



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

JAVAN GRISENTE DOS REIS DA COSTA

**ESTUDO SOBRE A ELETROADSORÇÃO DE METAIS NO
CRIOGEL MONOLÍTICO DE POLIACRILAMIDA
VISANDO A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS**

CAMPINAS

2024

JAVAN GRISENTE DOS REIS DA COSTA

**ESTUDO SOBRE A ELETROADSORÇÃO DE METAIS NO
CRIOGEL MONOLÍTICO DE POLIACRILAMIDA
VISANDO A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
JAVAN GRISENTE DOS REIS DA COSTA, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. AMBRÓSIO
FLORÊNCIO DE ALMEIDA NETO.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

C823e Costa, Javan Grisente dos Reis da, 1992-
Estudo sobre a eletroadsorção de metais no criogel monolítico de poliacrilamida visando a adsorção de proteínas / Javan Grisente dos Reis da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Ambrósio Florêncio de Almeida Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química.

1. Leito fixo. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Adsorção. I. Almeida Neto, Ambrósio Florêncio de, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Study on the electroadsorption of metals in monolithic polyacrylamide cryogel aiming at the adsorption of proteins

Palavras-chave em inglês:

Fixed bed

Affinity chromatography

Adsorption

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ambrósio Florêncio de Almeida Neto [Orientador]

Patricia Fazzio Martins Martinez

Adriano Pinto Mariano

Elizama Aguiar de Oliveira

Ana Paula Brescancini Ribeiro

Data de defesa: 25-04-2024

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3178-3816>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5580924831387528>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por **JAVAN GRISENTE DOS REIS DA COSTA – RA 264230**, e aprovada em 25/04/2024 pela Comissão Examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Ambrosio Florencio de Almeida Neto

Presidente e Orientador

FEQ/ UNICAMP

Profa. Dra. Patricia Fazzio Martins Martinez

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Profa. Dra. Elizama Aguiar de Oliveira

Universidade Estadual de Santa Cruz

Videoconferência

Profa. Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo

PUC - Minas campus Poços de Caldas

Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, por ter chegado a essa primeira etapa;

Ao meu orientador Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto, pela confiança, dedicação, orientação e incentivo durante toda a construção do trabalho;

A minha esposa Mariana, por segurar minha mão nos melhores e piores momentos;

A meus pais, Márcio e Eliana, por todo amor, carinho, confiança e dedicação;

A meus irmãos, Catarine e Jonas, por acreditar sempre terem acreditado em mim;

A todos os familiares, pela enorme torcida;

A CAPES pelo financiamento da pesquisa;

Aos colegas e amigos do LabPEA (Laboratório de Processos Eletroquímicos e Anticorrosão), por toda ajuda e incentivo durante o período inicial do doutorado;

AGRADECIMENTOS

CAPES – “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – BRASIL (CAPES) – Código de Financiamento 001”

RESUMO

Atualmente o Criogel monolítico de Poliacrilamida (PAam) tem apresentado uma crescente aplicabilidade na adsorção e purificação de proteínas devido à sua capacidade de rápida transferência de massa, alta porosidade e baixa contrapressão em altas taxas de fluxo. Sendo utilizado, principalmente, na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), um dos maiores problemas é a dessorção desses metais podendo contaminar as proteínas. Sendo assim, o presente trabalho propôs, de forma pioneira, como alternativa para a IMAC, investigar a eletroadsorção de íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} em uma coluna de PAam, com dois sistemas distintos (batelada e leito fixo), sem utilizar de agentes quelantes para fixar os metais na coluna, para aprimorar a capacidade de purificação de imunoglobulina G e ser eficiente para a imobilização da proteína Spike (aminoterminal da SARS-CoV-2). Dentre os íons citados, o estudo em leito fixo conseguiu de forma efetiva eletroadsorver os íons Cu^{2+} diretamente no PAam, devido ao design do leito ser minuciosamente dimensionado sem a necessidade de um agente quelante para intermediar o processo de adsorção do íon. Pois, o Cu^{2+} apresenta uma camada d⁹ diferente dos outros metais, tornando-o mais propício para realização de ligações coordenadas na estrutura do PAam. Vale ressaltar que, para que os íons Cu^{2+} sejam fixados nos sítios de adsorção formados no PAam é exigida uma voltagem mínima de 3V, independente da vazão aplicada (entre 1 e 5 mL/min). Após o processo de eletroadsorção, foi aplicada a eluição em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,1 mol/L, para verificar a quantidade adsorvida máxima do íon, nesse caso, aproximadamente 16 mg de Cu^{2+} /g de PAam. Para o sistema em batelada, ocorreu um impedimento eletroquímico gerando corrosão no sistema, não sendo possível tornar o PAam um formador de sítios de eletroadsorção. Na avaliação da capacidade de adsorção das proteínas, durante a passagem do tampão de Acetato de sódio, pela técnica de cromatografia de afinidade, grande parte dos íons Cu^{2+} foram dessorvidos, comprometendo a aplicação da técnica. Sendo assim, a inovação do estudo, que traz de forma pioneira a eletroadsorção de metais em PAam, abre um leque de possibilidades para resolver problemas práticos da indústria farmacêutica e aplicações em cromatografia.

Palavras-chave: Eletroadsorção, Leito fixo, Batelada, Cromatografia de afinidade.

ABSTRACT

Currently, monolithic Polyacrylamide Cryogel (PAam) has shown increasing applicability in the adsorption and purification of proteins due to its capacity for rapid mass transfer, high porosity and low backpressure at high flow rates. Being mainly used in immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), one of the biggest problems is the desorption of these metals, which can contaminate proteins. Therefore, the present work proposed, in a pioneering way, as an alternative to IMAC, to investigate the electroadsorption of metallic ions Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} in a PAam column, with two different systems (batch and fixed bed), without using of chelating agents to fix the metals in the column, to improve the purification capacity of immunoglobulin G and be efficient for the immobilization of the Spike protein (amino terminus of SARS-CoV-2). Among the ions mentioned, the fixed bed study managed to effectively electroadsorb the Cu^{2+} ions directly onto the PAam, due to the bed design being meticulously sized without the need for a chelating agent to mediate the ion adsorption process. Because Cu^{2+} has a different d^9 layer than other metals, making it more suitable for making coordinated bonds in the PAam structure. It is worth mentioning that, for the Cu^{2+} ions to be fixed in the adsorption sites formed on the PAam, a minimum voltage of 3V is required, regardless of the flow rate applied (between 1 and 5 mL/min). After the electroadsorption process, elution was applied in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0.1 mol/L, to verify the maximum adsorbed amount of the ion, in this case, approximately 16 mg of Cu^{2+} /g of PAam. For the batch system, an electrochemical impediment occurred, generating corrosion in the system, making it impossible to make PAam a former for electroadsorption sites. When evaluating the adsorption capacity of proteins, during the passage of the sodium acetate buffer, using the affinity chromatography technique, a large part of the Cu^{2+} ions were desorbed, compromising the application of the technique. Therefore, the innovation of the study, which pioneers the electroadsorption of metals in PAam, opens a range of possibilities for solving practical problems in the pharmaceutical industry and applications in chromatography.

Keywords: Electro-adsorption, Fixed Bed, Batch, Affinity Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do princípio da cromatografia de afinidade seguindo as etapas de: A- introdução dos componentes da amostra ; B- Captura do analito-alvo ; C – remoção dos demais componentes da amostra ; D- Eluição do analito e regeneração da matriz.....	22
Figura 2: Mecanismo de produção do monólito de poliacrilamida.....	25
Figura 3: Processo de criogelificação para a formação do PAam.....	25
Figura 4: Representação da Imunoglobulina G com suas regiões Fab e Fc.....	30
Figura 5: Representação da SARS-CoV-2 e o como os protômeros S1 e S2 interagem com o receptor ACE2.....	34
Figura 6: Levantamento da quantidade de artigos publicados nos últimos cinco anos com a palavra “Spike Protein” apenas na seção de “Title, Abstract, Keywords” (Fonte: Autor).....	35
Figura 7: Esquema do processo de clássico de eletroadsorção.....	40
Figura 8: Fluxograma de atividades do trabalho.....	44
Figura 9: Ilustração sequencial da síntese do PAam (Fonte: Autor).....	45
Figura 10: A) Visão transversal do leito de acrílico; B) Visão longitudinal do leito de acrílico; C) Visão transversal da extremidade de aço inox; D) Visão longitudinal superior da extremidade de aço inox; E) Visão longitudinal inferior da extremidade de aço inox.....	47
Figura 11: Esquema do sistema dinâmico de eletroadsorção (Fonte: Autor).....	49
Figura 12: Esquema do sistema de eletroadsorção em batelada.....	50
Figura 13: A: Visão lateral da haste que sustenta o PAam; B: Visão superior das roscas e da parte inferior da haste.....	51
Figura 14: Ilustração da curva de ruptura com a área grifada em cinza a quantidade útil de adsorção em relação ao $(C/C_0 \times t)$	54
Figura 15: Esquema de cromatografia por gravidade para coletar as amostras.....	58
Figura 16: a) PAam não comprimido e totalmente preenchido com água b) Compressão do PAam c) descompressão do PAam após a retirada de água.....	59
Figura 17: Composição mássica do monólito de poliacrilamida.....	61
Figura 18: Varredura do comprimento de onda dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+}	62
Figura 19: Curvas de calibração referentes aos íons a) Cu^{2+} ; b) Ni^{2+} ; c) Co^{2+} e d) Fe^{2+}	62
Figura 20: PAam após o processo de eletroadsorção do Fe^{2+} em leito fixo.....	63

Figura 21: Curvas de rupturas em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Cu^{2+}	65
Figura 22: Curvas de eluição para eluição dos íons Cu^{2+} em leito fixo para diferentes vazões	66
Figura 23: Gráfico de Pareto para o sistema em leito fixo considerando as respostas de a) ZTM e b) qel.....	68
Figura 24: Gráfico de Valores observados vs previstos considerando as respostas de a) ZTM e b) qel.....	69
Figura 25: Superfície de resposta considerando as respostas de a) ZTM e b) qel.....	69
Figura 26: C/C_0 versus tempo para a eletroadsorção de íons Cu^{2+} no PAam com para vazão de 1 mL/min a) curva de ruptura b) início do rompimento do leito.....	72
Figura 27: C/C_0 versus tempo para a eletroadsorção de íons Cu^{2+} no PAam com para vazão de 2 mL/min a) curva de ruptura b) início do rompimento do leito.....	73
Figura 28: Eluição dos íons Cu^{2+} em EDTA 0,1 mol.L ⁻¹ para a) 1 mL/min e b) 2 mL/min	75
Figura 29: Resultados em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Ni^{2+}	78
Figura 30: Resultados em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Co^{2+}	78
Figura 31: Resultados para eluição dos íons Ni^{2+} em leito fixo para diferentes vazões.	79
Figura 32: Resultados para eluição dos íons Co^{2+} em leito fixo para diferentes vazões	79
Figura 33: Representação do sistema de eletroadsorção em leito fixo como um circuito elétrico equivalente.....	82
Figura 34: Resultados dos íons Cu^{2+} em batelada, para 1,5 V variando a temperatura e rotação do sistema	83
Figura 35: Eluição dos íons Cu^{2+} em um sistema de batelada após o desligamento do sistema de eletroadsorção em 1,5 V e após passar por diferentes temperaturas e rotações.....	84
Figura 36: Representação de como o sistema de batelada não engloba o PAam, favorecendo a interação entre os eletrodos.....	85
Figura 37: Demonstração da região de interface do sistema de batelada, onde inicia-se a corrosão do aço inoxidável.....	86
Figura 38: Fotografia da haste de aço inoxidável com o PAam após um experimento com tensões acima de 1,5 V.	86

Figura 39 Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 1 V aumentada 30 vezes	88
Figura 40: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 1 V aumentada 50 vezes.....	88
Figura 41: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 3 V aumentada 30 vezes.....	89
Figura 42: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 3 V aumentada 50 vezes.....	89
Figura 43: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 5 V aumentada 30 vezes.....	90
Figura 44: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 5 V aumentada 50 vezes.....	90
Figura 45: a) Varredura do comprimento de onda da IgG; b) Curva de calibração da IgG	91
Figura 46: Ensaio de cromatografia com IgG após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 3 V.....	93
Figura 47: Ensaio de cromatografia com IgG após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 5 V.....	93
Figura 48: Ensaio de cromatografia com a Proteína Spike após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 3 V.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedade buscadas em um suporte de cromatografia de afinidade.....	37
Tabela 2: Variáveis do planejamento experimental em níveis codificados e reais dos fatores: Potencial (V) e Vazão (mL/min) para aplicação na matriz no Statistica em um sistema de leito fixo.....	49
Tabela 3: Variáveis do planejamento experimental em níveis codificados e reais dos fatores: Temperatura (°C) e Rotação (rpm) para aplicação na matriz no Statistica em um sistema em batelada.	52
Tabela 4: Sequência da introdução das soluções no leito e suas coletas para a análise da adsorção da proteína	57
Tabela 5: Resultados do Planejamento experimental em duplicata para o sistema de leito fixo com o íon Cu^{2+}	67
Tabela 6: Análise estatística para a variável ZTM utilizando a Regressão linear múltipla.	70
Tabela 7: Análise estatística para a variável q_{el} utilizando a Regressão linear múltipla.	70
Tabela 8: Métricas de ajustes e significância do modelo de regressão múltipla para a ZTM e para o q_{el}	71
Tabela 9: Parâmetros cinéticos calculados dos processo de eletroadsorção para 1 mL/min e 2 mL/min.....	77
Tabela 10: Tabela das propriedades dos Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}	80

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Cromatografia de afinidade (AC)	20
2.2 Criogel monolítico de poliacrilamida (PAam)	23
2.3 Cromatografia por afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC)	27
2.4 Imunoglobulina G	28
2.5 Purificação da Imunoglobulina G	31
2.6 Proteína Spike (Aminoterminal da SARS-CoV-2).....	33
2.7 Imobilização da proteína Spike	36
2.8 Eletroadsorção	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Material e equipamentos	43
3.2 Métodos	44
3.2.1 Síntese do monólito de poliacrilamida	45
3.2.2 Soluções dos íons metálicos	46
3.2.3 Sistemas de eletroadsorção.....	46
3.2.3.2 Sistema de eletroadsorção em batelada.....	49
3.2.4 Caracterização do PAam	52
3.2.4.1 Capacidade de expansão (S) e porosidade (ϕ)	52
3.2.5 Microscopia ótica (MO)	53

3.2.6	Análise da eletroadsorção no sistema de leito fixo	53
3.2.7	Eluição dos íons metálicos	56
3.2.8	Análise das curvas de eluição.....	56
3.2.9	Cromatografia de afinidade para a IgG	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Síntese do PAam.....	59
4.2	Capacidade de expansão (S), massa de água retida (mágua) e porosidade (φ)	60
4.3	Sistemas de eletroadsorção	61
4.3.1	Eletroadsorção em sistema de leito fixo	63
4.3.2	Eletroadsorção em sistema de batelada	82
4.4	Microscopia ótica.....	87
4.5	Ensaio de cromatografia de afinidade	91
4.5.1	Ensaio de cromatografia para a IgG	92
4.5.2	Ensaio de cromatografia para a Proteína Spike	94
5	CONCLUSÃO	95
6	SUGESTÕES FUTURAS	96
	ANEXO I.....	110

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Adsorção é um processo físico-químico em que átomos, moléculas ou íons de uma substância se ligam à superfície de um sólido ou líquido, formando uma camada aderida à superfície (TALLMADGE, 1957; MCCABE et al. 1993). A adsorção ocorre devido à interação entre as moléculas adsorvidas e a superfície do material adsorvente, resultando em uma diminuição da concentração das moléculas no meio (TALLMADGE, 1957; MCCABE et al. 1993). Esse processo é amplamente utilizado em diversas áreas, como na remoção de poluentes da água, na separação de misturas gasosas, na produção de catalisadores, entre outras aplicações (COSTA et al., 2023; CHEN; WANG, 2006; RADOVIC; MORENO-CASTILLA; RIVERA-UTRILLA, 2000).

Diversas formas de aperfeiçoar o processo de adsorção vem sendo reportadas na literatura, com o objetivo de redução de custos, redução do tempo do processo, maior capacidade na etapa de recuperação, entre outros. Nesse contexto, a aplicação do potencial elétrico no processo de adsorção, conhecido como eletroadsorção, apresenta duas vantagens significativas: maior capacidade de adsorção, devido a presença de forças eletrostáticas, e maior facilidade de recuperação do material adsorvente, com a alteração no sentido da corrente elétrica aplicada (PUGA et al., 2022; BERALUS et al., 2014; PENG et al., 2011; COSTA et al., 2021). Uma necessidade nesse tipo específico de adsorção é que o material adsorvente seja condutor de corrente elétrica. O principal adsorvente aplicado para tal fim tem sido o carvão ativado (BÁN; SCHÄFER; WENDT, 1998). As principais aplicações da eletroadsorção em pesquisas recentes tem sido na dessalinização de águas marinhas

(COSTA et al., 2022; NOKED et al., 2009) e na remoção de metais de águas naturais destinadas ao consumo humano (BERALUS et al., 2014; JIANG et al., 2015 ; COSTA et al., 2022).

As indústrias farmacêutica e bioquímica cada vez mais buscam técnicas alternativas e complementares para purificação e imobilização de proteínas, que forneçam baixo custo de produção e estabilidade da matriz. Dentre as proteínas utilizadas para testes diagnósticos e uso terapêutico, a Imunoglobulina G (IgG) humana é uma das que mais se destaca devido a sua ampla gama de aplicações clínicas e sua capacidade de reconhecer e neutralizar uma variedade de agentes patogênicos. Para essas aplicações, essa glicoproteína necessita apresentar elevada pureza, acima de 95%, para evitar interferências nos resultados e, na segurança dos usuários (HAMACEK et al., 2023; FIORAVANTE et al., 2022)

O recente surto do SARS-CoV-2 tornou-se uma preocupação significativa para a saúde pública em todo o mundo. Esse novo vírus se liga com as células humanas, por meio de sua extremidade aminoterminal conhecida como proteínas Spike, ao receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2), sendo papel da proteína Spike a ligação com os receptores do hospedeiro, o que a torna um objeto de estudo para o aperfeiçoamento de vacinas e desenvolvimento terapêutico antiviral.

Entre as técnicas aplicadas na adsorção e purificação de proteínas, uma que se destaca em aplicações laboratoriais é a cromatografia de afinidade (DUTTA; BOSE, 2022; HAGE et al., 2023; RODRIGUEZ et al., 2020) . Nessa técnica, uma matriz contendo um ligante específico (imobilizado covalentemente) é carregada com a molécula-alvo. Após a sucessiva passagem de eluentes para remoção de impurezas, a molécula-alvo é recuperada e purificada ao final do processo. A escolha da combinação de matriz e ligante para a cromatografia é feita de forma a otimizar os fatores de especificidade, de seletividade, de reprodutibilidade e de custo operacional, de modo que seja possível obter a pureza desejada, com o máximo de rendimento e sem gerar um custo excessivo (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017 ; DUTTA; BOSE, 2022; HAGE et al., 2023; RODRIGUEZ et al., 2020).

As condições ideais para que a matriz e o ligante em um processo de cromatografia de afinidade ocorram bem dependem de vários fatores, incluindo a natureza da molécula-alvo e do ligante, bem como, das condições físico-químicas da matriz e da solução de

trabalho. As matrizes aplicadas em cromatografias de afinidade devem apresentar alta estabilidade química e física nas condições de operação (vazão, composição, temperatura, pH), grupos funcionais que interajam com os ligantes, elevada área superficial e alta porosidade (DUTTA; BOSE, 2022; HAGE et al., 2023; RODRIGUEZ et al., 2020; MALLIK; HAGE, 2006). Para a cromatografia que envolva a separação e purificação de biomoléculas, é importante que a configuração dos poros da matriz permita o acesso das moléculas aos sítios de adsorção, que cresce quanto menor for a resistência a transferência de massa. Na maioria das matrizes, a transferência de massa é controlada por convecção, o que minimiza a resistência a transferência de massa e favorece a adsorção (ALKAN et al., 2009). Nesse contexto, matrizes poliméricas compostas por um bloco único, chamadas de criogéis, tem apresentado crescente aplicabilidade, devido à sua estrutura macroporosa interconectada. Os polímeros mais utilizados são a poli(acrilamida), glicidil metacrilato e os derivados de acrilamida (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; SERINBAŞ et al., 2020; BABANEJAD et al., 2022)

A síntese de monólito macroporoso pode ser realizada por criopolimerização, técnica que consiste em realizar a polimerização em uma solução aquosa de monômeros em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água. Com isso, os cristais de gelo auxiliam na formação de uma estrutura macroporosa e interconectada, que é de interesse para as aplicações em adsorção e cromatografia (BAKHSHPOUR et al., 2016; ČERNIGOJ et al., 2016).

O ligante imobilizado na matriz possui um papel importante na cromatografia de afinidade. Existem dois tipos de ligantes aplicados: os bioespecíficos e os pseudobioespecíficos (HAGE et al., 2023; PLATELLA et al., 2022) No primeiro grupo estão incluídas diversas biomoléculas, como os antígenos, os anticorpos, as lectinas e os cofatores, por exemplo. Apesar de sua elevada especificidade, esses materiais possuem custo elevado, são difíceis de imobilizar na maioria das matrizes utilizadas e podem sofrer desnaturação com sua utilização, o que leva a perda de eficiência. Por outro lado, os ligantes pseudobioespecíficos, que envolvem os aminoácidos e os íons metálicos, além de apresentarem boa seletividade, possuem maior estabilidade, sofrendo menos degradação com sua utilização e menor desprendimento, e menor custo. Por esses motivos, esse segundo grupo de ligantes tem sido cada vez mais empregado em matrizes cromatográficas

na separação e purificação de enzimas e proteínas variadas (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017; SAVANE et al., 2016; VIJAYALAKSHMI, 1989).

Uma das formas de aprimorar o processo de cromatografia de afinidade é imobilizar íons metálicos na matriz, utilizando um agente quelante. Esse processo é denominado cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*), no qual, se utiliza íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida para seletivamente ligar e purificar proteínas ou peptídeos que possuem grupos fosfato, carboxilato ou histidina, expostos em sua superfície (PLATELLA et al., 2022; VERGARA-BARBERÁN et al., 2019). A interação entre os quelatos dos íons metálicos, como Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{2+} , e as proteínas ocorre por ligações de coordenação (SERINBAŞ et al., 2020; ÇAMBAY KUBAN et al., 2023). Porém, ao utilizar um potencial elétrico em matrizes poliméricas, a migração de íons pode resultar em um aumento localizado da concentração de íons e, em um aumento da densidade de cargas elétricas na região em torno dos sítios de adsorção da matriz polimérica do criogel. Isso pode levar a uma reorganização local da estrutura do material devido às interações eletrostáticas entre as cargas dos íons e as cargas dos grupos funcionais na matriz polimérica (MRAVLJAK et al., 2021; SUN; LIU; YANG, 2020).

Além disso, a aplicação de potencial elétrico pode ser utilizada para controlar a distribuição espacial dos íons adsorvidos na matriz polimérica, permitindo a formação de camadas ou gradientes de concentração de íons no interior do criogel. Essa estruturação controlada pode ter implicações importantes na eficiência de adsorção e na seletividade do criogel para diferentes íons metálicos. Portanto, esses fatores são de grande influência para realizar uma investigação, de forma pioneira, de como o processo de eletroadsorção de metais em um criogel pode ser aplicado como alternativa para a técnica de IMAC, sem a necessidade de se utilizar um agente quelante, possibilitando uma interação PAam-Metal mais intensa, menor custo e menor dessorção dos metais. Ademais, a remoção de um agente quelante no processo e introdução do potencial elétrico tem como objetivo tornar o processo de adsorção de metais mais rápida e reduzir o custo de processos, agregando valor econômico ao processo e movimentando a indústria farmacêutica.

1.1 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo propor e avaliar dois sistemas de eletroadsorção, um de leito fixo e outro em batelada, capazes de eletroadsorver íons metálicos (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{2+}) em criogeis, principalmente o PAam. Para que seja aplicado posteriormente na adsorção, imobilização e purificação de proteínas, com ênfase na IgG humana e a proteína Spike (aminoterminal do SARS-CoV-2).

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese do monólito de poliacrilamida e caracterização por microscopia óptica e capacidade de expansão.
- Avaliação do monólito de poliacrilamida em diferentes potenciais elétricos.
- Eletroadsorção de íons Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{2+} , em batelada (para diferentes agitações e temperaturas) e em leito fixo (para diferentes vazões).
- Análise da capacidade de captura dos íons da solução por eletroadsorção.
- Adsorção da IgG humana e da Proteína Spike por ensaios de cromatografia de afinidade, utilizando o PAam com íons metálicos eletroadsorvidos.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

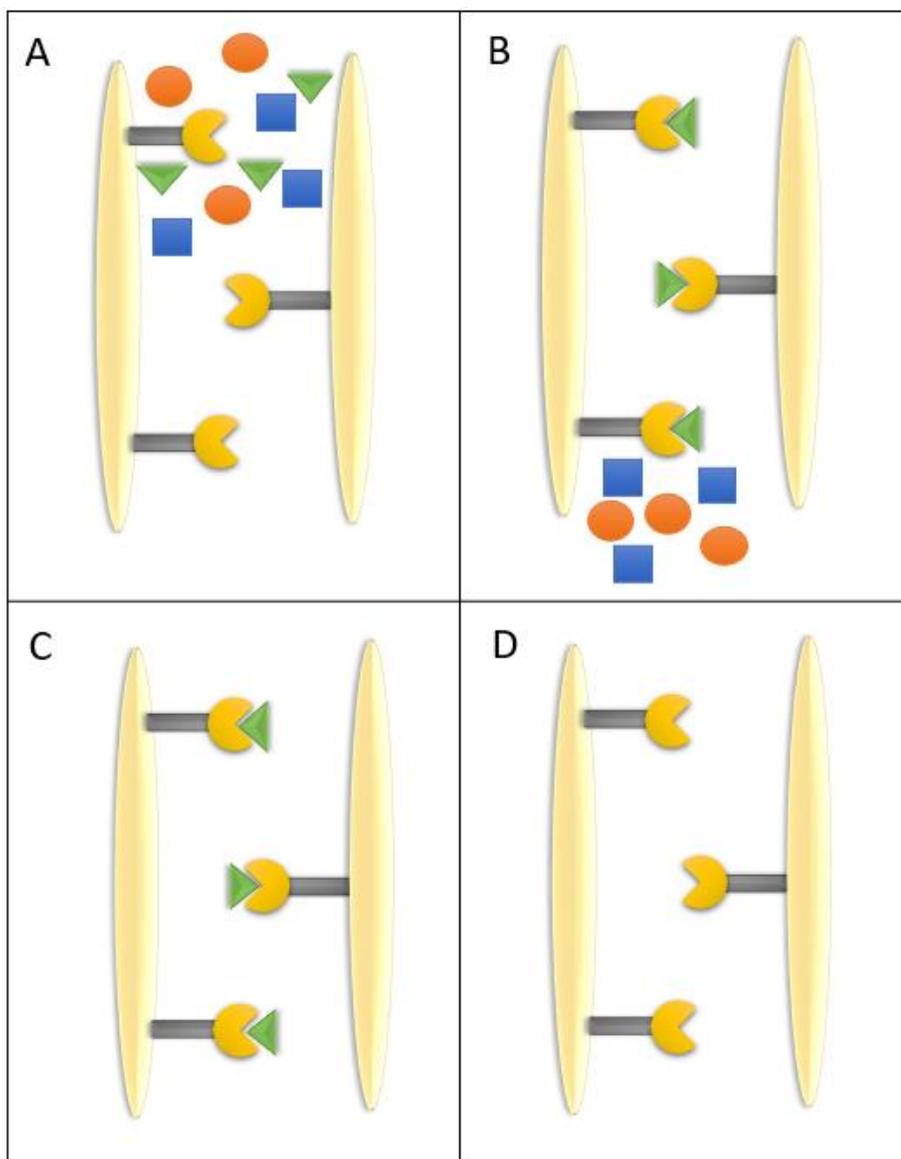
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cromatografia de afinidade (AC)

A cromatografia de afinidade é um método de separação e purificação de biomoléculas que se baseia na interação específica entre uma molécula alvo e uma matriz de adsorção (TSCHELIESSNIG; JUNGBAUER, 2009; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021; PUGA et al., 2020). O processo de cromatografia de afinidade é uma técnica altamente seletiva e eficiente para purificação de proteínas, permitindo a obtenção de proteínas altamente purificadas em um único passo. A escolha do ligante e da matriz sólida adequados e a otimização das condições experimentais são fundamentais para o sucesso da purificação (MALLIK; HAGE, 2006; PFAUNMILLER et al., 2013; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021).

O sequenciamento da técnica é dividido em várias etapas (como mostra a Figura 1), a primeira é a seleção do ligante, que é escolhido na especificidade e afinidade pela molécula-alvo. O ligante pode ser uma proteína ou peptídeo que se liga especificamente à molécula-alvo, um anticorpo que reconhece um epítopo na molécula-alvo ou um ligante pequeno que se liga a um sítio específico na molécula-alvo. Em seguida, a imobilização do ligante, que é imobilizado em uma matriz sólida através de ligações covalentes ou não covalentes. A matriz sólida pode ser pré-ativada ou ativada na presença de uma substância que promove a ligação covalente entre o ligante e a matriz (MALLIK; HAGE, 2006; PFAUNMILLER et al., 2013; TETALA; VAN BEEK, 2010). Após a interação matriz-

ligante estiver completa, em seguida ocorre o carregamento da amostra, que é aplicada na coluna contendo o ligante imobilizado. A molécula-alvo se liga seletivamente ao ligante, enquanto outras moléculas não ligadas passam pela coluna. Essa amostra pode passar por um processo de preparação ou não, depende de suas características (LI et al., 2017; PFAUNMILLER et al., 2013). Essa ligação da molécula-alvo altamente seletiva é conhecida como via-reconhecimento (também chamado de modo “on/off”) e é durante essa etapa que são aplicados experimentos para obter informações sobre a estequiometria, termodinâmica e cinética da interação que ocorre entre o analito alvo e o agente de ligação imobilizado (SPROSS; SINZ, 2011; VERGARA-BARBERÁN et al., 2019). Em seguida, vem a lavagem da coluna, normalmente utiliza-se um tampão de lavagem para remover as impurezas e moléculas não ligadas que possam ter se ligado de forma não específica à matriz. Após remover as principais impurezas, utiliza-se outro tampão para dar sequência ao processo de eluição, em que a molécula-alvo é eluída da coluna usando pelo eluente que interrompe a interação entre a molécula-alvo e o ligante. Esse eluente (ou tampão de eluição) pode ser uma solução de sal, um agente quelante ou um solvente orgânico (LI et al., 2017; PFAUNMILLER et al., 2013). Após a remoção da molécula-alvo, o processo seguinte é chamado de regeneração da coluna cromatográfica, na qual é realizada uma lavagem com o tampão de aplicação para iniciar um novo ciclo. Por fim, ocorre o monitoramento do produto, que é analisado para confirmar a pureza e identidade da molécula-alvo purificada através de métodos analíticos comuns incluem eletroforese em gel, espectrometria de massa e ensaios de atividade biológica (LI et al., 2017; SPROSS; SINZ, 2011; ZHANG et al., 2018).



Fonte: Autor

Figura 1: Representação do princípio da cromatografia de afinidade seguindo as etapas de: A- introdução dos componentes da amostra ; B- Captura do analito-alvo ; C – remoção dos demais componentes da amostra ; D- Eluição do analito e regeneração da matriz

O emprego da cromatografia de afinidade na purificação de proteínas farmacêuticas de alto custo é amplamente aplicado devido ao rigoroso requisito de pureza do produto. Um resultado ótimo de purificação da proteína usando cromatografia pode ser alcançada por parâmetros variáveis, como tipo do tampão, pH, força iônica e taxa de fluxo da fase móvel (LI et al., 2017; MARIAM et al., 2015; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021). Trabalhos relatam que a adsorção pode ocorrer por interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de afinidade

e ligações de hidrogênio a depender do ligante selecionado (CARMIGNOTTO; MOURÃO; BUENO, 2017; DA SILVA et al., 2014; MOURÃO; CARMIGNOTTO; BUENO, 2016).

Além dos ligantes, as modificações químicas na superfície podem proporcionar uma melhor capacidade de adsorção do ligante se incluírem características, estabilidade química, estabilidade mecânica, alteração na hidrofobicidade e modificação da carga superficial (DU; DAN, 2018; MAGDELDIN; MOSER, 2012). Sistemas com sílica têm sido tradicionalmente utilizados, no entanto, esses sistemas sofrem certas desvantagens, como alta contrapressão e longos tempos de processamento. Para evitar esses problemas, materiais monolíticos, que são leitos contínuos, foram introduzidos para separações por afinidade, pois, apresentam para sistemas cromatográficos tradicionais devido a sua capacidade de fornecer uma baixa resistência ao escoamento e uma difusão distribuída de solutos de qualquer tamanho, além de apresentar rápida transferência de massa, alta porosidade e baixa contrapressão em altas taxas de fluxo (LI; LEE, 2009; SPROSS; SINZ, 2011; AYDOĞAN et al., 2018; NEFF; JUNGBAUER, 2011).

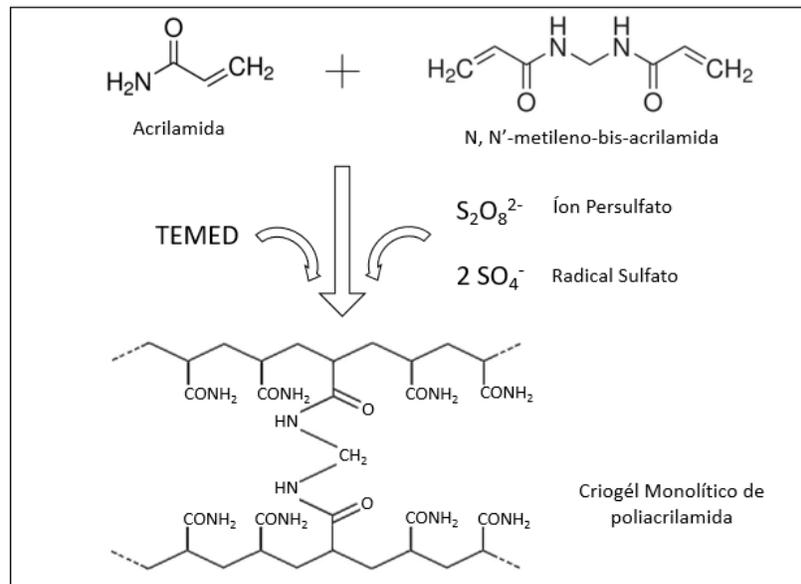
2.2 Criogel monolítico de poliacrilamida (PAam)

Entre os tipos de criogéis monolíticos usados como suportes em cromatografia, um dos que mais se destacam é o criogel monolítico de poliacrilamida (PAam). Este criogel é produzido a partir de um processo de criogelificação, onde envolve o congelamento de uma solução contendo um ou mais monômeros ou polímeros, seguido por uma etapa de sublimação do gelo formado. Esse processo resulta na formação de uma estrutura tridimensional altamente porosa e interconectada, com um tamanho de poro e uma área superficial específica, controlados pelo tamanho e pela concentração dos monômeros na solução inicial.

Para a produção do PAam, as matérias primas bases que devem ser dissolvidas em solução é o monômero de acrilamida e o seu agente reticulante, geralmente o N,N'-metileno-bis-acrilamida. Após sua dissolução, é necessário adicionar o TEMED (Tetrametiletenodiamina), que funciona como catalisador do processo e o Persulfato de

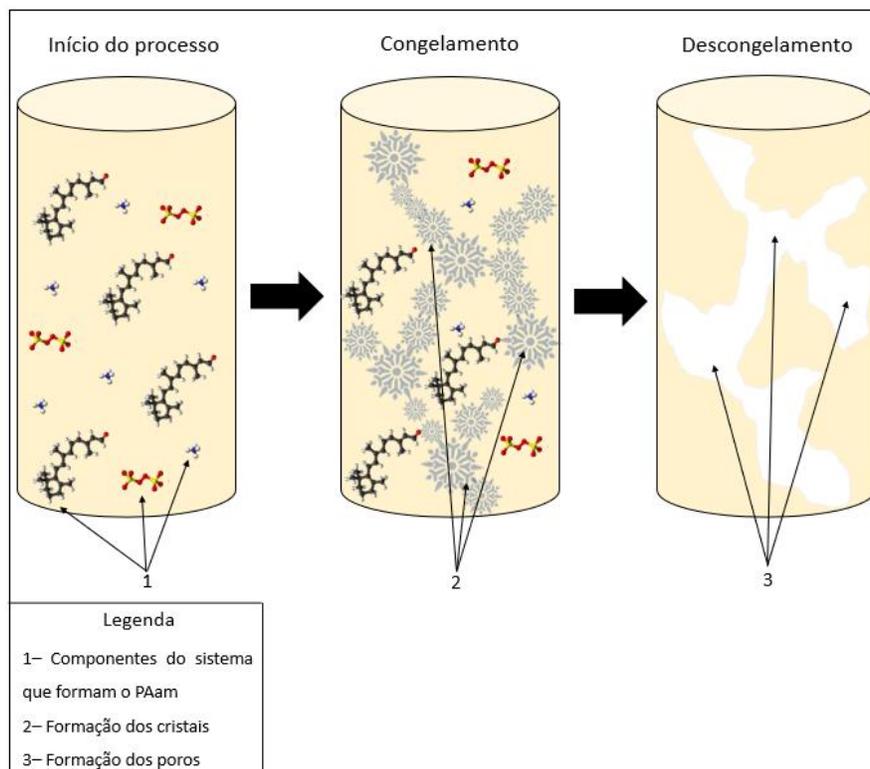
amônio ((NH₄)₂S₂O₈) que é utilizado para que seus íons em solução façam uma reação radicalar com a acrilamida, permitindo que a polimerização ocorra e conseqüentemente, aumentando o número de cadeias na presença do reticulador (Figura 2) (MALLIK; HAGE, 2006; PLIEVA et al., 2009).

Vale ressaltar que o tamanho dos poros do monólito depende pela quantidade de acrilamida que foi utilizada e da quantidade de ligações cruzadas no processo. Após todos os componentes adicionados, a moldagem da solução do criogel é fundamental, pois, as dimensões desejadas definem o seu volume final. O próximo processo é o que realmente define a criogelificação, pois, o molde contendo a solução de poliacrilamida é colocado em um freezer para que seja a solução congelada, esse congelamento faz com que os monômeros sejam interconectados por cristais. Em seguida, o molde congelado é então submetido ao processo de descongelamento ou de sublimação, na qual os cristais formados são descongelados, resultando na formação de uma estrutura altamente porosa de poliacrilamida (SATZER et al., 2018; MALLIK; HAGE, 2006; PLIEVA et al., 2009; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021). O esquema principal da formação do criogel é descrito na Figura 3. Por fim, o PAam é então lavado com água destilada para remover qualquer resíduo de polímero não polimerizado ou iniciador que ainda permaneça na estrutura sem realizar qualquer ligação. Vale ressaltar que, dependendo do objetivo do criogel, outras etapas de modificação química ou funcionalização podem ser realizadas para adicionar grupos funcionais específicos ou para modificar a sua interação com diferentes compostos, incluindo íons metálicos.



Fonte: Autor

Figura 2: Mecanismo de produção do monólito de poliacrilamida.



Fonte: Autor

Figura 3: Processo de criogelificação para a formação do PAam.

Essa característica porosa do PAam o torna uma matriz versátil e eficiente, oferecendo uma série de vantagens para a cromatografia de afinidade, como: Maior capacidade de ligação, facilidade de preparação e maior estabilidade (MARCUZ et al., 2021; MOURÃO et al., 2019; PLIEVA et al., 2009). Uma das principais aplicações do PAam é a sua utilização na eletroforese, funcionando como uma peneira molecular, retardando a migração de proteínas aproximadamente em proporção à sua razão carga-massa, sendo o potencial elétrico como a força de mobilidade da proteína. Como um método analítico, sua vantagem é que as proteínas podem ser visualizadas, bem como separadas, permitindo ao pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas diferentes em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação proteica específica (BOYLE, 2005).

Além da aplicação na eletroforese, na área da saúde, estudos quanto as vantagens do PAam o evidenciam como um componente promissor nessa área (LIU et al., 2010; MAI, 2014; MOURÃO et al., 2019). Zhang et al., (2020b), estudaram a inserção de partículas magnéticas na estrutura do monólito de poliacrilamida, a adição dessas partículas resultaram em diferentes efeitos nas propriedades dos hidrogéis, como o aumento de resistência à tração em 40% (de 0,035 MPa para 0,049 MPa) e uma leve redução no seu intumescimento. Nanocristais Azul da Prússia (PB) ancorados na superfície de esferas porosas de poliacrilamida demonstrou serem seletivos e eficientes para o sequestro do cério radioativo. Devido aos poros esféricos bem interconectados, a permeação do Cs^+ no adsorvente foi facilitada e a capacidade de retenção com o PB atingiu 90% de sua capacidade máxima de adsorção em 30 min, além de ser altamente seletivo na remoção de Cs^+ contendo outros íons como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} (JUNG; CHOI; KO, 2021). Já Marcuz et al., (2021), mostraram que a utilização do ligante orto-fosfo-tirosina (P-Tyr) imobilizado em uma matriz de PAam-alginato se mostrou eficiente para purificar os fragmentos Fab de solução de IgG, com rendimento de 82% e pureza de 95%. Outra forma de tentar melhorar a capacidade de melhor adsorção de proteínas é inserindo metais imobilizados na estrutura do suporte monolítico (VERGARA-BARBERÁN et al., 2019).

2.3 Cromatografia por afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC)

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, do inglês "Immobilized Metal Affinity Chromatography") é um método de purificação de proteínas que utiliza a interação entre resinas contendo íons metálicos imobilizados e grupos específicos presentes nas proteínas. Em que explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelatados imobilizados em um suporte sólido (VERGARA-BARBERÁN et al., 2019; BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Inúmeras são as aplicações analíticas, preparativas e industriais de IMAC, como a separação e purificação de diferentes biomoléculas (peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), a separação de células a partir de extratos biológicos e estudos de estrutura-função de proteínas (PFAUNMILLER et al., 2013; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021; SHIN et al., 2011).

Nesse caso, é fundamental a participação de um agente quelante para a formação de íons metálicos complexados na IMAC, pois, essa interação se baseia na imobilização do íon metálico através de ligações de coordenação com os átomos de N, O ou S presentes na estrutura do agente quelante (HAMACEK et al., 2023; FIORAVANTE et al., 2022) . Os íons metálicos utilizados são normalmente formados pelos metais de transição como Co, Cu, Ni e Zn, que ao serem quelatados recebem os átomos doados do suporte em questão e são denominados de “centro de adsorção”. Sendo assim, o mecanismo de adsorção é baseado em uma interação coordenativa, onde o suporte se comporta como ácido de Lewis (KHAPARDE; TETALA, 2020; LI et al., 2017; PFAUNMILLER et al., 2013).

De forma geral, a IMAC pode ser aplicada em várias áreas e tem se mostrado uma ferramenta muito útil para purificar proteínas que possuem determinados aminoácidos em suas superfícies. (LI et al., 2017; PEREIRA AGUILAR et al., 2020). A seletividade ou a capacidade de adsorção das fases estacionárias IMAC não dependem apenas do quelante imobilizado nas matrizes cromatográficas, mas também da composição da fase móvel (MOURA; YANO, 2012; VERGARA-BARBERÁN et al., 2019 ; HAMACEK et al., 2023). Pois, a retenção de proteínas adsorvidas na fase estacionária do IMAC ocorre devido

à contribuição de várias interações físico-químicas, que podem ser intensificadas ou minimizadas dependendo da constituição da fase móvel. Por essa razão, é extremamente importante escolher a composição adequada da fase móvel antes de iniciar as separações, para obter a melhor recuperação das proteínas-alvo (MOURA; YANO, 2012).

O IMAC tem se mostrado uma excelente ferramenta na área separando toxinas que apresentam essa característica de afinidade iônica metálica, principalmente pelos íons Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} e que também pode ser realizado usando um componente monolítico como suporte (ELVIRO et al., 2019; KHAPARDE; TETALA, 2020; LINGG et al., 2020; MOURA; YANO, 2012; TRANG; JIANG; MARCUS, 2019; VERGARA-BARBERÁN et al., 2019). Elviro et al., (2019) estudaram a preparação e caracterização de um monólito de agarose macroporoso na IMAC, contendo Ni^{2+} para adsorção da albumina de soro bovino (BSA) em pH 7,4. O monólito foi reutilizado para 20 ciclos adsorção/dessorção e foi possível verificar uma porcentagem média de adsorção de 89,65%, em todos os ciclos. Khaparde e Tetala, (2020) investigaram a adsorção da IgG para o Cu^{2+} quelatado no poli(HEMA) e constataram uma leve melhora na capacidade de adsorção de IgG com o íon metálico (27,8 mg/g de monólito) quando comparado sem íon metálico (23,4 mg/g de monólito). Ainda utilizaram o diacrilato de dietilenoglicol como agente de reticulação para melhorar a rigidez do monólito, mantendo a captura eficiente da IgG. Já Bakhshpour et al., (2016) também utilizaram o poli(HEMA) com os íons Cu^{2+} para purificação de IgG, nesse caso, a capacidade máxima de adsorção deste analito foi 72,3 mg/g de monólito, e a pureza da IgG atingiram valores próximos a 90%.

Uma precaução desses e outros suportes de IMAC é a necessidade de regeneração o leito, sem que ocorra a dessorção dos íons quelatados (PFAUNMILLER et al., 2013; PODDAR; SHARMEEN; HAGE, 2021; ZHANG et al., 2018). Sendo assim, aprimorar a capacidade de fixação de íons metálicos em suportes monolíticos pode ser fundamental para melhorar os processos de imobilização e purificação de proteínas.

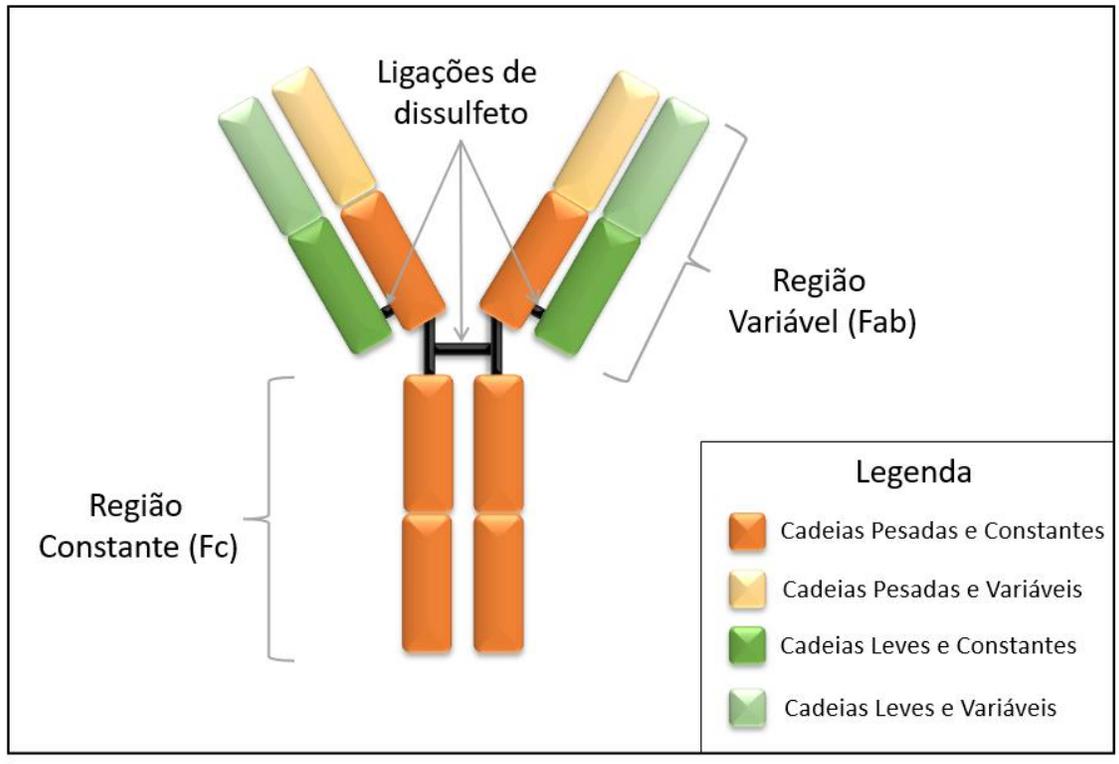
2.4 Imunoglobulina G

O plasma sanguíneo humano é um meio complexo e contém proteínas que possuem valor econômico (KOVAC et al., 2008). Dentre os tipos de proteínas, as ligadas ao sistema

imunológico recebem destaque e alto valor agregado, são elas as imunoglobulinas (Igs). Existem cinco classes de Igs no soro humano: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que são glicoproteínas solúveis secretadas pelos linfócitos B no sistema imunológico com o objetivo de neutralizar antígenos (POURROSTAM-RAVADANAQ; SAFA; ABBASI, 2020; BOYLE, 2005). Essas Igs se diferenciam quanto a estrutura e sequenciamento de aminoácidos, conferindo massa molecular, ponto isoelétricos e ações variáveis no sistema imunológico (GHORBANI; KOMPANY-ZAREH; TAHMASEBI, 2021; MAHMOUDI GOMARI et al., 2020).

Dentre as imunoglobulinas citadas, IgG é responsável por uma grande parte da imunidade humoral contra infecções. Diferentemente das outras classes de imunoglobulinas, a IgG é a mais abundante no sangue, representando cerca de 75% de todos os anticorpos circulantes no corpo humano (LI et al., 2002). Além disso, a IgG é capaz de atravessar a barreira placentária, fornecendo imunidade passiva para o feto durante a gestação. Além disso, a IgG possui uma meia-vida mais longa do que outras classes de anticorpos, o que significa que ela permanece no sangue por mais tempo, fornecendo uma imunidade mais duradoura contra infecções.

A estrutura típica da IgG tem a forma similar a letra “Y” (Figura 4), dividida em duas regiões contendo uma massa molecular de aproximadamente 150 kDa que são unidas por ligações de dissulfeto. Composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), cada cadeia pesada é composta por quatro domínios, enquanto cada cadeia leve contém dois domínios. A região terminal da molécula, chamada de fragmento Fc (*fragment crystallizabl*), é responsável pela ligação com receptores celulares do sistema imunológico, enquanto a região variável, chamada de fragmento Fab (*fragment antigen-binding*), é responsável pela ligação com o antígeno alvo (GHORBANI; KOMPANY-ZAREH; TAHMASEBI, 2021; MAHMOUDI GOMARI et al., 2020). Vale conceituar que essa ligação que ocorre entre um único sítio e o antígeno é denominada afinidade, e quando os dois sítios a afinidade se ligam simultaneamente a dois antígenos idênticos a força total de interação aumenta e esse termo é chamado de avidéz (GHORBANI; KOMPANY-ZAREH; TAHMASEBI, 2021; MAHMOUDI GOMARI et al., 2020; BOYLE, 2005).



Fonte: Autor

Figura 4: Representação da Imunoglobulina G com suas regiões Fab e Fc.

A IgG é capaz de atuar de diversas formas no sistema imunológico, incluindo a neutralização de toxinas, a opsonização de bactérias para facilitar sua fagocitose por células do sistema imunológico, e a ativação do sistema complemento para destruir patógenos (CHARLES A JANEWAY et al., 2001; COBB, 2021). As principais aplicações da IgG incluem sua utilização para a imunoterapia, administração de drogas, testes para realização de diagnósticos, ou como uso terapêutico para pacientes imunodeficientes primários e secundários no que diz respeito a doenças imunológicas como aloimunização, artrite reumatoide, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), síndrome de Kawasaki e até mesmo câncer (CHARLES A JANEWAY et al., 2001; COBB, 2021). A IgG também é utilizada em testes de diagnóstico, como o teste de ELISA, para detectar a presença de antígenos específicos no sangue (ÇULHA et al., 2015; MA et al., 2017; POURROSTAM-RAVADANAQ; SAFA; ABBASI, 2020).

Entretanto, essas aplicações requerem uma alta pureza da IgG (acima de 95%) para aumentar a confiabilidade nos resultados e, principalmente, a segurança dos usuários. Por isso, são necessários grandes volumes de IgG para fornecer níveis fisiológicos eficazes no

tratamento de algumas das doenças citadas, o que associa a IgG a um alto custo de produção (CASTILHO et al., 2008; FASSINA et al., 2001). Desta maneira, buscar alternativas ao processo de separação e purificação de IgG do plasma sanguíneo é extremamente importante.

2.5 Purificação da Imunoglobulina G

Pesquisadores de biotecnologia e biofarmacêutica têm dedicado recursos consideráveis para estudar a produção em larga escala de anticorpos altamente purificados para uma ampla gama de aplicações. As imunoglobulinas estão entre os biofármacos mais valiosos devido sua aplicação em tratamentos terapêuticos (FERRER-MIRALLES et al., 2015; SALAMANCA et al., 2019; LEAVY, 2010). Considerando o alto nível de pureza, que é essencial para esses anticorpos terapêuticos e outras aplicações biomédicas, o desenvolvimento dos processos de produção e purificação econômicos podem ser uma tendência para acompanhar no mercado farmacêutico em evolução (GHORBANI; KOMPANY-ZAREH; TAHMASEBI, 2021).

Diversos métodos foram desenvolvidos para o enriquecimento ou purificação da IgG e de outros anticorpos presentes no plasma humano. Entre eles estão os métodos cromatográficos, como cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de afinidade (AC), cromatografia de imunoafinidade, precipitação por adição de etanol, polietilenoglicol (PEG) ou sal, crioprecipitação e filtração em gel (HABEEB; FRANCIS, 1984; LIU et al., 2003; LAURSEN et al., 2014; PURWANTO; RISKA, 2019; MAGDELDIN; MOSER, 2012). A cromatografia de afinidade se tornou o principal método para a purificação de anticorpos monoclonais, enquanto os procedimentos de purificação para anticorpos policlonais provenientes do plasma tradicionalmente incorporam etapas de precipitação combinadas com cromatografia de troca iônica (HOFBAUER et al., 2012; KELLEY, 2007; LOW; O'LEARY; PUJAR, 2007; STROHL, 2009).

Características como alto rendimento, alta seletividade e natureza automatizável tornaram os métodos cromatográficos a primeira escolha para vários setores industriais, bem como o ramo biomédico. Pois através deste método, a proteína de interesse é purificada em virtude de suas características de ligação específicas com ligantes imobilizados (DA SILVA et al., 2014)

Na literatura, os principais ligantes para a purificação da IgG são as proteínas A e G, pois se ligam especificamente à região Fc da IgG, (HOFBAUER et al., 2012; MAGDELDIN; MOSER, 2012). Entretanto, a forma de obtenção dessas proteínas é complexa e apresenta um custo elevado. Diversos estudos tentam minimizar os custos de purificação da IgG utilizando essas proteínas como ligantes, mas esbarram na baixa capacidade e eluição em condições severas (KUMAR; MINA, 2016; LEAVY, 2010; HOFBAUER et al., 2012; LEE; KANG; LEE, 2021). Huang et al. (2021) investigaram a reutilização das quatro resinas H-AFV, H-diAFV, H-triAFV e H-tetAFV, essas resinas de afinidade foram capazes de isolar IgG com alta pureza, com a capacidade de ligação estática as resinas permanece acima de 75% após 10 ciclos. Entretanto, a proporção molar observada para todas as quatro resinas foi menor do que o número correspondente de domínios de ligação, sugerindo que houve uma limitação no reconhecimento devido ao efeito estérico do espaço. Em outras palavras, a menor proporção molar indica que nem todos os sítios de ligação disponíveis nas resinas foram capazes de se ligar aos ligantes de interesse, devido à falta de espaço suficiente para acomodá-los, o que é conhecido como efeito estérico.

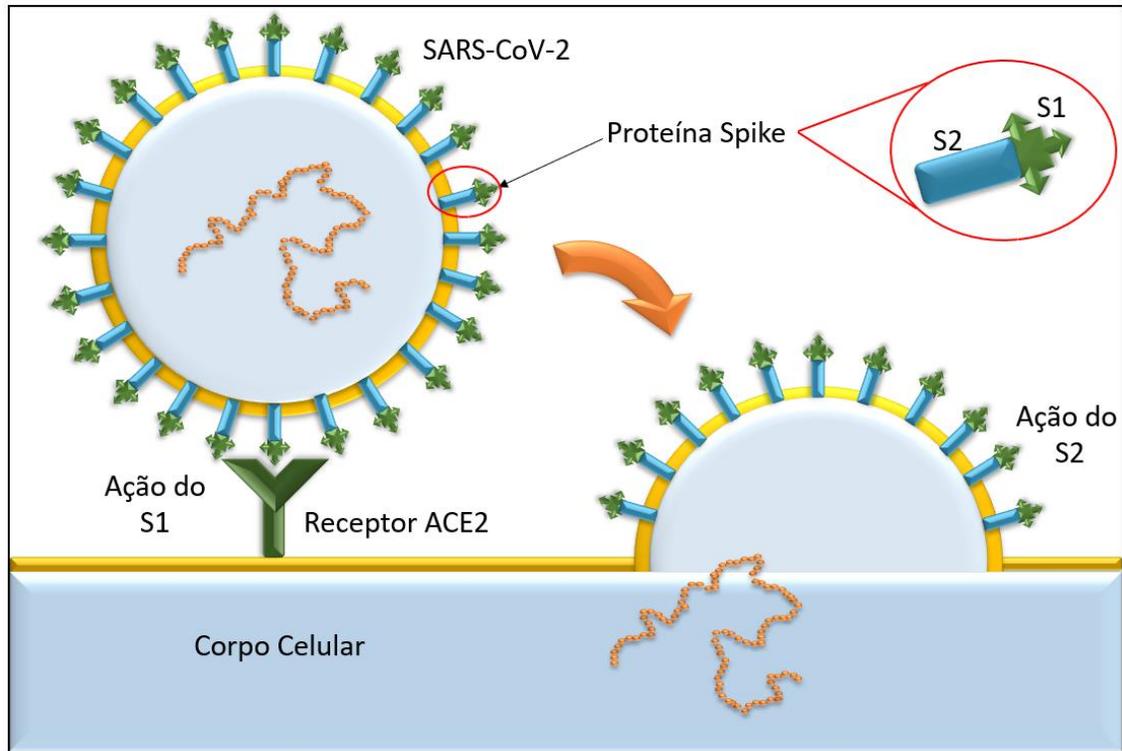
Diversos estudos utilizam criogéis como fase estacionária para a purificação de proteínas devido a seus poros grandes, baixa queda de pressão e tempo de residência muito curto para adsorção e eluição (ÇULHA et al., 2015; DAOUD-ATTIEH et al., 2013; MOURÃO et al., 2019; SUN et al., 2012). Também é visto que esses suportes monolíticos quando adicionados grupos ionizáveis em sua estrutura fornecem ligação seletiva nas cavidades impressas com IgG, a depender da mudança do valor de pH (PERÇIN; IDIL; DENIZLI, 2019). Salimi et al., (2018) ao utilizarem microesferas monodispersas de SiO₂ [Mag (SiO₂)] ligado à proteína A, com concentrações inferiores a 50 mg/mL, observaram que o isolamento de IgG do soro de coelho apresentou pureza superior a 95%. Ao utilizar variações de Cu²⁺ quelatados no criogel de polihidroxietilmetacrilato (PHEMA) com 10% de polietilenoimina (PEI), a purificação de IgG humana foi alcançada e obtiveram uma capacidade máxima de adsorção de 72,28 mg/g de IgG humana (BAKSHPOUR et al., 2016). Prasanna e Vijayalakshmi (2010) utilizaram os íons Cu²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ na adsorção de IgG e esse suporte apresentou uma alta capacidade de ligação do Cu²⁺ e Ni²⁺, 14-16 mg/mL e 7-9 mg/mL, respectivamente para a IgG humana. Entretanto, para o Zn²⁺ a capacidade de

ligação foi de apenas 0,5 mg/ml. Sendo assim, para aprimorar a capacidade de ligação dos metais com a IgG, utilizar o potencial elétrico pode ser tornar uma saída viável na busca por componentes que possam auxiliar a purificação da IgG.

2.6 Proteína Spike (Aminoterminal da SARS-CoV-2)

Nenhum outro vírus após o surto da pandemia de influenza de 1918 afetou tão drasticamente a população mundial quanto a síndrome respiratória aguda grave-coronavírus-2 (SARS-CoV-2), que desde novembro de 2019 já infectou mais de 230 milhões de pessoas, além de resultar em quase 5 milhões de mortes até o presente momento. O veículo de transmissão de vírus são gotículas de aerossol com um diâmetro de ~ 1–5 μm , isso garante uma alta eficiência na sua disseminação que pode ser reduzida em consequência do distanciamento social e do uso de máscaras (ZHANG et al., 2020; MÜLLER et al., 2021). Entretanto, para os contaminados o quadro clínico da SARS-CoV-2 (ou COVID-19), é variável, oscilando de um curso assintomático à síndrome do desconforto pulmonar grave com altas taxas de mortalidade. Os sintomas mais frequentes da SARS-CoV-2 são febre, tosse e dispneia, mas sintomas gastrointestinais também foram descritos (CLARK et al., 2021; HUANG et al., 2020).

O SARS-CoV-2 tem morfologia globular com diâmetro de 118-136 nm e pequenas projeções de 9-12 nm que se estendem do envelope de vírus formando o seu domínio de ligação ao receptor (RBD) (MÜLLER et al., 2021). A Figura 5 mostra que o SARS-CoV-2 entra nas células humanas quando o RBD da proteína Spike entra em contato com o receptor celular ACE2 (Enzima conversora da angiotensina 2) o RBD do vírus apresenta duas unidades estruturais (protômeros S) presentes nas pontas da proteína que apresentam ações distintas na imersão do vírus no corpo celular (CLARK et al., 2021; MÜLLER et al., 2021). O protômero S1 é responsável pela primeira conexão entre o RBD e o ACE2 e o S2 medeia a fusão das membranas virais com a célula hospedeira, impedindo que a célula rejeite o restante da estrutura do vírus (CLARK et al., 2021; DJOMKAM et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020)



Fonte: Autor

Figura 5: Representação da SARS-CoV-2 e o como os protômeros S1 e S2 interagem com o receptor ACE2

A ACE2 está presente nas células do endotélio vascular do pulmão, do coração, do intestino e do rim, além disso apresenta um polimorfismo que explicaria em partes porque as pessoas reagem de forma tão diferente à doença, em diferentes nacionalidades e etnias (HOFFMANN et al., 2020). O polimorfismo da ACE2 foi importante para diversas pessoas, pois a maioria delas apresentou quadros clínicos leves mostrando uma imunização natural contra o vírus. A mutação que aflige toda a população mundial é a do SARS-CoV-2, que é impulsionada principalmente por conta de seu protômero S1 ser altamente flexível e adaptável as resistências impostas pelo sistema imunológico (DJOMKAM et al., 2020). De acordo com Upadhyay et al. (2021), as mutações ocorrem mais comumente na ligação ao receptor domínio da proteína Spike e geram a proteína maior estabilidade, atividade e potencial de escape de anticorpo. Esses múltiplos fatores contribuem para a seleção natural de variantes, e todos eles precisam ser considerados para compreender a evolução do vírus.

A Figura 6 mostra como o crescimento de pesquisas científicas relacionadas a proteína Spike aumentou significativamente nos últimos 2 anos em comparação com os 3 anos anteriores. Ainda em 2020 a ciência protagonizou um recorde de produção de vacinas que teve início já em 2021. Porém, a imprevisibilidade das mutações emergentes da SARS-CoV-2 não podem ser descartadas a longo prazo, o que gera a possibilidade de buscar alternativas para impedir que a proteína Spike consiga interagir com facilidade nas células humanas. Sendo assim, a identificação e isolamento de agentes eficazes para prevenir ou tratar o SARS-CoV-2 é uma necessidade global urgente para potenciais aplicações clínicas e, para orientar o projeto de vacinas para as próximas gerações (CLARK et al., 2021; HOFFMANN et al., 2020; MÜLLER et al., 2021).

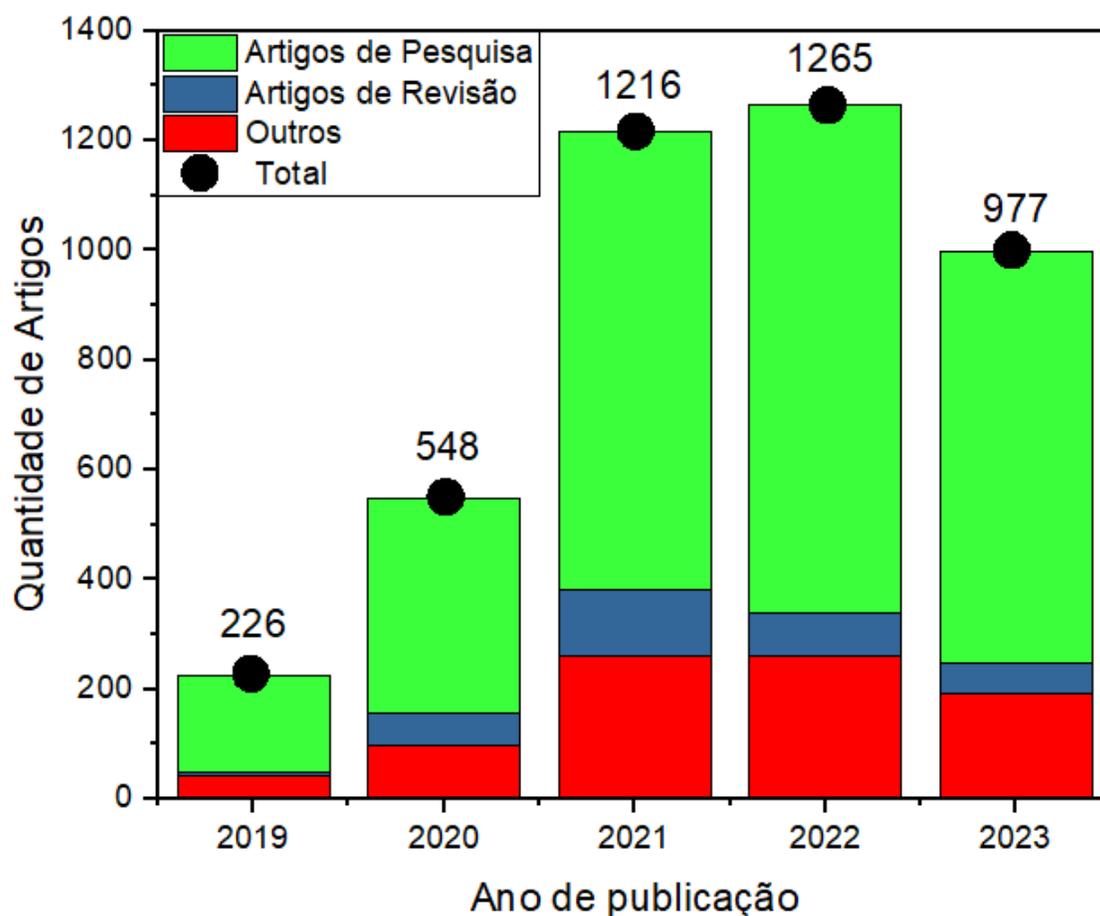


Figura 6: Levantamento da quantidade de artigos publicados nos últimos cinco anos com a palavra “Spike Protein” apenas na seção de “Title, Abstract, Keywords” (Fonte: Autor).

2.7 Imobilização da proteína Spike

Uma molécula ou célula é referida como imobilizada, se sua mobilidade no espaço de reação for artificialmente restringida (BENEOV; KRLOV, 2012). O tratamento para restringir a mobilidade de algumas proteínas tem mostrado resultados clínicos promissores em várias doenças infecciosas, incluindo influenza, HIV e Ebola (DEARLOVE et al., 2020). As técnicas mais comumente usadas para imobilização de proteínas em suportes sólidos são adsorção, aprisionamento, ligação covalente e ligações cruzadas. Dentre as técnicas, adsorção se destaca como a mais simples e barata que envolve interações físicas geradas entre o suporte sólido e a proteína-alvo, podendo incluir forças de van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio. As propriedades que os suportes podem apresentar são distintas a depender do tipo de molécula que se deseja adsorver, para a adsorção de proteínas, a busca de um suporte ideal na aplicação de proteínas imobilizadas está descrita na Tabela 1 (TRINDADE XIMENES et al., 2021; FURLANI et al., 2020 ; TETALA; VAN BEEK, 2010). Alguns artigos destacam a importância de propriedades como a estabilidade, a uniformidade da imobilização, a especificidade da ligação, a acessibilidade da proteína e a capacidade de regeneração do suporte para a imobilização de proteínas em diferentes contextos de aplicação (LI; LEE, 2009; TETALA; VAN BEEK, 2010).

Tabela 1: Propriedade buscadas em um suporte de cromatografia de afinidade

Propriedades	Explicação
Alta especificidade de ligação	Necessária para permitir a separação de uma proteína de interesse a partir de uma mistura complexa de proteínas.
Alta capacidade de ligação	A capacidade de ligação suficientemente alta é importante para permitir a purificação eficiente de quantidades razoáveis de proteína.
Estabilidade química e física	Essencial para garantir a reutilização do suporte de cromatografia de afinidade. Pois, o suporte deve ser capaz de suportar várias lavagens com diferentes soluções de limpeza e armazenamento adequado.
Baixa afinidade não específica	Importante para minimizar a ligação de outras proteínas ou componentes da amostra, que podem interferir na especificidade de ligação da proteína de interesse.

Fonte: Li & Lee (2009), Magdelin & Moser (2012,), Tetala & van Beek (2010).

A compreensão mecanicista da adsorção de partículas virais em superfícies sólidas pode, em última análise, contribuir para conter a propagação do SARS-CoV-2 ou de outros vírus (LI; LEE, 2009; MAGDELDIN; MOSER, 2012; TETALA; VAN BEEK, 2010; SOLOVIEV et al., 2022). Formas de melhorar as propriedades do suporte vem crescendo no campo da imobilização de proteínas (LI; LEE, 2009; MAGDELDIN; MOSER, 2012; TETALA; VAN BEEK, 2010). Polímeros orgânicos ou inorgânicos regulam positivamente o epitélio das células bloqueando a ligação do vírus as células e reforçar a barreira de defesa contra a infiltração do vírus, se apresentando como um agente protetor/terapêutico para o SARS-CoV-19 (HOFFMANN et al., 2020; MÜLLER et al., 2021). De acordo com Soloviev et al., (2022) é possível simular a adsorção do RBD da SARS-CoV-2 na superfície de SiO₂ assumindo que as proteínas sejam consideradas como esferas de raios manométricos e caracterizadas por um volume específico parcial, pois ao interagir com o suporte sofre uma modificação de sua estrutura. Benková e Cordeiro (2021) estudaram a

adsorção da proteína Spike em grafeno e constataram que a adsorção ocorre de forma rápida durante os primeiros 10 ns da simulação, e após 20 ns, um platô é alcançado na curva de adsorção sem apresentar indicações de desadsorção durante os 40 ns de simulações. Já Jomhori et al., (2021) observaram que os nanotubos de carbono tem afinidade com o protômero S1, conseqüentemente ocorrendo adsorção da proteína Spike no suporte, resultando em uma diminuição no deslocamento médio da estrutura podendo ser utilizada como uma barreira para a replicação viral.

A inclusão de partículas magnéticas aos suportes também é uma proposta promissora para a imobilização de proteínas devido à sua alta área superficial (TRINDADE XIMENES et al., 2021). Mesmo que a carga geral de uma proteína seja zero, interação eletrostática entre a proteína e uma superfície ainda podem existir, porque a carga a distribuição na superfície da proteína não é uniforme (LI; LEE, 2009). Recentemente foi descoberto que a superfície do RBD da proteína Spike apresenta característica catiônica permitindo que a interação eletrostática com outro componente possa impedir sua conexão com o ACE2 (MÜLLER et al., 2021). O que sugere possibilidades de estudar a interação e alguns metais com alta polarizabilidade e alto magnetismo.

2.8 Eletroadsorção

Diversos processos físicos, químicos e biológicos ocorrem no limite entre duas fases, ou mesmo com início na interface para posteriormente adentrarem no material específico. Dentre estes tipos de processos, a adsorção se trata da mudança na concentração de uma determinada substância na interface em comparação com as fases vizinhas (DĄBROWSKI, 2001; RUTHVEN, 1984).

A adsorção tornou-se, então, um dos métodos mais populares para este fim, ganhando importância como um processo de separação e purificação, nas últimas décadas (COSTA; COSTA; ALMEIDA NETO, 2021; PUGA et al., 2020; MACÍAS-GARCÍA et al., 2017; ZHAO et al., 2019; HUANG et al., 2017; LIU; WANG, 2020; SANTOYO-CISNEROS et al., 2020; TANG et al., 2019). Sua aplicação abrange diversos setores industriais, principalmente para fins de secagem de ar, tratamento de água, purificação do ar, purificação de proteínas, remoção de odor ou para a separação de componentes de sua mistura (PUGA et al., 2020; MACÍAS-GARCÍA et al., 2017; ZHAO et al., 2019; HUANG

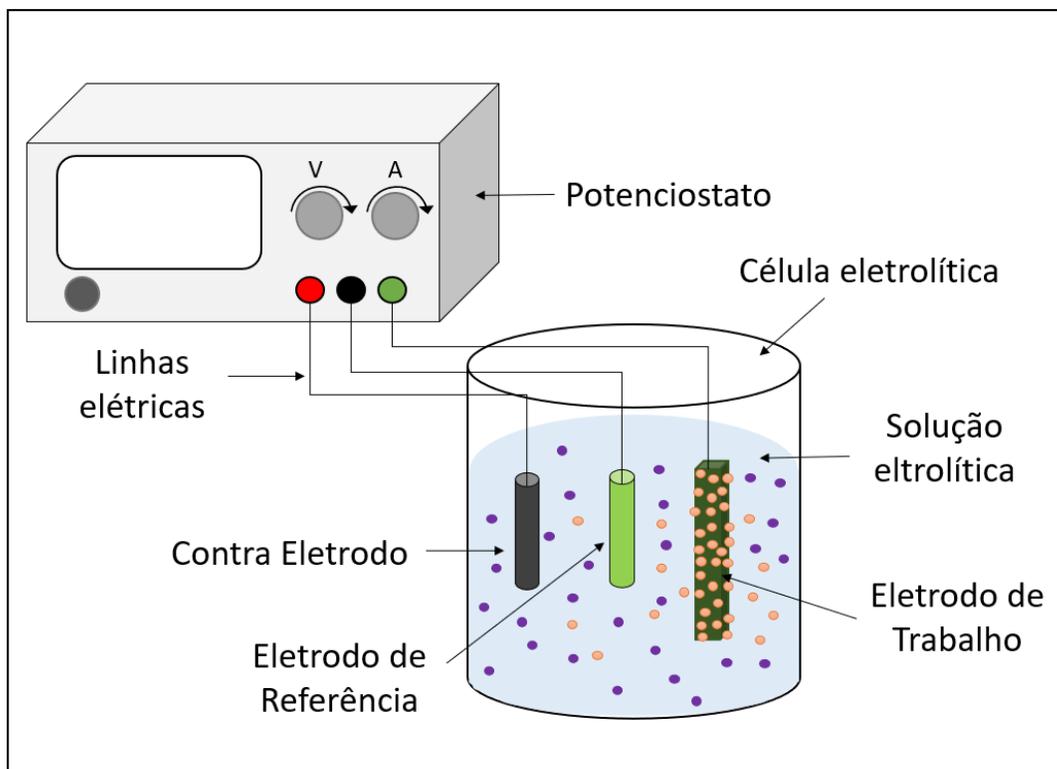
et al., 2017; LIU; WANG, 2020; SANTOYO-CISNEROS et al., 2020; TANG et al., 2019; SUN; LIU; YANG, 2020). Embora a tecnologia não seja nova, a comunidade acadêmica e industrial demonstraram interesse no desenvolvimento e comercialização de novos processos com o objetivo de intensificá-los (SHARMA et al., 2013; SUN; LIU; YANG, 2020).

Um dos pontos-chaves no processo de adsorção é observar a interação dos componentes apresentados no sistema, em que a escolha e modificação do adsorvente pode refletir em uma melhor eficácia do processo (RUTHVEN, 1984). A afinidade do adsorvente para um determinado constituinte é influenciada pela natureza do suporte, natureza do solvente e variáveis físico-químicas. Os critérios de seleção de um adsorvente para um adsorbato estabelecido dependem da natureza do adsorbato, tais como sua capacidade de sofrer oxidação, hidroxilação, troca iônica, redução, redox e reações eletroquímicas (SHARMA et al., 2013; SUN; LIU; YANG, 2020). Além disso, outros critérios devem ser levados em consideração, como custo, especificidade, seletividade, estabilidade, regenerabilidade e escalabilidade.

Sendo assim, o conhecimento eletroquímico em adsorção se tornou fundamental devido à capacidade reativa de diversos processos envolvendo eletrodos (RIBEIRO et al., 2014). O processo em que a adsorção é realizada com um eletrodo aplicado ao potencial é conhecida como eletroadsorção, nesse processo o tempo de aplicação da corrente é importante para regular a quantidade de componentes interagindo na interface (BRETT; BRETT, 1993). A densidade de corrente e a tensão (ou potencial) são variáveis praticamente coexistentes, onde a variação de ambas podem provocar uma melhor transferência de elétrons que ocorrem tanto na adsorção quanto na dessorção (se acoplada), podendo promover um melhor desempenho do processo quando comparado com a adsorção física (DĄBROWSKI, 2001; DO, 1998; BRETT; BRETT, 1993).

Esse método híbrido combina elementos de adsorção com eletroquímica em um sistema com dois ou mais eletrodos conectados a um circuito externo, conforme mostrado na Figura 7. O potenciostato funciona como uma fonte de corrente e tensão para a célula eletrolítica, transmitida por linhas elétricas para o eletrodo de trabalho, referência e contra-eletrodo. No eletrodo de trabalho, os componentes da solução eletrolítica são adsorvidos. O eletrodo de referência é geralmente composto de Ag/AgCl (KCl) ou calomelano (Hg₂Cl₂).

Seu potencial permanece constante e é conhecido como eletrodo de potencial zero. Finalmente, o contra-eletrodo de platina fecha o circuito elétrico (NAINAMALAI et al., 2018).



Fonte: Autor

Figura 7: Esquema do processo de clássico de eletrodoadsorção.

O processo de eletrodoadsorção vem sendo abordado em diversas áreas no campo industrial, principalmente para purificação de proteínas, tratamento de efluentes, remoção de bactérias, metais pesados e subprodutos em inúmeros tipos de resíduos (SEN GUPTA; BHATTACHARYYA, 2011; WAN NGAH; TEONG; HANAFIAH, 2011; COSTA; COSTA; ALMEIDA NETO, 2021). Lian et al. (2020), exploram conceitos da natureza envolvida no processo de adsorção em um processo de eletrodoadsorção, são eles a adsorção física (ou fisissorção), que se trata a ligação do adsorvato à superfície do adsorvente envolve uma interação relativamente fraca, e a adsorção química (ou quimissorção), a qual envolve a troca ou partilha de elétrons entre as moléculas do adsorvato e a superfície do adsorvente, resultando em uma reação química. No estudo em questão, é mostrado que com o aumento do tempo de exposição e controle do potencial do eletrodo, utilizando níquel como material catódico, tanto a capacidade de adsorção física, que incluíram forças de van

der Waals e a interação eletrostática quanto a adsorção química, que incluíram a interação de ligação química e ligação de hidrogênio no sistema, mostraram que cerca de 93% das células da bactéria *Microcystis aeruginos* foram removidas do resíduo estudado.

Tang et al. (2019) estudaram a eletroadsorção de Zn^{2+} em carvão ativado e observaram que os mecanismos de adsorção do metal também estão relacionados com a natureza do processo (fisissorção ou quimissorção). Um ponto importante é como o conhecimento dos parâmetros de operação implica em uma interação entre o adsorvente e o metal, esses parâmetros incluem tensão de carga, concentração de Zn^{2+} , volume da solução, e taxa de fluxo. O ajuste do pH também pode melhorar a eletroadsorção, forçando uma interação próximo da máxima entre o adsorvente e os íons metálicos (DOS SANTOS FRANCO et al., 2020). Alguns trabalhos evidenciam que a seletividade durante o processo de eletroadsorção dependem não somente do adsorvente em questão, mas dos parâmetros eletroquímicos e principalmente do potencial aplicado (MIN et al., 2020; MACÍAS-GARCÍA et al., 2017; SUN et al., 2020).

O modo de trabalhar com a eletroadsorção é vasto, entretanto, a indústria farmacêutica e da saúde vem utilizando esse processo eletroquímico de forte interação entre metal e adsorvente como fonte de remoção ou identificação de componentes relacionados a funções do corpo humano. Basu et al., (2019) apresentaram uma nova forma de realizar a transdução de hibridização de DNA aplicando uma diferença de potencial com variações de 0,1 a 0,5 V, sendo inovador porque os trabalhos anteriores com essa perspectiva só apresentavam a transdução com adsorção sem a influência do potencial elétrico. A remoção e degradação de antibióticos ionizáveis também fazem parte do escopo de estudos na eletroquímica devido as suas variáveis formas de dissociação (CHAO et al., 2021; GANESAN et al., 2019; ZAIDI et al., 2019). De acordo com Xu et al., (2021) a adsorção da ω -transaminase (ω -TA) em um novo material híbrido orgânico-inorgânico, o complexo de níquel-carnosina (NiCar) apresentou uma abundância de íons níquel e uma alta quantidade de sítios propensos a ancorarem a proteína. A afinidade de adsorção entre o grupo funcional imidazol da proteína e o NiCar foi a principal força no processo de imobilização, o que forneceu uma ideia para o desenvolvimento de novos carreadores de imobilização enzimática.

O uso combinado da eletroadsorção com a eletro-oxidação é fundamental para degradação de antibióticos, pois a eletroadsorção é um processo que utiliza um eletrodo polarizado para adsorver seletivamente compostos orgânicos da solução, enquanto a eletro-oxidação é um processo que utiliza um eletrodo polarizado para oxidar compostos orgânicos na solução, convertendo-os em produtos inofensivos. Sendo assim, ao aplicar o potencial aglutina-se os antibióticos em um eletrodo poroso e em seguida, elimina-se poluentes direta ou indiretamente por oxidação eletrocatalítica, também chamada de oxidação direta e oxidação indireta (ANTILEN et al., 2016; CHAO et al., 2021; GANESAN et al., 2019; LI et al., 2019). Tais trabalhos mostraram como a utilização da eletroquímica, por meio do processo de eletroadsorção pode ser significativa para obtenção de excelentes resultados para a área da saúde, tanto no aprimoramento quanto na substituição de métodos convencionais. Por isso, torna-se mais interessante a proposta de substituição do agente quelante pelo potencial elétrico para melhorar a fixação dos metais.

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e equipamentos

Os reagentes para a síntese do PAam foram o N,N-metileno-bis-acrilamida, adquirido da Sigma-Aldrich, e o N, N, N',N'-tetra-metilenodiamina (TEMED), adquirido da BioRAD, além do persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) da marca Labitech.

Os reagentes analíticos dos íons metálicos foram: sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de níquel (NiSO₄), sulfato de cobalto (CoSO₄) e sulfato de ferro (FeSO₄), os três primeiros da marca Synth e o último da marca Dinâmica. As pesagens dos componentes foram feitas em balança analítica Sartorius TE214S. As soluções tampão utilizadas foram de EDTA 0,1 mol/L, de acetato de sódio e de HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico, fornecidos pela Dinâmica. Todas as soluções tiveram o ajuste de pH, em pHmetro QUIMIS modelo Q400RS. As proteínas utilizadas para serem adsorvidas foram a IgG humana - Merck e a Proteína spike, fonte de coelho, Uniscience.

Para os processos de eletroadsorção foi utilizada uma Fonte de potência, Marca Shimadzu, modelo AUY220, um refrigerador TECNAL, modelo TE-2005, uma bomba peristáltica Intllab-dosing pump DP-385 e um agitador rotativo da marca AMETEK, modelo 616A. No processo em leito fixo, uma coluna de acrílico com extremidades de aço inoxidável foi utilizada, já no processo de batelada, um suporte de aço inoxidável foi construído para receber o PAam durante a batelada.

3.2 Métodos

A sequência de preparos, sínteses, medidas e ensaios do trabalho está resumida na Figura 8, onde se apresenta um fluxograma das atividades que englobam as etapas precedentes ao processo de eletroadsorção, etapas que englobam a montagem do sistema, etapas que envolvem o processo de eletroadsorção, as etapas de análise cinética da eletroadsorção dos íons metálicos e também as etapas da adsorção das proteínas.

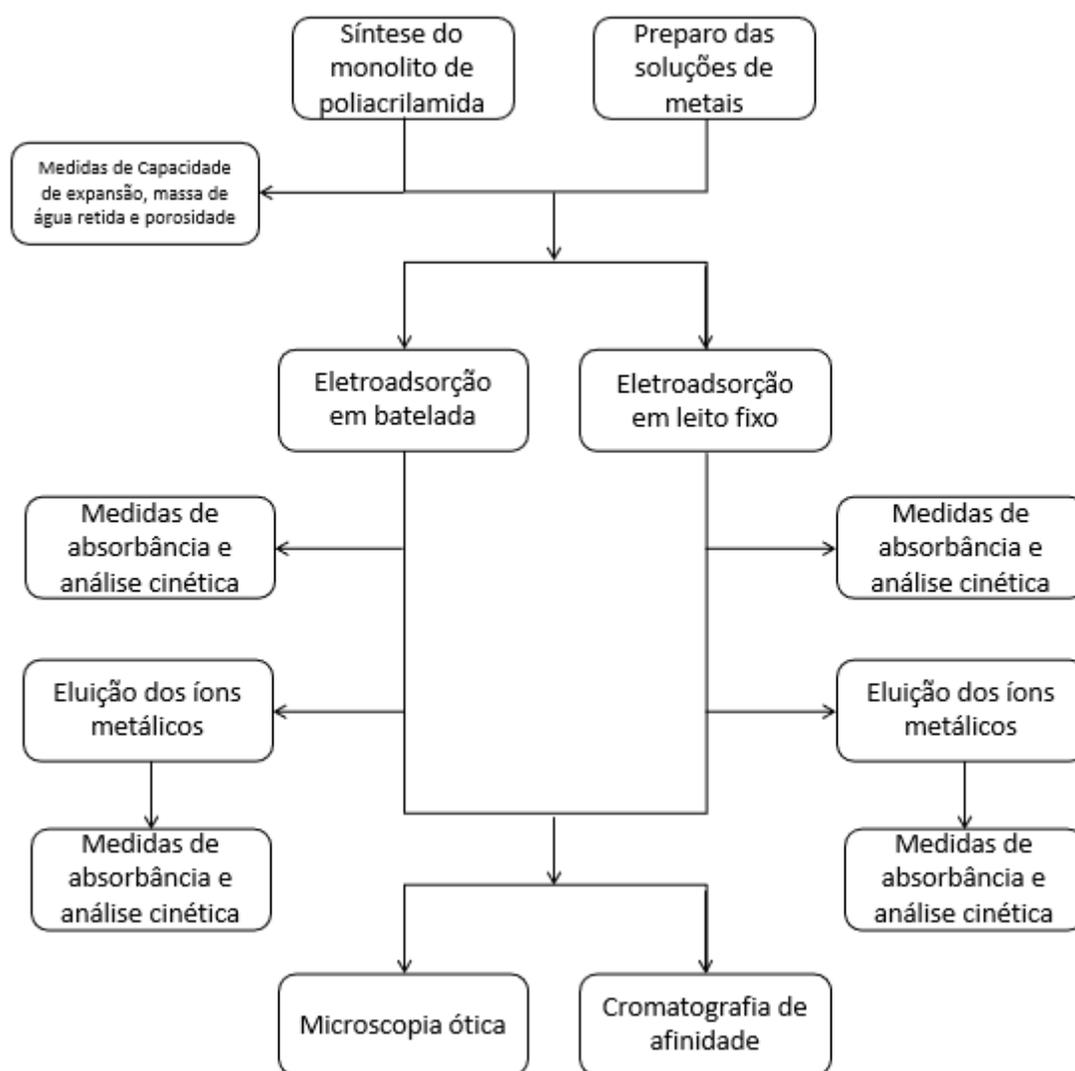


Figura 8: Fluxograma de atividades do trabalho

3.2.1 Síntese do monólito de poliacrilamida

De acordo com Plieva (2004), a síntese do criogel de poliacrilamida iniciou-se reservando um recipiente contendo etanol no *freezer*, a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os monômeros de acrilamida (0,948 g) e de N,N-metileno-bis-acrilamida (0,254 g) foram dissolvidos em 20 mL de água deionizada (concentração de 6,3% m/v). Essa mistura foi submetida a um processo de degaseificação, durante 20 minutos em banho ultrassônico, seguida de resfriamento em *freezer* ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), por 5 minutos. Após esse período, a solução foi retirada do *freezer* e a polimerização via radical livre foi iniciada adicionando-se 1,0 mL da solução de persulfato de amônio em água (22 mg/mL; 2,2% m/v) e TEMED (19 μL). A mistura reacional, de volume final de 20,19 mL (concentração final de monômeros de 6% (m/v)), foi fracionada em seringas plásticas de capacidade 3,0 mL, nas quais se adicionou cerca de 1,0 mL em cada. Após serem preenchidas com a mistura reacional, as seringas foram vedadas e imersas no recipiente contendo etanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os criogéis foram mantidos no *freezer*, em banho de etanol, por 16 horas. O processo de descongelamento do criogel foi realizado transferindo-o para a geladeira e, após 1 hora, deixando-o a temperatura ambiente. Depois de totalmente descongelado, o criogel foi lavado com 30 mL de água ultrapura (Milli-Q), para remover a fração da mistura que não reagiu. O sequenciamento dos experimentos estão descritos na Figura 9.



Figura 9: Ilustração sequencial da síntese do PAam (Fonte: Autor).

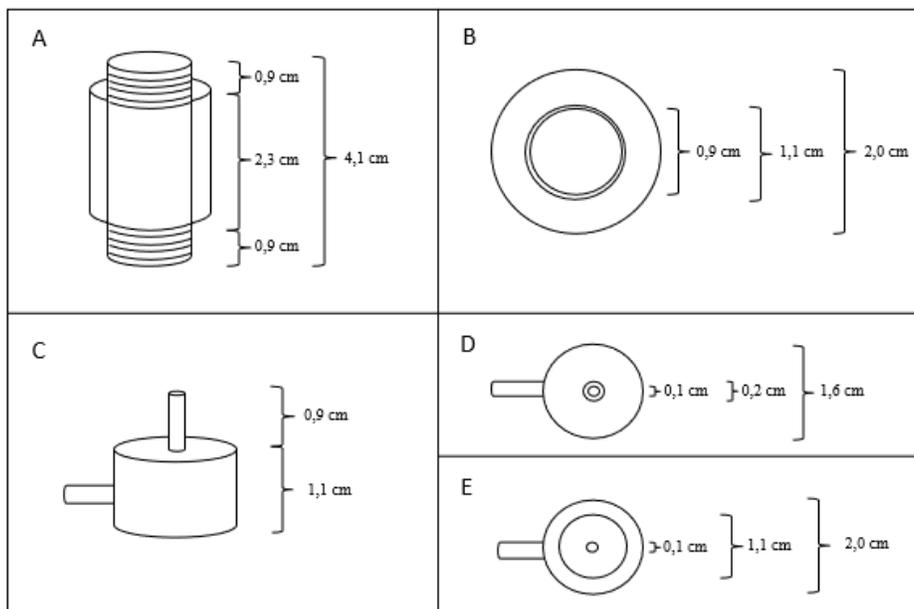
3.2.2 Soluções dos íons metálicos

Os sais de CuSO_4 , NiSO_4 , CoSO_4 e FeSO_4 foram utilizados como fonte dos respectivos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} na preparação das soluções para a eletroadsorção no PAam. As soluções foram preparadas com água destilada e deionizada com uma concentração de 2000 ppm de íon metálico para cada solução. O pH dessas soluções foi medido por um pH-metro eletrônico modelo Q400RS, da marca Quimis, pertencente ao Laboratório de Processos Eletroquímicos e Anticorrosão (LabPEA). A calibração do pH-metro foi feita a partir de soluções tampão de pH 4,01, 6,86 e 9,18.

3.2.3 Sistemas de eletroadsorção

3.2.3.1 Sistema de eletroadsorção em leito fixo

Para a inicialização do processo de eletroadsorção em leito fixo, o PAam de 4,5 cm de comprimento foi colocado em uma coluna de acrílico com 4,1 cm de comprimento, 0,9 cm de diâmetro interno, 1,2 cm de diâmetro externo e rosqueada nas extremidades para o fechamento do sistema com peças de aço inox, compondo respectivamente o topo e a base da coluna. Ao fechar o sistema com as peças de aço inox o comprimento externo total do sistema foi de 4,9 cm, conforme a Figura 10. A peça descrita na Figura 10 foi projetada para se adequar as dimensões do PAam com o objetivo de não criar caminhos preferenciais durante o processo de eletroadsorção.



Fonte: Autor

Figura 10: A) Visão transversal do leito de acrílico; B) Visão longitudinal do leito de acrílico; C) Visão transversal da extremidade de aço inox; D) Visão longitudinal superior da extremidade de aço inox; E) Visão longitudinal inferior da extremidade de aço inox

A Figura 11 traz o sistema de leito fixo de eletroadsorção dos íons metálicos PAam com base nas medições citadas na Figura 10. Nas extremidades de aço inox foram conectados fios de cobre, provenientes de uma fonte de tensão, com o objetivo de permear a corrente elétrica por todo o material. Foi fundamental que a parte interna das extremidades de aço inox permanecesse em contato com o criogel para garantir a passagem de corrente elétrica. Portanto, o comprimento do criogel foi maior que o comprimento do leito de acrílico. Após as conexões realizadas, a solução contendo os íons metálicos atravessou o material sob uma determinada vazão e potencial elétrico. Ao final da conexão, foram coletados 2,5 mL de solução que passou pelo leito em cubetas de acrílico. Com o processo de eletroadsorção finalizado, o fornecimento de potencial elétrico foi desligado e em seguida um fluxo de água MiliQ atravessou o leito com o objetivo de remover os íons metálicos que não foram eletroadsorvidos pelo sistema. Após a passagem de 50 mL de água MiliQ, o processo de eluição dos metais se iniciou, no qual um fluxo de EDTA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ atravessou o leito para complexar e remover os íons que permaneceram eletroadsorvidos no criogel, sendo também coletados em cubetas de 2,5 mL. Em seguida, medidas de

absorbância em um espectrofotômetro de UV-VIS foram realizadas em cada cubeta coletada no comprimento de onda de 800 nm.

Inicialmente, foi necessário avaliar as limitações de vazão e potencial do sistema. Embora a bomba utilizada atingisse uma vazão máxima de 25 mL/min, sabe-se que valores elevados podem ser prejudiciais para o PAam, causando desgaste e eventual ruptura dentro do leito. Além disso, vazões elevadas resultaram no rompimento dos tubos e conexões do sistema, principalmente na parte próxima à bomba peristáltica. Para controlar a vazão, utilizou-se um controlador de fluxo e reduziu-se a vazão para um valor que o PAam e os tubos pudessem suportar, sendo o valor máximo aplicado de 5 mL/min.

Da mesma forma, a fonte de tensão utilizada, que pode atingir um valor máximo de até 30 V, foi estudada para verificar o limite anticorrosivo do aço inoxidável presente nas extremidades do sistema. Após vários testes, determinou-se que o valor máximo de tensão suportado pelo aço inoxidável sem ocorrer processo corrosivo é de 5 V. Esses valores limites serviram como ponto de partida para o planejamento experimental descrito na Tabela 2, utilizando uma matriz especial para combinação dos dados, realizado em triplicada, tendo como variáveis de respostas a qel (quantidade de material eluída) e a ZTM (zona de transferência de massa). Sendo assim, as limitações de vazão e potencial foram cuidadosamente consideradas e controladas durante o estudo para garantir a operação adequada do sistema de leito fixo e evitar danos ao PAam e aos componentes do sistema.

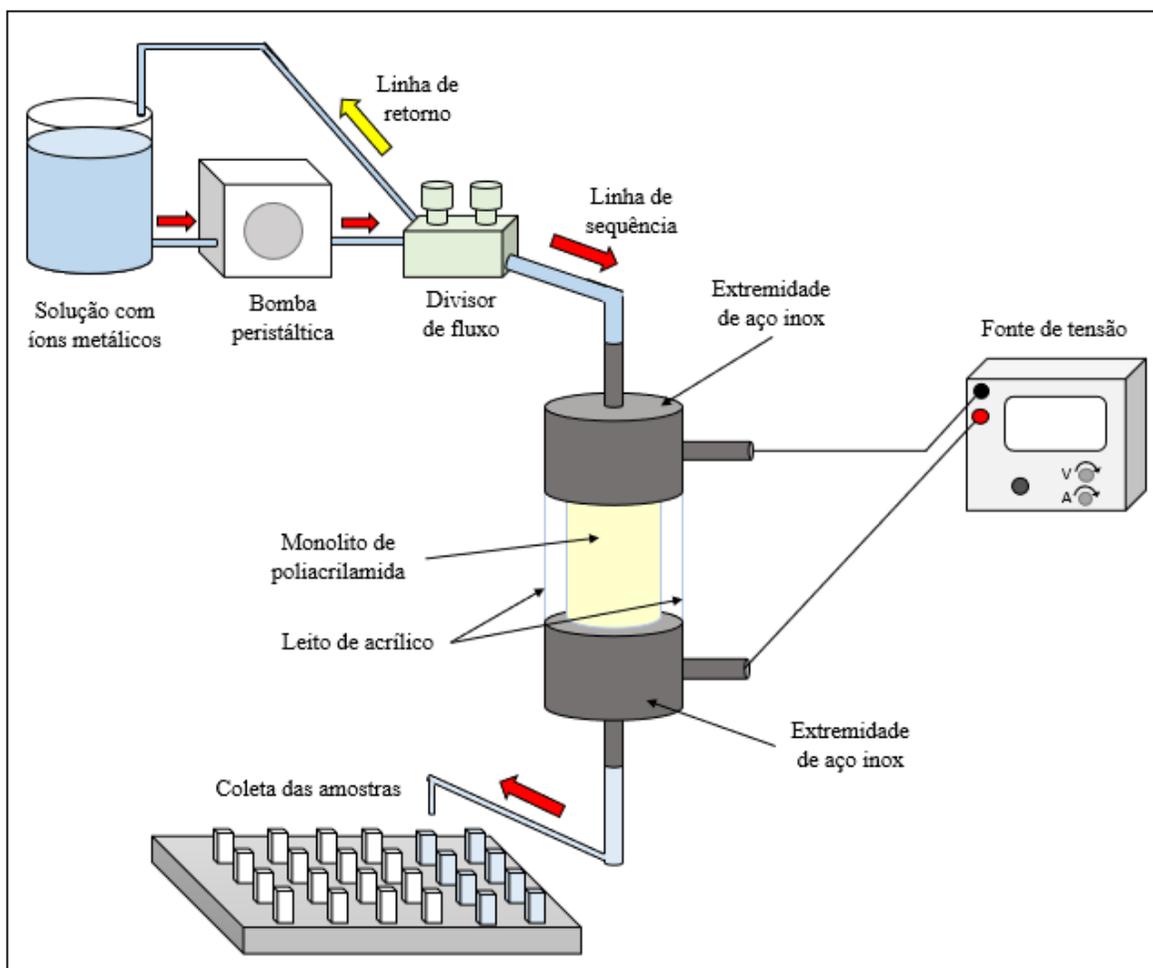


Figura 11: Esquema do sistema dinâmico de eletroadsorção (Fonte: Autor).

Tabela 2: Variáveis do planejamento experimental em níveis codificados e reais dos fatores: Potencial (V) e Vazão (mL/min) para aplicação na matrizno Statistica em um sistema de leito fixo.

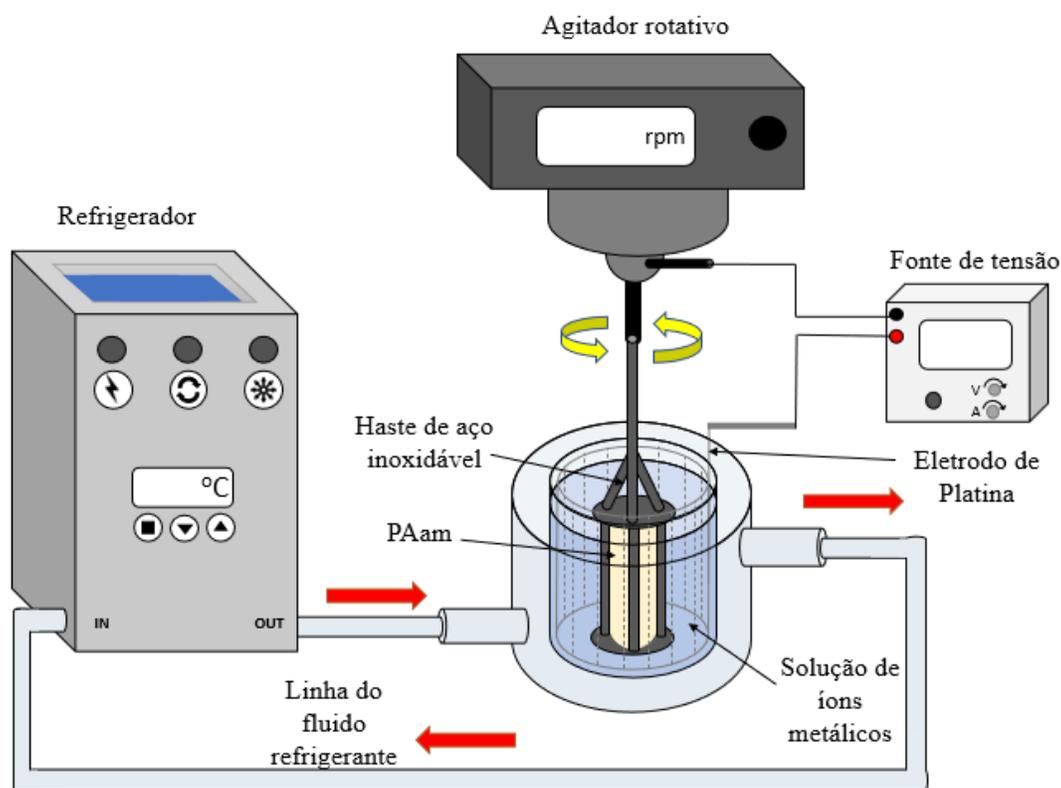
Níveis	(-1)	(0)	(+1)
Variáveis			
Potencial (V)	1	3	5
Vazão (mL/min)	3	4	5

3.2.3.2 Sistema de eletroadsorção em batelada

Os ensaios de eletroadsorção, em batelada, foram realizados conforme a Figura 12, na qual tem-se um esquema do sistema contendo 80 mL de solução de metal e o PAam

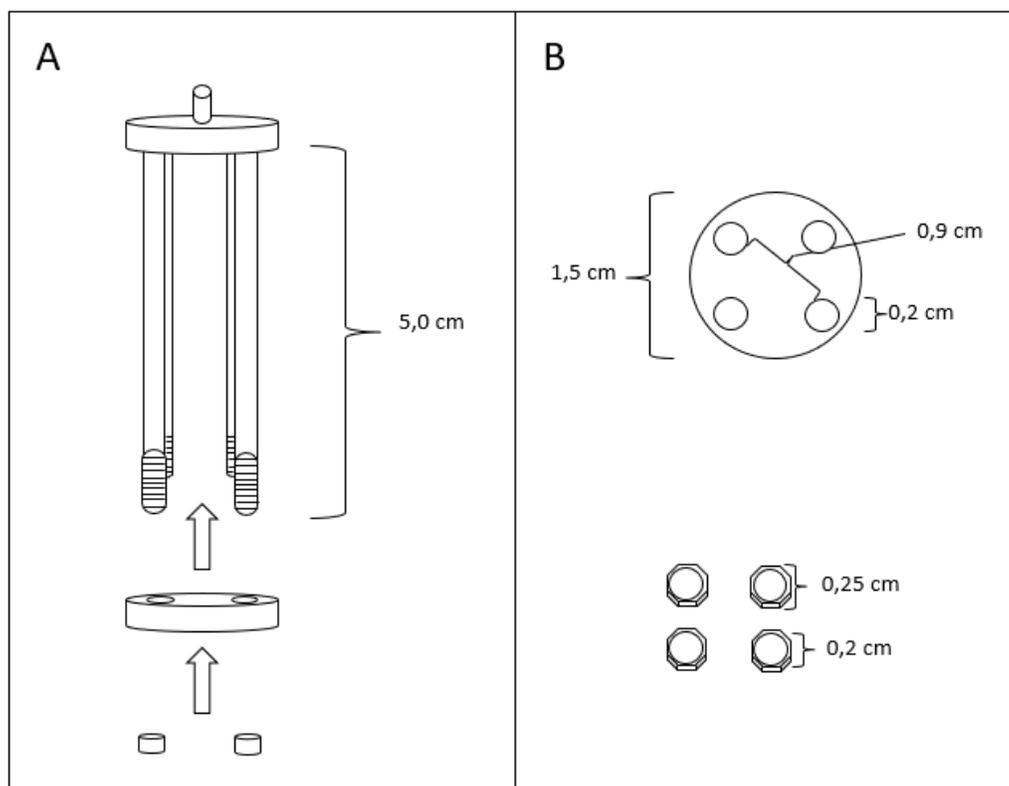
sustentado por uma haste de aço inoxidável, sujeitos a variação do potencial (proveniente da fonte de potência) da rotação (proveniente agitador rotativo) e da temperatura (proveniente do refrigerador). A Figura 13 mostra as dimensões da haste de aço inoxidável, utilizada como suporte para inserir o PAam na solução dos íons metálicos.

As coletas das amostras de íons metálicos foram realizadas com uma pipeta volumétrica de 100 μL , adicionadas na cubeta de quartzo e preenchidas com água deionizada até o volume de 2 mL. Para esse sistema foram realizadas coletas a cada 30 segundos até completar 5 minutos, totalizando 10 coletas nesse formato. Após 5 min, foram coletadas mais 10 amostras a cada 5 minutos, finalizando aos 55 minutos de ensaio. Após o processo de eletroadsorção ser concluído, o PAam foi levado para o sistema de leito fixo, onde foi realizada a passagem de água MiliQ e do EDTA 0,1 mol/L, com o objetivo de eluir os íons metálicos e avaliar suas adsorções.



Fonte: Autor

Figura 12: Esquema do sistema de eletroadsorção em batelada.



Fonte: Autor

Figura 13: A: Visão lateral da haste que sustenta o PAam; B: Visão superior das roscas e da parte inferior da haste

Assim, foram realizados testes cinéticos para cada íon metálico individual, com concentrações 2000 ppm. As alíquotas foram diluídas e analisadas, em relação aos íons originais presentes na solução inicial, no espectrofotômetro UV-VIS. Inicialmente, houve a tentativa de utilizar tensões de 1, 3 e 5 V, assim como no sistema de leito fixo. Entretanto, para o sistema em batelada as tensões de 3 e 5 V ocasionaram uma corrosão generalizada na haste que suporta o criogel, o que fez essas condições serem descartadas. Sendo assim, foram realizados testes de tensões para identificar qual é a tensão máxima que a haste suporta sem sofrer corrosão. Sendo assim, após diversos ensaios, a tensão máxima encontrada foi de 1,5 V. Essa tensão foi a tensão padrão para realização dos ensaios em um sistema de batelada, alterando o planejamento experimental para a Tabela 3, como explicado anteriormente.

Tabela 3: Variáveis do planejamento experimental em níveis codificados e reais dos fatores: Temperatura (°C) e Rotação (rpm) para aplicação na matriz no Statistica em um sistema em batelada.

Níveis	(-1)	(0)	(+1)
Variáveis			
Temperatura (°C)	5	15	25
Rotação (rpm)	0	25	50

3.2.4 Caracterização do PAam

3.2.4.1 Capacidade de expansão (S) e porosidade (ϕ)

As medidas capacidade de expansão e porosidade foram descritas por Plieva (2004), Sun et al. (2012) e Mourão et al. (2019). Assim, em uma proveta de 50 mL com volume de água Milli-Q® conhecido, o PAam é adicionado e a partir do deslocamento de água foi medido o volume do criogel expandido (V_m), considerando a densidade da água ($\rho_{\text{água}} = 1,0 \text{ g/mL}$). Após a variação do volume, o criogel foi colocado sobre o papel filtro e movimentado com cuidado, para retirar o excesso de água presente no criogel e em seguida levado a filtração a vácuo, até que não houvesse mais água no papel e a massa de monólito filtrado medida. Após a pesagem, os monólitos foram deixados na estufa durante 24 horas à 60°C e a massa do monólito seco foi devidamente pesada (m_d). Em seguida o monólito foi levado a um ambiente hermeticamente fechado e com umidade controlada ($\approx 90\%$), contendo uma solução saturada de cloreto de potássio (KCl) sem que o PAam seco entrasse em contato com a solução. As medidas de massa úmida (m_w), do PAam umedecido foram realizadas a cada 24 horas durante 14 dias ou até que o material não apresentasse mais variação de massa. Com todos esses dados coletados foi possível estimar a capacidade de expansão, massa de água retida e a porosidade do criogel, descritos nas Equações 1, 2 e 3, respectivamente. Todas os experimentos foram realizados em triplicata.

$$S = \frac{m_f - m_d}{m_d} \quad (1)$$

Em que,

S = Capacidade de expansão,

m_f = massa do monólito filtrado (g),

m_d = massa do monólito seca (g)

$$m_{\text{água}} = m_w - m_d \quad (2)$$

Em que,

$m_{\text{água}}$ = massa de água ligada (g),

m_w = massa do monólito úmido (g).

$$\phi = \frac{m_f - m_{\text{água}}}{\rho_{\text{água}} \cdot V_m} \quad (3)$$

Em que,

Φ = porosidade,

$\rho_{\text{água}}$ = densidade da água (g/mL),

V_m = volume deslocado (mL)

3.2.5 Microscopia ótica (MO)

A microscopia ótica foi usada para a caracterização da amostra úmida, pois, ao incidir a luz na superfície da amostra, foi possível obter as imagens da mudança de coloração do criogel. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP com o equipamento de MO de marca Motic e modelo: BA300 para ampliações de 30 e 50 vezes.

3.2.6 Análise da eletroadsorção no sistema de leito fixo

Geankoplis (1993) apresentou um método simplificado para o cálculo do comprimento da zona de transferência de massa (ZTM), uma das principais variáveis de resposta do sistema de eletroadsorção. Inicialmente é necessário calcular os tempos equivalentes às quantidades, útil (q_u) e total (q_t) removidas pela coluna, podendo ser obtida através do t_u = tempo útil e t_e = tempo equivalente pelas respectivas Equações 4 e 5:

$$t_u = \int_0^{t_{pr}} \left(1 - \frac{c|_{z=L}}{c_0}\right) dt \quad (4)$$

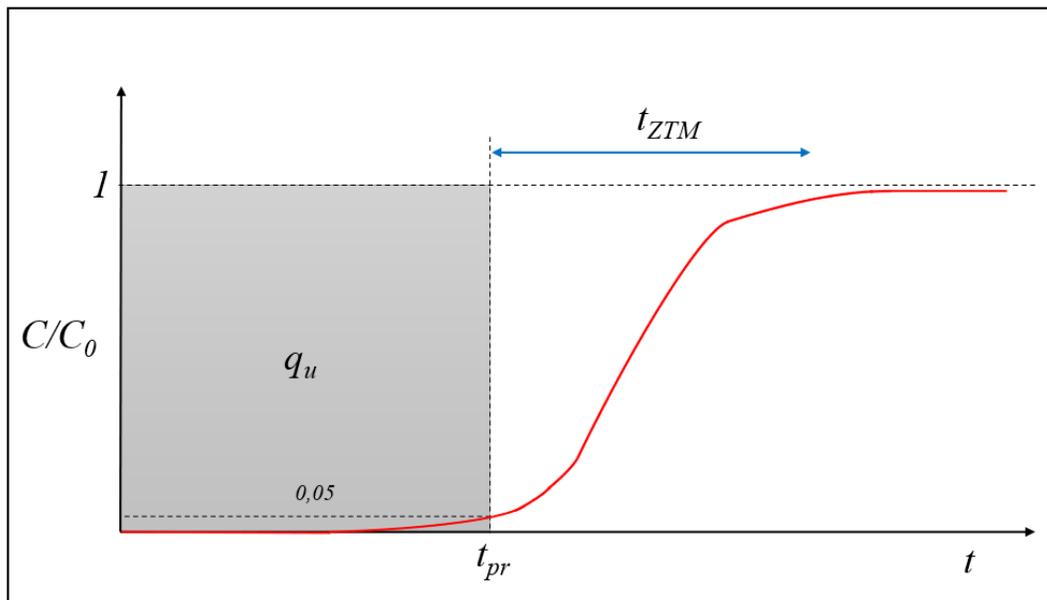
t_u = tempo útil (min);

t_{pr} = tempo em que a concentração na saída da coluna é igual a 5% da concentração inicial de alimentação e realizando um balanço de massa na coluna (min);

$C|_{z=L}$ é a concentração do metal em solução na saída da coluna (mmol/L);

C_0 é a concentração de alimentação na coluna (mmol/L).

A integral sob a curva $(1-C|_{z=L}/C_0)$ é proporcional à área em cinza apresentada na Figura 14 até o ponto t_{pr} .



Fonte: Autor

Figura 14: Ilustração da curva de ruptura com a área grifada em cinza a quantidade útil de adsorção em relação ao $(C/C_0 \times t)$

Da mesma forma, o tempo equivalente à quantidade de íons metálicos, q_t , se todo o leito estiver em equilíbrio com a alimentação (t_e) pode ser calculado pela Equação 5:

$$t_e = \int_0^t \left(1 - \frac{C|_{z=L}}{C_0}\right) dt \quad (5)$$

t = o tempo de exaustão do leito (min);

A integral sob a curva $(1-C|_{z=L}/C_0)$ é proporcional à área acima da curva apresentada na Figura 14 até o ponto de saturação $(C/C_0 = 1, t)$. A razão entre t_u e t_e , τ , é uma fração do comprimento total do leito (Ht), chamada altura útil (Hu) do leito e dada pela Equação 6:

$$Hu = \tau \cdot Ht \quad (6)$$

Sendo,

$$Hu = \tau \cdot Ht + ZTM \quad (7)$$

em que, ZTM corresponde à zona de transferência de massa, é a diferença entre a altura total (Ht) e útil (Hu) do leito e pode ser calculada pela substituição da Equação 6 na Equação 7.

$$ZTM = (1 - \tau) Ht \quad (8)$$

Pelo balanço material na coluna e a partir das curvas de ruptura obtidas até a saturação do leito, a quantidade de metal retida no leito (q_t) é calculada pela Equação 9:

$$q_t = \frac{c_0 \cdot Q}{m} \int_0^t \left(1 - \frac{c|_{z=L}}{c_0}\right) dt \quad (9)$$

Q = a vazão de operação (mL/min);

m = massa de monólito (g).

Assim, a quantidade de metal retida no leito até o ponto de ruptura (q_u) é calculada de acordo com a Equação 10:

$$q_u = \frac{c_0 \cdot Q}{m} \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{c|_{z=L}}{c_0}\right) dt \quad (10)$$

A porcentagem de Adsorção no leito (%AL) será obtida considerando a fração de metal em solução que ficou retida no sólido de todo efluente que foi utilizado no processo até a saturação do leito.

3.2.7 Eluição dos íons metálicos

Os íons de cobre e níquel serão dessorvidos com uma solução de EDTA 0,1 mol/L pH 7,0, sendo feita a coleta de alíquotas de 2,5 mL para análise por espectrofotometria de ultravioleta, repetindo essa etapa até a obtenção de absorvância zero, indicando a eluição máxima dos íons foi alcançada. As eluições serão realizadas no sistema leito fixo.

3.2.8 Análise das curvas de eluição

As curvas de eluição relativas a dessorção dos metais da poliacrilamida, obtidas em sistema dinâmico, nas mesmas vazões em que se realizou a remoção, serão avaliadas com relação à quantidade eluída de metal. Esta quantidade será calculada integrando a curva de eluição. A área abaixo da curva multiplicada pela vazão de alimentação, Q , por grama de poliacrilamida, m , fornecerá a quantidade de metal eluída (q_{el}) que é, assim como a ZTM, outra principal variável de resposta do sistema de eletroadsoção (VOLESKY et al., 2003):

$$q_{el} = \frac{Q}{m} \int C_{el} \cdot dt \quad (11)$$

C_{el} = concentração do material eluído.

A porcentagem de eluição será determinada considerando a quantidade total de remoção (q_t) como sendo 100% do metal a ser extraído da poliacrilamida.

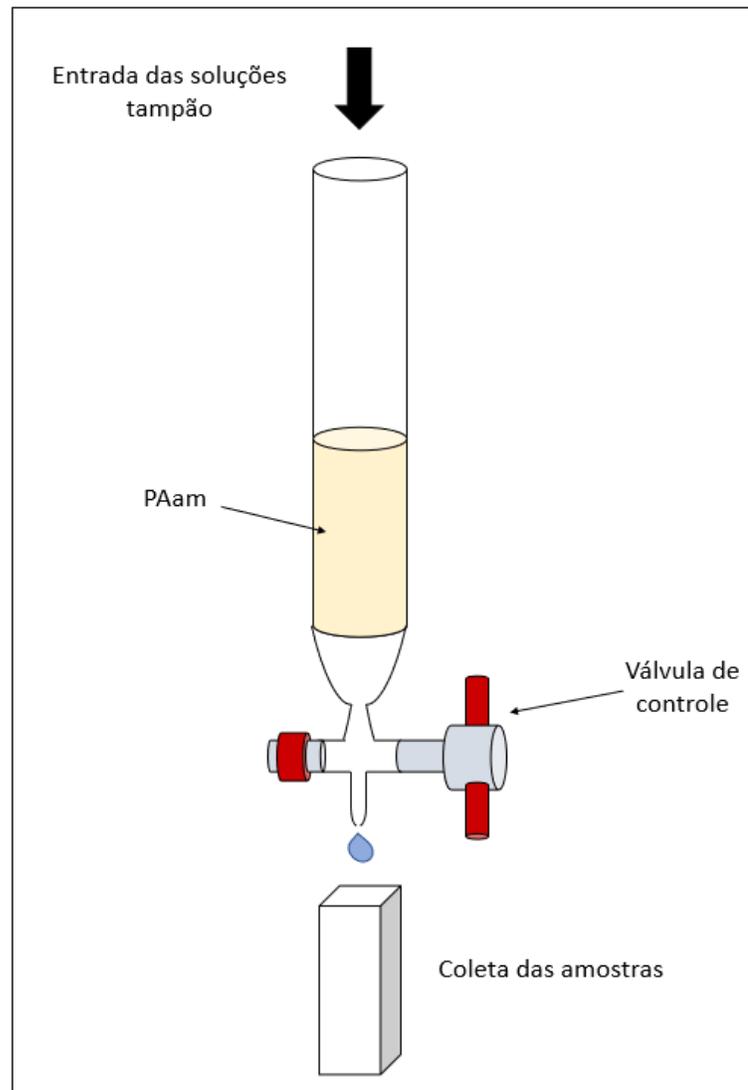
3.2.9 Cromatografia de afinidade para a IgG

Após realizar e avaliar a etapa de eletroadsoção dos íons metálicos no PAam, a próxima etapa foi avaliar a capacidade da coluna interagir com a IgG, através dos íons metálicos eletroadsorvidos na PAam. As soluções tampão escolhidas para avaliar a adsorção da IgG na coluna foram: tampão de eluição, acetato de sódio (NaO_2CCH_3) 25 mmol/L em pH = 4; tampão de adsorção HEPES (Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico) 25 mmol/L e o tampão de regeneração de EDTA 0,1 mol/L. A Tabela 4 demonstra a sequência das soluções escolhidas, incluindo a etapa com a alimentação de 1 mL de IgG (2mg/mL).

Durante toda a cromatografia, foram coletadas frações de 2,5 mL da corrente de saída. Essas frações foram quantificadas em termos de proteína total pelo método de Bradford (1976). Vale ressaltar que a cromatografia foi realizada pela ação da gravidade em uma coluna de 13 cm, com diâmetro interno igual ao do PAam, como mostra a Figura 15.

Tabela 4: Sequência da introdução das soluções no leito e suas coletas para a análise da adsorção da proteína

Ordem de introdução no leito	Solução	Número de coletas
1	Acetato de sódio	10
2	HEPES	10
3	HEPES (com IgG)	20
4	Acetato de sódio	20
5	EDTA	10



Fonte: Autor

Figura 15: Esquema de cromatografia por gravidade para coletar as amostras.

3.2.10 Cromatografia de afinidade para a proteína Spike

De maneira análoga a cromatografia da IgG foi utilizado o tampão de eluição, acetato de sódio (NaO_2CCH_3) 25 mmol/L em $\text{pH} = 4$ e o tampão de adsorção, HEPES (Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico) 25 mmol/L em $\text{pH} 7,0$. Entretanto, a quantidade da proteína foi de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Durante toda a cromatografia, foram coletados frações de 2,5 mL da corrente de saída. A eluição final dos íons Cu^{2+} também foi feita com o EDTA 0,1 mol/L. Essas frações também foram quantificadas em termos de proteína total pelo método de Bradford (1976).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do PAam

O PAam apresentou coloração branca e opaca, além de ser visualmente homogêneo. Na avaliação da elasticidade do material foi possível, tanto comprimir, quanto secá-lo sem o comprometimento de sua estrutura, que após descompressão e reidratação, retornou ao estado inicial não apresentando qualquer rachadura ou deformação visual. De acordo com Carvalho et al. (2014), criogéis de PAam podem ser comprimidos em até 50% de seu volume sem sofrer deformações permanentes. A Figura 16 mostra o monólito com uma estrutura homogênea e de característica esponjosa, e devido a sua facilidade de reter água é provável que a quantidade de poros esteja adequada para aplicações futuras na cromatografia de afinidade.

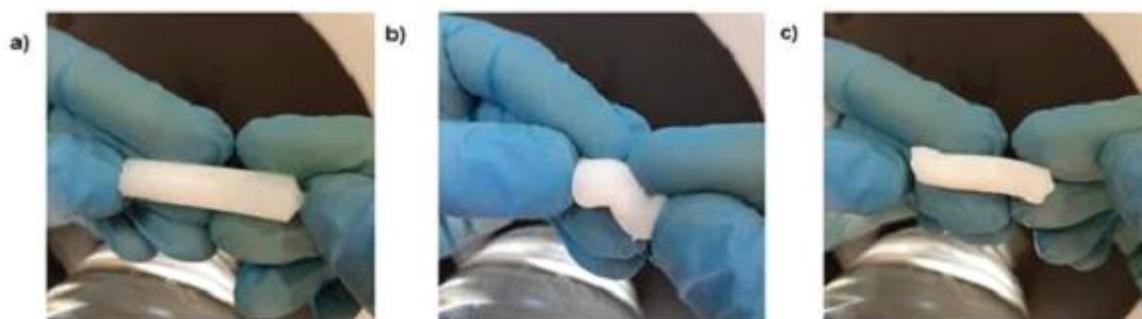


Figura 16: a) PAam não comprimido e totalmente preenchido com água b) Compressão do PAam c) descompressão do PAam após a retirada de água

4.2 Capacidade de expansão (S), massa de água retida (m_{água}) e porosidade (φ)

Após a medição de volume e massa do PAam, foi possível obter a capacidade de expansão do material, de acordo com a Equação 1, com um resultado de 17,97 ($\pm 1,46$). Esse resultado indica que o PAam tem uma boa capacidade de reter um alto volume de água em seus poros, facilitando o fluxo contínuo de soluções. É importante notar que uma capacidade de expansão muito elevada pode prejudicar as características mecânicas do criogel para cromatografia, resultando em uma baixa capacidade de retenção de material (ARVIDSSON et al., 2003; CARVALHO et al., 2014)

Além disso, para avaliar a quantidade de massa de água retida (Equação 2), foram realizadas medições diárias do PAam durante 14 dias, a cada 24 horas. O resultado médio obtido foi de 0,081 g ($\pm 0,0122$), o que demonstra que, devido à capacidade de expansão e à baixa quantidade de água retida, o PAam está em condições ideais para operar em sistemas que envolvem fluxo de soluções. A proporção de mássica do PAam preenchido com água pode ser observada na Figura 17.

Os resultados da distribuição da composição mássica do PAam confirmam o que a literatura já aborda sobre esses componentes: eles possuem uma grande capacidade de reter água à medida que expandem seu volume. Esse fenômeno ocorre devido à presença de poros bem distribuídos, formados pelo derretimento dos cristais de gelo após a criogelificação. De acordo com Arvidsson e colaboradores (2003), a porosidade do criogel influencia diretamente a resistência do material ao fluxo.

Por fim, os valores de porosidade do PAam sintetizado apresentaram uma média de 77,43% ($\pm 5,11\%$). Esses resultados estão em conformidade com Plieva et al. (2004), que estabeleceram uma faixa adequada de porosidade (entre 70% e 90%) para garantir uma interação eficiente com as biomoléculas na cromatografia de afinidade. É importante ressaltar que valores elevados de porosidade permitem que o monólito suporte taxas de fluxo mais altas, porém resultam em materiais mais frágeis, comprometendo seu uso como fase estacionária em cromatografia (PLIEVA et al., 2009). Com a síntese e a validação dos ensaios da estrutura do material, os primeiros ensaios de eletroadsorção foram realizados com o objetivo de determinar uma faixa de condições de trabalhos adequadas.

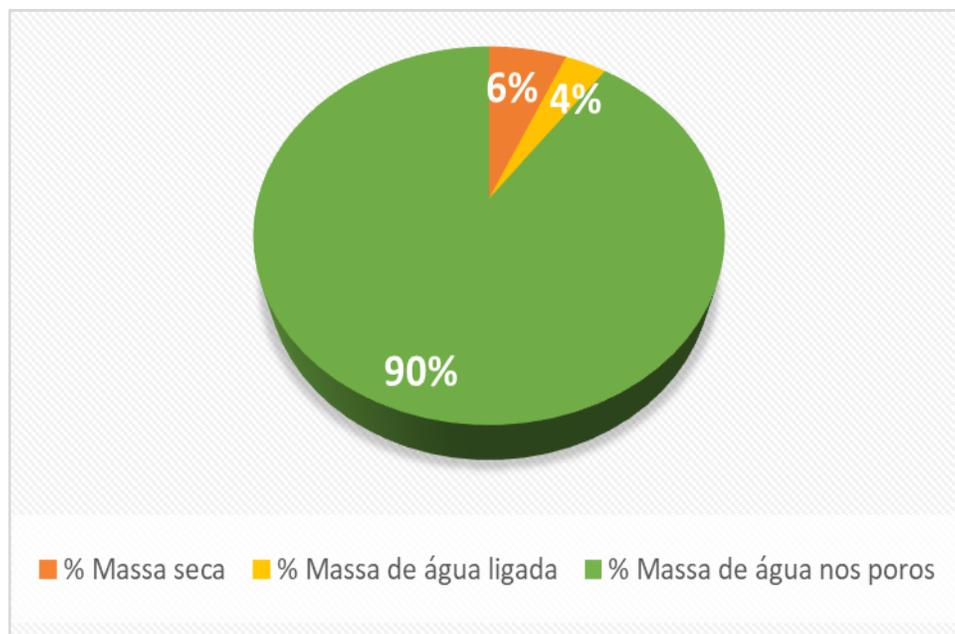


Figura 17: Composição mássica do monólito de poliacrilamida

4.3 Sistemas de eletroadsorção

Primeiramente, como a concentração é uma resposta analítica dos ensaios, fez-se uma varredura inicial para cada íon no espectrofotômetro UV-Vis para identificar qual o melhor comprimento de onda para ser feita a leitura da absorbância em cada íon metálico, sendo 809 nm para o Cu^{2+} , 394 nm para o Ni^{2+} , 511 nm para o Co^{2+} e 304 nm para o Fe^{2+} , como mostra a Figura 18. A partir desses valores, foram realizadas medições em concentrações distintas para obter curvas de calibração para cada íon metálico (Figura 19).

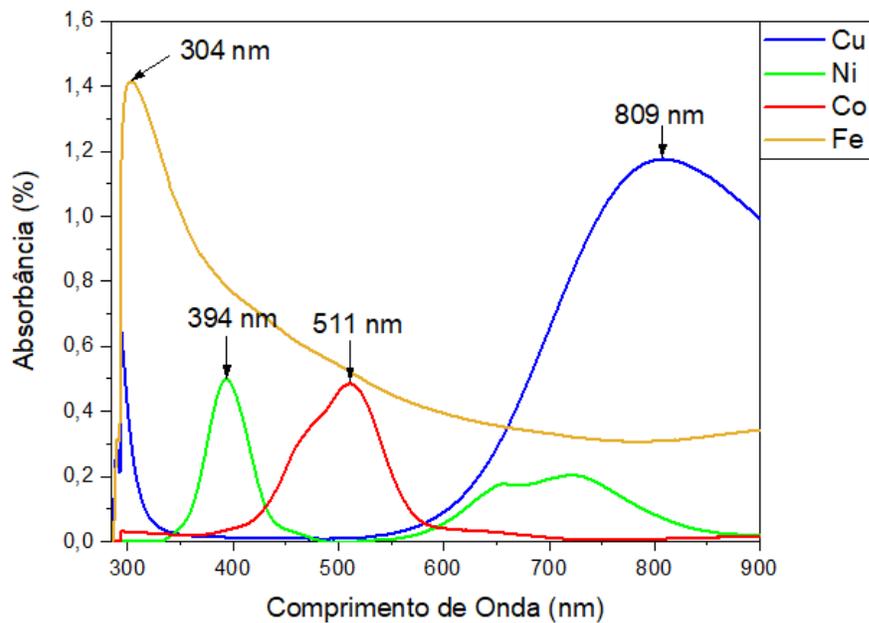


Figura 18: Varredura do comprimento de onda dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+}

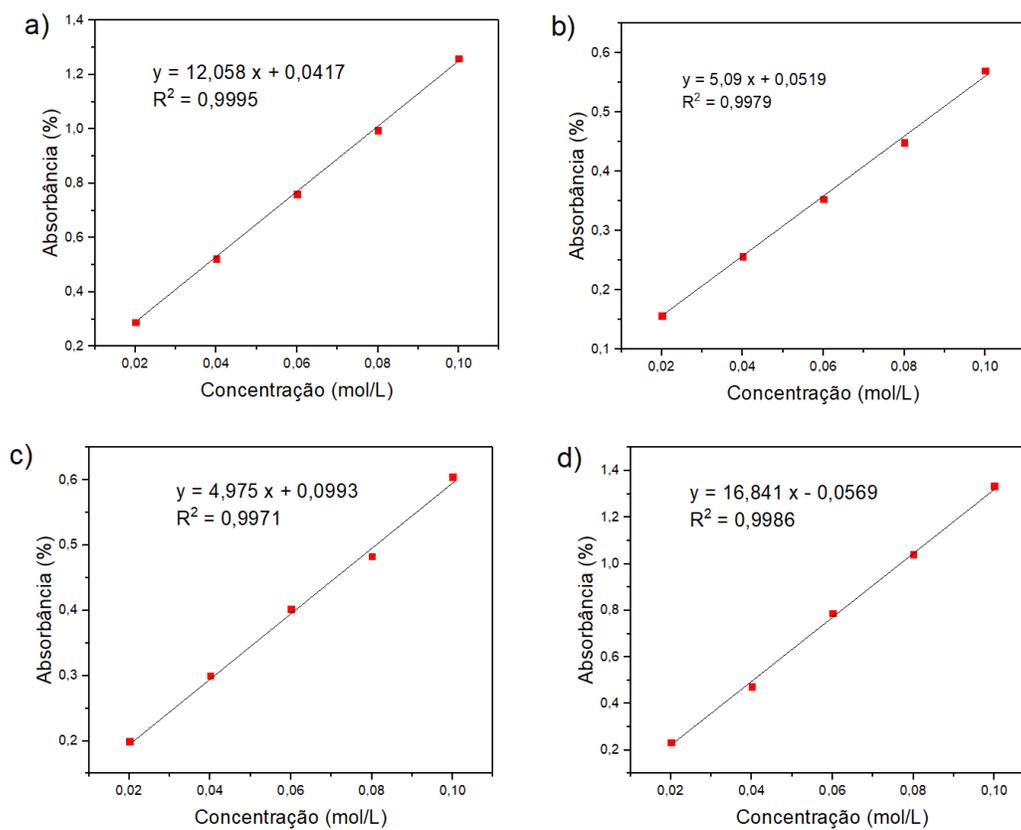


Figura 19: Curvas de calibração referentes aos íons a) Cu^{2+} ; b) Ni^{2+} ; c) Co^{2+} e d) Fe^{2+} .

Com base nesses dados iniciais, serão apresentados resultados que fornecem insights valiosos sobre a eficiência e a viabilidade dos sistemas de eletroadsorção de batelada e leito fixo para a adsorção de íons metálicos em PAam.

4.3.1 Eletroadsorção em sistema de leito fixo

4.3.1.1 Eletroadsorção do íon Fe^{2+}

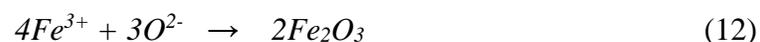
O primeiro íon metálico estudado foi o Fe^{2+} , pois, estudos mostraram que algumas proteínas (principalmente a Spike) tem capacidade de serem influenciadas por campos magnéticos, sendo assim, utilizar metais ferromagnéticos para avaliar esse comportamento torna-se indispensável (SOLOVIEV, 2022). Entretanto, a utilização do íon Fe^{2+} em um sistema de eletroadsorção sem a ocorrência de oxidação e formação de corrosão apresenta desafios significativos.

A Figura 20 mostra um dos testes iniciais da aplicação dos íons Fe^{2+} no PAam. Apesar da mudança da coloração ser significativa, os íons metálicos não se encontram eletroadsorvidos, pois, o íon Fe^{2+} é altamente propenso à oxidação, especialmente em ambientes eletroquímicos, onde ocorrem reações de transferência de elétrons. Isso ficou claro com a diferença de tonalidade na parte superior da imagem (ânodo) da parte inferior (cátodo), o que mostra que ocorre a oxidação do íon Fe^{2+} resultando na formação do íon Fe^{3+} , que possui propriedades químicas e eletroquímicas diferentes (GENTIL, 2008).



Figura 20: PAam após o processo de eletroadsorção do Fe^{2+} em leito fixo

Uma das principais razões pelas quais a utilização do íon Fe^{2+} em um sistema de eletroadsorção sem oxidação é difícil é devido à sua natureza redox, pois, o íon Fe^{2+} tem uma tendência natural de perder elétrons e se oxidar para Fe^{3+} . Em um sistema eletroquímico, onde um potencial elétrico é aplicado, essa oxidação é ainda mais provável. Como resultado, a formação de Fe^{3+} interfere na capacidade de adsorção eletroquímica e prejudica o desempenho do sistema. Além disso, a oxidação do íon Fe^{2+} para Fe^{3+} também está associada à formação de produtos de corrosão, como óxido (Fe_2O_3) e hidróxido de ferro ($Fe(OH)_3$) representados nas Equações 12 e 13 (MERÇON; GUIMARÃES; MAINIER, 2004).



Observando a Figura 20, esses produtos de corrosão foram formados e se depositaram nas superfícies e nos poros do material PAam, obstruindo os poros e reduzindo a eficiência da adsorção. Além disso, a corrosão dos eletrodos pode levar à degradação do material e à diminuição da vida útil do sistema. Ficou claro também que ao realizar um teste de compressão do PAam, o desprendimento de pequenas partículas arenosas foi observado, provavelmente são os óxidos e hidróxidos de ferro formados durante o processo. Em resumo, a utilização do íon Fe^{2+} em um sistema de eletroadsorção sem a ocorrência de oxidação e formação de corrosão se mostrou desafiadora devido à natureza redox do íon Fe^{2+} e à propensão à formação de Fe^{3+} e produtos de corrosão. Tornando-se inviável prosseguir nos estudos de eletroadsorção com esse íon no PAam.

4.3.1.2 Eletroadsorção do íon Cu^{2+}

Seguindo no estudo dos metais, a Figura 21 apresenta os resultados das amostras coletadas durante o processo de eletroadsorção dos íons Cu^{2+} no PAam para as vazões de 3, 4 e 5 mL/min, variando os potenciais de 1, 3 e 5 V. As curvas apresentadas na Figura 21 são representadas graficamente por C/C_0 versus t , em que C/C_0 corresponde a razão da concentração na saída da coluna e a concentração inicial, e t corresponde ao tempo de fluxo do fluido pela coluna. Como o PAam é muito poroso, já era esperado que a curva de

ruptura do leito atingisse seu limite rapidamente, pois, nessas vazões elevadas (entre 3 e 5 mL/min), o preenchimento da coluna é mais rápido, tornando o experimento mais célere.

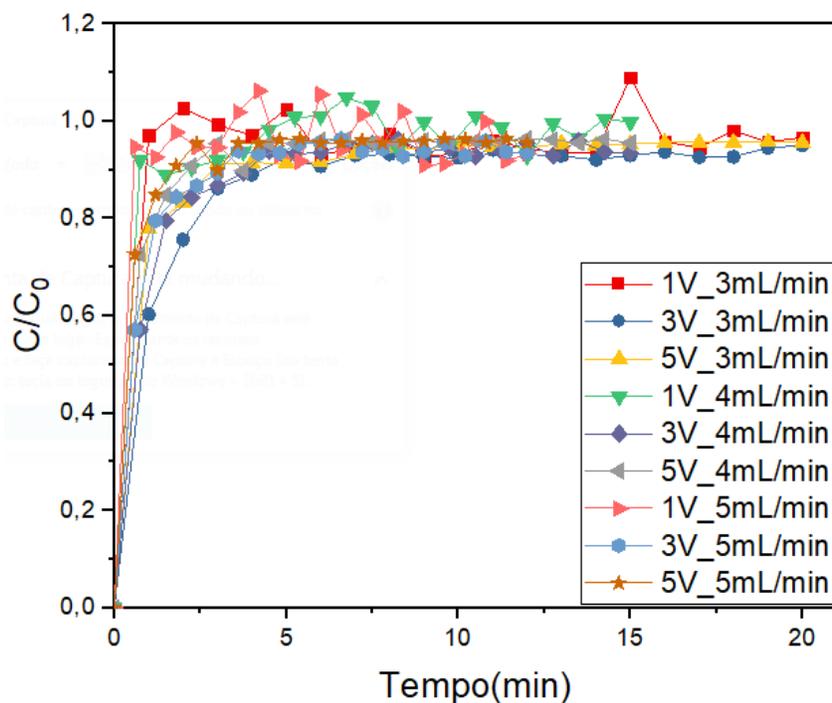


Figura 21: Curvas de rupturas em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Cu^{2+}

Após o processo de eletroadsorção, as eluições foram realizadas com a passagem de EDTA 0,1 mol/L no leito com a intenção de remover e verificar a quantidade de íon eletroadsorvida no PAam, resultando nos denominados Exp 1 (após a eletroadsorção em 1 V), Exp 2 (após a eletroadsorção em 3V) e Exp 3 (após a eletroadsorção em 5V). Inicialmente, a Figura 22 apresenta os valores da eluição do Cu^{2+} que demonstram que a partir de 3 V, a interação PAam- Cu^{2+} tem efetividade na eletroadsorção do íon metálico. Chegando a atingir nas primeiras coletas valores acima de C_0 , o que mostra que a quantidade de material acumulada no PAam pode ultrapassar a concentração da solução do íon Cu^{2+} . A Figura 22 também mostra que para 1 V, não teve força suficiente para conseguir eletroadsorver os íons Cu^{2+} , e que independentemente da vazão aplicada, ou seja, independente do tempo que a solução passe pelo PAam, para o potencial de 1 V é indiferente o processo de eletroadsorção. Esses resultados mostram que, apesar do PAam não ser um material condutor, é possível que ocorra uma pequena condutividade iônica na

solução aquosa em contato com o criogel, devido à presença dos íons metálicos e do potencial aplicado. Essa condutividade iônica na solução pode ser utilizada para induzir a migração dos íons metálicos para o interior do criogel por meio de um campo elétrico aplicado (GUO; ZHOU; XU, 2021).

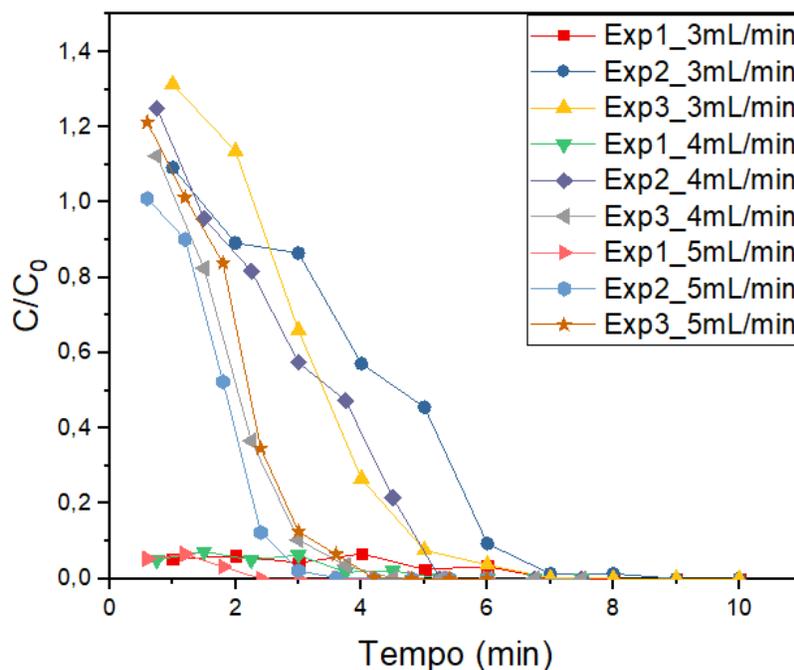


Figura 22: Curvas de eluição para eluição dos íons Cu^{2+} em leito fixo para diferentes vazões

Após a migração dos íons metálicos para o interior do criogel, eles podem ser adsorvidos em sítios específicos do PAam. É comum que esses sítios sejam criados pela introdução de grupos funcionais específicos na poliacrilamida ou por meio de modificações químicas na superfície do criogel (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; MOURÃO; CARMIGNOTTO; BUENO, 2016). No entanto, apenas com a inclusão do potencial elétrico, o PAam pode ser tornar um material adsorvente seletivo para íons Cu^{2+} , o que demonstra o caráter inovador desse processo. Esses resultados referentes a eletroadsorção dos íons Cu^{2+} tem caráter único e pioneiro na literatura, demonstrando a novidade do tema.

A Tabela 5 mostra as respostas cinéticas do processo do sistema de eletroadsorção em leito fixo para o íon Cu^{2+} , é possível observar que o potencial menor resultou em maiores valores para a ZTM e menores resultados para as quantidades de material

adsorvidas e eluidas. Confirmando que para menores potenciais a interação PAam–Cu²⁺ não é efetiva. Vale ressaltar que os resultados de q_u , q_e e q_{el} , não necessariamente poderiam estar ligados a influência do potencial, já que o PAam é de um material esponjoso e poroso, e ao entrar em contato com a solução pode ter a capacidade de adsorver os componentes sem a necessidade de um potencial elétrico. Entretanto, com o aumento do potencial, a ZTM para 3 V e 5 V tem uma redução expressiva, indicando que a adsorção ocorreu em um menor tempo e com maior eficiência. A eficiência do processo é vista com nitidez em comparação com os resultados de 1 V, obtendo maiores quantidades de material e, em alguns casos, dobrando o valor da eficiência do leito, chegando a valores acima de 80% (experimento 4, 7 e 9). Além disso, o que definiu, de fato, uma eletroadsorção eficiente foram os resultados de eluição dos íons (q_{el}) com o EDTA 0,1 mol/L. Esses resultados mostram uma eluição muito maior para os experimentos com maiores potenciais, mostrando que a interação PAam–Cu²⁺ é efetiva, mantendo os íons metálicos no PAam, ressaltando o diferencial desse trabalho em relação aos demais que utilizam um agente quelante (AQ) como intermediário na interação PAam-AQ-Metal (HAMACEK et al., 2023; MOURÃO et al., 2019; FIORANTE et al., 2022).

Tabela 5: Resultados do Planejamento experimental em duplicata para o sistema de leito fixo com o íon Cu²⁺

Experimento	Potencial (V)	Vazão (mL/min)	ZTM (cm)	q_u (mg/g)	q_t (mg/g)	η (%)	q_{el} (mg/g)
1	1	3	2,69	7,08	11,33	42,50	1,45
2	1	4	2,52	4,02	9,15	43,93	1,68
3	1	5	2,63	8,25	11,81	41,67	1,21
4	3	3	0,66	14,67	16,47	85,36	15,45
5	3	4	0,84	14,25	19,81	71,67	11,93
6	3	5	0,71	13,65	15,20	68,41	14,51
7	5	3	0,75	12,84	14,42	83,25	15,33
8	5	4	0,72	11,04	15,81	75,01	14,26
9	5	5	0,68	16,25	17,48	82,64	16,83

A avaliação da Tabela 5 para os parâmetros de ZTM e qel foi realizada por meio do *software Statistica*, considerando o limite de confiança de 95% para analisar quais variáveis independentes são estatisticamente significativas e qual é a magnitude e a direção de seus efeitos na variável dependente. Nesse caso, as variáveis dependentes analisadas foram “ZTM” e “qel”, e as variáveis independentes são "Potencial" e “Vazão”.

Ao observar os gráficos de Pareto (Figura 23) para as duas variáveis, é possível considerar que a variável Potencial tem mais significância do que a vazão tanto em relação ao ZTM, quanto ao qel. Porém, de acordo com o Gráfico de Pareto, nenhuma das variáveis indicam um efeito significativo de $p > 0,05$.

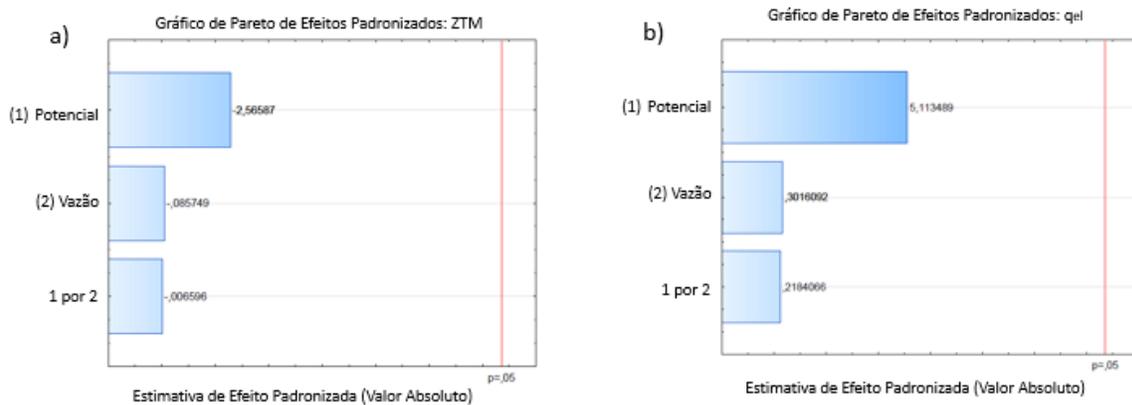


Figura 23: Gráfico de Pareto para o sistema em leito fixo considerando as respostas de a) ZTM e b) qel

Os gráficos de valores observados x previstos consegue prever com uma boa precisão os valores reais do modelo ajustado, isso significa que há uma boa homogeneidade entre os valores observados experimentalmente com o valor previsto no modelo, conforme a Figura 24. Além disso, as superfícies de resposta (Figura 25) revela regiões de resposta otimizada para maiores valores de Potencial aplicado, onde é fornecido uma resposta de ZTM menor e uma resposta de qel maior. Observando também que há uma maior sensibilidade das variáveis dependentes em relação ao potencial do que em relação a vazão.

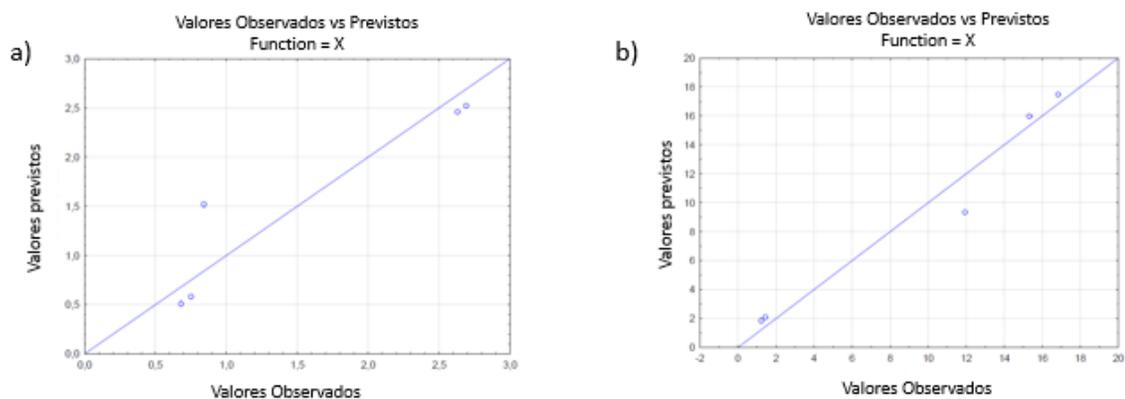


Figura 24: Gráfico de Valores observados vs previstos considerando as respostas de a) ZTM e b) q_{el}

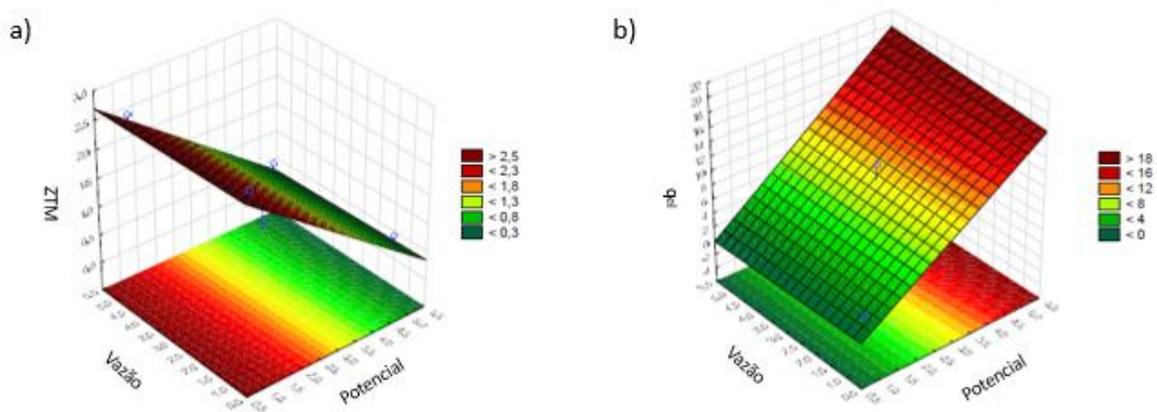


Figura 25: Superfície de resposta considerando as respostas de a) ZTM e b) q_{el}

A análise estatística expressa nas Tabelas 6 e 7 foram realizadas pelo *Software R* considerando o limite de confiança de 95% e a utilização da Regressão linear múltipla. Dessa forma, foi possível analisar mais precisamente os efeitos da vazão e do potencial aplicado no processo de eletroadsorção.

Os resultados indicaram que, para a variável Potencial, o valor de t (-4,2920) e valor- p (0,00513) para a ZTM e o valor de t (5,007) e o valor- p (0,00244) para o q_{el} , indicam que esses coeficientes são estatisticamente significativos, ou seja, há evidência

suficiente para afirmar que a variável Potencial tem um efeito significativo tanto na ZTM quanto na q_{el} . Já para a variável Vazão, o valor de t (-0,060) e o valor-p (0,95384) para a ZTM e o valor de t (0,038) e o valor-p (0,97086) para a q_{el} , sugerem que esse coeficiente não é estatisticamente significativo, ou seja, não há evidência suficiente para afirmar que a variável Vazão tem um efeito significativo nas variáveis ZTM e q_{el} .

Tabela 6: Análise estatística para a variável ZTM utilizando a Regressão linear múltipla.

Variáveis	Estimativa do valor	Desvio padrão estimado	Valor de t	Valor-p
Coefficiente linear	2,83139	0,96089	2,947	0,02573
Potencial	-0,47417	0,11046	-4,292	0,00513
Vazão	-0,01333	0,22093	-0,060	0,95384

Tabela 7: Análise estatística para a variável q_{el} utilizando a Regressão linear múltipla.

Variáveis	Estimativa do valor	Desvio padrão estimado	Valor de t	Valor-p
Coefficiente linear	-0,43889	6,09266	-0,072	0,94491
Potencial	3,50667	0,70041	5,007	0,00244
Vazão	0,05333	1,40083	0,038	0,97086

Além disso, a análise forneceu dados adicionais de métricas de ajuste e significância do modelo de regressão múltipla, apresentados na tabela 8. Nesse caso, os valores de R^2 de 0,7544 e 0,8069, para a ZTM e q_{el} , respectivamente, significam que aproximadamente 75% e 81% da variabilidade dessas variáveis é explicada pelas variáveis independentes do modelo. Já o valor de F, é um teste estatístico que avalia se existe uma relação linear significativa entre as variáveis independentes (Potencial e Vazão) e as variáveis dependentes (ZTM e q_{el}). O valor de F é 9,215 e o valor-p associado ao teste é de 0,01482, indicando que há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula de que não existe relação linear entre as variáveis independentes e a variável dependente. Já para a variável dependente q_{el} , o valor de F é 12,53 e o valor-p associado ao teste é 0,007204,

também indica que há evidência estatística significativa que rejeita a hipótese nula de que não existe relação linear entre as variáveis independentes e a variável dependente.

Tabela 8: Métricas de ajustes e significância do modelo de regressão múltipla para a ZTM e para o q_{el} .

Variáveis	Estimativa do desvio padrão dos resíduos	Graus de liberdade	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor de F	Valor-p
ZTM	0,5412	6	0,7544	9,215	0,01482
q_{el}	3,431	6	0,8069	12,53	0,007204

Sendo assim, com base nos resultados apresentados, o Potencial apresenta um efeito significativo nas variáveis dependentes ZTM e q_{el} , enquanto a Vazão não apresenta um efeito estatisticamente significativo. Além disso, o tem um bom ajuste geral, com uma porcentagem de variabilidade explicada pelas variáveis independentes. Sendo assim, para ambas as variáveis dependentes os valores de F e o valor-p sugerem que os modelos como um todo são estatisticamente significativos. Vale ressaltar que, em relação a influência da vazão no sistema, não foram obtidos resultados que demonstrem a influência dessa variável. Isso sugere que a taxa de adsorção com potenciais maiores é tão rápida que a quantidade de íons fixadas independem da velocidade com que a solução está percorrendo o leito. Ademais, encontrar o ponto de ruptura das curvas se mostrou uma tarefa desafiadora para vazões elevadas, devido a essa taxa de adsorção ser rápida, em alguns casos o leito parece iniciar rompido. Sendo assim, foi necessário realizar ensaios com menores vazões para tentar entender melhor o processo de ruptura do leito.

4.3.1.2.1 Eletroadsorção do íon Cu^{2+} em menores vazões

Mesmo com os resultados demonstrados, com as vazões elevadas o leito é preenchido rapidamente, dificultando localizar a determinar qual é de fato o ponto de ruptura do leito para calcular a ZTM e a quantidade de material adsorvida. Sendo assim, para melhor estudar o processo de eletroadsorção, o planejamento experimental foi realizado em triplicata para dois fluxos distintos (1 e 2 mL/min) e três tensões diferentes (1, 3 e 5 V). O comportamento curvilíneo (ou não) da curva de ruptura delinea uma região do

leito na qual está ocorrendo a adsorção. Esta região é definida como a zona de transferência de massa (ZTM), pois, se trata especificamente da região ativa do leito onde a adsorção acontece. Conforme as Figuras 26 e 27, a região de ruptura do leito é influenciada pela quantidade de volume de solução, ou seja, quanto maior a vazão de alimentação, menor o tempo necessário para atingir a saturação, sendo aproximadamente 150 e 70 s para vazões de 1 e 2 mL/min, respectivamente. Porém, um menor tempo de residência não diminui a capacidade do leito, pois, com o potencial elétrico aplicado não foi verificado uma diminuição no processo de eletroadsorção dos íons Cu^{2+} no leito.

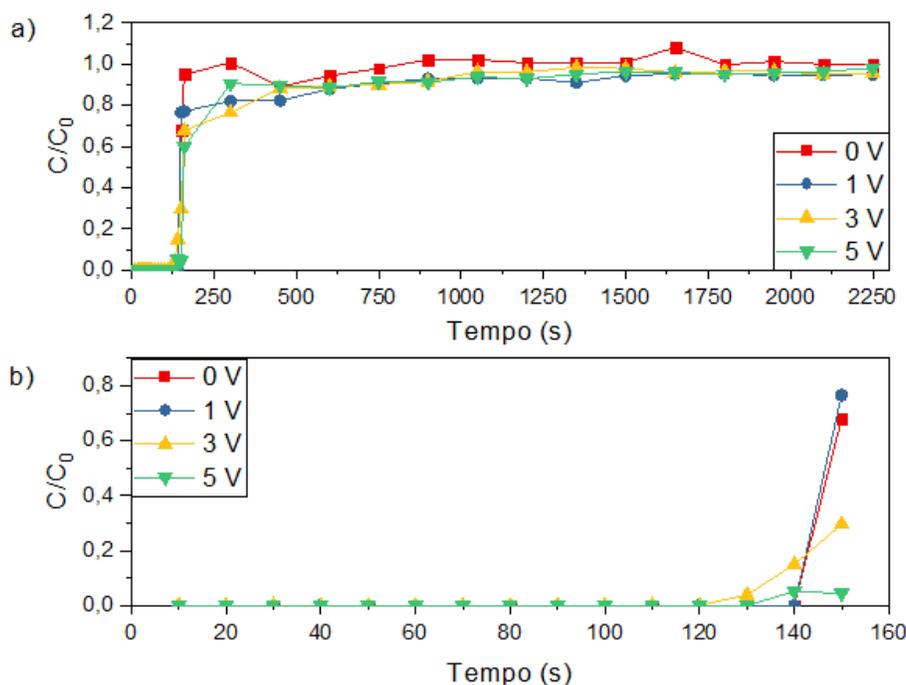


Figura 26: C/C_0 versus tempo para a eletroadsorção de íons Cu^{2+} no PAam com para vazão de 1 mL/min a) curva de ruptura b) início do rompimento do leito

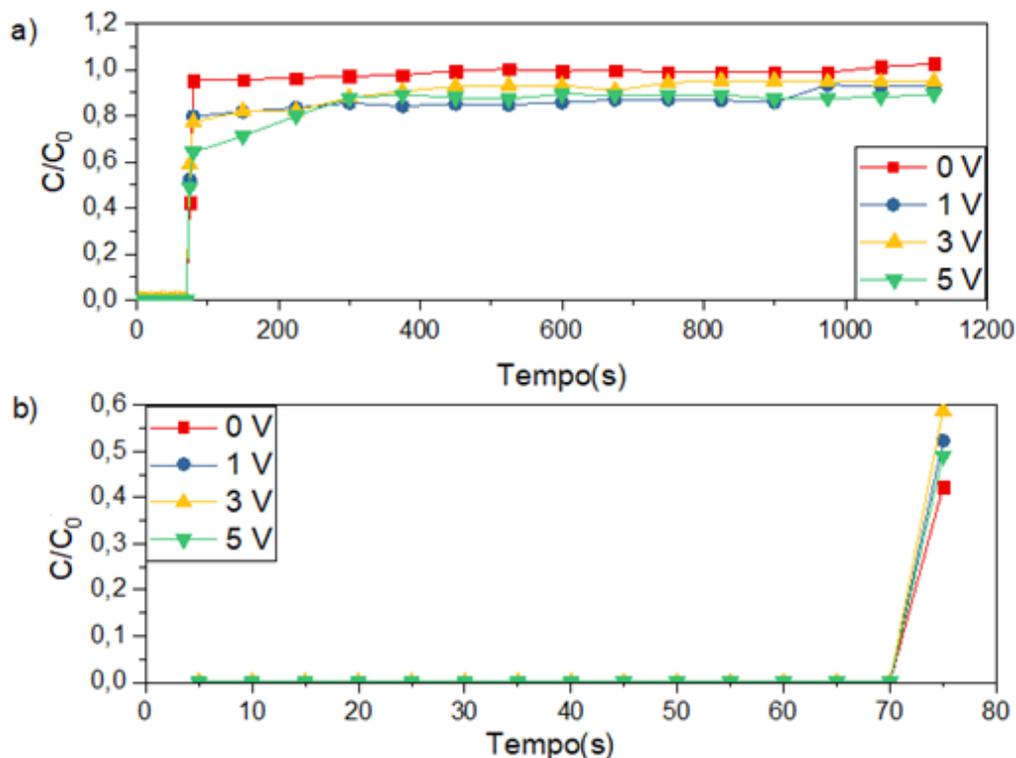


Figura 27: C/C_0 versus tempo para a eletroadsorção de íons Cu^{2+} no PAam com para vazão de 2 mL/min a) curva de ruptura b) início do rompimento do leito

Para todas as tensões aplicadas, foram observadas que as taxas de adsorção do cobre independem da vazão aplicada. Entretanto, após esse processo, se fez necessário passar pelo leito 50 mL de água miliQ com o objetivo de remover os íons que não foram eletroadsorvidos e os íons que adsorveram mais fracamente com o crigoel, sendo facilmente solvatados com o fluxo de água. Pois, a intensidade da eletroadsorção deve ser mantida mesmo após interromper o fornecimento de potencial elétrico.

Após os 50 mL de água, ao utilizar $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA como agente complexante de íons Cu^{2+} , foi possível remover os íons Cu^{2+} do leito através das curvas de eluição relativas a dessorção dos íons Cu^{2+} , nas mesmas vazões em que se realizou a eletroadsorção. As Figuras 28-a e 28-b apresentam as curvas de eluição para 2 e 1 mL/min, respectivamente. É necessário ressaltar que o Exp 1 se trata do crigoel ausente de tensão durante a eletroadsorção, e os Exp 2, 3 e 4 foram os experimentos com 1, 3 e 5 V durante o processo de eletroadsorção. Analisando os Exp 1 de ambas as Figuras, praticamente não

foram identificados íons Cu^{2+} na eluição, indicando que não ocorreu adsorção na ausência de potencial elétrico. Para o Exp 2, para a vazão de 2 mL/min, o comportamento foi similar ao Exp 1, ou seja, o potencial de 1 V não foi suficiente para promover uma eletroadsorção suficiente para evitar o processo de solvatação do íon e arraste pelo fluxo de água. Para 1 mL/min foi observado uma eletroadsorção mais branda, e a curva de eluição mais inclinada, iniciando em $C/C_0 = 0,37$. Essa diferença entre as vazões é importante, pois, apesar de apresentar eletroadsorção, quando a vazão da água miliQ passada pelo sistema antes do EDTA é mais elevada, a intensidade do fluxo influencia na dessorção dos íons Cu^{2+} .

Quanto aos Exp 3 e 4, a relação C/C_0 para 2 mL/min atingiu inicialmente 1,4 e para 1 mL/min atingiu 1,1, demonstrando uma concentração de íons removida acima da concentração inicial C_0 . Portanto, o processo de eletroadsorção se mostrou eficiente para 3 e 5 V, uma vez que, mesmo após 50 mL de água miliQ, os íons eletroadsorvidos nessas tensões permaneceram e foram dessorvidos somente com o agente complexante EDTA 0,1 mol/L. As curvas referentes as duas tensões citadas apresentaram um rápido decaimento, ou seja, a maior parte dos íons Cu^{2+} foram removidas nas primeiras coletas de amostras e atingiram rapidamente o equilíbrio, principalmente para a vazão de 2 mL/min. Os Exp 3 e 4 comprovaram que a uma determinada tensão, foi possível eletroadsorver os íons Cu^{2+} em criogeis monolíticos de poliacrilamida e que houve uma tensão mínima necessária para que a eletroadsorção fosse efetiva. Conforme a similaridade das curvas dos Exp 3 e 4 para as duas vazões, não se fez necessário se aprofundar em maiores tensões. Além disso, tensões acima de 5 V são limitadas experimentalmente devido a resistência do aço inox (nas extremidades do sistema) sofrer oxidação, não sendo um atrativo do ponto de vista industrial, pois a corrosão é um problema a ser evitado.

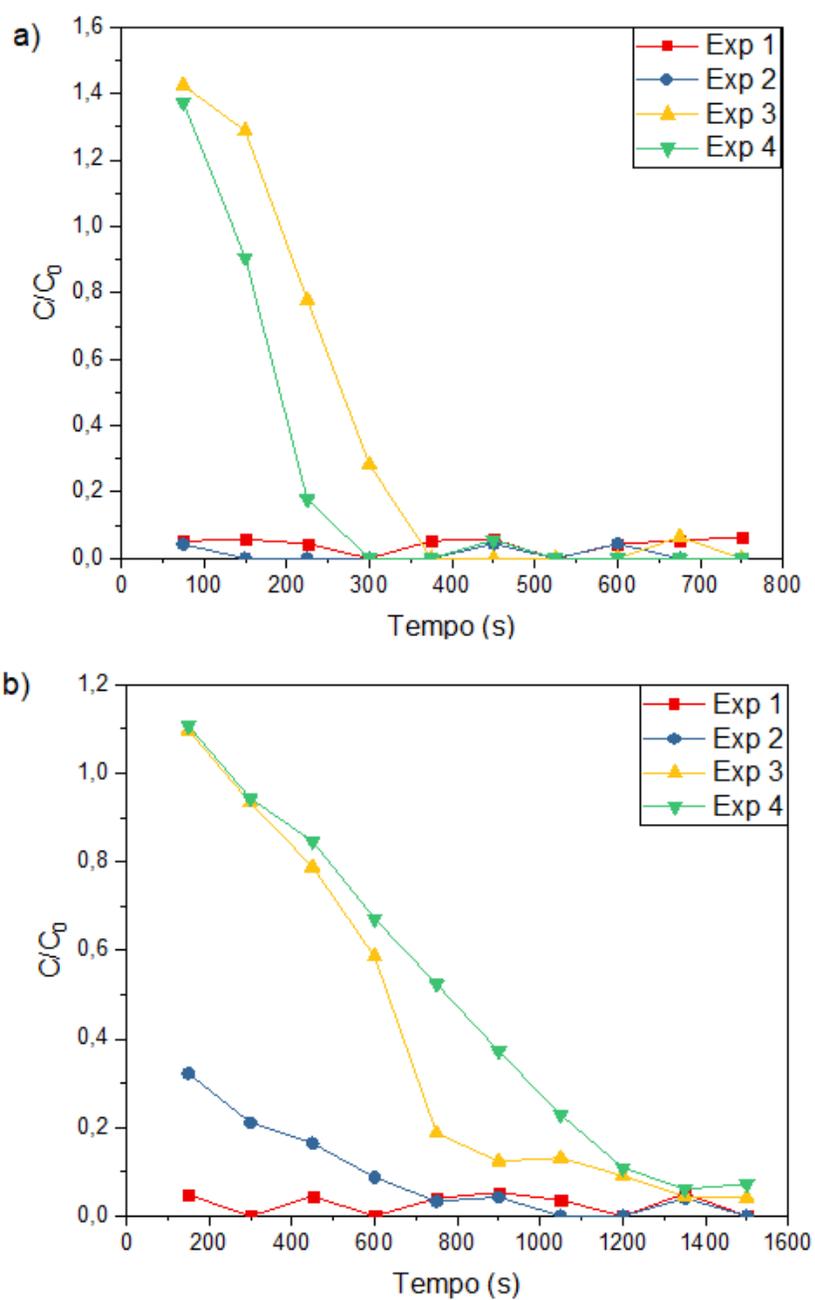


Figura 28: Eluição dos íons Cu^{2+} em EDTA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para a) 1 mL/min e b) 2 mL/min

A representação cinética dos dados experimentais de ensaios de eletroadsorção na forma de curva de ruptura deve ser comparada com dados analíticos. O método simplificado para o cálculo do comprimento da zona de transferência de massa (ZTM) foi realizado através dos tempos equivalentes as quantidades, útil (q_u) e total (q_t) removidas pela coluna, considerando o tempo de ruptura (t_b) como os tempos em que o processo se inicia observados nas Figuras 26-b e 26-b, e considerando a concentração na saída da coluna igual a 5% da concentração inicial de alimentação.

Com os parâmetros cinéticos definidos nas Equações 4-10, a Tabela 9 apresenta os resultados da ZTM com menores valores para maiores potenciais obtidos, indicando uma maior eficiência na eletroadsorção dos íons cobre no crigeol monolítico de poliacrilamida. Para as duas vazões testadas, foi observado uma diferença significativa entre a ZTM, demonstrando que a exposição mais rápida a um volume maior de íons Cu^{2+} favoreceu o processo de eletroadsorção. Para maiores valores de vazão, a pressão interna do leito foi um limitante, dificultando a aplicação na purificação de biomoléculas. Além disso, a porcentagem de adsorção no leito (η) foi obtida considerando a fração de metal em solução que ficou retida, na matriz de poliacrilamida, de todo efluente que foi utilizado no processo até a saturação do leito.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram a baixa quantidade de Cu^{2+} eluidas (q_{el}) no Exp 2 para ambas as vazões, reforçando que a tensão de 1 V não foi suficiente para eletroadsorver os íons Cu^{2+} com efetividade. Os dados para os Exp 3 e 4 apresentam uma quantidade de íon Cu^{2+} eluida similar com a q_t apresentada na Tabela 8, o que mostra que a quantidade efetivamente eletroadsorvida com as tensões de 3 e 5 V foram eluidas posteriormente com a complexação do EDTA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Sendo assim, o processo de eletroadsorção dos íons Cu^{2+} em PAam se mostrou eficaz e pode ser utilizado para purificação de biomoléculas em sistemas cromatográficos, principalmente visando a substituição do agente quelante necessário no IMAC. Ou seja, o trabalho demonstra que em um sistema de leito fixo ajustado e devidamente dimensionado, apenas com a aplicação do potencial é possível eletroadsorver o Cu^{2+} no PAam, sem a necessidade da utilização de um agente quelante para adsorver o íon Cu^{2+} .

Tabela 9: Parâmetros cinéticos calculados dos processo de eletroadsorção para 1 mL/min e 2 mL/min

Experimento	Potencial (V)	Vazão (mL/min)	ZTM (cm)	q_u (mg/g)	q_t (mg/g)	η (%)	q_{el} (mg/g)
1	1	1	2,02	6,57	11,92	55,09	1,35
2	3	1	1,49	9,60	14,34	66,97	15,45
3	5	1	0,84	11,93	14,68	81,30	14,32
4	1	3	0,80	13,33	16,23	85,36	4,20
5	3	2	0,69	11,51	13,58	82,16	19,13
6	5	2	0,69	14,26	16,83	87,41	16,85

4.3.1.3 Eletroadsorção do íon Co^{2+} e Ni^{2+}

Após os resultados inovadores da eletroadsorção do íon Cu^{2+} e da comprovação de uma interação direta do PAam- Cu^{2+} , outros dois íons metálicos foram testados no sistema de leito fixo. Os resultados de eletroadsorção apresentados nas Figuras 29 e 30 para o Ni^{2+} e Co^{2+} , respectivamente, mostram uma similaridade com a Figura 21, referente a eletroadsorção do íon Cu^{2+} . Sugerindo a possibilidade de uma interação PAam- Ni^{2+} e PAam- Co^{2+} devido a passagem do potencial elétrico em um sistema de leito fixo. Entretanto, nas Figuras 31 e 32, são observadas as eluições referentes aos íons Ni^{2+} e Co^{2+} , respectivamente, e de acordo com esses resultados, os íons Ni^{2+} e Co^{2+} não foram eletroadsorvidos pelo PAam, independente do potencial aplicado, o que torna difícil de quantificar esses íons na eluição com EDTA 0,1 mol/L. Os poucos pontos observados no início das coletas de eluição são considerados como íons adsorvidos sem a influência do potencial elétrico, devido sua baixa quantidade em comparação com os íons Cu^{2+} , pois, apesar da polaridade da água em remover esses íons, o EDTA como agente complexante tende a retirar por completo os íons que podem ter sido adsorvidos sem a influência do potencial. Esses resultados sugerem que o Cu^{2+} tem propriedades e características específicas que devem ser investigadas, com o objetivo de elucidar essa relação PAam- Cu^{2+} com a passagem de um potencial elétrico.

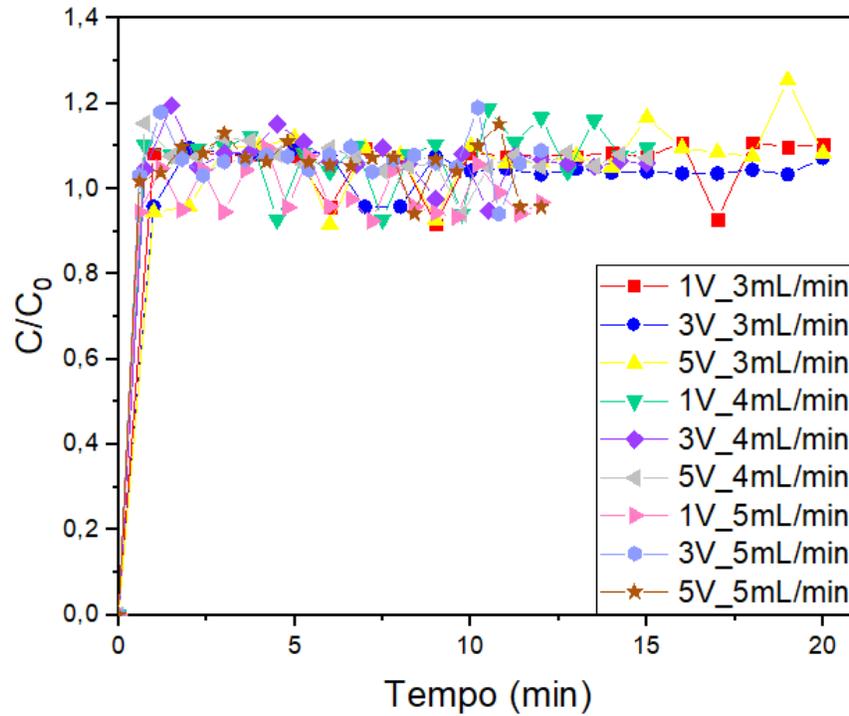


Figura 29: Resultados em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Ni^{2+}

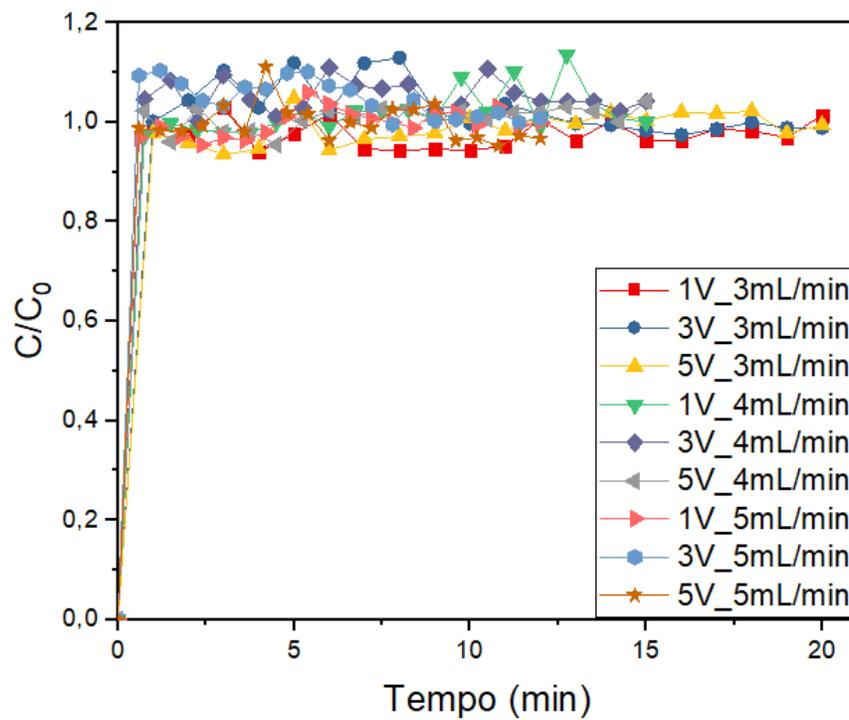


Figura 30: Resultados em leito fixo para diferentes tensões e vazões aplicadas para o íon Co^{2+}

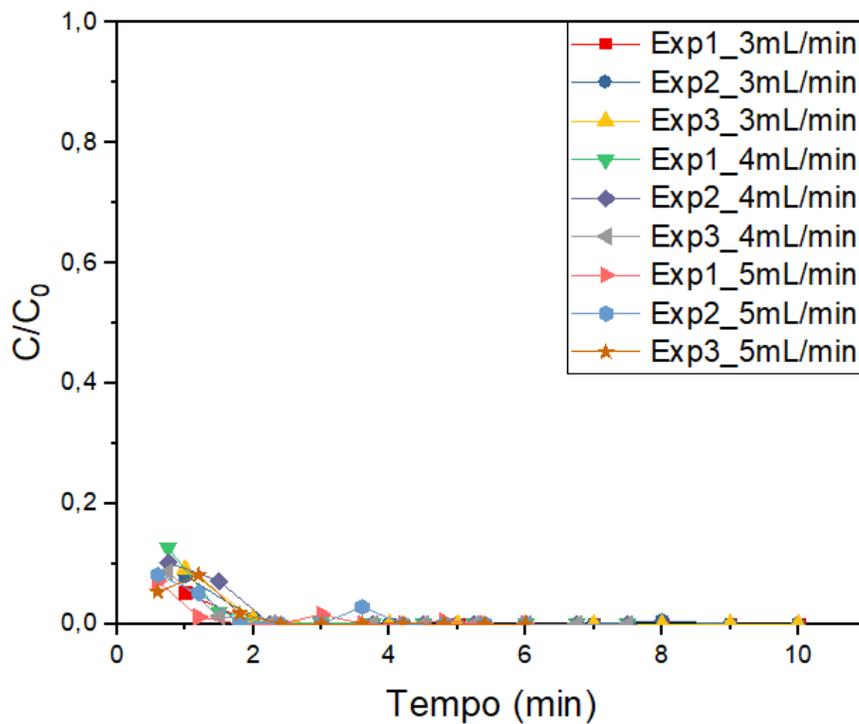


Figura 31: Resultados para eluição dos íons Ni^{2+} em leito fixo para diferentes vazões

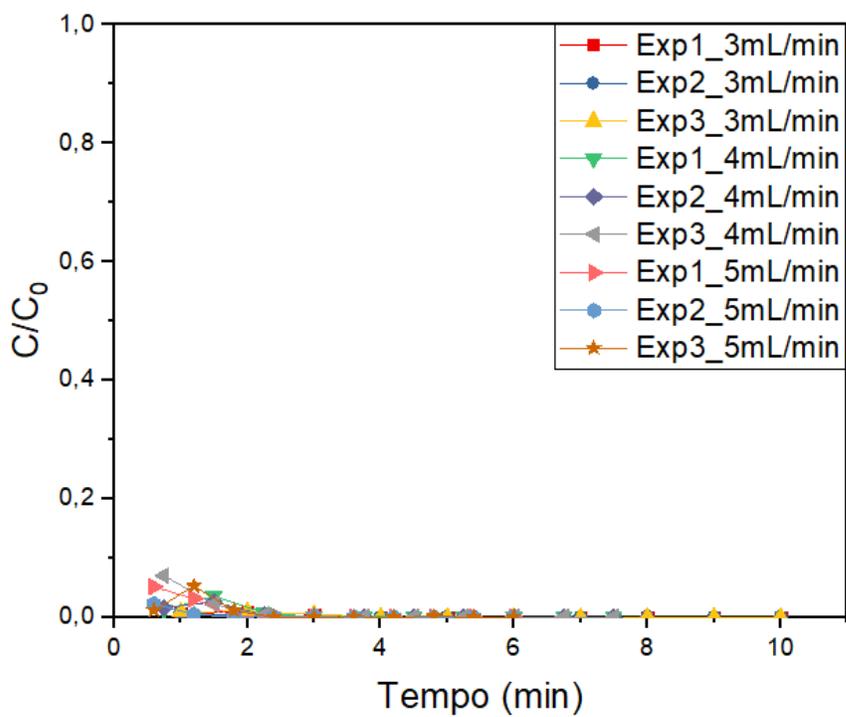


Figura 32: Resultados para eluição dos íons Co^{2+} em leito fixo para diferentes vazões

A Tabela 10 mostra as principais características dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} , bem como suas semelhanças e distinções que podem ajudar a elucidar o porquê do íon Cu^{2+} ser eletroadsorvido no PAam e os demais não. O tamanho relativamente pequeno dos íons citados permite que eles se encaixem em espaços menores nas superfícies dos materiais adsorventes, o que significa que pode adsorver mais eficientemente em superfícies com poros menores. Ademais, a alta polarizabilidade desses íons permite que eles sejam facilmente atraídos por cargas opostas eletrostáticas, pois, a polarizabilidade aumenta com o tamanho do íon e com a facilidade com que os elétrons em orbitais d podem ser deformados.

Como os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} têm tamanhos diferentes, a polarizabilidade segue a ordem de tamanho do íon: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ (GRIFFITHS; INGLEFIELD, 2005). Logo, quanto mais polarizado, mais fácil distorcer os orbitais d, essa maior distorção do Cu^{2+} faz com que ele seja um melhor adsorvato do que os outros metais. Já que, a configuração eletrônica d^9 do íon Cu^{2+} significa que ele tem nove elétrons na camada d (SILVA et al., 2019). Esses elétrons podem estar distribuídos em diferentes níveis de energia dentro da camada d, mas a configuração d^9 implica que existe um único elétron desemparelhado em um dos orbitais d. Esse elétron desemparelhado confere ao íon Cu^{2+} um momento magnético e torna-o altamente reativo. Além disso, a última camada d^9 do íon Cu^{2+} , torna-o altamente capaz de formar ligações coordenadas fortes com grupos de ligação em materiais adsorventes, o que aumenta a força e a capacidade de adsorção (GRIFFITHS; INGLEFIELD, 2005; SILVA et al., 2019).

Tabela 10: Tabela das propriedades dos Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}

Íons metálico	Raio iônico	Polarizabilidade	Configuração eletrônica
Cu^{2+}	0,073 nm	Alta	d^9
Ni^{2+}	0,069 nm	Alta	d^8
Co^{2+}	0,065 nm	Alta	d^7

Essa interação é possível pois o PAam tem grupos amida (-CONH₂) em sua estrutura, podendo formar ligações coordenadas com os íons Cu²⁺, devido a doação de pares de elétrons do átomo de nitrogênio (GURYČA et al., 2007). Em comparação com os íons Ni²⁺ e Co²⁺, suas configurações eletrônicas podem limitar suas capacidades de formar ligações coordenadas fortes com materiais adsorventes, reduzindo assim suas capacidades adsorptivas em um sistema de leito fixo.

Ademais, o entendimento da função do PAam no sistema de leito fixo com o íon Cu²⁺ também deve ser discutido. Pois, ocorre uma passagem forçada da solução pelo PAam, o que mostra que se a corrente estiver passando pela solução de íons metálicas, obrigatoriamente irá entrar em contato com o PAam, fazendo dele uma espécie de “fio condutor” do sistema, ligando as extremidades de aço inoxidável. Vale ressaltar que se fosse transcrever esse sistema em um circuito equivalente (Figura 33), o PAam funcionaria como um resistor do sistema, devido a sua alta resistividade. Por isso, se faz necessária a aplicação de tensões elevadas para que o processo de eletroadsorção ocorra no PAam. Além disso, por se tratar de um mesmo material (aço inoxidável) não é observado uma diferença de potencial significativa para que ocorra a corrosão em voltagens menores que 5 V. Sendo assim, uma das inventividades desse trabalho foi encontrar o ajuste ideal de um sistema minuciosamente dimensionado, que acomodasse o PAam com o potencial adequado para a fixação dos íons Cu²⁺, somente assim é possível considerar essa aplicação viável para substituição de agentes quelantes para purificação de proteínas no processo de IMAC.

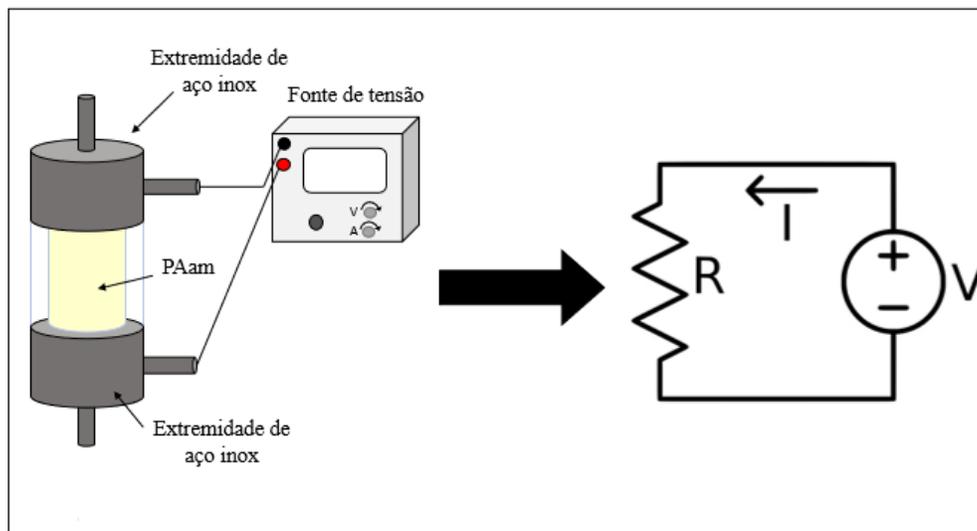


Figura 33: Representação do sistema de eletroadsorção em leito fixo como um circuito elétrico equivalente.

4.3.2 Eletroadsorção em sistema de batelada

Neste tópico, serão apresentados os resultados obtidos no sistema de eletroadsorção em um sistema de batelada utilizando o PAam como adsorvente. Pois, esse sistema, assim como o sistema em leito fixo pode trazer para o debate como a eletroadsorção em um criogel pode ser ampliada para produção em larga escala, abordando a viabilidade, estabilidade e capacidade de regeneração do PAam ao longo do tempo.

4.3.2.1 Eletroadsorção dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}

A Figura 34 apresenta a relação C/C_0 vs tempo para a eletroadsorção de Cu^{2+} respectivamente, em diferentes temperaturas e diferentes rotações. A utilização desses dois parâmetros é justificada por trabalhos mostram que sistemas de adsorção podem ser melhorados com a aplicação de energia, seja ela cinética ou térmica (COSTA; COSTA; ALMEIDA NETO, 2021). A tentativa de eletroadsorver os íons metálicos no sistema de batelada foi baseada na possibilidade de melhorar a eletroadsorção, mesmo em voltagens menores. Entretanto, a Figura 35 mostra que não existe um decaimento significativo em relação $C/C_0=1$ que justifiquem que o potencial eletroquímico está influenciando na

mudança da concentração inicial em favorecimento de uma captura dos íons metálicos pelo PAam.

Os resultados mostram que independentemente da temperatura e da rotação aplicada, os valores de concentração C/C_0 variam entre 0,93 e 0,96. O que não necessariamente pode ser resultante da influência do potencial, pois, como o PAam trata-se de um material esponjoso, ao entrar em contato com a solução pode ter uma interação entre o íon e o PAam, que seja mínima e natural de sua estrutura, sem ocorrer de fato uma eletroadsorção. O principal motivo de não ocorrer a eletroadsorção é a impossibilidade de utilizar potenciais acima de 1,5 V, essa tensão aplicada não permite explorar ao PAam explorar sua capacidade de adsorver de forma efetiva os íons metálicos, principalmente o íon Cu^{2+} .

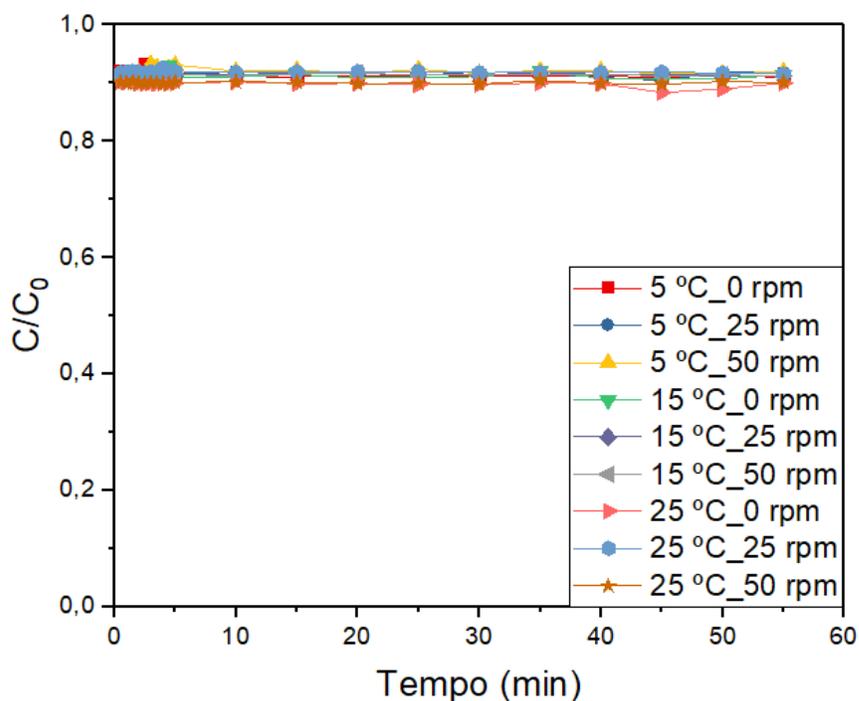


Figura 34: Resultados dos íons Cu^{2+} em batelada, para 1,5 V variando a temperatura e rotação do sistema

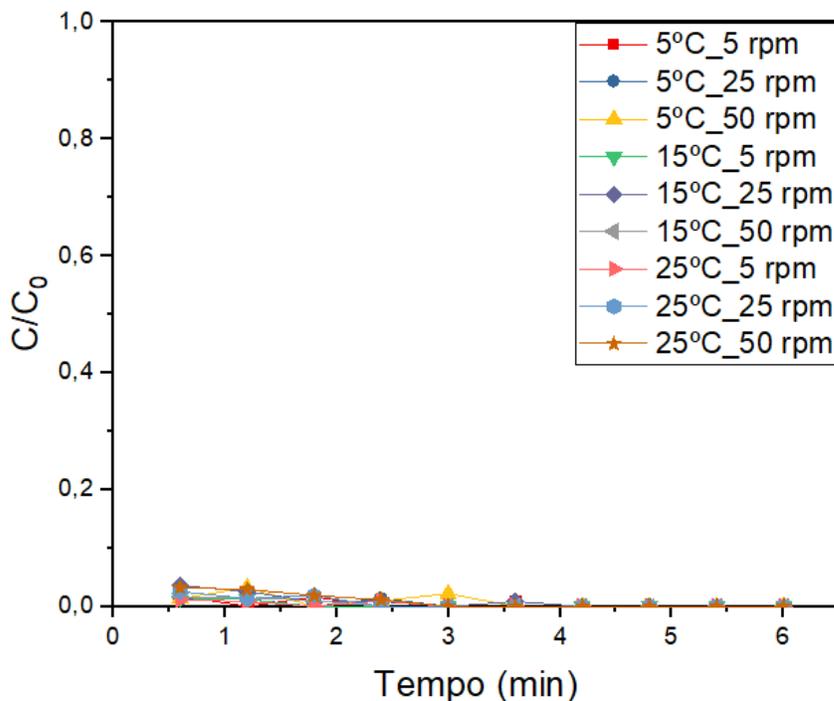


Figura 35: Eluição dos íons Cu^{2+} em um sistema de batelada após o desligamento do sistema de eletroadsorção em 1,5 V e após passar por diferentes temperaturas e rotações.

A não eletroadsorção em um sistema de batelada pode ser representada na Figura 35, que apresentam a relação C/C_0 vs tempo para a eluição em EDTA 0,1 mol/L dos ensaios realizados para o íon metálico Cu^{2+} . Vale ressaltar que os Exp 1, Exp 2 e Exp 3 citados nas figuras representam que os experimentos passaram por uma rotação de 0, 25 e 50 rpm, respectivamente. Sendo assim, após a eluição, ficou comprovado que não foi possível eletroadsorver os íons metálicos nesse sistema, mesmo insistindo em aplicar energia cinética e térmica no processo. Quanto aos íons Ni^{2+} e Co^{2+} , as imagens de eletroadsorção são análogas as Figuras 34 e 35 para o íon Cu^{2+} .

Para o sistema em batelada, o PAam está imerso na solução, sustentado por sua haste. Nesse caso, não existe a garantia que a solução de íons metálicos que entra nos poros do PAam seja responsável por conduzir eletricidade. A Figura 36 mostra que ao aplicar um potencial elétrico, o sistema com ou sem PAam não apresenta diferença alguma na condução da corrente elétrica, como se o processo ignorasse a presença do criogel, pois a solução permite a transferência de elétrons entre o aço inoxidável e o eletrodo de platina.

Sendo assim, o PAam não atua como resistor do processo, não sendo possível explorar tensões elevadas.

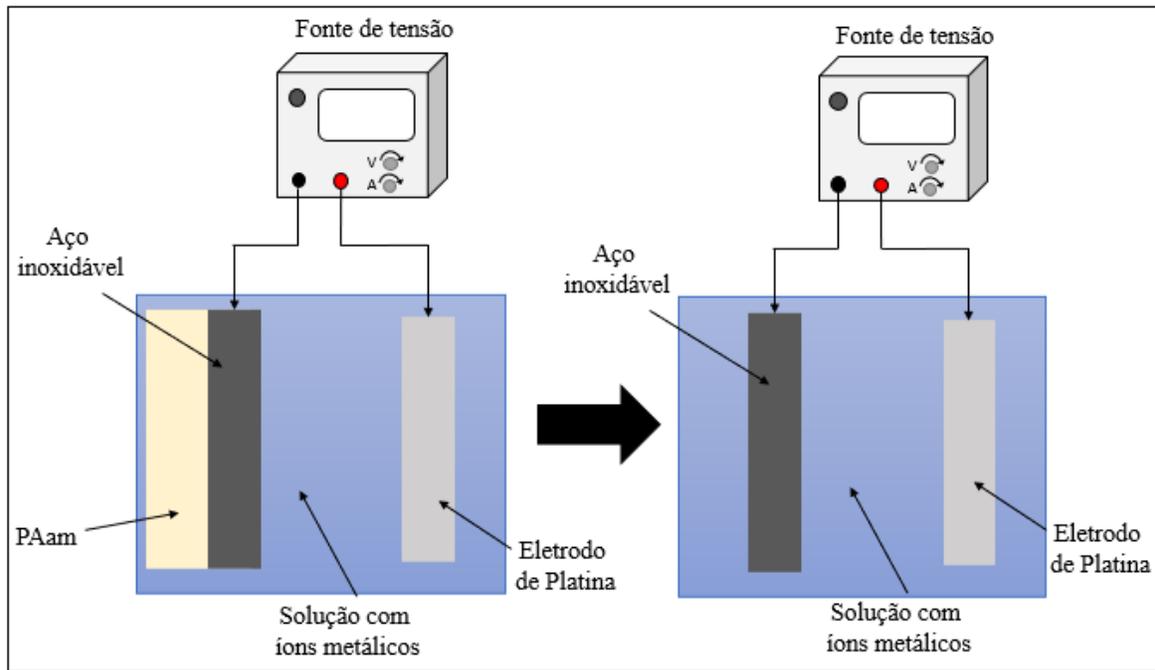


Figura 36: Representação de como o sistema de batelada não engloba o PAam, favorecendo a interação entre os eletrodos.

Na eletroquímica, quando dois metais com potenciais eletroquímicos diferentes são conectados por uma fonte de tensão em uma solução de íons metálicos, ocorre um processo chamado de célula eletroquímica ou célula galvânica (TICIANELLI; GONZALEZ, 2013). Ou seja, no ânodo (aço inoxidável), o metal com o potencial mais negativo sofre oxidação mais facilmente, liberando elétrons para a solução eletrolítica. Esses elétrons são atraídos pelo cátodo (eletrodo de platina) onde ocorre a redução dos íons metálicos presentes na solução, recebendo os elétrons e formando átomos do metal sólido depositados no cátodo.

Com potenciais aplicados elevados, todo o processo de corrosão inicia na chamada região de interface (Figura 37) esse processo tem início na chamada de região de interface, que é a área de contato do eletrodo com a solução com íons metálicos, onde ocorre as principais reações eletroquímicas. Sendo assim, além da não possibilidade de utilizar o PAam como resistor do sistema, devido a diferença de potencial entre os dois metais utilizados no processo, a corrosão tende a ocorrer com mais facilidade por proporcionar uma diferença de potencial elevada no ânodo, como mostra a Figura 38 (WOLYNEC,

2013). Essa diferença dos sistemas só reforça a dificuldade de encontrar um dimensionamento preciso e viável para eletroadsorver diretamente os íons metálicos em PAam, o que valoriza a inovação do sistema de eletroadsorção para os íons Cu^{2+} em leito fixo.

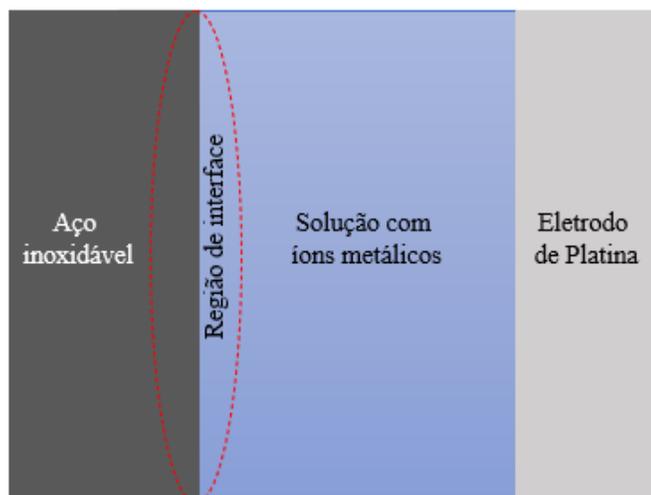


Figura 37: Demonstração da região de interface do sistema de batelada, onde inicia-se a corrosão do aço inoxidável.



Figura 38: Fotografia da haste de aço inoxidável com o PAam após um experimento com tensões acima de 1,5 V.

4.4 Microscopia ótica

Com o intuito de verificar a presença dos íons Cu^{2+} no PAam, as fotografias de 30 e 50 vezes são apresentadas na Figura 39 para as amostras submetidas a 1, 3 e 5 V em um sistema de leito fixo. As Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44 mostram o detalhamento da estrutura rugosa e porosa do material, e em algumas imagens é possível identificar traços de coloração azul, representando onde os íons Cu^{2+} podem ter sido adsorvidos. As Figuras 39 e 40 mostram que para 1 V não é possível identificar com clareza a coloração azul dos íons Cu^{2+} na estrutura do PAam. Entretanto, para os resultados de 3 e 5 V, principalmente para um aumento de 50 vezes (Figura 43 e 44, respectivamente) é possível identificar alguns traços de coloração azul onde são formados os poros do PAam.

Essa interação ocorre por meio da doação de pares de elétrons do átomo de nitrogênio para o íon metálico, formando uma ligação de coordenação. Portanto, é provável que os íons Cu^{2+} sejam adsorvidos nas regiões onde os grupos amida estão presentes na matriz de poliacrilamida. É importante considerar que a distribuição exata dos íons Cu^{2+} na matriz do criogel poderá depender de diversos fatores, além da disponibilidade dos grupos amida, como a concentração dos íons na solução e as condições experimentais específicas, principalmente o potencial aplicado.

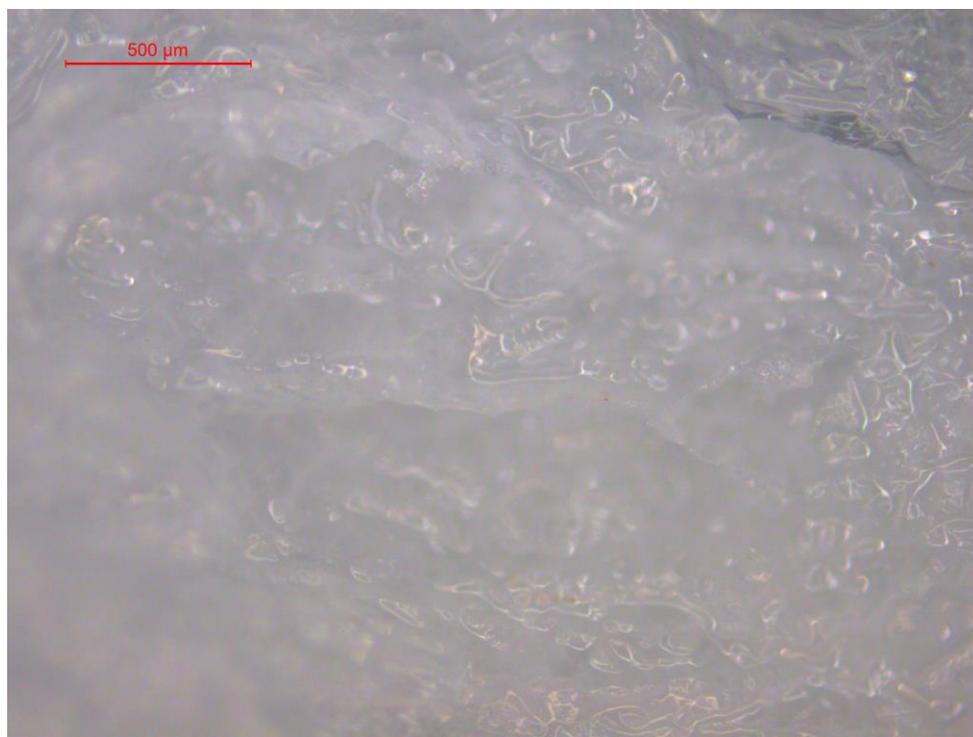


Figura 39 Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 1 V aumentada 30 vezes

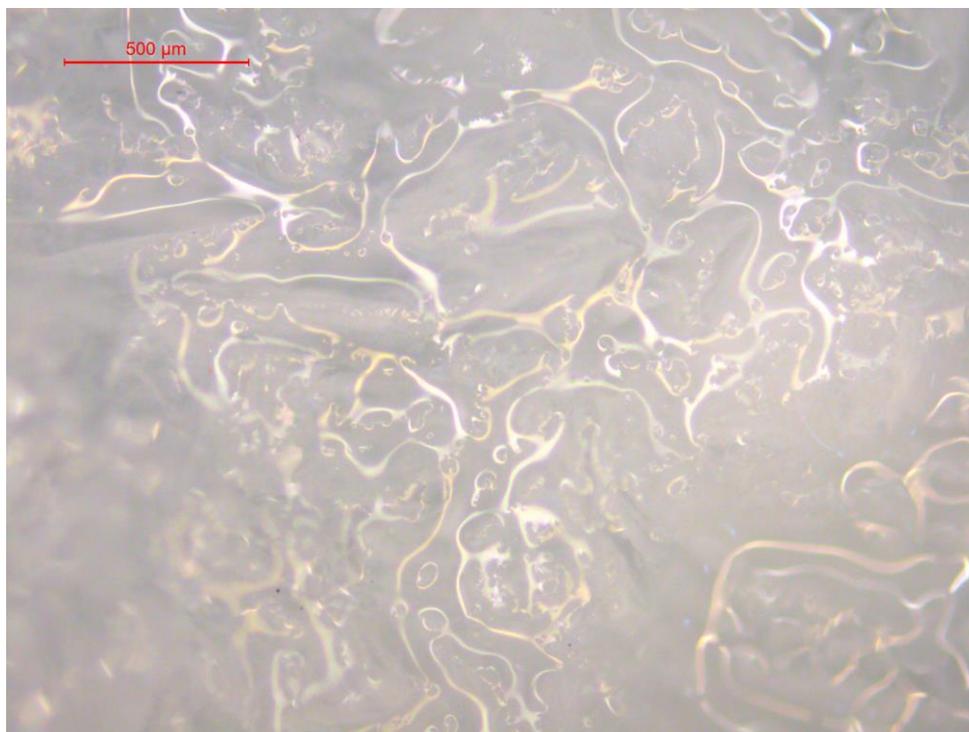


Figura 40: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 1 V aumentada 50 vezes

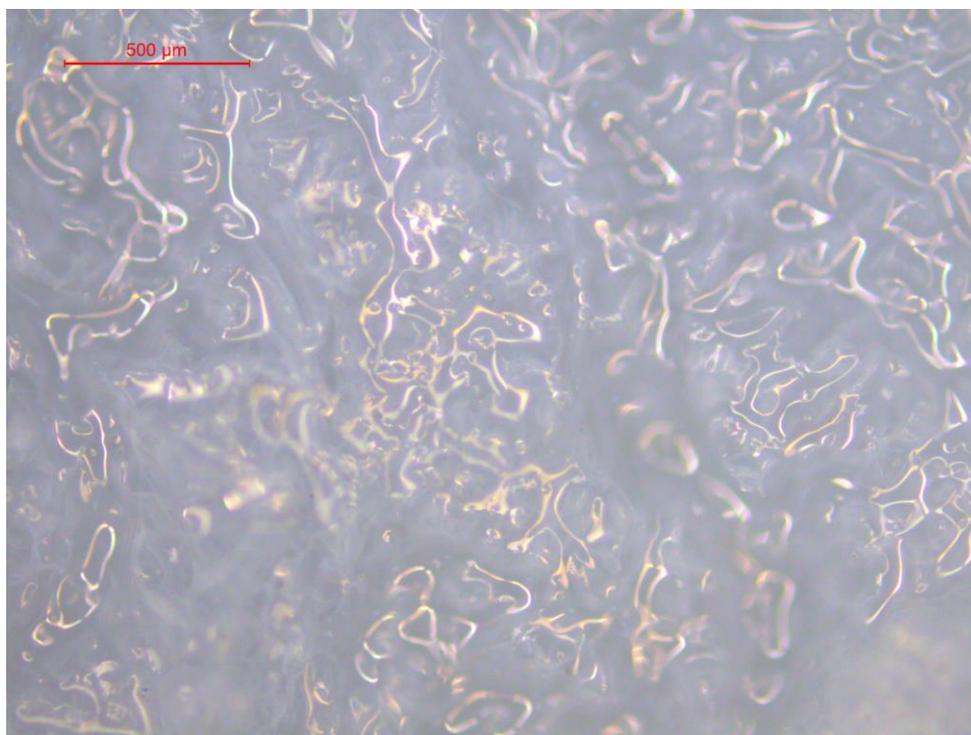


Figura 41: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 3 V aumentada 30 vezes.

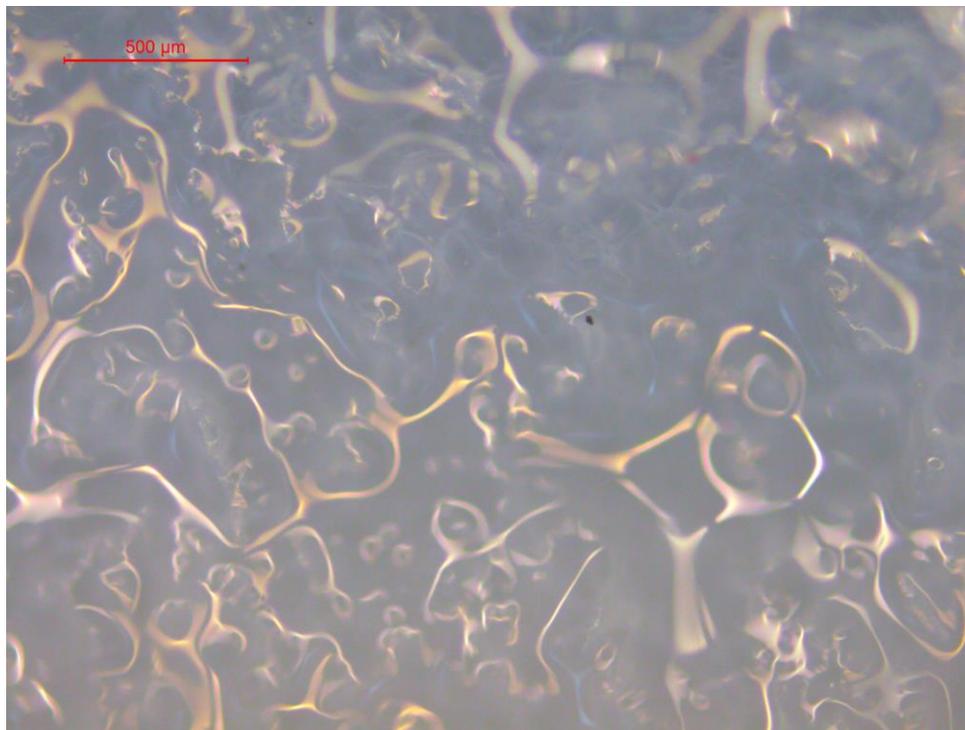


Figura 42: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 3 V aumentada 50 vezes.

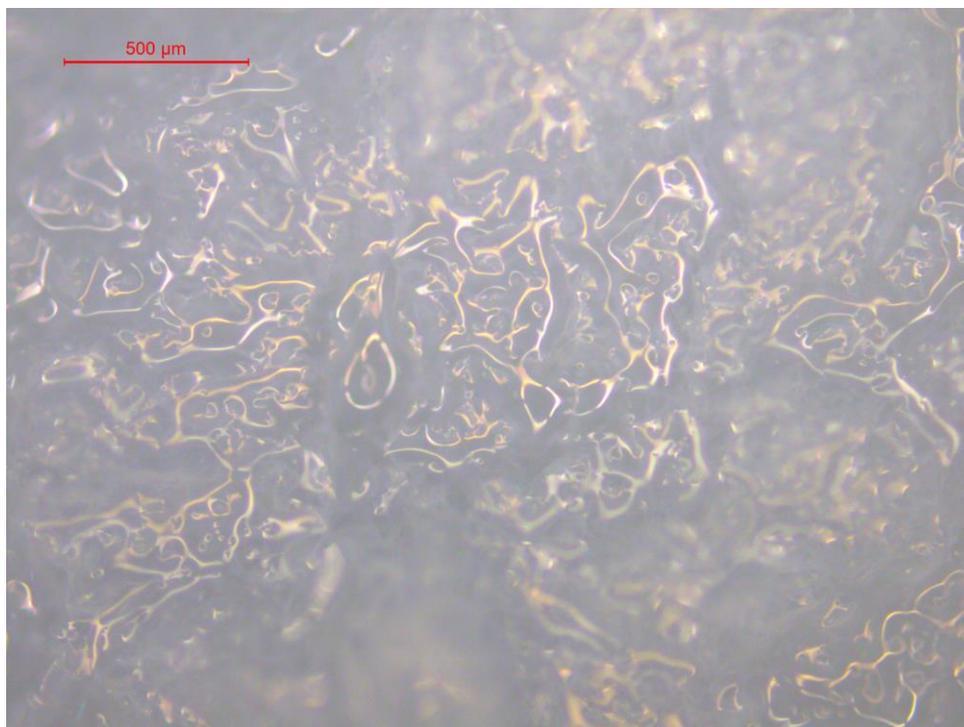


Figura 43: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 5 V aumentada 30 vezes.

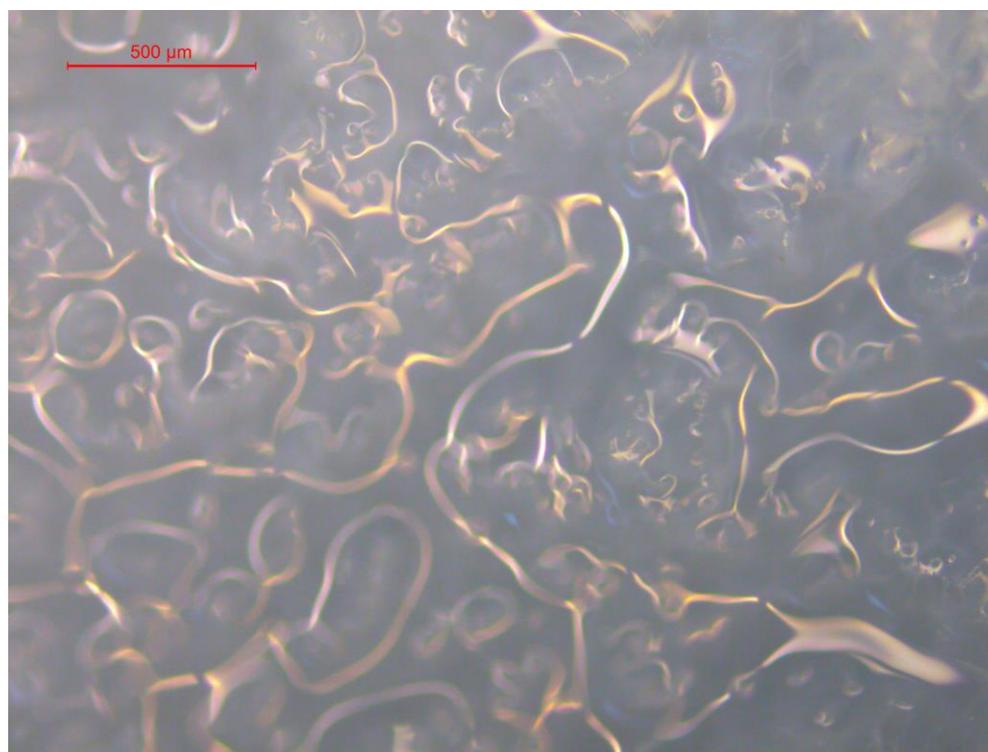


Figura 44: Microscopia Ótica para as amostras submetidas a eletroadsorção em leito fixo para 5 V aumentada 50 vezes.

4.5 Ensaios de cromatografia de afinidade

Os resultados para cromatografia foram realizados após a eletroadsorção dos íons Cu^{2+} em leito fixo, para as tensões de 3 e 5V. Assim como nos íons metálicos, fez-se uma varredura inicial para cada íon no espectrofotômetro UV-Vis para identificar qual o melhor comprimento de onda para ser feita a leitura da absorbância da IgG, 294 nm como mostra a Figura 45 a. A partir desse valor, foram realizadas medições em concentrações distintas para obter curvas de calibração para a IgG (Figura 45 b). Para a proteína Spike, foi utilizado como base trabalhos anteriores que obtiveram o comprimento de onda da proteína Spike 280 nm (SOLOVIEV et al., 2022). Para ambos os casos, as medições da concentração de Cu^{2+} também foram avaliadas, pois, é importante observar se os íons não irão desorver durante a passagem das soluções tampão.

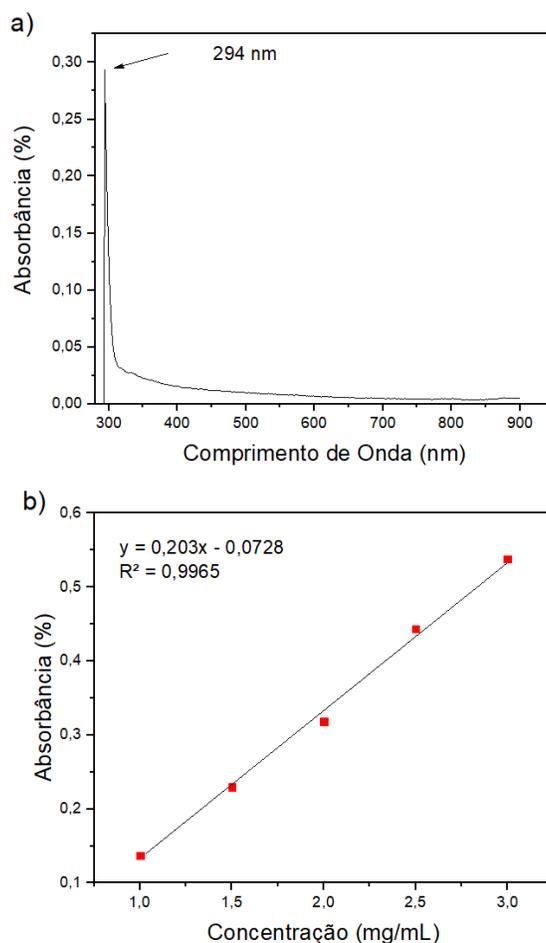


Figura 45: a) Varredura do comprimento de onda da IgG; b) Curva de calibração da IgG

4.5.1 Ensaio de cromatografia para a IgG

As Figuras 46 e 47 apresentam os ensaios de cromatografia realizados após o PAam ser submetido a um potencial de 3 e 5 V, respectivamente, em um sistema de leito fixo. Inicialmente, é possível observar a dessorção dos íons Cu^{2+} antes da passagem da proteína. Isso ocorre porque o acetato de sódio tem a capacidade de tamponar os íons Cu^{2+} por meio da coordenação dos íons metálicos, devido ao par de elétrons livres do átomo de oxigênio, realizando uma ligação de coordenação com os íons Cu^{2+} .

Apesar do Cu^{2+} , possivelmente, estar interagindo com o PAam através da interação com os grupos amida, sem a presença do potencial, a capacidade de interação entre esses dois componentes pode ser reduzida, tornando-o suscetível a outros compostos retirarem os íons Cu^{2+} do PAam. Sendo assim, com a passagem do acetato de sódio em $\text{pH} = 4$, é observado uma dessorção significativa dos íons Cu^{2+} , mostrando que o acetato de sódio desempenha um papel maior na estabilização e transporte desses íons.

Ainda nas Figuras 46 e 47 quando analisados os resultados referentes a IgG, é observado que sem os íons Cu^{2+} presentes no PAam, não existirá a adsorção da proteína. Pois, é necessário que os íons Cu^{2+} estejam presentes para interagir com a cauda de histidina da IgG. Sendo assim, apesar da eletroadsorção do Cu^{2+} em um sistema de leito fixo ocorrer no PAam, ela não é efetiva o suficiente para suportar um sistema tamponante do processo cromatográfico.

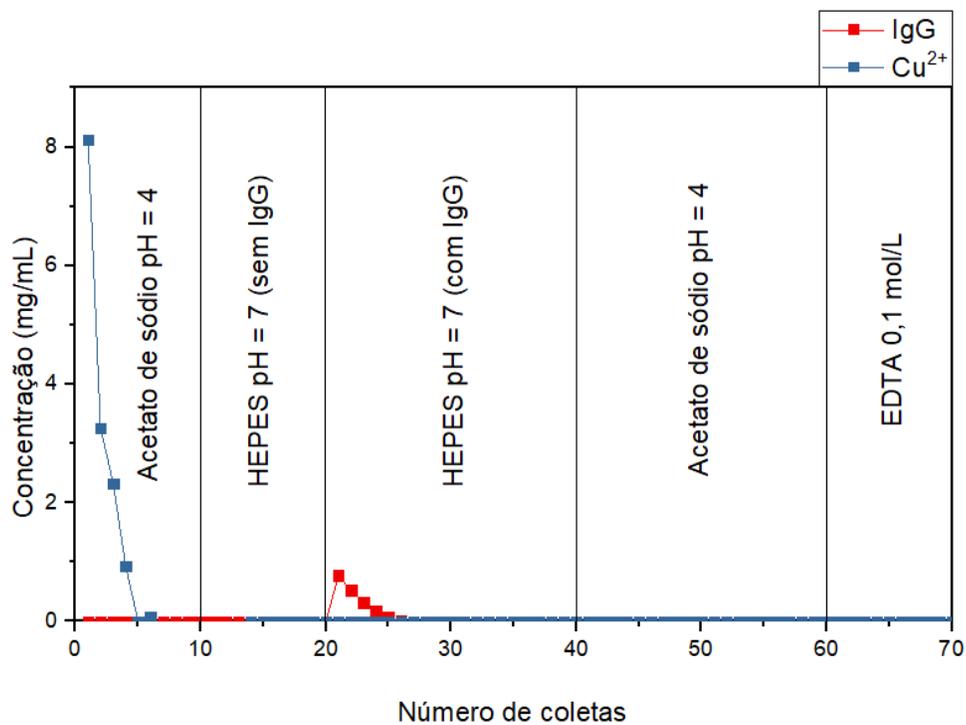


Figura 46: Ensaio de cromatografia com IgG após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 3 V.

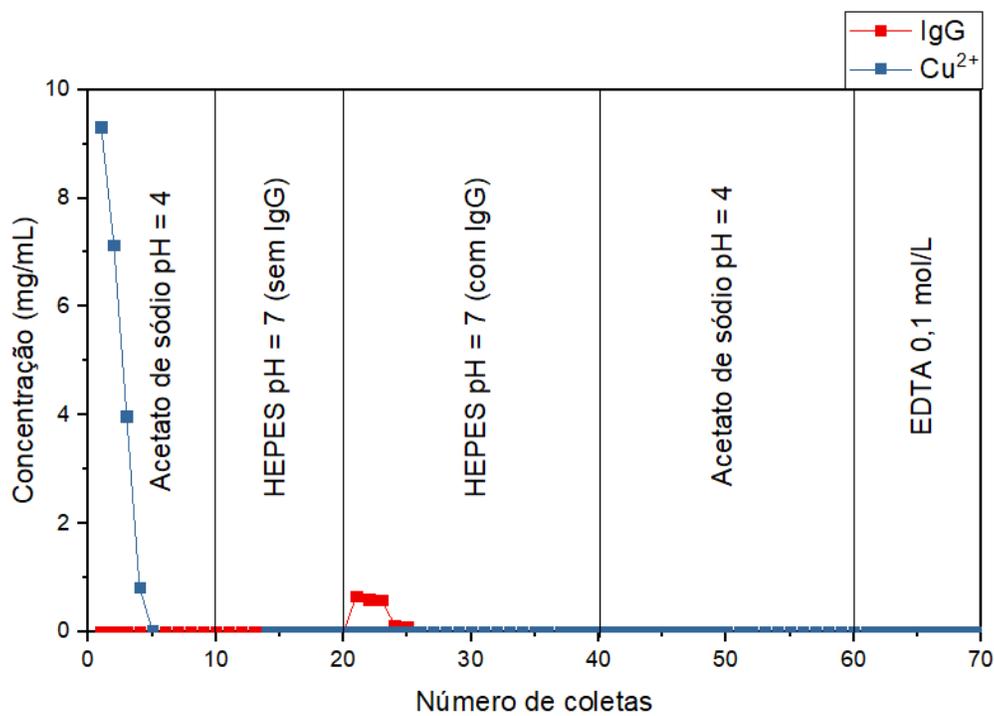


Figura 47: Ensaio de cromatografia com IgG após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 5 V.

4.5.2 Ensaio de cromatografia para a Proteína Spike

Assim como para a IgG, a dessorção dos íons Cu^{2+} ocorreu com o acetato de sódio no início do processo, o que impede que o ACE2 da proteína Spike interaja com o metal durante a etapa de inserção da proteína. Essa limitação da solução tampão foi um impeditivo determinante para avaliar o processo de adsorção das proteínas. Além disso, para a proteína Spike a quantidade em $100 \mu\text{L/L}$ foi muito reduzida, impedido de detectar no espectrofotômetro UV-Vis sua saída. Sendo assim, a Figura 48 apresentou nitidamente apenas a dessorção dos íons Cu^{2+} .

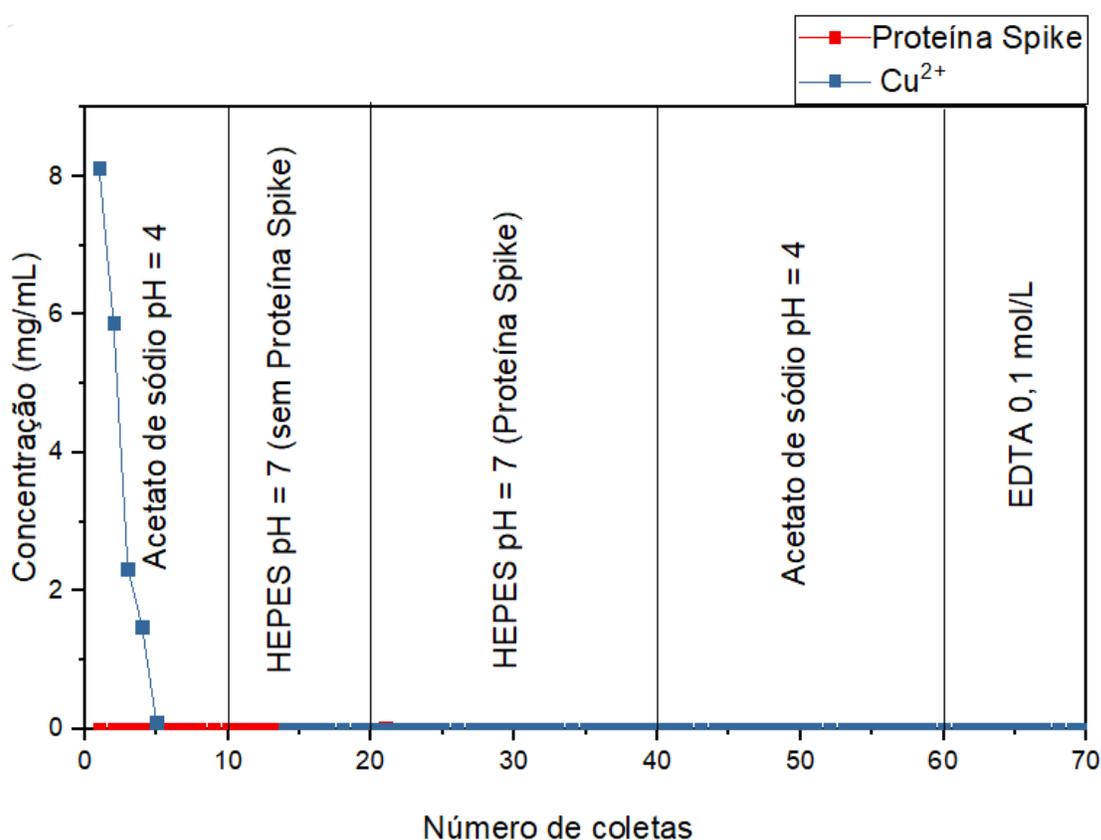


Figura 48: Ensaio de cromatografia com a Proteína Spike após a eletroadsorção de íons Cu^{2+} em potencial de 3 V.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O trabalho abordou de forma pioneira o estudo sobre a eletroadsorção dos íons metálicos Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em uma matriz polimérica de PAam, para dois sistemas distintos de eletroadsorção, em batelada e em leito fixo, visando a substituição do agente quelante por um sistema de eletroadsorção. Pode-se concluir que, devido ao minucioso dimensionamento proposto pelo trabalho e do ajuste das variáveis, foi possível eletroadsorver os íons Cu^{2+} no PAam. Essa eletroadsorção específica pode ser explicada pela subcamada d⁹ do íon Cu^{2+} ser capaz de interagir mais fortemente em regiões onde estão presentes os grupos amida do PAam. Os resultados confirmaram que independente da vazão aplicada, essa variável não influencia significativamente na eletroadsorção, a variável fundamental para o processo ocorrer é o potencial. Os experimentos 4, 7 e 9 para o Cu^{2+} , obtiveram em porcentagem de quantidade adsorvidas acima de 80%. Como os melhores resultados de eletroadsorção foram em potenciais elevados (3 e 5V), houve uma limitação do processo para o sistema em batelada devido a diferença de potencial entre o eletrodo de platina e o suporte de aço inoxidável, prevalecendo a interação entre os metais e ignorando o PAam no sistema. Quanto aos outros metais, o Fe^{2+} rapidamente se oxida durante o processo, formando óxidos e hidróxidos produtos de corrosão, preenchendo o leito e comprometendo sua eletroadsorção. Em relação ao Ni^{2+} e o Co^{2+} , esses metais não apresentaram uma eletroadsorção significativa devido as características desses íons serem diferentes do Cu^{2+} . Para a aplicação na cromatografia de afinidade, visando a adsorção da IgG e da Proteína Spike, houve a dessorção dos íons Cu^{2+} no início do processo, limitando a adsorção.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES FUTURAS

6 SUGESTÕES FUTURAS

Para futuras pesquisas relacionadas a esse trabalho, algumas sugestões podem ser consideradas:

- **Explorar a modificação da matriz do criogel de poliacrilamida:** Testar diferentes composições e estruturas do criogel, utilizando outros polímeros ou modificando as propriedades da poliacrilamida, a fim de melhorar a adsorção dos íons metálicos.
- **Investigar condições de operações otimizadas:** Analisar parâmetros como pH e concentração dos íons Cu^{2+} , a fim de determinar as condições ideais para a máxima adsorção.
- **Estudar a regeneração e reutilização do criogel:** Avaliar métodos de regeneração do criogel após a adsorção dos íons metálicos, permitindo sua reutilização e prolongando a vida útil do material.
- **Reavaliar o sistema tamponante:** Avaliar sistemas tamponante que evitem a dessorção preliminar dos íons metálicos, para que seja possível avaliar sua capacidade de adsorver as proteínas.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKAN, H. et al. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. **Biochemical Engineering Journal**, 2009.

ANTILEN, M. et al. Electrochemical evaluation of ciprofloxacin adsorption on soil organic matter. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 7132–7139, 2016.

ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, B. V. **Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification** *Methods*, 2017.

ARVIDSSON, P. et al. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, 2003.

BABANEJAD, N. et al. **Applications of cryostructures in the chromatographic separation of biomacromolecules** *Journal of Chromatography A*, 2022.

BAKSHPOUR, M. et al. [PHEMA/PEI]-Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma. **Materials Science and Engineering C**, 2016.

BÁN, A.; SCHÄFER, A.; WENDT, H. Fundamentals of electrosorption on activated carbon for wastewater treatment of industrial effluents. **Journal of Applied Electrochemistry**, 1998.

BASU, N. et al. Coupling Electrochemical Adsorption and Long-range Electron Transfer: Label-free DNA Mismatch Detection with Ultramicroelectrode (UME). **Electroanalysis**, v. 31, n. 11, p. 2232–2237, 2019.

BENEOV, E.; KRLOV, B. Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization. In: **Affinity Chromatography**. [s.l.: s.n.].

BENKOVÁ, Z.; CORDEIRO, M. N. D. S. Structural behavior of monomer of SARS-CoV-2 spike protein during initial stage of adsorption on graphene. **Materials Today Chemistry**, v. 22, p. 100572, 2021.

BERALUS, J. M. et al. Electroadsorption of arsenic from natural water in granular activated carbon. **Frontiers in Materials**, v. 1, 2014.

BOYLE, J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, 2009.

ÇAMBAY KUBAN, F. et al. Ni(II) functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane based capillary monolith for purification of histidine-tagged proteins by immobilized metal affinity micro-chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2023.

CARMIGNOTTO, G. P.; MOURÃO, C. A.; BUENO, S. M. A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on ω -aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. **Process Biochemistry**, 2017.

CARVALHO, B. M. A. et al. **Cryogel poly(acrylamide): Synthesis, structure and applications** Separation and Purification Reviews, 2014.

CASTILHO, L. R. et al. **Animal cell technology: From biopharmaceuticals to gene therapy**. [s.l: s.n.].

ČERNIGOJ, U. et al. Characterization of methacrylate chromatographic monoliths bearing affinity ligands. **Journal of Chromatography A**, 2016.

CHAO, L. et al. Review on antibiotics treatment by electrochemical membrane reactor. **E3S Web of Conferences**, v. 233, 2021.

CHARLES A JANEWAY, J. et al. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**, 2001.

CHEN, C.; WANG, X. Adsorption of Ni(II) from aqueous solution using Oxidized

multiwall carbon nanotubes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 26, p. 9144–9149, 2006.

CLARK, S. A. et al. SARS-CoV-2 evolution in an immunocompromised host reveals shared neutralization escape mechanisms. **Cell**, 2021.

COBB, B. A. **The history of IgG glycosylation and where we are now** **Glycobiology**, 2021.

COSTA, J. G. DOS R. DA; COSTA, J. M.; ALMEIDA NETO, A. F. DE. **Recent advances and future applications in electro-adsorption technology: An updated review** **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2021.

COSTA, J. M. **Considerations on Electrochemical Technologies for Water Purification and Wastewater Treatment** **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2023.

COSTA, J. M.; COSTA, J. G. DOS R. DA; ALMEIDA NETO, A. F. DE. **Techniques of nickel(II) removal from electroplating industry wastewater: Overview and trends** **Journal of Water Process Engineering**, 2022.

ÇULHA, S. et al. Synthesis of l-lysine imprinted cryogels for immunoglobulin G adsorption. **Materials Science and Engineering C**, 2015.

DA SILVA, L. C. A. et al. Separation of human Fab fragments on negative mode Ni(II)-TREN-agarose chromatography. **Process Biochemistry**, 2014.

DĄBROWSKI, A. LINKS OPEN OVERLAY. Adsorption — from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, p. 135–224, 2001.

DAOUD-ATTIEH, M. et al. Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels. **Separation and Purification Technology**, 2013.

DEARLOVE, B. et al. A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2020.

DJOMKAM, A. L. Z. et al. **Commentary: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor** **Frontiers in Oncology**, 2020.

DO, D. D. **Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics**. [s.l: s.n.]. v. 2

DOS SANTOS FRANCO, F.; FERNANDES, D. S.; DO CARMO, D. R. A modified hybrid silsesquioxane/histidine composite for copper and zinc adsorption and its behavior in the electro-oxidation of ascorbic acid. **Materials Science and Engineering C**, v. 111, 2020.

DU, K.; DAN, S. Reversible Concanavalin A (Con A) ligands immobilization on metal chelated macroporous cellulose monolith and its selective adsorption for glycoproteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1548, p. 37–43, 2018.

DUTTA, S.; BOSE, K. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: **Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins**. [s.l: s.n.].

ELVIRO, M. et al. Preparation and characterization of a macroporous agarose monolith as a stationary phase in IMAC chromatography. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, n. 2, p. 268–277, 2019.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Cryogels-versatile tools in bioseparation **Journal of Chromatography A**, 2014.

FASSINA, G. et al. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2001.

FERRER-MIRALLES, N. et al. General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. **Methods in Molecular Biology**, 2015.

FIORAVANTE, I. F.; BUENO, S. M. A. Performance of polyacrylamide-alginate-based cryogel for IgG purification from bovine serum by IMAC. **Process Biochemistry**, 2022.

FURLANI, I. et al. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE. **Química Nova**, 2020.

GANESAN, S. et al. Absolute removal of ciprofloxacin and its degraded byproducts in aqueous solution using an efficient electrochemical oxidation process coupled with adsorption treatment technique. **Journal of Environmental Management**, v. 245, n. 100, p. 409–417, 2019.

GEANKOPLIS, C. **Transport processes and unit operations**. [s.l: s.n.].

GENTIL, V. **Corrosao São Paulo**, 2008.

GHORBANI, J.; KOMPANY-ZAREH, M.; TAHMASEBI, E. Antibodies purification from human plasma using fractionation, chromatography and gel electrophoresis assisted by multivariate analysis of complimentary absorption and fluorescence spectra. **Journal of**

Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2021.

GRIFFITHS, D. J.; INGLEFIELD, C. Introduction to Electrodynamics. **American Journal of Physics**, 2005.

GURYČA, V. et al. Porous polyacrylamide monoliths in hydrophilic interaction capillary electrochromatography of oligosaccharides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2007.

HABEEB, A. F. S. A.; FRANCIS, R. D. Preparation of human immunoglobulin by caprylic acid precipitation. **Preparative Biochemistry**, 1984.

HAGE, D. S. et al. Affinity chromatography. In: **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Volume 1, Third Edition**. [s.l: s.n.].

HAMACEK, H. S. D. R. et al. Synthesis and characterization of chitosan-polyacrylamide cryogels for the purification of human IgG by IMAC. **Process Biochemistry**, 2023.

HOFBAUER, L. et al. Affinity Chromatography for Purification of IgG from Human Plasma. In: **Affinity Chromatography**. [s.l: s.n.].

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, 2020.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, 2020.

HUANG, Y. et al. Sustainable activated carbon fiber from sawdust by reactivation for high-performance supercapacitors. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 1, p. 478–488, 2017.

HUANG, Y. et al. Tandem nanobody: A feasible way to improve the capacity of affinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2021.

HUSE, K.; BÖHME, H. J.; SCHOLZ, G. H. **Purification of antibodies by affinity chromatography** **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2002.

JIANG, T. J. et al. Electroadsorption-Assisted Direct Determination of Trace Arsenic without Interference Using Transmission X-ray Fluorescence Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, 2015.

JOMHORI, M.; MOSADDEGHI, H.; FARZIN, H. Tracking the interaction between single-wall carbon nanotube and SARS-Cov-2 spike glycoprotein: A molecular dynamics

- simulations study. **Computers in Biology and Medicine**, 2021.
- JUNG, Y.; CHOI, U. S.; KO, Y. G. Securely anchored Prussian blue nanocrystals on the surface of porous PAAm sphere for high and selective cesium removal. **Journal of Hazardous Materials**, 2021.
- KELLEY, B. **Very large scale monoclonal antibody purification: The case for conventional unit operations** **Biotechnology Progress**, 2007.
- KHAPARDE, A.; TETALA, K. K. R. Simplification of affinity macroporous monolith microfluidic column synthesis and its ability for protein separation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 181, 2020.
- KOVAC, S. et al. Proteomics as a tool for optimization of human plasma protein separation. **Journal of Chromatography A**, 2008.
- KUMAR, P.; MINA, U. **Fundamentals and Techniques of Biophysics and Molecular Biology**. [s.l: s.n.].
- LAURSEN, I. A. et al. Development, manufacturing and characterization of a highly purified, liquid immunoglobulin G preparation from human plasma. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 2014.
- LEAVY, O. **Therapeutic antibodies: Past, present and future** **Nature Reviews Immunology**, 2010.
- LEE, H. G.; KANG, S.; LEE, J. S. Binding characteristics of staphylococcal protein A and streptococcal protein G for fragment crystallizable portion of human immunoglobulin G. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2021.
- LI, G. et al. Purification of human immunoglobulin G: A new approach to plasma fractionation. **Vox Sanguinis**, 2002.
- LI, H. et al. Effects of graphite and Mn ore media on electro-active bacteria enrichment and fate of antibiotic and corresponding resistance gene in up flow microbial fuel cell constructed wetland. **Water Research**, v. 165, p. 114988, 2019.
- LI, Y.; LEE, M. L. Biocompatible polymeric monoliths for protein and peptide separations. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3369–3378, 2009.
- LI, Z. et al. **Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications** **Electrophoresis**, 2017.
- LIAN, H. et al. Efficiency and mechanisms of simultaneous removal of Microcystis

aeruginosa and microcystins by electrochemical technology using activated carbon fiber/nickel foam as cathode material. **Chemosphere**, v. 252, 2020.

LINGG, N. et al. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions. **Journal of Chromatography A**, 2020.

LIU, J. et al. Macroporous molecularly imprinted monolithic polymer columns for protein recognition by liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17–18, p. 2757–2761, 2010.

LIU, X.; WANG, J. Electro-assisted adsorption of Cs(I) and Co(II) from aqueous solution by capacitive deionization with activated carbon cloth/graphene oxide composite electrode. **Science of the Total Environment**, v. 749, n. I, p. 141524, 2020.

LIU, Y. et al. Novel sulfamethazine ligand used for one-step purification of immunoglobulin G from human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2003.

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. **Future of antibody purification** **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2007.

MA, R. T. et al. Improved surface imprinting based on a simplified mass-transfer process for the selective extraction of IgG. **Journal of Materials Chemistry B**, 2017.

MACÍAS-GARCÍA, A. et al. Study of the adsorption and electroadsorption process of Cu (II) ions within thermally and chemically modified activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 328, p. 46–55, 2017.

MAGDELDIN, S.; MOSER, A. Affinity Chromatography: Principles and Applications. In: **Affinity Chromatography**. [s.l: s.n.].

MAHMOUDI GOMARI, M. et al. **Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: Applications in the pharmaceutical industry** **Biotechnology Advances**, 2020.

MAI, J. Rapid detection of trace bacteria in biofluids using porous monoliths in microchannels. 2014.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686–1704, 2006.

MARCUZ, C. et al. Performance of phospho-L-tyrosine immobilized onto alginate/polyacrylamide-based cryogels: Effect of ligand coupling on human IgG adsorption and Fab fragments separation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2021.

MARIAM, S. H. S. et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, 2015.

MERÇON, F.; GUIMARÃES, P. I. C.; MAINIER, F. B. Corrosão: Um Exemplo Usual de Fenômeno Químico. **Química Nova na Escola**, 2004.

MIN, X. et al. Selective removal of Cl⁻ and F⁻ from complex solution via electrochemistry deionization with bismuth/reduced graphene oxide composite electrode. **Chemosphere**, v. 251, 2020.

MOURA, L.; YANO, T. Ion Metallic Affinity Chromatography and Purification of Bacterial Toxin. In: **Affinity Chromatography**. [s.l: s.n.].

MOURÃO, C. A. et al. Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolithic cryogels: Purification of IgG from human serum. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1129, 2019.

MOURÃO, C. A.; CARMIGNOTTO, G. P.; BUENO, S. M. A. Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1017–1018, p. 163–173, 2016.

MRAVLJAK, R. et al. Non-invasive determination of ionizable ligand group density on high internal phase emulsion derived polymer. **Journal of Chromatography A**, 2021.

MÜLLER, W. E. G. et al. **An unexpected biomaterial against SARS-CoV-2: Biopolyphosphate blocks binding of the viral spike to the cell receptor** *Materials Today*, 2021.

NAINAMALAI, M. et al. Decolorization of synthetic dye wastewater using packed bed electro-adsorption column. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 130, n. April, p. 160–168, 2018.

NOKED, M. et al. The rate-determining step of electroadsorption processes into

nanoporous carbon electrodes related to water desalination. **Journal of Physical Chemistry C**, 2009.

PENG, Z. et al. Comparative electroadsorption study of mesoporous carbon electrodes with various pore structures. **Journal of Physical Chemistry C**, 2011.

PERÇİN, I.; IDİL, N.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted poly(N-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification. **Process Biochemistry**, 2019.

PEREIRA AGUILAR, P. et al. Capture and purification of Human Immunodeficiency Virus-1 virus-like particles: Convective media vs porous beads. **Journal of Chromatography A**, v. 1627, 2020.

PFAUNMILLER, E. L. et al. Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 7, p. 2133–2145, 2013.

PLATELLA, C. et al. Affinity Chromatography-Based Assays for the Screening of Potential Ligands Selective for G-Quadruplex Structures. **ChemistryOpen**, 2022.

PLIEVA, F. M. et al. Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: processing under compression and scale-up. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 110–116, 2009.

PODDAR, S.; SHARMEEN, S.; HAGE, D. S. **Affinity monolith chromatography: A review of general principles and recent developments** *Electrophoresis*, 2021.

POURROSTAM-RAVADANAQ, P.; SAFA, K. D.; ABBASI, H. Study of imidazole performance as pseudo-affinity ligand in the purification of IgG from bovine milk. **Analytical Biochemistry**, 2020.

PRASANNA, R. R.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, 2010.

PUGA, A. et al. Environmental application of monolithic carbonaceous aerogels for the removal of emerging pollutants. **Chemosphere**, v. 248, 2020.

PUGA, A. et al. Electric field as a useful tool to improve the poor adsorption affinity of pollutants on carbonaceous aerogel pellets. **Journal of Molecular Liquids**, 2022.

PURWANTO, P.; RISKA, R. Kinetics and Equilibrium Studies of Electro Adsorption of

Remazol Red on Modified Stainless Steel Electrode. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1295, n. 1, 2019.

RADOVIC, L. R.; MORENO-CASTILLA, C.; RIVERA-UTRILLA, J. Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions. **Chemistry and Physics of Carbon**, 2000.

RIBEIRO, R. P. P. L.; GRANDE, C. A.; RODRIGUES, A. E. Electric Swing Adsorption for Gas Separation and Purification: A Review. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 49, n. 13, p. 1985–2002, 2014.

RODRIGUEZ, E. L. et al. **Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years** **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2020.

RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. [s.l: s.n.].

SALAMANCA, D. R. et al. **Plasmodium falciparum Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines** **Frontiers in Microbiology**, 2019.

SALIMI, K. et al. Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

SANTOYO-CISNEROS, R. et al. Influence of surface chemistry of activated carbon electrodes on electro-assisted adsorption of arsenate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 392, 2020.

SATZER, P. et al. Monolith affinity chromatography for the rapid quantification of a single-chain variable fragment immunotoxin. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 15, p. 3051–3059, 2018.

SAVANE, T. S. et al. Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobiospecific ligand l-histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2016.

SEN GUPTA, S.; BHATTACHARYYA, K. G. **Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review** **Advances in Colloid and Interface Science**, 2011.

SERINBAŞ, A. et al. A new application of inorganic sorbent for biomolecules: IMAC practice of Fe³⁺-nano flowers for DNA separation. **Materials Science and Engineering**

C, 2020.

SHARMA, M.; VYAS, R. K.; SINGH, K. A review on reactive adsorption for potential environmental applications. **Adsorption**, v. 19, n. 1, p. 161–188, 2013.

SHIN, M. J. et al. Monolith-based immobilized metal affinity chromatography increases production efficiency for plasmid DNA purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 31, p. 5273–5278, 2011.

SILVA, L. et al. COBRE: PRODUÇÃO INDUSTRIAL E APLICAÇÕES. **Química Nova**, 2019.

SOLOVIEV, M. et al. Modelling the adsorption of proteins to nanoparticles at the solid-liquid interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2022.

SPROSS, J.; SINZ, A. **Monolithic media for applications in affinity chromatography** **Journal of Separation Science**, 2011.

STROHL, W. R. Therapeutic Monoclonal Antibodies: Past, Present, and Future. In: **Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic**. [s.l: s.n.].

SUN, J.; LIU, L.; YANG, F. A WO₃/PPy/ACF modified electrode in electrochemical system for simultaneous removal of heavy metal ion Cu²⁺ and organic acid. **Journal of Hazardous Materials**, v. 394, 2020.

SUN, S. et al. Monolithic cryogels made of agarose-chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012.

TALLMADGE, J. A. Unit operations of chemical engineering. Warren L. McCabe and Julian C. Smith. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York(1956). 945 pages.\$10.50. **AIChE Journal**, 1957.

TANG, W. et al. Electro-assisted Adsorption of Zn(II) on Activated Carbon Cloth in Batch-Flow Mode: Experimental and Theoretical Investigations. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2670–2678, 2019.

TETALA, K. K. R.; VAN BEEK, T. A. **Bioaffinity chromatography on monolithic supports** **Journal of Separation Science**, 2010.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

TRANG, H. K.; JIANG, L.; MARCUS, R. K. Grafting polymerization of glycidyl

methacrylate onto capillary-channeled polymer (C-CP) fibers as a ligand binding platform: Applications in immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) protein separations. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2019.

TRINDADE XIMENES, I. A. et al. **Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021.

TSCHELIESSNIG, A.; JUNGBAUER, A. High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, 2009.

UPADHYAY, V. et al. Receptor binding, immune escape, and protein stability direct the natural selection of SARS-CoV-2 variants. **Journal of Biological Chemistry**, p. 101208, 2021.

VERGARA-BARBERÁN, M. et al. **Current trends in affinity-based monoliths in microextraction approaches: A review** *Analytica Chimica Acta*, 2019.

VIJAYALAKSHMI, M. A. **Pseudobiospecific ligand affinity chromatography** *Trends in Biotechnology*, 1989.

VOLESKY, B.; WEBER, J.; PARK, J. M. Continuous-flow metal biosorption in a regenerable Sargassum column. **Water Research**, 2003.

WAN NGAH, W. S.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. **Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review** *Carbohydrate Polymers*, 2011.

WILSON, G. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 1994.

WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas Em Corrosão**. 1. ed. [s.l: s.n.].

XU, J. et al. Nickel-Carnosine complex: A new carrier for enzymes immobilization by affinity adsorption. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2021.

ZAIDI, S. et al. Separate and simultaneous removal of doxycycline and oxytetracycline antibiotics by electro-generated adsorbents (EGAs). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 102876, 2019.

ZHANG, C. et al. High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents. **Analyst**, v. 143, n. 2, p.

374–391, 2018.

ZHANG, R. et al. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2020a.

ZHANG, S. et al. Fabrication and extrusion of the PAAm-SAlg hydrogels with magnetic particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2020b.

ZHAO, C. et al. Treatment of low-level Cu(II) wastewater and regeneration through a novel capacitive deionization-electrodeionization (CDI-EDI) technology. **Chemosphere**, v. 217, p. 763–772, 2019.

ANEXO I

Produções acadêmicas desenvolvidas durante o período de doutoramento:

COSTA, JOSIEL MARTINS; ALMEIDA NETO, AMBRÓSIO FLORÊNCIO DE. Recent advances and future applications in electro-adsorption technology: An updated review. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL ENGINEERING, v. 9, p. 106355, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106355>

COSTA, JOSIEL MARTINS; COSTA, JAVAN GRISENTE DOS REIS DA; ALMEIDA NETO, AMBRÓSIO FLORÊNCIO DE . Techniques of nickel(II) removal from electroplating industry wastewater: Overview and trends. JOURNAL OF WATER PROCESS ENGINEERING, v. 46, p. 102593, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102593>

COSTA, J. G. R.; COSTA, JOSIEL MARTINS; ALMEIDA NETO, AMBRÓSIO FLORÊNCIO DE. Progress on Electrodeposition of Metals and Alloys Using Ionic Liquids as Electrolytes. Metals, v. 12, p. 2095, 2022. <https://doi.org/10.3390/met12122095>

COSTA, JAVAN GRISENTE DOS REIS DA; ALMEIDA NETO, AMBRÓSIO FLORÊNCIO DE; COSTA, JOSIEL MARTINS. Processo de electroadsorção em criogel para purificação de biomoléculas. 2022, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102022020705, título: "Processo de electroadsorção em criogel para purificação de biomoléculas", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 11/10/2022