



**MARIANA OLIVEIRA MENDES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOGEL DE TROCA  
IÔNICA PARA CAPTURA DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS  
DA ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

**Lavras – MG**

**2022**

**MARIANA OLIVEIRA MENDES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOGEL DE TROCA IÔNICA PARA CAPTURA  
DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Prof (a). Dr (a). Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Orientadora

Prof (a). Dr (a). Isabelle Cristina Oliveira Neves  
Coorientadora

Prof. Dr. Luís Antônio Minim  
Coorientador

**Lavras – MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mendes, Mariana Oliveira.

Desenvolvimento de um criogel de troca iônica para captura  
das proteínas das folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)  
/ Mariana Oliveira Mendes. - 2022.

76 p.

Orientador(a): Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.

Coorientador(a): Isabelle Cristina Oliveira Neves, Luís Antônio

Minim.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Criogel de troca iônica. 2. Purificação de proteínas. 3. Ora-  
pro-nobis. I. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. II. Neves, Isabelle  
Cristina Oliveira. III. Minim, Luís Antônio. IV. Título.

**MARIANA OLIVEIRA MENDES**

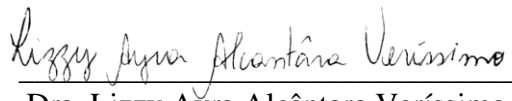
**DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOGEL DE TROCA IÔNICA PARA CAPTURA  
DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DA ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

**DEVELOPMENT OF AN ION EXCHANGE CRYOGEL TO CAPTURE PROTEINS  
FROM THE LEAVES OF ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

APROVADA em 30 de junho de 2022.

Dra. Isabelle Cristina de Oliveira Neves    UFSCAR  
Dra. Paula Chéquer Gouveia Mól        UNESP  
Dr. Jaime Vilela de Resende            UFLA



Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
**Orientadora**

Dra. Isabelle Cristina Oliveira Neves  
**Coorientadora**

Dr. Luís Antônio Minim  
**Coorientador**

**LAVRAS – MG  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar pelos melhores caminhos até aqui. Aos meus pais por todo incentivo, compreensão, paciência e por sempre acreditarem em mim. À toda minha família, ao meu namorado e amigos que sempre apoiaram todas as minhas escolhas.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade e por proporcionar as melhores ferramentas que me permitiram chegar ao final desta etapa de forma satisfatória.

À minha Orientadora Lizzy, pela paciência, colaboração, confiança, orientações e sugestões úteis durante a execução do projeto.

Aos meus Coorientadores Isabelle Neves e Luis Antônio Minim, pelas sugestões úteis durante a execução do projeto e pela disponibilização do laboratório da Universidade Federal de Viçosa (UFV) para realização de análises.

À Ana Cristina, que desde o início contribuiu na elaboração de todos os testes. Obrigada por toda disposição, paciência e pelos ensinamentos a mim concedidos até o último momento.

Ao professor Jaime pela disponibilidade do laboratório de refrigeração da UFLA para realização das análises.

Aos colegas, professores e técnicos dos demais laboratórios que cederam espaço, equipamentos ou material para realização das análises.

A todos os amigos que colaboraram de alguma forma para a realização desse trabalho, agradeço imensamente pelo auxílio e disposição de cada um, pela amizade e momentos de descontração. Vocês com certeza fizeram parte desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

**MUITO OBRIGADA!!!**

## RESUMO

O desenvolvimento de novas matrizes adsorventes macroporosas que permitem separar e purificar moléculas mantendo sua bioatividade tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Nesse contexto, diversas pesquisas exploraram o potencial de aplicação de proteínas purificadas em vários setores. A ora-pro-nobis (OPN) é uma planta que apresenta uma composição nutricional rica, conteúdo alto teor de proteínas, que estão sendo amplamente utilizadas como aditivo alimentício, produção de embalagens biodegradáveis, películas comestíveis, produção de biofármacos, dentre outros. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um criogel de troca iônica para a adsorção das proteínas das folhas da OPN (PFOPN) (*Pereskia aculeata* Miller). Para isso, a funcionalização dos criogéis de troca iônica foi realizada utilizando sulfato de amônio ( $2,75 \text{ mols L}^{-1}$ , em pH 9,5) contendo os ligantes de troca iônica (taurina, cisteína, polietilenoimina e ácido glutâmico) a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 h. Ensaios de adsorção foram realizados em batelada utilizando os criogéis funcionalizados, os quais foram submersos em tampão fosfato de sódio ( $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) e extrato das folhas da OPN em pH 2,5, 5,5 e 8,5, na concentração de diluição 1:1 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. O Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) foi aplicado para analisar as diferenças significativas entre os efeitos dos ligantes sobre a capacidade adsortiva. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado para otimizar o método de funcionalização, onde o tempo variou de 17 a 39 h e a temperatura variou de  $28$  a  $71 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando o ligante que apresentou a melhor capacidade adsortiva no ensaio de adsorção. Além disso, os criogéis que apresentaram a melhor capacidade adsortiva foram submetidos a caracterização em termos de suas propriedades químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas. E, por fim, as isotermas de adsorção foram determinadas a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  variando as proporções de diluição do extrato da folha de OPN e tampão fosfato de sódio ( $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,5) em 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10. Os modelos de Langmuir e Freundlich foram ajustados aos dados experimentais. O criogel funcionalizado com ácido glutâmico (criogel-AG) obteve a melhor capacidade adsortiva, apresentando poros interconectados variando na faixa de  $6\text{--}75 \text{ }\mu\text{m}$ , capacidade de intumescimento de  $14,113 \pm 0,867 \text{ g g}^{-1}$  e grau de expansão de  $1,569 \pm 0,058$ , boa resistência térmica e mecânica, não apresentando diferenças significativas em relação aos criogéis puros. Dentre os valores de pH estudados na adsorção das PFOPN, em pH 5,5 o criogel se comportou como um trocador anfótero, apresentando cargas superficiais positivas e negativas. Nessa condição, houve uma maior adsorção das PFOPN. Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustados aos dados experimentais, obtiveram resultados preditos de capacidade máxima de adsorção de  $172,4 \text{ mg g}^{-1}$  a  $400,0 \text{ mg g}^{-1}$  e  $49,58 \text{ mg g}^{-1}$  a  $108,3 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente. A análise termodinâmica baseada na relação de Van't Hoff indicou que o processo foi espontâneo e entropicamente dirigido. Os resultados mostram que o criogel-AG é uma matriz promissora para uso em processos de captura de proteínas por troca iônica.

**Palavras-chaves:** Troca iônica • Criogel • Isotermas de adsorção • Proteína • Ora-pro-nobis

## ABSTRACT

The development of new macroporous adsorbent matrices that allow separating and purifying molecules while maintaining their bioactivity has aroused the interest of many researchers. In this context, several researches explored the potential of application of purified proteins in several sectors. Ora-pro-nobis (OPN) is a plant that has a rich nutritional composition, containing a high content of proteins, which are being widely used as a food additive, production of biodegradable packaging, edible films, production of biopharmaceuticals, among others. In view of the above, the objective of this work was to develop an ion-exchange cryogel for the adsorption of OPN leaf proteins (PFOPN) (*Pereskia aculeata* Miller). For this, the functionalization of ion exchange cryogels was performed using ammonium sulfate (2,75 mol L<sup>-1</sup>, at pH 9,5) containing the ion exchange ligands (taurine, cysteine, polyethyleneimine and glutamic acid) at 35 °C for 20 h. Adsorption assays were carried out in batches using functionalized cryogels, which were submerged in sodium phosphate buffer (0,25 mol L<sup>-1</sup>) and OPN leaf extract at pH 2,5, 5,5 and 8,5, at 1:1 dilution concentration at 25 °C for 24 h. The Completely Randomized Design (DIC) was applied to analyze the significant differences between the effects of ligands on the adsorptive capacity. The Central Composite Rotational Design (DCCR) was used to optimize the functionalization method, where the time varied from 17 to 39 h and the temperature varied from 28 to 71 °C, using the binder that presented the best adsorptive capacity in the adsorption test. Furthermore, the cryogels that showed the best adsorptive capacity were subjected to characterization in terms of their chemical, morphological, thermal and mechanical properties. Finally, the adsorption isotherms were determined at 8 °C, 15 °C, 25 °C and 35 °C varying the dilution proportions of OPN leaf extract and sodium phosphate buffer (0,025 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,5) in 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 and 1:10. The Langmuir and Freundlich models were fitted to the experimental data. The cryogel functionalized with glutamic acid (cryogel-AG) had the best adsorptive capacity, presenting interconnected pores ranging from 6–75 µm, swelling capacity of 14,113 ± 0,867 g g<sup>-1</sup> and degree of expansion of 1,569 ± 0,058, good thermal and mechanical resistance, showing no significant differences in relation to pure cryogels. Among the pH values studied in the adsorption of PFOPN, at pH 5,5 the cryogel behaved as an amphoteric exchanger, presenting positive and negative surface charges. In this condition, there was a greater adsorption of PFOPN. The Langmuir and Freundlich models, adjusted to the experimental data, obtained predicted results of maximum adsorption capacity of 172,4 mg g<sup>-1</sup> to 400,0 mg g<sup>-1</sup> and 49,58 mg g<sup>-1</sup> to 108,3 mg g<sup>-1</sup>, respectively. Thermodynamic analysis based on the Van't Hoff relation indicated that the process was spontaneous and entropy driven. The results show that cryogel-AG is a promising matrix for use in ion exchange protein capture processes.

**Keywords:** Ion-exchange • Cryogel • Adsorption isotherms • Protein • Ora-pro-nobis

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

<b>Figura 1</b> – Exemplar da ora-pro-nobis (OPN): (a) folhas, (b) espinhos, (c) flor branca, (d) flor rosa, (e) frutos verdes e (f) frutos maduros.....	15
<b>Figura 2</b> – Processo de separação de proteínas por cromatografia de troca iônica.....	23
<b>Figura 3</b> – Diagrama da formação dos criogéis poliméricos.....	25
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de imobilização de proteínas em suportes epóxi.....	27
<b>Figura 5</b> – Comportamento de isotermas de adsorção.....	28
<b>Figura 6</b> – Classificação IUPAC de isotermas de sorção.....	29
<b>Figura 7</b> – Tipos, equações e curvas de isotermas de adsorção.....	30

### SEGUNDA PARTE

<b>Figura 1</b> – Criogéis poliméricos.....	58
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para capacidade adsortiva.....	62
<b>Figura 3</b> – Espectro de FTIR do criogel puro (a) e do criogel-AG (b).....	63
<b>Figura 4</b> – Determinação do ponto de carga zero do criogel-AG. $\Delta\text{pH}$ é a diferença entre o pH final da solução aquosa após 24 h e o pH inicial da solução aquosa.....	65
<b>Figura 5</b> – Micrografia do criogel-AG (magnitude - 500x). .....	66
<b>Figura 6</b> – Curvas de TGA: (a) criogel puro e (b) criogel-AG.....	67
<b>Figura 7</b> – Isotermas de adsorção das proteínas das folhas da OPN no criogel-AG usando o modelo de Langmuir. [Tampão fosfato de sódio (0,025 mol / L), em pH 5,5, nas temperaturas de 8 °C (bolinha preta), 15 °C (bolinha vermelha), 25 °C (bolinha azul) e 35 °C (bolinha verde)].....	68
<b>Figura 8</b> – Gráfico de Van't Hoff – $\ln k'$ versus $1/T$ .....	70



## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

- Tabela 1** Resultado do Delineamento Inteiramente Casualizado da capacidade adsortiva ( $q$ ) dos criogeis de troca iônica (taurina, polietilenoimina, cisteína e ácido glutâmico) sobre as proteínas da OPN. [Tampão fosfato de sódio, 0,025 mol L<sup>-1</sup>; pH 8,5, 5,5 e 2,5, a 25 °C].....59
- Tabela 2** Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional para a capacidade adsortiva ( $q$ ) dos criogeis de troca iônica (ácido glutâmico) sobre as proteínas das folhas da OPN. [Condições de adsorção = Tampão fosfato de sódio = 0,025 mol L<sup>-1</sup>; pH 5,5 a 25 °C].....61
- Tabela 3** – Caracterização morfológica do criogel puro e criogel-AG.....66
- Tabela 4** – Parâmetros do modelo de Langmuir para a adsorção das proteínas das folhas da OPN.....69
- Tabela 5** – Parâmetros do modelo de Freundlich para a adsorção das proteínas das folhas da OPN.....69
- Tabela 6** – Valores dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^{\circ}_{ads}$ ,  $\Delta S^{\circ}_{ads}$  e  $\Delta G^{\circ}_{ads}$ .....70

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Ora-pro-nobis.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Propriedades funcionais das proteínas das folhas da ora-pro-nobis.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Proteínas de origem vegetal.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Purificação de proteínas por técnicas cromatográficas.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Cromatografia de troca iônica.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Criogel.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Funcionalização de criogeis.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8 Isotermas de adsorção.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8.1 Modelo de Langmuir.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8.2 Modelo de Freundlich.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8.3 Termodinâmica do processo adsortivo.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>
<b>SEGUNDA PARTE: ARTIGO.....</b>	<b>48</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de espécies de plantas e, em meio a essa biodiversidade, encontra-se as plantas comestíveis não-convencionais (PANCs) (QUEIROZ *et al.*, 2015). As PANCs podem ser facilmente encontradas em jardins, quintais, terrenos baldios, além de ser uma alternativa alimentar de qualidade, acessível e com bom custo-benefício (KINUPP e BARROS, 2007; ROMANO *et al.*, 2017).

A ora-pro-nobis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) é um exemplo de hortaliça não-convencional. É uma planta perene com folhas nutritivas, apresenta um considerável teor de proteínas de alto valor biológico, grandes quantidades de cinzas e é uma ótima fonte de ferro, cálcio, magnésio e zinco, além de não apresentar toxicidade foliar (SATO *et al.*, 2019). Ainda, as folhas da OPN (FOPN) são ricas em mucilagem atóxica, composta por proteínas e arabinogalactanas, que são polímeros presentes na estrutura da goma arábica (ICO *et al.*, 2018; JUNIOR *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2009; DUARTE e HAYASHI, 2005).

Como visto, a OPN apresenta uma rica composição nutricional, contendo ainda uma quantidade significativa de lisina, um aminoácido essencial presente em proteínas de origem animal, que se apresenta em maior quantidade na OPN do que em hortaliças convencionais como o espinafre, por exemplo (MARTIN *et al.*, 2017; BRASIL, 2016). Outro aminoácido essencial que se destaca nas folhas da OPN é o triptofano, representando mais de 20% de seus aminoácidos, além de ser também uma ótima fonte de fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina e treonina (BOTREL *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, diversas pesquisas exploraram o potencial de aplicações de proteínas purificadas em vários setores, como no enriquecimento de produtos alimentícios (SATO *et al.*, 2019), produção de filmes e embalagens biodegradáveis (GU *et al.*, 2019; ZHANG, LIU e REMPEL, 2018), revestimento e películas comestíveis (LACROIX e VU, 2014), regeneração e reparo de tecidos (COSTA, SILVA e BOCCACCINE, 2018; RAI *et al.*, 2018), produção de biofármacos (ABD-AZIZ *et al.*, 2020), adesivos e revestimentos biomiméticos (LIU *et al.*, 2016), dentre outros.

Nesse contexto, as proteínas vegetais podem ser usadas para a produção de uma variedade de bioprodutos, além de serem seguras e de baixo custo (ARIF, CHIA e PAULS, 2018). Em decorrência de suas propriedades nutricionais e as diversas aplicações que poderiam ser utilizadas, o estudo de processos de purificação dessas proteínas pode gerar um grande

impacto para futuras pesquisas. Para tanto, as técnicas cromatográficas são as mais empregadas para avaliar o comportamento adsorptivo dessas biomoléculas.

Na sequência, a cromatografia de troca iônica é um método amplamente empregado na separação e purificação de aminoácidos, peptídeos e proteínas (YAMAMOTO *et al.*, 1988). Essa técnica apresenta boa eficiência, alta resolução (CUMMINS *et al.*, 2016) e realiza separações sob condições não desnaturantes (ANDERSEN *et al.*, 2004). Seu princípio envolve a separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial (BOBLETER e BONN, 2011).

Nas últimas décadas, nota-se um crescimento no número de pesquisas científicas relacionadas com o desenvolvimento de matrizes cromatográficas para a separação de biomoléculas. Dentre esses materiais, destaca-se os criogéis poliméricos, considerados excelentes matrizes de separação, por possuir elevada porosidade, alta capacidade de processamento de biomoléculas, apresentando uma ampla gama de aplicações em vários processos de biosseparação (BAKSHPOUR *et al.*, 2019; ANDAÇ, GALAEV e DENIZLI, 2016; KUTLUSOY *et al.*, 2017; EROL *et al.*, 2016; KOSE *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2020 (a); NEVES *et al.*, 2020 (b); OLIVEIRA *et al.*, 2019 (a); NASCIMENTO *et al.*, 2019; MÓL *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Todavia, apesar das vantagens relacionadas aos criogéis poliméricos, sua alta porosidade resulta em uma pequena área superficial disponível para adsorção de moléculas, o que leva a uma redução da eficiência do processo de purificação (KUMAR *et al.*, 2006; VERÍSSIMO *et al.*, 2017). Por sua vez, podem ser realizadas modificações na matriz do criogel, através da funcionalização, com o intuito de aumentar a eficiência dos processos de separação (INGAVLE *et al.*, 2015).

Uma das formas de funcionalização de criogéis é a inserção de grupos funcionais à sua superfície a fim de melhorar a eficiência durante o processo adsorptivo (MACHADO *et al.*, 2015). Para tanto, são empregados grupos epóxis que são grupos funcionais decorrentes da presença de alil glicidil éter (AGE). Essa ativação química tem como principal objetivo imobilizar os ligantes específicos para melhorar a capacidade adsorptiva dos criogéis, uma vez que eles apresentam alta reatividade e formação de ligações covalentes com os grupos amina (NH<sub>2</sub>), tiol (SH) e hidroxila (OH) (VAIDYA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2019; BAI, LI e WANG, 2006). Além disso, a funcionalização pode ser utilizada para tornar o criogel específico para captura da molécula de interesse.

O estudo das relações de equilíbrio adsorptivo (isotermas de adsorção) é importante para compreender o processo de adsorção visando a melhoria geral das vias do mecanismo de adsorção (AYAWEI *et al.*, 2017). As isotermas fornecem parâmetros sobre a capacidade de adsorção de um material adsorvente, informações sobre a interação adsorvente-soluto, meios para encontrar parâmetros termodinâmicos, dentre outros (PICCIN *et al.*, 2017). Além disso, em complemento à análise das isotermas de adsorção, estudos termodinâmicos são imprescindíveis para avaliar a eficiência do adsorvente, nas quais a quantificação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^{\circ}_{ads}$ ), entalpia ( $\Delta H^{\circ}_{ads}$ ) e entropia ( $\Delta S^{\circ}_{ads}$ ) padrão de adsorção são usados para obter informações do processo de adsorção (PAIVA *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um criogel de troca iônica, avaliando-se diferentes tipos de ligantes de troca iônica (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), caracterizá-lo e avaliar seu potencial de aplicação na adsorção das PFOPN.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Ora-pro-nobis**

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de espécies de plantas e, em meio a essa biodiversidade, encontra-se as plantas comestíveis não-convencionais (PANCs) (QUEIROZ *et al.*, 2015). As PANCs desempenham um papel importante na alimentação tradicional de muitas famílias, embora tenham perdido, aos poucos, grande parte do seu espaço para outros alimentos (BARREIRA *et al.*, 2015). Devido à sua característica rústica, não necessitam de grandes acompanhamentos no pré e pós-plantio. Dessa forma, essas espécies identificam-se com o perfil da agricultura familiar sendo uma ótima opção como fonte de renda e também para a diversificação agrícola (VIANA *et al.*, 2015).

As hortaliças não-convencionais, genericamente chamadas de “inço”, “daninhas” ou “mato”, podem ser encontradas em locais de fácil acesso como jardins, quintais, terrenos baldios e podem ser uma alternativa alimentar de qualidade, acessível e com bom custo-benefício (KINUPP e BARROS, 2007; ROMANO *et al.*, 2017). Embora tenha uma importância devido às suas propriedades nutricionais e funcionais e possuir características sensoriais que facilitam o seu consumo (CUNHA *et al.*, 2003), tais hortaliças são pouco estudadas pela comunidade científica (QUEIROZ *et al.*, 2015), o que reflete diretamente no desinteresse de outras empresas (BRASIL, 2010).

A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller), é um exemplo de hortaliça não-convencional e sua ocorrência está associada a regiões de clima seco. No latim, seu nome significa “ora por nós”, devido as pessoas às colherem no quintal de um padre e, em seguida, realizarem suas orações (BRASIL, 2016).

A ora-pro-nobis (OPN) teve sua origem na América tropical com relatos de plantas nativas desde a Flórida até o Brasil (BRASIL, 2015). No Brasil, é encontrada na região Nordeste que envolve os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Sergipe; Centro-Oeste em Goiás; Sudeste no Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo; Sul no Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CAMPOS *et al.*, 2017).

A OPN é tratada como “praga”, por ser difícil de ser controlada, de se disseminar facilmente, apresentar uma moderada taxa de crescimento e adaptar-se a diversos tipos de solo, sendo pouco exigente em fertilidade (GONÇALVES *et al.*, 2014; MARSARO-JÚNIOR *et al.*, 2011; JESUS *et al.*, 2020).

Ademais, é uma planta perene com folhas nutritivas, lisas, formato elíptico e simétrico e coloração verde escuro (Figura 1a). Seus frutos são pequenos, arredondados, espinhosos (Figura 1b) de coloração amareladas/alaranjadas (DUARTE e HAYASHI, 2005; BRASIL, 2015). As flores da OPN possuem de 3 a 4 cm de diâmetro e se desenvolvem na coloração branca ou rosa (Figura 1c e 1d). Apresentam de 6 a 8 brácteas folhosas que protegem os frutos durante o seu desenvolvimento e desaparecem quando esses amadurecem. Os frutos são verdes na fase de desenvolvimento (Figura 1e) e alaranjados quando já maduros (Figura 1f) (BOKE, 1966; MARSARO-JÚNIOR *et al.*, 2011). Recomenda-se que a colheita da OPN seja iniciada de 2 a 3 meses após o seu plantio, quando as folhas apresentarem em média de 7 a 10 cm de comprimento (BRASIL, 2016).

Segundo Agostini-Costa *et al.*, (2014), os frutos da OPN são comestíveis e também bastante nutritivos sendo compostos por 1% de proteínas, 0,7% de lipídeos, 6,3% de carboidratos, 0,7 a 9,4% de fibras, 0,02 a 1,25 mg/g de vitamina C, 0,009 mg/g de niacina, 1,74 a 2,06 mg/g de cálcio e 0,26 mg/g de fósforo. Além disso, os altos teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno apontam que os frutos são fontes propícias de substâncias bioativas capazes de enriquecer a culinária brasileira.

**Figura 1.** Exemplar da ora-pro-nobis: (a) folhas, (b) espinhos, (c) flor branca, (d) flor rosa, (e) frutos verdes e (f) frutos maduros.



Fonte: Google Imagens (2022)

As folhas da OPN possuem grandes quantidades de cinzas com aproximadamente 16% em base seca e, em vista disso, é uma ótima fonte de ferro, cálcio, magnésio e zinco. Seu teor de fibra alimentar é de 39% (ROSA *et al.*, 2020) e seu conteúdo proteico é de aproximadamente 25% altamente digeríveis (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014), podendo ser comparado com a carne que é composta por 30% (VALLE, 2000). Também possuem grandes quantidades de vitaminas e hemicelulose, nutrientes essenciais para a alimentação humana.

A OPN apresenta uma composição nutricional rica, contendo uma quantidade significativa de lisina, um aminoácido essencial presente em proteína animal, que se apresenta em maior quantidade na OPN do que em hortaliças convencionais como o espinafre, por exemplo (MARTIN *et al.*, 2017; BRASIL, 2016). Outro aminoácido essencial encontrado é o triptofano, representando mais de 20% de seus aminoácidos (TAKEITI *et al.*, 2009). As quantidades de aminoácidos essenciais e não essenciais presentes na folha da OPN atendem às quantidades diárias recomendadas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (MARTIN *et al.*, 2017).

A folha da OPN é um dos principais elementos que compõem a planta. Isso se deve à ausência de toxidade foliar, alto teor de proteínas de alto valor biológico, fibras, minerais e vitaminas (SATO *et al.*, 2019). O interesse na utilização da OPN vem crescendo nos últimos anos pelas indústrias alimentícias, especialmente pelo alto teor de proteínas e de mucilagens (ALMEIDA *et al.*, 2014), podendo ser adicionadas para enriquecer alimentos (MAGALHÃES *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018; RAMOS e QUEIROZ, 2018), no desenvolvimento de suplementos alimentares ricos em proteínas ou em partículas ricas em ferro

(MACIEL *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2018). Por outro lado, a mucilagem favorece sua utilização em produtos cárneos emulsionados (LISE, 2018), podendo ser também utilizadas no tratamento de água (ROCHA *et al.*, 2017) e ainda, no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

## 2.2 Propriedades funcionais das proteínas das folhas da ora-pro-nobis

Uma variedade de polissacarídeos extraídos de plantas é utilizada pelas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, em virtude de suas propriedades físico-químicas (MUNOZ-MUNOZ *et al.*, 2017; SHOWALTER e BASU, 2016; NAJI-TABASI e RAZAVI, 2017; BOUAZIZ *et al.*, 2016; SRIKAEAO, LAOTHONGSAN e LERDLUKSAMEE, 2018; LIU *et al.*, 2018; HAMEDDI *et al.*, 2017). Um exemplo de polissacarídeo presente em plantas é a arabinogalactana (FINCHER, STONE e CLARKE, 1983), podendo ser encontrada nas sementes, raízes, caules, folhas e flores (MARTIN *et al.*, 2017). Esses polissacarídeos naturais possuem inúmeras vantagens quando comparados aos polímeros sintéticos, uma vez que estão facilmente disponíveis na natureza, são atóxicos, de baixo custo, biodegradáveis e, ainda, (AHMAD *et al.*, 2019) podem ser quimicamente modificados para fornecer outros tipos de estruturas ganhando cada vez mais espaço no mercado de alimentos (SAHA *et al.*, 2017).

As folhas da OPN apresentam um elevado conteúdo de arabinogalactana, além de serem ricas em mucilagem atóxica e proteínas de alto valor biológico (ICO *et al.*, 2018; JUNIOR *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2009; DUARTE e HAYASHI, 2005). Nos últimos anos, diversas pesquisas exploraram o potencial de aplicações dos hidrocoloides presentes na mucilagem da OPN como aditivo alimentício em bebidas lácteas, filmes alimentícios e, ainda, em procedimentos médicos como em tratamentos de feridas e processos inflamatórios (GARCIA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2010). Além disso, tais pesquisas comprovaram a eficácia desses hidrocoloides como agente formador de filme, emulsificante, espessante, gelificante, estabilizante e outros (NEVES *et al.*, 2020; LAGO *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; JUNQUEIRA *et al.*, 2018; JUNQUEIRA *et al.*, 2019; AMARAL *et al.*, 2017; AMARAL *et al.*, 2018; AMARAL *et al.*, 2019; CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

Amaral *et al.*, (2018) aplicaram o hidrocoloide da mucilagem da ora-pro-nobis (MOPN) na produção de produtos lácteos fermentados e verificaram que este pode manter a qualidade do produto além de substituir a gordura.



Em 2019, Junqueira e colaboradores (JUNQUEIRA *et al.*, 2019) avaliaram as capacidades emulsificantes dos hidrocoloides extraídos da ora-pro-nobis (HOPN) em emulsão de óleo de soja em água. Nos testes realizados, as emulsões preparadas apresentaram características desejáveis como um grande número de gotas, maior uniformidade no tamanho dessas gotas, estrutura morfológica estável e comportamento reológico pseudoplástico. Entretanto, sugeriram que na presença de NaCl e pH ácido, o HOPN deve ser utilizado juntamente com outros estabilizantes para não ocorrer desestabilização das emulsões.

Em outro estudo, realizado por Oliveira *et al.*, (2019), avaliaram a viabilidade de produção de filmes à base de MOPN. O estudo indicou que a MOPN pode ser utilizada como uma embalagem biodegradável, pois é capaz de formar filmes firmes e flexíveis e, ainda, por apresentar características atóxica e coloração escura, tais filmes podem ser utilizados como embalagens primárias de alimentos, especialmente aos sensíveis à luz como café e chocolate.

Lago *et al.*, (2019) prepararam nanoemulsões de óleo em água utilizando a MOPN pela técnica de ultrassom. Avaliaram a influência das concentrações de MOPN e óleo de soja no diâmetro médio das gotas, otimizaram os parâmetros operacionais do processo, amplitude de potência ultrassônica e tempo de sonicação. Os autores relataram que as concentrações de MOPN estabelecidas entre 1,0 e 1,5 % e a concentração de óleo de soja inferior a 5,0 %, possibilita a produção de emulsões com valores de diâmetros médios das gotículas mais baixos. Com base nos resultados obtidos, foi possível inferir que o tratamento contendo 1,5 % de MOPN e 1,0 % de óleo de soja apresentou melhor estabilidade cinética, uma vez que baixos valores de diâmetro médio de gota foram mantidos durante os 30 dias de armazenamento. Portanto, concluíram que a MOPN pode ser usada como um emulsificante natural no preparo de nanoemulsões, sendo considerada uma boa alternativa para substituição parcial ou total dos emulsificantes já disponíveis no mercado.

Tendo em vista que a MOPN apresenta também um grande potencial terapêutico, Barros e colaboradores (2010), desenvolveram uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata* para avaliar sua ação cicatrizante em feridas cutâneas de ratos. O teste apresentou resultados satisfatórios, já que os parâmetros de qualidade e estabilidade se mostraram adequados. Concluíram também que a pomada proporcionou uma aparente melhora no processo de cicatrização.

Em outro estudo, Ziegler *et al.*, (2020) adicionou a farinha da OPN em bifes de hambúrgueres com a finalidade de enriquecer o produto. As propriedades nutricionais dos

hambúrgueres melhoraram, resultando em um aumento no teor de proteínas, cinzas e fibras alimentares, pequena redução na gordura e redução significativa dos carboidratos.

Assim, a MOPN atrai grandes perspectivas devido às suas propriedades funcionais. Contudo, para se obter proteínas das folhas da OPN com certo grau pureza são necessárias etapas de purificação. Neste contexto, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas nos processos de purificação.

### **2.3 Proteínas de origem vegetal**

Nos últimos anos, o desenvolvimento e a aplicação de proteínas vegetais atraíram crescentes interesses científicos e industriais, no contexto dos conhecimentos e recursos disponíveis hoje. Proteínas vegetais de soja, feijão, trigo e milho estão sendo amplamente testadas quanto à sua utilização na produção de bioprodutos, incluindo fibras, embalagens de alimentos como filmes e revestimentos, adesivos e colas, produtos farmacêuticos, entre outros (ARIF, CHIA e PAULS, 2018; SHUKLA e CHERYAN, 2001; AIDER, SIROIS-GOSSELIN E BOYE, 2012; BURGER E ZHANG, 2019; CHOI E HAN, 2001; ZHAO *et al.*, 2020; ACQUA *et al.*, 2020; PANG *et al.*, 2020; FAN *et al.*, 2016; PEANPARKDEE, IWAMOTO E YAMAUCHI, 2016).

Nesse contexto, a utilização de proteínas vegetais como emulsificantes tem aumentado, ultrapassando até mesmo o uso de proteínas de origem animal. Dentre as proteínas vegetais, podemos encontrar principalmente isolado de proteína de soja, ervilha e tremoço, favas e proteína do trigo. Muitas delas são moléculas tensoativas com capacidade de aumentar a estabilidade e fornecer propriedades físico-químicas específicas às emulsões de água e óleo. Em aplicações alimentares, por exemplo, as proteínas vegetais são conhecidas por serem menos alergênicas em comparação com as proteínas animais (BURGER e ZHANG, 2019; BURGUS-DIAZ *et al.*, 2016; KIM, WANG e SELOMULYA, 2020).

Os polímeros naturais como a proteína de soja, a zeína do milho e o glúten, estão conquistando cada vez mais atenção tanto no âmbito da pesquisa científica quanto da indústria devido à sua acessibilidade e baixo custo (PATNI *et al.*, 2014; SHUKLA e CHERYAN, 2001; TIAN *et al.*, 2018). Os principais materiais compostos pela proteína da soja são adesivos, filmes, folhas, espumas, fibras, dentre outros. Os filmes biodegradáveis ecologicamente viáveis são bastante empregados, principalmente em embalagens de alimentos (TIAN *et al.*, 2018). Além disso, a proteína de soja é amplamente utilizada como enchimento de reforço no campo de espuma de biomassa (ZHANG *et al.*, 2018), e como alternativa aos recursos naturais

renováveis para uso extensivo como adesivos na produção de compósitos de madeira (BACIGALUPE e ESCOBAR, 2021; PANG *et al.*, 2020; FAN *et al.*, 2016).

Atualmente, existe um crescente movimento pelas indústrias alimentícias para encontrar proteínas de origem vegetal, com o intuito de substituir às proteínas animais que apresentam características alergênicas (ZHAO *et al.*, 2020). Em analogia às propriedades funcionais atribuídas pela proteína de soja, a proteína de ervilha também exibe tais propriedades, como a emulsificação, com a vantagem de não ser alergênica. As ervilhas são compostas de 20 a 30% de proteínas, no qual 65 a 80% são compostas por globulinas e 10 a 20% por albuminas. Na sequência, uma maior quantidade de globulinas pode melhorar as propriedades de emulsificação, as quais são impulsionadas por sua natureza anfifílica. Além da função emulsificante (BURGER e ZHANG, 2016), apresenta também capacidade de formação de filmes ou bioplásticos (ACQUAH *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2020), microencapsulação (JANSEN-ALVES *et al.*, 2019; BAJAJ *et al.*, 2017), dentre outros.

Outra fonte de proteína vegetal estudada é a canola. Embora existam estudos relacionados, a proteína da canola é raramente utilizada como componente alimentar, devido à presença de fatores antinutricionais (CHMIELEWSKA *et al.*, 2020). Por outro lado, é muito empregada em aplicações não alimentares, como na fabricação de plásticos, filmes, materiais de embalagem e adesivos (BANDARA *et al.*, 2018). Essa proteína exibe propriedades termoplásticas quando plastificantes como água, glicerol, polietilenoglicol e sorbitol estão presentes. A presença desses plastificantes permite que a proteína da canola passe por uma transição vítrea e facilite a deformação e a processabilidade (ZHANG, LIU e REMPEL, 2018).

Todos esses fatores inferem a importância de conhecer e estudar mais fontes de proteínas vegetais que atendam a demanda mundial em termos nutricionais, incluindo os aspectos de alergenicidade, como também em termos tecnológicos aplicando-as em compostos não alimentares. Na sequência, fontes de proteínas vegetais ainda desconhecidas podem exibir um caráter tecnológico único, podendo ser aplicadas em diferentes áreas, contribuindo para com o crescimento do campo científico e industrial. Nesse contexto, a MOPN a qual apresenta um alto teor de proteínas, vem sendo bastante utilizada em diferentes campos, apresentando resultados satisfatórios (NEVES *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019; LAGO *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2014). Sabendo que a OPN é rica em proteínas e que sua mucilagem vem sendo alvo de muitos estudos, pesquisas relacionadas as proteínas de outras partes da planta como das folhas, por exemplo, são essenciais para o meio científico. Diante disso, o estudo do

comportamento de separação das proteínas das folhas da OPN é indispensável, pensando nas inúmeras aplicabilidades em sua forma purificada.

## **2.4 Purificação de proteínas por técnicas cromatográficas**

A construção e otimização de novas metodologias para a separação e purificação de biomoléculas, como as proteínas, foi uma condição essencial para a evolução das áreas das ciências biológicas e biotecnologia nos últimos 50 anos (JANSON, 2012).

Até o início do século 20, as tecnologias de separação existentes eram as de filtração, precipitação e cristalização. Contudo, entre 1930 e 1940, foram desenvolvidos métodos importantes para separação de proteínas como a eletroforese, cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (HEALTHCARE, 2010; BRAITHWAITE e SMITH, 2012).

O processo cromatográfico baseia-se na separação de moléculas presentes em um sistema contendo duas fases, sendo uma fase móvel (fase fluida) e outra fase estacionária (sólida ou líquida). Na cromatografia líquida, a fase estacionária é composta por resinas poliméricas, monólitos ou geis contidos em colunas de vidro, plástico ou aço inoxidável. A fase móvel fluida percola através da fase estacionária, levando consigo diversos solutos presentes na amostra e, dependendo das interações entre os solutos e as fases, os mesmos serão mais ou menos retidos na fase estacionária (PERES, 2002; ABRÃO, 1972; BIOPHARM INTERNATIONAL, 2003).

O botânico Mikhail Tswett, em um de seus artigos publicados, explicou que a separação de biomoléculas depende das interações das substâncias com a fase estacionária (COLLINS, 2006). Assim, quanto maior a interação de um soluto pela fase estacionária, maior será o tempo de retenção deste e mais tempo ele irá demorar a eluir da coluna. Por meio de um sistema de detecção é possível avaliar os perfis observados na saída da coluna na forma de um cromatograma, em função do tempo ou do volume de fase móvel (POOLE, 2002).

A finalidade de aplicar as técnicas cromatográficas é conseguir a separação, identificação e purificação das moléculas (COSKUN, 2016). Entre os métodos de cromatografia líquida destacam-se o de interação hidrofílica (OLSEN e PACK, 2013; IKEGAMI *et al.*, 2008), interação hidrofóbica (ERIKSSON, 2018; TOMAZ, 2017), e ainda o de troca iônica (SELKIRK, 2004) e afinidade (MAGDELDIN, 2012).

Neves *et al.*, (2020) sinterizaram um criogel de poliacrilamida para purificar proteínas do extrato da folhad da OPN, na qual imobilizaram os ligantes L-triptofano (criogel-Trp) e L-fenilalanina (criogel-Phe) através de reações mediadas por hexanodiamina, glutaraldeído e

moléculas de ligantes. Os criogel-Trp e criogel-Phe foram avaliados de acordo com o tipo e concentração da solução salina, pH e efeitos da concentração de NaCl na adsorção das proteínas da OPN. De acordo com os resultados, o criogel-Phe obteve maior capacidade adsorptiva, alcançando o valor máximo ( $q = 92,53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) quando o extrato bruto da folha da OPN foi diluído em sulfato de sódio + NaCl, a pH 7,0. Portanto, concluíram que criogel-Phe possui propriedades satisfatórias como suporte de cromatografia, sendo promissor para uso na purificação de alto rendimento de proteínas das folhad da OPN.

Mól *et al.*, (2019) preparou um criogel de poliacrilamida enxertado com 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA) a fim de analisar a captura da  $\beta$ -glucosidase produzida pela fermentação sólida do fungo *Thermoascus aurantiacus*. O criogel de troca iônica apresentou propriedades como alta porosidade, baixa dispersão, baixa resistência ao fluxo e alta estabilidade. Segundo os autores, o teor de purificação foi baixo devido à eluição isocrática e, dessa forma, outras proteínas não foram separadas da  $\beta$ -glicosidase pela força iônica. Além disso, um aumento no número de etapas no processo de purificação provoca uma perda maior de proteína e eleva o custo do processo, o que faz com que as plantas industriais utilizem o mínimo possível de processos. Os autores concluíram que o extrato enzimático fluiu através do adsorvente sem qualquer obstrução dos poros e, portanto, este adsorvente é um suporte atraente para a separação de biomoléculas, reduzindo tempo e custos.

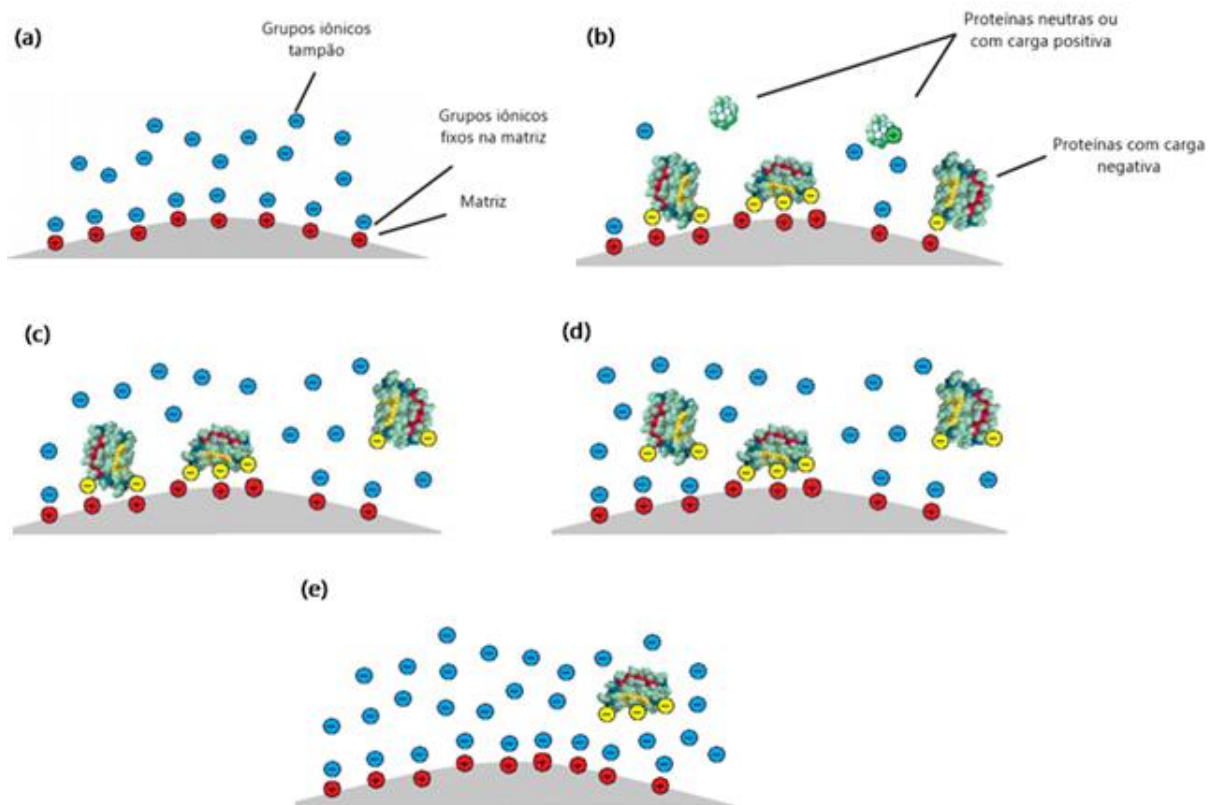
Outra abordagem foi realizada por Yun *et al.*, (2015) em que utilizaram a cromatografia para separar albumina sérica e imunoglobulina G (IgG) do soro de coelho. Para isso, prepararam um criogel com uma combinação de ligantes funcionais (grupo amina como ligante de troca iônica e grupos benzila hidrofóbicos), além de empregar cadeias monoméricas de cloreto de (vinilbenzil)trimetilamônio (VBTAC) nas matrizes de poliacrilamida (pAAM). A capacidade dos criogéis de adsorver proteínas variou em função das condições de enxertia, da concentração de sal e do pH no processo de adsorção. Os resultados mostraram que, ao utilizar a albumina de soro bovino como proteína modelo, o criogel teve capacidade de se ligar às proteínas mesmo em solução salina e tampão com pH próximo ou abaixo do pI da proteína devido às interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Portanto, concluíram que o criogel pAAM-VBTAC pode ser promissor para a purificação de IgG e albumina, sendo obtido uma pureza de 98,2% para a IgG e 96,8% para a albumina.

## 2.5 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é um método de separação amplamente empregado na purificação de aminoácidos, peptídeos e proteínas (YAMAMOTO *et al.*, 1988). Apresenta boa eficiência, alta resolução (CUMMINS *et al.*, 2016) e, ainda, realiza separações sob condições não desnaturantes (ANDERSEN *et al.*, 2004). Seu princípio envolve a separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial (BOBLETER e BONN, 2011). Em outras palavras, o equilíbrio adsorptivo é dominado pelas interações eletrostáticas entre os radicais iônicos ligados à superfície da matriz cromatográfica e o soluto a ser separado (ACIKARA, 2013). Em condições diferentes do ponto isoelétrico (pI) da proteína, estas apresentam uma carga líquida positiva ou negativa e, através de interações eletrostáticas interagem com grupos iônicos presentes na superfície da fase estacionária. O pI é o pH onde a proteína possui carga líquida nula (DAMODARAN e PARKIN, 2019). As matrizes cromatográficas de troca iônica são recobertas por cátions ou ânions, portanto, essas matrizes serão neutralizadas por contra-íons aniônicos ou catiônicos. Quando as proteínas estão carregadas, estas deslocam os contra-íons, interagindo com a matriz cromatográfica por interações eletrostáticas (HEALTHCARE, 2016; GERBERDING e BYERS, 1998).

O processo de separação de uma mistura de proteínas por cromatografia de troca iônica é ilustrada na Figura 2. Inicialmente, os íons presentes em uma solução aquosa tamponada de baixa força iônica, neutralizam os radicais iônicos da matriz (Figura 2 a). Estes íons são denominados contra-íons. Em seguida, os solutos (neste exemplo, proteínas) com cargas superficiais, deslocam os contra-íons e, por meio de interações eletrostáticas interagem com os grupos iônicos da matriz (Figura 2 b). As proteínas com cargas iguais aos contra-íons ficarão retidas na matriz, enquanto as que apresentarem cargas diferentes serão eluídas na fase móvel. Em seguida, um processo de lavagem é realizado por meio do bombeamento de solução aquosa tamponada de baixa força iônica através da matriz para remover os componentes que não foram adsorvidos. Após, inicia-se o processo de eluição, o qual consiste no aumento da força iônica da fase móvel, fazendo com que as interações entre contra-íons e radicais iônicos do adsorvente passem a ser preferenciais, ao mesmo tempo em que as proteínas adsorvidas na matriz são novamente deslocadas para a fase móvel, sendo eluídas da coluna cromatográfica (Figuras 2 c, 2 d e 2 e). Por fim, uma nova lavagem com a solução tampão de baixa força iônica é capaz de preparar a coluna cromatográfica para um novo processo de adsorção por troca iônica (BOBLETER e BONN, 2011).

**Figura 2.** Processo de separação de proteínas por cromatográfica de troca iônica.



Fonte: Adaptado de Acikara (2016).

Os avanços na produção de novos materiais adsorventes e trocadores iônicos que visam aprimorar os processos cromatográficos são constantes (LI *et al.*, 2019; DODS *et al.*, 2015; ANGELO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Diante de tal desenvolvimento, destacam-se os criogéis poliméricos (MÓL *et al.*, 2019; MINIM, 2015; PERÇIN *et al.*, 2015; ÖZKAN, GÜVEN E GEZICI, 2018), os quais apresentam estruturas porosas e interconectadas. Tais materiais são eficazes para processos de separação de extratos não clarificados (NASCIMENTO *et al.*, 2019; MÓL *et al.*, 2019; MÓL *et al.*, 2017), além de serem versáteis quanto a sua funcionalização, o que permite explorar múltiplas interações intermoleculares como forças motrizes na purificação de macromoléculas (MEMIC *et al.*, 2019).

Perçin *et al.*, (2015), purificou  $\alpha$ -quimiotripsinogenio, citocromo c e lisozima a partir de uma coluna monolítica de troca catiônica. Tais colunas eram constituídas de poli acrilato de 2-hidroxiethylmetil (HEMA) e glicidilmetacrilato (GMA) e funcionalizadas com o ligante de troca catiônica ácido 3-mercaptopropano sulfônico (3-MPS). Os autores observaram alto desempenho do material nas separações cromatográficas, mesmo após a passagem de litros de eluentes e 10 a 20 volumes de coluna de solução de NaOH 1 mol/L. A separação da  $\alpha$ -

quimiotripsinogênio, citocromo c e lisozima foi alcançada por meio de um gradiente linear gradativo, e nenhuma evidência de adsorção irreversível das proteínas foi observada.

Outra abordagem foi realizada por Nascimento *et al.*, (2019) em que os autores utilizaram a cromatografia de troca iônica como estratégia para purificar lectinas, principalmente jacalinas, de extrato bruto de semente de jaca. Criogeis de poliacrilamida foram funcionalizados com grupos ligantes de troca catiônica (ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPSA) ou ácido acrílico (AAc) e aniônica (cloreto de [2-(acriloiloxi)etil] trimetilamônio (AETA-Q) ou 2-(dimetilamino)-etil metacrilato (DMAEMA)). As lectinas foram capturadas diretamente dos extratos brutos de semente de jaca em um protocolo de etapa única e a eficiência do processo foi avaliada em função do fator de purificação e da atividade hemaglutinante recuperada. Os pesquisadores concluíram que os criogeis monolíticos de troca iônica apresentam potencial de uso para a purificação de lectinas de sementes de jaca em um protocolo rápido e de etapa única.

## 2.6 Criogel polimérico

Nas últimas décadas, nota-se um crescimento no número de pesquisas científicas relacionadas ao desenvolvimento de matrizes cromatográficas para a separação de biomoléculas. Dentre esses materiais, encontram-se os criogeis poliméricos, considerados excelentes matrizes de separação, apresentando uma ampla gama de aplicações em vários processos de biosseparação por possuírem habilidades de purificação com alta eficiência (LOZINSKY *et al.*, 2001; INGVLE *et al.*, 2015; BAKHSHPOUR *et al.*, 2019; ANDAÇ, GALAEV e DENIZLI, 2016; ANDRABI *et al.*, 2016; KUTLUSOY *et al.*, 2017; EROL *et al.*, 2016; KOSE *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2015).

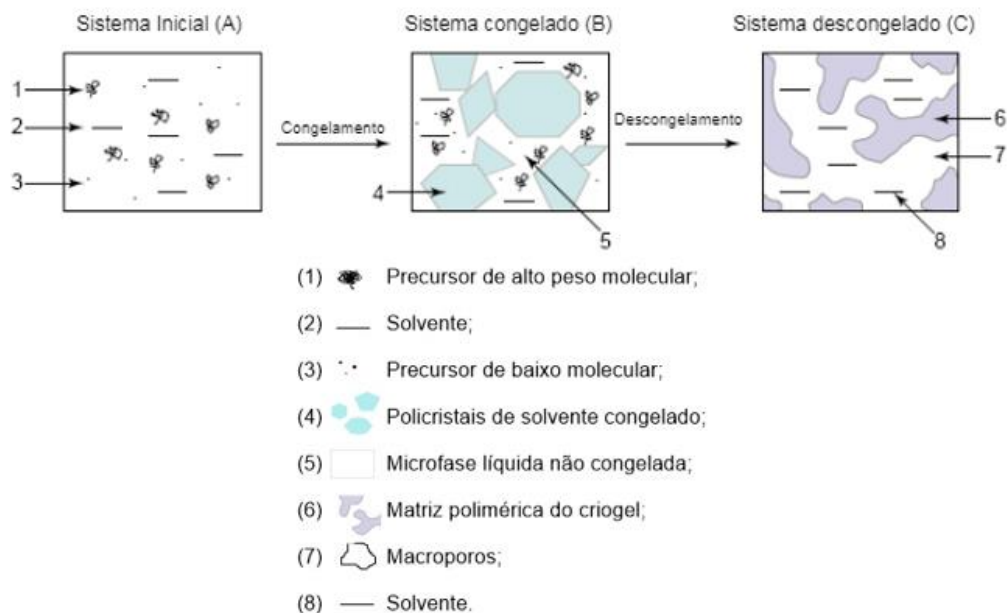
Os criogeis poliméricos são géis formados por meio de um processo chamado gelificação criotrópia, nas quais são sintetizados a partir de uma solução de monômeros e catalisadores, em temperaturas entre -5 °C a -20 °C (Figura 3), sendo que a polimerização prossegue pelo tempo necessário para formação dos cristais de gelo (LOZINSKY, 2002; LOZINSKY, 2014; SAYLAN e DENIZLI, 2019). Durante o estágio de polimerização, ocorre a concentração dos monômeros e radicais livres em uma microfase não congelada, que resultará na formação da estrutura tridimensional do gel, ao mesmo tempo em que há a formação de policristais de solventes congelados. Ao final do processo de polimerização, o gel formado é descongelado à temperatura de refrigeração ou ambiente fazendo com que os cristais de gelo



derretam, e sejam gerados os poros (macro, meso e microporos) interconectados dentro da matriz (LOZINSKY, 2003; JAIN e KUMAR, 2013).

Para a síntese dos criogeis poliméricos de acrilamida são utilizados monômeros de acrilamida, o monômero de ligação N,N'-metileno-bis(acrilamida), uma solução tampão tetrametilenodiamina (TEMED) que atua como catalisador da formação do gel, e o persulfato de amônio que atua como formador de radicais livres (CARVALHO *et al.*, 2013). Em alguns casos, os criogeis são também funcionalizados com co-monômeros funcionais como alil glicidil éter (AGE) ou glicidilmetacrilato (GMA), responsáveis por conferir grupos epóxi livres superficiais, o que permite uma versatilidade na funcionalização química dos criogeis (PLIEVA *et al.*, 2004).

**Figura 3.** Diagrama da formação dos criogeis poliméricos



Fonte: Adaptado de Lozinsky (2003).

Diversos fatores influenciam as propriedades físicas dos criogeis como a reticulação, a temperatura de gelificação, a composição da solução de monômeros, o tempo, a temperatura e a taxa de congelamento durante o processo de criopolimerização. Para a síntese dos criogeis, podem ser empregados uma gama de polímeros naturais ou sintéticos (LOZINSKY, 2002), monômeros ou oligômeros, permitindo uma diversidade de novas matrizes (HENDERSON *et al.*, 2013) como criogeis de poli (álcool vinílico) (PLIEVA *et al.*, 2005), de gelatina (SHALUMON *et al.*, 2018), de poli(acrilamida) (PLIEVA *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2006), de poli hema (TEKIN *et al.*, 2011) e outros. Além disso, os criogeis podem apresentar-se em diferentes formatos como colunas monolíticas, discos, membranas, *beads*, filmes, entre outros

(KUMAR *et al.*, 2006; TURKMEN e DENIZLI, 2014; BAYRAMOGLU e ARICA, 2020; AISLIYUCE *et al.*, 2012; HOSSEIMI *et al.*, 2020).

Os criogeis poliméricos apresentam uma combinação única de propriedades como macroporosidade (poros com diâmetro de 10  $\mu\text{m}$  – 200  $\mu\text{m}$ ), alta estabilidade mecânica, boa flexibilidade e biocompatibilidade, o que os leva a serem excelentes materiais cromatográficos para separação e purificação de biomoléculas (ERTÜRK e MATTIASSON, 2014; LOZINSKY, 2003), além de apresentarem ótimo custo benefício e não causarem danos ambientais (ÇIMEN *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens relacionadas aos criogeis poliméricos, sua alta porosidade resulta em uma pequena área superficial disponível para adsorção, o que leva a uma redução da eficiência do processo de purificação (KUMAR *et al.*, 2006; VERÍSSIMO *et al.*, 2017). Por sua vez, podem ser realizadas modificações em sua matriz, aumentando assim a eficiência dos processos de separação (INGLAVE *et al.*, 2015).

## 2.7 Funcionalização de criogeis

A funcionalização insere grupos funcionais à superfície dos criogeis a fim de melhorar sua eficiência durante o processo adsorptivo (MACHADO *et al.*, 2015), uma vez que este possui grandes poros reduzindo sua área superficial disponível (VERÍSSIMO *et al.*, 2017). A presença de grupos funcionais na superfície do criogel é capaz de promover modificações químicas e alterar a morfologia do mesmo. Além disso, são úteis tanto para melhorar propriedades de adsorção, grau de intumescimento, hidrofobicidade e estabilidade térmica, como para aumentar a área superficial e imobilizar ligantes específicos (YANG *et al.*, 2016; ARRUA *et al.*, 2009; YAO *et al.*, 2007; TEKIN *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2016). Dentre os métodos de funcionalização existentes para criogeis, destaca-se o método epóxi ativado (Fig. 4) (MATEO *et al.*, 2003).

Para alcançar grupos funcionais diversificados, deve-se optar pela inserção de monômeros com diferentes grupos funcionais (LEE *et al.*, 2001). O co-monômero alil glicidil éter (AGE) e o metacrilato de glicidil (GMA) fazem parte de grupos funcionais capazes de sintetizar polímeros ativados com epóxi. Além de apresentarem grupos epóxi terminais em suas estruturas, possuem funcionalidades particulares, em que AGE e GMA possuem grupos alil e acrílico, respectivamente. Dessa forma, a função alil/acrílico, possibilita uma copolimerização com outros monômeros. Os grupos epóxi presentes no AGE e GMA são ótimas alternativas para imobilização de ligantes, uma vez que apresentam alta reatividade e formação de ligações

covalentes com grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), tiol ( $\text{SH}$ ) e hidroxila ( $\text{OH}$ ) (VAIDYA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2019; BAI, LI e WANG, 2006). Dessa forma, o ligante de interesse se ligará covalentemente com o grupo epóxi, provocando a reação de abertura do anel desse grupo funcional e, então, as proteínas poderão interagir com o ligante sendo adsorvidas pela matriz como mostra a Fig. 4. Suportes ativados com grupos epóxis são fornecidos de forma ativada, além de serem matrizes ideais para realizar uma imobilização de proteínas em escala laboratorial e industrial (MATEO *et al.*, 2000; MATEO *et al.*, 2003; MATEO *et al.*, 2007; HOSSEINI *et al.*, 2018).

**Figura 4.** Mecanismo de imobilização de proteínas em suportes epóxi.



Fonte: Adaptado de Mallik *et al.*, (2005).

Uygun *et al.*, (2015) prepararam um novo criogel de poli (metil metacrilato-glicidil metacrilato) [poli (MMA-GMA)] para imobilização de amiloglicosidase. Os criogéis de poli (MMA-GMA) imobilizado com amiloglicosidase também foram usados para a produção contínua de glicose a partir do amido, e seu potencial de hidrólise de amido foi demonstrado com sucesso. Os autores mencionaram que em razão das propriedades únicas e vantajosas dos criogéis, como estruturas porosas e interconectadas, curto caminho de difusão, baixas quedas de pressão e alta estabilidade química e física, este novo material pode ser utilizado para uma contínua produção de xarope de glicose. Os resultados indicaram que os criogéis funcionalizados com epóxi ofereceram uma boa alternativa para aplicações de imobilização de amiloglicosidase com maior estabilidade operacional e térmica, além de capacidade de reutilização. Além disso, concluíram que esses criogéis podem ser usados tanto para imobilizar amiloglicosidase como também outras enzimas de valor industrial.

## 2.8 Isotermas de adsorção

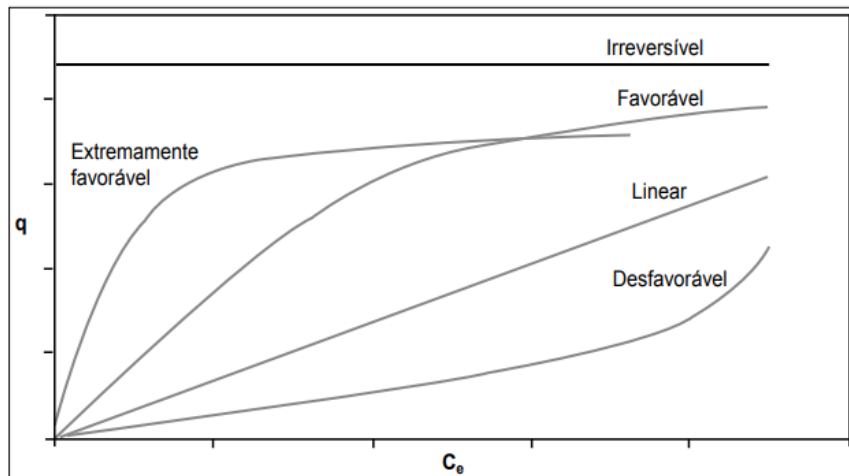
A palavra isotérmica vem do grego, em que “iso” significa “igual” e “térmica” significa “calor”. Dessa forma, o termo isotermas de adsorção pode ser atribuído à ensaios de adsorção realizados sob temperaturas constantes, ou seja, sob condições isotérmicas (MELO *et al.*, 2020). As curvas de isotermas de adsorção podem ser representadas na forma de gráficos

na qual relacionam a quantidade de adsorbato retido na matriz e a quantidade de adsorbato remanescente na fase móvel, quando as duas fases estão em equilíbrio em uma determinada temperatura (PICCIN *et al.*, 2017).

Ao estudar novos materiais adsorventes, é necessário definir uma relação de equilíbrio para o sistema, uma vez que a interação entre o adsorbato e o adsorvente é expressa através das isotermas de adsorção, por meio das relações de equilíbrio (LAZZARI *et al.*, 2021).

Na Figura 5, é apresentado gráficos obtidos das isotermas que fornecem informações relevantes sobre os processos de adsorção. Nesse contexto, a isoterma linear demonstra que a massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente ( $q$ ) é proporcional à concentração de equilíbrio ( $C_e$ ) do adsorbato na fase líquida. Já a isoterma favorável retrata que a massa do adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente é alta para uma baixa concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida. Por outro lado, a isoterma desfavorável evidencia que a massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente é baixa mesmo para uma alta concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida. Por fim, a isoterma irreversível revela que a massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente não depende da concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida (MOREIRA, 2008; ALVES, 2007; MELO *et al.*, 2020).

**Figura 5.** Comportamento de isotermas de adsorção



Fonte: Adaptado de Alves (2007) e Moreira (2008).

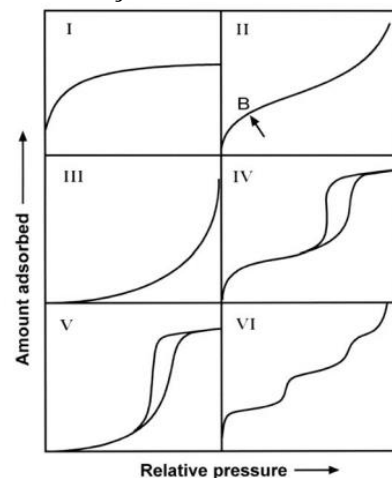
De acordo com Piccin *et al.* (2017), em sistemas de adsorção em fase líquida, as isotermas são importantes devido aos seguintes aspectos:

- É possível obter a capacidade máxima de adsorção de um determinado adsorvente em diferentes condições experimentais através dos parâmetros isotérmicos e, quanto maior a capacidade, maior a qualidade do adsorvente;

- Além de avaliar a qualidade do adsorvente, também é possível obter informações sobre as propriedades energéticas, estéricas e de afinidade;
- Pode fornecer informações sobre o mecanismo de interação que ocorre entre o adsorvente e o adsorbato;
- Em termos de modelagem da taxa de adsorção, geralmente é considerado um equilíbrio local, para resolver as equações diferenciais parciais. Este equilíbrio local é descrito matematicamente pelas isothermas de adsorção;
- Parâmetros termodinâmicos de adsorção, como variação de energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ), variação de entalpia padrão ( $\Delta H^\circ$ ) e variação de entropia padrão ( $\Delta S^\circ$ ), podem ser encontrados nas isothermas. Esses parâmetros são fundamentais para verificar a espontaneidade e natureza da operação de adsorção.

A maioria das análises de equilíbrio de adsorção começa com a classificação das isothermas. Esta classificação é importante na modelagem teórica de fenômenos de adsorção. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) classifica as isothermas em 6 tipos, como mostra a Figura 6, de maneira simplificada (LIMA *et al.*, 2020).

**Figura 6.** Classificação IUPAC de isothermas de sorção



Fonte: IUPAC (1985).

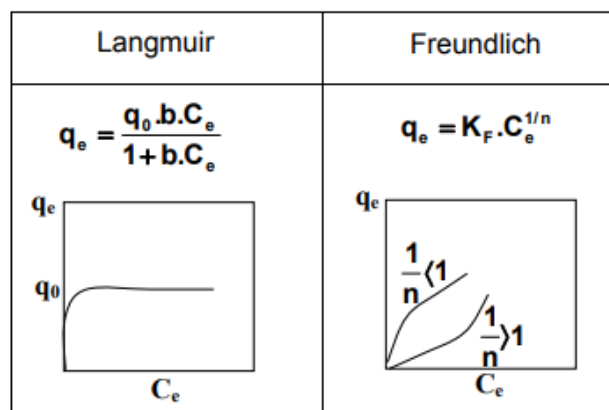
As isothermas do tipo I são reversíveis e possui inclinação não linear. Nesse caso, há uma diminuição da disponibilidade dos sítios de adsorção quando a concentração da solução aumenta, indicando que todos os sítios da superfície estão ocupados. No caso da adsorção física, as isothermas de sorção obtidas em materiais microporosos são frequentemente do tipo I. Já as isothermas de adsorção do tipo II são obtidas em adsorventes não porosos ou macroporosos. O ponto B mostrado na figura indica o estágio em que a superfície da monocamada está saturada e a adsorção multicamada começa a ocorrer (LOWELL *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2020; IUPAC, 1985; DONOHUE e ARANOVICH, 1998; FALONE e VIEIRA, 2004).

As isotermas do tipo III são reversíveis, incomuns e não apresentam o ponto B como as do tipo II. Esse tipo de isoterma apresenta adsorção lenta devido a fraca interação entre adsorbato e adsorvente. As do tipo IV são comumente vistas em materiais mesoporosos. São caracterizadas pela alça de histerese, que está associada à ocorrência de condensação dos poros. Nessa isoterma, a adsorção ocorre em camadas, em superfície homogênea não porosa. A parte inicial do tipo IV pode ser atribuída à adsorção monocamada-multicamada como no caso da isoterma tipo II (LOWELL *et al.*, 2004; DONOHUE e ARANOVICH, 1998).

As isotermas do tipo V retratam a condensação de poros e alça de histerese assim como ocorre nas isotermas do tipo IV. No entanto, a parte inicial desta isoterma está relacionada com as do tipo III, indicando fracas interações entre o adsorvente e o adsorbato. Por fim, as isotermas do tipo VI representam a adsorção multicamada em uma superfície uniforme e não porosa. A nitidez das etapas depende da homogeneidade da superfície adsorvente, da adsorção e da temperatura (LOWELL *et al.*, 2004).

Dentre os modelos existentes de isotermas de adsorção, os mais utilizados são os de Langmuir e Freundlich, mesmo sendo modelos introduzidos há cerca de 70 anos. Este fato reflete na simplicidade de suas equações, bem como sua capacidade de ajustar uma ampla variedade de dados de adsorção. Embora estes modelos apresentem uma base teórica, em sua maioria, quando aplicados são realizados ajustes de forma empírica para cada sistema em particular (SILVA, 2010; RODRIGUES, 2002; KINNIBURGH, 1986). A Figura 7 apresenta os modelos com suas respectivas curvas e equações.

**Figura 7.** Tipos, equações e curvas de isotermas de adsorção.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2002)

### 2.8.1 Modelo de Langmuir

O modelo de Langmuir é comumente utilizado para representar a adsorção de proteínas (HORBETT, 2018; COGLITORE *et al.*, 2019). Este modelo de adsorção tem sido

amplamente aplicado para simular a adsorção monocamada na superfície adsorvente sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, onde a superfície do adsorvente é assumida como uniforme e os sítios ativos são distribuídos uniformemente no adsorvente (WANG *et al.*, 2018).

O modelo é restrito às seguintes hipóteses (MELO *et al.*, 2020):

- Existe um número definido de sítios;
- As moléculas adsorvidas não interferem na adsorção de outras moléculas;
- A adsorção ocorre em uma monocamada.
- Cada sítio pode adsorver apenas uma molécula.

A equação que representa o modelo de Langmuir é apresentada abaixo (Equação 1) (MÓL *et al.*, 2017; LANGMUIR, 1916):

$$q_e = \frac{q_{max} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (1)$$

Ou na forma linearizada como:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{max} \cdot K_L} + \frac{1}{q_{max}} \cdot C_e$$

Onde  $q_{max}$  representa a capacidade de adsorção máxima do adsorvente ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), assumindo-se a formação de uma monocamada de adsorbato sobre o adsorvente; e  $K_L$  representa a constante de Langmuir ( $\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Os parâmetros  $K_L$  e  $q_{max}$  podem ser calculados a partir dos coeficientes linear e angular, respectivamente, da reta  $C_e/q_e$  em função de  $C_e$ .

### 2.8.1 Modelo de Freundlich

O modelo proposto por Freundlich foi um dos primeiros a equacionar a relação entre a quantidade de material adsorvido e a concentração do material na solução em um modelo com características empíricas. Esse modelo empírico pode ser aplicado a sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas e diferentes constantes de adsorção de equilíbrio podem ser determinadas (LEE *et al.*, 2012; FOO e HAMEED, 2010; MELO *et al.*, 2020).

A equação que representa o modelo de Freundlich é apresentada abaixo (Equação 2) (SHAO e HALL, 2016):

$$q_e = K_F C_{eq}^\alpha \quad (2)$$

Ou na forma linearizada como:

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_{eq}$$

Onde  $q_e$  representa a quantidade de adsorção no equilíbrio de proteínas,  $C_{eq}$  representa a concentração de proteína de equilíbrio,  $K_F$  é uma constante que indica a capacidade de adsorção do substrato e  $1/n$  é uma constante de Freundlich que indica a intensidade de adsorção.

### 2.8.2 Termodinâmica do processo adsortivo

A adsorção é um fenômeno que depende diretamente da temperatura do sistema. Com isso, a avaliação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos é de extrema importância, pois são indicadores da possível natureza da adsorção. Contudo, o processo adsortivo pode ser caracterizado em relação a esses parâmetros da seguinte forma (SAHMOUNE, 2019):

- Variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ_{ads}$ ) que indica a espontaneidade do processo;
- Variação da entalpia ( $\Delta H^\circ_{ads}$ ) que indica se o processo é exotérmico ou endotérmico;
- Variação da entropia ( $\Delta S^\circ_{ads}$ ) que está relacionada ao grau de organização do sistema.

A energia livre de Gibbs pode ser determinada pela Equação 3 (LIMA *et al.*, 2019; BATOOL *et al.*, 2018):

$$\Delta G^\circ_{ads} = -RT \ln K_L \quad (3)$$

Onde  $\Delta G^\circ_{ads}$  é a variação da energia livre de Gibbs padrão ( $J.mol^{-1}$ ),  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,3145 J.mol^{-1} K^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (K) e  $K_L$  é a constante de equilíbrio (adimensional) obtida do modelo de Langmuir.

A variação da entalpia e da entropia podem ser determinadas empregando-se a equação de Van't Hoff, através da Equação 4 (RAGANATI *et al.*, 2018; MÓL *et al.*, 2017):

$$\ln K_L = \frac{-\Delta H^\circ_{ads}}{RT} + \frac{\Delta S^\circ_{ads}}{R} + \theta \quad (4)$$

Onde  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,3145 J.mol^{-1} K^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta do sistema (K),  $\Delta H^\circ_{ads}$  é a variação de entalpia,  $\Delta S^\circ_{ads}$  é a variação de entropia e  $\theta$  é uma constante dependente da razão entre as fases e é constante com a temperatura.

O coeficiente angular e linear da reta  $\ln K_L$  versus  $1/T$  pode ser usada para encontrar o valor de  $\Delta H^\circ_{ads}$ . Quando a  $\Delta H^\circ_{ads}$  e a  $\Delta S^\circ_{ads}$  dependem da temperatura, a curva de  $\ln K_L$  versus  $1/T$  gera uma relação não linear (SOUSA *et al.*, 2014) podendo ser aproximada por um polinômio de segundo grau de acordo com a Equação 5:

$$\ln K_L = \alpha + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \theta \quad (5)$$

Onde  $\alpha$ ,  $b$  e  $c$  são parâmetros empíricos.



Derivando a equação 4 em relação a  $1/T$ , obtém-se:

$$\left(\frac{\partial \ln K_L}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)}\right) = -\frac{\Delta H^\circ_{ads}}{R} \quad (6)$$

Derivando a equação 5 em relação a  $1/T$ , obtém-se:

$$\left(\frac{\partial \ln K_L}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)}\right) = b + 2 \cdot \frac{c}{RT} \quad (7)$$

Igualando as Equações (6) e (7), obtém-se:

$$-\frac{\Delta H^\circ_{ads}}{R} = b + 2 \cdot \frac{c}{RT} \rightarrow \Delta H^\circ_{ads} = -R \left( b + 2 \cdot \frac{c}{T} \right) \quad (8)$$

Através da equação 8, pode-se determinar a  $\Delta H^\circ_{ads}$ , em função da temperatura.

E, por fim, pode-se determinar a  $\Delta S^\circ_{ads}$ , sendo calculada pela relação de Gibbs-Helmholtz, através da Equação 9:

$$\Delta G^\circ_{ads} = \Delta H^\circ_{ads} - T \cdot \Delta S^\circ_{ads} \quad (9)$$

## REFERÊNCIAS

ABD-AZIZ, N. et al. A new plant expression system for producing pharmaceutical proteins. **Molecular Biotechnology**. v. 62, p. 240 – 251, 2020.

ABRÃO, A. Operações de Troca Iônica. São Paulo: INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES - CNEN/SP, 1972

ACIKARA, O. B. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. IntechOpen, 2016.

ACIKARA, O. B. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. IntechOpen, 2013.

ACQUA, C. et al. Formation and characterization of protein-based films from yellow pea (*Pisum sativum*) protein isolate and concentrate for edible applications. **Current Research in Food Science**. v. 2, p. 61-69, 2020.

AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Perfil de carotenoides e fenólicos totais em frutos de pereskia aculeata miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 234–38, 2012.

ARAÚJO, A. L. P. et al. Estudo Termodinâmico da Adsorção de Zinco em Argila Bentonita Bofe Calcinada. **Scientia Plena**. V. 5, p. 124201, 2009.

AHMAD, S. et al. A review on latest innovations in natural gums based hydrogels: Preparations & applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 136, p. 870–890, 2019.

AIDER, M.; SIROIS-GOSSELIN, M.; BOYE, J. I. Pea, Lentil and Chickpea Protein Application in Bread Making. **Journal of Food Research**; v. 1, 2012.

AISLIYUCE, S. et al. Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v. 889-890, p. 95-102, 2012.

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

ALVES, A. C. M. **Avaliação do tratamento de efluentes líquidos contendo cobre e chumbo por adsorção em carvão ativado**. 56p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento do Centro de Tecnologia de da Universidade Federal de Alagoas). Maceió, 2007.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero pereskia na alimentação humana em um município de minas gerais. **Ciência Rural**, v. 42, p. 751–56, 2012.

ALMEIDA, M. E. F. et al. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nóbis. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 431–39, 2014.

AMARAL, T. N. et al. Extraction of hydrocolloids from *Pereskia Aculeata* Miller: reuse of process residue as activated carbon for the pigment-removal phase. **Food Sci. Technol**, Campinas, v. 38, p. 77-85, 2017.

AMARAL, T. N. et al. Effects of salts and sucrose on the rheological behavior, thermal stability, and molecular structure of the *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 218–229, 2019.

AMARAL, T. N., et al. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, 79, 331–342, 2018.

ANDERSEN, T. et al. Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1025, n. 2, p. 217-226, 2004.

ANDRABI, S. M. et al. Supermacroporous hybrid polymeric cryogels for efficient removal of metallic contaminants and microbes from water. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterial**. v. 65, 2016.

ANGELO, J. M. et al. Characterization of cross-linked cellulosic ion-exchange adsorbents: 2. Protein sorption and transport. **Journal of Chromatography A**. v. 1438, p. 100-112, 2016.

ANDAÇ, M.; GALAEV, I. Y.; DENIZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications inbiomacromolecule purification. **J. Chromatogr. B**, v. 1021, p. 69–80, 2016.

AOAC, Official methods of analysis of AOAC international., 19th ed., AOAC International, Washington, USA, 2012.

- ARIF, M.; CHIA, L-S.; PAULS, K. P. Protein-Based Bioproducts. **Plant Bioproducts**. p. 143 – 145, 2018.
- ARRUA, R. D. et al. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. **Materials**, v. 2, p. 2429-2466, 2009.
- BACIGALUPE, A.; ESCOBAR, M. M. Soy protein adhesives for particleboard production – a Review. **Journal of Polymers and the Environment**, 2021.
- BAI, Y-X.; LI, Y-F.; WANG, M-T. Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 540-547, 2006.
- BAJAJ, P. R. et al. Improving functional properties of pea protein isolate for microencapsulation of flaxseed oil. **Journal of Microencapsulation**. v. 34, 2017.
- BAKSHPOUR, M. et al. Biomedical applications of polymeric cryogels. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 1–22, 2019.
- BANDARA, N. et al. Canola protein: a promising protein source for delivery, adhesive, and material applications. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 95, p. 1075 – 1090, 2018.
- BARREIRA, T. F. et al. Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 964–74, 2015.
- BARROS, K. N. et al. Desenvolvimento de uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata*. **Iniciação Científica Cesumar**. v. 12, n. 1, p. 29-37, 2010.
- BATOOL, F. ET AL. Study of isothermal, kinetic, and thermodynamic parameters for adsorption of cadmium: an overview of linear and nonlinear approach and error analysis. **Bioinorganic Chemistry and Applications**. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3463724>.
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Strong and weak cation-exchange groups generated cryogels films for adsorption and purification of lysozyme from chicken egg white. **Food Chemistry**. v. 342, p. 128295, 2021.
- BOBLETER, O.; BONN, G. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. **GE Healthcare**, p. 1187–1242, 2011
- BOKE, N. H. Ontogeny and Structure of the Flower and Fruit of *Pereskia aculeata*. **Amer. J. Bot.** v. 53, p. 534–542, 1966.
- BOTREL, N.; GODOY, R. L. de O.; MADEIRA, N. R.; AMARO, G. B.; MELO, R. A. de C. e. Estudo comparativo da composição proteica e do perfil de aminoácidos em cinco clones de ora-pro-nóbis. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2019.

BOUAZIZ, F. et al. Recent advances in Rosaceae gum exudates: From synthesis to food and non-food applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 535–545, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram 749 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* v. 750, p. 248–254, 1976.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, J. F. **Chromatographic Methods**. SPRINGER SCIENCE & BUSINESS MEDIA, 5ed, p. 1-4, 2012.

BRASIL. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belo Horizonte, MG, 2010. 92 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. Brasília, DF. 2015

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. Secretaria de Biodiversidade – Brasília, DF: MMA, p. 1160, 2016.

BURGER, T. G.; ZHANG, Y. Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applicationS. **Trends in Food Science & Technology**. v. 86, p. 25-33, 2019.

BURGUS-DIAZ, C. et al. Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 25, p. 51-57, 2016

CAMPOS, J. A. et al. Brotação de ora-pro-nóbis em substrato alternativo de casca de arroz carbonizada. **Holos**, v. 7, p. 148, 2017.

CARVALHO, B. M. A. et al. Cryogel Poly (acrylamide): Synthesis, Structure and Applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, p. 1-42, 2013.

CARVALHO, B. M. A. et al. Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 33, 2016.

CARVALHO, E. G. et al. Propriedades de cicatrização de feridas e conteúdo de mucilagem de *Pereskia aculeata* de diferentes substratos. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v, 24, n. 6, 2014.

CHMIELEWSKA, A. et al. Canola/rapeseed protein – nutritional value, functionality and food application: a Review. **Food Science and Nutrition**, 2020.

CHOI, W-S.; HAN, J. H. Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films. **Journal Food Science**. v. 66, p. 319-322, 2001.

ÇIMEN, D.; TÜRKMEN, D.; DENIZLI, A. Poly-(L)-histidine immobilized cryogels for lysozyme purification. **Adsorption Science and Technology**. v. 34, p. 469–87, 2016.

COLLINS, C. H. 2006 – Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 889-890, 2006.

CONCEIÇÃO, M. C. et al. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–14, 2014.

COSKUN, O. Separation Techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–60, 2016

COSTA, F.; SILVA, R.; BOCCACCINI, A. R. 7 - Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. **Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair**. p. 175-204, 2018

CUMMINS, P. M.; ROCHFORD, K. D.; O'CONNOR, B. F. Protein chromatography: **Ion exchange chromatography: basic principles and application**. New York: ed. 2, HUMANA PRESS, 2016.

CUNHA, A. P; SILV, A. A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Ed. 4. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 152-53, 2003.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fenema. Ed. 5. Artmed. 2019.  
DODS, S. R. et al. Fabricating Electrospun Cellulose Nanofibre Adsorbents For Ion-Exchange Chromatography. **Journal Of Chromatography A**. V. 1376, p. 74-83, 2015.

DONOHUE, M. D.; ARANOVICH, G. L.; Classification of Gibbs adsorption isotherms. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 76, p. 137-152, 1998

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 103–9, 2005.

ERIKSSON. K. O. **Chapter 19 – Hydrophobic Interaction Chromatography**. Alemanha: G. Jagschies, 2018.

EROL, K. et al. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 567–576, 2016.

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

FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção/dessorção do explosivo tetra em turfa e em argissolo vermelho amarelo. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 849-854, 2004

FAN, B. et al. Formulation of a novel soybean protein-based wood adhesive with desired water resistance and technological applicability. **Journal Applied Polymer Science**. v. 133, 2016.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **Rev. Plant Physiol**. v. 34, p. 47-70, 1983.

FONTAN, R. C. I. *et al.* Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**. v. 58, p. 1717 – 1725, 2017.

GARCIA, J. A. A. et al. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 141–51, 1998.

GONÇALVES, G. R. F. et al. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal Chromatography B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** p. 1033–1034, 2016.

GONÇALVES, G. R. F. et al. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

GONÇALVES, J. P. Z. et al. Quantificação De Proteínas E Análise De Cinzas Encontradas Nas Folhas E Caule Da Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia Aculeata* Miller). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ 2014, v. 1, n. 2., 2015. Florianópolis. **Anais...** São Paulo: 2014, p. 3127–32.

GU, W. et al. Tough, strong, and biodegradable composite film with excellent UV barrier performance comprising soy protein isolate, hyperbranched polyester, and cardanol derivative. **Green Chemistry**, v. 21, p. 3651 – 3665, 2019.

HAMEDI, H. et al. A novel bioactive edible coating based on sodium alginate and galbanum gum incorporated with essential oil of *Ziziphora persica*: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food model. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 35-46, 2017.

HEALTHCARE, G. E. Strategies for Protein Purification. **GE HealtCare Handbooks**, p. 39-50, 2010.

HEALTHCARE, G. E. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. **GE HealtCare Handbooks**, p. 170, 2016

HENDERSON, T. M. A. et al. Cryogels for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 21, p. 2682–95, 2013.

HOSSEINI, S. H. et al. Covalent Immobilization of Cellulase Using Magnetic Poly(ionic liquid) Support: Improvement of the Enzyme Activity and Stability. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 789–798, 2018.

HOSSEIMI, M. et al. Preparation of ultra-lightweight and surface-tailored cellulose nanofibril composite cryogels derived from date palm waste as powerful and low-cost heavy metals adsorbent to treat aqueous medium. **Industrial Crops and Products**, v. 154, 2020

ICO, N. et al. Captura cromatográfica das proteínas da mucilagem de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) utilizando criogéis monolíticos de afinidade. XXII C ONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, p. 2793-2796. In: São Paulo: Blucher, 2018.

IKEGAMI, T. *et al.* Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1184, n. 1–2, p. 474–503, 2008.

INGAVLE, G. C. *et al.* Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen. **Biomaterials**, v. 50, n. 1, p. 140–53, 2015.

IUPAC Recommendations. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603–619, 1985.

JAIN, E.; KUMAR, A. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production. **Nature Protocols**, v. 8, n. 5, p. 821–35, 2013.

JANSEN-ALVES, C. *et al.* Production of própolis extract microparticles with concentrated pea protein for application in food. **Food and Bioprocess Technology**. v. 12, p. 729 – 740, 2019.

JANSON, J.-C. Protein Purification: **Principles, High Resolution Methods, and Applications**. Ed. 3, WILEY, J e SONS, 2012.

JESUS, R. S. *et al.* Características agrônômicas de ora-pro-nóbis cultivadas em ambientes de luz e adubação orgânica. **Braz. J. of Develop.**, v. 6, n. 3, p.15048-15063, 2020.

JIA, Z. W. *et al.* Preparation and characterization of pea protein isolate-pullulan blend electrospun nanofiber films. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 157, p. 641–647, 2020.

JUNIOR, F. A. L. *et al.* Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 38–47, 2013.

JUNQUEIRA, L. A. *et al.* Rheological behavior and stability of emulsions obtained from *Pereskia aculeata* Miller via diferente drying methods. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 21–35, 2018.

JUNQUEIRA, L. A. *et al.* Effects of Change in PH and Addition of Sucrose and NaCl on the Emulsifying Properties of Mucilage Obtained from *Pereskia aculeata* Miller. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 3, p. 486–98, 2019.

KIM, W.; WANG, Y.; SELOMULYA, C. Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. **Trends in Food Science & Technology**.v. 105. p. 261–272, 2020

KINNIBURGH, D. G. General Purpose Adsorption Isotherms. **Environ. Sci. Technol.** v. 20, p. 895–904, 1986

KINUPP, V. F.; BARROS, I, B, I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 63–65, 2007.

KOSE, K. *et al.* PolyAdenine cryogels for fast and effective RNA purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 678–686, 2016.

KUMAR, A. et al. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Jornal de Cromatografia A**, v. 1103, p. 35–42, 2006.

KUMAR, B.; GUPTA, A. K.; PRIYA, S.; KUMAR, K. Mixed ligand complexes of ag (i) metal salts of some organic acids with  $\beta$ -alanine. **Acta Ciencia Indica**, Vol. XLIC, No. 4, 175 (2015).

KUTLUSOY, T. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application intissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 366–378, 2017.

LACROIX, M.; VU, K. D. Chapter 11 - Edible Coating and Film Materials: Proteins. *Innovations in Food Packaging* (second Edition), p. 277 - 304, 2014.

LAGO, A. M. T. et al. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 50, p. 339–353, 2019.

LAZZARI, L. K.; PERONDI, D.; ZATTERA, A. J.; SANTANA, R. M. C. Cellulose/Biochar Cryogels: A Study of Adsorption Kinetics and Isotherms. **Langmuir**. v. 37, p. 3180–3188, 2021

LEE, K-P. et al. Adsorption behavior of urokinase by polypropylene film with amine, hydroxylamine and polyol groups. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 60, p. 473-482, 2001.

LI, Y. et al. Emerging biomaterials for downstream manufacturing of therapeutic proteins. **Acta Biomaterialia**. v. 95, 1 p. 73-90, 2019.

LIMA, E. C. et al. A critical review of the estimation of the thermodynamic parameters on adsorption equilibria. Wrong use of equilibrium constant in the van't hoof equation for calculation of thermodynamic parameters of adsorption. **Journal of Molecular Liquids**. v. 273, p. 425-434, 2019.

LIMA, A. C. A. de. et al. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. 256p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2020.

LISE, C. C. **Potencial emulsificante de ora-pro-nóbis (*pereskia aculeata miller*) em derivado cárneo tipo mortadela**. 2018. 49p. Monografia (Graduação em Química) – Universidade Tecnológica do Paraná, Pato Branco, 2018.

LIU, J. et al. Flaxseed gum a versatile natural hydrocolloid for food and non-food Applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 75, p. 146–157, 2018.

LIU, Y. et al. Biomimetic adhesives and coatings based on mussel adhesive proteins. **Biological Adhesives**. P. 345 – 378, 2016.

Lowell, S.; Shields, J. E.; Thomas, M. A.; Thommes, M. **Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density**. Ed. 1. Springer Dordrecht, 2004.

LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001.



LOZINSKY, V. L. A. Polymeric Cryogels: **Brief History of Polymeric Cryogens**. Ed 1, Instambul: OKAY, O.; SPRINGER, C., 2014.

LOZINSKY, V. L. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 71, n. 6, p. 489-511, 2002.

MACHADO, A. P. F. et al. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64–69, 2015.

MACIEL, B. V. B. et al. Iron-rich chitosan-pectin colloidal microparticles laden with ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) extract. **Food Hydrocolloids**, v. 98, 2020.

MAGALHÃES, F. E. L. et al. Analysis and acceptance of the use of panacs in ora-pro-nóbis bread recipe in youth of a Brasilia university center. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 17659-17669, 2019.

MAGDELDIN, S. e MOSER, A. Affinity Chromatography: Affinity Chromatography: **Principles and Applications**. Japão: BOD - LIVROS SOB DEMANDA, 2012.

MAHDAVINIA, G. R. et al. Model protein bsa adsorption onto novel magnetic chitosan/pva/laponite rd hydrogel nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107. p. 719-729, 2018.

MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-performance affinity monolith chromatography: Development and evaluation of human serum albumin columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 7013–22, 2005.

MARSARO-JÚNIOR, A. L. et al. Report of natural infestation of *Pereskia aculeata* Mill. (cactaceae) by *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in Brazil. **Revista de Agricultura**, v. 86, n. 2, p. 151-154, 2011.

MARTIN, A. A. et al. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 509-515, 2000.

MATEO, C. et al. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 772–77, 2003.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. **Biochem. Soc. Trans.** v. 35, p. 1593–1601, 2007.

MATEO, C. et al. **Multi-Point covalente immobilization of enzymes on supports activated with epoxy groups**: Stabilization of industrial enzymes. New York: Humana, 2020.

MELO, C. B., RAULINO, G. S. C., NASCIMENTO, R. F., LIMA, A. C. A., VIDAL, D. Q. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. 256p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2020.

MEMIC, A. et al. Latest Advances in cryogel technology for biomedical applications. **Advanced Therapeutics**. v. 2. p. 1-45. 2019.

MINIM, L. A. **Desenvolvimento de um criogel supermacroporoso de troca catiônica para purificação direta de lisozima da clara de ovo**. Viçosa, 2015.

MÓL, P. C. G. et al. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 75–83, 2019.

MÓL, P. C. G. et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**. v. 1044, p. 17-23, 2017.

MOREIRA, S. A. **Adsorção de íons metálicos de efluente aquoso usando bagaço de pedúnculo de caju: estudo de batelada e coluna de leito fixo**. 133p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará). Fortaleza, 2008.

MUNOZ-MUNOZ, J. et al. An evolutionarily distinct family of polysaccharide lyases removes rhamnose capping of complex arabinogalactan proteins. **J. Biol. Chem.** v. 292, n. 32, p. 13271–13283, 2017.

NAJI-TABASI, S, RAZAVI, S. M. A. Functional properties and applications of basil seed gum: An overview. **Food Hydrocolloids**. v. 73, p. 313-325, 2017.

NASCIMENTO, I. S. Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus Integrifolia*) Seeds in a single step using a supermacroporous ion exchange cryogel. **Revista Mexicana De Ingeniería Química**. v. 18, p. 313-324, 2019.

NASCIMENTO, R. F., LIMA, A. C. A., VIDAL, C. B., MELO, D. Q., RAULINO, G. S. C. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Ed. 2, 260p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2020 ISBN: 978-85-7485-186-0

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production from *Spirulina platensis* algae biomass using single stage extraction–transesterification process. **Fuel**. v. 135, p. 228-234, 2014.

NEVES, I. C. O. et al. Effect of carrier oil on  $\alpha$ -tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 2020. (a)

NEVES, I. C. O. et al. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) Leaves. **Journal Chromatography B**. v. 1161, p. 122435, 2020. (b)

OLSEN, B. A.; PACK, B. W. **Hydrophilic interaction chromatography: a guide for practitioners**. New Jersey: J Wiley, 2013.

OLIVEIRA, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 499–510, 2019. (a)

OLIVEIRA, A. C. F. et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, p. 1-13, 2019. (b)

ÖZKAN, A. E.; GÜVEN, I.; GEZICI, O. Protein ion-exchange chromatography on a biomacromolecule-immobilized monolithic cryogel. **Turkish Journal of Chemistry**. v. 42, p. 355 – 370, 2018.

OZTEKIN, A. et al. Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. **Journal of Chromatography B**. v. 1114–1115, p. 86–92, 2019.

PANG, H. et al. Development of soy protein-based adhesive with high water resistance and bonding strength by waterborne epoxy crosslinking strategy. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. v. 100, 2020.

PATNI, N.; YADAVA, P.; AGARWAL, A.; MAROO, V. An overview on the role of wheat gluten as a viable substitute for biodegradable plastics. **Reviews in Chemical Engineering**. 2014.

PAULA, M. C. de. et al. Processamento de bolo com a planta *Pereskia aculeata* MILL. (Ora-pro-nóbis). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.18, n.2, p.167-174, 2016.

PEANPARKDEE, M; IWAMOTO, S.; YAMAUCHI, R. Microencapsulation: a review of applications in the food and pharmaceutical industries. **Reviews in Agricultural Science**. v. 4, p. 56 – 65, 2016.

PERES, T. B. Noções Básicas de Cromatografia. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PERÇIN, I. et al. Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel. **Journal of Chromatography A**. v. 1386, p. 13-21, 2015.

PICCIN, J. S., CADAVAL, T. R. S., de PINTO, L. A. A., & DOTTO, G. L. (2017). Adsorption Isotherms in Liquid Phase: Experimental, Modeling, and Interpretations. *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification*. p. 19–51, 2017.

PLIEVA, F. M. et al. 2005. Pore Structure of Macroporous Monolithic Cryogels Prepared from Poly (vinyl alcohol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, p. 1057–1066, 2006.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, L.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828–836, 2004. (a)

PLIEVA, F. M.; et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, **Journal Chromatography. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci**. v. 807, p. 129–137, 2004. (b)

POOLE, C. F. **The essence of chromatography**. Amsterdam, NLD: Elsevier Science B.V. p. 936, 2002.

QUEIROZ, C. R. A. A. et al. Ora-pro-nóbis em uso alimentar humano: percepção sensorial.

**Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 1–5, 2015.

RAGANATI, F. et al. Isotherms and thermodynamics of CO<sub>2</sub> adsorption on a novel carbon-magnetite composite sorbent. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 134, p. 540-552, 2018.

RAI, K. et al. Proteins: natural polymers for tissue engineering. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**. v. 8, p. 295-308, 2018.

RAMOS, R. O.; QUEIROZ, C. R. A. A. **Desenvolvimento e caracterização física de pão de cebola com adição de ora-pro-nóbis**. Anais do II Seminário de Pesquisa e Inovação Tecnológica, Uberaba, MG, v.2, n.1, set., 2018.

ROCHA, R. D. C.; LUCCA, A.; SANTOS, W. S. Extração de mucilagem da *Pereskia aculeata* Miller: Avaliação do rendimento e caracterização morfológica para posterior uso no processo de coagulação. In: CONGRESSO ABES FENASAN, 2017. SP Expo (São Paulo). **Anais...** São Paulo: CBL, 2017, p. 1-5.

RODRIGUES, I. R.; RAMOS, R. O.; QUEIROZ, C. R. A. A. Ora-pro-nóbis na mesa: foco alimentar. **Boletim Técnico IFTM**, Uberaba-MG, ano 4, n.3, p.40-47, Set./Dez., 2018.

RODRIGUES, C. C. **Contribuição ao estudo do tratamento do gás amoníaco por adsorção em leito fixo de carvão ativado**. 134p. Tese (Doutorado em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos). São Carlos – SP, 2002.

ROMANO, B. C. et al. 2017. “Desenvolvimento de bala de ora-pro-nóbis: uma alternativa para o consumo de nutrientes. **Ling. Acadêmica**, v. 7, n. 5, p. 57-66, 2017.

ROSA, L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; MELO, C. M. T. Fresh leaves of ora-pro-nóbis in cakes prepared from commercial pre-mixture. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 376–82, 2020.

SAHA, A. et al. Natural gums of plant origin as edible coatings for food industry Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 959–973, 2017.

SAHMOUNE, M. N. Evaluation of thermodynamic parameters for adsorption of heavy metals by green adsorbents. **Environmental Chemistry Letters**. v. 17, p. 697-704, 2019.

SANTANA, C. S. et al. Desenvolvimento de Suplemento Alimentar Utilizando Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*). **Cadernos de Agroecologia**. v. 13, n. 2, 2018.

SAYLAN, Y.; DENIZLI, A. Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications. **Gels**, v. 5, n. 2, p. 1-20, 2019.

SATO, R. et al. Nutritional improvement of pasta with *Pereskia aculeata* Miller: a non-conventional edible vegetable”. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 28–34, 2019.

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

SELKIRK, C. **Ion-exchange Chromatography**. 2<sup>a</sup> ed. New Jersey: Humana Press, 2004.

SHALUMON, K. T. et al. Gelatin/nanohydroxyapatite cryogel embedded poly(lactic-co-glycolic acid)/nanohydroxyapatite microsphere hybrid scaffolds for simultaneous bone regeneration and load-bearing. **Polymers**, v. 8, n. 6, p. 620, 2018

SHOWALTER, A. M.; BASU, D. Glycosylation of arabinogalactan-proteins essential for development in Arabidopsis. **Commun Integr Biol**. v. 9, n. 3, 2016.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**.v. 13, p. 171-192, 2001.

SILVA, R. P. da. **Remoção de metais pesados em efluentes sintéticos utilizando vermiculita como adsorvente**. 2010. 83f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SILVA, A. P. G. et al. Ripe Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* miller) fruits express high contents of bioactive compounds and antioxidant capacity. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 40, n. 3, 2018.

SILVA, K. C. G. et al. Adsorption of protein on activated carbon used in the filtration of mucilage derived from *Pereskia aculeata* Miller. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 42-49, 2017.

SILVA, J. F. de. et al. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 136, p. 47956, 2019.

SIMOES-CARDOSO, J. C.; KOJO, H.; YOSHIMOTO, N.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric Analysis of the Adsorption of Lysozyme and Cytochrome c onto Cation-Exchange Chromatography Resins: Influence of Temperature on Retention. **Langmuir**. v. 36, p. 3336–3345, 2020.

SOUSA, R. C. S. de. et al. Adsorção de alfa-lactalbumina do soro de leite em hidroxiapatita: efeito do pH e da temperatura e análise termodinâmica. **Química Nova**, v. 37, p. 950-955, 2014.

SOUSA, R. M. F. et al. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 448–57, 2014.

SOUZA, M. R. M. et al. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Rev. Bras. De Agroecologia**. v. 4, n. 2, p. 3550-3554, 2009.

SRIKAEAO, K.; LAOTHONGSAN, P.; LERDLUKSAMEE, C. Effects of gums on physical properties, microstructure and starch digestibility of dried-natural fermented rice noodles. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 109, p. 517–523, 2018.

SU, X. et al. Macroporous cellulose-based cryogels with tunable porous structure and surface functional groups. **Fibers and Polymers**. V. 17, p. 712-720, 2016.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller)”. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148–60, 2009.

TAN, H. et al. Collagen cryogel cross-linked by naturally derived dialdehydecaboxymethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 17–24, 2015.

TEKIN, K. et al. Preparation and characterization of composite cryogels containing imidazole group and use in heavy metal removal. **Reactive and Functional Polymers**. v. 71, p. 985-993, 2011.

BIOPHARM INTERNATIONAL. **The Basics of Chromatography**. v. 16, n. 7, 2003. Disponível em: <<https://go-gale.ez26.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?&id=GALE|A106336611&v=2.1&u=capes&it=r&p=AONE&sw=w>>. Acesso em 23 Apr. 2020.

TIAN, H. et al. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: a Review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 120, p. 475-490, 2018.

TOMAZ, C. T. **Chapter 7 - Hydrophobic interaction chromatography**. 2<sup>a</sup> ed. Itália (Monterotondo): S. Fanali, 2017.

TURKMEN, D.; DENIZLI, A. PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. **Colloid and Surface B: Biointerfaces**. v. 123, p. 859-865, 2014

UYGUN, M. et al. Immobilization of amyloglucosidase onto macroporous cryogels for continuous glucose production from starch. **Journal of Biomaterials Science**. v. 26. p. 1112-1125, 2015.

VAIDYA, B. K. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3623–3629, 2008.

VALLE, E. R. Carne Bovina: Alimento Nobre Indispensável. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v. 41, p. 1–4, 2000.

VERÍSSIMO, L. A. A. et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification, **Sep. Sci. Technol**. v. 52, p. 1973–1982, 2017.

VIANA, M. M. S. et al. Composição fitoquímica e potencial antioxidante de hortaliças não convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 504–9, 2015.

YAMAMOTO, S; NAKANISHI, K; MATSUNO, R Protein ion exchange chromatography: **Brief history of Ion-Exchange chromatography**. New York: CRC Press, 1988.

YANG, S. ET AL. Charged groups synergically enhance protein imprinting in amphoteric polyacrylamide cryogels. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 133, n. 34, 2016.

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

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

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

YUN, J. *et al.* Chromatographic adsorption of serum albumin and antibody proteins in cryogels with benzyl-quaternary amine ligands. **Journal of Chromatography A**. v. 1381, p. 173-183, 2015.

WANG, J.; YANG, H. Superelastic and pH-Responsive Degradable Dendrimer Cryogels Prepared by Cryo-aza-Michael Addition Reaction. **Scientific Reports**. v. 8, p. 1–10, 2018.

WANG, H-Y. et al. Fabrication of high-capacity cation-exchangers for protein chromatography by atom transfer radical polymerization. **Biochemical Engineering Journal**. v. 113, p. 19-29, 2016.

WHEATLEY, J. B.; SCHMIDT JN, D. E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. **Jounal Chromatography A**. v. 849, n. 1., p. 1-12, 1999.

ZAINOL, M. M. et al. Kinetics and thermodynamic analysis of levulinic acid esterification using lignin-furfural carbon cryogel catalyst. **Renewable Energy**. v. 130. p. 547-557, 2019.

ZEM, L. M. et al. *Pereskia aculeata*: Biological analysis on wistar rats. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 42–47, 2017.

ZHANG, S. et al. Water-blown castor oil-based polyurethane foams with soy protein as a reactive reinforcing filler. **Journal of Polymers and the Environment**. v. 26, p. 15 – 22, 2018.

ZHANG, Y.; LIU, Q.; REMPEL, C. Processing and characteristics of canola protein-based biodegradable packaging: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 58, 2018.

ZHAO, H. et al. Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. **Journal Food Biochemistry**. v. 44, 2020

ZIEGLER, V. et al. Nutritional enrichment of beef burgers by adding components of non-conventional food plants. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 23, 2020.

**SEGUNDA PARTE: ARTIGO****Desenvolvimento de um criogel de troca iônica para captura das proteínas das folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**

**Autores:** Mariana Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira<sup>1</sup>, Isabelle Cristina Oliveira Neves<sup>3</sup>, Luis Antônio Minim<sup>2</sup>, Jaime Vilela de Resende<sup>1</sup>, Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brasil

(Versão Preliminar)

**A ser submetida na revista:** Brazilian Journal of Chemical Engineering



## **Desenvolvimento de um criogel de troca iônica para captura das proteínas das folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**

### **Resumo**

O desenvolvimento de novas matrizes adsorventes macroporosas que permitem separar e purificar moléculas mantendo sua bioatividade tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Nesse contexto, diversas pesquisas exploraram o potencial de aplicação de proteínas purificadas em vários setores. A ora-pro-nobis (OPN) é uma planta que apresenta alto teor de proteínas, que estão sendo amplamente utilizadas pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, etc. Diante do exposto, foi desenvolvido um criogel de troca iônica para uso na adsorção das proteínas das folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller). Dentre os valores de pH estudados (2,5, 5,5 e 8,5) e os tipos de ligantes de troca iônica testados (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), em pH 5,5 houve uma maior adsorção das proteínas para todos os ligantes, na qual o criogel funcionalizado com ácido glutâmico (criogel-AG) apresentou o melhor resultado de capacidade adsortiva ( $54,435 \text{ mg/g} \pm \text{mg/g}$ ). Nessa condição, o criogel-AG se comportou como um trocador anfótero, apresentando cargas superficiais positivas e negativas. O criogel-AG apresentou poros interconectados com tamanho variando na faixa de  $6 \mu\text{m}$  a  $75 \mu\text{m}$ , capacidade de intumescimento de  $14,113 \pm 0,867 \text{ g g}^{-1}$  e grau de expansão de  $1,569 \pm 0,058 \text{ ml g}^{-1}$ , boa resistência térmica e mecânica (21 kPa). As isotermas de adsorção foram determinadas a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  variando as proporções de diluição do extrato da folha de OPN e tampão fosfato de sódio ( $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,5) em 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10. Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustados aos dados experimentais apresentaram valores preditos de capacidade máxima de adsorção de  $151,9 \text{ mg g}^{-1}$  a  $1083,6 \text{ mg g}^{-1}$  e  $49,58 \text{ mg g}^{-1}$  a  $108,7 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente. A análise termodinâmica baseada na relação de Van't Hoff indicou que o processo foi espontâneo, entropicamente dirigido. Os resultados mostram que o criogel-AG é uma matriz promissora para uso em processos de captura de proteínas por troca iônica.

**Palavras-chaves:** Troca iônica • Criogel • Isotermas de adsorção • Proteína • Ora-pro-nobis

## Introdução

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de espécies de plantas e, em meio a essa biodiversidade, encontra-se as plantas comestíveis não-convencionais (PANCs) (Queiroz et al. 2015). As PANCs podem ser facilmente encontradas em jardins, quintais, terrenos baldios, além de ser uma alternativa alimentar de qualidade, acessível e com bom custo-benefício (Kinup e Barros, 2007; Romano et al. 2017).

A ora-pro-nobis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) é um exemplo de hortaliça não-convencional. Ademais, é uma planta perene com folhas nutritivas, na qual apresenta um considerável teor de proteínas de alto valor biológico, grandes quantidades de cinzas e, em vista disso, é uma ótima fonte de ferro, cálcio, magnésio e zinco, além de não apresentar toxidade foliar (Sato et al. 2019). Ainda, as folhas da OPN (FOPN) são ricas em mucilagem atóxica, composta por proteínas e arabinogalactanas, que são polímeros presentes na estrutura da goma arábica (Ico et al. 2018; Junior et al. 2013; Souza et al. 2009; Duarte e Hayashi, 2005).

A OPN apresenta uma quantidade significativa de lisina ( $\pm 4,65\%$ ), um aminoácido essencial presente em proteínas de origem animal, que se apresenta em maior quantidade na OPN do que em hortaliças convencionais como o espinafre, por exemplo (Martin et al. 2017; Brasil 2016). Outro aminoácido essencial que se destaca nas FOPN é o triptofano, representando mais de 20% de seus aminoácidos, além de serem também ótimas fontes de fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina e treonina (Botrel et al. 2019).

Nos últimos anos, diversas pesquisas exploraram o potencial de aplicações de proteínas purificadas em vários setores, como no enriquecimento de produtos alimentícios (Sato et al. 2019), produção de filmes e embalagens biodegradáveis (Gu et al. 2019; Zhang, Liu e Rempel, 2018), revestimento e películas comestíveis (Lacroix e Vu 2014), regeneração e reparo de tecidos (Costa, Silva e Boccaccine 2018; Rai et al. 2018), produção de biofármacos (ABD-AZIZ et al. 2020), adesivos e revestimentos biomimétricos (Liu et al. 2016), dentre outros.

Nesse contexto, as proteínas vegetais podem ser usadas para a produção de uma variedade de bioprodutos, além de serem seguras, de baixo custo e de rápida implantação (Arif, Chia e Pauls 2018). Em decorrência de suas propriedades nutricionais e as diversas aplicações biotecnológicas, o estudo de processos adsorptivos das proteínas da OPN abre perspectivas para a geração de produtos plant-based e como nova fonte de proteínas vegetais. Para tanto, técnicas cromatográficas são as mais empregadas para avaliar a captura e separação de proteínas.

A cromatografia de troca iônica é um método amplamente empregado na separação e purificação de aminoácidos, peptídeos e proteínas (Yang et al. 2022; Ebere et al. 2019; Jiao et

al. 2019; Yamamoto et al. 1988). Essa técnica apresenta boa eficiência, alta resolução (Ebere et al. 2019; Cummins et al. 2016) e, ainda, realiza separações sob condições não desnaturantes (Farsang et al. 2020; Goyon et al. 2017; Andersen et al. 2004). Seu princípio envolve a separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial (Bobleter e Bonn, 2011; Amartely et al. 2018).

Nas últimas décadas, nota-se um crescimento no número de pesquisas científicas relacionadas com o desenvolvimento de matrizes cromatográficas para a separação de biomoléculas. Dentre esses materiais, encontram-se os criogeis poliméricos, considerados excelentes matrizes de separação, apresentando uma ampla gama de aplicações em vários processos de biosseparação e possuem habilidades de purificação com alta eficiência (Bakhshpour et al. 2019; Andaç, Galaev e Denizli, 2016; Andrabi et al. 2016; Kutlusoy et al. 2017; Erol et al. 2016; Kose et al. 2016; Neves et al. 2020; Oliveira et al. 2019; Nascimento et al. 2019; Mól et al. 2019; Silva et al. 2019).

Apesar das vantagens relacionadas aos criogeis poliméricos, sua alta porosidade resulta em uma pequena área superficial disponível para adsorção de moléculas, o que leva a uma redução da eficiência do processo de purificação (Kumar et al. 2006; Veríssimo et al. 2017). Por sua vez, podem ser realizadas modificações na matriz do criogel, através da funcionalização, com o intuito de aumentar a eficiência dos processos de separação (Shakya 2022; Memic et al. 2019; Ingavle et al. 2015).

A funcionalização química dos criogeis insere grupos funcionais à sua superfície a fim de melhorar a eficiência durante o processo adsorptivo (Machado et al. 2015). Para tanto, a reatividade de grupos epóxis superficiais oriundos do alil glicidil éter (AGE) pode ser explorada. Por meio da funcionalização via método epóxi tem-se a formação de ligações covalentes com os grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), tiol (SH) e hidroxila (OH) presentes (Vaidya et al. 2008; Oliveira et al. 2019; Bai, Li e Wang, 2006) por exemplo, em aminoácidos e proteínas. Na literatura são relatados trabalhos em que foram utilizados os aminoácidos L-triptofano, L-fenilalanina, fosfo-L-tirosina, L-histidina, lisina, como ligantes para a produção de criogeis de troca iônica, afinidade, interação hidrofóbica (Neves et al. 2020; Oliveira et al. 2020; Mól et al. 2022; Marcuz et al. 2021; Elkak et al. 2017; Çorman 2018).

Além das características físicas, é necessário conhecer o comportamento adsorptivo do criogel produzido. Nos últimos anos, diversos autores estudaram as isotermas de adsorção de criogeis poliméricos em processos de separação de biomoléculas (Lazzari et al. 2018; Erzenin et al. 2022; Bilgin et al. 2018; Yesilova et al. 2018; Dragan et al. 2019; Huseynli et al. 2020).

O estudo das relações de equilíbrio adsorptivo (isotermas de adsorção) é importante para a compreensão do processo de adsorção visando a melhoria geral do sistema (Ayawei et al. 2017). Além disso, as isotermas fornecem parâmetros sobre a capacidade de adsorção de um material adsorvente, informações sobre a interação adsorvente-soluto, meios para encontrar parâmetros termodinâmicos, dentre outros (Piccin et al. 2017). Nesse contexto, em complemento às isotermas de adsorção, os parâmetros termodinâmicos são imprescindíveis para avaliar o potencial do adsorvente. A quantificação da variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^{\circ}_{ads}$ ), entalpia ( $\Delta H^{\circ}_{ads}$ ) e entropia ( $\Delta S^{\circ}_{ads}$ ) de adsorção é usada para obter informações do processo de adsorção (Paiva et al. 2021).

Os objetivos desse estudo foram desenvolver um novo criogel de troca iônica, via método epóxi, avaliando-se diferentes ligantes (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), para a captura das proteínas das folhas da OPN. Otimizar a funcionalização do criogel em função da temperatura e pH do meio, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Caracterizar os criogéis quanto às suas propriedades químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas. Determinar as isotermas de adsorção e testar os modelos de Langmuir e Freundlich ajustados aos dados experimentais.

## **Material e Métodos**

### **Materiais**

Acrilamida (AAm, 98,5%), N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAAm, 99%), alil glicidil éter (AGE, 99%), N, NN', N'-tetrametileno-diamina (TEMED, 98,0%), persulfato de amônio (APS, 98,0%), ligantes (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), 1,6-hexanodiamina e glutaraldeído (50% v/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Fosfato de sódio, hidróxido de sódio, ácido fosfórico 85%, sulfato de amônio, hidróxido de amônio foram adquiridos da Sigma e Dinâmica (São Paulo, BRA). Água deionizada foi utilizada em todos os experimentos. Os demais reagentes são descritos ao longo da metodologia e foram de grau analítico.

### **Preparo do extrato bruto das folhas da OPN**

O extrato bruto das folhas da OPN foi obtido conforme o procedimento adaptado de Lago et al. (2019). As folhas da OPN foram colhidas na cidade de Luz - MG e armazenadas em congelador até a sua utilização. O extrato da OPN foi produzido pela mistura de 200 g de folhas

com 500 mL de água gelada, triturando-as por 10 min usando um liquidificador (Arno Optimix Plus 110V). Posteriormente, a mistura foi filtrada manualmente com uma camada de tecido de organza e, novamente filtrada com três camadas de tecido de organza. Após a filtração, o líquido foi submetido à centrifugação a  $4680 \times g$  por 7 min (SP Labor SP-701, Brasil) e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto para os ensaios de adsorção, o qual foi caracterizado em termos do conteúdo de umidade, cinzas, fibras, gordura, proteína e carboidrato, segundo as normas da *International Association of Official Analytical Chemists* (AOAC 2012).

### **Síntese dos criogeis**

Os criogeis foram produzidos de acordo com a metodologia proposta por Veríssimo et al. (2017). Uma proporção de 9,86% m/v de monômeros (1,185 g AAm, 0,3175 g BAAM e 1 mL de AGE) foi dissolvida em 25 mL de água deionizada até a solubilização completa. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de APS (27,5% m/v) e 23,8  $\mu\text{L}$  de TEMED. A solução foi então vertida em seringas plásticas com volume nominal de 5 mL, vedadas e mantidas em banho ultra-termostático (Nova Ética 521 / 3DE, Brasil) contendo etilenoglicol a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Os criogeis produzidos foram descongelados em temperatura ambiente e lavados com água deionizada. Posteriormente, os adsorventes foram secos em estufa (Tecnal TE-395, Brasil) a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h e armazenados em dessecador até o uso.

### **Funcionalização dos criogeis via método epóxi**

A imobilização dos ligantes de troca iônica (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico) nos criogeis foi realizada explorando a reatividade dos grupos epóxi decorrente do co-monômero alil glicidil éter (AGE) (Wheatley e Schmidt JR 1999; Altintas et al. 2007; Oliveira et al. 2019). Inicialmente, os criogeis puros foram cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 3,0 cm ( $\pm 0,250$  g) e imersos em 50 mL de uma solução tampão de sulfato de amônio 2,75 mol/L (em pH 9,5), contendo 0,5 g do ligante de troca iônica (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 h (Wheatley e Schmidt JR 1999). Em seguida, a solução residual foi removida lavando os criogeis com 1000 mL de água deionizada e, então, as matrizes foram secas a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h e armazenadas em um dessecador até o uso.

### **Caracterização dos criogeis**

Os criogéis produzidos foram submetidos à caracterização em termos de suas propriedades químicas por meio de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier usando a técnica de refletância total atenuada na faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

O conteúdo de grupos epóxi foi determinado pela saturação de uma solução de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  na superfície do criogel e, em seguida, a eluição dos íons adsorvidos ocorreu aplicando uma solução de EDTA. Para a leitura da absorbância do eluído utilizou-se um espectrofotometro a 730 nm, e a quantificação foi feita através da equação 1 (Arvidsson et al. 2003).

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (1)$$

Onde C é a concentração da solução (mol/L), A é a absorbância,  $\varepsilon$  é a absorvidade molar (L/mol.cm) e l é a espessura da cubeta (cm).

A capacidade de troca iônica foi realizada com base na troca de íons  $\text{H}^+$  do HCl pelos íons  $\text{Na}^+$  do NaCl em um sistema fechado. Em seguida, fez-se a titulação com HCl ou NaOH e a quantificação da capacidade de troca catiônica e aniônica foram realizadas através das equações 2 e 3, respectivamente (Fontan et al. 2017).

$$\Lambda_m = \frac{6V_T}{m} \left[ \left( \frac{M_{\text{NaOH}} f V_{\text{NaOH}}}{V} \right)_{\text{amostra}} - \frac{M_{\text{NaOH}} f V_{\text{NaOH}}}{V} \right]_{\text{branco}} \quad (2)$$

$$\Lambda_m = \frac{6V_T}{m} \left[ \left( \frac{M_{\text{HCl}} f V_{\text{HCl}}}{V} \right)_{\text{amostra}} - \frac{M_{\text{HCl}} f V_{\text{HCl}}}{V} \right]_{\text{branco}} \quad (3)$$

Onde  $\Lambda_m$  é a capacidade iônica (mol/kg),  $V_T$  é o volume de NaCl adicionado aos tubos (L), m é a massa de criogel seco (kg),  $M_{\text{NaOH}}$  e  $M_{\text{HCl}}$  são as concentrações de NaOH e HCl usadas na titulação (mol/L), respectivamente, f é o fator de correção das soluções de NaOH e HCl,  $V_{\text{NaOH}}$  e  $V_{\text{HCl}}$  são os volumes de NaOH e HCl usados na titulação (L) e V é o volume da solução titulação com NaOH ou HCl (L).

O ponto de carga zero foi determinado pela variação do pH de soluções aquosas contendo amostras de criogel, por um período de 24 h (Mól et al. 2019). Também foram determinadas suas propriedades morfológicas (frações de macro ( $\varphi_M$ ), meso e microporos ( $\varphi_m$ ) (Plieva et al. 2004), capacidade de inchamento (S) (Savina et al. (2005), grau de expansão (ED) (Gonçalves et al. 2016).

A estrutura do criogel foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As propriedades térmicas foram determinadas por termogravimetria, onde 5 mg de amostra

foram aquecidas de 25 a 750 °C sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min (Neves et al. 2020).

As propriedades mecânicas foram analisadas por ensaios de compressão axial, na qual foi aplicada sobre o criogel hidratado uma carga de 5 kN com velocidade de 0,5 mm/s, onde foi compactado para 60 % da sua altura inicial. O módulo de Young (E) que representa a rigidez do material, foi determinado pela equação 4 (Wang e Yang, 2018).

$$\frac{F}{\pi r^2} = E \frac{\Delta h}{h} \quad (4)$$

Onde E é o módulo de Young (Pa), F é a força máxima aplicada ao criogel (N),  $\pi r^2$  é a área de seção transversal,  $\Delta h$  é a variação na altura (m) e h é a altura inicial do criogel (m).

### **Efeito do pH e do tipo de ligante na adsorção das proteínas das folhas da ora-pro-nobis**

Visando determinar a melhor condição de pH (2,5; 5,5 e 8,5) e do tipo de ligante de troca iônica (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico) para adsorção das proteínas das folhas da OPN, foi empregado um delineamento fatorial  $3 \times 4$ , para avaliar a capacidade adsorptiva dos criogeis. Para isso, ensaios de adsorção das proteínas da OPN foram realizados em batelada, usando tubos de centrifugação de 15 mL onde foi adicionado 0,02 g do criogel e 2,5 mL de solução salina de fosfato de sódio 0,025 mol/L em diferentes valores de pH (2,5; 5,5 e 8,5), durante 30 minutos, para equilibrar o adsorvente. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL do extrato de OPN (99% de umidade; base seca: 1,32% de extrato etéreo, 24% de proteína, 18,6% de cinzas, 0,3% de fibras e 56% de carboidrato) em pH (2,5; 5,5 ou 8,5). O pH da solução contendo as proteínas da OPN foi ajustado com ácido fosfórico ou NaOH e conferido em pHmetro. Os ensaios de adsorção foram realizados em temperatura ambiente ( $25 \text{ °C} \pm 1,5 \text{ °C}$ ), sob agitação de 30 rpm por 24 h em Banho Dubnoff Microprocessado (QUIMIS - Q226M2). Posteriormente, os tubos foram centrifugados em uma Centrífuga Excelsa II (FANEM, SP - BRA) a  $3000 \times g$  por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação do teor de proteínas. Todos os ensaios de adsorção foram realizados em quadruplicata.

A capacidade adsorptiva ( $q$ , mg/g) dos criogeis de troca iônica foram determinadas de acordo com a Equação 5. A quantificação das proteínas na solução inicial e nos sobrenadantes foi mensurada pelo método de Bradford (1976), através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Nova 200 UV, Brasil) em 595 nm. Uma curva analítica foi construída usando solução de albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão, com concentrações variando de 0,05 mg/mL a 1 mg/mL.

$$q = \frac{(c_0 - c) \times V}{m} \quad (5)$$

onde  $q$  é a quantidade de proteína da OPN adsorvida no criogel (mg/g);  $c_0$  e  $c$  são, respectivamente, as concentrações iniciais e finais das proteínas em solução (mg/mL);  $m$  é a massa de criogel seco (g) e  $V$  é o volume de solução de proteínas (mL).

Os ensaios foram conduzidos no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 95% de significância. O pacote estatístico SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi usado nas análises estatísticas.

### **Otimização da funcionalização dos criogéis de troca iônica via método epóxi**

Após os ensaios de adsorção das proteínas da OPN utilizando os ligantes de troca iônica foi selecionado o que apresentou melhor resultado para prosseguir com os procedimentos de otimização. Nestes procedimentos foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$ , contendo 4 pontos centrais e 4 axiais, visando otimizar o método de imobilização do ligante de troca iônica ácido glutâmico na superfície dos criogéis e aumentar sua capacidade adsorviva. No delineamento, variou-se a temperatura de 29 °C a 71 °C e o tempo de contato do ligante com o adsorvente variou de 17 h a 39 h. Como variável resposta deste delineamento, foi selecionado a quantidade de proteína da OPN que o criogel de troca iônica adsorveu ( $q$ , mg/g).

Os resultados obtidos a partir do DCCR foram submetidos à análise de regressão ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SAS<sup>®</sup> University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A confiabilidade do modelo matemático obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo ( $p > 0,05$ ), o coeficiente de determinação  $R^2$  e o nível de significância ( $p < 0,05$ ) dos coeficientes da regressão. As superfícies de resposta foram geradas no software SigmaPlot versão 12 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

### **Isotermas de adsorção e análises termodinâmicas**

Para obtenção das isotermas de adsorção, foram empregadas diferentes proporções de extrato de OPN: solução salina de fosfato de sódio (0,025 mol/L, pH 5,5) (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10). As isotermas foram determinadas nas temperaturas (8 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C) e os ensaios de adsorção foram realizados em batelada. Para isso, foram utilizados tubos de centrifugação de 15 mL onde foram adicionados 0,02 g do criogel e as respectivas quantidades



de solução de fosfato de sódio, durante 30 minutos, para equilibrar o adsorvente. Em seguida, foram adicionadas as respectivas quantidades de extrato das folhas de OPN em pH 5,5. O pH da solução contendo as proteínas da OPN foi ajustado com ácido fosfórico ou NaOH e conferido em pHmetro. Os ensaios de adsorção foram realizados sob agitação de 30 rpm por 24 h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (Centrífuga Excelsa II FANEM, SP – Brasil) a  $3000 \times g$  por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação do teor de proteínas. Todos os ensaios de adsorção foram realizados em triplicata. A capacidade adsortiva ( $q$ , mg/g) dos criogeis foram determinadas de acordo com a Equação 1. A determinação dos parâmetros do modelo de Langmuir ( $q_{\max}$  e  $k_L$ ), e Freundlich ( $k_F$  e  $n$ ), foram estimados por meio de linearização das isotermas de adsorção, utilizando-se o *software* Microsoft Excel.

## Resultados e Discussão

### Síntese dos criogeis

Os criogeis sintetizados apresentaram estrutura uniforme, esponjosa e rígida, de formato cilíndrico e coloração esbranquiçada, como mostra a Figura 1. Além disso, foi observado que ao serem hidratadas, as matrizes poliméricas exibiram alta porosidade, e, após serem secas e reidratadas, mantiveram suas características estruturais.



**Fig. 1** Criogeis poliméricos

### Efeito do pH e do tipo de ligante na adsorção das proteínas da OPN

As condições de adsorção das proteínas das folhas da OPN foram avaliadas em função do tipo de ligante de troca iônica e pH. Os resultados médios para a capacidade adsortiva ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dos criogeis de troca iônica são mostrados na Tabela 1. Os resultados médios para a variável resposta  $q$  foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** Resultado do Delineamento Inteiramente Casualizado da capacidade adsortiva ( $q$ ) dos criogeis de troca iônica (taurina, polietilenoimina, cisteína e ácido glutâmico) sobre as proteínas da OPN. [Tampão fosfato de sódio, 0,025 mol L<sup>-1</sup>; pH 8,5, 5,5 e 2,5, a 25 °C].

Ligantes	$q$ (mg g <sup>-1</sup> )			pKa
	pH			
	2,5	5,5	8,5	
Taurina	42,796 ± 3,398 <sup>bcd</sup>	42,701 ± 3,892 <sup>bcd</sup>	34,217 ± 2,774 <sup>de</sup>	SO <sub>3</sub> H = 1,5 NH <sub>2</sub> = 9,08
Polietilenoimina	39,061 ± 2,598 <sup>cd</sup>	45,718 ± 2,671 <sup>bc</sup>	38,878 ± 3,214 <sup>cd</sup>	NH <sub>2</sub> = 9,06 COOH = 1,71
Cisteína	38,985 ± 3,131 <sup>cd</sup>	51,970 ± 2,977 <sup>b</sup>	27,426 ± 2,445 <sup>e</sup>	SH = 8,33 NH <sub>2</sub> = 10,78 $\alpha$ -COOH = 2,19
Ácido glutâmico	46,086 ± 5,721 <sup>bc</sup>	54,435 ± 3,227 <sup>a</sup>	33,744 ± 3,386 <sup>de</sup>	$\gamma$ -COOH = 4,25 NH <sub>2</sub> = 9,67

\*Os valores médios seguidos de mesma letra para cada tipo ligante indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se que para todos os tratamentos utilizando o fosfato de sódio (0,025 mol L<sup>-1</sup>) em pH 5,5, os criogeis apresentaram melhor capacidade adsortiva, sendo o ácido glutâmico o ligante que apresentou maior valor de  $q$  (54,435 ± 3,227 mg g<sup>-1</sup>).

Todos os aminoácidos estudados contêm o grupo amino (NH<sub>2</sub>) em sua estrutura e somente os aminoácidos cisteína e ácido glutâmico contêm o grupo carboxílico (COOH). Segundo Hoffman e Gobran (1973), os ácidos carboxílicos são capazes de se ligar em grupos epóxi através de reações de esterificação, seguida de eterificação, esterificação e hidrólise. Diante disso, é possível presumir que além dos grupos NH<sub>2</sub>, os grupos COOH também se ligaram aos grupos epóxi. Visto que a cisteína e o ácido glutâmico apresentaram resultados de capacidade adsortiva próximos, pode-se afirmar que as ligações entre os grupos carboxílicos e os grupos epóxi aumentaram a eficiência e a densidade de sítios de adsorção do criogel.

Em pH 2,5 todos os criogeis estavam carregados com mais cargas positivas, visto que o pH do meio é menor que os valores de pKa dos grupos residuais da maioria dos ligantes testados (Tabela 1). Assim, as cargas superficiais positivas do adsorvente são neutralizadas por ânions em solução. De acordo com Morais et al. (2019), as proteínas do extrato da OPN apresentam ponto isoelétrico (pI) em torno de 1,7. Sendo assim, as proteínas estavam carregadas negativamente para todos os ligantes testados. Portanto, as proteínas da OPN carregadas negativamente deslocaram os ânions que estabilizavam a matriz e, dessa forma, foram adsorvidas nos criogeis por troca aniônica.

Já em pH 5,5, o criogel comportou-se como um trocador anfótero, por apresentar cargas superficiais positivas e negativas, visto que esse pH estava entre os valores de pKa dos grupos residuais da maioria dos ligantes testados. Nessa condição, houve uma maior adsorção das proteínas da OPN para todos os ligantes, como pode ser visto na Tabela 1. Por outro lado, em pH 8,5, o criogel estava carregado com mais cargas negativas, visto que o pH do meio é maior que os valores de pKa dos grupos residuais da maioria dos ligantes. Nessa condição, as cargas superficiais negativas da matriz são neutralizadas pelos cátions em solução. Foi observado uma baixa adsorção das proteínas das FOPN, uma vez que essas estão carregadas negativamente e não deslocarão os cátions que estabilizam a matriz, além de apresentarem repulsão eletrostática com o criogel carregado negativamente (Gerberding e Byers, 1998; Mól et al. 2019, Healthcare, 2016). Nesse contexto, a adsorção das proteínas no adsorvente pode ter ocorrido devido às interações com as cargas positivas dispersas na superfície da matriz, além também da contribuição das interações hidrofóbicas (Oncel et al. 2005; Yilmaz et al. 2009).

Por apresentar os maiores resultados de capacidade adsortiva, os criogéis funcionalizados com ácido glutâmico foram selecionados para a otimização do protocolo de imobilização do ligante via método epóxi.

### Otimização da funcionalização dos criogéis de troca iônica via método epóxi

Os resultados do DCCR para a capacidade adsortiva ( $q$ ) dos criogéis funcionalizados com ácido glutâmico são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional para a capacidade adsortiva ( $q$ ) dos criogéis de troca iônica (ácido glutâmico) sobre as proteínas das FOPN. [Condições de adsorção = Tampão fosfato de sódio = 0,025 mol L<sup>-1</sup>; pH 5,5 a 25 °C].

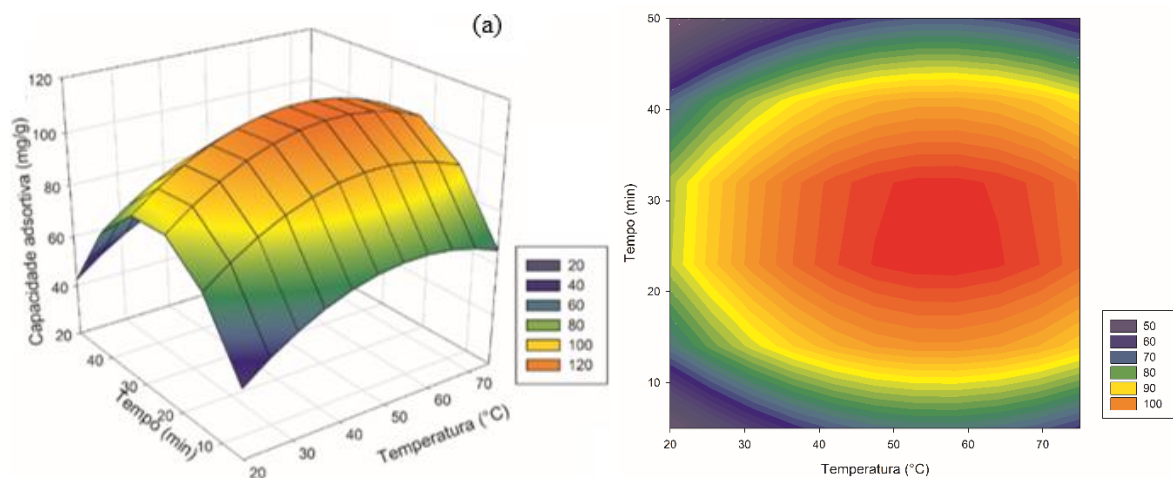
Tratamento	X1 - (Temperatura - °C)	X2 - (Tempo - h)	Capacidade adsortiva (mg/g)
1	-1 (35)	-1 (20)	96,136 ± 3,227
2	1 (65)	-1 (20)	89,323 ± 1,224
3	-1 (35)	1 (36)	99,407 ± 2,994
4	1 (65)	1 (36)	88,859 ± 3,320
5	-1,41 (28,79)	0 (28)	93,259 ± 5,751
6	1,41 (71,21)	0 (28)	91,165 ± 1,444
7	0 (50)	-1,41 (16,69)	92,586 ± 3,065
8	0 (50)	1,41 (39,31)	94,199 ± 3,465
9	0 (50)	0 (28)	105,365 ± 5,347

10	0 (50)	0 (28)	103,426 ± 1,412
11	0 (50)	0 (28)	102,680 ± 6,450
12	0 (50)	0 (28)	102,008 ± 5,199

Os resultados obtidos no DCCR foram submetidos à análise de regressão e o modelo matemático obtido é apresentado na Equação 6. Os termos lineares e quadráticos das variáveis tempo ( $t$ ) e temperatura ( $T$ ) foram significativos ( $p < 0,05$ ), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,902, a raiz quadrada do erro médio foi 2,2851 e a falta de ajuste do modelo foi não significativa ( $p > 0,05$ ).

$$q = -9,839 + 2,240T + 4,309t - 0,024T^2 - 0,076t^2 \quad (6)$$

A Figura 2a e b representam, respectivamente, a superfície de resposta e curva de contorno para a capacidade adsorptiva dos criogéis em função do tempo e temperatura. Por meio da Figura 2 é possível identificar as condições ótimas para a imobilização do ligante de troca iônica, ácido glutâmico, na superfície do criogel, uma vez que a variável resposta capacidade adsorptiva foi maximizada nos intervalos de tempos de 22 h a 32 h e temperatura entre 50 °C e 62 °C.



**Fig. 2** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para capacidade adsorptiva.

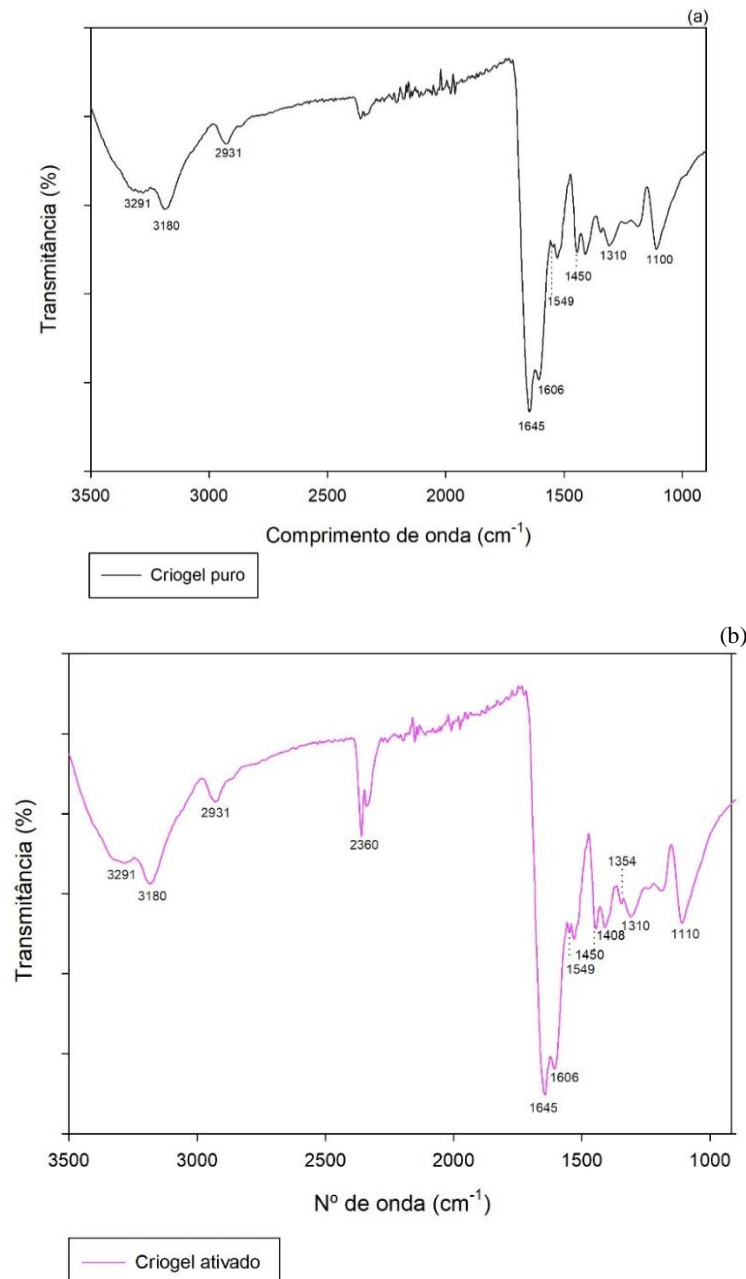
A condição experimental ótima para a funcionalização dos criogéis com ácido glutâmico (criogel-AG) foi obtida à temperatura de 50 °C e tempo de contato da solução de ligante com o adsorvente de 28 h. Nessa condição, a média dos valores de capacidade adsorptiva obtidos foi de  $q = 103,369 \text{ mg/g} \pm 4,602 \text{ mg/g}$ .

Nas etapas subsequentes, os criogéis de troca iônica imobilizados de ácido glutâmico foram sintetizados nessa condição e foram caracterizados quanto as suas propriedades

químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas e também foram utilizados nos ensaios de isotermas de adsorção das proteínas da OPN.

### Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram realizados para determinar os grupos funcionais presentes nos criogéis puro e criogel-AG. Os resultados são apresentados na Figura 3.



**Fig. 3** Espectro de FTIR do criogel puro (a) e do criogel-AG (b).

A forte banda em  $2360 \text{ cm}^{-1}$  observada no espectro do criogel-AG (Fig. 3b) está relacionada com grupos de aminoácidos ( $-\text{NH}$ ) (Eskander, Ezz El Arab e Abdel-Gawad, 2018; Guesmi et al. 2020; Andrade et al. 2020), também está associada ao alongamento e deformação

de grupos C–H e C–N (Schwanninger et al., 2011; Salas-Valerio et al. 2022; Bharathi e Santhi, 2019), e absorção da ligação CH em CH<sub>3</sub> (Yang et al. 2019). Aminoácidos apresentam estiramento NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, dobramento NH (assimétrico/simétrico) e estiramento COO<sup>-</sup> (assimétrico/simétrico) (Pavia et al. 2010). De acordo com Kumar et al. (2015) uma banda de estiramento ampla e forte (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) na região 3410-2360 cm<sup>-1</sup> foi observada também para o ligante β-alanina. De acordo com as Figuras 3a e b, em ambos os espectros são observadas bandas em 1645 cm<sup>-1</sup> característica do grupo amida (N–C=O) formado na união dos monômeros AAm e MBAAm durante a síntese do criogel (Perçin et al. 2015; Silva et al. 2019; Oliveira et al. 2019; Gonçalves et al. 2016; Mourão et al. 2019). Uma pequena banda em 1549 cm<sup>-1</sup> foi observada em ambos os espectros (Figuras 3a e b) e está associada às vibrações da banda amida II (Kristoffersen et al. 2019; Pavia et al. 2010). O espectro do criogel-AG (Figura 3b) exibiu uma pequena banda em 1354 cm<sup>-1</sup> atribuída a grupos amina proveniente da ligação covalente entre o grupo amina do ácido glutâmico e o grupo epóxi livre na superfície do criogel (Mallik e Hage 2006; Ingavle et al., 2015). As bandas observadas em 1110 e 1310 cm<sup>-1</sup> são atribuídas ao alongamento da ligação de (C–O) característico de ésteres, devido a presença do epóxi livre na superfície do criogel, além de estiramento de (C–N) característico de aminas (Boström et al, 2005; Mól et al. 2019; Jing et al. 2019; Pavia et al. 2010). As bandas observadas em 3180 e 3291 cm<sup>-1</sup> para ambos os criogeis indicam alongamento de grupos amidas (–NH) presentes no gel de poliácridamida (Conceição et al. 2014; Mól et al. 2019; Pavia et al. 2010). Também foram observadas bandas em 2931 e 1450 cm<sup>-1</sup> que estão relacionadas às vibrações de estiramento de grupos alifáticos (–CH) (Perçin et al. 2015; Niekerk et al. 2008). A banda em 1408 cm<sup>-1</sup> observada no criogel-AG pode indicar a presença de COO<sup>-</sup> oriundo do ácido carboxílico do ácido glutâmico (Lee et al. 2019; Sharma et al. 2019), sugerindo a imobilização do ligante no criogel.

### **Determinação do conteúdo de grupos epóxis presentes nos criogeis**

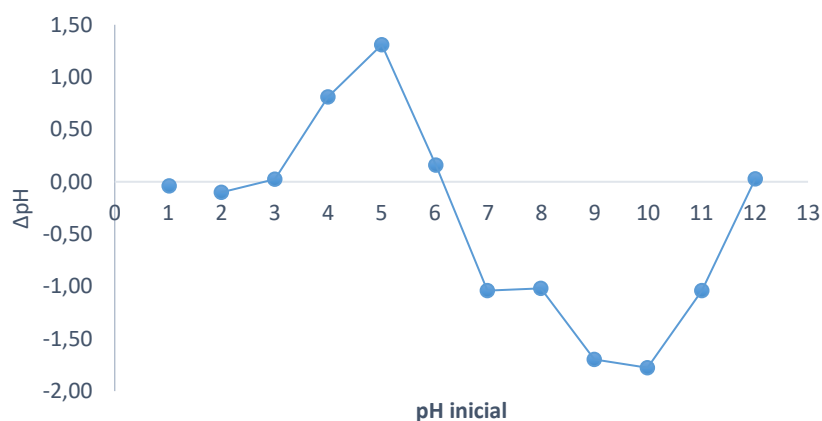
Os criogeis sintetizados contêm o co-monômero AGE em sua formulação e, com isso, sua superfície possui grupamentos epóxi capazes de imobilizar ligantes via ligação covalente. O resultado da determinação da densidade de grupos epóxi foi de 1133,3 ± 153 μmol g<sup>-1</sup>. Outros trabalhos apresentaram resultados inferiores sendo 770 μmol/g (Bibi et al. 2013), 1,84 μmol/g (Bayramoglu e Arica, 2020), 25 μmol/g (Sun et al. 2020), 745 μmol/g e 1050 μmol/g (Arvidsson et al. 2003).

### Determinação da capacidade iônica total ( $\Delta$ ) dos criogéis de troca iônica

A capacidade iônica representa o número de sítios disponíveis para adsorção. Verificou-se que o criogel-AG produzido apresentou uma maior capacidade catiônica (0,513 mmol/g) do que aniônica (0,110 mmol/g). Os valores obtidos foram superiores aos relatados por Mól et al. (2019), que obteve resultados de capacidade catiônica de 0,329 mmol/g e aniônica de 0,06 mmol/g para criogéis ativados com 2-(dimetilamino)etil metacrilamida (DMAEMA) e inferiores ao relatado por Fontan et al. (2018), que obteve capacidade catiônica de 0,666 mmol/g para criogéis funcionalizados com ácido 2- acrilamido2- metil-1-propanosulfônico (AMPSA).

### Determinação do ponto de carga zero (PCZ) dos criogéis de troca iônica

De acordo com a Fig. 4, verificou-se que os resultados obtidos para o PCZ, foram 3,0 e 6,15, o que sugere que tanto os grupos  $\text{COO}^-$  quanto os grupos  $\text{NH}_2$  do ácido glutâmico, podem ter se ligado aos grupos epóxi do criogel, pois caso ocorressem somente as ligações entre o grupo epóxi e o grupo  $\text{NH}_2$ , eram esperados que os valores de PCZ fossem todos abaixo de 4,25, que corresponde ao pKa do grupo radical R do ácido glutâmico. De fato, segundo Hoffman e Gobran, 1973, os ácidos carboxílicos são capazes de se ligar em grupos epóxi através de reações de esterificação, seguida de eterificação, esterificação e hidrólise, como é observado na produção de elastômeros reticulados. Neste caso, quando os grupos carboxila do ácido glutâmico se ligam aos grupos epóxi dos criogéis, os grupos amino permanecem livres, o que contribui para o aumento do PCZ da matriz.



**Fig. 4** Determinação do ponto de carga zero do criogel-AG.  $\Delta\text{pH}$  é a diferença entre o pH final da solução aquosa após 24 h e o pH inicial dessa mesma solução aquosa.

### Caracterização morfológica

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para as propriedades morfológicas do criogel puro e criogel-AG. As propriedades entre os criogéis puros e funcionalizados não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, indicando que a imobilização do ácido glutâmico na superfície do criogel não promoveu modificações em sua estrutura. Os resultados para a capacidade de inchamento ( $S$ ) encontrado está dentro dos intervalos relatados para criogéis de poli(acrilamida em outros trabalhos (Paiva et al. 2021; Neves et al. 2020; Yavaser e Karagozler, 2021). Se um elevado grau de expansão demonstra que uma pequena massa de criogel ocupa um grande volume quando o mesmo é hidratado (Gonçalves et al. 2016; Fontan et al. 2017; Oliveira et al. 2020; da Silva et al. 2019), o baixo grau de expansão obtido para o criogel-AG demonstrou que uma pequena massa de criogel ocupou um pequeno volume quando o mesmo foi hidratado, reforçando que as matrizes eram compostas, majoritariamente, por microporos. Os valores encontrados para ambos os criogéis em termos de fração de macro, meso e microporos e porosidade total foi de 24%, 68% e 92%, respectivamente, expressando a igualdade entre eles. A fração de polímero seco encontrada ao hidratar a matriz foi de 6,8%, demonstrando a elevada capacidade que o criogel-AG tem de armazenar água (Gonçalves et al. 2016). Os valores encontrados, exceto para o grau de expansão, foram semelhantes aos observados por outros autores (Veríssimo et al. 2017; Neves et al. 2020; Gonçalves et al. 2017).

**Tabela 3** Caracterização morfológica do criogel puro e criogel-AG

Parâmetros	Criogel puro	Criogel-AG
Capacidade de inchamento ( $S$ )	$13,992 \pm 1,348^a$	$14,113 \pm 0,867^a$
Grau de expansão (ED) (ml/g)	$1,611 \pm 0,198^a$	$1,569 \pm 0,058^a$
Água ligada ( $\varphi_{wb}$ )	$0,146 \pm 0,006^a$	$0,157 \pm 0,015^a$
Polímero seco ( $\varphi_d$ )	$0,068 \pm 0,006^a$	$0,066 \pm 0,004^a$
Macroporos ( $\varphi_M$ )	$0,247 \pm 0,078^a$	$0,243 \pm 0,013^a$
Meso e microporos ( $\varphi_m$ )	$0,674 \pm 0,076^a$	$0,680 \pm 0,010^a$
Porosidade total ( $\varphi_T$ )	$0,922 \pm 0,007^a$	$0,923 \pm 0,004^a$

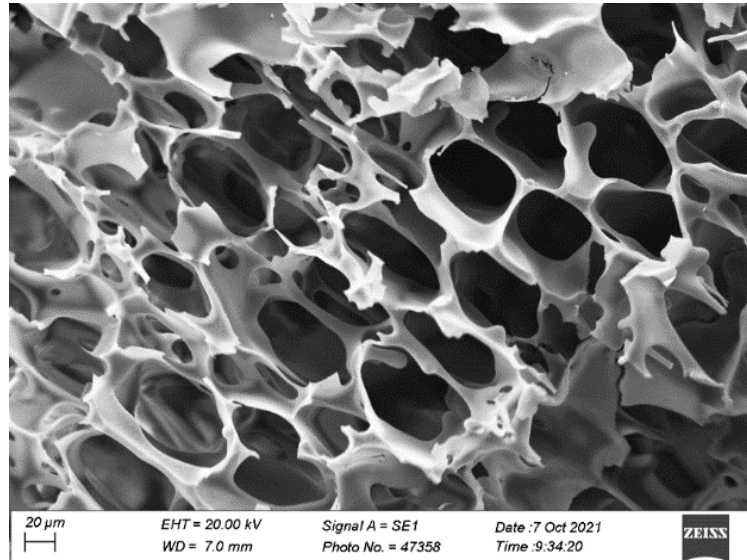
\*Valores médios com a mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Fig. 5 é apresentada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregada para caracterização morfológica dos criogéis produzidos. Foi observado na estrutura do criogel-AG uma alta porosidade com poros interligados com diâmetro variando de 6  $\mu\text{m}$  a 72  $\mu\text{m}$ . Nota-se que a funcionalização do criogel com ácido glutâmico não alterou sua característica porosa, viabilizando sua aplicabilidade na purificação de extratos brutos,



particulados e viscosos, bem como reduzir etapas de preparo de amostras (Andaç, Galaev e Denizli 2016; Silva et al. 2019). O criogel-AG apresentou estrutura homogênea alcançando resultados semelhantes aos obtidos por outros autores (Gonçalves et al. 2017; Oliveira et al. 2019; Neves et al. 2020).

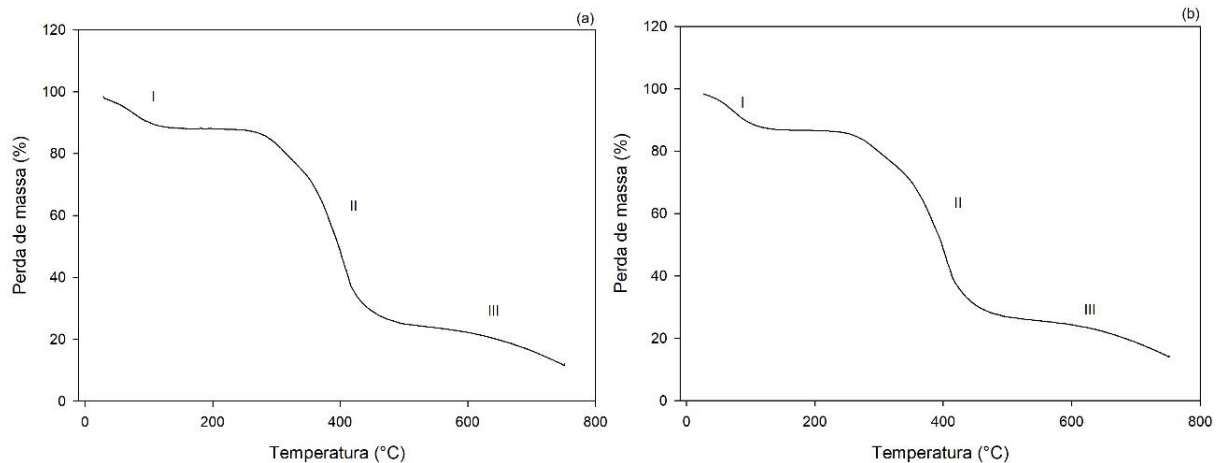


**Fig. 5** Micrografia do criogel-AG (magnitude de 500 x).

### Caracterização térmica

As curvas TGA do criogel puro e do criogel-AG são mostradas na Fig. 6a e b. Três eventos térmicos podem ser observados. No primeiro evento térmico (I), ocorreu uma perda mássica de 9,5% e 10,9% para o criogel puro e criogel-AG, que foi atribuída à evaporação da água absorvida pelas matrizes. A estrutura de ambas as matrizes estabilizaram-se termicamente a aproximadamente 200 °C. No segundo evento térmico (II), a degradação térmica do criogel puro e do criogel-AG começou a 250°C e 279°C, respectivamente, com uma perda acentuada de massa de 62,1% para o criogel puro e 59,64% para o criogel-AG, que estão relacionadas à liberação de NH<sub>3</sub> por imidização entre grupos amida, bem como a evaporação de água por desidratação da poliacrilamida, nos quais ocorrem entre 220 °C e 340 °C, além da quebra da cadeia principal de poliacrilamida que ocorre em temperatura superior a 340 °C (Dyke e Kasperski, 1993). Ademais, as perdas em torno de 200 °C também são atribuídas a degradação do ácido glutâmico (Nunes e Cavalheiro, 2007; Nunes, 2009). No terceiro evento térmico (III), houve uma perda lenta de massa, resultando em uma massa residual de 13,4% com degradação total de 87% para o criogel puro e uma massa residual de 13,4% com degradação total de 85% para o criogel-AG. Como foi aplicada atmosfera de nitrogênio inerte durante as análises, não ocorreu a degradação completa dos materiais. A maior perda foi observada no segundo estágio

de degradação (II), que ocorreu entre 250 e 488°C para o criogel puro e entre 279 e 485°C para o criogel-AG. Dessa forma, a menor perda de massa para o criogel-AG foi atribuída ao aumento da resistência térmica do material causado pelo processo de funcionalização. Outros trabalhos também apresentaram resultados semelhantes, onde os criogéis funcionalizados obtiveram maior resistência à degradação térmica (Neves et al. 2020b; Aslanli et al. 2019; Gök e Inal 2022).



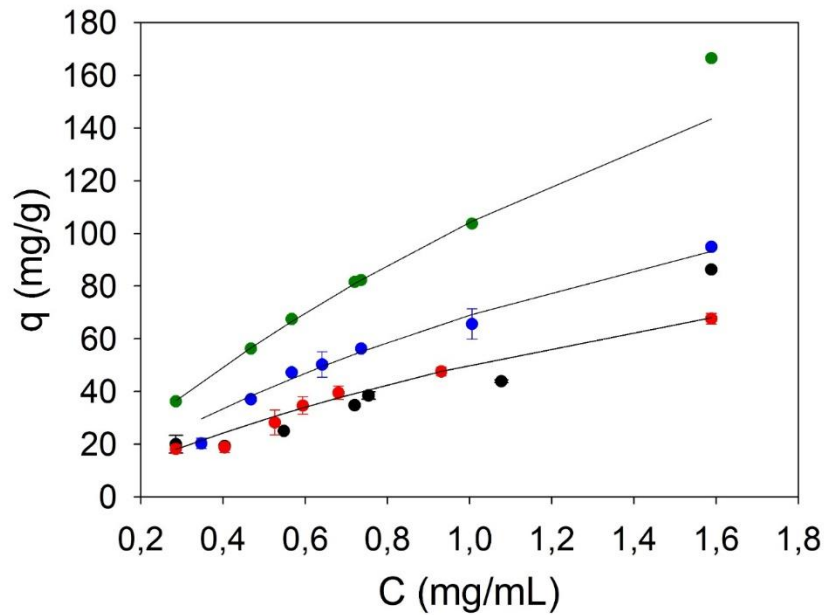
**Fig. 6** Curvas de TGA: (a) criogel puro e (b) criogel-AG

### Caracterização mecânica

A caracterização mecânica dos criogéis foi realizada exercendo a compressão uniaxial sobre a matriz e a força máxima foi obtida para o cálculo do módulo de Young. O criogel puro e o criogel-AG, ambos hidratados, apresentaram módulos de Young de  $21,1 \pm 1,42$  kPa e  $21 \pm 1$  kPa, respectivamente. Observa-se que o processo de funcionalização não alterou sua resistência estrutural. O resultado obtido foi superior ao reportado por Fu et al. (2021), em criogéis de quitosana hidratados (10,59 kPa, 9,29 kPa e 2,81 kPa) e aos relatados por Goppert et al. (2016) e Madaghie et al. (2018), em criogéis de polietilenoglicol hidratados (13,1 kPa e 12,2 kPa) e (10 kPa), respectivamente.

### Isotermas de adsorção e análise termodinâmica

Na Figura 7 são apresentadas as isotermas de adsorção das proteínas das folhas da OPN no criogel-AG nas temperaturas de 8 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C, usando o modelo de Langmuir.



**Fig. 7** Isothermas de adsorção das proteínas das FOPN no criogel-AG usando o modelo de Langmuir. [Tampão fosfato de sódio (0,025 mol / L), em pH 5,5, nas temperaturas de 8 °C (bolinha preta), 15 °C (bolinha vermelha), 25 °C (bolinha azul) e 35 °C (bolinha verde)].

As Tabelas 4 e 5 apresentam os parâmetros ajustados do modelo de Langmuir e Freundlich, respectivamente.

**Tabela 4** Parâmetros do modelo de Langmuir para a adsorção das proteínas das FOPN

Temperatura (°C)	$q_{\max}$ (mg/g)	$K_L$ (mL/mg)	$R^2$
15	172,4	0,41	0,92
25	232,5	0,42	0,92
35	400,0	0,35	0,98

**Tabela 5** Parâmetros do modelo de Freundlich para a adsorção das proteínas das FOPN

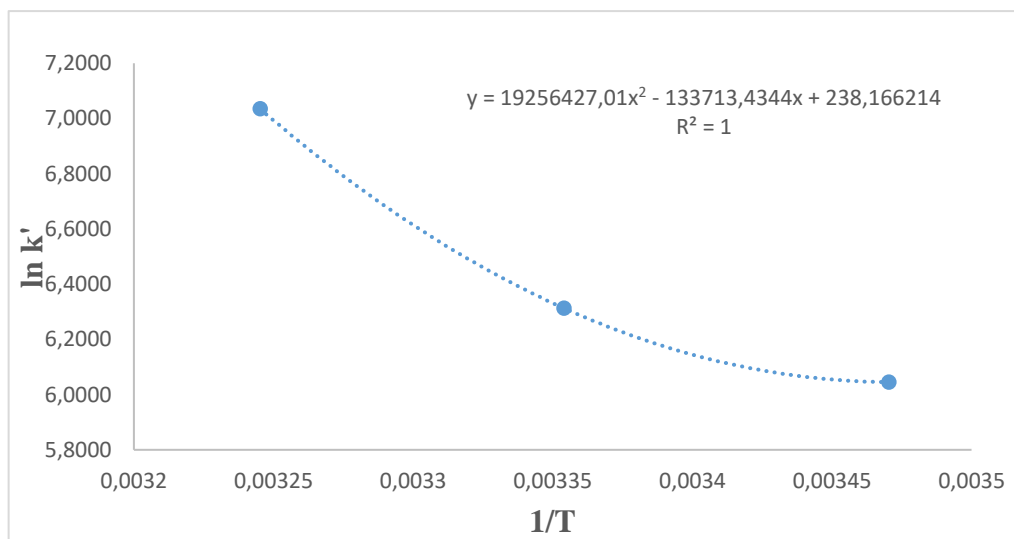
Temperatura (°C)	$K_f$ (mL/mg)	N	$R^2$
8	49,5841	1,0805	0,99
15	48,4382	0,7722	0,99
25	67,0110	0,7820	0,99
35	108,289	1,1490	0,99

Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustaram-se aos dados experimentais em toda a faixa de concentração para as temperaturas de 15 °C, 25 °C e 35 °C e, somente o modelo de Freundlich ajustou-se a temperatura de 8°C. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o modelo de Langmuir nas temperaturas de 15 °C, 25 °C e 35 °C foi de 0,92, 0,92 e 0,98 respectivamente,

e para o modelo de Freundlich foi de 0,99 para todas as temperaturas. Ao analisar os parâmetros obtidos, observou-se que a capacidade máxima de adsorção ( $q_{\max}$ ) aumenta com o aumento da temperatura e os valores da constante de adsorção de Langmuir ( $K_L$ ) está entre 0 e 1. Esse comportamento indica que a temperatura favoreceu o processo de adsorção. Outros autores apresentaram resultados semelhantes (Mól et al. 2017; Carvalho et al. 2016; Sousa et al. 2014).

Em geral, para o modelo de Freundlich, uma adsorção favorável tende a ter um valor de  $n$  entre 1 e 10. Quanto maior o valor de  $n$  (menor será o valor de  $1/n$ ) e mais forte será a interação entre a molécula de interesse e o adsorvente. Por outro lado, quanto menor o valor de  $n$  (maior será o valor de  $1/n$ ) e mais fraca será a interação do mesmo. Ainda, quando  $1/n$  for igual a 1, indica que a adsorção é linear e as energias são idênticas para todos os sítios de adsorção (Melo et al. 2020). Portanto, de acordo com os resultados obtidos mostrado na Tabela 5, somente as temperaturas de 8 °C e 35 °C apresentaram valores de  $n$  acima de 1, sendo 1,0805 e 1,1490, respectivamente. As demais temperaturas obtiveram valores abaixo de 1, concluindo que, de acordo com este modelo, o processo de adsorção não foi favorável nas condições estudadas.

A partir do ajuste do modelo de Langmuir, realizou-se uma análise de Van't Hoff, onde os valores de  $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$  e  $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$  foram calculados a partir da inclinação e interceptação do gráfico linear de  $\ln k'$  versus  $1/T$ , como mostrado na Fig. 8, e a variação das propriedades termodinâmicas é apresentada na Tabela 6.



**Fig. 8** Gráfico de Van't Hoff –  $\ln k'$  versus  $1/T$

**Tabela 6** Valores dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$ ,  $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$  e  $\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$ 

Temperatura (K)	$\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$ (kJ/mol)	$\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$ (kJ/mol/k)	$\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$ (kJ/mol)	T. $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$ (kJ/mol)
288,15	0,481	0,052	-14,483	14,964
298,15	37,754	0,179	-15,650	53,403
308,15	72,607	0,294	-18,025	90,632

Os valores de  $\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$  foram cada vez mais negativos com o aumento da temperatura, indicando a viabilidade e espontaneidade do processo de adsorção, e esta espontaneidade tende a ser mais acentuada em temperaturas mais elevadas (Mól et al. 2017; Mahdavinia et al. 2018; Sahmoune et al. 2019).

Os valores positivos das  $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$  mostraram uma natureza endotérmica do processo de adsorção apresentando alta dependência com a temperatura, visto que houve um aumento no seu valor com o aumento da temperatura (Sousa et al. 2014). Dessa forma, considerando que os valores das  $\Delta H^{\circ}$  foram menores que os valores dos termos T.  $\Delta S^{\circ}$  para todas as temperaturas estudadas, pode-se afirmar que a adsorção foi regida pela entropia. Ainda, os valores das  $\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$  nas temperaturas de 15 °C e 25°C foram menores que 10 kcal mol<sup>-1</sup> (40 kJ mol<sup>-1</sup>), indicando que o processo de adsorção é de natureza física (fisissorção), que ocorre quando forças intermoleculares de atração das moléculas na fase fluida e da superfície adsorvente são maiores do que as forças atrativas entre as moléculas do próprio fluido. Esse tipo de adsorção é rápida e reversível decorrendo da ação de forças de atração intermoleculares fracas entre o adsorvente e as moléculas adsorvidas (Nascimento et al. 2020; Araújo et al. 2009).

Já a  $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$ , está relacionada às variações de ordem/desordem de um sistema. Quanto menos ordenado for o sistema, maior será sua entropia (Sahmoune 2019). Uma pequena desordem na interface sólido/líquido pode ter ocorrido devido à uma possível formação de um complexo ativado entre as proteínas das FOPN e o criogel (Bayramoglu e Arica 2021). Isso significa que as espécies reagentes formaram o estado de transição durante a reação, tendo assim um estado mais ordenado do que os reagentes na estrutura do estado fundamental (Zainol et al. 2019). No entanto, a  $\Delta S^{\circ}_{\text{ads}}$  tende a aumentar com o aumento da temperatura. Esse fornecimento de energia ao sistema promove o rompimento das interações das moléculas presentes, aumentando a desordem e contribuindo com o número de possibilidades de novas ligações, favorecendo o processo adsortivo.

## Conclusão

Foram desenvolvidos criogéis funcionalizados com diferentes ligantes de troca iônica (cisteína, taurina, polietilenoimina e ácido glutâmico), para separação de proteínas das folhas da ora-pro-nobis. Dentre os ligantes estudados, o criogel funcionalizado com ácido glutâmico (criogel-AG) apresentou melhores resultados de capacidade adsortiva ( $q$ ). Nesse contexto, o criogel-AG apresentou estrutura porosa e interconectada, bem como alta resistência térmica e mecânica. Dentre os valores de pH estudados, o pH 5,5 apresentou melhores resultados de  $q$ , onde o criogel-AG comportou-se como um trocador anfótero, apresentando cargas superficiais positivas e negativas e, nessa condição, houve uma maior adsorção das PFOPN.

Os modelos de Langmuir e Freundlich ajustaram-se aos dados experimentais em toda a faixa de concentração para as temperaturas de 15 °C, 25 °C e 35°C e ambos apresentaram  $R^2$  acima de 0,90. A adsorção das PFOPN no criogel-AG apresentou uma dependência da temperatura, mostrando que temperaturas mais altas favorecem a capacidade máxima de adsorção. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que os processos de adsorção foram espontâneos, uma vez que os valores da energia livre de Gibbs foram negativos e conduzidos entropicamente.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o criogel-AG é uma matriz promissora para uso em processos de captura de proteínas por troca iônica.

## REFERÊNCIAS

- Altintas, E. B. et al. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 105-113, 2007.
- Amartely, H. et al. Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. **Scientific Reports**. v. 8, 2018.
- Andaç, M.; Galaev, I. Y.; Denizli, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **J. Chromatogr. B**, v. 1021, p. 69–80, 2016.
- Andrade, G. C.; Coelho, C. M. M.; Uarrota, V. G. Modelling the vigour of maize seeds submitted to artificial accelerated ageing based on ATR-FTIR data and chemometric tools (PCA, HCA and PLS-DA). **Heliyon**. v. 6, P. E03477, 2020.
- Arvidsson, P. et al. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**. v. 986, n. 2, p. 275–290, 2003.

Aslanli, A. et al. Enzymatically Functionalized Composite Materials Based on Nanocellulose and Poly (Vinyl Alcohol) Cryogel and Possessing Antimicrobial Activity. **Materials**. v. 12, p. 3619, 2019.

Ayawei, N.; Ebelegi, A. N.; Wankasi, D. Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms. **Journal of Chemistry**, 2017.

Bayramoglu, G.; Arica, M. Y. Modification of epoxy groups of poly(hydroxymethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) cryogel with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as adsorbent for removal of hazardous pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 24, p. 43340-43358, 2020.

Bharathi, R.; Santhi, N. 4-(3-(2-amino-3,5-dibromophenyl)-1-(4-substitutedbenzoyl) -4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)benzotrile as a novel anti-Inflammatory scaffold: synthesis, biological evaluation and docking studies. **World Scientific News**. v. 126, p. 148-162, 2019.

Bibi, N. S. et al. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**. v. 1272, p. 145-149, 2013.

Bilgin, E. et al. Use of nicotinamide decorated polymeric cryogels as heavy metal sweeper. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, p. 27614-27628, 2018.

Boström, M. et al. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. **Biophysical Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 217–224, 2005.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* v. 750, p. 248–254, 1976.

Coglitore, D.; Janot, J-M.; Balme, S. Protein at liquid solid interfaces: Toward a new paradigm to change the approach to design hybrid protein/solid-state materials. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 270, p. 278-292, 2019.

Conceição, M. C. et al. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014.

Çorman, M. E. Poly-L-Lysine Modified Cryogels For Efficient Bilirubin Removal From Human Plasma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 167, p. 291-298, 2018.

Donohue, M. D.; Aranovich, G. L.; Classification of Gibbs adsorption isotherms. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 76, p. 137-152, 1998.

Dragan, E. S.; Humelnicu, D.; Dinu, M. V. Development of chitosan-poly(ethyleneimine) based double network cryogels and their application as superadsorbents for phosphate. **Carbohydrate Polymers**. v. 210, p. 17-25, 2019.

Dyke, J. D. V.; Kasperski, K. L. Thermogravimetric study of polyacrylamide with evolved gas analysis. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry**. v. 31, p. 1807, 1993.

Ebere, E. C.; Obinna, I. B.; Wirnkor, V. A. Applications of Column, Paper, Thin Layer and Ion Exchange Chromatography in Purifying Samples: Mini Review. **SF Journal of Pharmaceutical and Analytical Chemistry**. v. 2. P. 1018, 2019.

Elkak, A. et al. Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G. **Analytical Biochemistry**. v. 525, p. 1-7, 2017.

Erzengin, M.; Pesint, G. B.; Zenger, O.; Odabasi, M. Monolithic hydrophobic cryogel columns for protein separation. **Polymer Bulletin**. v. 79, p. 1485-1499, 2022.

Eskander, S. B., Ezz El Arab, A., Abdel-Gawad, E. I. Consequences of Hot Air and/or  $\gamma$  - Rays on Hair Hygiene Post the Application of Protein Conditioner in Rats: Urea, Creatinine, Scanning Electron Microscope and Fourier Transform Infrared Analyses. **International Journal of Innovative Science and Research Technology**. v. 3, 2018.

Falone, S. Z.; Vieira, E. M. Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argissolo vermelho amarelo. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 849-854, 2004.

Farsang, E. et al. Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 185, 2020.

Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*. v. 156, p. 2-10, 2010.

Fontan, R. C. I. **Desenvolvimento e caracterização de trocador catiônico supermacroporoso para a purificação de macromoléculas**. 137f. (2013). Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2013.

Fontan, R. C. I. et al. Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**. v. 58, p. 1717 – 1725, 2017

Fu, C. Y.; Chuang, W. T.; Hsh, S-H. A Biodegradable Chitosan-Polyurethane Cryogel with Switchable Shape Memory. **Applied Materials & Interfaces**. v. 13, p. 9702-9713, 2021. DOI: 10.1021/acsami.0c21940

Gerberding, S. J.; Byers, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography A**. v. 808, p. 141–51, 1998

Gök, Z. G.; Inal, M. Effective Removing of Remazol Black B by the Polyacrylamide Cryogels Modified with Polyethyleneimine. **Journal of Polymers and the Environment**. v. 30, p. 151-163, 2022.

Gonçalves, G. R. F. et al. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal Chromatography B Anal. Technol. Biomed. Life Sci**. p. 1033–1034, 2016.



Gonçalves, G. R. F. et al. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

Goppert, B. et al. Superporous poly(ethylene glycol) diacrylate cryogel with a defined elastic modulus for prostate cancer cell research. **Small**. v. 12, p. 3985-3994, 2016.

Goyon, A. et al. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I-non-denaturing chromatographic techniques. **Journal Chromatography B Analytic Technology Biomedic Life Science**. v. 1058, p. 73-84, 2017.

Guesmi, S. et al. Polyphenolic extracts from the xerophyte *Rhamnus lycioides* as a radiation biosimeter. **Environmental Science and Pollution Research** (2020) 27:5661–5669

Healthcare, G. E. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. **GE HealthCare Handbooks**. p. 170, 2016

Hoffman, R. F.; Gobran, R. H. Liquid Carboxyl-Terminated Poly(Butadiene). **Rubber Chemistry and Technology**, v. 46, n. 1, p. 139–147, 1973. DOI: 10.5254/1.3545005.

Horbett, T. A. Fibrinogen adsorption to biomaterials. **Journal Biomedical Materials Research**. v. 106, p. 2777-2788, 2018.

Huseynli, S. et al. Composite Polymeric Cryogel Cartridges for Selective Removal of Cadmium Ions from Aqueous Solutions. **Polymers**. v. 12, p. 1149, 2020.

Ingavle, G. C. et al. Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen. **Biomaterials**, v. 50, n. 1, p. 140–53, 2015.

IUPAC Recommendations. Pure and Applied Chemistry, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

Jiao, K. et al. Isolation and purification of a novel antimicrobial peptide from *Porphyra yezoensis*. **Journal Food Biochemistry**. v. 43, e12864, 2019.

Jing, Z. et al. Use of FTIR, XPS, NMR to characterize oxidative effects of NaClO on coal molecular structures. **International Journal of Coal Geology**. p. 1–13, 2019. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coal.2018.11.017>

Kinniburgh, D. G. General Purpose Adsorption Isotherms. **Environ. Sci. Technol.** v. 20, p. 895-904, 1986.

Kristoffersen, K. A. et al. FTIR-based hierarchical modeling for prediction of average molecular weights of protein hydrolysates. **Talanta**. v. 205, p. 120084, 2019.

Kumar, B. et al. Mixed ligand complexes of ag (i) metal salts of some organic acids with  $\beta$ -alanine. **Acta Ciencia Indica**, v. 41, n. 4, p. 175, 2015.

Lago, A. M. T. et al. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 50, p. 339–353, 2019.

Langmuir, I. The dissociation of hydrogen into atoms. III. The mechanism of the reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, n. 6, p. 1145-1156, 1916.

Lazzari, L. K. et al. A study on adsorption isotherm and kinetics of petroleum by cellulose cryogels. *Cellulose*. v. 26, p. 1231-1246, 2019.

Lazzari, L. K et al. Cellulose/Biochar Cryogels: A Study of Adsorption Kinetics and Isotherms. *Langmuir*. v. 37, p. 3180–3188, 2021.

Lee, W-H. et al. Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments. *J. R. Soc. Interface*, v. 9, p. 918–927, 2012.

Lee, W-H. et al. Functionalizing the surface of hydroxyapatite drug carrier with carboxylic acid groups to modulate the loading and release of curcumin nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. v. 99, p. 929-939, 2019.

Lowell, S. et al. *M. Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*. Ed. 1. Springer Dordrecht, 2004.

Madaghiele, M. et al. Fast synthesis of poly(ethylene glycol) diacrylate cryogels via uv irradiation. *Materials Letters*. v. 218, p. 305-308, 2018.

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*. v. 1165, 2021.

Memic, A. et al. Latest advances in cryogel technology for biomedical applications. *Advanced Therapeutics*. v. 2, 2019.

Mól, P. C. G. et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. *Journal of Chromatography B*. v. 1044, p. 17-23, 2017.

Mól, P. C. G. et al. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. *Process Biochemistry*, v. 82, p. 75–83, 2019.

Mól, P. C. G. et al. Adsorption and immobilization of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* on macroporous cryogel by hydrophobic interaction. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2022.

Morais, L. C. et al. Protein recovery from barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Miller) leaves by salting out and isoelectric precipitation. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, v. 18, p. 419-430, 2019.

Mourão, C. A. et al. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2019, 1129, 121783.

Nascimento, R. F. et al. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. Ed. 2, 260p. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2020 ISBN: 978-85-7485-186-0.

Neves, I. C. O. et al. Effect of carrier oil on  $\alpha$ -tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 2020.

Neves, I. C. O. et al. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) Leaves. **Journal Chromatography B**, V. 1161, P. 122435, 2020.

Niekerk, D. V. et al. Structural characterization of vitrinite-rich and inertinite-rich Permian-aged South African bituminous coals. **International Journal of Coal Geology**. v. 76, p. 290-300, 2008.

Nunes, R. S.; Cavaleiro, É. T. G. Thermal behavior of glutamic acid and its sodium, lithium and ammonium salts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 627–630, 2007.

Nunes, R. S. **Estudo do comportamento térmico de alguns aditivos alimentares por tg/dtg, dta e dsc.** (2009). Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos, São Carlos.

Oliveira, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 499–510, 2019.

Oliveira, A. C. F. et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, p. 1-13, 2020.

Öncel, Ş. et al. Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 18, p. 7049–7056, 2005.

Paiva, T. S. et al. Adsorption isotherms and thermodynamic properties of a butyl functionalized hydrophobic macroporous cryogel. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2021.

Pavia, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia. Ed. 4. 2010

Perçin, R. Khalaf, B. Brand, M. Morbidelli, O. Gezici, Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel, **J. Chromatogr. A**. 1386 (2015) 13–21. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.01.075>.

Piccin, J. S. et al. Adsorption Isotherms in Liquid Phase: Experimental, Modeling, and Interpretations. **Adsorption Processes for Water Treatment and Purification**, p. 19–51. 2017.

Plieva, F. M.; Andersson, L.; Mattiasson, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns Original Paper. **Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828–836, 2004.

Salas-Valerio, W. F. et al. In-field screening of *trans*-fat levels using mid- and near-infrared spectrometers for butters and margarines commercialized in the peruvian Market. **LWT**, v. 157, p. 113074, 2022.

Savina, I. N.; Mattiasson, B.; Galaev, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer (Guildf)**. v. 46, p. 9596–9603, 2005.

Schwanninger, M.; Rodrigues, J. C.; Fackler, K. A Review of Band Assignments in near Infrared Spectra of Wood and Wood Components. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. v. 19, p. 287-308, 2011.

Shakya, A. K. Functionalized cryogel monoliths for fast and selective separation of nucleic acids directly from crude lysate. **Biomedical Chromatography**. v. 36, 2022.

Shao, Q.; Hall, C. K. Protein adsorption on nanoparticles: model development using computer simulation. **Journal of Physics: Condensed Matter**. v. 28, p. 414019, 2016. DOI:10.1088/0953-8984/28/41/414019

Sharma, A. K.; Sharma, R.; Gangwal, A. Antifungal activities and characterization of some new environmentally safe cu (ii) surfactants substituted 2-amino-6-methyl benzothiazole. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**. v. 6, 2019.

Silva, J. F. da. et al. Enhancements in sugar immobilization in polymeric macroporous matrices for affinity capture. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 136, p. 47956, 2019.

Sun, I; Feng, X.; Zhong, T.; Zhang, X. Preparation of supermacroporous cryogels with improved mechanical strength for efficient purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of Separation Science**. v. 43, p. 3315-3326, 2020.

Veríssimo, L. A. A. et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification, **Sep. Sci. Technol**. v. 52, p. 1973–1982, 2017.

Yang, X. et al. Determination of 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid of Royal Jelly Using Near-Infrared Spectroscopy Combined with Chemometrics. **Journal of Food Science**. v. 84, 2019.

Yang, X. et al. Constructing novel nanofibrous polyacrylonitrile (PAN)-based anion exchange membrane adsorber for protein separation. **Separation and Purification Technology**. v. 285, p. 120364, 2022.

Yavaser, R.; Karagozler, A. A. Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. **Process Biochemistry**. v. 101, p. 137-146, 2021.

Yesilova, E. et al. Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption. **Separation and Purification Technology**. v. 200, p. 155-165, 2018

Yilmaz, F. et al. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 272–279, 2009.

Wang, J.; Yang, H. Superelastic and pH-Responsive Degradable Dendrimer Cryogels Prepared by Cryo-aza-Michael Addition Reaction. **Scientific Reports**. v. 8, p. 1–10, 2018.

Wang, Y-P. et al. In situ polymerized poly(acrylic acid)/alumina nanocomposites for  $\text{Pb}^{2+}$  adsorption. **Advances in Polymer Technology**. v. 37, p. 2981-2996, 2018.

Wheatley, J. B.; Schmidt JN, D. E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. **Jounal Chromatography A**. v. 849, n. 1., p. 1-12, 1999.