase móvel na Tabela 2 (mg·mL ⁻¹)	n_i	Número total de capilares com diâmetro d_i (-)
C_{NaCl}	Concentração de NaCl adicionada à fase móvel (mol·L ⁻¹)	n_{ions}	Quantidade máxima de íons retida no leito (mols _{Na+})
$C_D(t_r)_{exp}$	Conc. exper. adimen. de soluto na saída do leito no ponto de tempo r (-)	n_T	Número total de capilares no leito monolítico (-)
$C_D(t_r)_{pred}$	Conc. pred. adimen. de soluto na saída do leito no ponto de tempo r (-)	N	Quantidade total de diferentes diâmetros de capilares usados no modelo (-)
D_0	Coefficiente de difusão do soluto em solução livre (m ² ·s ⁻¹)	p	Contador dos passos no método de Runge-Kutta (-)
$D_{ax,i}$	Coefficiente de dispersão axial para o capilar de diâmetro d_i (m ² ·s ⁻¹)	p_i	Probab. de se encontrar um capilar com diâm. d_i numa população com diâmetros entre d_{min} e d_{max} (-)
d_i	Diâmetro do i -ésimo capilar (m)	p_{max}	Probab. de se encontrar um capilar com diâm. d_{max} numa população com diâmetros entre d_{min} e d_{max} (-)
d_L	Diâmetro do leito (m)	p_{min}	Probab. de se encontrar um capilar com diâm. d_{min} numa população com diâmetros entre d_{min} e d_{max} (-)
d_m	Diâmetro médio dos capilares (m)	Pe_i	Número de Peclet para o capilar com diâmetro d_i (-)
d_{max}	Diâmetro máximo observado para os capilares (m)	$Pe_{0,i}$	Número de Peclet molecular para o capilar com diâmetro d_i (-)
d_{min}	Diâmetro mínimo observado para os capilares (m)	q	Concentração de soluto adsorvido no equilíbrio (mol·m ⁻³ _{leito})
erf	Função erro de Gauss	$q_{D,i}$	Conc. adim. de soluto adsorvido no capilar com diâmetro d_i (-)
ECN	Erro combinado normalizado (-)	q_i	Conc. de soluto adsorvido no capilar com diâmetro d_i (mol·m ⁻³ _{capilar})

q_s	Capacidade máxima de saturação do leito ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}_{\text{leito}}$)	Δw_p	Incremento do valor de w_p no processo de ajuste do parâmetro (m)
$q_{s,i}$	Capacidade máxima de saturação do capilar com diâmetro d_i ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}_{\text{leito}}$)	Δn_T	Incremento do valor de n_T no processo de ajuste do parâmetro (-)
Q	Vazão volumétrica ao longo do leito ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$)	ΔP	Queda de pressão no leito (Pa)
Q_i	Vazão volumétrica ao longo do capilar com diâmetro d_i ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$)	ΔP_i	Queda de pressão no capilar de diâmetro d_i (Pa)
r	Contador dos pontos exp. no perfil de ruptura na saída do leito (-)		<i>Letras gregas</i>
r_i	Distância radial a partir do centro do capilar de diâmetro d_i (m)	α, β, λ	Constantes na discretização da equação 17
R	Total de pontos exp. no perfil de ruptura na saída do leito (-)	δ_i	Espessura da camada limite no capilar de diâmetro d_i (m)
Re_i	Número de Reynolds para o capilar com diâmetro d_i (-)	$\Delta\sigma_d$	Incremento do valor de σ_d no processo de ajuste do parâmetro (m)
Sc	Número de Schmidt para o fluido (-)	$\Delta\tau_{dmin}$	Incremento do valor de τ_{dmin} no processo de ajuste do parâmetro (-)
Sh_i	Número de Sherwood para o capilar com diâmetro d_i (-)	γ	Parâmetro ajustado da equação 48 (-)
St_i	Número de Stanton para o capilar com diâmetro d_i (-)	η	Viscosidade da fase móvel ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
t	Tempo de escoamento no leito (s)	φ, φ_{exp}	Porosidade efetiva do leito (-)
t_{dmax}	Tempo de ret. de um traçador não-adsorvente no capil. c/ diâm. d_{max} (s)	φ_{pred}	Porosidade efetiva predita do leito usando a equação 5 (-)
$t_{D,i}$	Tempo adimensional no capilar com diâmetro d_i (-)	Λ	Capacidade iônica volumétrica total do adsorvente ($\text{mol}_{\text{Na}^+}\cdot\text{m}^{-3}_{\text{leito}}$)
t_r	Tempo correspondente ao ponto r do perfil de ruptura na saída do leito (s)	Λ_i	Capac. iônica volum. para o capilar de diâmetro d_i ($\text{mol}_{\text{Na}^+}\cdot\text{m}^{-3}_{\text{capilar}}$)
u_i	Vel. de escoamento no perfil laminar no capilar de diâmetro d_i ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	Λ_{sup}	Quant. máx. de íons retidos por unid. de área do sist. capilar ($\text{mol}_{\text{Na}^+}\cdot\text{m}^{-2}$)
U	Velocidade da fase móvel ao longo do leito ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	ν	Carga característica da proteína no modelo SMA (-)
U_{dmax}	Velocidade da fase móvel no capilar com diâmetro d_{max} ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	π	Constante de Arquimedes $\cong 3,141592$
U_i	Velocidade da fase móvel ao longo do capilar de diâmetro d_i ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	ρ	Densidade da fase móvel ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
V, V_{exp}	Volume total do leito (m^3)	σ	Fator estérico da proteína no modelo SMA (-)
V_{pred}	Volume predito do leito usando a equação 6 (m^3)	σ_d	Desvio-padrão dos capilares (m)
V_i	Volume do capilar de diâmetro d_i (m^3)	τ_{dmax}	Tortuosidade dos capilares com diâmetro d_{max} (-)
w_p	Espessura dos capilares (m)	τ_{dmin}	Tortuosidade dos capilares com diâmetro d_{min} (-)
z	Coord. de comprimento do leito (m)	τ_i	Tortuosidade dos capilares com diâmetro d_i (-)
$z_{D,i}$	Coord. adimensional de comprimento do capilar com diâmetro d_i (-)	ω	Parâmetro da equação 14 (m^{-1})
Δd_m	Incremento do valor de d_m no processo de ajuste do parâmetro (m)	ψ	Parâmetro da equação 51 (-)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BROOKS, C.; CRAMER, S. (1992). Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal*, v.38, 1969-1978.

CANFIELD, R. E. (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.238(8), 2698-2707.

CAVAZZINI, A.; BARDIN, G.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; ALBOKARI, M.; GUIOCHON, G. (2002). Adsorption equilibria of butyl- and amylbenzene on monolithic silica-based columns. *Journal of Chromatography A*, v.957, 111-126.

CHAPRA, S. C.; CANALE, R. P. (2006). *Numerical methods for engineers*, 5th edition. New York: USA, McGraw-Hill Companies, Inc., 809p.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. (2008). 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, 71-77.

ÇİMEN, D.; DENİZLİ, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.93, 29-35.

CUSSLER, E. L. (2007). *Diffusion – mass transfer in fluid systems*, 3rd edition. New York: USA, Cambridge University Press, 631p.

GAO, H.; WU, X.; LIN, B. (2010). Application of moment analysis to mass transfer kinetics of reversed-phase liquid chromatography: 2. A new understanding of the external mass transfer coefficient. *Journal of Chromatographic Science*, v.48, 742-749.

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

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. (1994). *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Boston, USA: Academic Press, Inc., 700p.

GUTSCHE, R.; BUNKE, G. (2008). Modelling the liquid-phase adsorption in packed beds at low Reynolds numbers: an improved hydrodynamic model. *Chemical Engineering Science*, v.63, 4203-4217.

HASHIM, M. A.; CHU, K. H. (2007). Prediction of protein breakthrough behavior using simplified analytical solutions. *Separation and Purification Technology*, v.53, 189-197.

HE, L.; NIEMEYER, B. (2003). A novel correlation for protein diffusion coefficients based on molecular weight and radius of gyration. *Biotechnology Progress*, v.19, 544-548.

JOZWIK, M.; KACZMARSKI, K.; FREITAG, R. (2005). Investigation of the steric mass action formalism in the simulation of breakthrough curves on a monolithic and a packed bed column. *Journal of Chromatography A*, v.1073, 111-121.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. (2008). Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, v.1184, 62-79.

KACZMARSKI, K.; BELLOT, J.-C. (2005). Influence of particle diameter distribution on protein recovery in the expanded bed adsorption process. *Journal of Chromatography A*, v.1069, 91-97.

LANGMUIR, I. (1918) The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361-1403.

LOZINSKY, V. I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, v.71, 489-511.

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

LUZZATI, V.; WITZ, J.; NICOLAIEFF, A. (1961). Détermination de la Masse et des dimensions des protéines en solution par la diffusion centrale des rayons X mesurée à l'échelle absolue : exemple du lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, v.3, 367-378.

KOKU, H.; MAIER, R. S.; CZYMMEK, K. J.; SCHURE, M. R.; LENHOFF, A. M. (2011). Modeling of flow in a polymeric chromatographic monolith. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 3466-3475.

MEYERS, J. J.; LIAPIS, A. I. (1999). Network modeling of the convective flow and diffusion of molecules adsorbing in monoliths and in porous particles packed in a chromatographic column. *Journal of Chromatography A*, v.852, 3-23.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. (2002). The moment equations of chromatography for monolithic stationary phases. *Journal of Physical Chemistry B*, v.106, 8898-8909.

MUNSON, B. R.; YOUNG, D. F.; OKIISHI, T. H. (2002). *Fundamentals of fluid mechanics*, 4th edition. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 840p.

PERSSON, P.; BAYBAK, O.; PLIEVA, F.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; NILSSON, B.; AXELSSON, A. (2004). Characterization of a continuous supermacroporous monolithic matrix for chromatographic separation of large bioparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, 225-236.

- PIATKOWSKI, W.; GRITTI, F.; KACZMARSKI, K.; GUIOCHON, G. (2003). Influence of the particle porosity on chromatographic band profiles. *Journal of Chromatography A*, v.989, 207-219.
- SEGUIN, D.; MONTILLET, A.; BRUNJAIL, D.; COMITI, J. (1996). Liquid-solid mass transfer in packed beds of variously shaped particles at low Reynolds numbers: experiments and model. *The Chemical Engineering Journal*, v.63, 1-9.
- SRIVASTAVA, A.; SHAKYA, A. K.; KUMAR, A. (2012). Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, 373-381.
- SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; GUOC, L.; ZHAO, Y.; CHANG, C. (2012). Monolithic cryogels made of agarose–chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, 1002-1007.
- TYN, M. T.; GUSEK, T. W. (1990). Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, 327-338.
- UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. (2012). Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.
- YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2011). Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.
- YUN, J.; JESPERSEN, G. R.; KIRSEBOM, H.; GUSTAVSSON, P.-E.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. (2011). An improved capillary model for describing the microstructure characteristics, fluid hydrodynamics and breakthrough performance of proteins in cryogel beds. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 5487-5497.
- YUN, J.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. (2009). Modeling of breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. *Journal of Separation Science*, v.32, 2601-2607.
- YUN, J. LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. (2005). Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial nonuniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *Journal of Chromatography A*, v.1095, 16-26.
- YUN, J.; TU, C.; LIN, D.-Q.; XU, L.; GUO, Y.; SHEN, S.; ZHANG, S.; YAO, K.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. (2012). Microchannel liquid-flow focusing and cryopolymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1247, 81-88.
- ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. (2006). Experimental and modeling study of adsorption in preparative monolithic silica column. *Chemical Engineering and Processing*, v.45, 150-160.

ZABKA, M.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. (2007). Experimental characterization and modelling of analytical monolithic column. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.70, 95-105.

ARTIGO 04

PURIFICAÇÃO DA LISOZIMA A PARTIR DA CLARA DE OVO EM DIFERENTES DILUIÇÕES UTILIZANDO TROCADOR CATIÔNICO MONOLÍTICO POLIMÉRICO SUPERMACROPOROSO

Resumo

A lisozima é uma enzima com elevado potencial de uso nas indústrias farmacêutica e de alimentos devido à sua atividade antimicrobiana, e purificá-la por processos mais rápidos, com custos reduzidos e menor impacto ambiental, que confirmam um elevado grau de pureza é de grande interesse. Leitos monolíticos poliméricos supermacroporosos são um avanço e uma promessa nesse sentido, possibilitando o uso de soluções mais concentradas e menos clarificadas, devido à elevada permeabilidade e porosidade que possuem. O potencial dos monólitos poliméricos não vem sendo plenamente explorado na purificação de lisozima a partir da clara do ovo, sendo utilizadas até o momento diluições da matéria-prima entre 5 e 18 vezes. Neste sentido foi avaliado o uso de uma coluna monolítica de troca catiônica para a purificação de lisozima a partir de soluções de clara de ovo livres de ovomucina, diluídas nas proporções 1:2, 1:7 e 1:18, utilizando-se uma única etapa cromatográfica. Para isso, foi utilizada uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,2 como fase móvel e a eluição foi feita adicionando-se $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl ao tampão. Os picos eluídos foram dialisados e apresentaram 100% de proteína, com grau de pureza entre 42,4% e 78,1%, crescente para soluções menos diluídas, e recuperação em torno de 40%. O uso de leitos monolíticos supermacroporosos na purificação de lisozima mostrou-se promissor, permitindo o uso de soluções de alimentação mais concentradas em um processo com um reduzido número de etapas. Com isso é possível a redução de custos e do consumo de água requerido, minimizando o impacto ambiental do processo.

Palavras-chave: purificação, troca iônica, criogel, leito monolítico, lisozima.

1. INTRODUÇÃO

A demanda das indústrias farmacêutica e de alimentos por biocompostos de fontes naturais é crescente, buscando-se o emprego de técnicas que mantenham ao máximo a bioatividade dos mesmos (Guiochon e Beaver, 2011).

A lisozima é uma enzima presente na clara de ovo e em diversos tecidos e fluidos animais (Boesman-Finkelstein e Finkelstein, 1982; Thammasirirak et al., 2006, Başar et al., 2007; Yan et al., 2011). Ela possui grande importância por sua ação bactericida devido à capacidade de hidrólise das β -ligações entre o ácido murâmico e a N-acetil-glicosamina componentes do mucopolissacarídeo das paredes celulares de bactérias, sendo usada como conservante em alimentos e antibiótico pela indústria farmacêutica (Mecitoğlu et al., 2006; Bayramoğlu et al., 2007; Anirudhan e Rejeena, 2012). A lisozima da clara de ovo de galinha é uma proteína pequena, de cadeia única, composta por 129 resíduos de aminoácidos e massa molar em torno de 14300 Da (Canfield, 1963). Possui caráter básico, com seis resíduos de lisina e nove de arginina, e ponto isoelétrico em torno de 11,3 (Wetter e Deutsch, 1951; Dimer e Hubbuch, 2007).

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para a purificação da lisozima, como a adsorção (Alderton et al., 1945), cristalização (Alderton e Fevold, 1946), cromatografia com heparina (Boesman-Finkelstein e Finkelstein, 1982), permeação em gel (Awadé et al., 1994), troca aniônica (Vachier et al., 1995), afinidade por corante imobilizado (He e Sun, 2002; Tong et al., 2002; Arica e Bayramoğlu, 2005; Yilmaz et al., 2005) e por íon metálico imobilizado (Sharma e Agarwal, 2002), troca catiônica (Guérin-Dubiard et al., 2005; Thammasirirak et al., 2006; Chiu et al., 2007; Yan et al., 2011; Yun et al., 2012), afinidade hidrofóbica (Altıntaş et al., 2007) e ultrafiltração (Mayani et al., 2010).

As técnicas cromatográficas prevalecem nos processos empregados, principalmente nas etapas finais em que o grau de pureza requerido é elevado (Jungbauer e Hanh, 2008; Lenhoff, 2011). Dentre elas, a troca iônica, baseada na adsorção diferenciada de compostos carregados (positiva ou negativamente) em uma superfície com cargas opostas, é uma das técnicas mais utilizadas por causar pouco ou nenhum dano à estrutura terciária e consequente perda da bioatividade das mesmas (Dechow, 1997; Roos, 2000). Tal característica é devida à seletividade e capacidade de separação sob condições próximas às fisiológicas, causando menos danos aos compostos (Chen et al., 2010).

Uma alternativa aos adsorventes tradicionais são os leitos monolíticos poliméricos supermacroporosos, considerados a quarta geração dos materiais cromatográficos (Jungbauer e Rahn, 2008). Entre eles estão os chamados criogéis, cuja estrutura permite a passagem de soluções de alimentação concentradas e não-clarificadas, inclusive com células inteiras, o que permite uma redução no número de etapas dos processos de purificação (Arvidsson et al., 2002; Lozinsky et al., 2003). Tais monólitos também são facilmente sintetizados e modificados para adquirir características específicas para o isolamento de compostos de interesse (Plieva et al., 2004; Savina et al., 2005). Monólitos poliméricos modificados para o uso em troca iônica, afinidade, afinidade por metal quelato, imobilização de enzimas, entre outros, vêm sendo reportados (Hanora et al., 2006; Chen et al., 2008; Wang et al., 2008; Li et al., 2009; Erzençin et al., 2011; Sun et al., 2012; Uygun et al., 2012; Yun et al., 2012).

Outra característica interessante de tal matriz é a baixa resistência ao escoamento e conseqüente baixa perda de carga ao se escoar um fluido através de um leito monolítico. Com isso soluções menos diluídas podem ser usadas sem afetar a eficiência da extração, otimizando o tempo de processo (Lozinsky et al., 2003; Guiochon, 2007), e reduzindo o consumo de água essencial na redução do impacto ambiental associado às etapas cromatográficas (Nováková et al., 2006; Chen e Kord, 2009).

No entanto, estudos que avaliam o efeito da viscosidade ou diluição da alimentação na extração de biocompostos ainda são escassos, em especial com os monólitos poliméricos. Alguns trabalhos com leitos expandidos ou fluidizados vêm sendo feitos, mas sem se avaliar tais características especificamente (Tong et al., 2002; Başar et al., 2007). Além disso, o potencial de utilização dessas matrizes na purificação da lisozima a partir de soluções concentradas vem sendo pouco explorado, com a alimentação sendo diluída entre 5 e 18 vezes (Guérin-Dubiard et al., 2005; Yan et al., 2011; Yun et al., 2012).

Assim sendo, neste trabalho verificou-se o efeito da diluição na extração da lisozima da clara de ovo utilizando-se um trocador catiônico monolítico polimérico supermacroporoso, abordando-se aspectos relacionados à pureza e rendimento obtidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para a realização deste trabalho foram utilizados ovos brancos frescos de galinha, tipo grande, adquiridos de produtores registrados no comércio local. Fosfatos de sódio monobásico e bibásico, ambos anidros, e cloreto de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), assim como os padrões de lisozima (pureza > 90%, código L6876), conalbumina (código C0755) e albumina (A5378). Todos os reagentes químicos utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultra-pura. O teor de proteína do padrão de lisozima foi avaliado pelo método de Kjeldhal (Chang, 1999), utilizando-se um fator de conversão igual a 6,25.

Para a purificação da lisozima foi utilizada coluna cromatográfica C10/20 com pistão adaptador AC10 (ambos da GE Healthcare, Uppsala, Suécia), de modo que o leito monolítico apresentou 9,4 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro. O trocador catiônico utilizado como monólito foi criogel polimérico constituído por acrilamida, bis-acrilamida e alil glicidil éter, enxertado com o ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (criogel pAAm-SO₃), sintetizado no próprio laboratório de acordo com a metodologia descrita anteriormente (artigo 01). Algumas características físicas e químicas do leito trocador catiônico utilizado são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características do leito monolítico trocador catiônico utilizado.

Característica do adsorvente	Valor
comprimento (L) / (cm)	9,4
diâmetro total (D) / (cm)	1,0
permeabilidade ao escoamento (k_p) / (m ²)	$8,47 \times 10^{-13}$
porosidade total (ε_T)	0,91
porosidade aparente com lisozima (ε_{ap})	0,83
altura equivalente a um prato teórico (HETP) / (mm)	2,3
diâmetro médio de poro (d_m) / (μm)	70
cap. iônica volumétrica (A) / (10 ⁻³ mol _{Na⁺} ·L ⁻¹ _{criog hidrat})	25,72

2.2. Preparo das soluções de alimentação

Para a extração da lisozima da clara do ovo foi feito um pré-tratamento para percolar o leito monolítico similar ao realizado por Guérin-Dubiard et al. (2005),

Yan et al. (2011) e Yun et al. (2012), com algumas modificações. Tal tratamento visou retirar a proteína ovomucina presente na clara, a principal responsável pela consistência gelatinosa da mesma (Omana et al., 2010). Para tanto, procedeu-se à separação manual da clara, que foi colocada sobre uma peneira plástica com diâmetro total de 5,0 cm e malha com abertura de 1,0 mm, deixando-se a parte fina da clara se separar da parte viscosa e da chalaza por ação da força da gravidade. Tal procedimento foi repetido com quinze ovos, obtendo-se cerca de 190 mL de clara fina. A clara pré-tratada foi diluída com dois volumes (~380 mL) de água deionizada, teve o pH da mistura ajustado para 6,0 utilizando-se uma solução de HCl $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e foi então levada à agitação orbital a 25 rpm em tubos de centrífuga de 15 mL em uma estufa BOD (Modelo EL101/3, Eletrolab, São Paulo, Brasil) mantida à temperatura ($2,0 \pm 0,3$) °C por cerca de 12 h (*overnight*). Em seguida os tubos foram centrifugados sob refrigeração (4 °C) à rotação de $12000 \times g$ durante 10 min em uma centrífuga de bancada com rotor de ângulo fixo (Modelo 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) sendo o sobrenadante (S1) gentilmente separado do precipitado, obtendo-se um volume de cerca de 500 mL.

O sobrenadante S1 foi então dividido em três alíquotas. Na primeira fração, 250 mL do S1 foram adicionados de 5 mL de uma solução-tampão de fosfato de sódio $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2 (para que a concentração final de fosfato fosse de aproximadamente $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo o pH da mistura ajustado para 7,2 utilizando-se uma solução de NaOH $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Na segunda fração, outros 94 mL do sobrenadante S1 foram tamponados para um volume final de 250 mL, de modo que a solução final contivesse uma concentração de fosfato igual a $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2. E por fim, na terceira fração, 40 mL do S1 foram tamponados ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de íons fosfato e pH 7,2) para um volume final de 250 mL. Essas três novas soluções foram novamente centrifugadas sob refrigeração (4 °C) à rotação de $12000 \times g$ durante 15 min, sendo os novos sobrenadantes cuidadosamente separados do precipitado utilizando-se uma pipeta graduada. O sobrenadante da solução obtida da primeira fração foi identificado como ‘Alimentação Livre de Ovomucina na diluição 1:2’ (ALO1:2), o da segunda fração como ‘Alimentação Livre de Ovomucina na diluição 1:7’ (ALO1:7) e o da terceira fração como ‘Alimentação Livre de Ovomucina na diluição 1:18’ (ALO1:18). As soluções foram mantidas sob refrigeração até seu uso.

2.3. Purificação da lisozima a partir das soluções de alimentação.

Para a extração da lisozima das soluções livres de ovomucina, foram realizados experimentos em duplicata para cada solução de alimentação, utilizando-se o aparato descrito a seguir. A coluna contendo o leito monolítico foi adaptada a um sistema contendo uma bomba peristáltica (Masterflex Easy Load II, com cabeçote 77201-60 e mangueira de noreprene 6402-14, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, EUA), uma válvula manual de quatro vias (SRV-4, código 19-2099-01, GE Healthcare) e volume vazio de 1,88 mL (sem a coluna). O monitoramento contínuo da fase móvel foi feito utilizando-se um monitor UV-Vis920 (GE Healthcare) com filtro de UV de 280 nm, conectado a um sistema de aquisição de dados Spider8 (HBM, Darmstadt, Alemanha) controlado via computador por meio do *software* Catman v.4.5 (HBM). Todos os experimentos foram conduzidos à vazão constante de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em ambiente climatizado a $(20 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

A coluna utilizada foi lavada com 200 mL de água deionizada, 100 mL de uma solução de HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e então equilibrada com 100 mL de solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2. Em seguida, ela foi percolada por 60 mL da solução de alimentação desejada, observando-se a formação e estabilização da curva de ruptura. Após isso, a coluna foi lavada com cerca de 30 mL da solução-tampão de equilíbrio para a retirada do material não-adsorvido, até que a curva de ruptura retornasse à linha de base, seguido da eluição do material adsorvido, de modo isocrático, utilizando-se cerca de 30 mL de uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2 contendo $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl. Terminada a eluição, a coluna foi reequilibrada com 100 mL da solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,2, reiniciando-se o processo.

Na etapa de eluição, verificou-se a presença de um único pico que foi coletado até o momento em que a linha de base iniciou sua estabilização, resultando em uma fração de cerca de 8 mL. Foram coletadas ainda frações para análises posteriores das soluções de alimentação. Todas as amostras foram coletadas manualmente, imediatamente após o detector.

Os picos coletados na etapa de eluição foram submetidos a um processo de diálise para retirada do sal, utilizando-se um tubo de diálise de 2 cm de diâmetro previamente ativado (código D0530, Sigma), imerso em água deionizada por 12 h sob refrigeração.

Além dos experimentos mencionados acima, uma terceira replicata do procedimento de extração utilizando-se a solução de alimentação ALO1:18 foi realizada, sendo coletadas frações de 1,0 mL em microtubos durante todo processo. Essas amostras foram diluídas com solução-tampão de fosfato de sódio $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,2 e lidas diretamente em um espectrofotômetro calibrado em 280 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo para pequenas amostras com caminho ótico de 10 mm. Tal medida foi feita para se obter o perfil cromatográfico do processo.

2.4. Análises realizadas

A fim de se verificar o grau de pureza, o rendimento e o fator de purificação obtidos foram realizadas análises da concentração de sólidos totais, proteína total e lisozima nas frações coletadas. A concentração de sólidos totais foi determinada por liofilização e a concentração de proteínas totais foi determinado pelo método de micro-Kjeldhal (Chang, 1999) utilizando-se um fator de conversão igual a 6,25.

Para a quantificação da lisozima presente foi utilizada uma coluna de filtração em gel TSKgel Super SW2000 de 30 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partículas de $4,0 \mu\text{m}$ (código 18674, Tosoh Bioscience, King of Prussia, EUA) adaptada a um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Tóquio, Japão) com 2 bombas de pistão (LC-10AD VP), forno (CTO-10A VP), detector de feixe de diodos (SPD-M10A VP), autoinjeter (SIL-10AD VP) e controlador (SCL-10A VP), operado utilizando-se o *software* Shimadzu Class-VP v.6,14 SP2. A fase móvel foi uma solução-tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 adicionada de $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, com vazão de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em modo isocrático. A temperatura foi mantida em $30 \text{ }^\circ\text{C}$, o volume de amostra injetada igual a $5 \mu\text{L}$ e o tempo de corrida de 20 min, monitorado a 210 nm. Uma curva de calibração com soluções de lisozima em concentrações variando de $0,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $3,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ na fase móvel foi utilizada para a quantificação das amostras. Todas as soluções e amostras foram filtradas em filtros de acetato de celulose com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e a fase móvel foi degaseificada em banho ultrassônico por 15 min.

Além destas, também foi feita a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) conforme metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações. Para isso, foi utilizado um gel de empilhamento com concentração de 5%, gel de separação com concentração de 12%, $30 \mu\text{L}$ de amostra desnaturada por poço e corrida com tensão constante igual a

100 V. Para as amostras da alimentação e dos padrões de lisozima, conalbumina e albumina (os três em concentração igual a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $10 \mu\text{L}$ de solução foram misturados a $390 \mu\text{L}$ do tampão desnaturante. Para a amostra do pico coletado e dialisado, $50 \mu\text{L}$ de solução foram misturados a $150 \mu\text{L}$ do tampão desnaturante.

Ao término dos experimentos, a coluna utilizada foi desmontada e o criogel em seu interior foi desidratado em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h, para a realização da análise da sua estrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, o criogel seco foi quebrado manualmente, fixado em suportes apropriados (*stubs*) e diretamente metalizado com uma fina camada de ouro. Após a metalização as amostras foram levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Jena, Alemanha).

2.5. Grau de pureza, fator de purificação e rendimento obtidos

Para se avaliar a eficiência do processo de extração da lisozima testado, foram calculados o grau de pureza (*GP*), o fator de purificação (*FP*) e a recuperação de lisozima (*R*) obtidos, utilizando-se as equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$GP = \left(\frac{C_{\text{lisoz.}}}{C_{\text{sólidos}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$FP = \frac{GP_{\text{pico dialisado}}}{GP_{\text{alim.}}} \quad (2)$$

$$R = \left(\frac{m_{\text{pico}}}{m_{\text{alim.}}}_{\text{lisoz.}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: $C_{\text{lisoz.}}$ e $C_{\text{sólidos}}$ são as concentrações de lisozima e de sólidos totais na amostra analisada ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $GP_{\text{pico dialisado}}$ é o grau de pureza do pico dialisado (%) e $GP_{\text{alim.}}$ é o grau de pureza da da alimentação (%), m_{pico} e $m_{\text{alim.}}$ são as massas de lisozima obtidas do volume total do pico eluído e dialisado e do volume total da alimentação que percolou a coluna (mg) respectivamente. *GP* e *R* são dados em porcentagem (%).

Alternativamente, para fins comparativos, foi utilizada a taxa de pureza (*TP*), dada pela razão entre a área do pico da lisozima e a soma total das áreas observadas, nos cromatogramas obtidos. A *TP* é utilizada, assim como a intensidade das bandas nos géis de eletroforese, para avaliar a pureza dos compostos purificados (Tong et al., 2002; Guérin-Dubiard et al., 2005; Yan et al., 2011). O valor de *TP*, expresso em porcentagem (%) foi obtido diretamente dos resultados via *software* Class-VP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estrutura dos poros do leito monolítico após a utilização nos experimentos se apresentou uniforme, bem distribuída e interconectada (Figura 1B), com diâmetro médio em torno de 70 μm , condizente com o observado por outros autores (Plieva et al., 2004; Yao et al., 2007; Dragan et al., 2012). Não se verificou efeitos de desgaste ou contaminação no monólito, comparada com sua condição antes do uso nos experimentos.

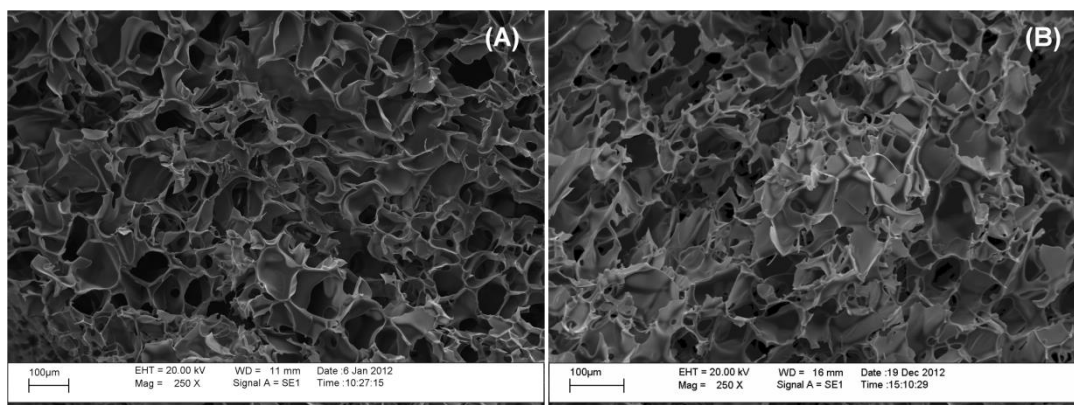


Figura 1: Estrutura do leito monolítico utilizado ao término dos experimentos.

A proteína ovomucina é a responsável pelo aspecto gelatinoso da clara de ovo. É insolúvel em água pura e facilmente precipitada em pH 6,0 a 8,0 (Li-Chan et al., 1995; Omana et al., 2010). Sua presença prejudica a utilização da clara de ovo concentrada ou *in natura* em processos de purificação como o proposto. Em estudos laboratoriais preliminares, verificou-se que a presença de ovomucina poderia levar facilmente ao entupimento da coluna e por isso foi feita a sua retirada prévia (Guérin-Dubiard et al., 2005; Yan et al., 2011; Yun et al., 2012).

O perfil cromatográfico foi obtido para o processo de extração da lisozima a partir da clara de ovo livre de ovomucina (Figura 2). Nele foram destacados os momentos em ocorreram as injeções de soluções de entrada na coluna e o local de coleta do pico de eluição para análises. Verificou-se a presença de um único pico de eluição, indicando que a concentração de sal utilizada foi eficiente na remoção do material adsorvido, assim como observado por Yan et al. (2011).

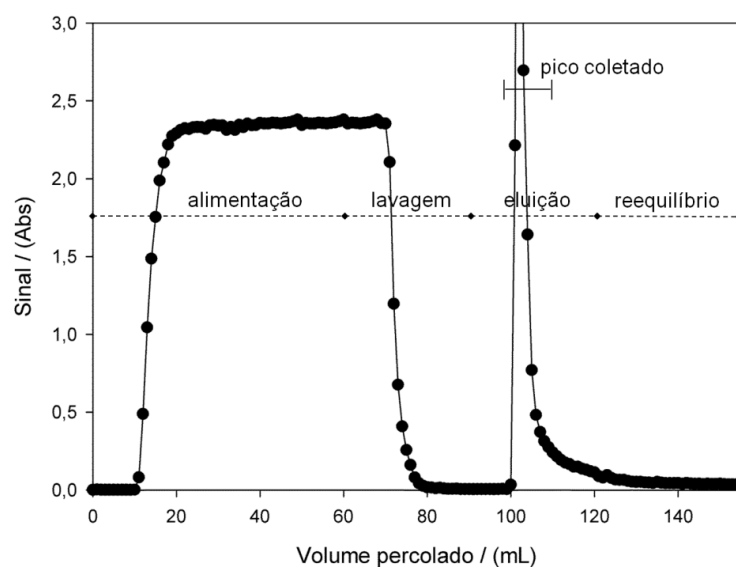


Figura 2: Perfil cromatográfico do processo de extração da lisozima da solução de alimentação ALO1:18.

Os cromatogramas dos padrões de lisozima, albumina e conalbumina obtidos por filtração em gel são apresentados na Figura 3.

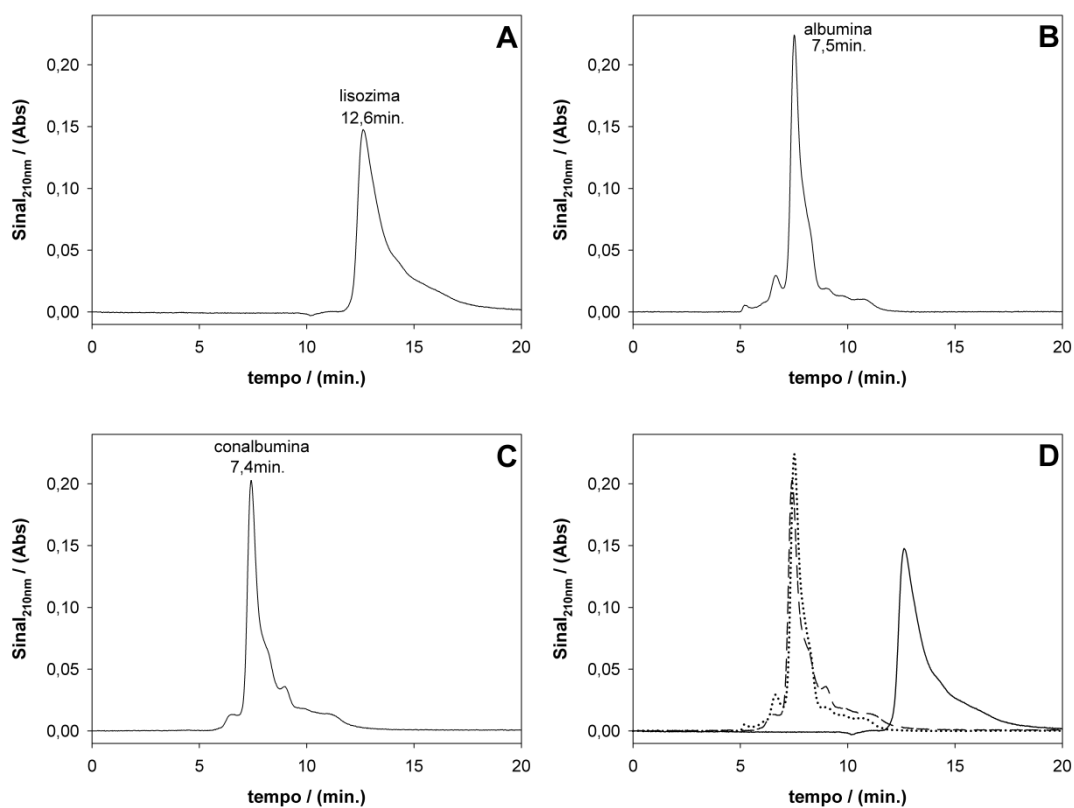


Figura 3: Cromatogramas dos padrões de lisozima (A), albumina (B) e conalbumina (C), todos com concentração igual a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. (D) superposição dos cromatogramas A, B e C (— lisozima; \cdots albumina; - - - conalbumina).

O método utilizado não possui capacidade para separar as proteínas albumina e conalbumina, contudo, o tempo de retenção da lisozima foi muito distinto das demais proteínas. Por isso tal método foi empregado para a quantificação da lisozima. O padrão de lisozima utilizado apresentou teor de proteína igual a 100% e taxa de pureza superior a 99,5%, e a curva de calibração obtida apresentou a seguinte equação ajustada:

$$C_{Lis} = 14839340,37 A - 80618,42 ; R^2 = 0,999 \quad (4)$$

Onde C_{Lis} é a concentração de lisozima ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e A é a área do pico no cromatograma (unidades de área, u.a.).

Na Figura 4 são apresentados os cromatogramas obtidos por filtração em geadas soluções de alimentação e dos picos de eluição coletados para as diferentes diluições testadas.

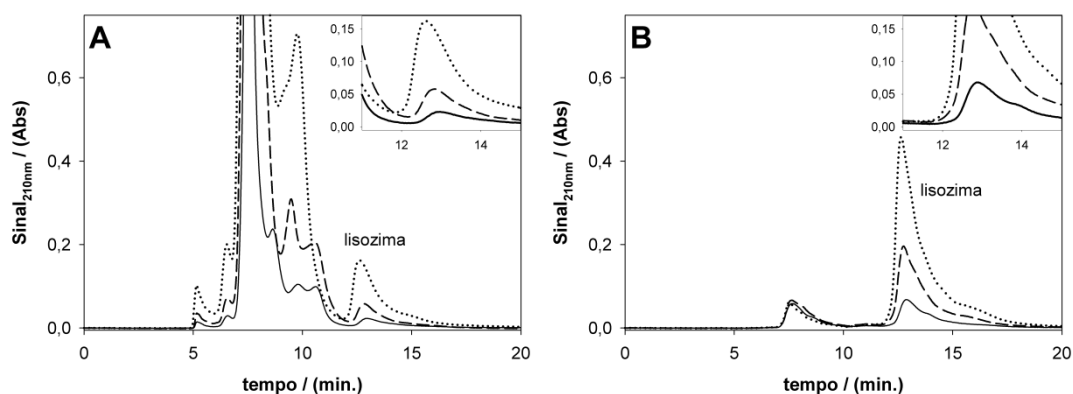


Figura 4: Cromatogramas das soluções de alimentação (A) e dos picos de eluição dialisados (B). (— ALO1:18; - - - ALO1:7; ···· ALO1:2).

As amostras dos picos de eluição coletados (Figura 4B) apresentaram uma significativa redução no número de compostos observados, quando comparados às soluções de alimentação (Figura 4A), demonstrando a eficiência do método utilizado em única etapa. Apenas dois picos cromatográficos foram observados, sendo a quantidade de lisozima crescente com a redução da diluição, enquanto que o outro pico permaneceu constante.

Na condição de pH utilizada, 7,2, apenas duas proteínas da clara de ovo apresentam carga líquida positiva; a lisozima e a avidina, uma proteína com massa molar em torno de 68 kDa composta por quatro sub-unidades idênticas com massa molar de cerca de 17 kDa cada (Awadé e Efstathiou, 1999). Poderia se supor que o

primeiro pico observado na Figura 4B, com tempo de retenção em torno de 7,5 minutos, seria, portanto, a avidina. Guérin-Dubiard et al. (2005) purificando proteínas do ovo a partir de uma alimentação livre de ovomucina relataram que somente estas duas proteínas foram retidas na etapa de troca catiônica por eles utilizada, sendo a quantidade de avidina, no entanto, desprezível se comparada à lisozima. Yan et al. (2011) por outro lado, purificando lisozima em uma coluna monolítica polimérica para troca catiônica similar a usada neste trabalho, relataram não ter verificado a presença de avidina nas frações purificadas, sugerindo que a mesma tenha sido eliminada junto com a ovomucina quando da preparação da solução de alimentação. Tais autores observaram ainda que, para o processo de eluição em etapa única por eles utilizado, além da lisozima, verificou-se a presença de uma proteína com massa molar em torno de 45 kDa, que os mesmos associaram a frações de ovoglobulina. Para se verificar qual era o tipo de proteína presente no primeiro pico de eluição da Figura 4B, foi realizada a análise em SDS-PAGE da alimentação ALO1:2 e do respectivo pico de eluição (Figura 5).

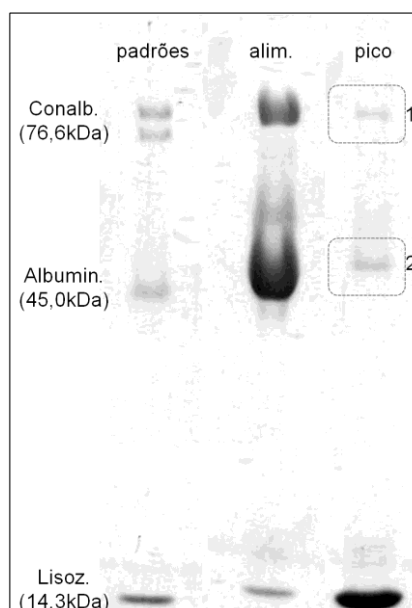


Figura 5: Gel de eletroforese SDS-PAGE da alimentação ALO1:2 e do respectivo pico de eluição coletado. Para a amostra do pico de eluição, destaque para as impurezas, provavelmente conalbumina (1) e ovoglobulina G2 (2).

Verificou-se que a alimentação era rica em albumina e conalbumina, sendo observada também a presença da lisozima. Da amostra do pico de eluição, a lisozima foi a principal proteína observada, sendo verificadas ainda outras duas bandas mais fracas (Figura 5). A banda 1 provavelmente foi a conalbumina, que pode ter sido

parcialmente retida no trocador catiônico utilizado provavelmente devido à interações com a lisozima (Damodaran et al., 1998; Lechevalier et al., 2005) ou com íons residuais de cobre (Tan e Woodworth, 1969; Giansanti et al., 2012) utilizados no processo de produção (ativação) do trocador iônico (Savina et al., 2005; Chen et al., 2008). A banda 2 observada foi de uma molécula com massa molar estimada em torno de 47 kDa, sendo provavelmente a proteína ovoglobulina G2 (Stevens, 1991; Awade e Efstathiou, 1999). Tais resultados são similares aos observados por Yan et al. (2011) também utilizando um criogel pAAm-SO3 com eluição em único estágio, que também verificaram a presença de ovoglobulina e a ausência da avidina.

Os valores obtidos para as concentrações de sólidos totais, proteína total e lisozima nas soluções de alimentação e picos coletados são apresentados na Tabela 2. Observou-se um aumento em tais concentrações com a redução da diluição e que os picos coletados e dialisados eram constituídos apenas de material protéico. A relação proteína / sólidos totais também aumentou com a redução da diluição, devido à maior importância relativa dos sólidos da clara de ovo quando comparado aos sais da solução-tampão.

Tabela 2: Características das soluções de alimentação e picos coletados.

Diluição	Amostra	C_{ST} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C_{PT} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$(C_{PT}/C_{ST})\times 100$ (%)	C_{Lis} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
ALO1:18	Alimentação	10,05 ± 0,05	6,58 ± 0,06	65,5	0,19 ± 0,01
	Pico dialisado	0,99 ± 0,04	1,02 ± 0,11	100,0	0,42 ± 0,09
ALO1:7	Alimentação	19,26 ± 0,15	13,11 ± 0,12	68,1	0,43 ± 0,01
	Pico dialisado	2,19 ± 0,27	2,25 ± 0,23	100,0	1,31 ± 0,04
ALO1:2	Alimentação	44,93 ± 0,31	34,04 ± 0,04	75,8	1,10 ± 0,01
	Pico dialisado	3,61 ± 0,09	3,62 ± 0,11	100,0	2,82 ± 0,01

C_{ST} : concentração de sólidos totais; C_{PT} : concentração de proteína total; C_{Lis} : concentração de lisozima.

O grau de pureza, o fator de purificação e recuperação de lisozima conseguidos para a fração purificada a partir de alimentações com diferentes diluições são apresentados na Tabela 3, bem como a taxa de pureza (TP) obtida das áreas dos picos na quantificação da lisozima.

Tabela 3: Grau de pureza (GP), fator de purificação (FP), recuperação de lisozima (R) e taxa de pureza (TP) obtida para a fração purificada a partir das alimentações com diferentes diluições.

Diluição	Amostra	GP	FP	R	TP
		(%)	(adim.)	(%)	(%)
ALO1:18	Alimentação	1,9	n.a.	n.a.	3,3
	Pico dialisado	42,4	22,4	40,0	54,1
ALO1:7	Alimentação	2,2	n.a.	n.a.	4,0
	Pico dialisado	59,8	26,8	46,3	78,0
ALO1:2	Alimentação	2,4	n.a.	n.a.	6,1
	Pico dialisado	78,1	31,9	36,7	90,2

n.a. :não aplicável.

Verificou-se um aumento no grau de pureza com a utilização de soluções mais concentradas, chegando-se a cerca de 78% de pureza na fração obtida. Yun et al. (2012) purificando lisozima de uma alimentação de clara de ovo diluída em aproximadamente 1:4 com tampão-fosfato em um leito fixo de partículas de criogel trocador catiônico conseguiram um grau de pureza entre 78% e 92% ao trabalhar com uma eluição isocrática usando NaCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adicionado ao tampão. No entanto tais valores foram obtidos a partir de resultados de SDS-PAGE, e não em relação ao teor de sólidos totais. O mesmo ocorreu no trabalho realizado por Guérin-Dubiard et al. (2005), que conseguiram uma fração de lisozima com 95% de pureza obtida, no entanto, a partir da razão das áreas das picos (TP), no cromatograma de quantificação da mesma. Avaliando-se desse modo, no presente trabalho chegou-se a uma taxa de pureza de 90%.

O fator de purificação obtido no presente trabalho também foi elevado, conseguindo-se um produto cerca de 32 vezes mais puro que a alimentação menos diluída (ALO1:2) com apenas uma etapa cromatográfica seguida de diálise. Considerando-se apenas a fração protéica da alimentação, ainda assim o fator de purificação seria em torno de 24, o que demonstra o potencial do método empregado.

A recuperação de lisozima oscilou em torno dos 40% e um dos fatores que contribuiu para tal valor foi o grande volume de solução de alimentação utilizada para assegurar que a coluna fosse saturada com a lisozima. O monitoramento da concentração de lisozima após a formação da curva de ruptura e antes da etapa de lavagem não foi realizado para se determinar o volume exato em que a saturação do

leito ocorreu. Provavelmente perdeu-se muito da lisozima não-adsorvida, que percolou o leito já saturado. Apenas para comparação, se o volume de alimentação utilizado fosse próximo a 20 mL, seria verificada uma recuperação de lisozima superior a 90%, para as condições observadas. Outro fator que possivelmente contribuiu para baixa recuperação observada foi a competição na adsorção ou a interação da lisozima com proteínas não retidas (Damodaran et al., 1998; Lechevalier et al. 2005).

Tong et al. (2002) purificando lisozima por cromatografia de afinidade por corante em colunas de leito expandido conseguiram recuperar aproximadamente 88% da proteína existente em uma alimentação de clara de ovo diluída (~1:2), no entanto com um grau de pureza em torno de 30% (em relação à proteína total) e fator de purificação em torno de 9. Başar et al. (2007) também utilizaram afinidade por corante, porém em leitos fluidizados estabilizados magneticamente, conseguiram recuperar 79,6% da lisozima com um grau de pureza de 87,4%, avaliado por SDS-PAGE. Yan et al. (2011) trabalhando com troca catiônica conseguiram um grau de pureza variando de 70% a 96%, também avaliado por SDS-PAGE, recuperação de lisozima entre 45% e 80% e fator de purificação entre 20 e 28, considerando-se apenas o material proteico existente na alimentação e amostras purificadas.

A diluição das soluções de alimentação não apresentou efeito na recuperação da lisozima, mas afetou o grau de pureza, que aumentou para menores diluições. Nenhuma alteração estrutural na coluna utilizada foi observada ao longo dos experimentos. A retirada da ovomucina das soluções de alimentação e a estrutura macroporosa da coluna utilizada permitiram o uso de reduzida diluição da clara de ovo (apenas 1:2), o que pode ser vantajoso, por permitir a redução no tempo do processo devido à saturação mais rápida da coluna e a redução de custos e do impacto ambiental, com menor utilização de água e outros materiais.

4. CONCLUSÕES

Com o leito monolítico polimérico supermacroporoso trocador catiônico utilizado para a purificação da lisozima da clara de ovo, conseguiu-se até 78% de pureza e um fator de purificação próximo a 32 em uma única etapa cromatográfica. O pré-preparo da solução de alimentação foi necessário para a retirada da ovomucina, evitando o entupimento da coluna, mas foi possível o uso de pequenas diluições, não ocorrendo problemas com a alimentação em diluição 1:2. Com o aumento da diluição houve uma redução no grau de pureza da proteína obtida, no entanto, não se verificou relação direta com a recuperação de lisozima, que apresentou valores da ordem de 40% provavelmente devido ao excesso de solução de alimentação utilizada. O emprego de criogéis poliméricos mostrou-se viável e promissor, sendo possível a obtenção de lisozima com elevado grau de pureza a partir da clara de ovo sem ovomucina e pouco diluída, reduzindo o número de etapas do processo e os custos envolvidos, e minimizando impactos ambientais devido à redução do consumo de água requerido. Mais estudos são demandados buscando-se otimizar as condições operacionais, para se aumentar o grau de pureza e o rendimento do processo.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALDERTON, G.; WARD, W. H.; FEVOLD, H. L.(1945). Isolation of lysozyme from egg white. *The Journal of Biological Chemistry*, v.157, 43-58.

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

ANIRUDHAN, T. S.; REJEENA, S. R. (2012). Poly(acrylic acid)-modified poly(glycidylmethacrylate)-grafted nanocellulose as matrices for the adsorption of lysozyme from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, v.187, 150-159.

ARICA, M. Y.; BAYRAMOĞLU, G. (2005).Purification of lysozyme from egg white by reactive blue 4 and reactive red 120 dye-ligands immobilized composite membranes. *Process Biochemistry*, v.40, 1433-1442.

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

AWADÉ, A. C.; MOREAU, S.; MOLLÉ, D.; BRULÉ, G.; MAUBOIS, J.-L. (1994). Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. *Journal of Chromatography A*, v.677, 279-288.

AWADÉ, A. C.; EFSTATHIOU, T. (1999). Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. *Journal of Chromatography B*, v.723, 69-74.

BAŞAR, N.; UZUN, L.; GÜNER, A.; DENIZLI, A. (2007). Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.41, 234-242.

BAYRAMOĞLU, G.; EKICI, G.; BEŞIRLI, N.; ARICA, M. Y. (2007). Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brushes grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system. *Colloids and Surfaces A*, v.310, 68-77.

BOESMAN-FINKELSTEIN, M.; FINKELSTEIN, R. A. (1982). Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. *FEBS Letters*, v.144, 1-5.

CANFIELD, R. E. (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.238(8), 2698-2707.

CHANG, S. K. C. (1999). Protein analysis (Chapter 15). In: Nielsen, S. S. (Ed.) *Food analysis*, 2nd ed. (pp.237-249). Norwell, USA: Kluwer Academic Publishers.

CHEN, F.; YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J. (2008). 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, 71-77.

CHEN, S.; KORD, A. (2009). Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1216, 6204-6209.

CHEN, X.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. (2010). Polymeric cation-exchange monolithic columns containing phosphoric acid functional groups for capillary liquid chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, v.1217, 3844-3854.

CHIU, H.-C.; LIN, C.-W.; SUEN, S.-Y. (2007). Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *Journal of Membrane Science*, v.290, 259-266.

- DAMODARAN, S.; ANAND, K.; RAZUMOVSKY, L. (1998). Competitive adsorption of egg white proteins at the air-water interface: direct evidence for electrostatic complex formation between lysozyme and other egg proteins at the interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, 872-876.
- DECHOW, F. J. (1997) Ion Exchange. In: Vogel, H. C.; Todaro, C. L. (Eds.) *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*, 2nd ed. (pp.382-475). Westwood, USA: Noyes Publications.
- DELANGE, R. J.; HUANG, T.-S. (1971). Egg white avidin - III. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, v.246, 698-709.
- DISMER, F.; HUBBUCH, J. (2007). A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. *Journal of Chromatography A*, v.1149, 312-320.
- DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. (2012). Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. *Chemical Engineering Journal*, v.204-206, 198-209.
- ERZENGIN, M.; ÜNLÜ, N.; ODABAŞI, M. (2011). A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 484-490.
- GIANSANTI, F.; LEBOFFE, L.; PITARI, G.; IPPOLITI, R.; ANTONINI, G. (2012). Physiological roles of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v.1820, 218-225.
- GUÉRIN-DUBIARD, C.; PASCO, M.; HIETANEN, A.; QUIROS DEL BOSQUE, A.; NAU, F.; CROGUENNEC, T. (2005). Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1090, 58-67.
- GUIOCHON, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1168, 101-168.
- GUIOCHON, G.; BEAVER, L. A. (2011). Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8836-8858.
- HANORA, A.; SAVINA, I.; PLIEVA, F. M.; IZUMRUDOV, V. A.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. (2006). Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. *Journal of Biotechnology*, v.123, 343-355.
- HE, L. Z.; SUN, Y. (2002). Purification of lysozyme by multistage affinity filtration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.25, 155-164.
- JUNGBAUER, A.; HAHN, R. (2008). Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, v.1184, 62-79.

LECHEVALIER, V.; CROGUENNEC, T.; PEZENNEC, S.; GUÉRIN-DUBIARD C.; PASCO, M.; NAU, F. (2005). Evidence for synergy in the denaturation at the air–water interface of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme in ternary mixture. *Food Chemistry*, v.92, 79-87.

LENHOFF, A. M. (2011). Protein adsorption and transport in polymer-functionalized ion-exchangers. *Journal of Chromatography A*, v.1218, 8748-8759.

LI-CHAN, E. C.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products (Chapter 6). In: STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. (Eds.). *Egg science and technology*, 4th ed. (pp. 105-175). Binghamton, USA: Food Product Press.

LI, Y.; GU, B.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. (2009). 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, 5525-5532.

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

MAYANI, M.; FILIPE, C. D. M.; GHOSH, R. (2010). Cascade ultrafiltration systems—Integrated processes for purification and concentration of lysozyme. *Journal of Membrane Science*, v.347, 150-158.

MECITOĞLU, Ç.; YEMENICIOĞLU, A.; ARSLANOĞLU, A.; ELMACI, Z. S.; KOREI, F.; ÇETIN, A. E. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, v.39, 12-21.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, v.68, 908-918.

OMANA, D. A.; WANG, J.; WU, J. (2010). Ovomucine - a glycoprotein with promising potential. *Trends in Food Science & Technology*, v.21, 455-463.

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

ROOS, P. H. (2000) Ion exchange chromatography. In: Kastner, M. (Ed.) *Protein liquid chromatography* (pp.3-88). Journal of Chromatography Library, v. 61, Amsterdam, NLD: Elsevier Science B.V.

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

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. (2002). Adsorption equilibrium and kinetics of egg-white proteins on immobilized metal ion affinity gels for designing fractionation. *Adsorption*, v.8, 203-213.

STEVENS, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, v.100B, 1-9.

SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; GUOC, L.; ZHAO, Y.; CHANG, C. (2012). Monolithic cryogels made of agarose–chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, 1002-1007.

TAN, A. T.; WOODWORTH, R. C. (1969). Ultraviolet difference spectral studies of conalbumin complexes with transition metal ions. *Biochemistry*, v.8, 3711-3716.

THAMMASIRIRAK, S.; PONKHAM, P.; PREECHARRAM, S.; KHANCHANUAN, R.; PHONYOTHEE, P.; DADUANG, S.; SRISOMSAP, C.; ARAKI, T.; SVASTI, J. (2006). Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.143, 209-217.

TONG, X.-D.; DONG, X.-Y.; SUN, Y. (2002). Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. *Biochemical Engineering Journal*, v.12, 117-124.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. (2012). Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, v.887-888, 73-78.

VACHIER, M. C.; PIOT, M.; AWADÉ, A. C. (1995). Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. *Journal of Chromatography B*, v.664, 201-210.

WANG, L.; SHEN, S.; HE, X.; YUN, J.; YAO, K.; YAO, S.-J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, 237-242.

WETTER, L. R.; DEUTSCH, H. F. (1951). Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v.192(1), 237-242.

YAN, L.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K. (2011). Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, 876-880.

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

YILMAZ, M.; BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. (2005). Separation and purification of lysozyme by reactive green 19 immobilised membrane affinity chromatography. *Food Chemistry*, v.89, 11-18.

YUN, J.; TU, C.; LIN, D.-Q.; XU, L.; GUO, Y.; SHEN, S.; ZHANG, S.; YAO, K.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. (2012). Microchannel liquid-flow focusing and cryopolymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1247, 81-88.

CONCLUSÕES GERAIS

Um trocador catiônico monolítico polimérico supermacroporoso foi produzido, caracterizado e aplicado no processo de purificação da lisozima a partir da clara do ovo de galinha.

As modificações propostas no processo de produção do criogel não provocaram mudanças consideráveis na capacidade de inchamento, no grau e densidade de enxertia, mas o rendimento de enxertia foi inferior ao observado na literatura. O uso da microscopia ótica para estimar o tamanho dos poros mostrou-se adequado, assim como o método dos momentos para a determinação da porosidade total do criogel na forma de leito fixo, do coeficiente de dispersão axial aparente e da *HETP*. A determinação da resistência ao escoamento variando-se a viscosidade de um fluido newtoniano à pressão constante apresentou resultados satisfatórios, com grande concordância com o método tradicional. O uso das alternativas propostas foi adequada à caracterização de criogéis, abrindo novas perspectivas nesse segmento.

O processo de troca iônica entre a proteína lisozima e contraíons de Na^+ presentes no criogel produzido foi avaliado a diferentes temperaturas e concentrações de NaCl adicionada à fase móvel, tamponada em pH 7,2. As isotermas de adsorção obtidas demonstraram que o aumento da temperatura aumentou a capacidade adsortiva do criogel, ocorrendo o inverso com o aumento da concentração de sal. Os modelos de Langmuir e SMA foram avaliados e o ajuste de ambos foi satisfatório. Os parâmetros ajustados do modelo SMA estão em acordo com informações da literatura que indicam que as interações entre o adsorvente e a proteína ocorrem prioritariamente em uma região limitada da proteína, próxima ao resíduo Arg128 e que a orientação da lisozima adsorvida tende de vertical para lateral aumentando-se a concentração de sal na fase móvel.

A análise termodinâmica proposta, permitiu avaliar o processo de troca iônica como um todo e os processos de adsorção da proteína e dessorção dos contraíons, sendo útil para se compreender melhor os fenômenos observados. Os processos observados foram espontâneos e o processo de troca iônica foi mais afetado pela adsorção da proteína do que pela dessorção dos contraíons. O processo de troca iônica mostrou-se endotérmico, entropicamente dirigido com o fenômeno dominante

provavelmente estando associado à desestruturação das duplas camadas elétricas das proteínas e liberação das espécies químicas presentes para a solução.

Com o modelo capilar proposto foi possível se descrever a complexa estrutura do leito monolítico polimérico estudado. O sistema capilar utilizado apresentou distribuição normal de probabilidade para os seus diâmetros, sendo pequeno o efeito da velocidade da fase móvel nos valores observados. O coeficiente de transferência de massa diminuiu com o aumento do diâmetro capilar, possivelmente devido ao aumento da camada de fluido estagnado em seu interior. No entanto, sua importância relativa aumentou com o aumento do diâmetro, fato observado pelo aumento do número de Sherwood. O modelo SMA demonstrou ser mais adequado para descrever o equilíbrio de troca iônica no processo em um leito monolítico, principalmente quando a concentração de sal em solução é maior. No entanto, mais estudos são necessários para melhorar a capacidade preditiva do modelo utilizado.

Ao se empregar o leito monolítico produzido para a purificação da lisozima da clara de ovo, conseguiu-se recuperar tal proteína com até 78% de pureza em uma única etapa cromatográfica. A coluna não apresentou desgastes ou deterioração com o uso, mas o pré-preparo da solução de alimentação é necessário para a retirada da ovomucina, sob o risco de se entupir o leito devido à sua desnaturação e formação de gel. No entanto, foi possível o uso de menores diluições, não ocorrendo problemas com a alimentação em diluição 1:2. Verificou-se que com o aumento na diluição houve uma redução no grau de pureza da proteína obtida, no entanto não se verificou relação direta com o rendimento obtido.

A utilização de leitos monolíticos poliméricos macroporosos é uma realidade na purificação de macromoléculas. Um grande número de pesquisas nesta área vem sendo desenvolvido e os resultados obtidos no presente trabalho irão contribuir para a ampliação do conhecimento neste segmento.