

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE
QUITOSANA NATURAL E MODIFICADA QUIMICAMENTE E O
SEU USO NA ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS BSA E LISOZIMA**

Doutorando : Marco Antonio Torres

Orientador : Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-orientadora : Prof^a. Dra. Marisa Masumi Beppu

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

T686p Torres, Marco Antonio
Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima / Marco Antonio Torres.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.
Co-orientadora: Marisa Masumi Beppu
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Química.

1. Biomaterias. 2. Proteínas. 3. Adsorção. 4. Quitosana. 5. Lisozima. 6. Albumina. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Production and characterization of natural and chemically modified chitosan microspheres and its use in the adsorption of BSA and lysozyme proteins.

Palavras-chave em Inglês: Chitosa microspheres, Chemical modifications, BSA, Lysozyme adsorption

Área de concentração: Desenvolvimento de processos biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Antônio Carlos Luz Lisboa, Maria Inês Ré, Derval dos Santos Rosa, Angela Maria Moraes

Data da defesa: 24/julho/2006

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado defendida por Marco Antonio Torres e aprovada em 24 de julho de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador

Prof. Dr. Antônio Carlos Luz Lisbôa

Profa. Dr^a. Maria Inês Ré -IPT

Prof. Dr. Derval dos Santos Rosa - USF

Prof. Dr^a. Angela Maria Moraes – Unicamp

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Marco Antonio Torres e aprovada pela comissão julgadora em 24 de julho de 2006.

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Prof^a. Dra. Marisa Masumi Beppu

**Dedico esse trabalho ao meu filho
Bruno Nannini Torres**

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Alessandra pela importância na minha vida e pela ajuda na realização deste trabalho;

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelo apoio recebido em todos os momentos da minha vida;

A amiga Prof. Marisa Beppu pelo total apoio e confiança nas horas boas e nas horas não tão boas;

Ao Prof. César Santana pelas dúvidas resolvidas de todas as horas;

Ao brilhante Prof. Lisboa pelas conversas e ajuda nas horas importantes;

À banca pelas críticas e elogios que ajudaram em pontos importantes do trabalho;

A equipe e aos amigos Rodrigo e Cassiano do laboratório LEQUIP;

Aos professores e colegas do DPB que através de incentivos e contribuições valiosas ajudaram na realização deste trabalho;

Ao CNPq e FAPESP pelo financiamento deste trabalho;

E aos coordenadores 7º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2003, pela menção honrosa que o trabalho "Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente com epícloridrina" recebeu como melhor trabalho de doutorado.

“Nem um grande grau de inteligência ou imaginação ou os dois juntos criam um gênio. Amor, amor, amor, isto é a alma do gênio”.

**Wolfgang Amadeus Mozart
(1756 a 1791)**

RESUMO

Neste trabalho foram produzidas microesferas de quitosana com tamanho controlado e porosidade influenciada pela técnica de atomização e coagulação. As condições de produção foram definidas pelo planejamento de experimentos. As microesferas obtidas foram modificadas quimicamente com anidrido acético, epícloridrina e glutaraldeído com objetivos de melhorar suas características iniciais de resistência e estabilidade. As possibilidades de uso apresentadas por essas matrizes se devem ao reconhecimento observado entre adsorbato e adsorvente e à realização de modificações químicas e estruturais. Após essas modificações as microesferas obtidas foram analisadas quanto às suas propriedades estruturais, capacidade de adsorção e dessorção.

As microesferas foram utilizadas em sistemas de adsorção em banho finito e coluna de leito fixo. Os adsorbatos utilizados foram as proteínas BSA, lisozima e um concentrado protéico (condição real) obtido do soro do leite. As proteínas BSA e lisozima apresentam pontos isoelétricos distintos de 4,8 e 11, respectivamente, permitindo assim avaliar o sistema adsorvente-adsorbato pelas isotermas de adsorção, cinética de equilíbrio, capacidade de dessorção e regeneração dos adsorventes, em condições distintas de pH.

O modelo de Langmuir descreveu bem os valores de adsorção obtidos experimentalmente. As capacidades máximas de adsorção para as proteínas BSA e lisozima foram de 9,24 mg/g e 11,95 mg/g, respectivamente, utilizando as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Os maiores valores de adsorção foram encontrados próximos aos pontos isoelétricos, mostrando que as interações eletrostáticas, fundamentais para o processo em toda a faixa de pH estudada, não estão agindo isoladamente no sistema.

Comparando-se os métodos de tanque agitado e coluna de leito fixo foi possível observar diminuição significativa na adsorção e dessorção da solução artificial de proteínas do primeiro para o segundo método. Esses resultados podem ser explicados por limitações no tamanho da coluna do leito, tempo de residência e conseqüentemente pela baixa transferência de massa.

Com um extrato real ocorreu diminuição, mais significativa ainda, da capacidade de adsorção quando comparado com a solução artificial de proteínas. Estes resultados refletem a complexidade das interações e a existência de competição pelos sítios de adsorção da superfície interna e externa das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Essa competição ocorre possivelmente entre as proteínas do extrato e outros grupos moleculares.

Palavras-chave: Microesferas de quitosana, modificações químicas, BSA, lisozima e adsorção.

ABSTRACT

This work is concerned with production of chitosan microspheres with sizes controlled and porosity influenced by spraying and coagulation process. The production conditions were defined through experimental planning. The microspheres were modified chemically with glutaraldehyde, epichlorohydrin and acetic anhydride in order to improve its initial characteristics of resistance and stability. The possibilities of use exhibited by these matrices are due to recognition adsorbate-adsorbent and the accomplishments these chemical and structural modifications. Soon after the gotten microspheres their structural, adsorption and desorption properties were analyzed.

The microspheres were used in adsorption system in two methods: stirred tank and fixed bed. The adsorbates used were the BSA and lysozyme proteins and a proteinic extract from milk serum. The BSA and lysozyme proteins have different isoelectric points, 4.8 and 11, respectively. This allowed study the adsorbent-adsorbate system by adsorption isotherms, equilibrium kinetics, desorption capability and regeneration of adsorbents, in different conditions of pH.

The Langmuir described well the experimental values of capacity of adsorption. The maximum adsorption capacities were 9,24 mg/g and 11,95 mg/g for BSA and lysozyme proteins, respectively. The higher values of adsorption were found close to the isoelectric points, showing that the electrostatic interactions, important to the process during all pH range studied, it are not acting alone in the system.

Comparing the methods of stirred tank with fixed bed happened significant reduction in the adsorption and desorption from proteins artificial solution. These results may be explained by the limitations in the size of column, time of residence and consequently in the mass transfer.

With a real extract occurred important reduction of the adsorption capacity when compared with synthetic proteins. These results show the complexity of the interactions and the competition between the extract proteins and others chemical groups by adsorption sites in the internal and external surface of chitosan microspheres crosslinked with glutaraldehyde.

Key words: Chitosan microspheres, chemical modifications, BSA, lysozyme, adsorption.

.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	xvi
INDICE DE FIGURAS	xviii
NOMENCLATURA	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Quitosana	5
3.2 Modificações químicas envolvendo a quitosana	8
3.2.1 Modificação com anidrido acético	9
3.2.2 Reticulação com epiclorigrina	11
3.2.3 Reticulação com glutaraldeído	12
3.3 Adsorventes	14
3.4 Fundamentos da Adsorção	18
3.4.1 Métodos de Adsorção.....	19
3.4.1.1. Tanque agitado.....	19
3.4.1.2. Colunas de adsorção.....	20
3.4.2 Modelos de Adsorção	22
3.4.3 Eluição.....	23
3.4.4 Adsorção de proteínas	24
3.5 Proteínas	25
3.5.1 Interações das proteínas com macromoléculas.....	28
3.5.2 A proteína albumina de soro bovino - BSA	32
3.5.3 A proteína lisozima	35
3.5.4 O concentrado proteico	37

4. MATERIAS E MÉTODOS.....	39
4.1 Preparação das microesferas de quitosana.....	39
4.1.1 Preparação da solução concentrada de quitosana.....	39
4.1.2 Preparação das microesferas pelo método de atomização e coagulação.....	39
4.2 Modelagem matemática com planejamento de experimentos.....	42
4.3 Modificações químicas das microesferas.....	44
4.3.1 Acetilação das microesferas de quitosana.....	44
4.3.2 Reticulação das microesferas de quitosana com epícloridrina.....	44
4.3.3 Reticulação das microesferas de quitosana com glutaraldeído.....	45
4.3.4 Denominação das amostras de quitosana preparadas.....	45
4.4 Ensaio realizado para caracterização das microesferas.....	45
4.4.1 Titulação potenciométrica.....	45
4.4.2 Infravermelho (FTIR-ATR).....	46
4.4.3 Técnica de difração por raios-X.....	46
4.4.4 Análises térmicas por TGA e DSC.....	47
4.4.5 Análise mecânica por DMA.....	47
4.4.6 Avaliação da estabilidade química.....	48
4.4.7 Distribuição de tamanho das microesferas.....	48
4.4.8 Porosidade das microesferas.....	48
4.4.9 Avaliações morfológicas das microesferas.....	49
4.4.9.1 Microscopia óptica.....	49

4.4.9.2 Esfericidade das microesferas.....	49
4.4.9.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
4.4.9.4 Morfologia interna das microesferas de quitosana.....	50
4.4.10 Medidas de pH_{zpc}	50
4.5 Ensaio de adsorção e dessorção realizados das proteínas em tanque agitado.....	51
4.5.1 Calibração das soluções com as proteínas BSA e lisozima.....	51
4.5.2 Preparação do concentrado protéico para ser submetido à adsorção em coluna.....	52
4.5.3 Condições e aparato utilizado nos ensaios de adsorção e dessorção em tanque agitado.....	52
4.5.4 Experimentos de adsorção das proteínas.....	53
4.5.5 Adsorção em diferentes pHs	54
4.5.6 Cinética de adsorção	54
4.5.7 Estudos de dessorção das proteínas.....	55
4.6 Ensaio realizado de adsorção e dessorção das proteínas em leito fixo.....	56
4.6.1 Condições e aparato utilizado nos ensaios de adsorção e dessorção em condição dinâmica.....	56
4.6.2 Estudo de adsorção e dessorção em condição dinâmica (leito fixo) para o concentrado protéico.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Produção das microesferas.....	61
5.1.1 Análise inicial à realização do estudo de planejamento de experimentos feito durante a produção das microesferas pelo método de atomização e coagulação	61
5.1.2 Superfícies de resposta.....	63
5.1.3 Condição adequada da produção de microesferas.....	68

5.2 Caracterização dos microsferas (corpos porosos) de quitosana.....	70
5.2.1 Porcentagem de grupos amino protonáveis nas amostras estudadas.....	70
5.2.2 Espectros FTIR-ATR para as amostras analisadas.....	71
5.2.3 Análises de difração por raios-X.....	73
5.2.4 Análises de TGA e DSC.....	74
5.2.5 Análise de DMA.....	76
5.2.6 Valores de Porosidade.....	78
5.2.7 Estabilidade química das microsferas.....	79
5.3 Morfologia das microsferas	80
5.3.1 Fotomicrografias	80
5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura das microsferas.....	81
5.4 Resultados de adsorção e dessorção das proteínas em tanque agitado.....	85
5.4.1 Valores de pH_{zpc}	85
5.4.2 Calibrações	87
5.4.3 Resultados de adsorção das proteínas	88
5.4.4 Influência do pH na adsorção das proteínas	92
5.4.5 Cinética da adsorção das proteínas	95
5.4.6 Estudo da dessorção das proteínas	99
5.4.7 Curvas de ruptura para o sistema dinâmico	100
5.4.7.1 Curvas de ruptura para as proteínas BSA e lisozima	101
5.4.7.2 Curvas de ruptura para o extrato real	102
6. CONCLUSÕES.....	105
7. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

Lista de Tabelas

Tabela 1: Variáveis importantes nos adsorventes utilizados comercialmente.....	17
Tabela 2: Principais modelos de adsorção de acordo com Giles e colaboradores 1974.....	23
Tabela 3: Distribuição de cargas na quitosana e nas proteínas estudadas.....	28
Tabela 4: Composição da cadeia e o número de aminoácidos da BSA.....	33
Tabela 5: Resultados em trabalhos de referência envolvendo as proteínas BSA e lisozima e outros adsorventes.....	37
Tabela 6: Dados com os níveis e as variáveis do plano fatorial usados na modelagem por superfície de resposta.....	43
Tabela 7: Plano fatorial usado na modelagem por superfície de resposta (RSM) para as variáveis de resposta: tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio (DPM).....	43
Tabela 8: Parâmetros da coluna de leito fixo utilizada.....	58
Tabela 9: Influência da variação de alguns parâmetros no tamanho médio das microesferas durante o estudo preliminar.....	62
Tabela 10: Valores dos parâmetros fixados usados durante o planejamento de experimentos.....	63
Tabela 11: Efeitos dos parâmetros (PN) e (VSQ) sobre o tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio (DPM).....	65
Tabela 12: Condições adequadas encontradas durante o estudo.....	70
Tabela 13: Percentual de grupos amino protonáveis das microesferas, natural (N), reticulada com glutaraldeído (RG), reticulada com epícloridrina (RE) e acetilada (MA),.....	71
Tabela 14: Valores de porosidade das microesferas de quitosana.....	79

Tabela 15: Valores de solubilização das amostras em solução aquosa de HCl 0,2 mol/L pelo tempo máximo de 48 h.....	80
Tabela 16: Fração dos grupos amino protonados para cada pH.....	85
Tabela 17: Parâmetros de adsorção obtidos pelo modelo de Langmuir.....	92
Tabela 18: Razão de dessorção das proteínas estudadas com as microesferas de (MA), (RE) e (RG).....	100
Tabela 19: Quantidade adsorvida e dessorvida para as proteínas nas respectivas concentrações iniciais.....	101
Tabela 20: Quantidade adsorvida e dessorvida para o extrato nas respectivas concentrações iniciais.....	104

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura linear e tridimensional da quitosana	05
Figura 2: Esquema simplificado do processo de obtenção da quitina e quitosana, segundo Braek <i>et al.</i> , 1989.....	06
Figura 3: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana N-acetilada.....	10
Figura 4: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana reticulada com epícloridrina.....	11
Figura 5: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana reticulada com glutaraldeído.....	13
Figura 6: Etapas envolvendo a recuperação e/ou purificação de proteínas.....	24
Figura 7: Estrutura básica dos aminoácidos.....	26
Figura 8: Esquema com as possíveis interações observadas entre proteínas-proteínas e proteínas-biopolímeros.....	30
Figura 9: Estruturas padronizadas A, B, C e D da proteína BSA.....	34
Figura 10: Conformações da proteína BSA encontradas nas formas N, F e E.....	35
Figura 11: Estrutura primária da proteína lisozima.....	36
Figura 12: Estrutura terciária estereoscópica da proteína lisozima.....	37
Figura 13: Fluxograma da produção de microesferas.....	40
Figura 14: Representação esquemática da produção de microesferas de quitosana pelo método de coagulação e atomização.....	41
Figura 15: Câmara de atomização e bico de injeção utilizado na produção de microesferas de quitosana.....	41
Figura 16: Obtenção da quitina por N-acetilação da quitosana (Kurita, 1997)	44
Figura 17: Diâmetro interno e diâmetro externo.....	50

Figura 18: Sistema de frascos utilizado para os ensaios de adsorção e dessorção em banho finito.....	53
Figura 19: Sistema utilizado para os ensaios de adsorção e dessorção em leito fixo.....	57
Figura 20: Coluna utilizada para os ensaios de adsorção e dessorção em condição dinâmica.....	57
Figura 21: Superfície de resposta mostrando os efeitos da PN (Kgf.cm^{-2}) e VSQ (ml.min^{-1}) sobre o tamanho médio das microesferas (μm).....	64
Figura 22: Superfície de resposta mostrando os efeitos da PN (Kgf.cm^{-2}) e VSQ (ml.min^{-1}) sobre o desvio padrão médio (μm).....	65
Figura 23: Valores preditos e valores observados para o modelo Y_1 , correspondendo a resposta TMM.....	67
Figura 24: Valores preditos e valores observados para o modelo Y_2 , correspondendo a resposta DPM.....	68
Figura 25: Distribuição de tamanho das microesferas na condição adequada para pressão de nitrogênio $2,5 \text{ kgf.cm}^{-2}$ e para vazão mássica da solução de quitosana 9 mL.min^{-1}	69
Figura 26: Espectros de FTIR-ATR para as microesferas naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).....	72
Figura 27. Difrátogramas para as microesferas naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).....	74
Figura 28: Análise termogravimétrica das microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).....	74

Figura 29: Perfil térmico obtido por DSC para as microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).....	76
Figura 30: Perfil obtido por DMA para as microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).....	78
Figura 31: Fotomicrografia das microesferas de quitosana naturais (N) e reticulada com glutaraldeído (RG).....	80
Figura 32: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana modificadas com anidrido acético.....	81
Figura 33: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana reticuladas com epícloridrina.....	82
Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	82
Figura 35: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia da seção transversal das microesferas modificadas com anidrido acético.....	83
Figura 36: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia da seção transversal das microesferas reticuladas com epícloridrina.....	84
Figura 37: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia da seção transversal das microesferas reticuladas com glutaraldeído.....	84
Figura 38: Valores de titulação pH_{zpc}	86
Figura 39: Curvas de calibração proteínas Lisozima e BSA no tampão Tris, $pH=7,5$ e temperatura de $20^{\circ}C$	87
Figura 40: Curvas de calibração proteínas Lisozima e BSA no tampão fosfato, $pH=6$ e temperatura de $20^{\circ}C$	87

Figura 41: Isotermas de adsorção do BSA usando 200 mM do tampão fosfato, no pH de 6 e temperatura de 20 °C.....	89
Figura 42: Isotermas de adsorção do BSA usando 400 mM do tampão Tris, no pH de 7,5 e temperatura de 20 °C.....	89
Figura 43: Isotermas de adsorção da lisozima usando 200 mM de tampão fosfato, no pH de 6, e temperatura de 20 °C.....	90
Figura 44: Isotermas de adsorção da lisozima usando 400 mM do tampão Tris, no pH de 7,5, e temperatura de 20 °C.....	90
Figura 45: Impacto dos valores de pH sobre a capacidade de adsorção das proteínas BSA e lisozima pelas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	95
Figura 46: Cinética de adsorção das proteínas sobre as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído no pH 6 e na temperatura de 20°C.....	97
Figura 47: Modelo da cinética de difusão controlada para a lisozima.....	97
Figura 48: Modelo da cinética de difusão controlada para o BSA.....	98
Figura 49: Modelo da cinética de transferência de massa inicial para o BSA.....	98
Figura 50: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema BSA, pH=4,8 no tampão fosfato, temperatura de 20 °C e $C_o = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$	101
Figura 51: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema lisozima, pH=11 no tampão “Tris”, temperatura de 20 °C e $C_o = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$	102

Figura 52: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema real (concentrado protéico), pH= 4,8, tampão fosfato, temperatura de 20°C e $C_o = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ 103

Figura 53: Curva de ruptura e dessorção para o sistema real (concentrado protéico), pH= 4,8, tampão fosfato, temperatura de 25°C e $C_o = 5 \text{ mg.mL}^{-1}$ 103

NOMENCLATURA E UNIDADES

- α Grau de desacetilação (%)
- ε Porosidade (%)
- q_m Capacidade máxima de adsorção (mg.g^{-1})
- K_d Constante cinética de dissociação (mg.g^{-1})
- Q Massa adsorvida de adsorbato por grama de adsorvente (mg.g^{-1})
- C_i Concentração inicial de adsorbato (mg.ml^{-1})
- C_f Concentração final de adsorbato no equilíbrio (mg.ml^{-1})
- V_f Volume da solução injetada (ml)
- V_m Volume morto (ml)
- PN Pressão do nitrogênio (kgf.cm^{-2})
- VSQ Vazão mássica da solução de quitosana (ml.min^{-1})
- TMM Tamanho médio das microesferas (μm)
- DPM Desvio padrão médio (μm)
- S Área superficial específica das microesferas de quitosana ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$)
- ε_L Porosidade do leito (adimensional)
- CP concentrado protéico (extrato)

1. INTRODUÇÃO

Existem na literatura estudos sobre a adsorção de proteínas em quitosana. Entretanto, não existiam até a realização desse trabalho estudos sobre a adsorção das proteínas BSA e lisozima em microesferas de quitosana modificadas quimicamente com anidrido acético, epicloridrina e glutaraldeído.

A viabilidade econômica e de produção em escala industrial de produtos obtidos por meio da biotecnologia depende significativamente das técnicas empregadas na concentração e purificação desses compostos (Arruda e Santana, 2003; Bohak e Sharon, 1979; Krigjaman e Jenkins, 1992). Entre esses bioprodutos destacam-se as proteínas com suas aplicações nas indústrias alimentícias e de medicamentos (Yoshida *et al.*, 1994; Grzegorzczuk e Carta, 1996; Hill e Nearath, 1975). São diversos os métodos cromatográficos desenvolvidos e aplicados na separação de proteínas. Infelizmente, são poucos os estudos realizados no desenvolvimento de novos adsorventes específicos de troca iônica ou interação hidrofóbica, com características e propriedades específicas para separação dessas proteínas. Além disso, quando encontrados no mercado, principalmente para aplicações em larga escala, normalmente são importados e com preço elevado (Kamei *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e a aplicação desses bioadsorventes permitem o controle de características importantes como: porosidade interna e ligantes químicos específicos na superfície. A flexibilidade apresentada por essas matrizes e a uniformidade de suas propriedades determinam a condução de processos homogêneos de adsorção (Roberts, 1992).

A quitosana é um aminopolissacarídeo obtido da desacetilação alcalina da quitina. É crescente a importância da quitosana como adsorvente em processos de recuperação e/ou purificação de bioprodutos de alto valor agregado, como as proteínas. Uma vantagem dessa utilização está na disponibilidade da quitosana na natureza por meio da quitina, podendo ser encontrada, facilmente, como subproduto da indústria pesqueira. Uma outra característica importante da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica. Como a quitosana é

solúvel em soluções ácidas, é possível a sua moldabilidade na forma desejada. Aproveitando essa propriedade, foram obtidas microesferas de quitosana, com distribuição de tamanho de $140 \pm 119 \mu\text{m}$ a partir da técnica de atomização e coagulação.

Foram três as modificações químicas realizadas sobre as microesferas com o objetivo de aumentar suas resistências mecânica, química e térmica: a-) reticulação com glutaraldeído, com o bloqueio dos grupos amino presentes na quitosana pelos grupos aldeídos; b-) reticulação com epicloridrina, com o bloqueio apenas das hidroxilas e c-) modificação com anidrido acético, diminuindo o grau de desacetilação da quitosana na tentativa da obtenção de pseudo-quitinas.

Devido à presença de grupos amino na sua superfície, a quitosana possui propriedades policatiónicas quando em solução ácida. Com isso, apresenta em pHs abaixo do seu ponto isoelétrico ($p.I = 6,5$) grupos amino na forma protonada. Nessas condições fica com sua superfície carregada positivamente e adsorve preferencialmente proteínas com $p.I. < 6,5$. Já em pHs acima do seu ponto isoelétrico, adsorve preferencialmente proteínas com $p.I. > 6,5$.

Aproveitando essa característica, foram escolhidas para a realização do estudo, duas proteínas com pontos isoelétricos distintos. A albumina de soro bovino - BSA - com $p.I. = 4,8$ e a lisozima com $p.I. = 11$. Foi utilizado também, como adsorbato, um extrato protéico contendo além das proteínas mencionadas outros possíveis adsorbatos e impurezas como forma de testar a capacidade dos adsorventes em uma condição complexa.

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de adsorventes alternativos com diferentes propriedades de adsorção-dessorção, aproveitando para isso que as modificações físico-químicas implementadas sobre a quitosana alteram o número de sítios de adsorção e as características dos grupos funcionais inicialmente presentes na cadeia macromolecular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Foi objetivo desse trabalho o desenvolvimento de adsorventes baseados em matriz de quitosana. Esses novos adsorventes foram utilizados para adsorção-dessorção das proteínas BSA e lisozima na forma sintética e misturadas em um concentrado protéico.

2.2 Objetivos específicos

➤ Obtenção de microesferas porosas de quitosana com distribuição de tamanho controlado utilizando o sistema de atomização e coagulação.

➤ Estudo das variáveis envolvidas na produção de microesferas de quitosana e determinação das variáveis importantes relacionadas ao controle de porosidade e ao tamanho das partículas através do planejamento de experimentos.

➤ Aumento das resistências térmica, mecânica e química das microesferas com os seguintes tratamentos:

1-) acetilação com anidrido acético;

2-) reticulação com epicloridrina;

3-) reticulação com glutaraldeído.

➤ Caracterizações morfológicas, térmicas, mecânicas e químicas das microesferas obtidas.

➤ Estudos de adsorção e dessorção em banho finito e coluna de leito fixo envolvendo as microesferas de quitosana e as proteínas padrão BSA e lisozima. Em banho finito, foram obtidas as curvas cinéticas de adsorção, as isotermas de equilíbrio, e a razão de dessorção. Em coluna de leito fixo, foram determinados parâmetros de adsorção e dessorção, utilizando para isso as curvas de “breakthrough” com as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído (que se mostraram mais adequadas na adsorção das proteínas durante o processo de banho finito).

➤ Estudos de adsorção e dessorção em coluna de leito fixo com as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e um concentrado protéico real.

Espera-se que esse trabalho possa gerar conhecimento suficiente para ser utilizado em outros estudos relacionados com a separação de biomoléculas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo contém informações e conceitos fundamentais relacionados ao trabalho.

3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear resultante da substituição parcial dos grupos N-acetil presentes na quitina quando em contato com solução alcalina, resultando em um grau de desacetilação maior ou igual a 50%. Sua natureza química é composta da estrutura 2-amino 2-desoxi- β -D-glicose (poli(D-glicosamina)) e 2-acetamida 2-desoxi- β -D-glicose (N-acetil-D-glicosamina), conforme mostra a Figura 1.

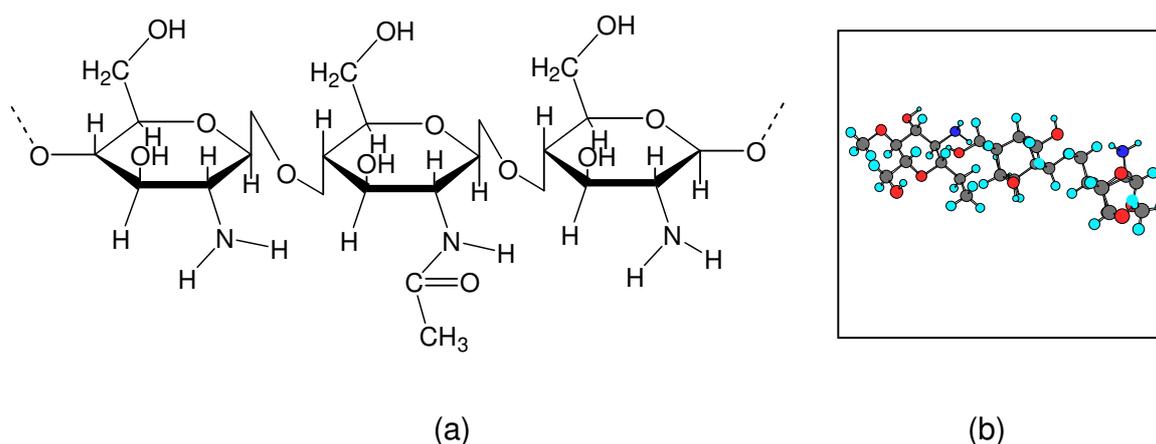


Figura 1: Estrutura linear (a) e tridimensional da quitosana (b).

A quitina é um polissacarídeo encontrado com facilidade na natureza. Sua constituição química é formada apenas pela estrutura 2-acetamida 2-desoxi- β -D-glicose (N-acetil-D-glicosamina), diferenciando-se da celulose pelo grupo N-acetil. A quitina é encontrada nas formas α onde sua estrutura é formada por cadeias paralelas e antiparalelas, β por cadeias paralelas e γ com sua estrutura não totalmente definida, todas encontradas na natureza.

A quitina, matéria-prima da quitosana, atualmente é obtida principalmente do exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo e o camarão, que até há pouco tempo era um resíduo descartável da indústria pesqueira. No exoesqueleto de crustáceos além da quitina existem quantidades de carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, pigmentos e proteínas. O processo de obtenção da quitosana está esquematizado na Figura 2.



Figura 2: Esquema simplificado do processo de obtenção da quitina e quitosana, segundo Braek *et al.*, 1989.

A quitina é insolúvel em solução aquosa e em solventes orgânicos devido a sua alta cristalinidade. Entretanto a solubilidade, a reatividade e o processamento da quitina aumentam consideravelmente com modificações químicas (Lapasin e Pricl, 1995).

Já a quitosana, diferentemente da quitina, apresenta solubilidade em soluções ácidas, permitindo o estudo de seus grupos reativos. Este biopolímero possui três grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2, e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6,

respectivamente (Furusaki *et al.*, 1996). O grupo amino é o responsável por sua natureza policatiônica, com a sua protonação quando em contato com soluções ácidas. A massa molecular das cadeias poliméricas da quitosana, com grau de desacetilação (α) em torno de 85%, foi determinada utilizando o método de cromatografia de permeação em gel de alta eficiência (CPGAE) por Vieira, 2004, obtendo valores da ordem de 10^5 Da. Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação são: tempo de reação e concentração da solução de álcali (Campana e Signini, 2001).

Através de técnicas desenvolvidas nos últimos anos, é possível conhecer a estrutura e a funcionalidade da quitosana com a possibilidade de alterá-la quimicamente. Isso permite modificar suas características iniciais para um determinado propósito. Esses estudos, realizados principalmente na área de biomateriais, têm a seu favor o fato da quitosana ser proveniente de fonte renovável, principalmente em países com extenso litoral como é o caso do Brasil, além de ser um material biodegradável.

Entre as inúmeras aplicações da quitosana podemos destacar a purificação de água, processamento de alimentos, proteção de frutas e sementes, indústria papelreira, cosméticos entre outras. Especificamente, na área médica e de fármacos, podemos destacar o uso da quitosana como adsorvente, em lentes de contato, em pele artificial e na regeneração de ferimentos. Mi e Shyu, 1999, realizaram estudos sobre a quitosana aplicada na liberação controlada de fármacos. Yamaguchi *et al.*, 2003 observaram compósitos de quitosana e suas aplicações na regeneração de nervos.

Algumas de suas propriedades físico-químicas e biológicas, descritas abaixo, permitem esse amplo espectro de aplicações.

- ◆ Natural, não tóxica, biocompatível;
- ◆ Moldável na forma de gel, membrana, fibras, spray, esferas e microesferas;
- ◆ Capacidade de adsorção;
- ◆ Propriedades bioadesivas;
- ◆ Propriedades bactericidas.

A quitosana na forma de solução ou gel possui arranjo conformacional variado, na forma esférica, fibrilar e espiralada. O arranjo estrutural é influenciado pela temperatura, pH, distribuição média das massas moleculares, e grau de desacetilação. A distribuição dos grupos acetilados e desacetilados, ou seja, dos grupos N-acetil e amino presentes na cadeia polimérica ocorre de forma randômica.

As soluções de quitosana, obtidas através de procedimentos simples de solubilização, normalmente possuem características hidrofílicas (grupos amino). A partir das alterações de sua estrutura elas podem intensificar a sua natureza hidrofílica ou começar a apresentar características hidrofóbicas (grupos imino). Essas interações hidrofóbicas diferem de outros tipos de interações como as eletrostáticas, pontes de hidrogênio e de van der Waals por não serem resultados de interações coesivas entre as moléculas, mas sim pela estabilização dos resíduos laterais presentes na cadeia polimérica que devem ser resguardados do contato com moléculas de água. Desbrières e colaboradores, 1996, estudaram as interações hidrofóbicas envolvidas na estabilização das estruturas reticuladas. Essas interações são influenciadas pelo grau de desacetilação da quitosana, através da distribuição dos grupos N-acetil e amino ou imino, aumento da concentração do reticulado, aumento da temperatura da amostra, pH do meio, com a ionização do grupo amino quando em solução ácida, grau de reticulação, com a reação do grupo amino de características hidrofílicas com o grupo aldeído formando base de Schiff com características hidrofóbicas, entre outros fatores.

3.2 Modificações químicas envolvendo a quitosana

A quitosana, como descrito, possui os grupos funcionais: N-acetil, amino, hidroxila primária e secundária. Modificações químicas envolvendo esses grupos têm recebido atenção especial com relação a características específicas tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade com tecidos animais e humanos e interações químicas e físicas (Chirachanchai *et al.*, 2001). Tais características ampliam ou restringem aplicações nas áreas biomédica e farmacêutica e são importantes para se definir um bom adsorvente (Lillo e Matsuhira, 1997).

Para tornar a quitosana quimicamente mais inerte ou resistente ao meio, costuma-se bloquear os seus grupos funcionais, adicionando-se um agente modificador. A reação pode ocorrer de forma homogênea (adicionando o agente modificador na própria solução de quitosana) ou heterogênea (adicionando o agente modificador na quitosana já moldada).

3.2.1 Modificação com anidrido acético

Tanto a quitina quanto a quitosana possuem vantagens e desvantagens dependendo do objetivo de suas aplicações. A quitina possui grande rigidez estrutural, mas baixa solubilidade em solventes inorgânicos e orgânicos, baixa processabilidade e baixa reatividade (Zong *et al.*, 2000). Já a quitosana, diferentemente da quitina, apresenta solubilidade em soluções ácidas permitindo o estudo de seus grupos reativos, como o grupo amino, responsável por sua natureza policatiônica. Em contrapartida, a quitosana possui baixa resistência mecânica e térmica e baixa estabilidade química.

Com o objetivo de remover essas limitações, modificações químicas envolvendo a quitosana e seus grupos funcionais têm sido estudadas.

Estudos realizados por Hirano *et al.*, 1976 mostraram que géis obtidos através da acetilação da quitosana, utilizando para isso ácido acético e metanol, formaram biomateriais com propriedades interessantes com relação à resistência mecânica quando comparados com géis obtidos por reticulação da quitosana através de ligações do tipo covalente.

A primeira vantagem da modificação com anidrido acético está na reversibilidade da reação quitina ou pseudo-quitina (caracterizada pelo grau de desacetilação compreendido entre $0 < \alpha < 50$ %) e a quitosana N-acetilada (estrutura desacetilada da quitosana, partindo-se da quitosana inicial, caracterizada pelo grau de desacetilação compreendido entre $0 < \alpha < 100$ %) ou quitosana propriamente dita. A segunda vantagem consiste no aparecimento de propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas pelas cadeias presentes na quitina, no que se refere à estabilidade.

Com a obtenção da quitosana N-acetilada ocorrem perdas na reatividade e moldabilidade. Essas variações dependem do controle da reação de acetilação relacionado ao grau de substituição entre os grupos N-acetil e amino (Vachored *et al.*, 2001).

Estudos comparativos, realizados por Zong e colaboradores, 2000, entre a quitosana e a quitosana N-acetilada, mostraram que a solubilidade em solventes orgânicos aumentou, mas a solubilidade em solventes polares diminuiu muito. A processabilidade também é influenciada pelo grau de acetilação e o tamanho da cadeia resultante. Normalmente, quanto menor a cadeia, mais leves e elásticos e de melhor processabilidade são os biomateriais obtidos.

O grau de acetilação da quitosana aumenta conforme a concentração da solução de anidrido acético utilizada e o tempo de contato entre as microesferas e a solução de anidrido acético. Alguns estudos conduzidos por Hirano e colaboradores, 1987, mostraram que os géis obtidos de quitosana N-acetilada, ou seja, de quitosana acilada por grupos N-acetil, com objetivo de mimetizar a quitina, conforme Figura 3, possuem estabilidade em soluções ácidas, alcalinas e ao calor, com propriedades de rigidez.

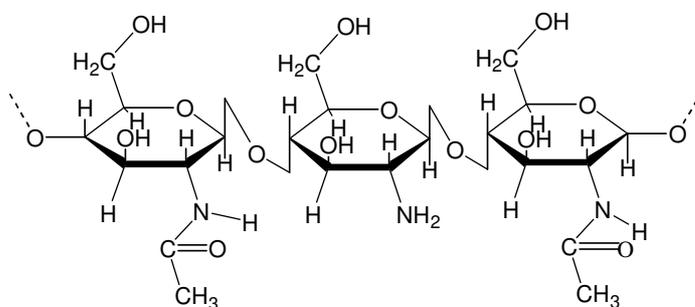


Figura 3: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana N-acetilada.

A obtenção de estruturas mais rígidas ou com reatividade maior está relacionada ao controle do grau de substituição (d.s.). Graus de substituição maiores dos grupos amino pelos grupos N-acetil correspondem a estruturas mais rígidas no caso da quitosana.

3.2.2 Reticulação com epícloridrina

A reticulação permite o aumento das resistências físico-químicas de materiais poliméricos, mas em contra partida diminui a densidade dos ligantes, inicialmente presentes, na superfície dos adsorventes.

A epícloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano) é um agente reticulante que pode ser utilizado com esse intuito, ou seja, de modificar quimicamente a estrutura físico-química da quitosana. O mecanismo de reticulação com a epícloridrina, nesse caso, envolve o bloqueio preferencial dos grupos hidroxila presentes na cadeia polimérica da quitosana permitindo que os grupos amino permaneçam livres. Hudson *et al.*, 1992, estudaram os aspectos envolvidos na reticulação da quitosana com epícloridrina e verificaram um aumento na resistência mecânica das estruturas formadas. A Figura 4 mostra as cadeias da quitosana após a reticulação com epícloridrina.

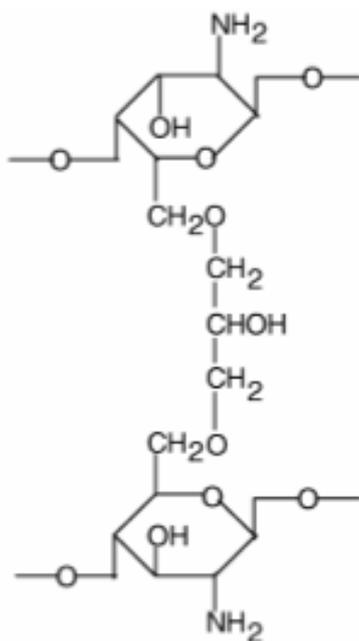


Figura 4: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana reticulada com epícloridrina.

3.2.3 Reticulação com glutaraldeído

A quitosana pode ser reticulada utilizando glutaraldeído (Muzzarelli e Peter, 1977). O glutaraldeído ou 1,5 pentanodiol ($\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$) é um agente reticulante que pode ser utilizado para modificar quimicamente a quitosana, com o objetivo de obter estruturas mais estáveis quimicamente; para isso é realizado o bloqueio dos grupos amino presentes na cadeia polimérica por grupos aldeído presentes no agente reticulante.

O glutaraldeído é um agente bifuncional largamente utilizado para a reticulação e imobilização de proteínas. Monsan *et al.*, 1975, estudaram o mecanismo de interação do glutaraldeído com as proteínas e verificaram a ocorrência de reações entre os grupos amino e os grupos aldeído, formando grupos imino rapidamente. No caso da quitosana, durante a reação com o glutaraldeído ocorrem interações intra e inter moleculares através de ligações covalentes entre esses grupos, com a formação da estrutura mostrada na Figura 5.

Entretanto, os mecanismos de reação e conseqüente formação desses produtos na forma de redes tridimensionais são pouco conhecidos, sendo sugeridas algumas hipóteses. A primeira através da polimerização do glutaraldeído em um sítio aminado da cadeia polimérica da quitosana e conseqüente propagação da reação com reticulação de grupos amino; a segunda com reticulação formada entre uma molécula de aldeído com seus dois grupos funcionais e duas moléculas de amino resultando em bases de Schiff; e a terceira através da formação de bases de Schiff apenas com um grupo funcional do aldeído sendo que o outro grupo permanece livre.

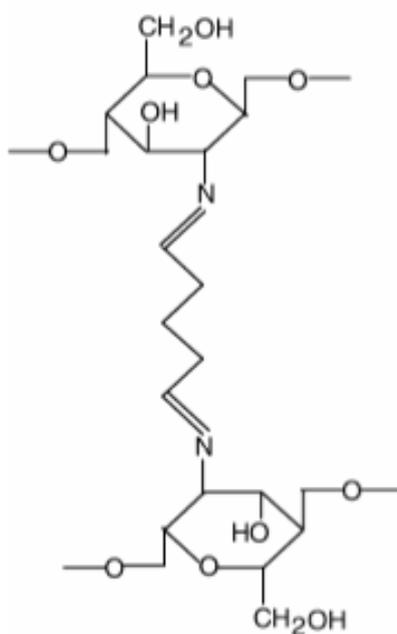


Figura 5: Estrutura molecular dos segmentos da cadeia da quitosana reticulada com glutaraldeído.

Investigações realizadas sobre a concentração do reticulante e do polissacarídeo a ser reticulado, o tempo de contato durante a reação e a temperatura do meio, têm fundamental influência na estrutura mostrada na Figura 5. As reações entre o polímero e o agente reticulante são irreversíveis e rápidas. Utilizando a microscopia eletrônica de varredura, a quitosana reticulada com glutaraldeído mostrou maior irregularidade superficial. Através de técnicas de raios-X, observou-se nas estruturas formadas uma diminuição da cristalinidade. Foi observado também, no mesmo estudo, um aumento na capacidade de adsorção de íons metálicos pela estrutura da quitosana reticulada com glutaraldeído quando comparada com a quitosana sem modificação alguma (Monteiro e Airoidi, 1999).

O mecanismo responsável pela formação do reticulado tridimensional, característico em alguns géis poliméricos, é resultado de forças atrativas e

repulsivas ao longo da cadeia. Existem numerosos exemplos de hidrogéis de quitosana formados por diferentes técnicas de reticulação. Reticulações com a formação de ligações covalentes utilizando o glutaraldeído têm sido empregadas, mas poucas pesquisas têm sido realizadas no estudo do efeito dessas modificações químicas envolvendo o glutaraldeído e estruturas já moldadas na forma desejada.

3.3 Adsorventes

É indiscutível, atualmente, a importância que a tecnologia de fabricação de adsorventes possui na área da biotecnologia, e, nesse contexto, o estudo da quitosana como adsorvente.

Os adsorventes sintéticos são caracterizados de acordo com sua natureza química e física, (Kalyanpur, 2002), com relação à:

- ✓ Porosidade do adsorvente;
- ✓ Área específica da superfície do adsorvente;
- ✓ Distribuição do tamanho de partículas do adsorvente;
- ✓ Estabilidades química, mecânica e térmica;
- ✓ Capacidade de adsorção, eluição e regeneração.

Cada tipo de adsorvente possui características específicas quanto à porosidade, área superficial, tamanho, estabilidade, e, principalmente, os sítios de ligação com os quais o adsorbato possa interagir. Esses parâmetros influenciam na capacidade de cada adsorvente com relação à adsorção de uma determinada molécula. A área específica da superfície é responsável pelo contato entre adsorvente - adsorbato. A porosidade, volume vazio no interior da partícula do adsorvente, tem fundamental importância durante a difusão molecular. A distribuição de tamanho do adsorvente tem relevância no momento do empacotamento das colunas e na sua estabilidade mecânica (Perry, 1999).

Características estruturais como cristalinidade e amorficidade também são importantes na caracterização dos adsorventes com impacto na resistência mecânica e na capacidade de adsorção.

Os adsorventes podem ser caracterizados pelo tamanho de poros. A IUPAC classifica o tamanho de poros nos adsorventes da seguinte maneira:

- Microporo $\epsilon < 2 \text{ nm}$
- Mesoporo $2 \text{ nm} < \epsilon < 50 \text{ nm}$
- Macroporo $\epsilon > 50 \text{ nm}$

Os adsorventes macroporosos são os mais usados na separação e recuperação de macromoléculas de alta massa molecular como é o caso das proteínas e das partículas coloidais. Esses adsorventes normalmente possuem poros com diâmetro mínimo de 50 nm até diâmetros maiores que 1000 nm.

As análises e métodos utilizados na determinação das características envolvendo área superficial e distribuição de poros dependem da condição de uso do adsorvente, ou seja, se esse adsorvente será empregado na condição seca ou úmida. A determinação dessas características pode ser feita utilizando o método BET. A técnica de BET baseada na adsorção e dessorção do gás nitrogênio pelos poros e pela superfície do adsorvente é imprecisa principalmente para diâmetros de poros acima de 200 nm. Em se tratando de bioadsorventes, obtidos na forma úmida e que passam por processo de liofilização para a realização do teste, normalmente os poros formados possuem baixa resistência mecânica, tornando a técnica ainda mais imprecisa com rompimento dos poros durante a difusão do gás.

O caráter hidrofóbico (superfície não polar) e hidrofílico (superfície polar) são dependentes da característica macromolecular inicial dos adsorventes e das modificações impostas a essa estrutura inicial. O grau de reticulação é decisivo na definição do caráter hidrofóbico ou hidrofílico do material adsorvente. Sua capacidade de interagir com cargas positivas ou negativas e com outros grupos hidrofóbicos e hidrofílicos vai depender do grau e tipo de modificação estrutural e do meio em que esse adsorvente seja empregado. A capacidade de

entumescimento do adsorvente vai depender também dessas condições. O grau de reticulação influencia na capacidade de entumescimento e porosidade, na capacidade de troca de cargas, na difusividade interna do adsorbato, na facilidade ou não de regeneração desse adsorvente, após uso em processos de adsorção, no acesso de íons dos grupos funcionais do adsorbato aos sítios de adsorção do adsorvente e, finalmente, nas estabilidades térmica, mecânica e química (Francischetti *et al.*, 2004).

Os adsorventes devem possuir características como insolubilidade em relação à fase móvel (adsorbato em solução), ter o mínimo de interações não específicas com formação de complexo específico apenas com a molécula alvo, permeabilidade a macromoléculas biológicas, grande superfície específica, estabilidade química, mecânica e térmica, regeneração e resistência ao ataque microbiológico (Turková, 1974).

Um estudo realizado por Kalyanpur, 1996, cita algumas utilizações dos adsorventes na recuperação-purificação das seguintes classes de compostos químicos:

- ❖ Antibióticos;
- ❖ Vitaminas;
- ❖ Peptídeos e proteínas;
- ❖ Sacarídeos;
- ❖ Nucleotídeos.

Os materiais mais utilizados para a confecção de matrizes são: agarose, dextrana, celulose, poliacrilamidas e suportes inorgânicos. Entretanto, a maioria desses adsorventes apresenta elevado custo, sendo interessante desenvolver novos materiais de menor custo e alta capacidade de adsorção. Neste ponto surge a bioadsorção. A bioadsorção é um método de adsorção que se utiliza de materiais de origem natural (biológica) como matrizes. Destaca-se pelo menor custo das matrizes de adsorção quando comparado aos adsorventes tradicionais

já conhecidos no mercado e que utilizam compostos de origem sintética (Saglam *et al.*, 2002).

Estudos comparativos, entre matrizes e proteínas padrão, têm indicado a agarose como um dos melhores materiais para a confecção de matrizes (Angal e Dean, 1995). As cadeias lineares reticuladas da agarose produzem uma estrutura tridimensional estabilizada por pontes de hidrogênio. Essas estruturas não têm estabilidades térmica, química e mecânica suficientes e exigem reticulações com epícloridrina. A maior desvantagem da agarose é sua semi-rigidez quando comparada a celulose (Janson, 1984). A celulose foi a primeira matriz de afinidade utilizada (Campbell *et al.*, 1951). A dextrana é um polissacarídeo que quando reticulado com epícloridrina é estável em uma ampla faixa de pHs. As poliácridamidas são sintetizadas por meio da polimerização da acrilamida e da N,N' - metilenobisacrilamida com vários tamanhos de poro. Suas microesferas porosas são quimicamente estáveis na faixa de pH de 0 a 12 e têm excelente estabilidade mecânica.

Alguns parâmetros importantes para avaliar os adsorventes são mostrados na Tabela 1 (Perry, 1999).

Tabela 1: Variáveis importantes nos adsorventes utilizados comercialmente.

Material estrutural	Forma	Faixa de tamanho (mm)	Área superficial Km ² .kg ⁻¹	Porosidade média (%)	Diâmetro médio de poro (nm)	Grau de intumescimento (%)	Temperatura máxima de aplicação (°C)	Faixa de pH operacional
Aluminas	G, E, P	0,074 - 6,73	0,28	38	5,5	sn	sn	sn
Silicatos	G, E, P, PC	< 4,76	0,395	39	0,55	sn	sn	sn
Carbonatos	G, E, P, PC	< 2,98	0,97	51	2,15	sn	sn	sn
Polímeros Orgânicos	G, E	0,25 - 1,19	0,15	50	14,75	sn	sn	sn
Trocadores de cátions	G, E, P, FF	sn	sn	sn	sn	3 - 100	< 150	0 - 14
Trocadores de ânions	E, P, FF	sn	sn	sn	sn	08 - 20	< 100	0 - 14

Formas: G = grânulos; E = esferas; P = pó, PC = pelotas cilíndricas; FF = flocos fibrosos.

sn = sem notação

Capacidade de adsorção base seca kg.kg⁻¹

Capacidade de adsorção base úmida kg.L⁻¹

São vários os caminhos utilizados na obtenção de adsorventes dependendo para isso da forma e características finais que o adsorvente deva possuir. No caso das microesferas de quitosana os métodos mais utilizados são: gelificação ionotrópica com cargas opostas, coacervação simples ou complexa, emulsificação com evaporação por solvente e secagem por atomização ("spray drying"). O uso desses métodos depende de características como: a distribuição de tamanho do adsorvente e seu uso final (Huang *et al.*, 2000).

3.4 Fundamentos da Adsorção

A adsorção é um fenômeno de superfície em que uma quantidade finita de moléculas de um fluido (adsorbato), adere à superfície de um sólido (adsorvente). As interações entre as duas fases são responsáveis pela separação do componente de interesse. Pode ser classificada como adsorção química ou física dependendo da intensidade das forças envolvidas. A adsorção física envolve forças do tipo não covalente, resultado da sobreposição de várias interações. Na adsorção química, as forças envolvidas no fenômeno são do tipo covalente, ocorrem entre adsorbato e adsorvente, e os efeitos interativos provocados por essas ligações, envolvendo os sítios ativos e os íons do adsorbato, ocorrem quase sempre na superfície do adsorvente (Adamson, 1990).

No estudo da adsorção, o conhecimento das propriedades de equilíbrio e de cinética é fundamental para determinação das características de processo e da escolha do adsorvente. Um sistema adsorbato-adsorvente está em equilíbrio quando não há mais variações na concentração do adsorbato no meio em estudo. Na obtenção dos dados de equilíbrio é possível escolher dois caminhos. O método de banho finito e o método dinâmico.

Ao se comparar o desempenho de sistemas de adsorção, alguns parâmetros têm importância fundamental, tais como a estabilidade química do sistema, a composição do meio, a capacidade máxima de adsorção do adsorvente (q_m) e a constante cinética de dissociação do complexo: molécula de interesse e adsorvente (K_d).

3.4.1 Métodos de Adsorção

3.4.1.1. Tanque agitado

O método do banho finito (tanque agitado) utiliza uma série de frascos, na forma mais apropriada ao experimento, com diferentes concentrações do adsorbato, em contato com certa quantidade de adsorvente. O sistema tem valores de temperatura, pH e agitação controlados durante o experimento até que se atinja o equilíbrio. Após equilíbrio, as amostras são analisadas quanto ao adsorbato remanescente na fase fluida (Pereira, 1999).

O balanço de massa da Equação 1 é usado para determinar a quantidade adsorvida partindo de uma concentração inicial de adsorbato.

$$Q = \frac{V(C_f - C_i)}{m} \quad (1)$$

Onde Q é a massa adsorvida de adsorbato por grama de adsorvente, V é o volume da solução, C_i é a concentração inicial de adsorbato, C_f é a concentração final de adsorbato no equilíbrio e m é a massa úmida de adsorvente.

Equilíbrios de fases podem ser representados por isotermas, curvas que relacionam os dados de concentração da fase adsorvida no equilíbrio e a concentração remanescente de adsorbato na fase fluida. Alguns modelos matemáticos podem ser usados com o objetivo de descrever esses dados obtidos.

A cinética de adsorção fornece o tempo necessário para que esse equilíbrio seja atingido. Os valores obtidos são influenciáveis pelos parâmetros da fase fluida, características geométricas do adsorvente, velocidade de agitação, temperatura e solvente da fase fluida. Existem vários modelos matemáticos que podem ser usados para descrever o comportamento cinético do sistema adsorbato-adsorvente em estudo.

A capacidade de adsorção obtida em um experimento pelo método do banho finito é importante por fornecer informações sobre a eficiência do sistema adsorbato-adsorvente.

3.4.1.2. Colunas de adsorção

Os processos de adsorção em leito fixo são usados industrialmente com diferentes objetivos (Rodrigues e Dias, 2005):

- Purificação de efluentes;
- Recuperação de solutos;
- Separação de componentes em uma mistura.

Um processo de adsorção em leito fixo envolve normalmente um ciclo constituído por etapas de saturação ou carga, lavagem, dessorção, e regeneração.

O método dinâmico consiste em percolar uma fase móvel contendo a molécula de interesse através de uma fase estacionária. Todos os componentes da solução, sob esta condição experimental, que não têm afinidade pelo conjunto matriz-ligante passam sem retenção. Entretanto, as moléculas que possuem afinidade pelo ligante ficam adsorvidas. A lavagem consiste na exclusão de moléculas indesejáveis por lavagem do complexo com o tampão de corrida. A eluição é a dessorção do complexo, por mudanças das condições do meio, por mudança de pH, força iônica, temperatura ou por agentes dissociantes que interferem na reversibilidade da interação proteína-ligante e finalmente a regeneração que é a recuperação do adsorvente por lavagem com tampão e/ou solução alcalina. Pode ser empregado utilizando uma coluna de leito fixo, preenchida pelo adsorvente a ser utilizado. A coluna é submetida à fase fluida em diferentes concentrações de adsorbato. A concentração na saída da coluna é monitorada ao longo do tempo. A resposta à variação da concentração fornece os

dados sobre o equilíbrio entre adsorbato adsorvido e o adsorbato da fase inicial contido na fase fluida. A curva é conhecida como curva de ruptura do sistema adsorbato-adsorvente (James, 1994).

Os fatores que governam o funcionamento de uma coluna de adsorção podem ser classificados em:

- ❖ Fatores de equilíbrio;
- ❖ Fatores cinéticos (dispersão axial/radial, transferência de massa no filme, transferência de massa intraparticular, transferência de calor).

O modelo de equilíbrio em coluna de adsorção baseia-se na hipótese de equilíbrio instantâneo entre fluido e sólido em qualquer ponto do leito (ou transferência de massa infinitamente rápida entre fluido e adsorvente), escoamento pistão do fluido, queda de pressão desprezível, operação isotérmica e sistema diluído.

A curva de ruptura apresenta forma sigmoideal típica. A concentração inicial do adsorbato na saída da coluna é inicialmente nula, indicando que o adsorbato está sendo totalmente adsorvido pelo adsorvente fixo presente no leito. Quando começa a ocorrer à saturação do sistema, o adsorbato começa a passar pelo leito sem ser adsorvido. A curva tem a sua elevação até a saturação total do adsorvente quando a concentração do adsorbato na saída é a mesma concentração na fase inicial (Chase, 1984A, Chase, 1984B).

O balanço de massa utilizado para os cálculos é mostrado na Equação 2.

$$Q = \frac{C_i(V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C dv}{m} \quad (2)$$

Em que, a integral representa a área sob a curva, V_f é o volume da solução injetada até que C_f seja igual a C_i , V_m é o volume morto no sistema que corresponde ao volume ocupado inicialmente pela solução nos tubos de entrada e entre as partículas do adsorvente.

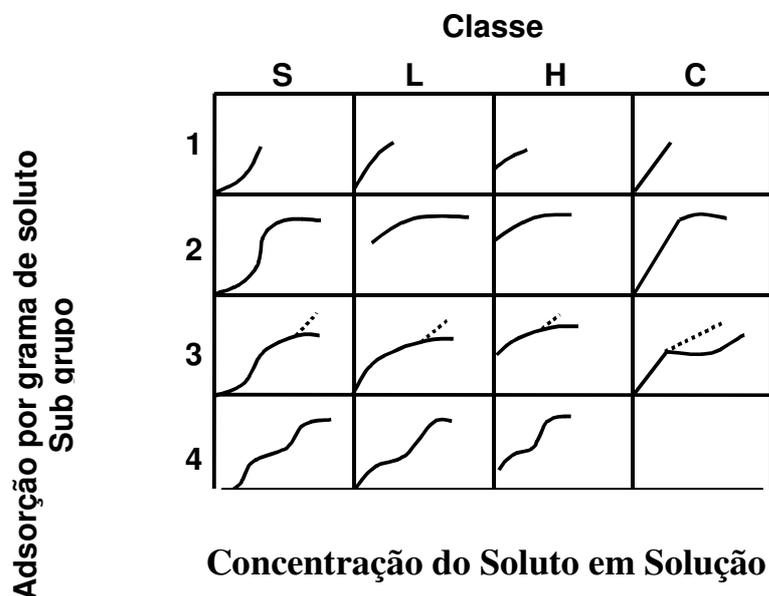
3.4.2 Modelos de Adsorção

Na adsorção de proteínas alguns modelos de isothermas são mais utilizados. O modelo clássico de Langmuir descreve o equilíbrio da adsorção da maioria dos sistemas, desde que sejam respeitadas como verdadeiras algumas limitações (Langmuir, 1916):

- Adsorção reversível e limitada em apenas uma camada;
- A superfície interna do sólido é homogênea;
- As moléculas adsorvidas não interagem entre si;
- Não existe adsorção competitiva;
- Cada molécula é adsorvida em apenas um único sítio de adsorção;
- Os sítios são energeticamente equivalentes.

Os principais modelos de adsorção e suas respectivas curvas, resultantes do comportamento dos dados experimentais, estão representados no sistema SSA (para adsorção de soluto sólido) e descritos na Tabela 2 (*Giles et al.*, 1974). O sistema SSA é dividido em quatro classes: curva S, curva L ou isoterma de Langmuir, curva H ou "alta afinidade" e curva C "partição". A classe S indica orientação vertical das moléculas do adsorbato sobre a superfície. A classe L indica que as moléculas são adsorvidas completamente ou algumas vezes os íons são adsorvidos verticalmente, com forte atração intermolecular. A classe H ocorre quando solutos são adsorvidos como micelas iônicas ou ocorre troca iônica, sendo que os íons com baixa afinidade são trocados pelos de alta afinidade. E na classe C a curva é linear e ocorre quando o soluto penetra no poro mais facilmente.

Tabela 2: Principais modelos de adsorção de acordo com Giles e colaboradores, 1974.



As classes ainda se dividem em subgrupos de acordo com a formação de patamares e aclives. Na classe 1 ocorre a formação apenas de aclave. Na classe 2 ocorre a formação de um aclave seguido de um patamar com a formação teórica de uma monocamada completa. Na classe 3 a monocamada não é completamente formada, pois ocorre a formação de um segundo aclave. Na classe 4 há dois aclives e dois patamares.

3.4.3 Eluição

Com a saturação do adsorvente é necessário realizar a dessorção do adsorbato. O método consiste inicialmente em sucessivas lavagens para remoção da fase fluida que ainda está em contato com a matriz adsorvente e posterior utilização de eluentes específicos para o sistema em estudo. A porcentagem de adsorbato recuperada em relação ao adsorbato adsorvido está condicionada ao tipo de interação ocorrida e a eficiência do eluente.

Após a recuperação do adsorbato pelo eluente o adsorvente pode ser teoricamente reutilizado, após passar pela fase de regeneração, sendo reutilizado em número de vezes limitado devido as suas características iniciais e sua capacidade de adsorção.

3.4.4 Adsorção de proteínas

As etapas envolvidas no processo de adsorção e dessorção das proteínas em tanque agitado ou coluna de leito fixo são mostradas na Figura 6.

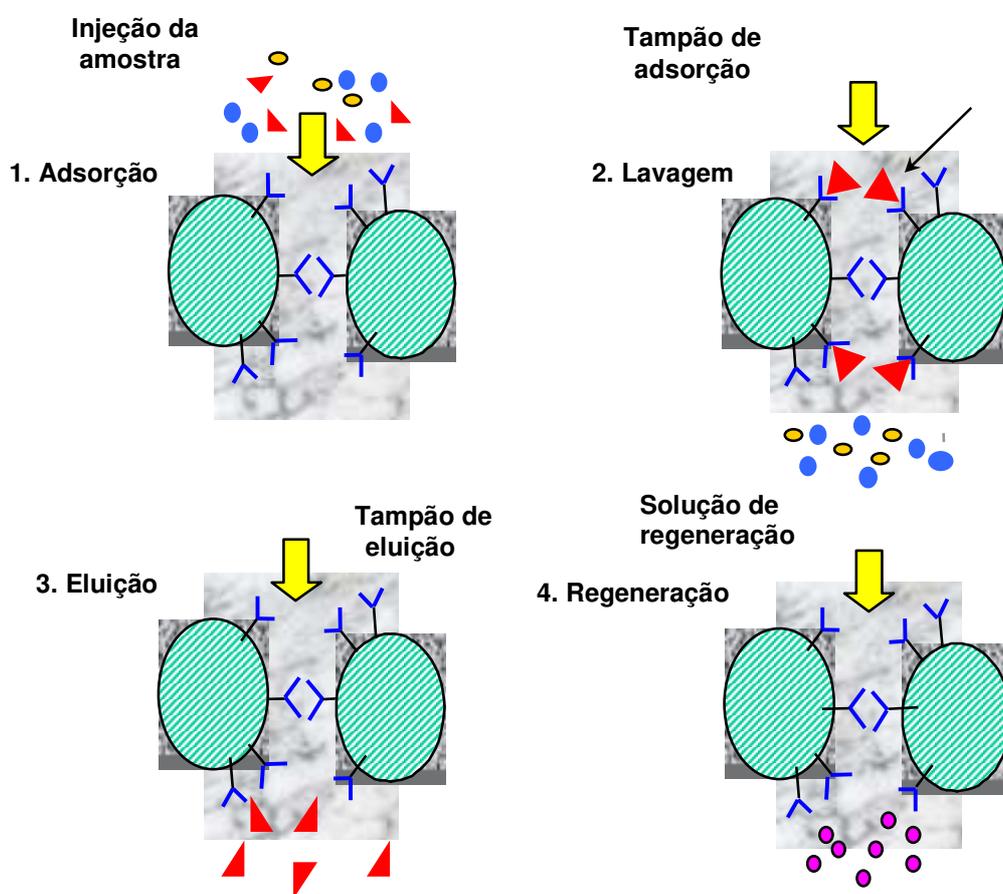


Figura 6: Etapas envolvendo a adsorção e dessorção de proteínas.

As interações bioespecíficas entre proteínas e ligantes envolvem o reconhecimento da molécula alvo pelo sítio de adsorção e o ajuste dessa molécula à posição mais adequada através de interações entre o ligante e os resíduos de aminoácidos das proteínas. A complementaridade da interação é por meio da

estrutura adsorbato-adsorvente, que permite a ligação da molécula ao ligante por ligações covalentes e/ou não covalentes. A conformação espacial da molécula alvo em relação ao ligante ou sítio de adsorção tem papel fundamental na intensidade das interações bioespecíficas (Nogueira, 1999).

3.5 Proteínas

Inúmeros bioprodutos com novas aplicações nas áreas científica e industrial têm recebido atenção cada vez maior dos pesquisadores, já que o consumo desses materiais tem aumentado muito nos últimos tempos. Entre esses bioprodutos, resultantes de processos biotecnológicos, destacam-se as proteínas, com suas propriedades enzimáticas, terapêuticas e diagnósticas. As proteínas são substâncias complexas presentes em todos os organismos vivos, possuem grande valor nutricional e estão sempre envolvidas em processos químicos essenciais para a vida de todos os organismos. Sua importância foi reconhecida pelos químicos no começo do século XIX.

Compostos heteropoliméricos, as proteínas variam do tamanho de 6KDa a 1000KDa. As fontes desses bioprodutos são biológicas, transgênicas ou não transgênicas.

A característica comum a todas as proteínas consiste na longa cadeia de aminoácidos. A estrutura geral dos α -aminoácidos é mostrada na Figura 7, formada pelos grupos amino ($-\text{NH}_2$) e carboxílico ($-\text{COOH}$) ligados ao carbono- α da cadeia (Lehninger, 1993).

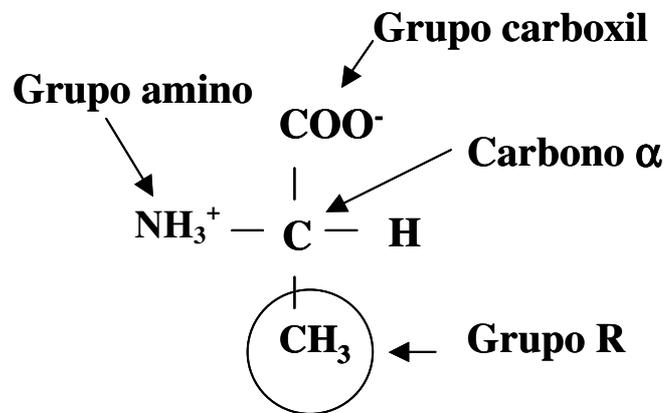


Figura 7: Estrutura básica dos aminoácidos.

Os 20 aminoácidos existentes na natureza e utilizados como monômeros na síntese das proteínas possuem comportamento ácido-base. Os aminoácidos que compõem as proteínas diferem entre si sempre no grupo R das cadeias protéicas, com variações de estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água. Quando em solução aquosa os aminoácidos estão ionizados. A glicina, como exemplo, o aminoácido mais simples, possui no lugar do seu radical o átomo de hidrogênio. As propriedades físico-químicas das proteínas são determinadas pelas propriedades dos próprios aminoácidos formadores de sua cadeia. Dependendo do aminoácido seu caráter pode ser hidrofílico ou hidrofóbico. Podem ser totalmente não polares ou hidrofóbicos, até polares ou hidrofílicos, sendo os grupos R polares classificados em: grupos R não carregados, grupos R carregados negativamente com caráter ácido (carga líquida negativa em pH = 7, presença maior de grupos carboxílico) e grupos R carregados positivamente com caráter básico (carga líquida positiva em pH = 7, presença maior de grupos amino). Dependendo do pH do meio podemos ter determinadas formas iônicas predominantes. Como o carbono- α , é um centro quiral, com exceção da glicina, é assimétrico, podemos ter quatro diferentes átomos ou moléculas ligadas a esse grupo (Lehninger, 1993).

As moléculas de proteínas consistem de uma longa cadeia de resíduos de aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (ligações covalentes). Os resíduos não são mais aminoácidos, pois perderam um átomo de hidrogênio do grupo amino ou do grupo carboxílico. Essa longa cadeia de seqüência de grupos R ligados covalentemente é chamada de estrutura primária das proteínas. O arranjo espacial desses grupos na cadeia peptídica, formando ângulos entre si, é chamado de estrutura secundária (IUPAC-IUB, 1970). Existem dois tipos comuns de estruturas secundárias nas proteínas: α -hélice e β -conformação. A estrutura terciária consiste na distribuição espacial de todos os átomos presentes na cadeia de aminoácidos, mostrando como as cadeias polipeptídicas das proteínas estão formadas, podendo, por exemplo, ser esféricas ou globulares compactadas. Essas cadeias podem possuir grupos carregados positivamente ou negativamente, polares ou apolares. Os grupos R hidrofóbicos normalmente situam-se no interior da conformação globular, evitando assim a exposição à água e permitindo a solubilidade da proteína. A estrutura quaternária das proteínas designa o arranjo mútuo das cadeias subunitárias, isto é, como elas estão reunidas e distribuídas tridimensionalmente na conformação nativa das proteínas oligoméricas.

O estudo da estrutura das proteínas forneceu a base para começarmos a entender a vida em termos moleculares. A primeira proteína que teve sua estrutura determinada foi a lisozima em 1959 e pode ser consultada no banco de dados de estruturas (*Protein Data Bank*) (www.rcsb.org/pdb/). A principal técnica para resolução da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas tem sido a cristalografia por difração de raios-X, e, até hoje, é a principal técnica para investigação da estrutura tridimensional das proteínas (Blow *et al.*, 1969).

No caso de proteínas, a solubilidade é definida pelas características do solvente. Como o solvente consiste usualmente de água a qual foram adicionadas diversas substâncias químicas para levar a solução até um dado pH (tampão) e até um valor de força iônica (sais), estes compostos podem afetar a solubilidade da proteína diretamente, pela interação com diferentes grupos funcionais e, eventualmente, modificando a conformação da macromolécula. Trabalhar em diferentes condições de tampão e sais é como trabalhar com uma proteína diferente do ponto de vista físico-químico (Lehninger, 1993).

A presença de cargas positivas ou negativas nas cadeias laterais das proteínas faz com que seu comportamento se aproxime de aminoácidos isolados em um campo elétrico. O ponto isoelétrico das proteínas corresponde ao valor do pH no qual o peptídeo apresenta carga líquida nula. A Tabela 3 apresenta a distribuição das cargas nas proteínas e no adsorvente estudado de acordo com o seu pH em meio aquoso.

Tabela 3: Distribuição das cargas na quitosana e nas proteínas estudadas.

pHs	Quitosana (grupos amino) cargas	BSA	Lisozima
pH > 11	negativa*	negativa	negativa
pH = 11	negativa*	negativa	nula
6,5 < pH < 11	negativa*	negativa	positiva
pH = 6,5	nula	negativa	positiva
4,7 < pH < 6,5	positiva	negativa	positiva
pH = 4,7	positiva	nula	positiva
pH < 4,7	positiva	positiva	positiva

* De acordo com os dados de pH_{zpc} .

3.5.1 Interações das proteínas com macromoléculas

A adsorção de proteínas em matrizes poliméricas é uma questão de interesse em vários processos. O fenômeno de adsorção envolve a molécula alvo, chamada de adsorbato, o adsorvente fixo ou em suspensão, a disponibilidade de sítios de adsorção e diversos tipos de interação. As interações entre as proteínas e os adsorventes são combinações de forças intermoleculares importantes na compreensão dos eventos de adsorção que ocorrem muitas vezes em ambientes

complexos. Além disso, as características do solvente presente no meio são de fundamental importância (Branden e Tooze, 1991).

Importantes avanços têm sido feitos envolvendo processos e etapas de separação-purificação dessas macromoléculas, a partir de sua produção nas mais diversas fontes. Entre as várias propriedades importantes no tratamento e nas etapas de separação-purificação das proteínas, algumas se destacam:

- Tamanho;
- Forma;
- Carga;
- Hidrofobicidade;
- Solubilidade;
- Função.

A proteína é um polímero de aminoácidos enovelados em uma estrutura tridimensional, principalmente por interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio ($C=O\dots H-N$), por interações de van der Waals; por algumas ligações covalentes (pontes S-S); e eventualmente por pontes salinas ($-COO^- \dots H_3N^+$) entre resíduos carregados. Proteínas apresentam as cadeias laterais hidrofóbicas preferencialmente no seu interior enquanto as cadeias laterais hidrofílicas se localizam principalmente na sua superfície. Desta forma as proteínas podem ser consideradas como polieletrólitos capazes de se dissolverem em água. A estabilidade das proteínas em solução baseia-se na competição entre as interações solvente-soluto com interações intramoleculares, necessárias para manter a estrutura das proteínas (Hidalgo e Hansen, 1969).

A possibilidade de interações entre o adsorvente e as proteínas em um ambiente complexo de adsorção envolve a sobreposição de interações, conforme mostrada na Figura 8, (Friedli, 2005).

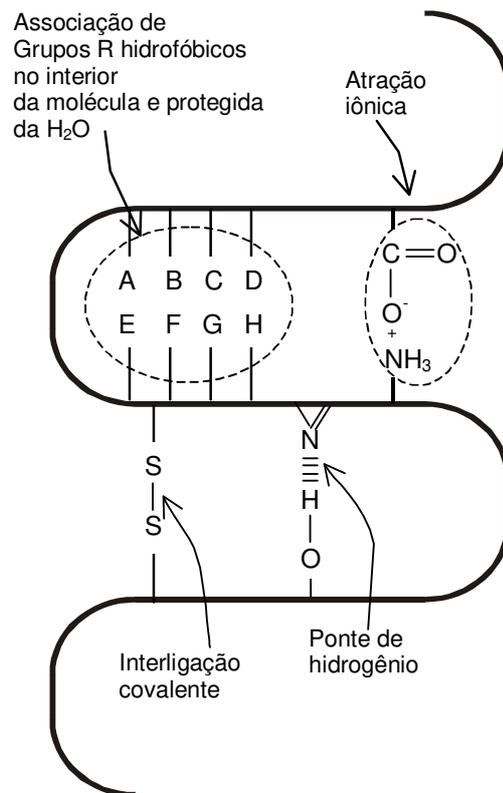


Figura 8: Esquema com as possíveis interações observadas entre proteínas-proteínas e proteínas-biopolímeros.

➔ Interações não covalentes:

- Incluindo interações de van der Waals;
 1. Dipolo-Dipolo, como as ligações de hidrogênio;
 2. Dipolo – Dipolo induzido, como H₂O + I₂;
 3. Forças de dispersão incluindo Dipolo induzido – Dipolo induzido, como o exemplo entre dois hidrogênios alifáticos;
- Interações eletrostáticas ou pontes salinas entre resíduos carregados;
- Forças hidrofóbicas entre resíduos não polares;

Interações eletrostáticas entre grupos carregados são de importância fundamental na estrutura das proteínas, na ligação entre substratos e proteínas, e

nas interações entre proteínas com resíduos (Schulz e Schimer, 1990). A água é um excelente exemplo de molécula polar, uma molécula com pólos elétricos positivos e negativos. A ligação de hidrogênio é uma forma especial de atração dipolo – dipolo muitas vezes presente nas interações envolvendo proteínas. A interação tipo van der Waals é de grande importância em qualquer processo de adsorção envolvendo qualquer biopolímero. A interação hidrofóbica descreve a repulsão e estabilização dos grupos não polares presentes nas moléculas hidrofóbicas e os grupos polares presentes na superfície da água.

➔ Interações covalentes:

Em uma ligação entre átomos ligados covalentemente a estrutura inicial e natural desses compostos é alterada por completo. Dependendo da posição do átomo na tabela periódica, ele pode participar de certo número de ligações covalentes. Existem dois tipos de ligações covalentes envolvendo apenas as proteínas, ligações peptídicas e pontes dissulfito. E existem inúmeras ligações covalentes entre proteínas e biopolímeros.

➔ Interações proteína-proteína:

Interações proteína-proteína ocorrem amplamente. Elas podem envolver interações específicas ou não específicas. Numerosos exemplos de ligações não específicas podem ser observados em sistemas biológicos. Entretanto, só uma pequena seleção de moléculas está envolvida em ligações específicas, (Schmidt e Illingworth, 1978). Interações proteína-proteína são geralmente favorecidas sob condições de redução da carga líquida das moléculas com valores perto do ponto isoelétrico. Fundamental para a estabilização da ligação entre proteínas é a interação hidrofóbica. O termo interação hidrofóbica é usado para descrever o ganho em energia livre dos resíduos não polares de proteínas associadas em um ambiente aquoso (Stainsby, 1980). Interações entre proteína-proteína e proteína-polissacarídeo sob estas circunstâncias são não específicas como nos sistemas biológicos.

➔ Interações proteína-polissacarídeo:

Nas interações proteína-polissacarídeo existem evidências indicando que as forças de maior impacto nessas interações sejam de natureza eletrostática

(Tolstoguzoy, 1986), mas outras interações como pontes de hidrogênio, hidrofóbicas ou ligações covalentes podem ser significativas na estabilização dessas interações.

Para a determinação do grau de biocompatibilidade entre adsorbato e adsorvente, é importante conhecer as propriedades das proteínas e seus comportamentos nas interfaces. Isso é possível através do estudo das interações entre as proteínas e as superfícies com suas diversas camadas. As propriedades físico-químicas que caracterizam as superfícies de contato, citadas a seguir, são de grande importância no entendimento dos fenômenos de transferência de energia e de massa entre as diversas camadas (Watenpaugh *et al.*, 1979).

→ Composição da superfície (polaridade, potencial hidrogeniônico, carga iônica, pontes de hidrogênio, biomoléculas imobilizadas);

→ Movimentos moleculares de superfície;

→ Irregularidade da superfície;

→ Tendência a biodegradação;

→ Cristalinidade ou amorficidade da superfície.

3.5.2 A proteína albumina de soro bovino - BSA

A proteína albumina do soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais amplamente estudadas, e, também, uma das proteínas mais abundantes do plasma, com concentração típica de 5 g.100 ml⁻¹. São diversos os estudos sobre a estrutura e as propriedades dessa proteína assim como suas interações com outras proteínas. Esses estudos têm como um dos objetivos o entendimento de como essa proteína afeta a funcionalidade dos alimentos. Como proteína multifuncional de transporte, o BSA tem papel fundamental na reserva de óxido nítrico, o que implica diretamente em grande e importante número de processos fisiológicos incluindo os neurotransmissores (Clark *et al.*, 1982).

A Albumina é usualmente relacionada com albumina do soro ou albumina do plasma. A palavra albumina é usada para descrever a proteína ou grupo de

proteínas, sendo definida pela sua característica de solubilidade em água. A albumina é a proteína mais abundante do sistema circulatório e contribui com 80 % da pressão sanguínea osmótica coloidal. Foi determinado, há pouco tempo, que a albumina do soro, é, sobretudo, responsável pela manutenção da pressão sanguínea. A albumina é sintetizada, inicialmente, como pré-albumina, pelo fígado. Depois da remoção de qualquer peptídeo sinal, da resultante pró-albumina, são removidos seis resíduos de pró-peptídeos do novo terminal N. A albumina obtida é liberada dentro do processo circulatório com uma meia vida de 19 dias (Wright, 1973).

Baseado, sobretudo, em experimentos hidrodinâmicos (Ziegler e Foegeding, 1990) e mapeamento de raios-X a baixos ângulos, a albumina do soro foi descrita como sendo um elipsóide com dimensões de 140 x 40 Å.

Estudos preliminares através da técnica de cristalografia de raios-X (Carter *et al.*, 1989) indicaram que a estrutura secundária da albumina de soro bovino possui aproximadamente 55 % da estrutura na forma de α -hélice e 45 % na forma randômica.

A composição da cadeia de aminoácidos da BSA está na Tabela 4 (Brown, 1975).

Tabela 4: Composição da cadeia e o número de aminoácidos da BSA.

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

A estrutura da proteína BSA não é uniformemente carregada, conforme é possível verificar em suas estruturas clássicas, Figura 9.

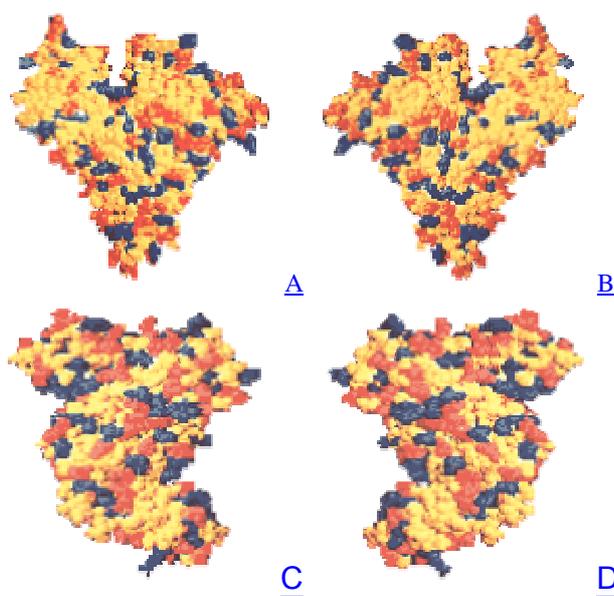


Figura 9: Estruturas padronizadas A, B, C e D da proteína BSA.

Nesse modelo verificam-se resíduos básicos, ácidos e neutros, nas diferentes intensidades de cor. O ponto isoelétrico da proteína BSA é 4,8.

As interações da proteína BSA com outros agentes dependem de características de viscosidade, massa molecular, tamanho, volume, forma, carga superficial e deformação (Bull, 1940). Essas características são afetadas pelo pH do meio, temperatura, força iônica, taxa de cisalhamento, e moléculas presentes no meio (Tung, 1978).

Suas conformações, apresentadas na Figura 10, dependem das características intrínsecas citadas.

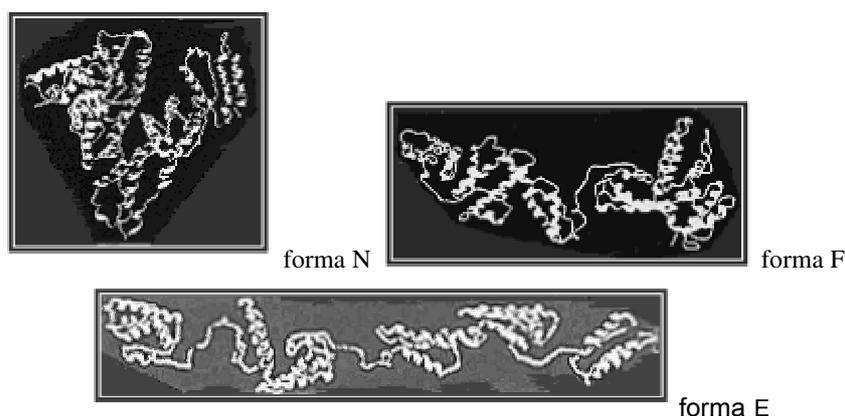


Figura 10: Conformações da proteína BSA encontradas nas formas N, F e E.

Uma importante habilidade das proteínas BSA é a sua capacidade de ligação reversível com grande variedade de ligantes (Goodman, 1958; Burke *et al.*, 1971; Jacobsen, 1977; Roda *et al.*, 1982).

3.5.3 A proteína lisozima

A lisozima é uma enzima encontrada na clara de ovo, na lágrima e em outras secreções. Foi descoberta por Alexander Fleming em 1922 durante a realização de pesquisas com o intuito de descobrir novos antibióticos. Durante anos ele manipulou uma série de substâncias com objetivo de inibir o crescimento de culturas de bactérias; acidentalmente, durante uma gripe, percebeu que a contaminação do seu próprio muco tinha funcionado no combate as bactérias. A lisozima é responsável pela quebra ou clivagem hidrolítica de polissacarídeos complexos presentes na parede celular de algumas famílias de bactérias (Fleming, 1945). O nome lisozima é devido ao poder de lisar, ou dissolver, a parede celular bacteriana e assim servir como agente bactericida. Esta característica antibacteriana determina a sua importância na proteção a muitos tipos de infecção, agindo como catalisador, ela promove a hidrólise da cadeia quebrando a ligação glicosídica e destruindo a integridade estrutural das paredes celulares dessas bactérias.

A lisozima é uma proteína globular, compactamente enrolada e que tem a maioria de seus grupos R hidrofóbicos voltados para o interior da macromolécula, protegidos da água, e a maioria dos seus grupos hidrofílicos voltados para a superfície de contato com o exterior. Sua estrutura primária é mostrada na Figura 11, formada por uma cadeia peptídica de 129 aminoácidos. Sua estrutura tridimensional globular de 26 x 45 Å é bem menor comparativamente ao tamanho da proteína BSA (Qasba e Kumar, 1997).

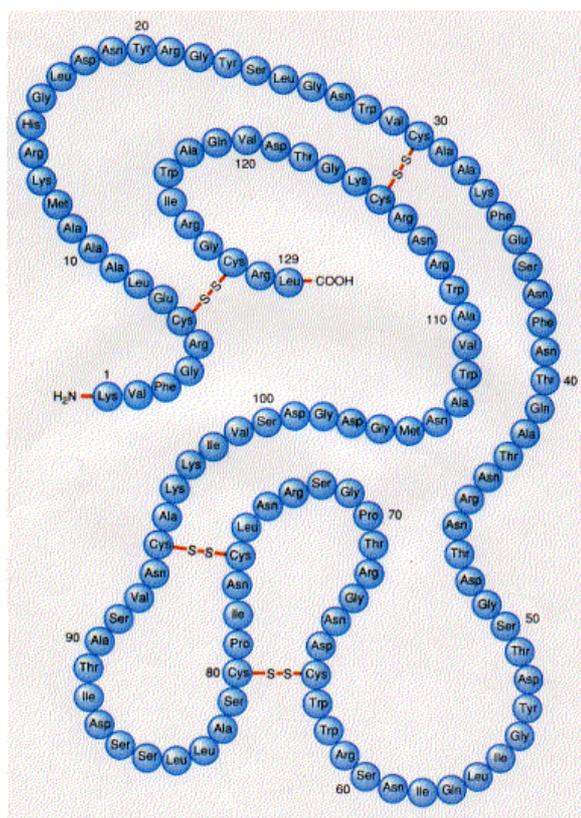


Figura 11: Estrutura primária da proteína lisozima.

Sua estrutura terciária clássica é mostrada na Figura 12. Perto de 40 % dos seus 129 resíduos de aminoácidos estão em segmentos na forma de α -hélice e delimitam uma longa fenda em um dos lados da molécula. Esta fenda é o sítio catalítico da enzima (Duarte *et al.*, 1999).

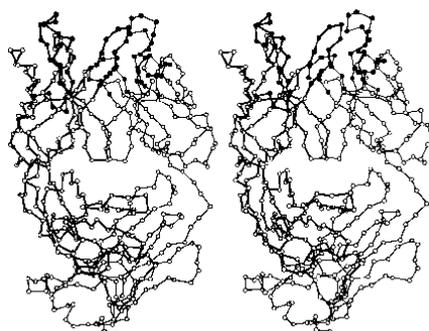


Figura 12: Estrutura terciária estereoscópica da proteína Lisozima.

Resultados importantes obtidos com a proteína BSA e a lisozima com outros tipos de adsorventes já foram relatados e alguns deles estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos em trabalhos de referência envolvendo as proteínas BSA e lisozima e outros adsorventes.

Adsorvente	Adsorbato	q_m (mg.mL ⁻¹)	Método	Autores
Spharose CL-6B	BSA	14	Tanque agitado	Chase, H.A .
Spharose CL-6B	Lisozima	14	Tanque agitado	Chase, H.A .
PHEMA	Lisozima	9,98	Tanque agitado	Bayramoglu, G., et al.,
Celulose	Lisozima	364	Tanque agitado	Bayramoglu, G., et al.,
Silica porosa	Lisozima	30	Tanque agitado	Bayramoglu, G., et al.,
HEMA	Lisozima	79,1	Tanque agitado	Bayramoglu, G., et al.,
Carboximetil-Quit	BSA	68,05	Tanque agitado	Zhao, Z.P., et al.,

3.5.4 Um concentrado protéico

Um aspecto interessante da operação de adsorção é a capacidade de concentrar produtos, o que é relevante em aplicações biotecnológicas onde há uma relação entre o preço de um produto e a concentração desse produto na solução de onde será extraído. Um grupo de proteínas com potencial para tratamento em leite fixo é aquele resultante das proteínas do soro de leite, relativo a produção do queijo. A separação das proteínas do soro do leite pode ser

alcançada utilizando técnicas preliminares de filtração e precipitação em conjunto com a adsorção (Noppe *et al*, 1998). A composição natural do soro de leite é rica em lactose (4-4,5 %), proteínas (0,7-0,9 %) e possui pequenas quantidades de ácidos orgânicos, lipídeos e sais minerais.

As proteínas encontradas no soro do leite bovino são: α -lactalbumina (α -La), proteína hidrofóbica composta por 123 resíduos de aminoácidos com massa molecular próxima de 14 kDa e ponto isoelétrico de 4,8 representando 20 % do total de proteínas presentes no soro de leite bovino; β -lactoglobulina proteína constituída de 162 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 18,3 kDa e ponto isoelétrico de 5,4 representando 50 % do total de proteínas, albumina do soro bovino - BSA presente no leite em concentrações próximas de 0,1 a 0,4 g.L⁻¹ e lisozima encontrada em concentrações menores, mas também presente.

Vários trabalhos de purificação de proteínas do soro do leite relatados na literatura envolvem as técnicas de precipitação, extração, ultrafiltração, eletrodialise, cromatografia por troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade e filtração em gel. Yoshida, 1990, separou as proteínas do soro do leite em cinco frações através da técnica de filtração em gel usando a resina Sephacryl S-200. Veredas, 2000, separou a α -La utilizando cromatografia por troca iônica e interação hidrofóbica, com resinas sintéticas, sendo que as resinas por troca iônica alcançaram resultados de adsorção muito superiores quando comparados às resinas de interação hidrofóbica.

4. MATERIAS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais e métodos utilizados no decorrer do trabalho.

4.1 Preparação das microesferas de quitosana

4.1.1 Preparação da solução concentrada de quitosana

Amostras com 2,5 % em massa de quitosana, material adquirido da Sigma (E.U.A) com no mínimo 85 % de grau de desacetilação, foram preparadas através da dissolução em solução de ácido acético (contendo 3 mL de ácido acético e 97 mL de água deionizada).

Os flocos hidratados em meio ácido foram dispersos com agitações periódicas e mantidos em repouso por 3 dias em temperatura de 5°C até completa solubilização. Após isso, a solução concentrada de quitosana (Torres e Santana, 2001) foi mantida à 5°C para utilização por no máximo 1 mês.

4.1.2 Preparação das microesferas pelo método de atomização e coagulação

Para obtenção das microesferas de quitosana foi utilizado o método de atomização e coagulação. As etapas são mostradas na Figura 13.

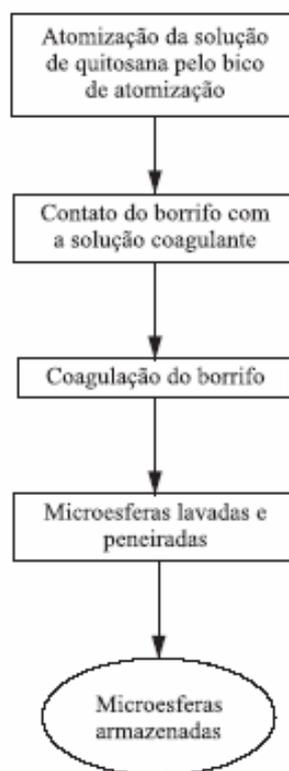


Figura 13: Fluxograma da produção de microesferas.

O sistema utilizado para a preparação das microesferas é mostrado na Figura 14, Arruda, 1999. Na condição otimizada, a solução concentrada de quitosana foi bombeada na vazão de $9,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando uma bomba peristáltica (modelo Cole Parmer) através de linha de silicone até o bico de atomização (Spraying System JBC) com abertura de 1,0 mm. A atomização da solução concentrada de quitosana ocorreu a partir do contato com o gás nitrogênio (N_2) sob pressão de $2,5 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$. O borrifo resultante foi disperso em direção à solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M mantida sob agitação lenta. Após o término da atomização, as microesferas permaneceram em contato e em repouso na solução coagulante por 12 horas. As microesferas, então, estabilizadas estruturalmente, apresentaram um aspecto branco opalescente devido ao espalhamento de luz através dos seus poros. As microesferas foram drenadas utilizando-se peneiras de tamanho de malha de 0,035 mm e 0,150 mm com o intuito de selecionar o tamanho das microesferas para a coluna de adsorção. A

fração intermediária foi então lavada com água deionizada e estocada em temperatura de 5 °C.

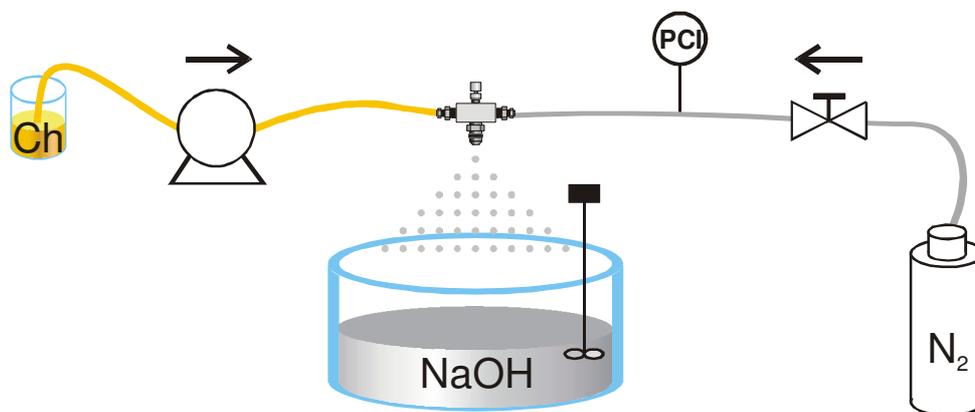


Figura 14: Representação esquemática da produção de microesferas de quitosana pelo método de coagulação e atomização.

Para obtenção das microesferas de quitosana, a câmara de atomização e o bico de injeção foram fornecidos pela Spraying Systems do Brasil Ltda, com especificações SS-Br/JBC, conforme a Figura 15.



Figura 15: Câmara de atomização e bico de injeção utilizados na produção de microesferas de quitosana.

Os parâmetros destacados a seguir, controlados durante o processo, têm fundamental importância nos resultados de homogeneidade dos adsorventes finais.

- ❖ Vazão mássica da solução de quitosana;
- ❖ Pressão do gás nitrogênio;
- ❖ Viscosidade da solução de quitosana;
- ❖ Diâmetro de abertura do bico atomizador;
- ❖ Temperatura da solução de quitosana;
- ❖ Altura entre o bico de atomização e a cuba com a solução coagulante.

Os valores ideais de vazão da solução de quitosana e de pressão de nitrogênio no processo foram definidos através dos diagramas de causa-efeito e da modelagem matemática. A viscosidade (a partir da concentração da solução de quitosana), a temperatura da solução de quitosana, a abertura do bico atomizador e a altura entre bico-cuba foram definidas empiricamente durante os ensaios, levando-se em conta as limitações dos equipamentos.

4.2 Modelagem matemática com planejamento de experimentos

O método estatístico, metodologia por superfície de resposta (RSM), com duas variáveis independentes, pressão do nitrogênio (PN) e vazão da solução de quitosana (VSQ), com 3 níveis, -1, 0, 1, foi usado para estudar as variáveis dependentes: tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio das microesferas (DPM). Foram realizadas três replicatas no ponto central para estimar o erro da metodologia. As coordenadas foram dadas pelo planejamento fatorial 2^2 e grau de confiança de 95 % para estimar a curvatura do modelo através de relações não lineares (Barros Neto, 1996). A Tabela 6 mostra os valores correspondentes aos níveis do planejamento de cada fator. E a Tabela 7 o plano fatorial usado.

Tabela 6: Dados com os níveis e as variáveis do plano fatorial usado na modelagem por superfície de resposta.

Níveis	Variáveis	
	Vazão da solução mL.min ⁻¹	Pressão de nitrogênio kgf.cm ⁻²
-1	5	1
0	7	1,75
1	9	2,5

Tabela 7: Plano fatorial usado na modelagem por superfície de resposta (RSM) para as variáveis de resposta: tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio (DPM).

Número do experimento	VSQ	PN	TMM (μm)	DPM (μm)
1	-1	-1	228	205
2	1	-1	240	223
3	-1	1	281	238
4	1	1	140	119
5	0	0	179	140
6	0	0	186	145
7	0	0	187	152

A análise dos efeitos foi feita utilizando o programa “Statistica”. A validação do modelo proposto, a partir da análise dos efeitos, foi feita através da análise de variância Anova.

4.3 Modificações químicas das microesferas

As microesferas obtidas pela técnica de atomização e coagulação foram modificadas quimicamente com anidrido acético, epicloridrina e glutaraldeído. As microesferas de quitosana foram então separadas conforme a sua estrutura final.

4.3.1 Acetilação das microesferas de quitosana

Na primeira rota, as microesferas foram modificadas usando solução de anidrido acético com 0,6 % em volume em solução de metanol, na temperatura ambiente e agitação contínua por 3 min. Em seguida, as microesferas foram lavadas com metanol para remoção do anidrido acético em excesso.

A acetilação foi realizada sobre a quitosana já moldada na forma de microesferas. Partindo-se das microesferas foi adicionada solução acetilante (2 a 3 mols por resíduo de hexosamina) constituída de anidrido acético diluído em 40 a 50 mL de volume de metanol. O sistema foi mantido em agitação lenta e temperatura ambiente. O grau de substituição dos resíduos de hexosamina foi controlado conforme a Figura 16.

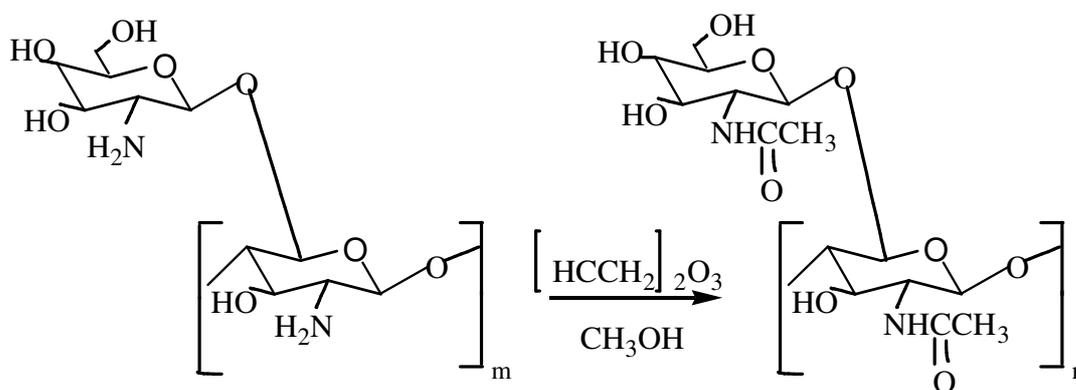


Figura 16: Obtenção da quitina por N-acetilação da quitosana (Kurita , 1998).

4.3.2 Reticulação das microesferas de quitosana com epicloridrina

No processo de reticulação com epicloridrina, 5 g de microesferas úmidas foram imersas em solução de epicloridrina na concentração de 0,01 mol/L. A solução utilizada foi preparada com 0,067 mol/L de NaOH. A solução com as microesferas foi agitada durante 2 h na temperatura de 40 °C. Em seguida, as microesferas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso de reticulante.

4.3.3 Reticulação das microesferas de quitosana com glutaraldeído

Na terceira rota, as microesferas foram reticuladas em solução aquosa de glutaraldeído 0,75 % em massa (5 g de microesferas úmidas em 50 mL de solução de glutaraldeído), sem agitação, na temperatura ambiente por 2 h. Em seguida, as microesferas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso de glutaraldeído.

4.3.4 Denominação das amostras de quitosana preparadas

Os ensaios foram realizados variando-se a amostra de quitosana, dependendo de cada situação, conforme descrição abaixo:

- a-) Para microesferas de quitosana naturais = adsorvente N.
- b-) Para microesferas de quitosana acetiladas = adsorvente MA.
- c-) Para microesferas de quitosana reticuladas com epicloridrina = adsorvente RE.
- d-) Para microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído = adsorvente RG.

4.4 Ensaios realizados para caracterização das microesferas

4.4.1 Titulação potenciométrica

A quantidade de grupos amino protonáveis foi determinada para cada adsorvente através de ensaios de titulação potenciométrica. Nesse método, uma

quantidade conhecida de microesferas (sem modificação ou modificadas) é adicionada a uma solução de HCl (0,02 equiv-g/L), permitindo o carregamento dos grupos protonáveis (grupos amino). Em seguida, a solução resultante é titulada com uma solução de NaOH (0,01 equiv-g/L). Com as curvas de titulação e os respectivos pontos de inflexão é possível determinar o percentual de grupos amino, conforme a Equação 3, (Raymond *et al.*, 1993).

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161}{m} * 100 \quad (3)$$

Em que M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mols/L), V_1 e V_2 são os volumes de NaOH usados respectivamente para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada, 161 é a massa molecular da unidade monomérica da quitosana e m é a massa de amostra utilizada para a titulação em gramas.

4.4.2 Infravermelho (FTIR-ATR)

Nesse estudo foram realizadas análises utilizando-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada a um elemento de reflexão total atenuada (ATR). O espectro foi varrido de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 16 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi FTIR da Nicolet Protégé, com acessório ATR de cristal de germânio.

4.4.3 Técnica de difração por raios-X

Difração de raios-X é uma técnica comum utilizada para o estudo da estrutura de materiais. Um campo de raios-X incidente pode ser parcialmente absorvido, disperso ou transmitido sem modificações. Os resultados da difração são resultantes da interação entre os elétrons presentes no material. Os raios-X difratados sofrem interferência entre si produzindo um padrão de difração que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade dos raios-X espalhados e difratados com o ângulo de incidência fornece informações sobre a

distribuição da intensidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro da estrutura do material (Alexander, 1969). Os adsorventes N, MA, RE e RG foram liofilizados e posteriormente triturados e prensados em suporte apropriado. O espectro foi varrido a uma velocidade de $0,022^{\circ}\text{s}^{-1}$ com incidência de radiação $K\alpha\text{-Cu}$ com $\lambda=1,54.10^{-6}$ m. As medidas foram feitas na faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp, usando como equipamento o Difrátômetro de raios-X Rigato.

4.4.4 Análises térmicas por TGA e DSC

As análises térmicas foram realizadas para observação do comportamento e da estabilidade térmica de cada adsorvente. Devido à especificidade das reações físico-químicas que ocorrem numa curva termogravimétrica definida de temperatura e velocidade, foi possível ter informações sobre a estrutura molecular. Para isso foi utilizado um analisador termogravimétrico TGA7 da Perkin-Elmer. Todas as amostras foram analisadas após liofilização. O aquecimento foi feito em uma razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de $25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Os eventos térmicos foram registrados em função da composição, estrutura do material e de sua história térmica. Para isso foi utilizado um analisador térmico DSC 2920 TA Instruments. O aquecimento foi feito em uma razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até temperatura de 450°C , em atmosfera inerte de nitrogênio, com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.4.5 Análise mecânica por DMA

No nosso caso, os ensaios mecânicos foram realizados com o objetivo de observar apenas a resistência mecânica dos adsorventes, variando a força imposta à amostra no decorrer do tempo. Durante os ensaios, a temperatura permaneceu constante em 25°C . Cada amostra, depois de ter sua dimensão medida, foi colocada em suporte apropriado. As medidas ocorreram em função da deformação observada a partir da compressão das amostras. A rampa de força aplicada durante os ensaios foi de $0,01\text{ N}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises foram realizadas com

o uso do equipamento TA Instruments Dynamic Mechanical Analyser (DMA) 2980 no modo força controlada.

4.4.6 Avaliação da estabilidade química

A estabilidade química ao ácido HCl foi determinada utilizando o mesmo protocolo de determinação do grau de desacetilação da quitosana (Raymond *et al.*, 1993). As microesferas individualmente foram deixadas em repouso durante 24 h em soluções de HCl 0,2 mol/L. Sua solubilidade foi avaliada visualmente e microscopicamente durante esse período. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.7 Distribuição de tamanho das microesferas

A distribuição do tamanho das microesferas foi realizada em triplicata e obtida utilizando o equipamento Mastersize S. A técnica consiste no espalhamento da luz (laser, com comprimento de onda de 488 nm) pelas partículas da amostra, sendo o tamanho inversamente proporcional ao desvio do ângulo da luz espalhada de acordo com a teoria Mie. Essa teoria permite descrever um objeto tri-dimensional (no nosso caso as microesferas) através de um número, utilizando para isso o modelo de uma esfera equivalente. O tamanho médio das microesferas em cada distribuição expresso por $D_{4,3}$ foi usado durante o planejamento de experimentos. A polidispersidade (“span”) foi calculada pela razão $(D_{0,9} - D_{0,1})/D_{0,5}$ com $D_{0,9}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,1}$ representando os respectivos diâmetros médios das microesferas obtidos em 90, 50 e 10 % do conjunto de partículas totais.

4.4.8 Porosidade das microesferas

As microesferas foram testadas com objetivo de caracterizar a porosidade. Para a quitosana e outros biopolímeros, a porosidade pode ser influenciada pelos seguintes fatores: a rota de preparação e as modificações químicas. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de

quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999). Com objetivo de maximizar os valores de porosidade, foram usados altos valores de concentração, aproximadamente 2,5 %, em massa, de quitosana e 1 M de NaOH. A porosidade pode ser estimada usando o método de Zeng e Ruckenstein, 1996, baseando-se apenas na quantidade de água que preenche os poros. A porosidade pode ser calculada pesando as microesferas de quitosana úmidas antes e depois da extração da água, através de vácuo (aproximadamente 250 mmHg) por 30 min. O vácuo é aplicado às microesferas até massa constante permitindo apenas que a água livre e não a água ligada à estrutura seja retirada. A porosidade (ϵ) pode ser estimada pela Equação 4, em que m_1 e m_2 são as massas das microesferas antes e depois da extração da água dos poros, respectivamente, (ρ_w) é a massa específica da água a 20 °C e (v) é o volume das microesferas úmidas. O procedimento foi realizado em triplicata.

$$\epsilon = \frac{\left\{ \frac{(m_1 - m_2)}{\rho_w} \right\}}{v} \cdot 100(\%) \quad (4)$$

4.4.9 Avaliações morfológicas das microesferas

4.4.9.1 Microscopia óptica

Para avaliação morfológica preliminar das microesferas foi utilizado um microscópio óptico Leica DMLM. As microesferas, após liofilização, foram imersas em óleo mineral para facilitar a dispersão e conseqüente visualização. O aumento utilizado foi de 200 x.

4.4.9.2 Esfericidade das microesferas

A esfericidade das microesferas foi calculada usando um método indireto, no qual a esfericidade é obtida pela razão entre o maior diâmetro interno e o menor diâmetro externo das áreas projetadas pelas circunferências das microesferas em um plano estável, como mostra a Figura 17 (Peçanha e

Massarani, 1986). As medidas foram realizadas em dez microesferas e o valor utilizado foi a média, conforme a Equação 5.

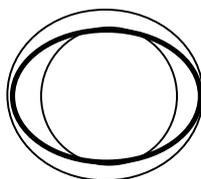


Figura 17: Diâmetro interno e diâmetro externo.

$$\mathfrak{R} = \frac{d_i}{d_c} \quad (5)$$

Sendo d_i o diâmetro interno e d_c o diâmetro externo (mm)

4.4.9.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia superficial das microesferas foi observada usando o Microscópio eletrônico de varredura Jeol. As microesferas foram depois de liofilizadas, cobertas por uma fina camada de ouro (10nm) usando o equipamento Sputter Coater SCD 050 (Baltec, Liechtenstein).

4.4.9.4 Morfologia interna das microesferas de quitosana

Para observação da morfologia interna, as microesferas após liofilização foram envolvidas e endurecidas com resina de poliácridamida. Esse procedimento visou a preservação da estrutura porosa das microesferas e da seção de corte propriamente dita. Após fratura seus cortes foram observados usando MEV com relação as suas estruturas internas e o tamanho dos poros.

4.4.10 Medidas de pH_{zpc}

O pH_{zpc} é freqüentemente empregado como importante parâmetro na avaliação das mudanças eletrostáticas na superfície de polieletrólitos. O procedimento usado no cálculo do pH_{zpc} de todos os adsorventes foi à titulação potenciométrica baseada nas reações ácido-base (Davranche *et al.*, 2003). Para estimar o pH_{zpc} , 2 g de microesferas foram misturadas em 100 ml de solução aquosa de NaNO_3 (p.a). O instrumento potenciômetro DM20 Digimed foi usado para medir as concentrações de $[\text{OH}^-]$ e $[\text{H}^+]$. O total de carga líquida na superfície das microesferas foi obtido através das diferenças entre a adição de ácido e base durante o equilíbrio. O total de carga Q (mol.g^{-1}) foi calculado através da Equação 6.

$$Q = \frac{C_a - C_b + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{C_s} \quad (6)$$

Onde C_a (mol.L^{-1}) e C_b (mol.L^{-1}) são as concentrações de ácido e base e C_s (g.L^{-1}) é a concentração da amostra.

4.5 Ensaio de adsorção e dessorção das proteínas realizados em tanque agitado

O objetivo dessa etapa foi verificar qual dos três tipos de adsorventes propicia maiores níveis de adsorção e dessorção das proteínas BSA e lisozima.

Os ensaios realizados de adsorção e dessorção envolveram as microesferas modificadas quimicamente e os seguintes adsorbatos:

- Proteínas padrão BSA e lisozima;

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores usados são médios.

4.5.1 Calibração das soluções com as proteínas BSA e lisozima

A calibração foi realizada com as soluções protéicas e os respectivos tampões: solução aquosa de fosfato (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4) na concentração de 200 mM e solução aquosa de Tri(hidroximetil)-aminometano na concentração de 400 mM. A concentração inicial de 0,82 g/L foi diluída com os tampões. As concentrações de análise variaram de 0,039 g/L até 0,1890 g/L.

4.5.2 Preparação do concentrado protéico para ser submetido à adsorção em coluna

O concentrado protéico utilizado como extrato real para estudo da adsorção em leito fixo, utilizando as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, é resultante da produção de queijo. O extrato foi produzido e fornecido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas. Os ensaios foram realizados nos pHs de 4,8 e 11, respectivamente, correspondentes aos pHs ótimos encontrados para adsorção das proteínas BSA e lisozima, nos tampões fosfato e "Tris". A solução protéica passou inicialmente por processos de filtração e precipitação simples para remoção de partículas em suspensão. As concentrações iniciais da solução protéica utilizadas nos ensaios foram de 0,7 e 5 mg.mL^{-1} .

O concentrado protéico teve sua curva de calibração medida nos comprimentos de onda 280 e 320 nm, este último para corrigir o valor referente a turbidez da solução.

A curva de ruptura encontrada representou a concentração das proteínas em função do volume injetado. A quantidade total de adsorbato adsorvido nas microesferas foi calculada pela área logo acima da curva compreendida entre a concentração de ruptura e a concentração de exaustão.

4.5.3 Condições e aparato utilizado nos ensaios de adsorção e dessorção em tanque agitado.

Os ensaios foram realizados utilizando o sistema da Figura 18, constituído de seringas de plástico, com êmbolo para remoção da solução e filtro na saída da solução. O sistema foi mantido em agitação constante de 30 rpm em sistema orbital na temperatura de 20 °C.

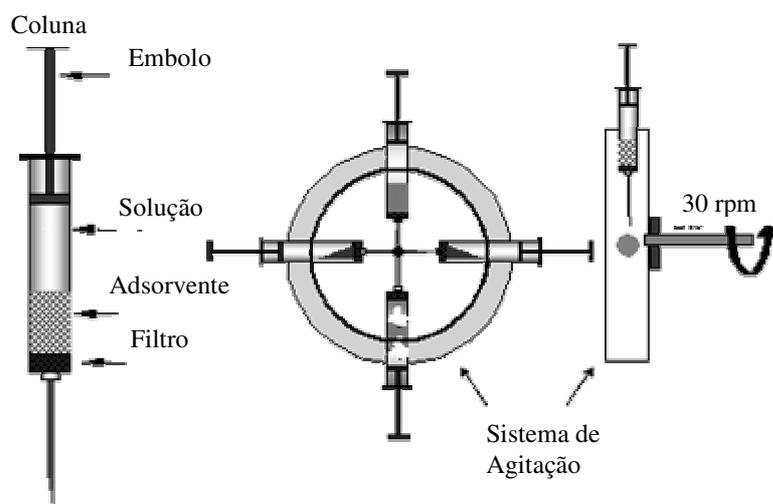


Figura 18: Sistema de frascos utilizado para os ensaios de adsorção e dessorção em banho finito.

4.5.4 Experimentos de adsorção das proteínas

A adsorção das proteínas BSA e lisozima foi realizada usando o método de tanque agitado: 4 mL de cada solução com concentração inicial (C_0) variando de 0,07 a 0,7 mg.mL⁻¹ foram colocados em seringas plásticas contendo massa de 0,25 g de microesferas de quitosana. O pH das soluções foi ajustado para 6 e 7,5, próximo ao valor de 6,5. O valor de 6,5 corresponde ao pK_a dos grupos amino presentes na estrutura da quitosana. Para condições ácidas, foi usada solução aquosa do tampão fosfato (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4) na concentração de 200 mM. Para condições básicas, foi usada solução aquosa 400 mM do tampão

Tri(hidroximetil)-aminometano. Pelo fato das microesferas de quitosana natural não apresentarem resistências química e mecânica, elas não foram usadas nos experimentos de adsorção. As seringas foram agitadas em um sistema orbital na velocidade de 30 rpm, na temperatura de 20 °C por 12 horas. As concentrações protéicas finais do meio foram analisadas usando um Espectrofotômetro Beckman DU 640 no comprimento de onda de 280 nm. Foram calculadas as capacidades de adsorção máxima (q_m) e as constantes do modelo de Langmuir (k_d).

4.5.5 Adsorção em diferentes pHs

Com o intuito de estudar o efeito do pH das soluções sobre a adsorção das proteínas BSA e lisozima, apenas as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído foram utilizadas. Foram essas microesferas (RG) que apresentaram os maiores valores com relação à capacidade de adsorção. Valores esses observados durante a metodologia definida na Seção 4.5.4. Os pHs estudados foram 4, 5, 6, 7,5, 9 e 11.

4.5.6 Cinética de adsorção

Os experimentos de cinética foram conduzidos no pH 6 (para efeito comparativo sem interferências da variação do pH) e concentração inicial das proteínas de $0,33 \text{ mg.mL}^{-1}$ (concentração inicial média). A mistura foi agitada no mesmo sistema apresentado na Seção 4.5.3 até atingir o equilíbrio de adsorção. As amostras obtidas foram analisadas periodicamente. A quantidade adsorvida de proteínas por unidade de peso de microesferas no tempo (t), $q(t)$ (mg.g^{-1}), e a concentração de equilíbrio C^* (mg.mL^{-1}) foram calculadas através do balanço de massa. São vários os modelos cinéticos utilizados para determinar qual das etapas, se da transferência de massa ou da reação química, é que controlam o processo de adsorção. A constante da taxa cinética foi calculada, inicialmente, usando o modelo de Mckay e Poots (Mckay e Poots, 1980). O programa “Solver” de modelagem do Excel (Microsoft) foi utilizado para afinar o ajuste. A Equação 7 mostra que a quantidade adsorvida através da dinâmica de difusão-controlada em função do tempo pode ser obtida por:

$$q(t) = 2 C_0 S \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} = Kdt^{0.5} \quad (7)$$

Em que $q(t)$ representa a quantidade de BSA ou lisozima adsorvida pela unidade de massa das microesferas no tempo t ($s^{0.5}$), C_0 é a concentração inicial de proteínas no meio da solução, D é o coeficiente de difusão e S é a área superficial específica das microesferas de quitosana. A Equação 6 indica que sob o mecanismo de transporte de difusão controlada, $q(t)$ versus $t^{0.5}$, segue uma relação linear, com $kd = 2C_0S\sqrt{\frac{D}{\pi}}$ expressando a constante da taxa cinética para a adsorção de difusão controlada. Com a obtenção desses parâmetros é possível determinar como se dá o transporte das proteínas até a superfície e até os poros dos adsorventes e propor qual é a etapa limitante do processo.

4.5.7 Estudos de dessorção das proteínas

A dessorção de ambas as proteínas adsorvidas nas microesferas de quitosana foi investigada como segue: as microesferas foram primeiramente saturadas com as proteínas BSA e lisozima usando uma concentração inicial de $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ respeitando os tempos definidos na Secção 4.5.6. Após isso foi realizada a eluição utilizando 4 mL da solução aquosa de NaCl 1M no pH de 6 para BSA e 7,5 para lisozima, contendo os respectivos tampões (200 mM de tampão fosfato e 400mM de tampão “Tris”). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente sob agitação durante 12h. As concentrações de BSA e lisozima dessorvidas foram determinadas espectrofotometricamente. A recuperação das proteínas foi avaliada pela comparação da quantidade de BSA e lisozima dessorvidas e adsorvidas através da Equação 8. Dos valores obtidos foi descontado o volume da solução de proteínas que se encontrava nos poros das microesferas e não está adsorvido (Vieira *et al.*, 2004).

$$Dessorção(razão) = proteina \left[\frac{desorvida}{adsorvida} \right] \cdot 100\% \quad (8)$$

4.6 Ensaio realizado de adsorção e dessorção das proteínas em leito fixo

Os ensaios realizados de adsorção envolveram as microesferas reticuladas com glutaraldeído e os seguintes adsorbatos:

- Proteínas padrão BSA e lisozima;
- Concentrado protéico.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios foram usados.

4.6.1 Condições e aparato utilizado nos ensaios de adsorção e dessorção em condição dinâmica

Os ensaios foram realizados utilizando o sistema da Figura 19, constituído de uma coluna de vidro com diâmetro de 0,5 cm e altura total de 4 cm (as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, que se mostraram mais eficientes durante a adsorção pelo método do banho finito, preencheram 3 cm da altura do leito). A massa de adsorvente utilizada foi de 1 g. Para bombear a solução utilizou-se uma bomba peristáltica modelo Master flex - Digi Staltic, com cabeçote modelo 70130-20 na vazão de 1 mL.min⁻¹ (mínimo da operacionalidade da bomba para as condições utilizadas).

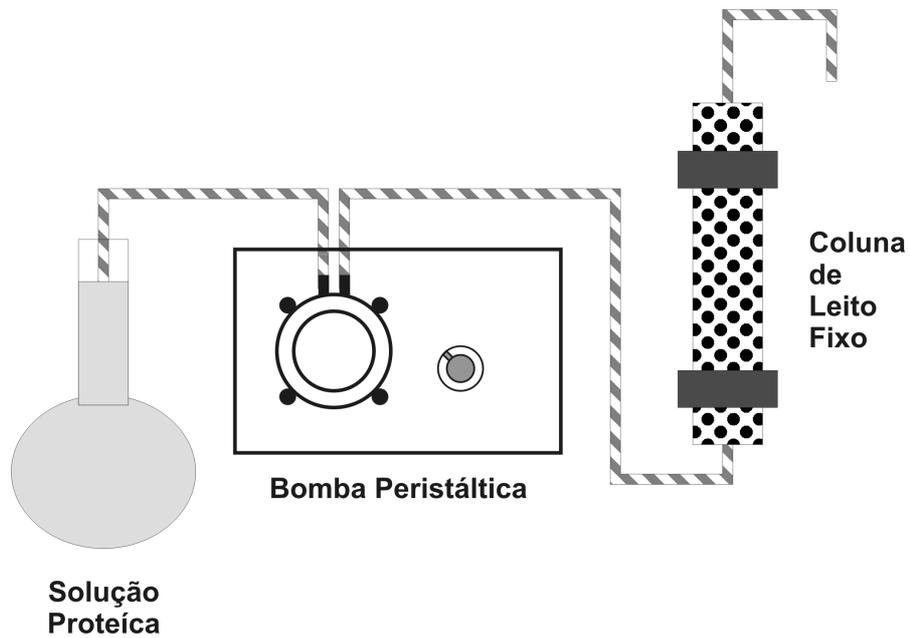


Figura 19: Sistema utilizado para os ensaios de adsorção e dessorção em leito fixo.

Na Figura 20 é mostrada a coluna Mono-Q utilizada durante a etapa de adsorção e dessorção dinâmica.

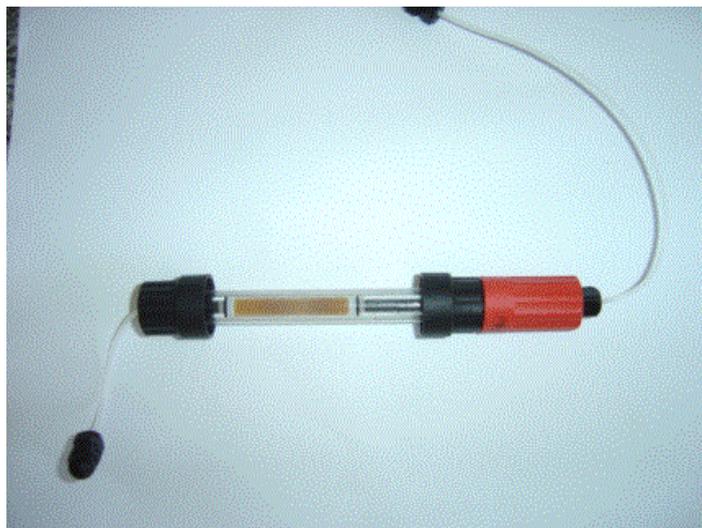


Figura 20: Coluna utilizada para os ensaios de adsorção e dessorção em condição dinâmica.

Inicialmente as microesferas foram condicionadas nas soluções tampão respectivas; para a proteína BSA o tampão fosfato 200 mM em pH 4,8 e para a proteína lisozima o tampão "Tris" 400 mM em pH 11 por 24 h na temperatura de 5 °C. Após preencher a coluna de adsorção com a solução tampão, a coluna foi então recheada com as microesferas. O adsorvente foi adicionado lentamente para evitar a formação de bolhas de ar na coluna. As bolhas de ar entre o adsorvente podem causar regiões de escoamento bifásico. Com a coluna já recheada, o sistema foi novamente estabilizado com a passagem contínua do referido tampão. Após essa etapa inicial, começou-se a bombear a solução protéica em sentido ascendente e na concentração inicial de 0,7 mg.mL⁻¹. Foram retiradas, em volumes pré-determinados e intervalos de 2 mL, sendo o volume mínimo de 2 mL, alíquotas na saída da coluna. O sobrenadante foi analisado utilizando Espectrofotômetro Beckman DU 640 no comprimento de onda de 280 nm. As alíquotas foram retiradas até que a concentração na saída da coluna se estabilizasse com valor próximo ao da concentração inicial das proteínas na solução protéica. Na terceira etapa, foi realizada a eluição do sistema com solução de NaCl 1 M com alíquotas de 2 mL separadas para análise no espectrofotômetro. A eluição foi repetida até que a concentração das proteínas na saída da coluna fosse próxima de zero.

A quantidade adsorvida e desorvida foi calculada a partir da Equação 2, desprezando o volume morto (V_m), devido a seu pequeno valor comparado a V_f . O termo $\int_{V_m}^{V_f} Cdv$ foi obtido com o cálculo da área sob a curva.

A porosidade do leito foi determinada pela Equação 9:

$$\epsilon_L = 1 - \frac{m_s}{\rho_s \cdot V_L} \quad (9)$$

Em que, ϵ_L corresponde à porosidade do leito, m_s à massa de adsorvente no leito, ρ_s à massa específica aparente do adsorvente e V_L ao volume do leito.

Os parâmetros da coluna utilizada durante o método dinâmico de adsorção estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros da coluna de leito fixo utilizada.

Parâmetros	Valores
Diâmetro da coluna (cm)	0,5
Altura do enchimento (cm)	3
Vazão (cm ³ /min)	1
Velocidade superficial (cm/min)	5,09
Massa específica do adsorvente (g/cm ³)	2,735
Porosidade do leito (%)	62,1

4.6.2 Estudo de adsorção e dessorção em condição dinâmica (leito fixo) para o concentrado protéico

O estudo das propriedades de adsorção em um extrato real pode tornar-se complexo devido as diferentes moléculas e grupos presentes na solução. Esses grupos químicos podem interagir e competir entre si pelos sítios de adsorção existentes na superfície do bioadsorvente. O sistema, nessas condições, possui propriedades multicomponentes de adsorção e dessorção.

Os experimentos com o extrato real foram realizados apenas na condição dinâmica e utilizando as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. As condições foram as mesmas apresentadas na Secção 4.6.1, mas utilizando duas concentrações iniciais, de 0,7 e 5,0 mg.mL⁻¹.

A quantidade de material recuperada foi medida através da diferença de leitura da absorvância da solução das proteínas (λ de 280 e 320 nm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção das microesferas

5.1.1 Análise inicial à realização do estudo de planejamento de experimentos feito durante a produção das microesferas pelo método de atomização e coagulação

Entre os parâmetros estudados, apenas dois foram considerados durante o estudo do planejamento: vazão da solução de quitosana e pressão de nitrogênio. Os outros parâmetros testados, apesar de importantes durante o processo, tiveram os seus valores fixados durante a realização do planejamento de experimentos. A temperatura da solução de quitosana teve pequena influência nos resultados encontrados de tamanho médio das microesferas e desvio padrão médio. Seu valor, em relação à temperatura ambiente (25°C), foi modificado para valores maiores e menores, em intervalos de 10°C. Nas temperaturas de 15°C e 35°C, não foram observadas mudanças significativas nos resultados de (TMM) e (DPM) das microesferas. Estudos feitos com a solução de quitosana na concentração de 0,025 g.mL⁻¹ e massa molecular em torno de 10⁵ Da mostraram que variações na faixa de 10°C não causam mudanças importantes na viscosidade. A solução utilizada tem comportamento de fluído não-newtoniano, com estruturas poliméricas ligadas entre si. O aumento ou diminuição da viscosidade relacionada à variação da temperatura nesse intervalo teve reduzida importância nas condições de cisalhamento observadas durante o processo estudado (Torres *et al.*, 2006). Em relação ao parâmetro concentração da solução de quitosana, foi possível observar aumento e diminuição na viscosidade da solução quando a concentração foi mudada para 0,03 g.mL⁻¹ e para 0,02 g.mL⁻¹. A bomba peristáltica utilizada durante o processo teve sua eficiência significativamente diminuída nos valores de concentração maiores que 0,025 g.mL⁻¹, valor esse correspondente à condição limite de uso da bomba (modelo Cole Parmer 302FM-B). Com o valor de 0,02 g.mL⁻¹ não ocorreu diminuição significativa na viscosidade da solução que acarretasse mudanças importantes nos resultados. Valores menores que 0,02 g.mL⁻¹, como esperado, diminuiriam ainda mais a viscosidade da solução, caracterizada nessas condições pelas

cadeias da estrutura polimérica fracamente ligadas entre si e movendo-se quase que independentemente uma das outras durante a aplicação de tensão. Essa faixa de valores não permitiu que a bomba peristáltica operasse em condições adequadas de trabalho. Nessas condições, o rápido aumento da vazão da solução de quitosana sem acompanhamento proporcional do aumento da pressão de nitrogênio acarretou rápido enchimento da câmara de atomização antes mesmo da atomização propriamente dita. Para manter a mesma eficiência na atomização foi necessário aumento da pressão de nitrogênio. Esse aumento na pressão de nitrogênio acabava impedindo a chegada da solução de quitosana até a câmara de atomização devido à formação de bolhas na linha de silicone. Após esses resultados, foi fixado o valor de $0,025 \text{ g.mL}^{-1}$ para a concentração da solução. A abertura do bico de atomização usada durante todo o trabalho foi de 1 mm. A altura entre o bico de atomização e a solução de coagulante teve influência apenas na morfologia das microesferas formadas. Alturas maiores resultaram na produção de microesferas com superfícies menos distorcidas. No entanto, a altura foi limitada pela área do recipiente contendo a solução de NaOH. Valor esse encontrado durante o processo de atomização. Com isso, a altura utilizada foi de 30 cm. Os valores encontrados nesse estudo preliminar, assim como outros valores fixados, são mostrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Influência da variação de alguns parâmetros no tamanho médio das microesferas durante o estudo preliminar.

Parâmetros	Valores	Efeito (micras)
Concentração da solução de quitosana	$0,02 \text{ g.mL}^{-1}$	-20
	$0,03 \text{ g.mL}^{-1}$	ND
Temperatura da solução na linha	$15 \text{ }^{\circ}\text{C}$	10
	$35 \text{ }^{\circ}\text{C}$	-5

ND = sem leitura de valores

Tabela 10: Valores fixados dos parâmetros usados durante o planejamento de experimentos.

Parâmetros	Valores
Concentração da solução de quitosana	0,025 g.mL ⁻¹
Temperatura da solução na linha	25 °C
Bico	1 mm
Altura (bico-solução NaOH)	30 cm

5.1.2 Superfícies de resposta

Após realização desse estudo preliminar e fixação desses parâmetros foi possível desenvolver um planejamento de experimentos mais detalhado em cima de duas variáveis: vazão da solução de quitosana (VSQ) e pressão de nitrogênio (PN). Os dados experimentais obtidos para o tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio (DPM) estão mostrados na Tabela 7 na Seção Materiais e Métodos. Esses resultados estão relacionados às condições mostradas na Tabela 6 na mesma seção. As superfícies de resposta com as variáveis dependentes e independentes estudadas são mostradas nas Figuras 21 e 22. Os efeitos das variáveis sobre as respostas estão mostrados na Tabela 11. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para os termos de primeira grandeza (para as variáveis VSQ e PN) e para os produtos entre as variáveis, mas para as variáveis quadráticas apenas VSQ foi considerado significativo. Para o termo quadrático da variável PN, o valor do coeficiente estatístico (p) foi

considerado não significativo conforme estudo realizado usando a distribuição Student-t. Em geral, as superfícies de resposta indicaram uma interação simples entre as duas variáveis. Os modelos propostos para as duas respostas (Y_1 e Y_2) estão mostrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Os valores encontrados para tamanho médio das microesferas e desvio padrão médio em relação à faixa de distribuição ficaram respectivamente entre 140 e 281 μm e 119 e 238 μm .

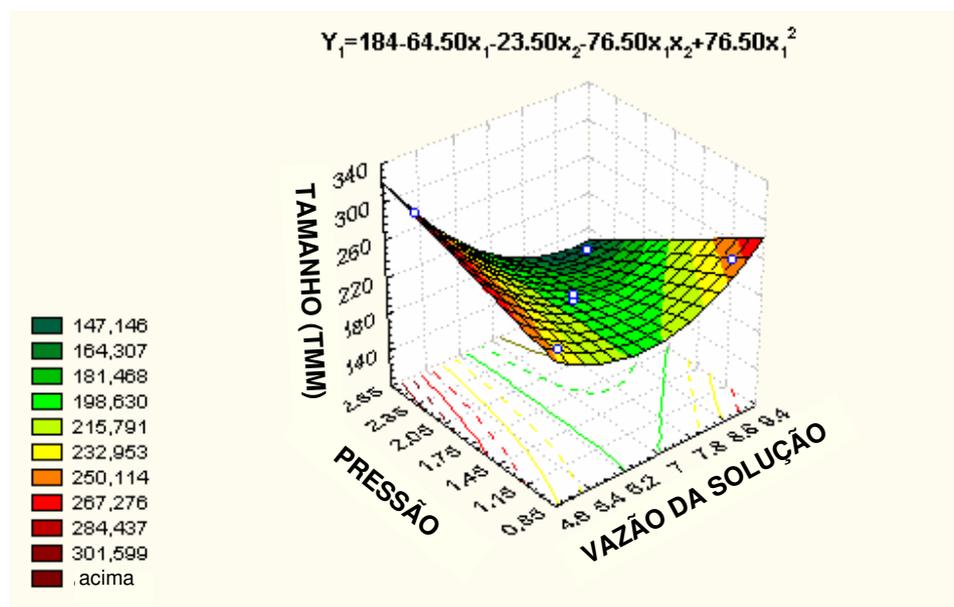


Figura 21: Superfície de resposta mostrando os efeitos da PN (kgf.cm^{-2}) e VSQ (mL.min^{-1}) sobre o tamanho médio das microesferas (μm).

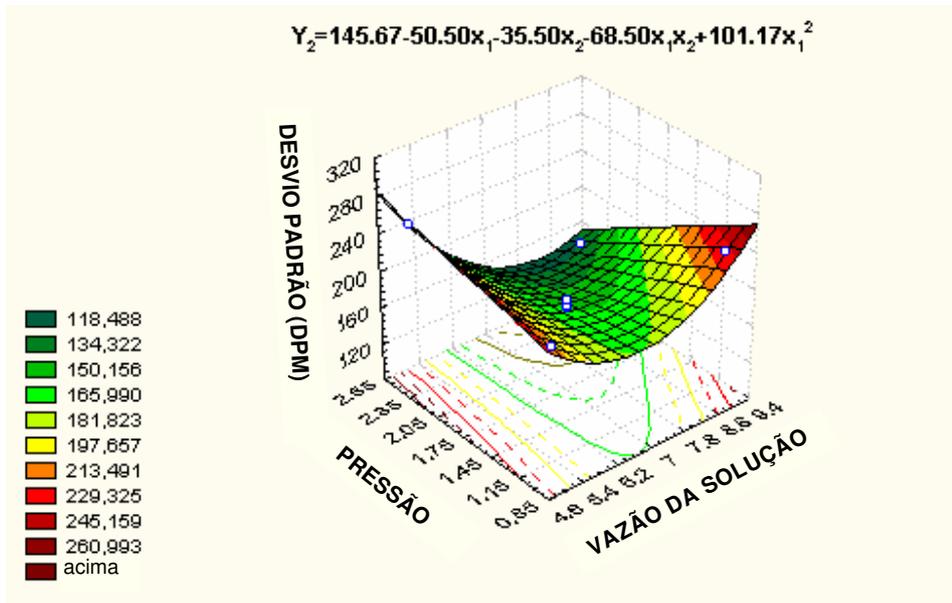


Figura 22: Superfície de resposta mostrando os efeitos da PN (kgf.cm^{-2}) e VSQ (mL.min^{-1}) sobre o desvio padrão médio (μm).

Esses resultados correspondem a valores médios levando-se em conta que cada condição gerada pelo equipamento corresponde a uma faixa de distribuição de tamanho de partículas. Para cada distribuição é possível determinar um valor de diâmetro médio e o correspondente desvio padrão médio em relação a toda faixa observada. Esses valores foram encontrados antes da etapa de peneiramento das microesferas obtidas.

Tabela 11. Efeitos dos parâmetros (PN) e (VSQ) sobre o tamanho médio das microesferas (TMM) e desvio padrão médio (DPM).

Fatores	Efeito sobre	
	TMM	DPM
PN	(-)23,50	(-)35,50
VSQ	(-)64,50	(-)50,50
PN.VSQ	(-)76,50	(-)68,50
VSQ ²	76,5	101,17

Os resultados permitem concluir que as respostas são afetadas em diferentes graus pelas variáveis estudadas: vazão da solução de quitosana e pressão de nitrogênio. Dentro das condições estudadas é possível observar que valores crescentes, aplicados simultaneamente, para vazão da solução e pressão de nitrogênio, acarretaram diminuição nos valores encontrados para as respostas estudadas. Também, durante o estudo, foi possível observar que existem limites nos valores atribuídos às variáveis. Esses limites são intrínsecos ao sistema montado para a realização dos experimentos, e, conseqüentemente, estão relacionados aos equipamentos e conexões presentes. Foi possível, durante os ensaios, determinar os valores máximos para as variáveis estudadas. Valores superiores a 2,5 kgf/cm² para a pressão de nitrogênio causam refluxo na linha oposta, ou seja, na linha de escoamento da solução. Valores superiores a 10 mL/min para a vazão da solução de quitosana causaram dilatação das linhas de silicone utilizadas para escoar a solução de quitosana. Com isso, nesses valores, a solução de quitosana não consegue chegar na câmara de atomização, impedindo a atomização propriamente dita. Diminuindo os valores de vazão de solução e de pressão de nitrogênio, se obtém valores maiores de tamanho médio das microesferas com desvios também maiores. Aumentos na vazão de solução sem acompanhamento, na mesma medida, da pressão de nitrogênio causaram

aumento também no tamanho das microesferas e no desvio padrão. Para compensar essa quantidade maior de solução na câmara de atomização foi necessário aumentar o fluxo de nitrogênio. Os valores dos coeficientes de reprodutibilidade encontrados ($R^2=0,99$) para as respostas obtidas e os valores para o coeficiente estatístico (F) sugerem que os modelos apresentados para as superfícies de resposta descrevem bem os dados experimentais obtidos. A Tabela 11, com os efeitos, mostrou que o parâmetro vazão da solução tem um impacto maior nas respostas estudadas. A sustentabilidade das equações encontradas pelos modelos e que representam os valores ótimos para as respostas foram também testados. Os valores experimentais que foram encontrados estão de acordo com os valores estimados (Figuras 23 e 24).

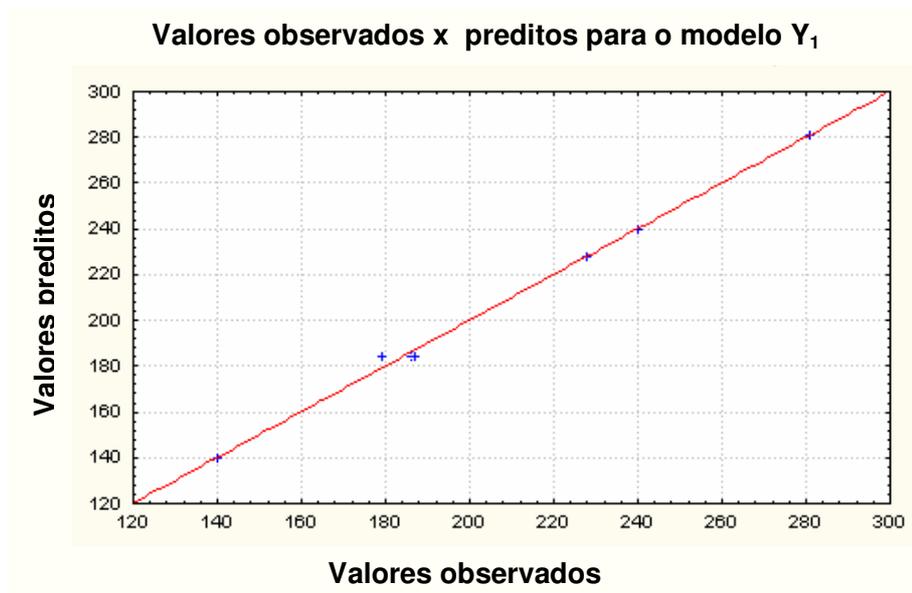


Figura 23: Valores preditos e valores observados para o modelo Y_1 , correspondendo à resposta TMM.

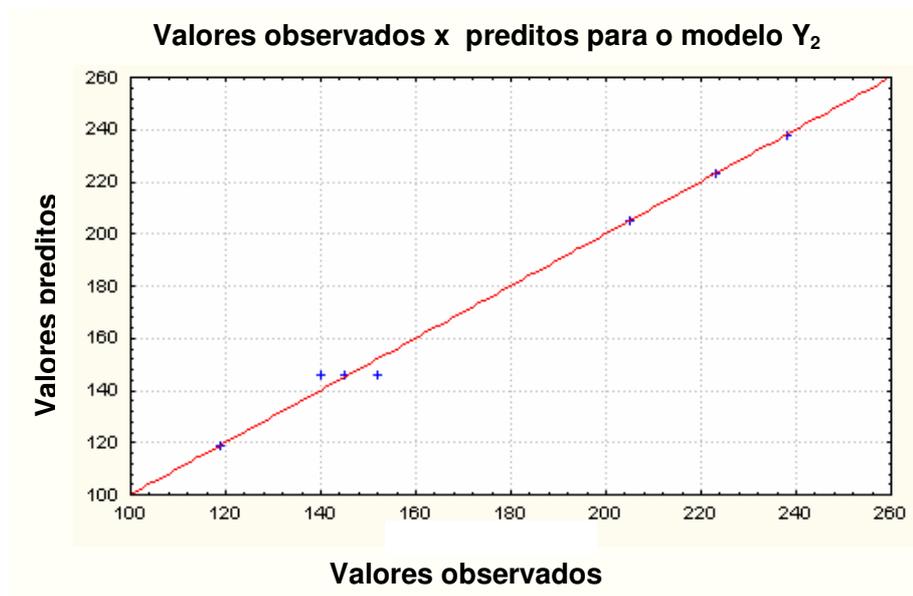


Figura 24: Valores preditos e valores observados para o modelo Y_2 , correspondendo à resposta DPM.

5.1.3 Condição adequada da produção de microesferas

Os resultados foram expressos na forma de superfície de contorno para visualizar as relações entre as respostas obtidas e os níveis experimentais para cada fator e para deduzir as condições adequadas depois da análise de variância.

A análise de distribuição de tamanho das microesferas apresentada na Figura 25 mostrou um diâmetro médio ($D_{4,3}$) em torno de 140 μm . A análise mostrou um desvio em relação à média de 119 μm . Esse valor é anterior à etapa de peneiramento. Os valores de $D_{0,9}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,1}$ correspondentes à 282 μm , 103 μm e 45 μm respectivamente, permitiram o cálculo da polidispersidade representada pelo “span” de 2,29. O valor alto de polidispersidade (> 1) mostra tendência a reaglomeração entre as microesferas analisadas.

Para cada aplicação envolvendo adsorventes na forma de microesferas fazem-se necessárias determinadas características de tamanho de microesferas e de desvio padrão. Na maioria das aplicações em que se faz uso das microesferas,

seja como biomaterial ou adsorvente, buscam-se desvios padrões relativamente pequenos, com estreitas distribuições de tamanho de partículas. Tamanhos de partículas influenciam na eficiência de sistemas de liberação de drogas ou de colunas de adsorção. A determinação de valores “ideais” é dependente da aplicação envolvida. No processo estudado as condições adequadas para o sistema de adsorção foram de 140 μm para tamanho das microesferas e 119 μm para desvio padrão (valores médios). Esses valores obtidos foram encontrados a partir das condições iniciais de: 2,5 kgf.cm^{-2} para pressão de nitrogênio (PN) e 9 mL.min^{-1} para vazão da solução de quitosana (VSQ). A determinação de valores ideais é dependente da aplicação final. As condições adequadas representaram, nesse caso, o ponto de mínimo nos gráficos de superfície de resposta. Os resultados obtidos de distribuição de tamanho das microesferas, nas condições adequadas, são mostrados na Figura 25. As condições adequadas são mostradas na Tabela 12.

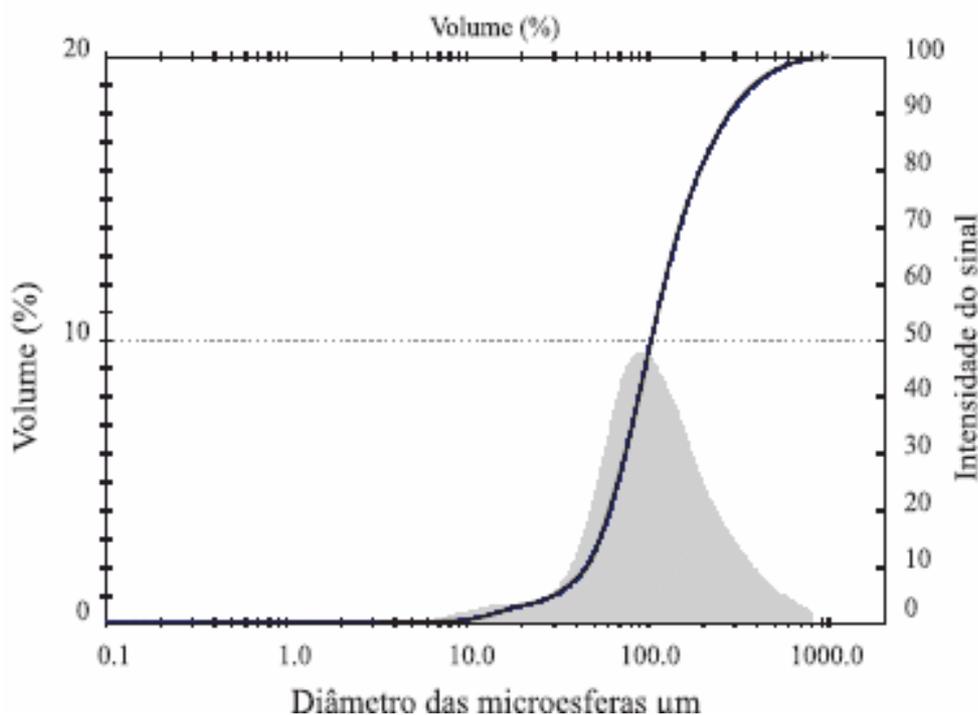


Figura 25: Distribuição de tamanho das microesferas na condição adequada para pressão de nitrogênio, 2,5 kgf.cm^{-2} e para vazão mássica da solução de quitosana, 9 mL.min^{-1} .

Tabela 12: Condições adequadas encontradas durante o planejamento de experimentos.

Parâmetros	Valores
Concentração da solução de quitosana	0,025 g.mL ⁻¹
Temperatura na linha	25 °C
Bico	1 mm
Altura (bico-solução NaOH)	30 cm
Pressão de nitrogênio PN	2,5 kgf.cm ⁻²
Vazão da solução VSQ	9 mL.min ⁻¹

5.2 Caracterização das microesferas (corpos porosos) de quitosana

5.2.1 Porcentagem de grupos amino protonáveis nas amostras estudadas

A Tabela 13 apresenta valores do percentual de grupos amino para as amostras (N), (RG), (RE) e (MA) obtidos pelo ensaio de titulação potenciométrica.

Tabela 13: Percentual de grupos amino protonáveis das microesferas, natural (N), reticulada com glutaraldeído (RG), reticulada com epícloridrina (RE) e acetilada (MA).

N	82,5
RG	nd
RE	68,7
MA	70

nd= sem valores nessa condição

As microesferas reticuladas com glutaraldeído não apresentaram quantidade de grupos amino protonáveis mensurável pelo método. Observou-se somente uma inflexão na curva de titulação potenciométrica, referente ao consumo de NaOH necessário para neutralizar o HCl adicionado. As microesferas reticuladas com epícloridrina apresentaram um percentual de grupos amino abaixo do valor encontrado para a quitosana natural, indicando que esta reação deve atuar prioritariamente em outros grupos funcionais da quitosana além dos grupos amino. As microesferas acetiladas apresentaram um percentual de grupos amino de 70%, correspondendo a quitosana na forma N-acetilada e não na forma de pseudo-quitina (Torres *et al.*, 2005).

5.2.2 Espectros FTIR-ATR para as amostras analisadas

A Figura 26 nos mostra os espectros FTIR-ATR para as microesferas analisadas. Foi possível verificar a presença das seguintes bandas de absorção: 1060 cm^{-1} estiramento vibracional C-O do álcool primário; 1090 cm^{-1} estiramento vibracional do grupo éter; 1070-1100 cm^{-1} aminas alifáticas; 1654 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} vibração de deformação de intensidade média N-H de amina primária e banda relativa à vibração de deformação angular simétrica de grupos metil do

grupo acetamido; 1400 cm^{-1} grupos alquilas e carboxilatos $\text{O}-\text{C}=\text{O}$; 1450 cm^{-1} vibração de deformação angular de grupos metilênicos CH_2 ; 1550 cm^{-1} bandas de sobreposição de amins $\text{N}-\text{H}$, amida $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ e carboxilato $\text{O}=\text{C}-\text{O}$; $1725-1750\text{ cm}^{-1}$ e $1230-1277\text{ cm}^{-1}$ grupos ésteres $\text{C}=\text{O}-\text{O}$. Nas microesferas (RG) pôde-se observar que a intensidade da banda devido à amina alifática (1100 cm^{-1}) diminuiu, denotando que estes grupos foram ligados às moléculas de glutaraldeído, formando uma nova estrutura denominada imina ($\text{N}=\text{C}$), conforme mostra a Figura 5. Este fato pôde ainda ser confirmado pelo aparecimento de um pico a 1655 cm^{-1} atribuído a ligação imina $\text{N}=\text{C}$ (Knaull *et al.*, 1999) e outro pico a 1562 cm^{-1} associado à ligação etilênica $\text{C}=\text{C}$. Pôde-se observar o aparecimento de bandas características entre $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ relacionadas aos grupos aldeídicos livres, os quais não reagiram com o polímero. Especialmente em reticulações extremas, como é o nosso caso, validado pelo resultado da titulação potenciométrica, as moléculas bifuncionais do glutaraldeído não têm necessariamente ambos os grupos aldeídicos ligados a quitosana e funções aldeídicas podem estar disponíveis na matriz final reticulada. Nas microesferas (RE) observou-se um aumento na intensidade entre $1000-1300\text{ cm}^{-1}$, indicando a formação da ligação $\text{C}-\text{O}$, característico do processo de reticulação com epicloridrina, conforme mostra a Figura 4 (Nghah *et al.*, 2002). Nas microesferas (MA) pôde-se observar que a intensidade da banda devido à amina alifática (1100 cm^{-1}) diminuiu, indicando a acetilação destes grupos pelo anidrido acético. Estes resultados concordam com aqueles apresentados pela titulação potenciométrica onde se observou que parte dos grupos amino foram acetilados.

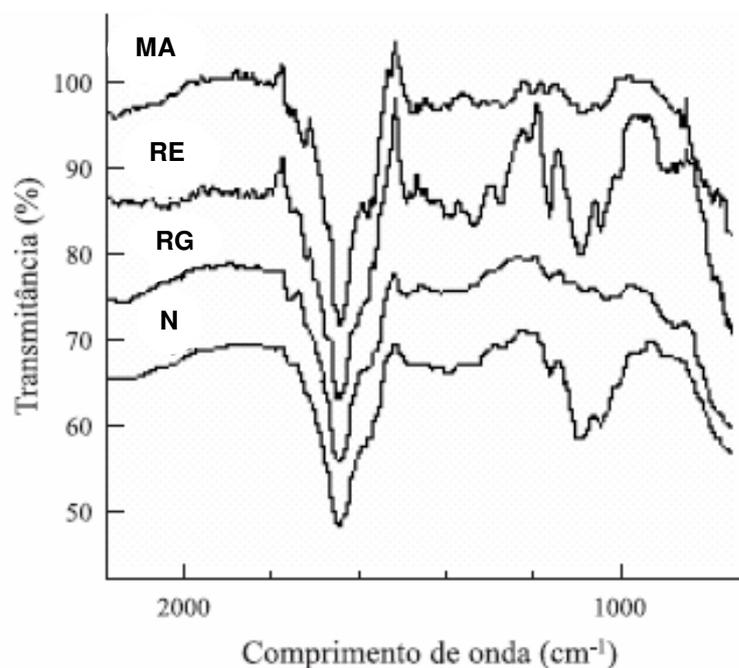


Figura 26. Espectros de FTIR-ATR para as microesferas naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epiclorigrina (RE) e acetiladas (MA).

5.2.3 Análises de difração por raios-X

A estrutura da quitosana natural usualmente apresenta sinais em $2\theta = 10.4^\circ$, 19.6° e 21.4° , que correspondem às reflexões dos planos (200), (020) e (220 e 202) (Saito *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1984). A literatura mostra nessa estrutura que as moléculas de água estão fracamente ligadas à cadeia de quitosana na direção (010) e que quando o adsorvente é tratado termicamente, em adição à redução da reflexão (020), um novo pico aparece em 15.1° . O pico em (020) depende da quantidade de água e tende a diminuir durante a secagem da amostra. O difratograma mostra que à medida que nos afastamos da quitina, estrutura de origem da quitosana e suas variáveis, condição encontrada na natureza, o pico (020) diminui de intensidade, refletindo o aumento da hidrofobicidade das estruturas devido à inserção de novos grupos químicos e o aumento da distância entre as cadeias macromoleculares. Com a estrutura

acetilada o comportamento é oposto mostrando um aumento da cristalinidade do adsorvente.

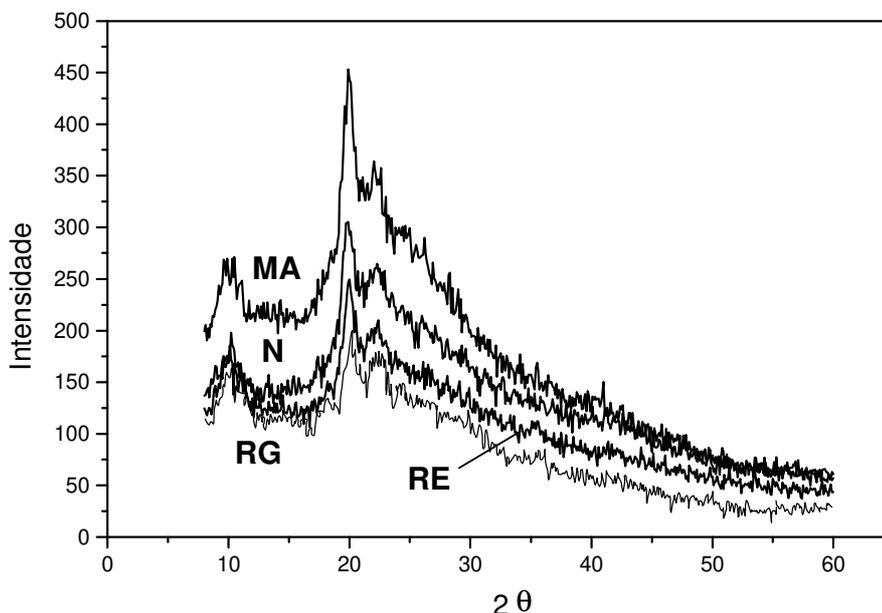


Figura 27. Difratogramas para as microesferas naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).

5.2.4 Análises de TGA e DSC

A Figura 28 mostra os resultados obtidos das análises termogravimétricas para as microesferas. Observa-se que a degradação das microesferas ocorre em dois estágios distintos. O primeiro referente à perda de água residual das microesferas, e o segundo, referente à degradação das microesferas propriamente dita. No primeiro estágio, é possível verificar que as microesferas reticuladas com glutaraldeído (RG) retiveram menos água e com isso volatilizaram mais facilmente. Esse comportamento sugere que os grupos amino, de caráter hidrofílico, encontram-se ligados aos grupos aldeídicos (Koyama *et al.*, 1986), concordando com os resultados apresentados pela titulação potenciométrica e pelo FTIR-ATR. Como consequência observou-se uma queda em sua resistência térmica. Já as temperaturas de degradação das microesferas (N), (RE) e (MA) ficaram muito próximas, em torno de 300 °C. O fluxo de massa perdido, associado

à perda de água, para as microesferas (N), (RE) e (MA) apresentaram, conforme Figura 29, comportamentos similares. Podemos inferir com isso que a reticulação com epícloridrina influenciou apenas parcialmente o caráter hidrofílico das microesferas (N), com o bloqueio preferencial aos grupos hidroxílicos, e não aos grupos amino. O aumento das unidades monoméricas acetiladas nas microesferas (MA) não alterou de forma importante o caráter hidrofílico apresentando resultados próximos aos encontrados nas amostras (N) e (RE).

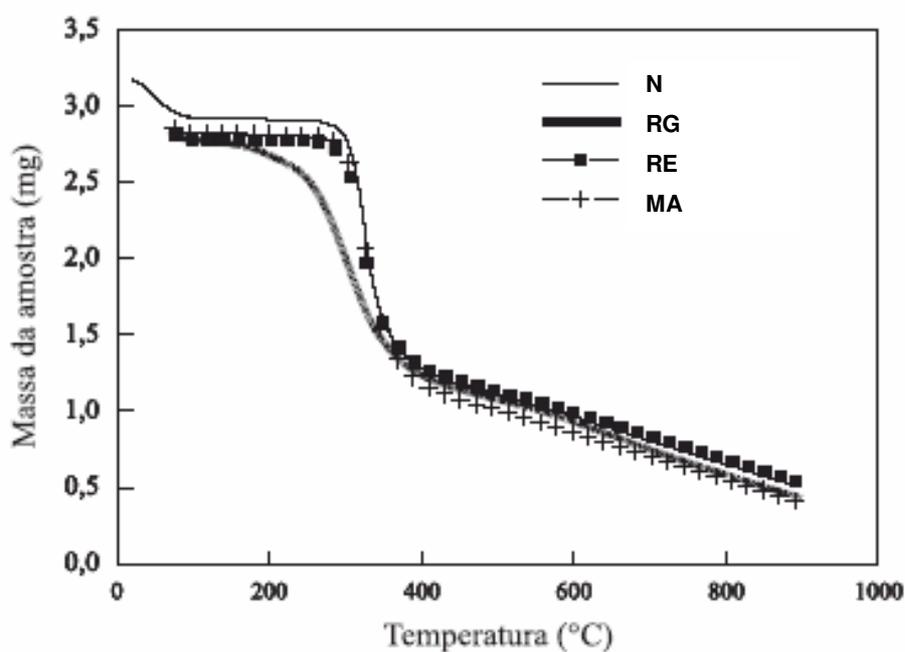


Figura 28: Análise termogravimétrica das microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).

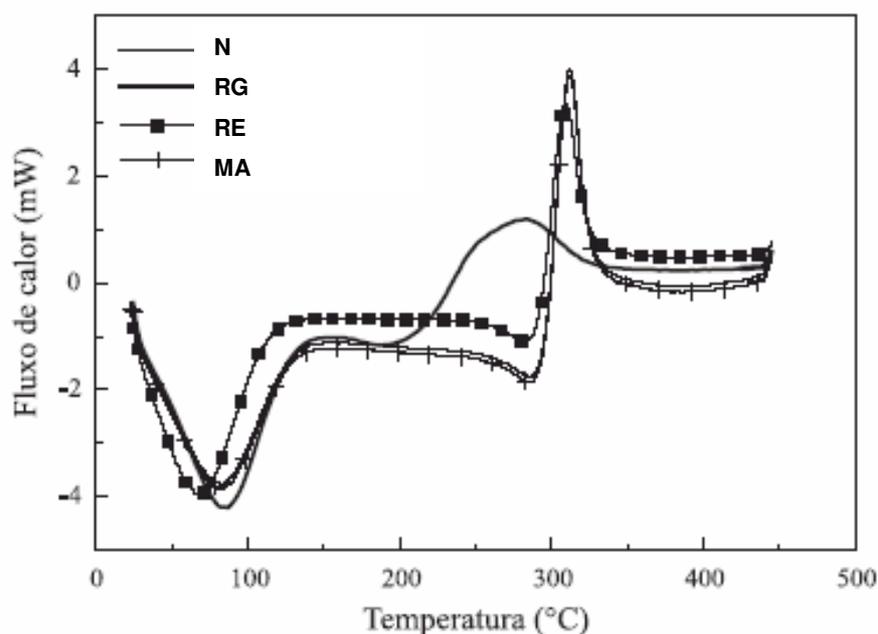


Figura 29: Perfil térmico obtido por DSC para as microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).

A Figura 29 mostra os resultados obtidos pelas análises de calorimetria exploratória diferencial para as microesferas. Observa-se em todas as microesferas um pico endotérmico relacionado à evaporação de água e um pico exotérmico relacionado à capacidade de retenção de água. O comportamento é similar para as microesferas (N), (RE) e (MA). Já para as microesferas (RG) reticuladas com glutaraldeído é possível verificar que o pico exotérmico é menos intenso quando comparado às demais amostras. Essas observações confirmam os resultados encontrados nas análises termogravimétricas, relacionando as alterações promovidas pela reticulação com glutaraldeído com a baixa capacidade de retenção de água pelas cadeias hidrofóbicas.

5.2.5 Análise de DMA

A Figura 30 mostra os resultados obtidos pelas análises mecânicas para as microesferas. Foi possível observar comportamento similar nas curvas (N),

(RE) e (MA) com relação à estabilidade das microesferas após aplicação de força de compressão em torno de 0,5 N. Mas todas as microesferas, após as respectivas modificações químicas, apresentaram perda de resistência mecânica quando comparadas à amostra (N). As microesferas (RE) apresentaram inicialmente maior deformação na mesma tensão imposta quando comparada às demais, mas com flexibilidade suficiente para alcançar a estabilização sem ruptura do material. As microesferas (MA) tiveram comportamento próximo as microesferas (N). Já as microesferas (RG), comparativamente, apresentaram deformação acentuada em todo o ensaio (sinal de um material mais rígido) com a ruptura da amostra caracterizada na curva, pelo ponto de cedência. Esse fenômeno ocorreu após a aplicação de uma força equivalente a 0,15 N. Diferentemente das demais microesferas, as microesferas (RG) apresentaram esfrelamento após o ensaio (já observado durante o manuseio), mostrando, nesse caso, que a reticulação com glutaraldeído alterou mais intensamente o empacotamento das cadeias macromoleculares e seu relaxamento após ser submetido a tensões diminuindo a flexibilidade final das microesferas. Alguns autores sugerem que a maior fragilidade apresentada pelas microesferas (RG) resultam da diminuição da cristalinidade; essa afirmação está de acordo com os resultados obtidos da difração de raios-X (Roberts , 1992).

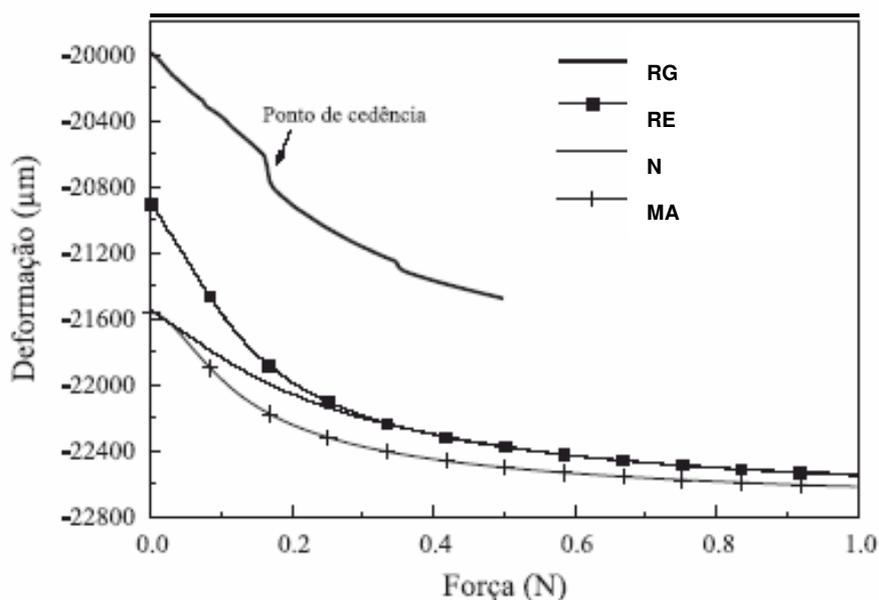


Figura 30: Perfil obtido por DMA para as microesferas de quitosana naturais (N), reticuladas com glutaraldeído (RG), reticuladas com epícloridrina (RE) e acetiladas (MA).

5.2.6 Valores de porosidade

As microesferas depois das modificações mostraram valores de porosidade compreendidos entre 48,5 e 88,5 %. Esses valores são menores que os encontrados para as microesferas naturais. Os valores encontrados estão coerentes com o tratamento das microesferas naturais, em que ocorreram mudanças não somente na superfície externa mas também na estrutura interna das microesferas. Os valores encontrados estão relacionados também, em diferentes graus, com os novos segmentos presentes na cadeia macromolecular das microesferas, com o tamanho desses novos segmentos e com seu caráter hidrofóbico. As modificações internas foram muito mais intensas nas microesferas (MA) devido provavelmente ao menor tamanho dos grupos de anidrido acético comparativamente aos segmentos dos agentes reticulantes. Os valores de porosidade encontrados estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de porosidade das microesferas de quitosana.

Microesferas	Porosidade média (%)	Desvio padrão (%)
N	89,3	1,5
RG	84	2,5
RE	88,5	1,7
MA	48,5	3

5.2.7 Estabilidade química das microesferas

As microesferas após as modificações químicas com epícloridrina e glutaraldeído tiveram um aumento acentuado da estabilidade química à solução aquosa de HCl quando comparadas as microesferas naturais. Já com as microesferas acetiladas, o valor de 12 h, próximo das microesferas naturais (10h), mostra que o grau de desacetilação de 70% não foi suficiente para conferir a amostra (MA) aumento significativo na estabilidade química à solução aquosa de HCl. Valores esses mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de solubilização das amostras em solução aquosa de HCl 0,2 mol/L pelo tempo máximo de 48 h.

Microesferas	Solúveis	Insolúveis
N	10	nd
RG	nd	48
RE	nd	48
MA	12	nd

nd = sem valores nessas condições

5.3 Morfologia das microesferas

5.3.1 Fotomicrografias

As fotomicrografias mostradas na Figura 31 são para as condições natural (N), e reticulada com glutaraldeído (RG), sendo essa última obtida após aplicação do protocolo de estabilidade química secção 4.4.6. As demais condições (RE) e (MA) apresentaram resultados de esfericidade bastante similares às condições naturais.

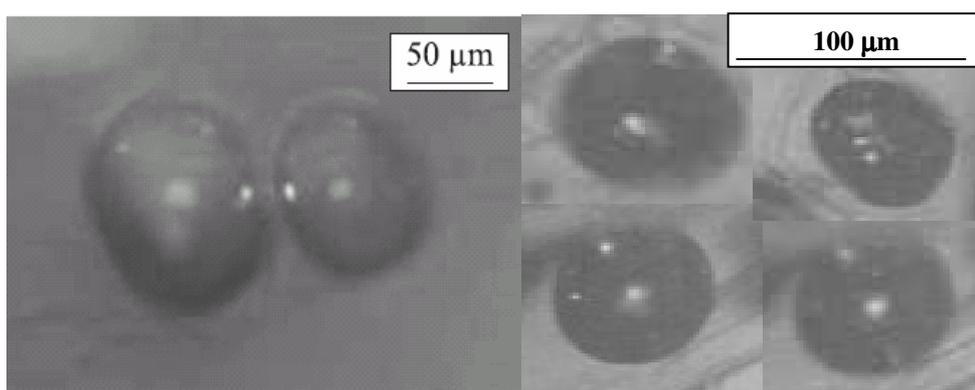


Figura 31: Fotomicrografia das microesferas de quitosana naturais (N) e reticulada com glutaraldeído (RG).

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura das microesferas

A morfologia das microesferas de quitosana preparadas através da técnica de atomização e coagulação foi examinada através da técnica de Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A esfericidade das microesferas de $0,74 \pm 0,14$ foi obtida pelo mecanismo descrito na Secção 4.4.9.2. As microesferas de quitosana reticuladas com epícloridrina e glutaraldeído mostraram morfologia similar, boa esfericidade e uma morfologia superficial levemente enrugada. As micrografias eletrônicas de varredura são mostradas nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Para as microesferas modificadas com anidrido acético foi observado o colapso de sua superfície como mostra a Figura 32.

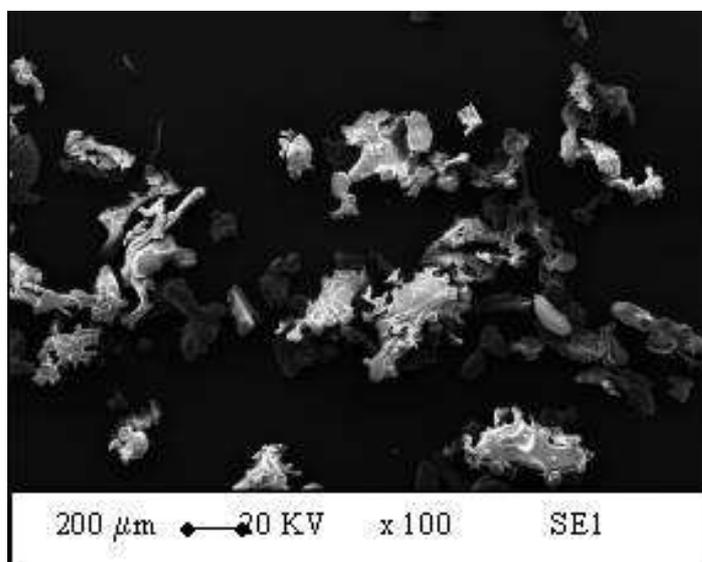


Figura 32: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana modificadas com anidrido acético.

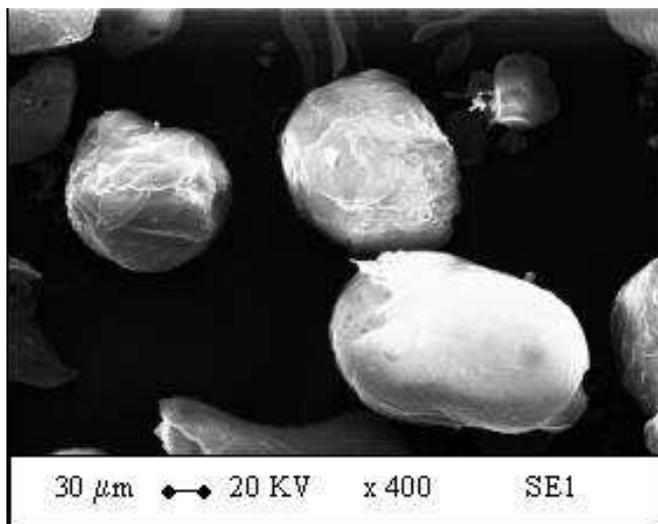


Figura 33: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana reticuladas com epiclorigrina.

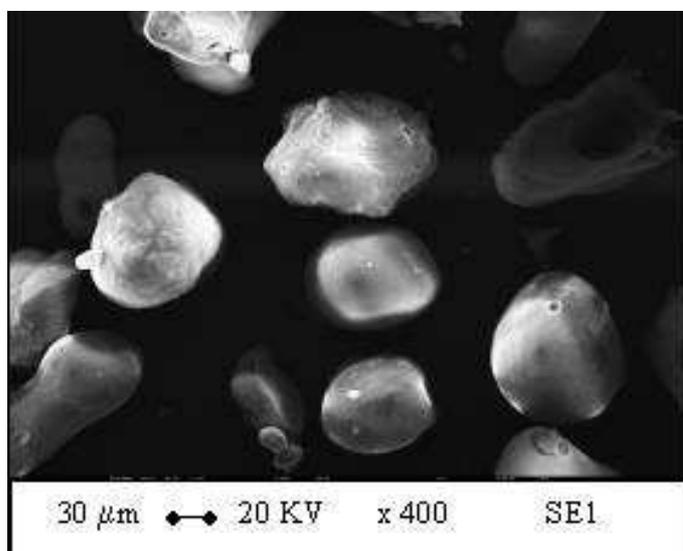


Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

A seção de corte transversal das microesferas de quitosana (RE) e (RG), como mostrado pelo MEV (Microscopia eletrônica de varredura) apresentou formas irregulares e tamanhos diferentes de poros, conforme Figuras 36 e 37.

Para as microesferas acetiladas, a fratura de sua superfície também apresentou o colapso de sua estrutura interna como mostra a Figura 35. Isto mostrou que o grau de acetilação não foi suficiente para manter intacta a estrutura interna das microesferas (MA) durante o processo de preparação da amostra para o MEV.

Foi possível observar durante a preparação e o manuseio das diversas microesferas nas condições estudadas que as microesferas reticuladas com epícloridrina apresentaram maior resistência ao manuseio que as microesferas naturais. Por outro lado, as microesferas reticuladas com glutaraldeído apresentaram a pior resistência ao manuseio de todas as amostras. As duas condições reticuladas mantiveram as suas estruturas internas intactas após liofilização. Foi possível observar, também nas seções de corte, a presença de macroporos de diferentes tamanhos com distribuição aleatória conforme mostrado nas Figuras 36 e 37.

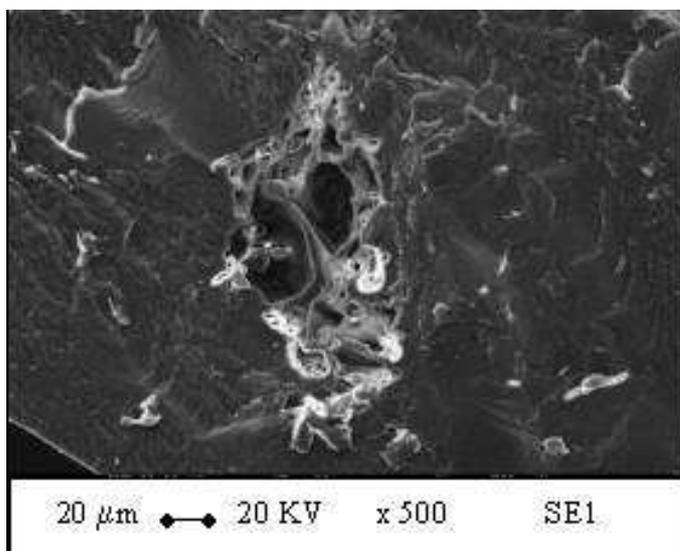


Figura 35: Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da seção transversal das microesferas modificadas com anidrido acético.

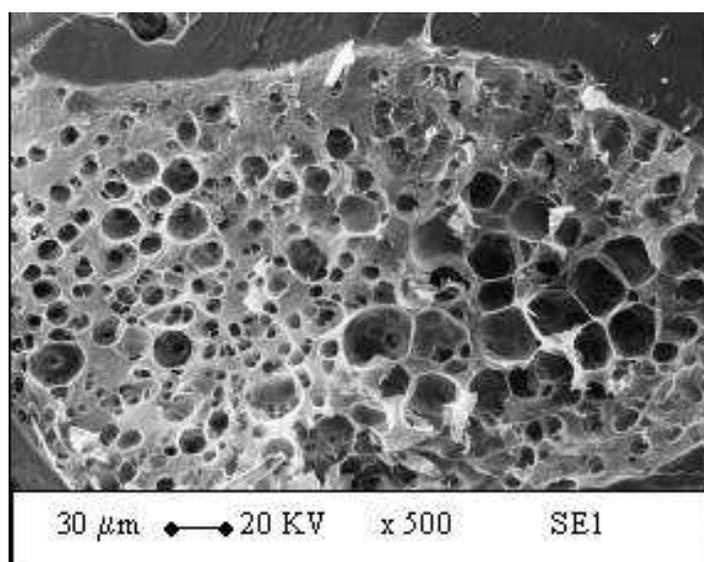


Figura 36: Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da seção transversal das microesferas reticuladas com epiclorigdrina.

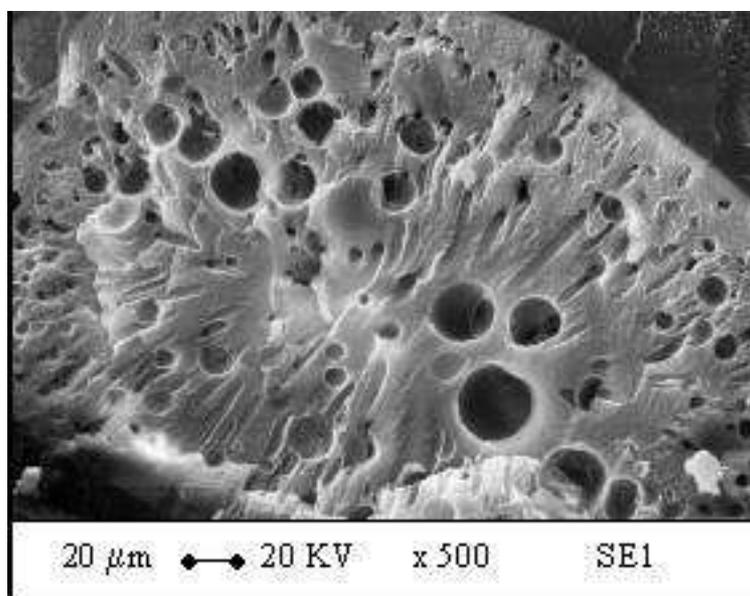


Figura 37: Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da seção transversal das microesferas reticuladas com glutaraldeído.

5.4 Resultados de adsorção e dessorção das proteínas em tanque agitado

5.4.1 Valores de pH_{zpc}

Os pH_{zpc} das microesferas de quitosana naturais e modificadas foram determinados e são mostrados na Figura 38. Todas as microesferas apresentaram pH_{zpc} próximo ao pH de 6,5. Os valores estão de acordo com o pK_a de aproximadamente 6,5 que o grupo amino do copolímero da quitosana apresenta quando o grau de desacetilação (α) está compreendido entre $0,72 < \alpha < 0,87$ (Roberts, 1992). Os valores de desacetilação das microesferas (N) e (MA) e (RE) ficaram em aproximadamente 82,5, 70 e 68,7 %, respectivamente, como calculado através de titulação potenciométrica (Raymond *et al.*, 1993). A carga total das microesferas depende do valor do pH do meio, e conseqüentemente da protonação ou desprotonação dos grupos amino presentes na quitosana conforme mostrado na Tabela 16.

Tabela 16: Fração dos grupos amino protonados para cada pH.

$pK_a = 6.5$	
pH	grupos amino (NH_3^+)
4	0.9968
6	0.7597
7.5	9.10×10^{-2}
9	3.2×10^{-3}
11	1×10^{-4}

Estes valores foram obtidos usando a relação $pK_a = pH + \log[(1-\alpha)/\alpha]$. Nos valores de pH menores que o pH_{zpc} , os sítios de adsorção na superfície do adsorvente estão positivamente carregados, enquanto nos valores de pH maiores

que o pH_{zpc} , os sítios de adsorção estão carregadas negativamente. Do ponto de vista de interação eletrostática, as cargas positivas presentes nas microesferas, sob condições de contato com soluções ácidas favorecem a adsorção de grupos carregados negativamente e sob condições de contato com soluções básicas podem acentuar a adsorção de grupos carregados positivamente. Nas microesferas (RG) e (RE), foi observada uma leve redução do pH_{zpc} . Além disso, nas condições ácidas, como esperado, as microesferas modificadas apresentaram uma considerável redução na quantidade de carga livre relacionada com os grupos amino protonados. Isto sugere que alguns grupos amino principalmente nas microesferas (RG) e (RE) foram consumidos ou bloqueados pelas reações de reticulação. Entretanto, para a amostra (MA), onde a quitosana foi parcialmente acetilada ($\alpha = 70\%$), os resultados de protonação dos grupos amino em condições ácidas obtidos pelo teste, não mostraram diferenças importantes quando comparados com as amostras naturais.

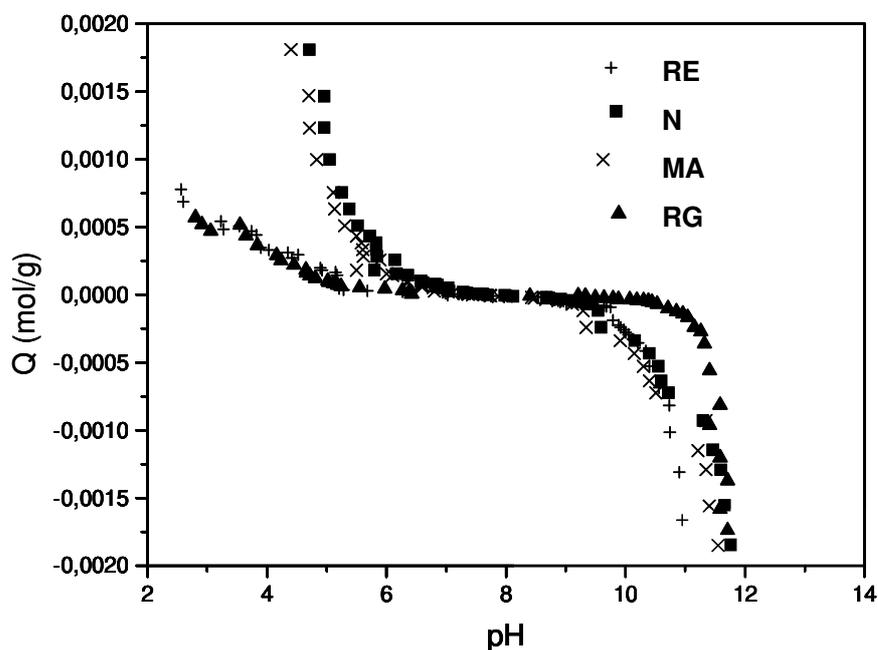


Figura 38: Valores de titulação pH_{zpc} .

5.4.2 Calibrações

As Figuras 39 e 40 mostram, respectivamente, as curvas de calibração para os sistemas com as proteínas lisozima e BSA em tampão Tris no pH 7,5, temperatura de 20°C e em tampão fosfato no pH 6 e temperatura de 20°C.

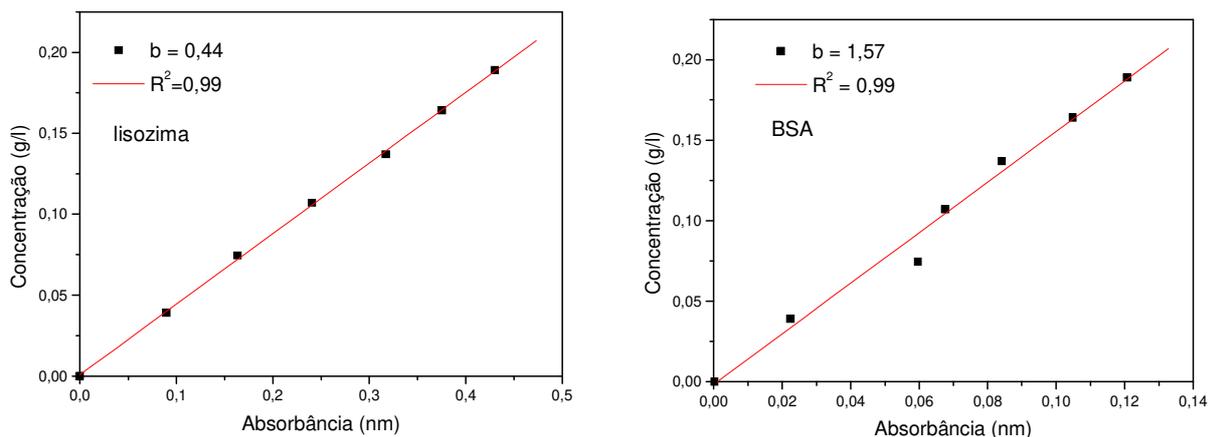


Figura 39: Curvas de calibração das proteínas lisozima e BSA no tampão Tris, pH=7,5 e temperatura de 20°C.

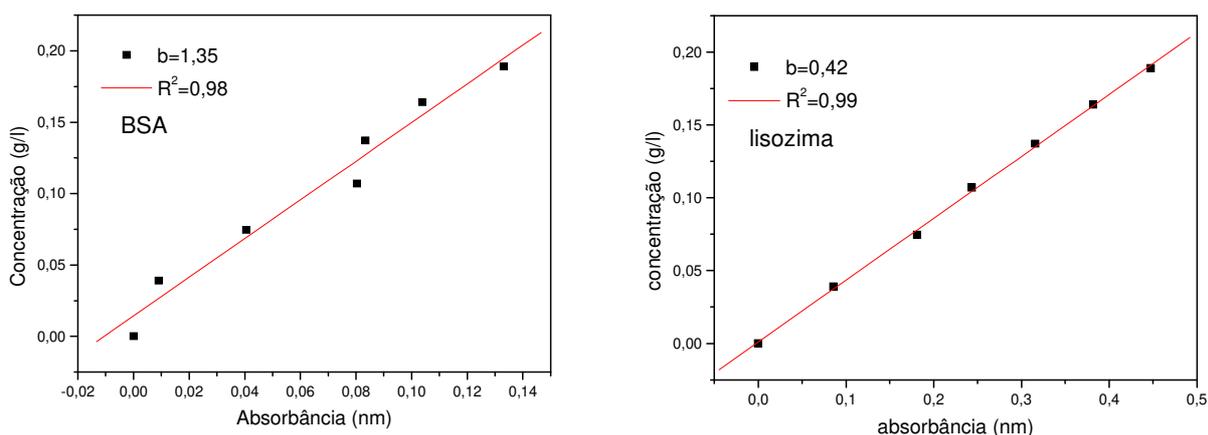


Figura 40: Curvas de calibração das proteínas lisozima e BSA no tampão fosfato, pH=6 e temperatura de 20°C.

5.4.3 Resultados de adsorção das proteínas

As isotermas de adsorção descreveram como os adsorbatos BSA e lisozima interagiram com os adsorventes (RG), (RE) e (MA). Estudos de adsorção realizados com proteínas são usualmente mais complexos do que os realizados com polieletrólitos, já que as proteínas são macromoléculas complexas caracterizadas por áreas polares carregadas ou não carregadas e apolares ou hidrofóbicas. As interações entre proteínas e matrizes sólidas podem ser de natureza não covalente envolvendo interações eletrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas ou através de pontes de hidrogênio, ou de natureza covalente envolvendo outros grupos químicos. Entretanto, a entalpia envolvida na adsorção de proteínas é usualmente positiva independentemente do substrato (Fujimoto *et al.*, 2002). Os resultados indicaram que com o aumento da concentração inicial de BSA e lisozima, a capacidade de adsorção de todos os adsorventes aumentou significativamente. Os dados de adsorção experimental são mostrados nas Figuras 41, 42, 43 e 44. As capacidades de adsorção para as proteínas BSA e lisozima dependeram da presença ou não de determinados grupos químicos na superfície dos adsorventes e também da porosidade desses adsorventes. Na faixa inicial, com concentrações baixas de BSA e lisozima, as capacidades de adsorção aumentaram linearmente com o aumento na concentração inicial das proteínas, sugerindo que as microesferas possuíam inicialmente sítios de adsorção em número suficiente, e, que a quantidade de proteínas adsorvidas nesta faixa foi dependente do número de proteínas transportadas do meio solúvel até a superfície interna e externa das microesferas. Entretanto, na faixa com concentrações maiores das proteínas BSA e lisozima, os valores de adsorção, nas condições de equilíbrio, não aumentaram na mesma proporcionalidade, indicando preenchimento e saturação dos sítios de adsorção na superfície externa e interna das microesferas limitando a capacidade de adsorção nas condições estudadas.

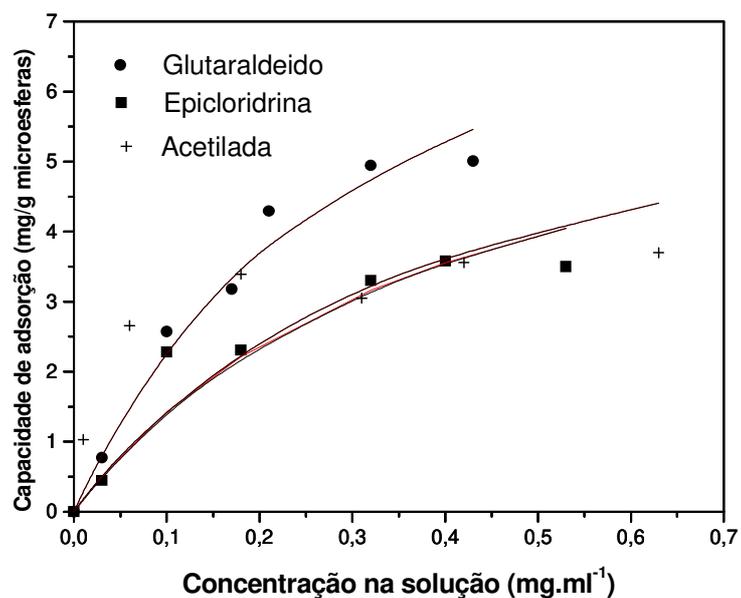


Figura 41: Isothermas de adsorção do BSA usando 200 mM do tampão fosfato, no pH= 6 e temperatura de 20 °C.

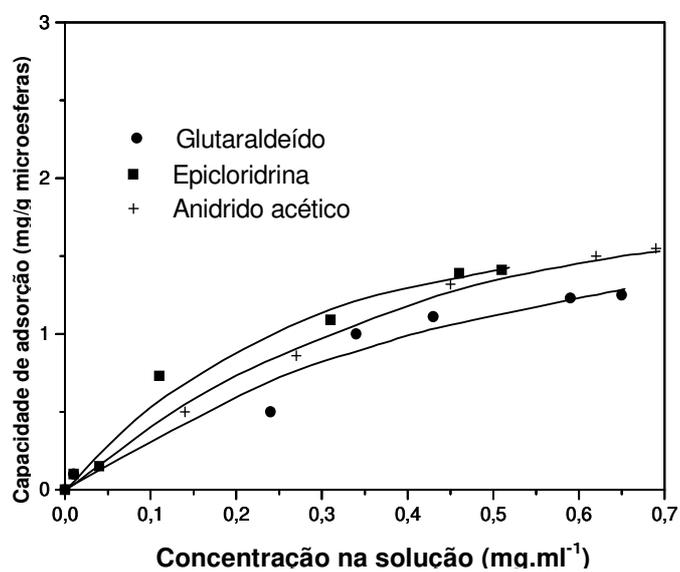


Figura 42: Isothermas de adsorção do BSA usando 400 mM do tampão Tris, no pH= 7,5 e temperatura de 20 °C.

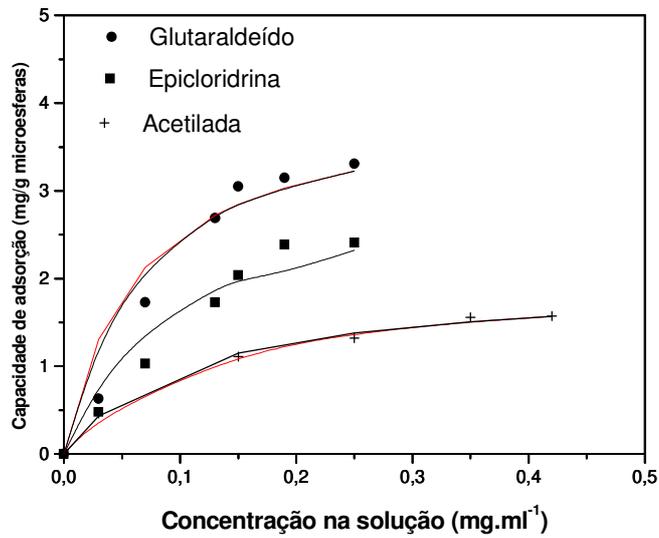


Figura 43: Isothermas de adsorção da lisozima usando 200 mM de tampão fosfato, no pH= 6, e temperatura de 20 °C.

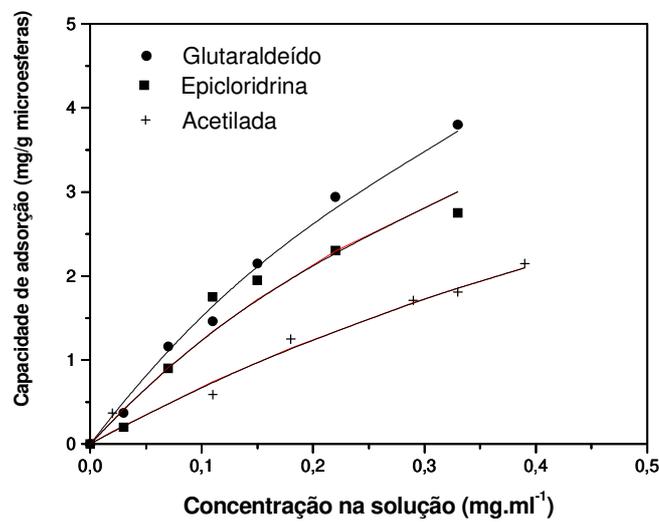


Figura 44: Isothermas de adsorção da lisozima usando 400 mM do tampão Tris, no pH= 7,5, e temperatura de 20 °C.

Os parâmetros de adsorção, obtidos dos experimentos em banho finito, estão apresentados na Tabela 17. Os resultados, em geral, indicaram que o modelo de Langmuir descreveu adequadamente a adsorção das proteínas BSA e lisozima. O modelo da isoterma de Langmuir assume, entre outras condições, que a adsorção ocorre em monocamada e que cada molécula se liga a apenas um sítio de ligação. Com isso, em condições de superfície homogênea, assumidas pelo modelo estudado, foram obtidas aproximações estatisticamente representativas. Os desvios ocorrem, principalmente, devido ao calor de adsorção com o aumento do recobrimento da superfície do adsorvente, o aumento da repulsão entre as moléculas adsorvidas e as características heterogêneas da superfície (Stolberg, 2000). As diferenças encontradas nos resultados comparativos podem ser atribuídas principalmente às interações específicas entre adsorventes e proteínas, aos ligantes incorporados nas matrizes poliméricas e a carga superficial dos adsorventes. Os resultados mostraram valores maiores de capacidade máxima de adsorção (q_m) para as microesferas reticuladas com glutaraldeído (RG) quando comparadas com as outras microesferas. A literatura específica indica que a presença de grupos imino, resultantes da ativação das microesferas naturais pelo glutaraldeído, favorece a capacidade de adsorção de vários tipos de moléculas (Monteiro e Airoidi, 1999). Isto ocorre, provavelmente, devido à somatória dos efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos correspondentes as interações entre os grupos amino e imino, respectivamente, e os grupos específicos presentes na superfície das proteínas. Alguns estudos também demonstram que a diminuição da cristalinidade favorece as propriedades de adsorção com o aumento da acessibilidade de grupos carregados aos sítios de adsorção (Kurita *et al.*, 1998). Para as microesferas (RE) e (MA), a capacidade de adsorção diminuiu quando comparada com a capacidade de adsorção mostrada pelas microesferas (RG). Os resultados intermediários da capacidade de adsorção com ambas as proteínas, em se tratando das microesferas de quitosana tratadas com epícloridrina podem ser explicados pelo bloqueio parcial dos grupos amino presentes inicialmente nas microesferas (N), diminuindo a contribuição eletrostática entre as superfícies de contato. Os menores valores de capacidade de adsorção com ambas as proteínas, em se tratando das microesferas acetiladas, podem ser atribuídos aos baixos valores de porosidade encontrados

para essa condição (Beppu *et al.*, 2004), diminuindo a capacidade de difusão interna no adsorvente e conseqüentemente a adsorção propriamente dita. Esta condição associada a uma pequena diminuição na quantidade de grupos amino protonados, diminui ainda mais a capacidade de adsorção.

Tabela 17: Parâmetros de adsorção obtidos pelo modelo de Langmuir.

Proteínas	pHs	Microesferas	q _m	K _d	R ²
BSA	6	glutaraldeído	9,24	0,29	0,97
	6	epicloridrina	7,06	0,39	0,92
	6	acetiladas	6,93	0,36	0,85
Lisozima	6	glutaraldeído	4,03	0,06	0,93
	6	epicloridrina	2,84	0,09	0,98
	6	acetiladas	1,97	0,11	0,99
BSA	7,5	glutaraldeído	1,18	0,08	0,87
	7,5	epicloridrina	1,59	0,12	0,95
	7,5	acetiladas	1,42	0,09	0,91
Lisozima	7,5	glutaraldeído	11,95	0,79	0,99
	7,5	epicloridrina	10,28	0,88	0,98
	7,5	acetiladas	7,37	0,97	0,97

5.4.4 Influência do pH na adsorção das proteínas

A presença de grupos amino livres na quitosana é responsável por sua natureza policatiónica em soluções ácidas. Com isso, para pHs < 6,5 (valor de seu pK_a), a quitosana apresenta seus grupos amino na forma protonada NH₃⁺, como mostrado na Tabela 3. Devido à presença desses grupos amino e de outros ligantes específicos, as microesferas de quitosana quando reticuladas podem servir como uma resina trocadora de íons fracos (Zeng e Ruckenstein, 1998). As microesferas de quitosana apresentam o equilíbrio R-NH₃⁺(aq.) ⇌ R-NH₂(aq.) + H₃O⁺. Como uma aproximação, as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído apresentam também um equilíbrio em seu pK_a envolvendo o grupo imino R-C(=NH)-R'. Como mostrado na Seção 3.2, todas as microesferas

estão positivamente carregadas em $\text{pH} < 6,5$, com mais grupos NH_2 convertidos a NH_3^+ na medida que o pH diminui. Interações eletrostáticas entre as microesferas e a proteína BSA ($\text{pI} = 4,8$) serão repulsivas em $\text{pHs} > 6,5$ e $\text{pHs} < 4,7$, mas tornam-se atrativas em pHs entre 4,7 e 6,5. Por outro lado, as interações eletrostáticas entre as microesferas e a lisozima ($\text{pI} = 11$) serão repulsivas em $\text{pHs} < 6,5$ e $\text{pHs} > 11$, mas tornam-se atrativas no pHs entre 6,5 e 11 (Zeng e Ruckenstein, 1998).

A Figura 45 mostra que a capacidade de adsorção das proteínas estudadas pelas superfícies das microesferas é fortemente dependente do pH do meio da solução. Assim como as proteínas, as cargas presentes nos adsorventes são também fortemente dependentes de mudanças no pH das soluções. A capacidade de adsorção do BSA nas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído em geral foi favorecida na faixa compreendida entre 4,7 e 6,5, com diminuição nos valores de adsorção em pHs acima de 6,5. As interações eletrostáticas podem explicar a diminuição observada na capacidade de adsorção em valores de pH acima de 6,5, com a repulsão entre as cargas de mesmo sinal presentes na superfície do adsorvente e do BSA. Entretanto, a capacidade de adsorção máxima dessa proteína, com valor aproximado de $5,5 \text{ mg.g}^{-1}$, foi observada no seu ponto isoelétrico. Resultados obtidos na literatura (Vieira *et al.*, 2003; Baki e Nalan, 2002; Zhao *et al.*, 2003) envolvendo proteínas e metais como adsorbatos mostram que os valores de capacidade máxima de adsorção foram obtidos nos pontos isoelétricos. Para o caso da adsorção de HSA (“Human Serum Albumin”) sobre diferentes materiais foi constatado que o máximo de adsorção foi obtido perto da região isoelétrica da proteína. Esta proteína, hidrofílica, adsorve sobre superfícies com o mesmo sinal o que segundo os autores é explicado pelo fato da repulsão eletrostática ser compensada por outras interações desfavorecendo a desidratação hidrofílica. Este tipo de interação é possível quando ocorrem modificações nos arranjos estruturais da proteína.

Para a lisozima a capacidade de adsorção com as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído foi favorecida na faixa compreendida entre 6,5 e 11, aumentando à medida que o valor de pH se aproximava de 11, alcançando a sua capacidade máxima de adsorção, com valor de $4,75 \text{ mg.g}^{-1}$,

também próximo de seu ponto isoelétrico (pH aproximado de 11). As interações eletrostáticas podem explicar a diminuição dos valores de adsorção em pHs abaixo de 6,5, com a repulsão de cargas de mesmo sinal.

A máxima capacidade de adsorção para ambas as proteínas nos seus respectivos pontos isoelétricos podem ser explicadas através do aparecimento de interações do tipo não covalente como van der Waals, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e interações do tipo covalente e do tipo proteína-proteína que acabam se impondo as interações não covalentes do tipo eletrostáticas que normalmente comandam e tem maior influência em condições distantes do ponto isoelétrico na presença de cargas superficiais. Essas interações resultam em valores maiores de adsorção do que em pHs onde as interações eletrostáticas estão presentes (Denizli *et al.*, 1999). Durante a reticulação das microesferas de quitosana com glutaraldeído seu caráter hidrofóbico foi acentuado, conseqüentemente, interações hidrofóbicas e por pontes de hidrogênio devem ser levadas em conta em condições de ausência de carga livre. Se ambas as superfícies são hidrofóbicas a adsorção ocorre por interações hidrofóbicas (Norde e Lyklema, 1989). Ambas as proteínas apresentaram interações com o adsorvente (RG) mesmo em valores de pH desfavoráveis do ponto de vista eletrostático. Estes resultados sugerem então que outras interações estão envolvidas entre as proteínas e as microesferas reticuladas com glutaraldeído durante essas condições.

No caso da lisozima, por exemplo, as capacidades de adsorção podem ser influenciadas por interações do tipo covalente resultado da sua afinidade por grupos N-acetil responsáveis pela degradação das microesferas de quitosana quando na forma natural (Colfen *et al.*, 1998). Quando modificada quimicamente e pelos períodos de contato mencionados nesse trabalho não ocorreu degradação das microesferas de quitosana quando em contato com a lisozima. Outro tipo de interação bem conhecida na literatura é a interação proteína – proteína entre as cadeias de aminoácidos e que pode acontecer em todos os pHs. Assim como a interação dos grupos hidroxila da proteína com os grupos amino desprotonados do adsorvente através de ligações por pontes de hidrogênio.

Para o BSA, por exemplo, as capacidades de adsorção podem ser influenciadas também pelas forças de van der Waals quando em faixas de pH desfavoráveis do ponto de vista eletrostático.

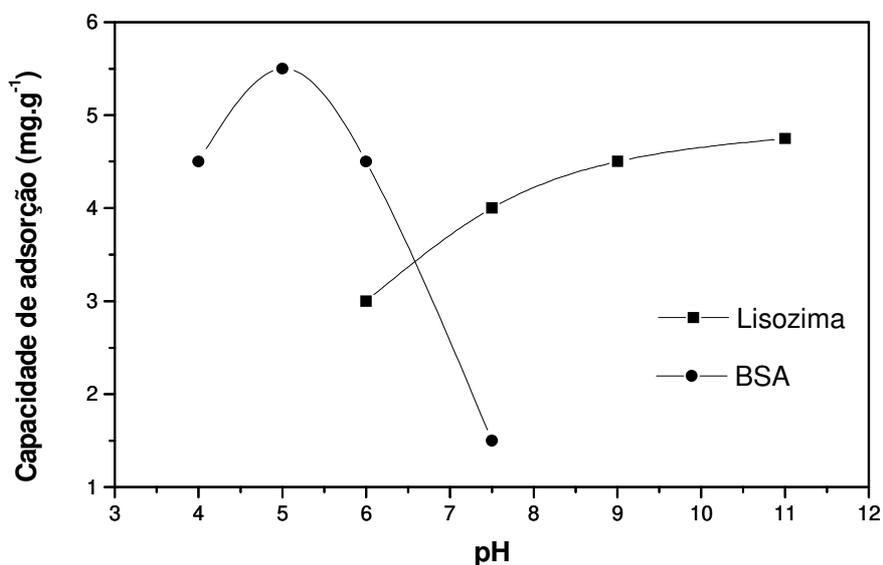


Figura 45: Impacto dos valores de pH sobre a capacidade de adsorção das proteínas BSA e lisozima pelas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

5.4.5 Cinética da adsorção das proteínas

Os resultados de cinética para os experimentos em pH 6 são mostrados na Figura 46. A adsorção da proteína BSA foi mais lenta quando comparada à adsorção da proteína lisozima, com o equilíbrio para o BSA sendo alcançado em aproximadamente 10 h e para a lisozima em 7 h. A agitação foi mantida constante em 30 rpm para todos os experimentos. A adsorção das proteínas BSA e lisozima, segundo o modelo de Mckay e Poots, podem ser constituídas de duas etapas: (a) o transporte das proteínas do meio solúvel até a

superfície das microesferas (incluindo as difusões externas e/ou intrapartículas), (b) a ligação das proteínas aos sítios de adsorção ativados nas microesferas.

Pode-se observar que a cinética de adsorção foi rápida no início, tendendo a um estado de equilíbrio com o decorrer do tempo. Na primeira etapa, a superfície das microesferas estava relativamente livre de proteínas; com isso as proteínas que entraram em contato com a superfície das microesferas ligaram-se instantaneamente aos sítios de adsorção na superfície do adsorvente. A taxa de adsorção foi então controlada pelo número de proteínas de BSA ou de lisozima que difundiram do meio aquoso até a superfície das microesferas. As Figuras 47 e 48 mostram o gráfico de $q(t)$ versus $t^{0.5}$ para os resultados experimentais da Figura 46. Os resultados confirmam a existência e a importância da etapa de difusão controlada na adsorção do BSA e da lisozima nas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Com a análise dos gráficos, foram encontrados os valores da taxa cinética para adsorção em difusão controlada (k_d) de $0,1254 \text{ mg.g}^{-1}.\text{s}^{-0.5}$ e $0,1386 \text{ mg.g}^{-1}.\text{s}^{-0.5}$ para a lisozima e para o BSA, respectivamente. O modelo linear não representou os dados experimentais na etapa final da adsorção das proteínas BSA e lisozima. Este fato sugere que outros fatores começaram a ter papel importante no controle da adsorção. Com uma quantidade cada vez maior de sítios de adsorção ocupados rapidamente pelas proteínas adsorvidas previamente, as proteínas que foram transportadas subsequentemente para a superfície das microesferas tiveram dificuldades de encontrar sítios de adsorção disponíveis e acabaram se ligando as próprias proteínas (Li e Bai, 2005). Essas interações proteína-proteína acabaram formando uma barreira dificultando a difusão interna entre os poros do adsorvente. A adsorção do BSA e da lisozima nas microesferas reticuladas com glutaraldeído, nessa última etapa, diminuíram lentamente e provavelmente transitaram de um processo inicial de difusão controlada para um processo final de ligação controlada (Bayramoglu *et al*, 2003). Uma das possibilidades para diminuir essa limitação seria promover um aumento da agitação durante o processo, diminuindo com isso o efeito de filme nesta região. Entretanto, isto não foi possível devido à baixa resistência mecânica apresentada pelas microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

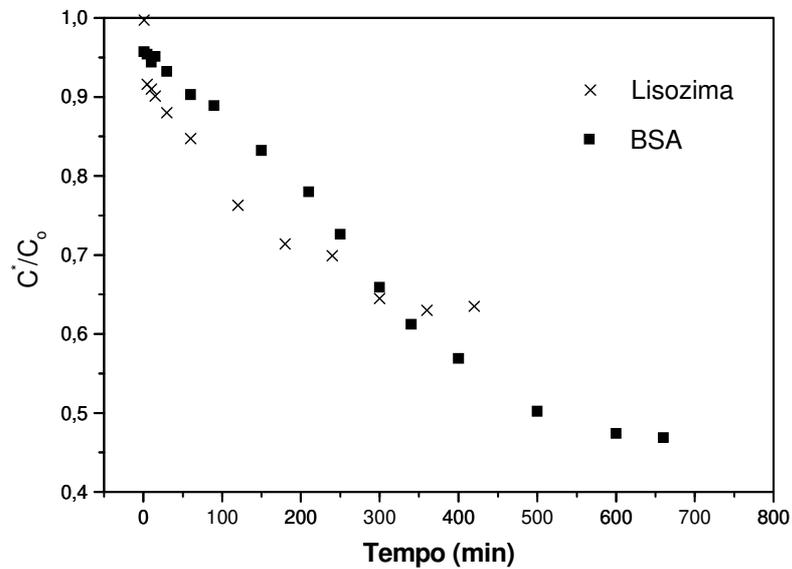


Figura 46. Cinética de adsorção das proteínas sobre as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído no pH= 6 e na temperatura de 20°C.

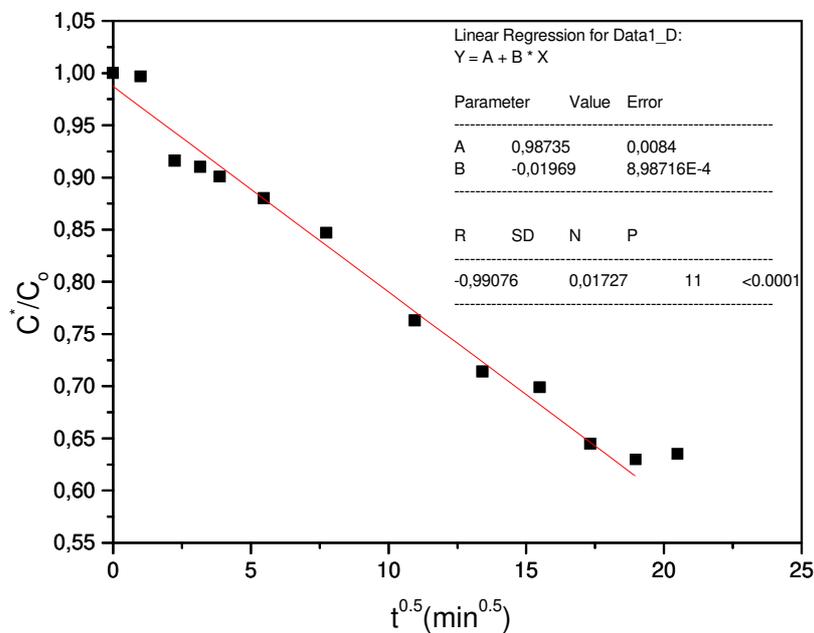


Figura 47: Modelo da cinética de difusão controlada para a lisozima.

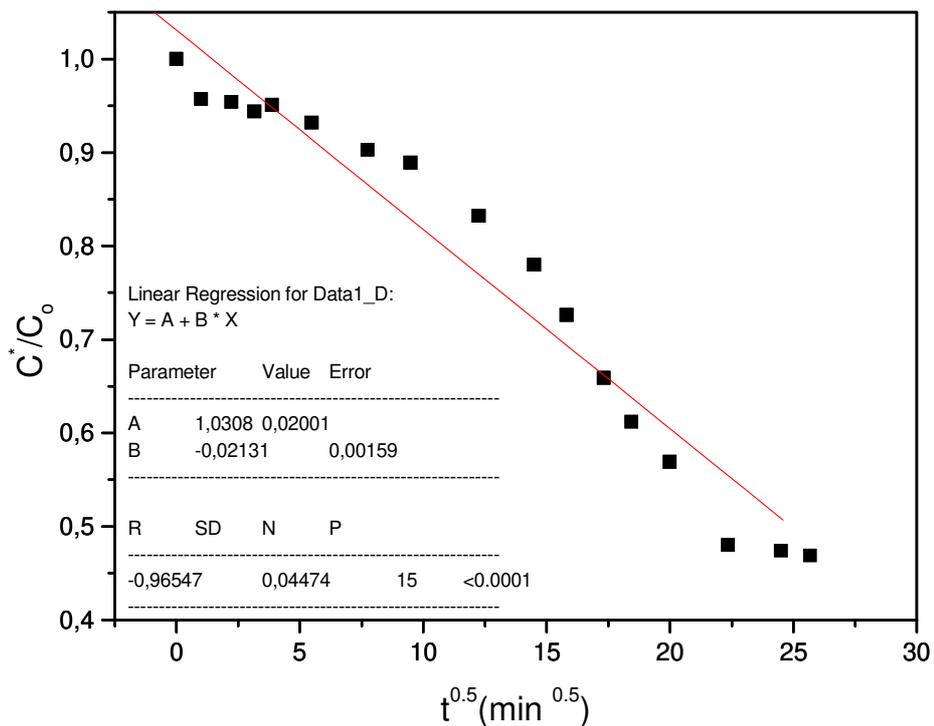


Figura 48: Modelo da cinética de difusão controlada para o BSA.

Os parâmetros de ajuste obtidos usando o modelo de Mckay e Poots para as proteínas estudadas tiveram resultados distintos. No caso das proteínas de BSA o ajuste apesar de estatisticamente satisfatório, $R^2 = 0,96$, não representou fisicamente o comportamento da cinética.

Aplicando o programa “Solver”, utilizando o método dos mínimos quadrados (m.m.q.), para a proteína BSA, foi possível obter um novo ajuste, mostrado na Figura 49, mais satisfatório matematicamente e mais representativo fisicamente. Mostrando que a cinética da proteína BSA diferentemente da proteína lisozima possui duas resistências iniciais à transferência de massa bem distintas: (1) referente à transferência de massa no filme em torno das microesferas e (2) referente a transferência de massa no interior das microesferas. O ajuste pelo modelo de Mckay e Poots não divide essa primeira fase de maneira tão clara. Esse comportamento distinto da molécula BSA pode estar relacionado ao seu tamanho bem maior quando comparado ao da proteína da lisozima. Essa

característica dificulta o seu transporte até a superfície das microesferas e para o interior das mesmas.

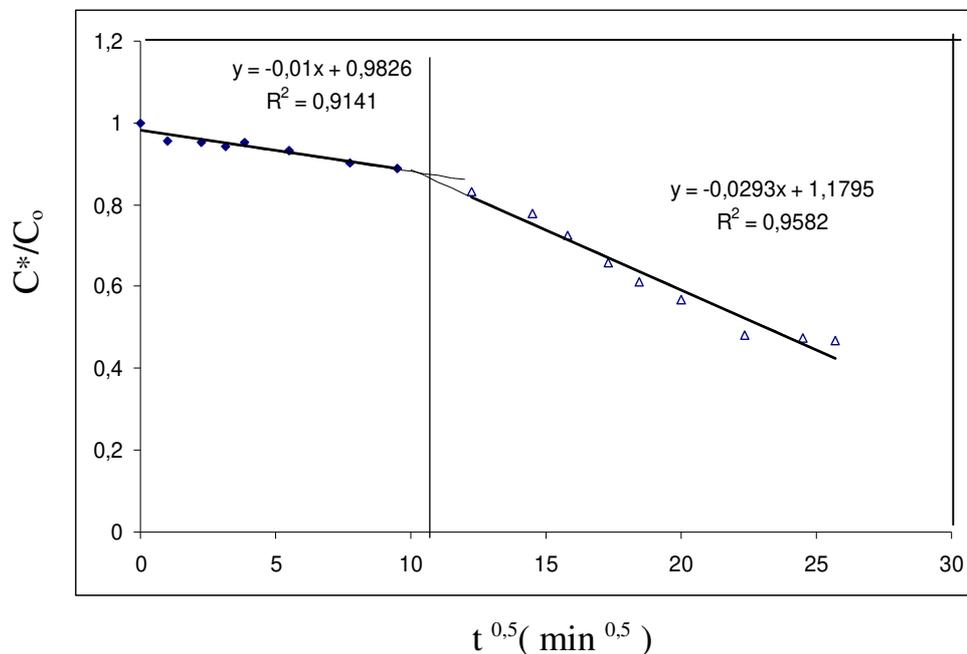


Figura 49: Modelo (m.m.q.) da cinética de transferência de massa inicial para o BSA.

5.4.6 Estudo da dessorção das proteínas

A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada a partir da mudança da força iônica. Nesse estudo, as microesferas, depois de saturadas pela etapa de adsorção, foram lavadas com água deionizada. A segunda etapa foi a eluição propriamente dita utilizando o tampão NaCl 1 M (eluyente). Os resultados mostrados na Tabela 18 indicam uma taxa de dessorção, durante o primeiro ciclo, na faixa aproximada de 23,38 % a 73,23 %. Com objetivo de testar a capacidade de regeneração dos adsorventes, eles foram reutilizados. A capacidade de dessorção diminuiu em aproximadamente 50 % em relação ao primeiro ciclo, independente do tipo de adsorvente. Os resultados estão relacionados à capacidade de regeneração dos sítios de adsorção, hora ligados aos resíduos dos

aminoácidos e hora ligados aos íons Na^+ ou Cl^- do eluente (Gumusderelioglu e Agi, 2004). Portanto, os resultados sugerem que o sistema, nas condições de pH estudadas, não é só dominado pelas interações de natureza eletrostática, mas também por outros tipos de interações.

Tabela 18: Razão de dessorção das proteínas estudadas com as microesferas (MA), (RE) e (RG).

Proteína	Microesferas	Razão de dessorção (%)	Desvio padrão (%)
BSA	RG	33,13	3,14
	RE	34,75	7,52
	MA	23,38	5,7
Lisozima	RG	73,23	5,5
	RE	43,64	16
	MA	32,56	10,4

5.4.7 Curvas de ruptura para o sistema dinâmico

5.4.7.1 Curvas de ruptura para as proteínas BSA e lisozima

As Figuras 50 e 51 mostram as curvas de ruptura e dessorção adimensional das proteínas BSA e lisozima utilizando a coluna de leito fixo já apresentada. Os valores encontrados de adsorção e dessorção estão resumidos na Tabela 19. A capacidade de adsorção e dessorção diminuiu quando comparamos os resultados obtidos pelo método dinâmico e os resultados obtidos em tanque agitado. Essa queda na eficiência pode ser explicada principalmente pelas características intrínsecas apresentadas pela coluna utilizada como: altura de enchimento e velocidade superficial, diminuindo o tempo de residência da solução protéica na coluna e conseqüentemente a transferência de massa entre adsorbato e adsorvente. Quedas na eficiência foram observadas em outros estudos comparativos, utilizando adsorventes de interação hidrofóbica, comparando

sistemas dinâmicos com sistemas de tanque agitado envolvendo proteínas (Fukuzaki *et al*, 1995; Araújo, 1996; Veredas, 2000). Pôde-se observar que a capacidade de dessorção também diminuiu na mesma proporcionalidade que a adsorção quando comparada com os valores obtidos pelo método de tanque agitado. Os resultados corroboraram a limitação que o sistema possui. Limitações impostas pelos parâmetros já citados: tamanho da coluna, velocidade superficial, tempo de residência e conseqüentemente limitação na transferência de massa.

Tabela 19: Quantidade adsorvida e dessorvida para as proteínas nas respectivas concentrações iniciais.

Proteína	Co (mg.ml ⁻¹)	Quantidade adsorvida (mg.g ⁻¹)	Quantidade dessorvida (mg.g ⁻¹)
BSA	0,7	3	1,05
Lisozima	0,7	2,55	0,75

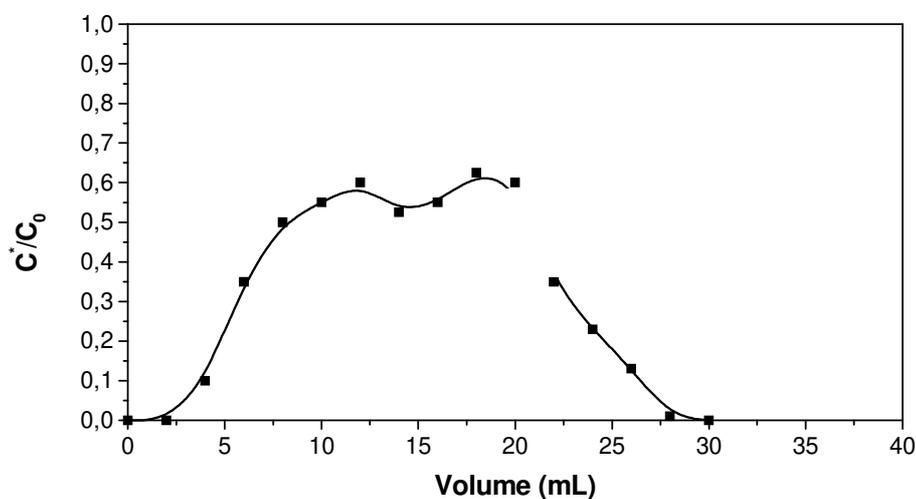


Figura 50: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema BSA, pH=4,8 no tampão fosfato, temperatura de 20 °C e $C_0 = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$.

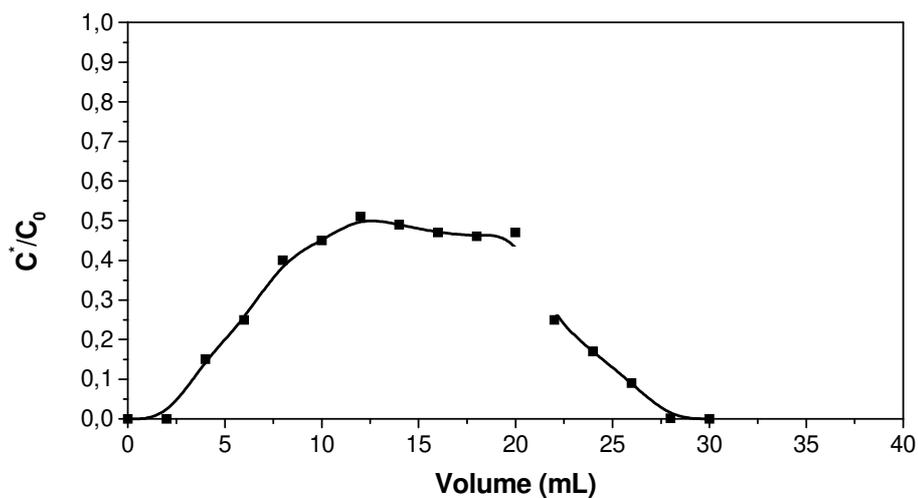


Figura 51: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema lisozima, pH=11 no tampão “Tris”, temperatura de 20 °C e $C_0 = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$.

5.4.7.2 Curvas de ruptura para o extrato real

Extratos provenientes de tratamento industrial são normalmente, soluções multicomponentes, onde ocorrem interações e competições complexas envolvendo ligantes e sítios de adsorção. Com isso, a determinação dos parâmetros capacidade máxima de adsorção e constante cinética de dissociação é mais imprecisa sem a aplicação de modelos matemáticos mais complexos agregando termos de competição e interação (Harrison *et al.*, 1995).

As Figuras 52 e 53 mostram as curvas de ruptura para a condição real.

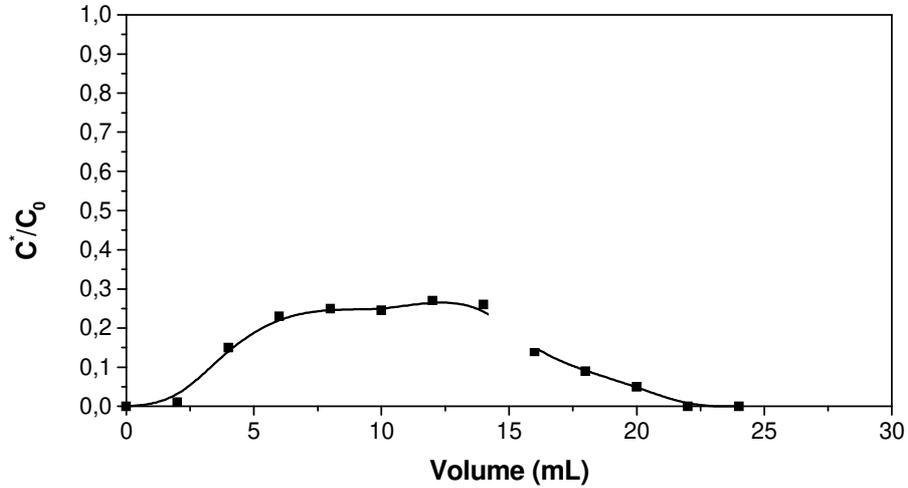


Figura 52: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema real (concentrado protéico), pH= 4,8, tampão fosfato, temperatura de 20°C e $C_0 = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$.

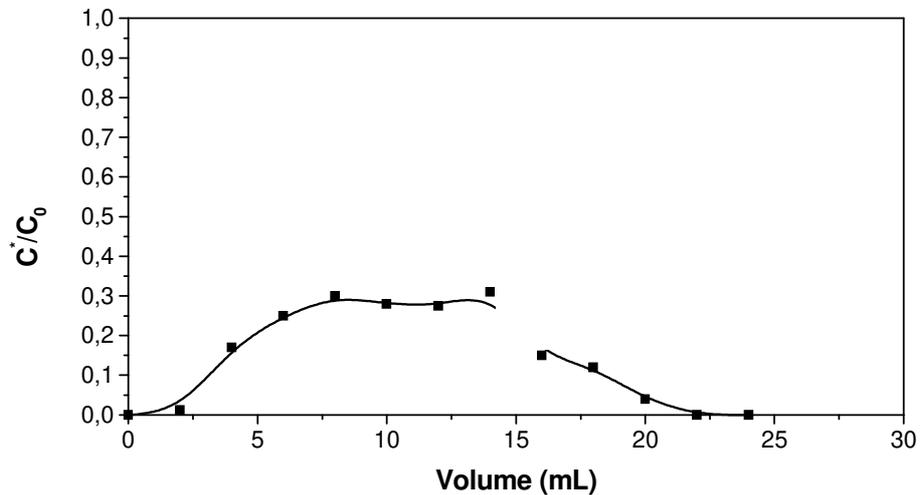


Figura 53: Curva de ruptura e curva de dessorção para o sistema real (concentrado protéico), pH= 4,8, tampão fosfato, temperatura de 20°C e $C_0 = 5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

A Tabela 20 mostra os valores de adsorção e dessorção obtidos para o extrato protéico.

Tabela 20: Quantidade adsorvida e dessorvida para o concentrado protéico (CP) nas respectivas concentrações iniciais.

Proteína	Co (mg.ml⁻¹)	Quantidade adsorvida (mg.g⁻¹)	Quantidade dessorvida (mg.g⁻¹)
CP	0,7	0,46	0,46
CP	5	1,12	0,5

Pôde-se observar para a condição real (extrato real), uma diminuição na capacidade de adsorção obtida, com o uso das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído nas duas condições de concentração inicial e nos respectivos pHs, quando comparadas com as soluções artificiais e seus resultados obtidos em tanque agitado e sistema monocomponente. Esses resultados podem ser explicados pelas complexas interações dos diferentes grupos químicos presentes na condição real. Essas interações e os diversos grupos químicos competem pelos sítios de adsorção presentes na superfície do bioadsorvente dificultando o contato com as moléculas de interesse por efeitos de impedimento espacial, velocidade de difusão, em se tratando muitas vezes de moléculas menores que as proteínas, e efeitos de carga. Foi possível observar que com o aumento da concentração inicial do adsorbato de 0,7 para 5 mg.mL⁻¹ a capacidade de adsorção foi ligeiramente aumentada em função dos próprios efeitos de transferência de massa. A capacidade de dessorção das proteínas adsorvidas também foi bastante reduzida quando comparamos com as soluções artificiais de proteínas.

6. CONCLUSÕES

O processo de atomização e coagulação mostrou-se eficaz e reprodutível para a obtenção de microesferas de quitosana.

As condições adequadas encontradas durante o planejamento de experimentos foram: concentração da solução de quitosana de $0,025 \text{ g.mL}^{-1}$, temperatura da solução de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, abertura do bico de 1 mm , altura bico-solução de 30 cm , pressão de nitrogênio $2,5 \text{ kgf.cm}^{-2}$ e vazão da solução de quitosana 9 mL.min^{-1} . Os valores mais adequados para a continuidade desse estudo foram de $140 \text{ }\mu\text{m}$ para tamanho médio das microesferas e $119 \text{ }\mu\text{m}$ para desvio padrão médio das microesferas.

Após as modificações físico-químicas nas microesferas naturais foram observadas: (1) a manutenção da resistência térmica em relação as microesferas naturais; (2) diminuição da resistência mecânica, principalmente após reticulação com glutaraldeído com sua estrutura comprometida quando aplicadas forças superiores a $0,15 \text{ N}$; (3) após as reticulações com glutaraldeído e epícloridrina foi observado aumento acentuado na estabilidade química à solução aquosa de HCl.

O processo de atomização e coagulação produziu microesferas macroporosas e com boa esfericidade. Após as modificações com anidrido acético a porosidade diminuiu quase 50% em relação às demais alterações.

As microesferas de quitosana modificadas com anidrido acético, epícloridrina e glutaraldeído foram capazes de adsorver com diferentes intensidades as proteínas BSA e lisozima. As isotermas de adsorção mostraram que o modelo de Langmuir se ajustou bem aos dados experimentais obtidos e que as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído tiveram maior capacidade de adsorção quando comparadas com as outras microesferas.

Ficou evidente a influência do pH do meio sobre os valores obtidos de adsorção e dessorção. Os maiores valores de adsorção foram obtidos próximos ao ponto isoelétrico das proteínas. Esses resultados permitem inferir que apesar das interações eletrostáticas serem de fundamental importância no fenômeno de adsorção entre proteínas e bioadsorventes outros tipos de interação devem ser levados em consideração, como as interações hidrofóbicas, por pontes de

hidrogênio, van der Waals, proteína-proteína e até ligações covalentes. Isso pôde ser observado durante a etapa de dessorção também. Essas interações dependeram do tipo de adsorvente e seus respectivos sítios de adsorção, do tipo de proteína e seus respectivos resíduos e da faixa de pH estudada.

O modelo de Mckay e Poots descreveu satisfatoriamente quase todo o processo de adsorção para a proteína lisozima; na etapa final, ficou claro que o fenômeno de adsorção transitou provavelmente de um processo inicial de difusão controlada para um processo final de ligação controlada. No caso do BSA foi observado que o efeito filme tem maior impacto no processo de transporte.

Para o leito fixo as curvas de ruptura e dessorção adimensional das proteínas BSA e lisozima apresentaram valores de capacidade de adsorção e dessorção menores quando comparados aos resultados obtidos pelo método tanque agitado. Essa queda na eficiência pode ser explicada principalmente pelas características intrínsecas apresentadas pela coluna utilizada como: baixo tempo de residência da solução protéica na coluna diminuindo o contato e a transferência de massa entre as proteínas e o adsorvente.

Pôde-se observar para a condição real (extrato real), uma diminuição ainda maior na capacidade de adsorção obtida, com o uso das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, quando comparada com as soluções artificiais e seus resultados obtidos em tanque agitado e sistema monocomponente. Esses resultados podem ser explicados pelas complexas interações dos diferentes grupos químicos presentes na condição real.

7. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Estudo da adsorção do concentrado protéico em colunas maiores possibilitando um tempo de residência maior do adsorbato;
- Estudos de adsorção em banho finito envolvendo a proteína α -lactoalbumina e as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.
- Estudo da adsorção competitiva entre as proteínas BSA, lisozima, α -lactalbumina. Com a utilização, por exemplo, de modelos mais complexos (modelo estendido de Langmuir);
- Adsorção ternária de diferentes espécies com a obtenção de parâmetros de interação e competição.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamson, A .W, Physical Chemistry of Surfaces, 5 ed. Jonh Wiley & Sons, p. 422-425, 1990.
2. Angal, S.; Dean, P.D.G. Purification by exploitation of activity, Protein Purification methods: a practical approach, Oxford Press, p. 245-292, 1995.
3. Araujo, M.O.D. Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de ions, Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas, 1996.
4. Arruda, E.J. Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato. Tese de Doutorado, FEQ- Unicamp, 1999.
5. Arruda, E.J. and Santana, C.C. Phenylboronate – chitosan resins for adsorption of beta-amylase from soybean extracts, Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 105, n.2, p. 829-842, (2003).
6. Baki, E.; Nalan, O. Human serum albumin (HSA) adsorption with chitosan microspheres, Journal of Applied Polymer Science, 86, p. 3035-3039, 2002.
7. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Unicamp, 291p, 1996.

8. Bayramoglu, G.; Yilmaz, M.; Arica, M.Y. Affinity dye-ligand poly(hydroxyethyl methacrylate)/chitosan composite membrane for adsorption lysozyme and kinetics properties, *Biochemical Engineering Journal*, 13, p.35-42, 2003.
9. Beppu, M.M.; Arruda, E.J.; Vieira, R.S.; Santos, N.N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine, *Journal of Membrane science*, 240, p.227-235, 2004.
10. Beppu, M. M; Santana, C.C.. Estudo da calcificação in vitro de quitosana. Tese de Doutorado, FEQ-Unicamp, 1999.
11. Blow, D. M., Birkoft, J. J. and Hartley, B. S. Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin. *Nature* 221; 337-340, (1969).
12. Bohak, Z.; Sharon, N. Biotechnological applications of proteins and enzymes. New York: Academic, Enzyme and Microbial Technology, v. 1, n.4, p. 289-299, (1979).
13. Braek, S.; Anthonsen, T.; Sandford, P. Chitin and Chitosan. London: Elsevier, 835p, 1989.
14. Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. Garland Pub. New York, (1991).

15. Brown J.R. Structure of Bovine serum albumin. Fed. Proc. 34; 591-591, (1975).
16. Bull, H. B. Viscosity of solutions of denatured and of native egg albumin. J. Biol. Chem. 133; 39, (1940).
17. Burke, C. W., Lewis, B., Panveliwalla, D., and Tabaqchali, S. The Binding of Cholic Acid and its taurine conjugate to serum Proteins. Clin. Chim. Acta 32; 207-214, (1971).
18. Campana, S.P.; Signini, R. Efeito de aditivos na desacetilação da quitina, Polímeros: Ciência e Tecnologia, 11, v.4, p. 169-173, (2001).
19. Campbell, D.H.; Luescher, E.; Lerman, L.S. Proc. Nat.Acad.Sci, USA, 37, p.575, 1951.
20. Carter, D. C. and Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. Adv. Protein Chem. 45; 153-203, (1994).
21. Chase, H.A. Affinity separation using immobilized monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer, Chemical Engineering Science, Oxford, 39, 7, p.1099-1125, 1984B.
22. Chase, H.A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, Journal of Chromatography, Amsterdam, 297, p.179-202, 1984A.

23. Chase, H.A . Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, *Journal of Chromatography*, 297, p. 179-202, 1984.
24. Chirachanchai, S.; Lertworasirikul, A; Tachaboonyakiat, W. Carbaryl insecticide conjugation onto chitosan via iodo-chitosan and chitosan carbonyl imidazolid precursors. *Carbohydrate Polymers*, 46, p.19-27, (2001).
25. Clark, A. H., Richardson, R. K., Robinson, G., Ross-Murphy, S. B. and Weaver, A. C. Structure and mechanical properties of agar/BSA co-gels. *Prog. Food Nutr. Sci.* 6; 149-160., (1982).
26. Colfen, H.; Harding, S.E.; Winzor, D.J.; Varum, K. A study of the interaction between chitosan and lysozyme, Abstracts presented at Biopolymer Mixtures, UK, 1998.
27. Davranche, M.; Lacour, S.; Bordas, F.; Bollinger, J.C. An easy determination of the surface chemical properties of simple and natural solids, *Journal of Chemical Education*, 80, 1, p. 76-78, 2003.
28. Debrières, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: characterization and rheological behaviour, *Biological Macromolecules*, 19, p. 21-28, 1996.

29. Denizli, A. ; Kokturk, G.; Yavuz, H.; Piskin, E. Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed bed column with Cibacron Blue F36A – Zn (II) attached poly (EGDMA – HEMA) microbeads. *Reactive Function Polymer*, v. 40, n. 3, p. 195 – 2003, (1999).

30. Duarte, C.G. Purificação e caracterização parciais da lisozima da clara de ovo de aves, Tese de Doutorado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 1999.

31. Fleming, A. Penicillin, Nobel Lecture, Suécia, 1945.

32. Francischetti, J. Remoção de metais pesados em efluentes líquidos através de filtração adsortiva, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2004.

33. FRIEDLI ENTERPRISES Georges-Louis Friedli, PgDip., MSc., PhD. georges-louis@friedli.com .

34. Fujimoto, J.; Reis, E.A .O.; Petri, D.F.S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína, *Química Nova*, v. 25, n.5, p. 757-761, (2002).

35. Fukuzaki, S.; Urano, H, Nagata, K. “Adsorption of Protein onto Stainless-Stell Surfaces”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (1), 6-11 (1995).

36. Furusaki, E.; Ueno, Y.; Sakairi, N.; Nishi, N.; Tokura, S. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin, *Carbohydrate Polymers*, 29, p.29-34, 1996.
37. Giles, C.H.; Smith, D.; Huitson, A. *Colloid Interface Science*, 47, p.755, 1974.
38. Goodman, D. S. The Interaction of Human Serum Albumin with Long-chain Fatty Acid Anions. *J. Am. Chem. Soc.* 80; 3892-3808, (1958).
39. Grzegorzczuk, S.; Carta, G. Adsorption of amino acids on porous polymeric adsorbents – I. Equilibrium. *Chemical Engineering Science*, v. 51, n.1, p. 807-817, (1996).
40. Gumusderelioglu, M.; Agi, P. Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes, *Reactive & Functional Polymers*, 61, p. 211-220, 2004.
41. H. Saito, R. Tabeta and K. Ogawa. High-resolution solid state ^{13}C NMR study of chitosan and its salts with acids, *Macromolecules*. 1987, 20, 2424-2430.
42. Harrison, I.M., Meadows, J.; Robb, I.D., Willians, P. "Competitive adsorption of polymers and surfactants at the solid/liquid interface" *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, 91(21), 3919-3923 (1995).

43. Hidalgo, J.; Hansen, P. M. T. Interaction between food stabilizers and beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 17; 1089-1092, (1969).
44. Hill, L., R.; Nearath, H. *The proteins*, New York: Academic, 1975.
45. Hirano, S.; Ohe, Y.; Ono, H. Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydrate Research*, 47 p.315-32, (1976).
46. Hirano, S.; Sato, N.; Yoshida, S.; Kitagawa, S. Chemical modification of chitin and chitosan, and their novel applications. *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, structure, Property Relations and Applications*, 10, p.163-175, 1987.
47. Huang, R. Y. M.; Moon, G. Y.; Pal, R. N-acetylated chitosan membranes for the pervaporation separation of alcohol/toluene mixtures. *Journal of Membrane Science*, 176, p.223-231, 2000.
48. Hudson, S.; M.; Wei, Y. C.; Hudson, S. M.; Mayer, J. M. & Kaplan, D. L, *Journal of Polymer Science*, 30, p.2187 (1992).
49. IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature: Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. Tentative rules. *J. Mol. Biol.*52; 1-17, (1970).

50. Jacobsen, J. Studies of the affinity of Human Serum Albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *Int. J. Pept. Protein Res.* 9; 235-239 (1977).
51. James, E.A. The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins, Tese de Doutorado, Austrália, 1994.
52. Janson, L.C. Large-scale affinity purification - state of the art and future prospects, *Trends in Biotechnology*, 2, 2, p.31-38, 1984.
53. K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui and T. Watanabe. A new polymorph of chitosan, *Macromolecules*. 1984, 17, 973-975.
54. Kalyanpur, M. Downstream processing in the biotechnology industry, *Molecular Biotechnology*, 22,1, p. 87-98, 2002.
55. Kamei, D.T.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phases aqueous mixed (nonionic-ionic) micellar system, *Langmuir*, v. 18, n. 26, p. 3047-3057, (2002).
56. Kurita, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1, p. 117-120, (1998).

57. Koyama, Y.; Tanigushi, A.; Huang, C.P.; Blakeship, D.W. *Journal of Applied Polymer Science*, 31, p. 1951, 1986.
58. Knaull, Z.L.; Hudson, S.M; Creber, A.M.K. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: proposal of a new reaction mechanism, *Journal of Applied Polymer Science -Part B: Polymer. Physical*, 37, 11, p.1079-1094, 1999.
59. Krigjaman, J.; Jenkins, O. *Product recovery in bioprocess technology*. Leicester Polytechnic, UK, 1992.
60. Kurita, K. *Chemistry and application of chitin and chitosan*. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59:117-120.
61. L. E. Alexander. *X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science*, New York: Wiley-Interscience. 1969. p. 125.
62. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *Journal of American Chemistry Society*, 30, p. 2263-2295, 1916.
63. Lapasin, R.; Prici, S. *Rheology of industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. London, 620p, 1995.
64. Lehninger, A.L. *Princípios de Bioquímica*, The Johns Hopkins University School of Medicine, Ed. Sarvier, São Paulo, 1993.

65. Li, N.; Bai, R. Copper adsorption on chitosan-cellulose hydrogel beads: behaviors and mechanisms, *Separation Purification Technology*, 42, p. 237-247, 2005.
66. Lillo, L.E.; Matsuhiro, B. Chemical modifications of carboxylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 34, p.397-401, 1997.
67. McKay, G.; Poots, R.E. Modelling interactions parameters. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 30, n.2, p. 279, (1980).
68. Mi, F. M.; Shyu, S.S.; Chen, C.T. & Schoung, J.Y.- Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release, *Biomaterials*, 20, 17, p.1603-1612, (1999).
69. Monsan, P.; Puzo, G.; Mazarguil, H. Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines, *Biochimie*, 57, p. 1281-1291, 1975.
70. Monteiro, O . A . C.; Airoidi, C. Some studies of crosslinking glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 2, p. 119-128, (1999).
71. Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. *Chitin Handbook*. Italy: Pergamon Press, 1977.

72. Ngah, W.S.W.; Endud, C.S.; Mayanar, R. Removal of Copper (II) ions from aqueous onto chitosan and crosslinked chitosan beads, *Reactive Functional Polymer*, 50, p. 181-190, 2002.
73. Nogueira, D. A. R. Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos. Dissertação de Mestrado, FEQ-UNICAMP, 1999.
74. Noppe, W.; Haezebrouck, P.; Hanssens, I.; Cuyper, M. Simple two-step produce for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme, *Journal of Chromatography A*, 719, p. 327-331, 1995.
75. Norde, W. Lyklema, J. " Protein Adsorption and Bacterial Adhesion to Solid Surfaces: A Colloid – Chemical Approach" *Colloids and Surfaces*, 38, 1-13 (1989).
76. Peçanha, R.P.; Massarani, G. Dimensão característica e forma de partículas, *Anais XIV ENEMP*, Campinas, 1986.
77. Pereira, J.A.M. Adsorção de β -galactosidase de *scopulariopsis* sp em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala, Tese de doutorado, FEQ-Unicamp, 1999.
78. "Perry's Chemical Engineers' Handbook", seção 16-30, 1999.

79. Qasba, P.K.; Kumar, S. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 4, p.255-306, 1997.
80. Raymond, L.; Morin, F.G.; Marchessault, R.H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 1993, 246:331-336.
81. Roberts, G. A. F. Chitin Chemistry, The Macmillian Press Ltd, London, (1992).
82. Roda, A., Cappelleri, G., Aldini, R., Roda, E., and Barbara, L.. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lipid Res.* 23;2 490-495 (1982).
83. Rodrigues, A.L; Dias, M.M. Laboratório de Processos de Separação e reação (LSRE), Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, 4200-465, Porto, Portugal.
84. Saglam, A.; Yalchinkaya, Y.; Denizli, A.; Arica, M.Y.; Genc, O.; Bektas, S. Biosorption of Mercury by Carboxymethylcellulose and immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, *Microchemical Journal*, 71, p. 73-81, 2002.
85. Schmidt, R. H.; Illingworth, B. L. Gelation properties of whey protein and blended protein systems. *Food Product Development* 12(10); 60-64, (1978).

86. Schulz, G. E.; Schirmer, R. H. Principles of Protein Structure. In 'Springer Advanced Texts in Chemistry'. (Ed. C. R. Cantor), Springer-Verlag, New York, (1990).
87. Stainsby, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chemistry* 6; 3-14, (1980).
88. Stolberg, J. Sorção de compostos policíclicos aromáticos por microesferas de quitosana -PVA contendo ftalocianina de cobre (II) tetrasulfonada, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 107p. 2000.
89. Tolstoguzov, V. B. Functional properties of proteins-polysaccharide mixtures. In *Functional properties of Food Macromolecules*. Eds. J. R. Mitchell and D. A., (1986).
90. Torres, M.A.; Aimoli, C.G.; Beppu, M.M. Investigations into the early stages of "in vitro" calcification on chitosan films, *Materials Science and Engineering:C*, 26, 1, (2006), 78-86.
91. Torres, M.A.; Beppu, M.M.; Arruda, E.J.; Santana, C.C. Viscous and Viscoelastic properties of chitosan solutions and gels, *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 2, (2006), 101-108.

92. Torres, M. A. Propriedades viscosas e viscoelásticas de soluções e géis de quitosana. Dissertação de Mestrado. FEQ-UNICAMP, 2001.
93. Tung, M. A. Rheology of protein dispersions. *J. Texture Stud.* 9; 3-31, (1978).
94. Turková, J. Affinity chromatography, *Journal of Chromatography*, 10, p. 267-291, 1974.
95. Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A . Sorption and desorption studies on chitin gels. *Biological Macromolecules*, 28, p.93-101, (2001).
96. Veredas, V. Purificação da α -lactalbumina a partir do soro de queijo em leito fixo e expandido de resinas, Dissertação de Mestrado, FEQ-Unicamp, Campinas, 2000.
97. Vieira, R. Remoção e recuperação de íons Hg(II) utilizando quitosana natural e reticulada, Dissertação de Mestrado, FEQ-Unicamp, 125p, 2004.
98. Watenpugh, K. D., Sieker, L. C.; Jensen, L. The structure of rubredoxin at 1.2Å resolution. *J. Mol. Biol.* 131; 509-522, (1979).
99. Wright, H. T. Comparison of the crystal structures of cChymotrypsinogen-A and alpha-Chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* 79; 1-23., (1973).

100. Yamaguchi I.; Itoh S.; Suzuki M.; Osaka A. & Tanaka J., The chitosan prepared from crab tendon: II. The chitosan/apatite composites and their application to nerve regeneration, *Biomaterials*, 24, 19, p.3285-3292, (2003).
101. Yoshida, H.; Nishihara H.; Kataoka, T. Adsorption of BSA on DEAE-Dextran; equilibria. *Separation Science and Technology*, v. 29, n.17, p. 2227-2244, (1994).
102. Yoshida, S. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S-200 and purification by diethylaminoethyl ion-exchange chromatography, *Journal of Dairy Science*, 73, 9, p. 2292-2298, 1990.
103. Zeng, X.; Ruckenstein, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. *Ind. Eng. Chem. Res*, 1996, 35:4169-4175.
104. Zeng, X.; Ruckenstein, E. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *Journal of Membrane Science*, 1998, 148:195-205.
105. Zhao, Z.P.; Wang, Z.; Wang, S.C. Formation charged characteristic and BSA adsorption behavior of carboxymethyl chitosan/PES composite MF membrane, *Journal of Membrane Science*, 217, p. 151-158, 2003.
106. Ziegler, G. R.; Foegeding, E. A. The Gelation of Proteins. *Adv. Food Nutri. Res.* 34; 203-298., (1990).

107. Zong, Z.; Kimura, Y.; Takahashi, M.; Yamane, H. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*, 41, p. 899-906, 2000.