



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

KARINA ALEXANDRE BARROS NOGUEIRA

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS (ALBUMINA DE SORO BOVINO
E LISOZIMA) EM MATERIAIS MESOPOROSOS**

FORTALEZA

2016

KARINA ALEXANDRE BARROS NOGUEIRA

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS (ALBUMINA DE SORO BOVINO E
LISOZIMA) EM MATERIAIS MESOPOROSOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N712e Nogueira, Karina Alexandre Barros.
Estudo da adsorção de biomoléculas (Albumina de soro bovino e Lisozima) em materiais mesoporosos /
Karina Alexandre Barros Nogueira. – 2016.
65 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.
Coorientação: Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.

1. Biomoléculas. 2. Adsorção. 3. Modelagem. I. Título.

CDD 660

KARINA ALEXANDRE BARROS NOGUEIRA

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS (ALBUMINA DE SORO BOVINO E
LISOZIMA) EM MATERIAIS MESOPOROSOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 09/09/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e força que ele me dá todos os dias.

Ao meu pai, a minha mãe e a minha irmã, pelo apoio constante, compreensão e ajuda, por ser minha base, minha estrutura nos momentos bons e ruins.

A minha avó, Adélia (*in memoriam*), que sempre será lembrada com muito amor por sua coragem e perseverança na vida. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior, meu agradecimento pela orientação, pelas muitas palavras de incentivo, pela confiança e paciência ao longo deste trabalho. Muito obrigada por sua ajuda em todos os momentos durante essa jornada que foi meu mestrado, pela ética e seriedade.

Ao Grupo de Pesquisa em Separação por Adsorção (GPSA), por disponibilizar seus laboratórios para a realização deste trabalho e que tanto contribuíram para o enriquecimento desta tese e também para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos que conviveram comigo no LP1, Diego, Euranio, Santis, Thaina, Paula, Jansen, em especial a Bruna Cavalcante, minha amiga, por me ajudar tanto durante todos os momentos desse mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo.

Às pessoas especiais que tenho em minha vida, sem vocês nada teria a mesma graça: Raphael, Saulo, Saha, Aquila, Junior, Marília e a todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização desta dissertação, muito obrigada!

“Para cada esforço disciplinado há uma retribuição múltipla” (Jim Rohn)

RESUMO

A adsorção de proteínas em superfícies sólidas tem sua aplicação em diversos campos tais como: biomedicina, separação de biomoléculas, tratamento de efluentes. O presente trabalho investiga a adsorção de duas biomoléculas – modelo (albumina de soro bovino – BSA e lisozima – LYS) em materiais mesoporosos obtidos de duas fontes diferentes, um hidróxido duplo lamelar e uma sílica mesoporosa. Na primeira parte do trabalho foi sintetizado HDL (hidróxido duplo lamelar) através do método de coprecipitação utilizando dois diferentes tipos de metais, zinco (Zn-Al) e magnésio (Mg-Al). A adsorção de BSA foi avaliada em batelada para verificar a influência da solução tampão, o tempo de contato e a concentração inicial. Experimentos em leito fixo também foram realizados para avaliar a dinâmica de adsorção da BSA em HDL como também a regenerabilidade do material. A máxima quantidade de BSA adsorvida foi em tampão acetato de sódio 50 mM no pH 4,8 (ponto isoelétrico da proteína) para o HDL Mg-Al e tampão MES 50 mM no pH 6,7. Para os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, obteve-se 338,74 e 346,54 mg.g⁻¹ para o HDL Zn-Al e 196,12 e 197,80 mg.g⁻¹ para o HDL Mg-Al respectivamente. Os resultados indicam que para os hidróxidos duplos lamelares a densidade de carga do HDL Zn-Al com as contribuições de outras interações como ligação de hidrogênio ou interação de Van der Waals favorece a pH 6,7 do tampão MES 50 mM a adsorção de albumina de soro bovino. Na segunda parte o material SBA-15 foi sintetizado pelo método hidrotérmico com a adição do componente 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) e utilizado na adsorção de biomoléculas dissolvidas em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio. A máxima quantidade de BSA adsorvida foi em tampão acetato de sódio 50 mM no pH 4,8 (ponto isoelétrico da proteína) e para a LYZ foi em tampão Tris HCl 50 mM no pH 10. Para o modelo de Langmuir, obteve-se 403,63 mg.g⁻¹ para BSA e 677,93 mg.g⁻¹ para LYS. Para os resultados de adsorção de LYZ observou-se a ocorrência de precipitação, devido ao fenômeno de “salting-out” quando há adição de sal ao meio e assim a redução da capacidade de adsorção na proteína no material.

Palavras-chave: Biomoléculas. Adsorção. Modelagem.

ABSTRACT

The adsorption of proteins on solid surfaces has application in many different fields such as biomedicine, biomolecule separation, effluent treatment. This study investigates the adsorption of two biomolecules (bovine serum albumin - BSA and lysozyme - LYS) on mesoporous materials obtained from two different sources, a layered double hydroxide and a mesoporous silica. In the first part of this study, HDL (layered double hydroxide) was synthesized through the coprecipitation method using two different types of metals, zinc (Zn-Al) and magnesium (Mg-Al). The adsorption of BSA was evaluated in batch system to check the influence of the buffer solution, the contact time and the initial concentration. Experiments fixed bed were also performed to evaluate the dynamics of adsorption of BSA in HDL as well as regeneratable material. The maximum amount of adsorbed BSA was in 50mM sodium acetate buffer at pH 4.8 (the isoelectric point of the protein) to the Mg-Al LDH and 50mM MES buffer at pH 6.7 to the Zn-Al LDH. For Langmuir and Langmuir-Freundlich models we got 338.74 mg g⁻¹ and 346.54 mg g⁻¹ for Zn-Al LDH and 196.12 and 197.80 mg g⁻¹ for Mg-Al LDH respectively. The results indicate that for the double lamellar hydroxides the charge density of the Zn-Al LDH with the contributions of other interactions such as hydrogen bonding or Van der Waals interaction promotes the better adsorption in 50mM MES pH 6.7 buffer of serum albumin bovine. In the second part of the SBA-15 material was synthesized by hydrothermal method with the addition of the component 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) and used in adsorption of biomolecules dissolved in solutions with different concentrations of sodium chloride. The maximum amount of BSA was adsorbed in 50mM sodium acetate buffer at pH 4.8 (the isoelectric point of the protein) and the LYZ was adsorbed in 50mM Tris HCl buffer at pH 10. The Langmuir model obtained 403.63 mg.g⁻¹ for adsorption of BSA and 677.93 mg g⁻¹ for adsorption of LYS. For adsorption results with LYZ revealed the occurrence of precipitation due to the phenomenon of "salting-out" when there is addition of salt to the solution and thus the reduction in protein adsorption capacity of the material.

Keywords: Biomolecules. Adsorption. Modeling.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	– Concentração de proteína adsorvida obtida pelo balanço de massa	22
Equação 2	– Concentração de proteína adsorvida obtida pelo modelo de Langmuir.....	22
Equação 3	– Concentração de proteína adsorvida obtida pelo modelo de Langmuir-Freundlich	22
Equação 4	– Quantidade de proteína adsorvida obtida pelo balanço de massa.....	41
Equação 5	– Isotermas modeladas por Langmuir.....	41
Equação 6	– Lei de Fick	42
Equação 7	– Equação tridimensional do processo de difusão	42
Equação 8	– Coeficiente de difusão.....	43
Equação 9	– Modelo de difusão paralelo implementado.....	43
Equação 10	– Condições de contorno.....	43
Equação 11	– Condições de contorno.....	43
Equação 12	– Balanço de massa na fase líquida.....	43
Equação 13	– Condição inicial	43
Equação 14	– Coeficiente de transferência de massa	44
Equação 15	– Difusividade molecular	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura do hidróxido duplo lamelar (HDL).....	16
Figura 2	– DRX do HDL Mg-Al e HDL Zn-Al.....	24
Figura 3	– Espectroscopia de Infravermelho FTIR do HDL Mg-Al e HDL Zn-Al.....	25
Figura 4	– Isoterma de adsorção – dessorção de N ₂ a -196°C para o HDL Mg-Al e HDL Zn-Al	26
Figura 5	– pHZPC do HDL Mg-Al e HDL Zn-Al.....	27
Figura 6	– Adsorção de BSA em HDL Zn/Al e HDL Mg/Al sob influência de diferentes sistemas tamponantes, tempo de contato 2 h, massa de adsorvente 20 mg.....	28
Figura 7	– Cinética de adsorção de BSA em HDL Zn/Al no tampão MES pH 6,7, e em HDL Mg/Al no tampão Acetato de sódio pH 4,8.....	30
Figura 8	– Isotermas de adsorção de BSA em HDL Zn-Al em tampão MES 50mM a pH 6,7 e em HDL Mg-Al em tampão acetato de sódio 50mM a pH 4,8 em temperatura ambiente e tempo de contato de 240 min.....	30
Figura 9	– Curva Breakthrough de BSA em HDL Zn-Al em diferentes concentrações iniciais de alimentação. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL e 2 mg/mL; vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão MES 50 mM a pH 6,7 e BSA	32
Figura 10	– Ensaio de adsorção/dessorção de BSA em HDL Zn-Al. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL e 2 mg/mL; vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão MES 50 mM a pH 6,7 e BSA; dessorção com solução tampão de fosfato 50 mM a pH 12.....	33
Figura 11	– Curva Breakthrough de BSA em HDL Mg-Al em diferentes concentrações iniciais de alimentação. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL e 2 mg/mL; vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,8 e BSA.....	33

Figura 12 – Esquema de formação de estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura.....	36
Figura 13 – Difratograma de raio-x em baixo ângulo para SBA-F-TMB	45
Figura 14 – Espectros FTIR para SBA-F-TMB.....	45
Figura 15 – Isoterma de adsorção/dessorção de N ₂ a 77 K para o SBA-15 F-TMB.....	46
Figura 16 – Adsorção em SBA-15- F-TMB de LYZ de BSA sob influência de diferentes sistemas tamponantes, tempo de contato 2h, massa de adsorvente 15mg.....	47
Figura 17 – Cinética de adsorção de BSA em SBA-15 - F-TMB no tampão acetato pH 4,8, concentração de BSA 3 mg/mL com 0,0M NaCl, 0,2M NaCl, 0,4M NaCl e 0,7M NaCl, massa de adsorvente 15 mg.....	49
Figura 18 – Cinética de adsorção de LYZ em SBA-15-F-TMB no tampão tris HCl pH 10, concentração de LYZ 3 mg/mL com 0,0M NaCl, 0,2M NaCl, 0,4M NaCl e 0,7M NaCl, massa de adsorvente 15 mg	49
Figura 19 – Isoterma de adsorção de BSA em SBA-F-TMB no tampão acetato de sódio pH 4,8 com 0,0M NaCl, 0,1M NaCl, 0,2M NaCl, 0,4M de NaCl, 0,7M de NaCl e 1,0M de NaCl	50
Figura 20 – Isoterma de adsorção de LYZ em SBA-15-F-TMB no tampão Tris HCl pH 10 com 0,0M NaCl, 0,1M NaCl, 0,2M NaCl, 0,4M de NaCl, 0,7M de NaCl e 1,0M de NaCl	51
Figura 21 – Ilustração de um diagrama de fase mostrando a solubilidade de uma proteína em solução em função da concentração do agente precipitante	52
Figura 22 – Modelagem dos perfis cinéticos da BSA para diferentes valores da força iônica. Concentração inicial da proteína foi de 3 mg/mL para todos os experimentos.....	54
Figura 23 – Modelagem dos perfis cinéticos para a LYS em diferentes valores da força iônica (concentração inicial da proteína foi de 3 mg.mL ⁻¹ para todos os experimentos)	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades da Albumina de Soro Bovino – BSA.....	19
Tabela 2 – Propriedades dos adsorventes HDL Mg-Al e Zn-Al e propriedades de materiais reportados na literatura	26
Tabela 3 – Parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich	31
Tabela 4 – Balanço de Massa (BM) da adsorção de proteína em HDL Mg-Al em cada etapa: injeção, adsorção, lavagem, eluição e regeneração.....	34
Tabela 5 – Balanço de Massa (BM) da adsorção de proteína em HDL Zn-Al em cada etapa: injeção, adsorção, lavagem, eluição e regeneração.....	34
Tabela 6 – Propriedades texturais de materiais mesoporosos	47
Tabela 7 – Parâmetros do modelo de Langmuir para a BSA	51
Tabela 8 – Parâmetros do modelo de Langmuir para a LYZ	51
Tabela 9 – Parâmetros matemáticos inseridos no modelo	53
Tabela 10 – Valores estimados obtidos pelo gPROMS da modelagem cinética da BSA em SBA-15 F TMB nas diferentes concentrações salinas	54
Tabela 11 – Valores estimados obtidos pelo gPROMS da modelagem cinética da LYS em SBA-15 F TMB nas diferentes concentrações salinas	55

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>C</i>	Concentração da substância difundida
<i>C_b</i>	Concentração de proteína na fase líquida em solução (mg.mL ⁻¹)
<i>C_{eq}</i>	Concentração no equilíbrio (mg.mL ⁻¹)
<i>C_i</i>	Concentração na fase líquida intra-partícula (mg.mL ⁻¹)
<i>C₀</i>	Concentração inicial (mg.mL ⁻¹)
<i>d</i>	Diâmetro da partícula (cm)
<i>D</i>	Coefficiente de difusão
<i>D_{AB}</i>	Coefficiente de difusão molecular (cm ² .min ⁻¹)
<i>D_{ap}</i>	Densidade aparente da partícula (g.cm ⁻³)
<i>D_{ef,p}</i>	Difusividade efetiva no poro para o modelo de difusão no poro (cm ² .min ⁻¹)
<i>k</i>	Parâmetro da equação de Langmuir (mL.mg ⁻¹)
<i>k_f</i>	Coefficiente de transferência de massa no filme (cm.min ⁻¹)
<i>M_A</i>	Massa molecular relativa para a proteína (Dalton)
<i>M_{ads}</i>	Massa do adsorvente (g)
<i>g</i>	Constante gravitacional (cm.s ⁻²)
<i>q</i>	Concentração na fase sólida (mg.g ⁻¹)
<i>q_i</i>	Concentração da proteína adsorvida na partícula (mg.g ⁻¹)
<i>Q_i</i>	Coefficiente da força motriz para a difusão da proteína na sílica (mg.mL ⁻¹)
<i>q_{max}</i>	Capacidade máxima de adsorção da proteína (mg.g ⁻¹)
<i>r</i>	Coordenada radial
<i>R</i>	Raio da partícula (cm)
<i>t</i>	Coordenada temporal
<i>T</i>	Temperatura em que foram realizados os experimentos (°C)
<i>v</i>	Volume de adsorvente (mL)
<i>V</i>	Volume de solução (mL)
<i>X</i>	Coordenada espacial
<i>ε_p</i>	Porosidade da partícula
<i>D_{ap}</i>	Densidade da partícula (g.cm ⁻³)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos.....	15
2	HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR.....	16
2.1	Introdução	16
2.2	Materiais e métodos.....	19
2.2.1	<i>Reagentes</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Síntese do HDL.....</i>	<i>20</i>
2.2.3	<i>Caracterização dos HDLs.....</i>	<i>20</i>
2.2.3.1	<i>Difração de raio X.....</i>	<i>20</i>
2.2.3.2	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier - FTIR.....</i>	<i>20</i>
2.2.3.3	<i>Adsorção de N₂ a -196°C</i>	<i>21</i>
2.2.3.4	<i>Ponto de carga zero</i>	<i>21</i>
2.3	Experimentos de adsorção em batelada	21
2.4	Experimentos em leito fixo	23
2.5	Resultados e discussão.....	24
2.5.1	<i>Caracterizações.....</i>	<i>24</i>
2.5.2	<i>Ensaio de Adsorção.....</i>	<i>28</i>
2.5.2.1	<i>Efeito do pH na adsorção de BSA em Mg-Al e Zn-Al HDL</i>	<i>28</i>
2.5.2.2	<i>Cinéticas e isotermas de adsorção de BSA em HDL Mg-Al e Zn-Al</i>	<i>29</i>
2.5.2.3	<i>Adsorção dinâmica de BSA em Zn-Al HDL e Mg-Al HDL</i>	<i>32</i>
2.6	Conclusão	35
3	SBA-15	36
3.1	Introdução.....	36
3.2	Materiais e métodos.....	38
3.2.1	<i>Proteínas Utilizadas.....</i>	<i>38</i>
3.2.2	<i>Síntese da Sílica Mesoporosa.....</i>	<i>39</i>
3.2.3	<i>Caracterização dos Materiais Obtidos</i>	<i>39</i>
3.2.3.1	<i>Difração de raio x</i>	<i>39</i>
3.2.3.2	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier.</i>	<i>40</i>
3.2.3.3	<i>Adsorção de N₂ a -196°C</i>	<i>40</i>
3.2.4	<i>Experimentos em Batelada.....</i>	<i>40</i>
3.3	Modelagem.....	42

3.4	Resultados e discussão.....	44
3.4.1	<i>Caracterizações.....</i>	44
3.4.2	<i>Ensaio de Adsorção.....</i>	47
3.4.3	<i>Estimativa de Parâmetros de Transporte de Massa.....</i>	53
3.5	Conclusão	56
4	CONCLUSÃO GERAL	58
4.1	Sugestões para trabalhos futuros.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A adsorção de proteínas em superfícies sólidas desempenha um papel fundamental em muitos processos sendo muito utilizada, por exemplo, engenharia interfacial biológica, ciência dos materiais e biomedicina (BHAJTA *et al.*, 2015; KIM; SOMORJAI, 2003; PATTERSON; LISAL; COLINA, 2011). Por isso, a compreensão dos processos envolvidos na adsorção, as condições experimentais, a superfície sólida e propriedades físico-químicas da proteína, tais como a carga, tamanho e composição de aminoácidos, são fatores fundamentais que afetam a quantidade da proteína adsorvida, fazendo-se necessário seu entendimento.

Os avanços do conhecimento de adsorção de proteínas foram alcançados principalmente através de abordagens experimentais. Desde os primeiros trabalhos sistemáticos neste campo que aproximadamente remontam à década de 1970 (CUATRECASAS, 1970; MITCHELL; IRONS; PALMER, 1970) um progresso contínuo no desenvolvimento de métodos e técnicas notavelmente aumentou a precisão dos dados experimentais para o entendimento do fenômeno de adsorção. No passado, a partir de medições em experimentos da cinética de adsorção em elevadas concentrações de proteína, buscava-se o entendimento do fenômeno de adsorção; hoje é possível detectar moléculas individuais, mesmo na superfície, para medir as propriedades de orientação e estrutura das proteínas adsorvidas. Portanto, as observações experimentais devem ser cuidadosamente analisadas para evitar erros de interpretação. Isto deve ser realizado comparando-as com as descrições modelo-teórico cuja vantagem consiste em um acesso ilustrativo de processos e mecanismos complexos. O modelo em si normalmente fornece nova hipótese que pode ser novamente testada experimentalmente e levar a um maior refinamento até que se justifica a chamá-lo de um modelo válido. Uma abordagem emergente para a adsorção de proteínas é aberta por métodos computacionais que aspiram a simular o comportamento das proteínas nas interfaces (PATTERSON *et al.*, 2011).

Neste trabalho é reportada a síntese e caracterização de dois materiais distintos, uma sílica mesoporosa e um hidróxido duplo lamelar, seguidos dos estudos de equilíbrio de adsorção (cinética e isoterma) a fim de avaliar as condições experimentais. Para o hidróxido duplo lamelar é avaliada a influência do metal utilizado a síntese, ou seja, a carga que o metal possui para a adsorção de proteína (albumina de soro bovina) em sistema em batelada e leito fixo. Para a sílica mesoporosa foi avaliada a influência da concentração do sal (cloreto de sódio) no meio de adsorção das biomoléculas BSA e LYS e também a obtenção de parâmetros

de transporte de massa da BSA e LYS em sílica mesoporosa através da modelagem dos dados utilizando o modelo de difusão em paralelo.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar hidróxidos duplos lamelares com mesma razão molar e diferente tipo de metal para avaliar a capacidade de adsorção de albumina de soro bovino (BSA) e sintetizar e caracterizar peneiras mesoporosas de sílica a partir de agentes direcionadores de mudanças das características típicas do material SBA-15, visando estudar a influência da expansão do tamanho dos poros e encurtamento dos canais, além da influência da concentração salina na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS).

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

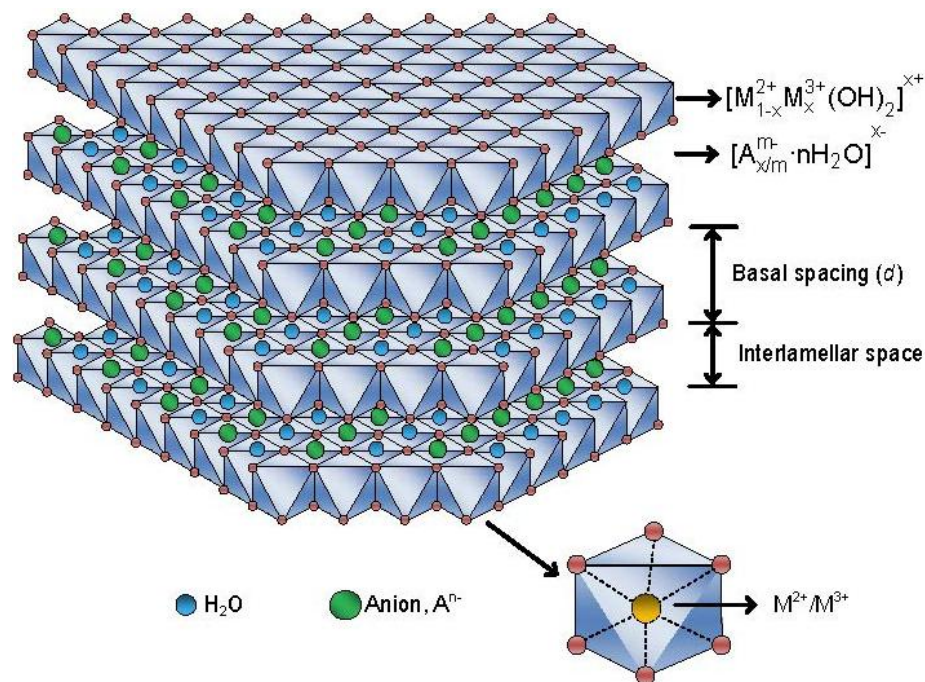
- i. Sintetizar sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 (via hidrotérmica) através da utilização de dois compostos, 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) e fluoreto de amônio (NH_4F), e investigar o seu potencial na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS);
- ii. Sintetizar hidróxido duplo lamelar HDL através do método de coprecipitação com a utilização de dois metais diferentes zinco (Zn) e magnésio (Mg), e investigar a adsorção de albumina de soro bovino (BSA) nos sistemas em batelada e leito fixo;
- iii. Caracterizar os materiais adsorventes obtidos por difração de raios-X de (DRX), adsorção de nitrogênio, e espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), relacionando suas características texturais;
- iv. Modelar os dados obtidos através do modelo de difusão em paralelo com SBA-15 para avaliar a influência da adição de sal ao meio.

2 HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR

2.1 Introdução

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são um grupo de hidróxidos lamelares. A estrutura elementar dos HDLs é similar ao observado em brucitas ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), o qual apresenta um arranjo hexagonal de grupos hidroxila, onde cátions de magnésio preenchem todos os espaços octaédricos entre duas lamelas adjacentes como mostra a Figura 1. Estas camadas se dispõem em lamelas sobrepostas e são mantidas juntas por ligações de hidrogênio (LEROUX; TAVIOT-GUEHO, 2005).

Figura 1 – Estrutura do hidróxido duplo lamelar (HDL)



Fonte: Jairo *et al.* (2013).

Os HDLs são formados por uma substituição parcial de cátions de M^{2+} por M^{3+} que produzem uma distorção da célula unitária e a formação da carga positiva nas folhas hidroxila (TAMURA *et al.*, 2006), que é contrabalançado por espécies aniônicas em conjunto com moléculas de água no espaço interlamelar (COSTA *et al.*, 2012).

A composição dos HDLs pode ser descrito pela fórmula geral $(M_{1-x}^{2+} M_x^{3+} (\text{OH})_2)^{x+} (A_{x/m}^{m-} \cdot n\text{H}_2\text{O})^{x-}$, em que M^{2+} , tal como Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Ni^{2+} , são os cátion bivalentes, enquanto que M^{3+} , tais como o Al^{3+} , Fe^{3+} ou Cr^{3+} , são os cátion trivalentes e X^{n-} representa um ânion orgânico ou inorgânico.

Na última década, os HDLs têm recebido muita atenção devido às propriedades intrínsecas desses materiais como troca iônica e mudanças de estado de hidratação demonstrando potencial para incorporação de moléculas como por exemplo proteínas (COSTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012; IYI; SASAKI, 2008; MASCOLO; MASCOLO, 2015).

Os hidróxidos duplos lamelares têm sido utilizados como adsorvente de espécies aniônicas (ABOU-EL-SHERBINI *et al.*, 2015; AGUIAR *et al.*, 2013) ou em processo de adsorção e imobilização de proteínas (LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2013), retendo moléculas no espaço entre suas camadas e/ou sua superfície. Além disso, tal material mesoporoso exibe um comportamento de base, que pode ser melhorado pela decomposição térmica do hidróxido, levando à formação de suas respectivas espécies de óxido que são potencialmente um material de base para a catálise heterogênea (ALBERTAZZI; BASILE; VACCARI, 2005). Exibem ainda uma capacidade de retornar para a estrutura em camadas originais mesmo após o processo de calcinação; este fenômeno é designado por efeito de memória (GARCÍA-SANCHO *et al.*, 2011; MASCOLO; MASCOLO, 2015).

A estabilidade estrutural da proteína é um aspecto importante a ser considerado no processo de adsorção. Proteínas com uma elevada estabilidade interna como a albumina de soro bovino, denotadas como proteínas “hard”, em superfícies hidrófilas adsorvem apenas na presença de forças eletrostáticas e considerando adsorção em superfícies hidrofóbicas conduzem alterações estruturais (BRANDES *et al.*, 2006; ZOUNGRANA; FINDENEGG; NORDE, 1997). Proteínas com fraca estabilidade interna como a lisozima, denotados como proteínas “soft” (por exemplo, mioglobina e albumina de soro bovino) tendem a ser adsorvido sobre todas as superfícies, independentemente de interações eletrostáticas, devido a uma variação de entropia favorável causada por grandes mudanças conformacionais resultantes da adsorção (KONDO; OKU; HIGASHITANI, 1991; VERMONDEN; GIACOMELLI; NORDE, 2001).

O processo de adsorção de proteínas a partir de uma solução aquosa sobre uma superfície sólida é tipicamente descrita em três passos. Em primeiro lugar, ocorre o transporte da proteína a partir da solução em direção à superfície sólida. Isto é seguido por uma ligação da proteína à superfície e, finalmente, a estrutura da proteína sofre uma alteração conformacional após a adsorção (LUENSMANN; JONES, 2008). A predominância de um determinado tipo de interação em relação aos demais é principalmente dado pelas condições experimentais. Essas interações são o resultado de um efeito combinado entre interações do tipo eletrostáticas (ou iônicas), hidrofóbicas e de coordenação. Assim, todos os tipos de

interações devem ser considerada, dependendo da natureza do suporte, embora possa haver complexidade na determinação da sua contribuição relativa (VOROBYOV; ALLEN, 2011).

A utilização de proteínas de animais, tais como albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin* – BSA) tem numerosas aplicações como um nutriente em cultura de células microbiana. A BSA é utilizada também para estabilizar algumas enzimas durante a digestão do DNA (ácido desoxirribonucleico) e para impedir a adesão de enzima aos tubos de reação, pontas de pipetas, e outros recipientes. Outra aplicação é sua utilização para determinar a quantidade de outras proteínas, através da comparação de uma quantidade desconhecida de proteína para quantidades conhecidas do mesmo mecanismo conhecido como eletroforese. A proteína BSA é usada por sua estabilidade para aumentar sinal em ensaios de imonodifusão, onde anticorpos reconhecem o antígeno padrão, no caso a BSA para determinação da faixa de purificação. Esta proteína tem diversas aplicações devido a sua falta de efeito em muitas reações bioquímicas, e seu baixo custo, uma vez que grandes quantidades podem ser facilmente purificadas a partir de sangue bovino, um subproduto da indústria de gado (PARÉS; SAGUER; CARRETERO, 2011).

Diferentes adsorventes, tais como a sílica mesoporosa (SANTOS *et al.*, 2013), minerais de argila, tais como caulinita (DUARTE-SILVA *et al.*, 2014), montmorilonita (LEPOITEVIN *et al.*, 2014) ou sepiolita (CENGIZ; ÇAVAŞ; YURDAKOÇ, 2012), titânia (ELLINGSEN, 1991), alumina (AKASAKA *et al.*, 2012), zircônia (SZEWCZUK-KARPISZ; WIŚNIEWSKA; MYŚLIWIEC, 2015) ou hidroxiapatita (KANDORI *et al.*, 2014), foram investigados para a adsorção de proteínas. Entretanto, os HDLs têm sido pouco estudados para a adsorção de proteínas, sendo limitados a estudos com sistema de tanques com agitação (AGUIAR *et al.*, 2013; SEFTEL *et al.*, 2008).

A utilização de HDLs pode levar a diminuição da capacidade de adsorção de proteínas (em comparação com outros adsorventes, tais como sílicas porosas) de cerca de 100 mg/g. No entanto, o simples processo de síntese em comparação a métodos de síntese como o da SBA-15 desses materiais os tornam potencialmente interessante para separação das proteínas. Além disso, HDLs foram escolhidos como adsorvente neste trabalho devido à possibilidade de escolher composição diferente em termos da natureza dos cátions, que determina o comportamento de carga da superfície. Investigações anteriores demonstraram que a quantidade de proteína adsorvida pode ser fortemente influenciada pelas propriedades físico-químicas da proteína (carga, tamanho, composição de aminoácidos) e da superfície sólida usada como adsorvente, assim como as condições experimentais (BELLEZZA *et al.*, 2012).

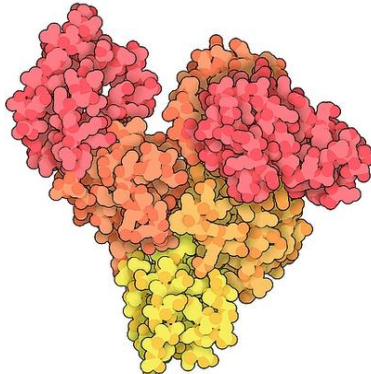
No presente trabalho, dois HDLs foram sintetizados (Zn-Al HDL e Mg-Al HDL) e caracterizados com o intuito de avaliar a capacidade de adsorção para a proteína BSA. Os materiais foram caracterizados por DRX (difração de raio X), FTIR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) e isoterma de adsorção-dessorção de N₂ a -196°C. Estudos em batelada foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito do pH, do tempo de contato e da concentração inicial na adsorção de BSA em ambos os materiais. Estudos em leito fixo também foram realizados com a finalidade de avaliar o uso dos materiais em sistema contínuo

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Reagentes

A albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida em Inlab (Brasil). BSA tem um peso molecular de 66,5 kDa e é formada por 583 resíduos de aminoácidos. Seu ponto isoelétrico (pI) em água a 25 °C é de cerca de 4,8 e suas dimensões são 140 Å X 40 Å X 40 Å (elipsóide prolato onde a = b < c) como mostrado na Tabela 1 (FERREIRA, 2009; KATIYAR *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Propriedades da Albumina de Soro Bovino – BSA

Estrutura Molecular	Propriedades
	Massa Molar: 66430 g/mol Ponto Isoelétrico: 4,8 Dimensão: 14x4x4 nm

Fonte: Adaptada de Sigma-Aldrich (2016, *online*).

O Ácido acético, 2- (N-morfolino) etanossulfônico (MES) e o tris (hidroximetil) aminometano (TRIS-HCl) foram adquiridas da Sigma-Aldrich, EUA. A água usada nas soluções tampão foi ultrapura (Milli-Q do sistema, Millipore, EUA). Reagentes de Mg(NO₃)₂.6H₂O, Zn(NO₃)₂.6H₂O, Al(NO₃)₃.9H₂O e NaHCO₃ utilizados na síntese de HDL foram adquiridos da Vetec, Brasil.

2.2.2 Síntese do HDL

O HDL empregado nesse estudo foi sintetizado pelo método de co-precipitação (AUXILIO *et al.*, 2009). O processo de síntese se dar quando soluções de nitrato de alumínio (III) nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (0,0332 mol) e nitrato de magnésio (II) hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (0,0996 mol) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e posteriormente adicionaram-se a solução obtida gota a gota a 100 mL de solução contendo 0,249 mol/L de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3) a 60 ° C, sob agitação vigorosa. Para obter o material HDL Zn-Al o cloreto de zinco (ZnCl_2) (0,0996 mol) é adicionado ao invés do nitrato de magnésio (II) hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (0,0996 mol). Os precipitados obtidos foram submetidos a tratamento hidrotérmico de 80 ° C durante 4 dias, seguido por agitação à temperatura ambiente durante 12 h. Os HDLs com razão molar M^{2+} : Al = 3:1 foram filtrados e lavados com água deionizada até o filtrado estar a pH 7. Os materiais foram novamente secos a 80 ° C durante 24 h e, em seguida, as amostras foram caracterizadas.

2.2.3 Caracterização dos HDLs

2.2.3.1 Difração de raio X

Os padrões de difração foram obtidos com um difratômetro Philips X'Pert Pro MPD automatizado, equipado com um GE (1 1 1) monocromador primário, estritamente $\text{CuK}\alpha$ monocromática ($\lambda = 0,1542$ nm) e um detector X'Celerator, operando a uma tensão de 40 kV e uma corrente de 40 mA. O tamanho dos cristais dos HDLs e de parâmetros de deformação foram estimados utilizando o método de Williamson-Hall para se ajustar ao perfil de difração. Parâmetros cristalográficos foram obtidos a partir do método de Rietveld usando o software X'Pert HighScore Plus. A análise do difratograma foi realizada através do software X'Pert Highcore Plus e do banco de dados ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

2.2.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier - FTIR

Os espectros de FTIR foram efetuados com FTIR 8400S Shimadzu com detector padrão mid-IV DTGS. Cada amostra de adsorvente (~ 5 mg) e KBr (~ 95 mg) foi triturado em um almofariz de ágata até a amostra apresenta-se bem dispersa e, em seguida, os espectros foram recolhidos na gama de 400-4000 cm^{-1} utilizando um espectro de KBr como um fundo.

2.2.3.3 Adsorção de N_2 a $-196^\circ C$

A caracterização estrutural foi realizada por isotermas de adsorção-dessorção em N_2 a $-196^\circ C$ com um sistema automático ASAP 2000 da Micromeritics. Antes das medições, as amostras foram degaseificadas a $200^\circ C$ e 10^{-4} mbar durante 24 horas. A área de superfície específica foi calculada usando a equação de BET (Brunauer-Emmet-Teller) e uma seção transversal da molécula de nitrogênio de $16,2 \text{ \AA}$. O tamanho médio dos poros foi calculado pelo método BJH (Barret, Joyner e Halenda) utilizando as isotermas de dessorção. O volume total dos poros foi calculado como o volume de nitrogênio adsorvido em $P/P_0 = 0,999$ (ROUQUEROL; ROUQUEROL, 2014).

2.2.3.4 Ponto de carga zero

Análise do ponto de carga zero foi realizada usando soluções de NaCl (cloreto de sódio) com concentração $0,01 \text{ mol/L}$ em contato com os HDLs em uma faixa de pH de 2 a 12 (IP; BARFORD; MCKAY, 2010), juntamente com 150 mg de adsorvente. Os pHs dessas soluções foram ajustados com ácido clorídrico (HCl) ou base tipo hidróxido de sódio (NaOH). As amostras permaneceram em solução por 48 horas e a diferença do pH da solução com o pH inicial foi registrado.

2.3 Experimentos de adsorção em batelada

Os experimentos de adsorção no suporte HDL foram realizados em sistema de batelada de forma a avaliar o comportamento da adsorção quanto ao efeito das soluções com diferentes pH, do tempo de contato e da concentração inicial de BSA. Os experimentos de adsorção foram conduzidos em agitador orbital 18 rpm (Tecnal TE-165, Brasil) todos em duplicata, com temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ C \pm 1 \text{ }^\circ C$).

Para avaliação da influência do pH, uma solução contendo 1 mg/mL da biomolécula BSA foi preparada com diferentes soluções em diversos valores de pH. Para realizar esse ensaio, 20 mg dos materiais HDL Mg-Al e também HDL Zn-Al (previamente avaliada em teste de saturação do adsorvente) foram postos em contato com solução de BSA nos seguintes tampões: acetato de sódio pH de $4,0 - 4,8$; MES pH de $6,0 - 7,0$; Tris-HCl pH de $8,0 - 10,0$.

Para os experimentos de cinética de adsorção (influência do tempo de contato), a concentração de BSA inicial igual a 1 mg/mL foi preparada em solução tampão de acetato com pH fixo de 4,8 em alíquotas de 3 mL juntamente com o adsorvente HDL Mg-Al; já para o HDL Zn-Al o tampão utilizado foi o tampão MES pH fixo de 6,7. Para a medição das isotérmicas de adsorção, diferentes concentrações iniciais de BSA (1,0 a 6,0 mg/mL) com pH fixo foram agitados com uma quantidade conhecida de HDL (20mg) por tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido. Após cada experimentos descritos acima as amostras resultantes foram recolhidas e centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm (microcentrifugadora refrigerada Cientec CT - 15000R, EUA) e a absorbância foi medida a 280 nm (UV-Vis Biomate 3, Thermo Scientific, EUA).

A concentração de proteína adsorvida (mg/g), no equilíbrio, foi calculada utilizando o balanço de massa descrito pela equação 1:

$$q = \frac{V_{\text{sol}}(C_0 - C_{\text{eq}})}{m_{\text{ads}}} \quad (1)$$

em que V_{sol} é o volume da solução (mL). C_0 é a concentração líquida inicial (mg/mL), C_{eq} é a concentração líquida no equilíbrio (mg/mL) e m_{ads} é a massa de adsorvente.

Para descrever as relações de equilíbrio de adsorção nesse trabalho foram utilizados os modelos de Langmuir e de Langmuir-Freundlich. Estes modelos estão representados respectivamente pelas equações 2 e 3.

$$q = \frac{q_{\text{max}} C_{\text{eq}}}{K_d + C_{\text{eq}}} \quad (2)$$

$$q = \frac{q_{\text{max}} (K_{\text{LF}} C_{\text{eq}})^n}{1 + (K_{\text{LF}} C_{\text{eq}})^n} \quad (3)$$

em que q_{max} (mg/g) é a capacidade máxima de adsorção, K_d (mL/mg) é definida como a constante de dissociação e C_{eq} (mg/mL) representa a concentração de proteína na solução de equilíbrio. K_{LF} é a constante de Langmuir – Freundlich, n é o coeficiente de cooperação.

Cooperatividade é definida como a ligação de um ligante a um local em uma proteína que influenciam a afinidade de outros locais. De acordo com Sharma e Agarwal (2002), citado por Sousa (2009), quando $n=1$ não existe cooperativa entre as proteínas, ou os sítios são independentes e para $n > 1$ e $n < 1$ indicam, respectivamente, cooperatividade positiva e negativa associada ao sistema (SHARMA; AGARWAL, 2002; SOUZA, 2009).

2.4 Experimentos em leito fixo

Ensaio de adsorção em leito fixo (adsorção/lavagem/eluição/regeneração) foram efetuados utilizando uma configuração composta por uma coluna de aço inoxidável (0,46 cm x 12 cm) e uma bomba de cromatografia líquida de alto desempenho (Varian ProStar 210) acoplado com um coletor de fração (C-660 Buchi, Suíça).

Em cada experiência, uma quantidade em massa foi obtida através da pesagem da coluna primeiramente vazia e após o empacotamento sem compressão com o adsorvente de 0,998 g de HDL Zn-Al e 0,683 g de HDL Mg-Al para se obter uma altura de leito de 12 cm.

Para iniciar o ciclo de experimentos a coluna já empacotada com o adsorvente HDL Mg-Al foi lavada com tampão de acetato de sódio (50 mM) a pH 4,8 a uma vazão de 1,0 mL/min e temperatura de 22 °C. Em seguida, sob a mesma taxa de fluxo, soluções de BSA (1,0 - 2,0 mg/mL) em tampão acetato de sódio pH 4,8 (50 mM) foram bombeadas para a coluna.

A fim de controlar o avanço de proteína, alíquotas de 5 mL foram recolhidas na saída da coluna e analisadas por detector UV/Vis. Após a concentração de saída da coluna com HDL Mg-Al se aproxima de um patamar, ou seja, a saturação da coluna, a alimentação da coluna foi trocada para uma solução com somente tampão acetato de sódio pH 4,8 (50 mM) (etapa de lavagem) durante o tempo suficiente para detectada em leitura no espectrofotômetro a concentração de proteínas caindo (acerca de 30 min).

Em seguida, a alimentação foi trocada novamente por uma solução de tampão fosfato (passo de eluição), durante 60 min, de modo a assegurar a completa dessorção da proteína. Finalmente, a coluna foi regenerada com solução 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4,8 (30 min), seguido por água Milli-Q e o tampão acetato de sódio pH 4,8 (50 mM), em seguida, para restaurá-la à sua condição inicial para um novo experimento.

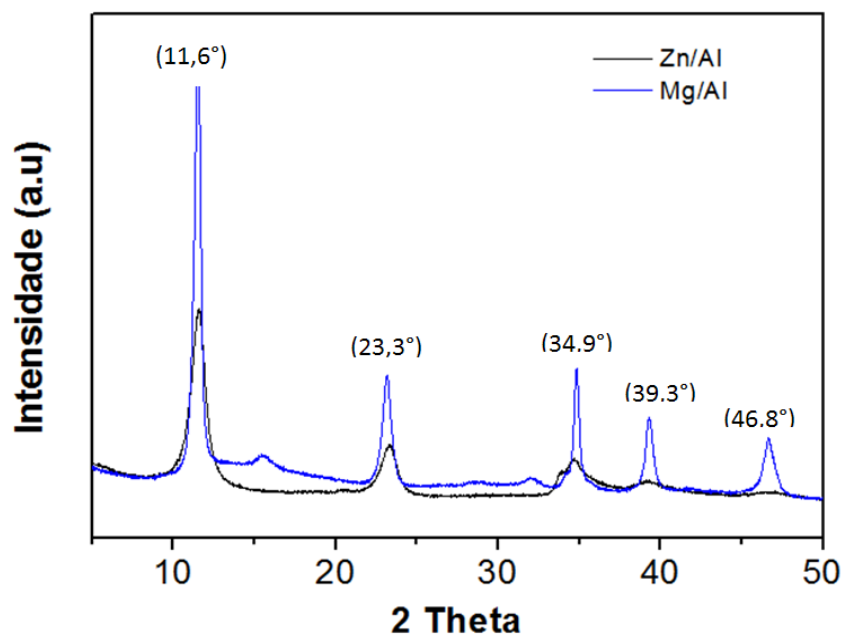
Para o adsorvente HDL Zn-Al o procedimento foi realizado de forma semelhante, porém o tampão utilizado foi MES pH 6,7 (50mM) para as etapas de alimentar a coluna, regenerar a coluna e lavar a coluna. O tampão fosfato também foi utilizado para eluição da coluna. Um balanço de massa (BM) foi obtido para cada etapa de cada experimento.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Caracterizações

O difratograma para os HDLs Mg-Al e Zn-Al são mostrados na Figura 2. Ambos os materiais possuem picos de difração semelhante localizados em $2\theta = 11,6; 23,3; 34,9; 39,3$ e $46,8^\circ$ o que determina o tipo de material como hidróxido duplo lamelar (ICSD: 98-008-1963) (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991) na forma de $Mg_4Al_2(CO_3)(OH)_{12}\cdot 3(H_2O)$ e $Zn_4Al_2(CO_3)(OH)_{12}\cdot 3(H_2O)$ respectivamente.

Figura 2 – DRX do HDL Mg-Al (—) e HDL Zn-Al (—)



Fonte: Autora (2016).

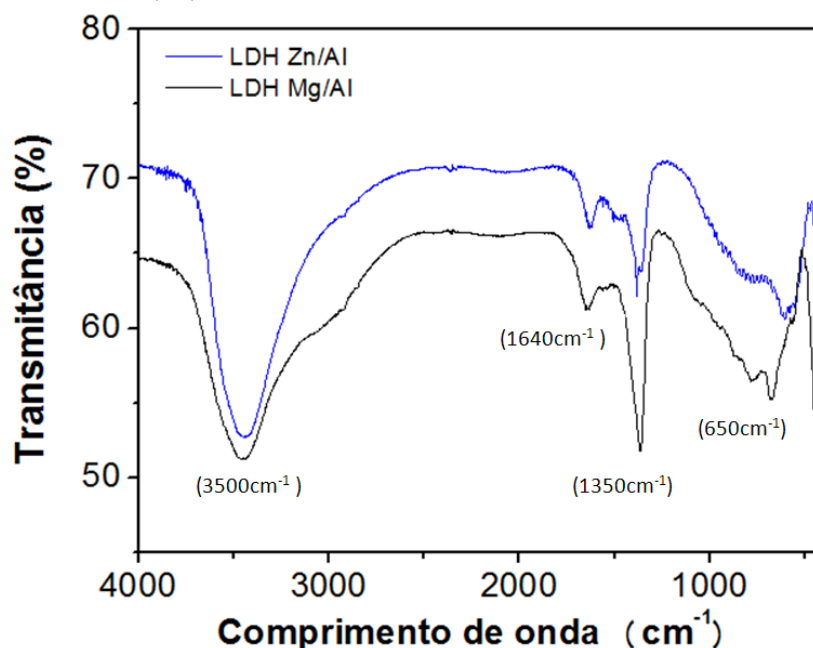
Os picos de difração são ligeiramente deslocados entre eles. Este fato é atribuído ao Mg^{2+} possuir raio atômico de $0,72 \text{ \AA}$ enquanto o raio do Zn^{2+} é $0,74 \text{ \AA}$ o que promove pequenas modificações nos parâmetros de célula unitária como foi determinado pelo método de Rietveld ($a=b=3,05 \text{ \AA}$ e $c=22,91 \text{ \AA}$ para o HDL Mg-Al e $a=b=3,06 \text{ \AA}$ e $c=22,87 \text{ \AA}$ para o HDL Zn-Al). Estes resultados estão em acordo com o padrão disponível em ICSD-6296 (MILLS *et al.*, 2012) que mostram os mesmos parâmetros a e b e $22,81 \text{ \AA}$ para o parâmetro de plano c. Para o HDL Mg-Al outras bandas foram localizadas em $2\theta= 15,6$ e $32,0$ o qual tem sido descritos para a presença de mineral na forma de $NaAl(CO_3)(OH)_2$ (ICSD: 98-008-1963). A fase de segregação é somente notada no caso do HDL Mg-Al, sendo atribuído ao fato

da ocorrência de precipitação de cátions Mg^{2+} em pH ligeiramente diferentes. O método de Williamson-Hall foi utilizado para estimar o tamanho do cristal de ambos os HDLs. Os valores encontrados foram de 9 nm para HDL Zn-Al e 19 nm para HDL Mg-Al indicando pequeno tamanho de partícula e alta área disponível para ambos os materiais.

A Figura 3 mostra a espectroscopia de infravermelho (FTIR) para os HDLs antes do processo de adsorção. Os espectros para ambos os materiais mostram uma larga banda entre 3900 e 2700 cm^{-1} , que é associado à ligação de hidrogênio nos grupos hidróxidos nas lamelas dos materiais. A presença do pico em aproximadamente 3000 cm^{-1} é atribuída a ligação de hidrogênio entre água com o ânion do espaço interlamelar. Os espectros também mostram a banda em 1640 cm^{-1} , que é atribuída a banda de deformação da água (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991; LV *et al.*, 2012).

Também é observado nos espectros uma sequência de bandas na região entre 1500 cm^{-1} e 700 cm^{-1} que representa a presença da espécie carbonato. Então as bandas localizadas em $670\text{-}690\text{ cm}^{-1}$, $1350\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$, $850\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ e $1060\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos aos modos de vibração do íon carbonato CO_3^{2-} (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991). E, finalmente, as bandas localizadas abaixo de 650 cm^{-1} representam a translação do Mg/Al-OH, Al-OH translação e Al-OH deformação, enquanto que a translação Zn-OH é localizada em 613 cm^{-1} (JIN *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2012).

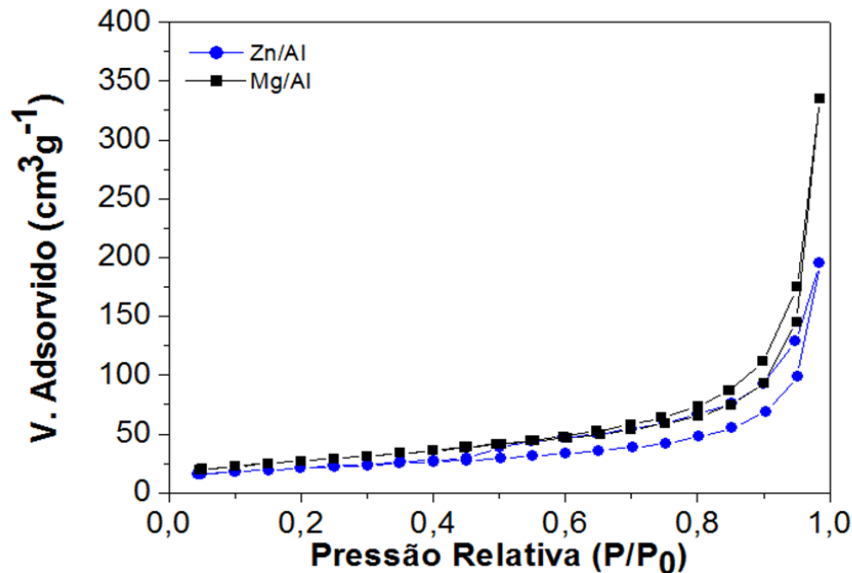
Figura 3 – Espectroscopia de Infravermelho FTIR do HDL Mg-Al (—) e HDL Zn-Al (—)



Fonte: Autora (2016).

As propriedades de textura para os HDLs Mg-Al e Zn-Al foram avaliados a partir das isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a -196°C (Figura 4).

Figura 4 – Isoterma de adsorção – dessorção de N₂ a -196°C para o HDL Mg-Al (■) e HDL Zn-Al (●)



Fonte: Autora (2016).

De acordo com a classificação IUPAC, ambos os materiais exibem uma isotérmica de tipo II com um ciclo de histerese H3 que corresponde a sólidos com agregados de partículas em forma de placa com poros em forma de fenda (ROUQUEROL; ROUQUEROL, 2014).

A área de superfície específica de ambos os HDLs foi estimada pela equação BET (ROUQUEROL; ROUQUEROL, 2014) (Tabela 2).

Tabela 2 – Propriedades dos adsorventes HDL Mg-Al e Zn-Al e propriedades de materiais reportados na literatura

Amostras	SBET [m ² /g]	VP [cm ³ /g]	D [nm]	Referências
HDL Mg-Al	74	0,45	24,0	Neste Trabalho
HDL Mg-Al	61,4	0,48	24,6	Ralla <i>et al.</i> (2011)
HDL Zn-Al	38,8	0,56	17,0	Neste Trabalho
HDL Zn-Al	32,0	0,14	51,5	Seftel <i>et al.</i> (2008)

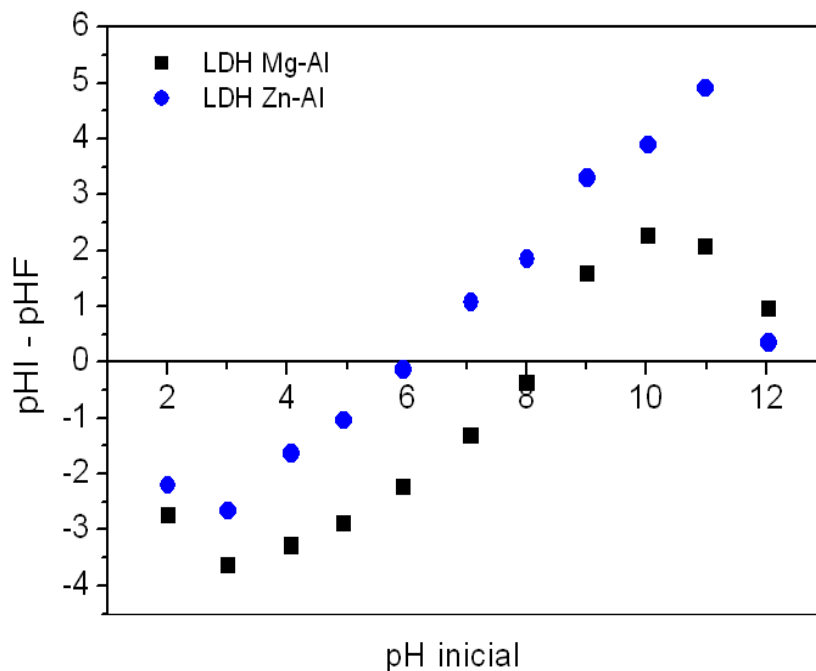
Fonte: Autora (2016).

Estes materiais exibem uma área superficial de 74 m²g⁻¹ e 39 m²g⁻¹ para o HDL Mg-Al e HDL Zn-Al, respectivamente. Ambas as isotermas revelam adsorção de N₂ em baixas pressões relativas P/P₀, indicando que a área superficial é principalmente atribuída ao espaço interpartícula entre as pequenas partículas de HDLs (BENITO *et al.*, 2006). Estes

resultados estão de acordo com a literatura (AUXILIO *et al.*, 2009; LAZARIDIS; KARAPANTSIOS; GEORGANTAS, 2003; RALLA *et al.*, 2011; SEFTEL *et al.*, 2008) que confirma o sucesso na formação de ambos os HDLs.

O resultado da análise de pH_{ZPC} para ambos os materiais é apresentado na Figura 5.

Figura 5 – pH_{ZPC} do HDL Mg-Al (■) e HDL Zn-Al (●)



Fonte: Autora (2016).

No caso de o Mg-Al HDL, a pH_{ZPC} é próximo de 8,0, enquanto que para o HDL Zn-Al é próximo de 6,0. Abaixo destes valores, HDLs retêm espécies H^+ na superfície levando a uma carga positiva que favorece a interação com espécies aniônicas (FERREIRA, 2009).

Esta protonação tem lugar sobre os grupos OH^- do HDL e as espécies carbonato localizadas no espaço entre as lamelas. Acima de seus pH_{zpc} há libertação de espécies H^+ , promovendo a carga negativa na superfície da HDL por desprotonação dos grupos OH , que favorece a afinidade com espécies catiônicas. Por outro lado, é conhecido que as proteínas possuem um ponto isoelétrico, que é o pH que tem uma carga positivas e negativas em equilíbrio na superfície da proteína e uma maior interação com superfícies sólidas (FERREIRA, 2009).

Os valores de pI e pH_{ZPC} podem definir a interação de cargas entre a HDL e a proteína a um dado pH.

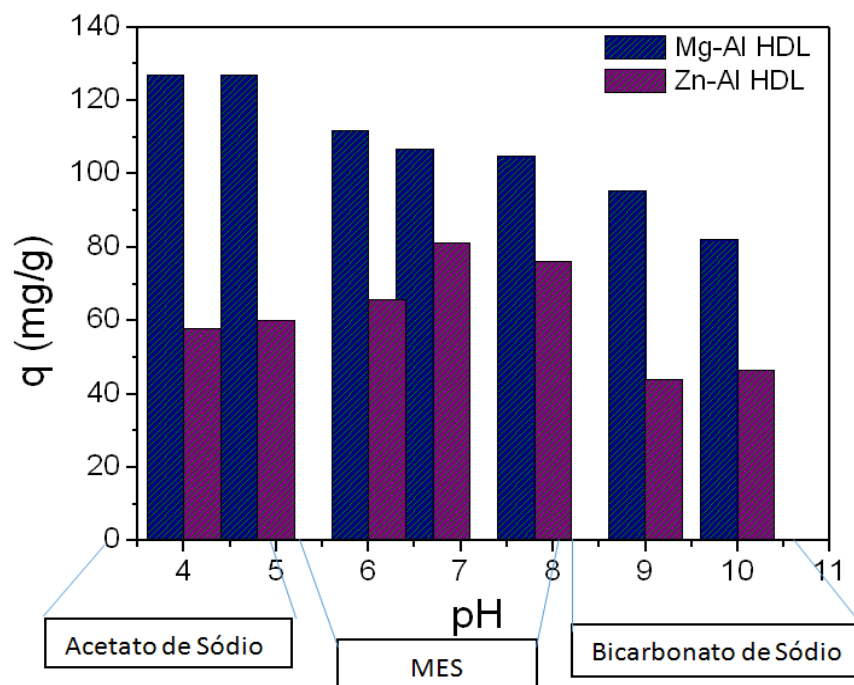
2.5.2 Ensaios de Adsorção

2.5.2.1 Efeito do pH na adsorção de BSA em Mg-Al e Zn-Al HDL

O pH é um importante parâmetro a ser investigado no processo de adsorção visto que pequenas variações em seu valor podem promover alterações significativas nas interações entre adsorvente e proteína, bem como mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (BELLEZZA *et al.*, 2009).

De modo a investigar a influência do pH sobre a adsorção de BSA em HDLs Mg-Al e Zn-Al experimentos foram realizados variando o pH de soluções de acetato e tampão MES. De acordo com os resultados dos dados de adsorção (Figura 6), a maior quantidade adsorvida foi obtida a pH 4,8 utilizando tampão acetato de sódio 50 mM para o material HDL Mg-Al. Este valor está próximo do pI da BSA que é 4,8 em que a carga líquida da superfície é nula, neste mesmo valor de pH o HDL Mg-Al está carregado positivamente.

Figura 6 – Adsorção de BSA em HDL Zn/Al (■) e HDL Mg/Al (■) sob influência de diferentes sistemas tamponantes, tempo de contato 2 h, massa de adsorvente 20 mg



Fonte: Autora (2016).

O que sugere que o processo de adsorção é favorecido pela interação eletrostática e da ligação de hidrogênio entre as espécies neutras de BSA e HDL Mg-Al. Este adsorvente

torna-se positivamente carregado pela protonação das espécies CO_3^{2-} localizadas no espaço entre as lamelas. Assim, ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos HDLs e os grupos amino e carbonila de BSA.

Para o HDL Zn-Al, a maior quantidade adsorvida ocorre no tampão MES 50 mM no pH 6,7. Para este caso a morfologia da BSA é modificada, possuindo predominantemente cargas negativas em sua superfície, enquanto o HDL está ligeiramente protonada indicando interação iônica entre o adsorvente e a proteína (FERREIRA, 2009; YOU; VANCE; ZHAO, 2001).

De acordo com Ralla *et al.* (2011), proteínas como BSA são bem adsorvidas perto de seus pontos isoelétricos em superfícies catiônicas. Zhang *et al.* (2013) também mostram a influência do pH para adsorção de BSA sobre a superfície carregada de HDL modificado. Quando o pH foi aumentado para além de 4,8, houve uma redução da quantidade adsorvida no HDL de forma constante, devido à competição dos grupamentos da proteína com íons hidróxido na superfície do adsorvente.

Jin *et al.* (2012) também relatam influência do pH na adsorção de proteínas em suporte inorgânico como HDL onde a BSA exibe uma adsorção máxima no ponto isoelétrico. Portanto, sugere-se que a carga da superfície da proteína e a carga dos suportes pode se dar através de interação complementar para que a adsorção ocorra. Todos esses fatos estão de acordo com o comportamento de adsorção de BSA para Mg-Al HDL deste trabalho.

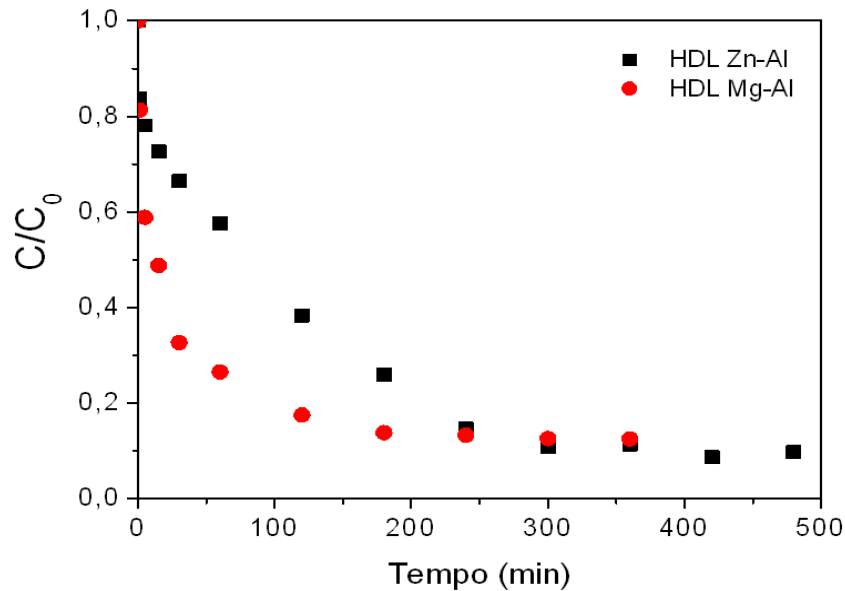
O comportamento diferente entre o processo de adsorção do HDL de Zn-Al e o HDL de Mg-Al no que respeita à quantidade adsorvida não é devido à diferença nas áreas superficiais, mas da diferente densidade de carga na superfície dos HDLs. O HDL de Zn-Al é ligeiramente protonado no pH 6,7 e BSA é negativamente carregado a um pH acima do seu ponto isoelétrico (pI). Sabe-se também que para BSA as cargas negativas não são uniformemente distribuídas (FERREIRA, 2009). Em adição com as contribuições de outras interações como ligação de hidrogênio ou interação de Van der Waals, favorecendo a adsorção para este determinado material (HDL Zn-Al).

2.5.2.2 Cinéticas e isotermas de adsorção de BSA em HDL Mg-Al e Zn-Al

Os experimentos de cinética e isoterma de equilíbrio foram realizados nas condições de pH que promoveram a maior quantidade adsorvida, ou seja, tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,8 para HDL Mg-Al e tampão MES 50mM a pH 6,7 para o HDL Zn-Al. O perfil cinético mostrado na Figura 7, revela que os HDLs Mg-Al e Zn-Al alcançam as

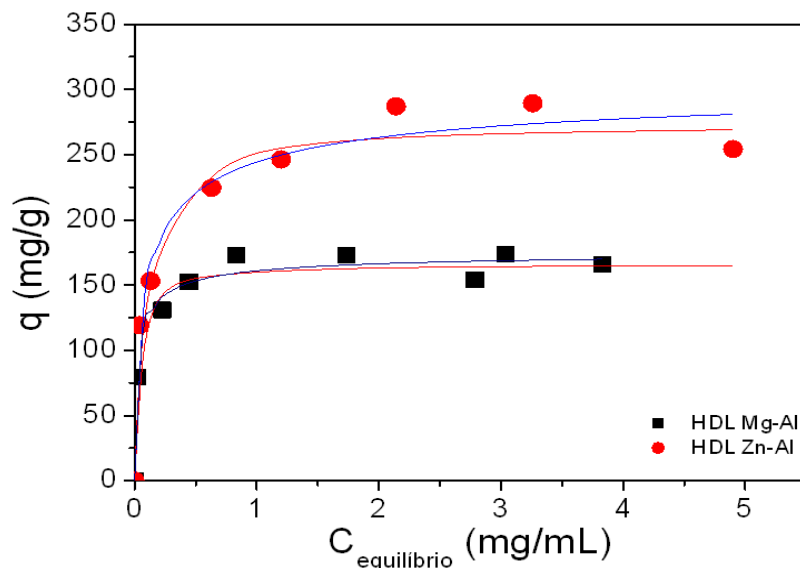
condições de equilíbrio após 240 min. As isotermas de adsorção de BSA em ambas as HDLs são mostrados na Figura 8.

Figura 7 – Cinética de adsorção de BSA em HDL Zn/Al (■) no tampão MES pH 6,7, e em HDL Mg/Al (●) no tampão Acetato de sódio pH 4,8



Fonte: Autora (2016).

Figura 8 – Isotermas de adsorção de BSA em HDL Zn-Al (●) em tampão MES 50mM a pH 6,7 e em HDL Mg-Al (■) em tampão acetato de sódio 50mM a pH 4,8 em temperatura ambiente e tempo de contato de 240 min



Fonte: Autora (2016).

Ambas as isotermas de adsorção exibem um típica isoterma favorável (tipo L) com uma inclinação acentuada inicial que indica fortes interações químicas entre a BSA e os

adsorventes. As isotermas mostram que o HDL Zn-Al exibe capacidade de adsorção maior do que o HDL Mg-Al, em acordo com os dados cinéticos apresentados na Figura 7.

Os modelos de isotermas Langmuir e Langmuir-Freundlich foram aplicados nos dados obtidos experimentalmente. Os parâmetros estimados são resumidos na Tabela 3. Todos os modelos de isotermas exibiram valores de q_{\max} e K semelhantes. O modelo de Langmuir-Freundlich apresenta um parâmetro de heterogeneidade n, quando este valor é mais próximo de 1 o modelo de Langmuir-Freundlich é reduzido para o modelo de Langmuir.

Tabela 3 – Parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich

Parâmetros	HDL Zn-Al		HDL Mg-Al	
	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Langmuir	Langmuir-Freundlich
q_{\max} (mg/g)	$338,74 \pm 11,43$	$346,54 \pm 15,19$	$196,12 \pm 6,06$	$197,80 \pm 6,56$
k_D (L/mg)	$1,07 \pm 0,15$	-	$1,76 \pm 0,25$	-
k_{DLF} (L/mg)	-	$1,02 \pm 0,16$	-	$1,74 \pm 0,26$
n	-	$0,95 \pm 0,08$	-	$0,97 \pm 0,07$
R ²	0,984	0,983	0,985	0,984
χ^2	147	155	335	363

Fonte: Autora (2016).

De fato, tal como apresentado na Tabela 3, os valores para n são próximos da unidade e os valores de q_{\max} estimados pela equação de Langmuir foram aproximadamente 339 mg g^{-1} para Zn-Al HDL e 197 mg.g^{-1} para Mg-Al HDL. Em vista disso, conclui-se que o comportamento de adsorção de BSA em HDLs Mg-Al e Zn-Al podem ser bem descrita pela equação de Langmuir.

Os resultados obtidos estão de acordo com dados relatados na literatura onde Jin *et al.* (2012) avaliaram o efeito da concentração, pH e força iônica sobre a adsorção de proteínas (albumina de soro bovino, lisozima e hemoglobina) usando partículas de ouro incorporadas em material hidróxido duplo lamelar. Este estudo afirma que a capacidade de adsorção está diretamente relacionada com o pH do meio de adsorção, alcançando a adsorção máxima quando o pH está perto do ponto isoelétrico da proteína alvo. Sob estas condições, as interações iônicas dos grupos amino, tiol e carboxila são acentuadamente reduzidas, minimizando o efeito repulsivo entre as biomoléculas.

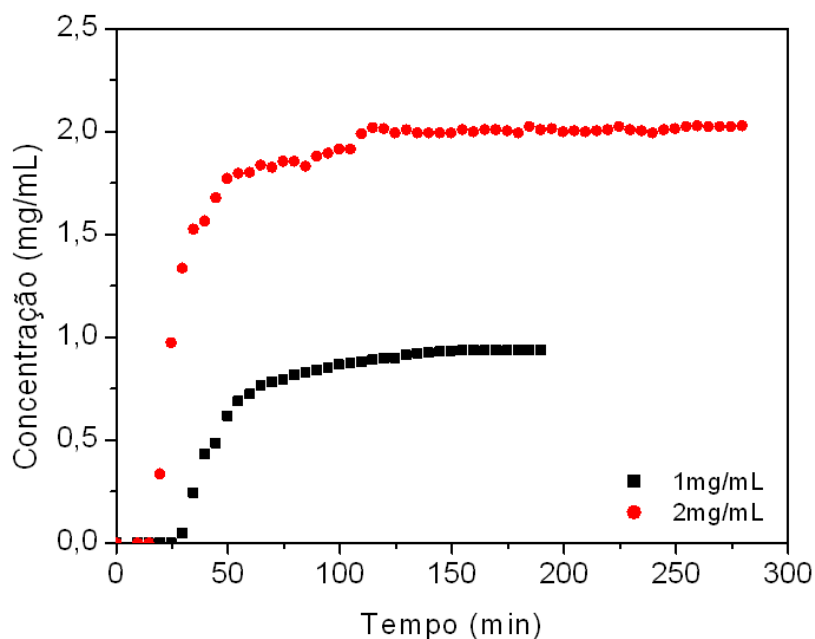
Da mesma forma, Bellezza *et al.* (2012) sintetizaram nanopartículas de hidrotalcitas com diferentes composições químicas (Ni-Cr, Ni-Al, Zn-Cr e Zn-Al), para a adsorção de duas proteínas (mioglobina e albumina de soro bovino), utilizando dois diferentes pHs (6.0 e 9.0). Estes autores também observaram influência do pH sobre a capacidade adsorção, concluindo que processo de adsorção é impulsionado por interação iônica entre a

carga de proteína e o adsorvente. Conclusões semelhantes foram relatadas por Ralla *et al.* (2011) na adsorção de albumina do soro humano em HDL.

2.5.2.3 Adsorção dinâmica de BSA em Zn-Al HDL e Mg-Al HDL

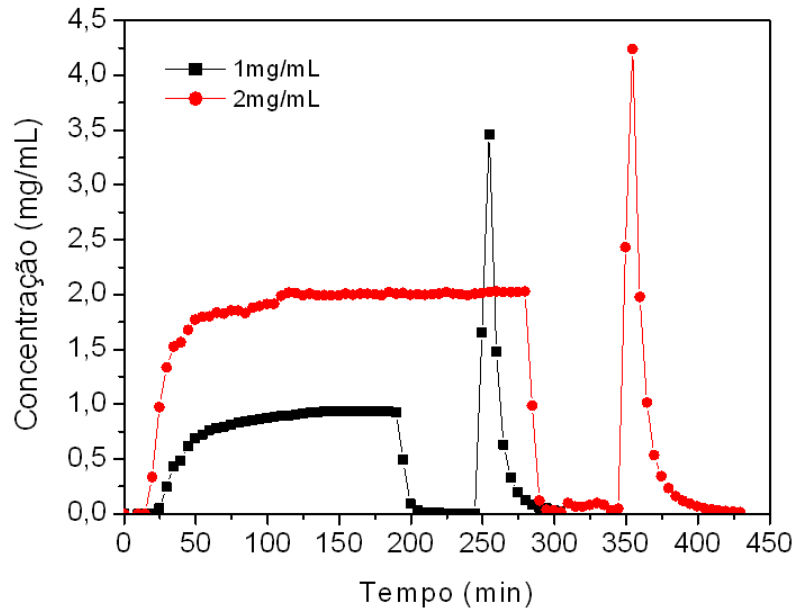
As Figuras 9 e 11 mostram as curvas de ruptura experimentais da BSA para HDLs Zn-Al e Mg-Al em diferentes concentrações de alimentação. Em acordo com os experimentos em batelada, HDL Zn-Al exibe quantidade maior de proteína total calculada do que HDL Mg-Al, este valor foi obtido através de balanço de massa apresentado na Tabela 4 mais adiante. Também pode ser mencionado um comportamento semelhante para ambas as curvas de ruptura, como esperado, o *breakpoint* para a solução menos concentrada ocorre mais tarde do que da solução mais concentrada devido à rápida saturação dos sítios disponíveis do HDL com o aumento na quantidade de BSA disponível para a coluna. A forma da curvatura obtida nos ensaios é muito semelhante para ambos os materiais; uma banda reduzida foi observada para os ensaios com solução menos concentrada, provavelmente devido aos efeitos reduzidos de dispersão axial.

Figura 9 – Curva Breakthrough de BSA em HDL Zn-Al em diferentes concentrações iniciais de alimentação. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL (■) e 2 mg/mL (●); vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão MES 50 mM a pH 6,7 e BSA



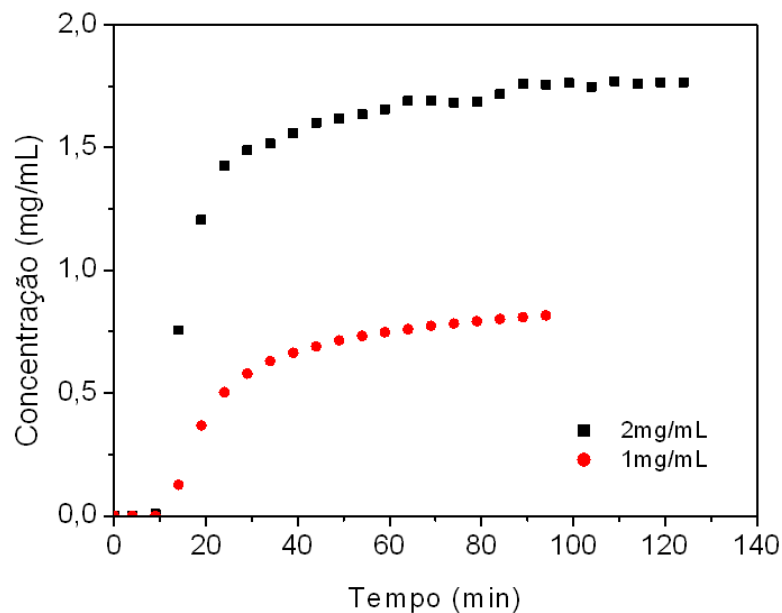
Fonte: Autora (2016).

Figura 10 – Ensaio de adsorção/dessorção de BSA em HDL Zn-Al. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL (■) e 2 mg/mL (●); vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão MES 50 mM a pH 6,7 e BSA; dessorção com solução tampão de fosfato 50 mM a pH 12



Fonte: Autora (2016).

Figura 11 – Curva Breakthrough de BSA em HDL Mg-Al em diferentes concentrações iniciais de alimentação. Condições experimentais: Concentração de alimentação de 1 mg/mL (■) e 2 mg/mL (●); vazão de alimentação de 1 mL/min; temperatura de 22 °C; comprimento da coluna de 12 cm e diâmetro interno de 0,46 cm; solução de alimentação de tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,8 e BSA



Fonte: Autora (2016).

Ensaio de adsorção/eluição foram realizados a fim de avaliar a regenerabilidade do HDL. Para este objetivo, a eluição da BSA pode ser realizada através da utilização de tampão de eluição que deve ser cuidadosamente examinado. Bellezza *et al.* (2012) relataram a dessorção de hemoglobina a partir de HDL Mg-Al por várias soluções tampões e condições de pH usando um sistema em batelada, foi visualizada a dessorção de hemoglobina em 72% usando tampão de fosfato a um pH de 12. Também é relatado que HDLs exibem uma alta afinidade por sais de fosfato (VIOLANTE *et al.*, 2009). O uso de um pH mais elevado é atribuído à perda de carga positiva de HDL e uma diminuição das interações eletrostáticas em conjunto com a perda da capacidade para adsorver proteínas devido a modificações na estrutura do HDL com a adição de fosfato. Para obter o efeito esperado, foi decidido usar tampão fosfato a pH 12 como tampão de eluição.

Os balanços de massa para ensaios de adsorção em coluna são apresentados na Tabela 4 e 5.

Tabela 4 – Balanço de Massa (BM) da adsorção de proteína em HDL Mg-Al em cada etapa: injeção, adsorção, lavagem, eluição e regeneração

Etapas	Concentração			
	C ₀ = 1 mg/mL		C ₀ = 2 mg/mL	
	BSA (mg)	%	BSA (mg)	%
Solução Inicial (Massa entrada)	90,32	100	242,69	100
Adsorção	56,46	63,56	185,15	76,29
+	+	+	+	+
Lavagem	4,00	4,50	7,47	3,08
+	+	+	+	+
Eluição	25,77	29,02	41,84	17,23
+	+	+	+	+
Regeneração	0,18	0,21	0,79	0,34
=	=	=	=	=
Balanço de Massa	86,41	97,29	235,87	96,94
Erro (+/-)	2,63	2,93	7,44	3,06

Fonte: Autora (2016).

Tabela 5 – Balanço de Massa (BM) da adsorção de proteína em HDL Zn-Al em cada etapa: injeção, adsorção, lavagem, eluição e regeneração

Etapas	Concentração			
	C ₀ = 1 mg/mL		C ₀ = 2 mg/mL	
	BSA (mg)	%	BSA (mg)	%
Solução Inicial (Massa entrada)	176,77	100	565,92	100
Adsorção	131,85	74,59	499,35	88,24
+	+	+	+	+
Lavagem	3,36	1,90	8,86	1,57
+	+	+	+	+
Eluição	40,39	22,85	56,14	10,10
+	+	+	+	+
Regeneração	0,31	0,18	0,17	0,03
=	=	=	=	=
Balanço de Massa	175,91	99,52	564,52	99,94
Erro (+/-)	1,17	0,66	0,58	0,10

Fonte: Autora (2016).

No caso do material HDL Zn-Al, não só as maiores adsorções em equilíbrio foram obtidas, mas também a maior recuperação após a eluição com tampão de fosfato, com menos de 1% da quantidade alimentada de BSA restante na coluna no final de um ciclo completo, em comparação com 3% de HDL Mg-Al. Estes resultados indicam que a HDL pode ser utilizado como uma fase estacionária atraente para purificação de proteínas cromatografia.

2.6 Conclusão

Os hidróxidos duplos lamelares foram sintetizados pelo método de coprecipitação. Para o material HDL Zn-Al, obteve-se uma área superficial de 38,8 m²/g e um diâmetro de poro de 17,5 nm. Já para o HDL Mg-Al, a área superficial foi de 74 m²/g e o diâmetro de poro 24 nm. Assim, o material adsorvente obtido, em ambos os casos, possui significativas propriedades texturais e estrutura característica de hidróxidos duplos lamelares.

Os experimentos em batelada para avaliação da influência do pH mostraram que no pI da BSA (pH 4,8) o HDL Mg-Al adsorve cerca de 130 mg/g e o material HDL Zn-Al, devido a distribuição de cargas, adsorve cerca de 80 mg/g no pH 6,7 para o tempo de contato de 2 horas, em que para o material HDL Zn-Al ainda não se estabeleceu o equilíbrio assim o pH influência fortemente na capacidade de adsorção da biomolécula estudada devido as mudanças conformacionais e interações eletrostáticas do adsorvente (HDL) e do adsorbato (BSA).

Os estudos de cinéticas mostraram que o sistema em batelada alcança o equilíbrio em torno de 240 min e as isotermas de adsorção de BSA para ambos os materiais foram bem descritos utilizando o modelo de Langmuir-Freundlich com capacidade máxima de adsorção de 197,8 mg/g para o HDL Mg-Al e 346,54 mg/g para o HDL Zn-Al.

Na operação utilizando o leito fixo é possível concluir que utilizando uma maior quantidade de proteína disponível (2 mg/mL) para a adsorção torna o processo mais eficiente. Este sistema permite uma alta taxa de recuperação da proteína injetada, este fato pode indicar que há uma relação entre a quantidade de proteína injetada e altas taxas de recuperação no sistema de leito fixo.

Estes resultados confirmam que os hidróxidos duplos lamelares são adsorventes atrativos para processos de extração e purificação de proteínas se mostrando eficaz na adsorção de proteínas padrão.

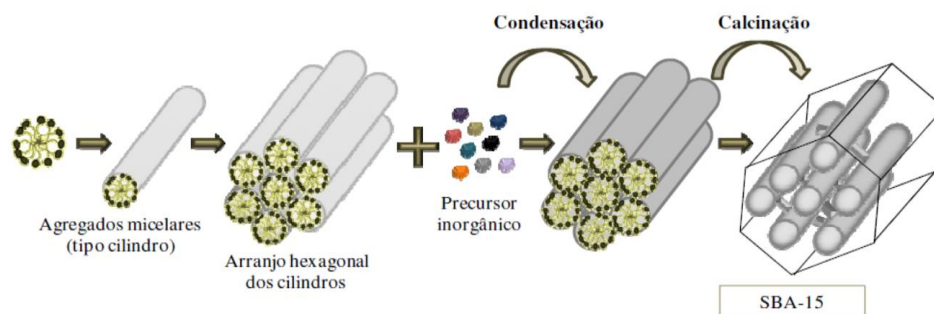
3 SBA-15

3.1 Introdução

Em 1998 foi sintetizada uma nova família de sílicas mesoporosas altamente ordenadas, denominada Santa Bárbara Amorfa (SBA) empregando surfactantes oligoméricos não iônicos de polióxido de etileno (PEO) e copolímeros bloco de polióxido de alquileno como agentes direcionadores de estruturas ou moldes, em meio ácido. Esses novos materiais com tamanhos de poros entre 2 e 30 nm foram identificados como estruturas cúbicas (SBA-11), hexagonal 3D (SBA-12), hexagonal (SBA-15) e cúbica em forma de gaiola (SBA-16). O material SBA-15 possui maior estabilidade hidrotérmica, térmica e mecânica em relação aos outros materiais, tornando-se um popular material de estudo com potenciais aplicações (ZHAO *et al.*, 1998).

Recentemente muitas mudanças na estratégia de síntese desse material vêm sendo desenvolvidas, objetivando a formação de um adsorvente com alto desempenho com o intuito de facilitar aplicações práticas da SBA-15 (DOADRIO *et al.*, 2014; LÓPEZ-SANZ *et al.*, 2012). As etapas de formação do material mesoporoso SBA-15 são apresentadas na Figura 12.

Figura 12 – Esquema de formação de estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura



Fonte: Hoffmann *et al.* (2006).

Existem muitas propostas de mecanismos para explicar a formação de materiais mesoporosos, fornecendo base para o estabelecimento de diversas rotas de síntese. Em linhas gerais, os silicatos mesoporosos são preparados a partir de uma fonte de sílica, um surfactante e um solvente misturados em quantidades apropriadas. Outros reagentes que podem ser usados são ácidos, bases, sais, agentes dilatadores e co-solventes, dependendo das condições de síntese podem-se obter diferentes materiais (CIESLA; SCHÜTH, 1999).

Entre os reagentes utilizados para sintetizar os materiais mesoporosos ordenados de sílica, o surfactante age como um agente estruturador direcionando a forma, na qual se dará a condensação da fonte da estrutura. Uma forma bastante comum de realizar a síntese é com a etapa de diluição do surfactante, geralmente em concentrações baixas, ocasionando a formação da micela. Em seguida, a fonte de sílica é adicionada à solução e um ácido ou uma base desencadeiam a polimerização da sílica. As interações entre a sílica polimerizada e a micela resultam em uma reação de precipitação e o produto obtido é a mesoestrutura, comportando-se como um sistema binário água-tensoativo. Em seguida remove-se o tensoativo por calcinação, extração com solvente adequado ou tratamento com ozônio-UV. Este é o método usado na formação dos materiais da família do M41S e do SBA.

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que devido as características dos materiais mesoporosos ordenados estes podem ser utilizados como catalisadores (MARCOUX; FLOREK; KLEITZ, 2015; PANG *et al.*, 2016), na adsorção de biomoléculas (SANTOS *et al.*, 2013), na medicina através da libertação prolongada de proteínas a partir de materiais mesoporosos ordenados para uma utilização potencial na terapia de várias doenças (por exemplo, doenças ósseas), bem como em compósitos para a regeneração do tecido ósseo (NIETO *et al.*, 2010; WANG, 2009). Dependendo da aplicação deste tipo de material, uma interação fraca ou forte entre a proteína e as superfícies dos materiais mesoporosos ordenados é requerida. As interações responsáveis pela adsorção de proteínas nesses suportes são do tipo eletrostática, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals.

A adsorção de proteínas em materiais hidrofílicos tem forte influência de fatores externos como: carga da proteína, o pH do meio, a carga da superfície e a força iônica. Ferreira (2009) ressalta que de acordo com os grupos ativos na superfície da proteína e as características do meio ocorrerá o predomínio de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, podendo essas zonas estarem positivamente carregadas, negativamente carregadas e neutras, pois a proteína apresenta domínios espaciais com características químicas diferentes.

Mudanças na distribuição de carga da superfície do material, na capacidade de formação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou de Van der Waals ocasionam a formação de uma camada proteica na superfície de determinado material (NORDE; BUIJS; LYKLEMA, 2005). Alguns estudos tem demonstrado que a adsorção de biomoléculas ocorre através de um mecanismo de múltiplas etapas que envolve uma interação inicial local seguida de uma reorientação da biomolécula adsorvida e uma subsequente formação de ligação do adsorbato com a superfície. Porém diferentes condições no processo de adsorção como o pH e

a força iônica podem aumentar ou reduzir a entalpia de um dessas etapas descritas acima na adsorção da proteína (KIM *et al.*, 2011; STERI; MONDUZZI; SALIS, 2013).

No presente trabalho, foi investigado o efeito da força iônica sobre a adsorção da lisozima da clara de ovo de galinha (LYZ) e da albumina de soro bovino (BSA) em SBA-F-TMB (material sintetizado com expensor de poro TMB). Como mencionado, uma alteração da força iônica afeta fortemente a energia envolvida no processo de adsorção, e, portanto, o mecanismo de adsorção das proteínas na sílica mesoporosa (KIM *et al.*, 2011). Além de avaliar a adsorção de proteína, a modificação da superfície da uma matriz adsorvente, através da alteração na síntese permite o desenvolvimento de um material com maior poro e canais curtos são propostos. Assim, a alteração da força iônica na solução proteica vai proporcionar uma alternativa fácil para a modificação na capacidade de adsorção das proteínas.

Portanto, sendo a adsorção de proteína em sílica mesoporosa o principal objetivo deste trabalho, as cinéticas obtidas experimentalmente foram modeladas utilizando o modelo de difusão paralelo com a finalidade de analisar o parâmetro de correlação (a partir da matriz de covariância) entre os parâmetros estimados e assim avaliar a capacidade de adsorção de lisozima e de albumina na sílica mesoporosa do tipo SBA-15 como uma função da concentração de sal (NaCl) no meio.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Proteínas Utilizadas

O adsorbato utilizado no estudo foi a Lisozima (LYS) comprada na Sigma - Aldrich (EUA). Trata-se de uma proteína do ovo de galinha, uma enzima antibacteriana e, devido a esta característica, é amplamente usada em vários campos. Do ponto de vista químico, é uma proteína globular, que consiste em 129 resíduos, é considerada uma biomolécula modelo pequena com um peso molecular de 14,4 kDa, com as dimensões de 30 x 30 x 45 Å. Ela apresenta forma elipsóide que é estabilizada por quatro pontes dissulfeto e seu sítio ativo pode se ligar a seis resíduos de carboidratos para executar a sua função de catalisador. Seu pH isoelétrico é de aproximadamente 11 (KATIYAR *et al.*, 2005; SALIS; BHATTACHARYYA; MONDUZZI, 2010).

O outro adsorbato utilizado foi a BSA (Bovine Serum Albumin) comprada na INLAB (Brasil), tem uma estrutura semelhante a estrutura da HSA (Human Serum Albumin),

com peso molecular de 66,462 kDa e cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos. A BSA também pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada (CARTER; HO, 1994; HIRAYAMA *et al.*, 1990). Com base nos principais experimentos hidrodinâmicos e dispersão de raio X a albumina de soro bovino foi postulada como uma estrutura elipsóide achatada nos polos com dimensões de 140 x 40 x 40 Å (BLOOMFIELD, 1966; WRIGHT; THOMPSON, 1975).

3.2.2 Síntese da Sílica Mesoporosa

Com a finalidade de adsorção das biomoléculas BSA e LYZ foi utilizado o material SBA-F-TMB com poros largos e canais curtos que foi sintetizado por modificação da rota de síntese hidrotérmica descrita por Fulvio, Pikus e Jaroniec (2005). Inicialmente o agente direcionador, o copolímero tribloco P123 e o NH₄F (fluoreto de amônia) foram dissolvidos em 1,7 M HCl (ácido clorídrico aquoso) a 313 K sob agitação magnética, e, em seguida, adicionou-se 1,3,5 trimetilbenzeno (TMB) como agente expensor de poro à solução transparente obtida. Após 30 min, foi adicionado tetraetilortosilicato (TEOS), precursor de sílica, gota a gota. A razão molar final no gel de síntese foi P123/SiO₂/TMB/HCl/NH₄F/H₂O = 1/55/48/350/1,8/11100. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h e, em seguida, colocada em uma autoclave, onde foi tratada hidrotermicamente a 393 K durante 72 h. O sólido foi então filtrado, lavado com água deionizada e seco a 333 K durante toda a noite. O material final é calcinado a 823 K por 5 h para remoção de resíduos.

3.2.3 Caracterização dos Materiais Obtidos

3.2.3.1 Difração de raio x

Difração de raios-X a baixo ângulo (DRX) foi usada para identificar o ordenamento dos sólidos mesoporosos sintetizados. Estes experimentos foram realizados em um difratômetro automatizado X'Pert Pro MPD equipado com um monocromador primário (estritamente monocromática radiação Cu-Kα) e um detector X'Celerator. As medições foram obtidas para 2θ variando de 1-10°.

A determinação da estrutura cristalina de um sólido é dada através da análise por difração de raio X que identifica os planos reticulares dos sólidos, esta identificação das fases

das amostras foi realizada através do programa X'Pert Highscore Plus versão 2.0a e do banco de dados ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

3.2.3.2 *Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier.*

Através da Espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é possível a identificação de grupos funcionais presentes no adsorvente. Os espectros de infravermelho abrangem uma faixa de 4000 à 400 cm^{-1} e foram obtidos em espectrofotômetro Varian 3100. Os interferogramas consistiu de 200 scans, e os espectros foram coletados por meio de um espectro de KBr como pano de fundo. Cerca de 30 mg de uma mistura de cada amostra e KBr a uma proporção em peso de 1: 9, foi colocado no suporte de amostras e, em seguida, os espectros foram recolhidos.

3.2.3.3 *Adsorção de N_2 a -196°C*

A fim de conhecer as propriedades texturais (SBET, V_p e D_p) do material SBA-15 F-TMB foram realizadas análises de adsorção e dessorção de N_2 a -196°C em equipamento automático ASAP 2020 da Micromeritics. Antes das medições, as amostras foram degaseificadas a 200 $^\circ\text{C}$ e 10^{-4} mbar durante a noite. As superfícies foram determinadas usando a equação de Brunauer-Emmett-Teller (BET), assumindo uma secção transversal de 16,2 Å para a molécula de nitrogênio (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). A área de superfície de microporos foi obtida pelo método t-plot de Boer para pressões relativas entre 0,35 e 0,70. A distribuição de tamanho de poro foi calculada pela aplicação do método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) para o ramo de dessorção da isotérmica N_2 . O volume total dos poros foi calculado a partir do N_2 adsorvido em $P/P_0 = 0,996$.

3.2.4 *Experimentos em Batelada*

Ensaio de adsorção foram realizados em sistemas de batelada a fim de avaliar o efeito das soluções de pH, o tempo de contato e da concentração inicial de lisozima e albumina no adsorvente SBA-F-TMB modificado com o expensor de poros TMB e NH_4F .

Todos os ensaios de adsorção foram realizados em duplicata em agitador orbital (Tecnal TE-165, Brasil) à temperatura ambiente. Para avaliação da influência do pH na quantidade adsorvida de LYS e BSA, foram preparadas diferentes soluções de tampão de

50 mM em diferentes pH's. Para os ensaios de pH foram utilizados os seguintes tampões: pH de 4,0 – 4,8 tampão acetato, 6,0 – 7,0 tampão MES, 8,0 – 10,0 tampão TRIS e 10,7 tampão bicarbonato, todos com 50 mM de concentração para a proteína lisozima e os seguintes tampões: pH de 4,0 – 4,8 tampão acetato, 6,0 – 7,0 tampão MES, 7,8 tampão TRIS, todos com 50 mM de concentração para a proteína BSA.

Para a construção das curvas cinéticas, o tempo de contato, entre a solução da lisozima (3,0 mg/mL) ou BSA (3,0 mg/mL) e o adsorvente (15 mg), variou de 0 a 360 min, outro parâmetro que variou foi a concentração de sal NaCl no meio (0 a 0,7 M).

A concentração do sobrenadante foi lida por meio de um espectrofotômetro UV a 280 nm, após centrifugação por 10 min e 10000 rpm. A isoterma de adsorção foi determinada variando a concentração de ambas as proteínas de 1,0 a 6,0 mg/mL.

Para os ensaios onde foi avaliado o comportamento da adsorção em meio salino, foram preparadas soluções de tampão acetato de sódio pH 4,8 (50mM) com a proteína BSA dissolvida e também soluções de tampão Tris Hcl pH 10 com a proteína LYZ dissolvida, a estas soluções foi adicionada uma quantidade calculada de NaCl com concentração variando entre 0,1 e 1,0 M e para a construção das isotermas foi realizada a variação da concentração das proteínas de 1,0 a 6,0 mg/mL.

A quantidade de proteína adsorvida para cada concentração de proteína testada foi calculada por meio de um balanço de massa de acordo com a equação 4:

$$q = \frac{V_{\text{sol}}(C_0 - C_{\text{eq}})}{m_{\text{ads}}} \quad (4)$$

em que V_{sol} representa o volume da solução no equilíbrio (mL); C_0 é a concentração inicial de Lisozima (mg/mL); C_{eq} é a concentração no equilíbrio (mg/mL) e m_{ads} representa a massa do adsorvente (g).

As isotermas foram modeladas por Langmuir, conforme equação 5:

$$q = \frac{q_{\text{max}} C_{\text{eq}}}{K_d + C_{\text{eq}}} \quad (5)$$

em que q_{max} (mg/g) é a capacidade máxima de adsorção, K_d (mL/mg) é definida como a constante de dissociação e C_{eq} (mg/mL) representa a concentração de proteína na solução de equilíbrio (BELLEZZA *et al.*, 2012).

3.3 Modelagem

A Difusão de proteínas em materiais porosos é um complexo processo onde efeitos difusionais e as interações na superfície da proteína ocorrem de forma simultânea assim como difusão intrapartícula e difusão na camada limite que podem coexistir (CHEN; DONG; SUN, 2002; YANG; SUN, 2007). Assim isotermas obtidas de forma convencional e estudos de taxa de adsorção são insuficientes para fornecer uma visão do fenômeno de difusão de proteínas.

A teoria difusional apoia-se na Lei de Fick, essa expressa que o fluxo de massa por unidade de área é proporcional ao gradiente de concentração (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 1960).

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial z} \quad (6)$$

em que J é o fluxo de massa, C é a concentração da espécie difundida e D é o coeficiente de difusão.

Considerando um volume de controle no plano (x,y,z), a alteração da massa dissolvida no volume de controle ao longo do tempo seguindo a lei de conservação de massa, teremos a equação tridimensional do processo de difusão (SOCOLOFSKY; JIRKA, 2005):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) = -D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (7)$$

em que a massa dissolvida presente no volume de controle é $\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}$, C representa a concentração da espécie difundida e t é o tempo.

Para a obtenção dos parâmetros de transporte de massa no modelo aplicado são assumidas as seguintes hipóteses:

- a) A partícula é esférica com tamanho e densidade constante, os sítios de adsorção distribuem-se uniformemente na superfície do adsorvente;
- b) As frações de vazio no adsorvente para a proteína é constante durante o processo de adsorção;
- c) O modelo de difusividade efetiva no poro inclui resistência a transferência de massa no filme líquido;
- d) O equilíbrio de adsorção pode ser representado pela equação de Langmuir.

O coeficiente de difusão geralmente é apresentado conforme a equação 8 (CHIANG *et al.*, 1999):

$$D = D_p + \left(\frac{1-\varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) K D_s \quad (8)$$

em que D_p é o coeficiente de difusão no poro, ε_p é a porosidade na partícula, K é a constante de equilíbrio e D_s é a difusividade na superfície.

O modelo paralelo implementado neste trabalho considera que a difusão no poro e na superfície estão ocorrendo em paralelo, conforme apresentado na equação 9 (LIU; YANG; REN, 2006):

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} + D_{ap} \frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_p D_p \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + D_s D_{ap} \left(\frac{\partial^2 q_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial q_i}{\partial r} \right) \quad (9)$$

Onde D_p é o coeficiente de difusão no poro e D_s é o coeficiente de difusão na superfície no modelo de difusão paralelo.

As condições de contorno:

$$r = 0; \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0 \quad (10)$$

$$r = R; \varepsilon_p D_p \frac{\partial c_i}{\partial r} + D_{ap} D_s \frac{\partial q_i}{\partial r} = k_f (c_b - c_i) \quad (11)$$

O balanço de massa na fase líquida:

$$\frac{\partial c_b}{\partial t} = - \left(\frac{3vk_f}{RV} \right) (c_b - c_i) |_{r=R} \quad (12)$$

Condição inicial:

$$t = 0; c_b = c_0 \quad (13)$$

em que c_b é a concentração global de proteínas na fase líquida, k_f é o coeficiente de transferência de massa através do filme líquido, R é o raio da partícula, v é o volume do adsorvente e V é o volume de líquido.

Para as equações é assumido que o gradiente no filme líquido de massa está relacionado com a concentração total de proteína na fase líquida (C_b) e a concentração de proteína dentro dos poros (C_i).

A estimação do coeficiente de transferência de massa foi descrito por Geankoplis (2003) para partículas pequenas, onde o primeiro termo é referente à difusão molecular e o segundo termo é referente às forças gravitacionais:

$$k_f = \frac{2D_{AB}}{d} + 0.31 \left(\frac{\mu}{\rho D_{AB}} \right)^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\Delta\rho\mu g}{\rho^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (14)$$

em que D_{AB} é a difusividade molecular, d é o diâmetro da partícula, μ é a viscosidade da solução, ρ é a densidade da partícula, $\Delta\rho$ é a diferença entre a densidade da partícula e a da solução e g é a gravidade que é dada como constante.

A difusividade molecular do BSA e da lisozima foi estimada pela equação 15 (SKIDMORE; HORTSMANN; CHASE, 1990):

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu(M_A)^{1/3}} \quad (15)$$

em que M_A é a massa molecular da proteína e T é a temperatura absoluta. A difusividade molecular e o coeficiente de transferência de massa no filme foram calculados e usados como valores de entrada no modelo.

O simulador comercial gPROMS foi utilizado como ferramenta para resolver o modelo matemático aplicado neste trabalho. O sistema matemático é composto de equações diferenciais parciais e equações algébricas (DAE). Os domínios radiais são descritos utilizando um método de colocação ortogonal de terceira ordem em elementos finitos (OCFEM).

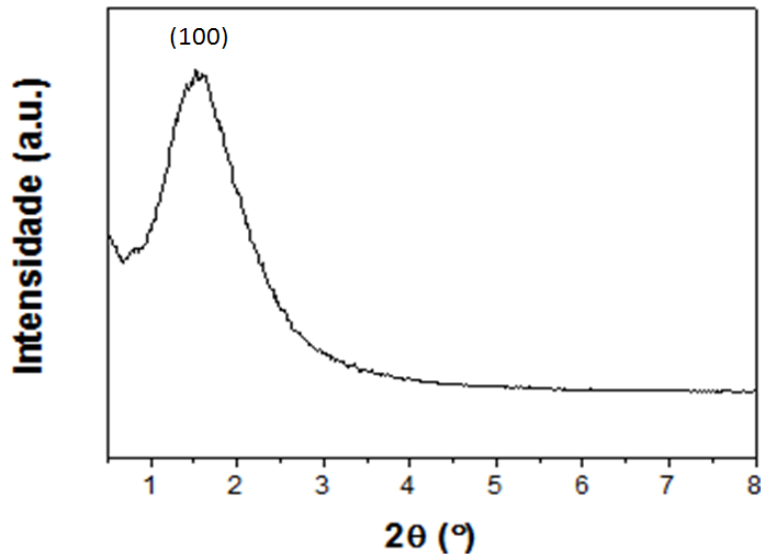
3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Caracterizações

O difratograma de baixo ângulo de SBA-F-TMB da Figura 13 exibe uma banda larga com um máximo de cerca de 2θ ($^\circ$) = 1,3, este valor pode ser atribuído à reflexão D100 o que sugere uma ordenação de longo alcance atestando a mesoporosidade do adsorvente.

Para este material mesoporoso sintetizado com fluoreto, a presença de fluoreto limita o crescimento e a agregação dos mesocanais, desta forma desenvolve materiais com um comprimento menor de poros e uma ordem de longo alcance também menor, o que é indicado pela diminuição drástica do pico de reflexão (100) e diminuição de outros picos característicos do material como (110) e (200) (LETTOW *et al.*, 2000).

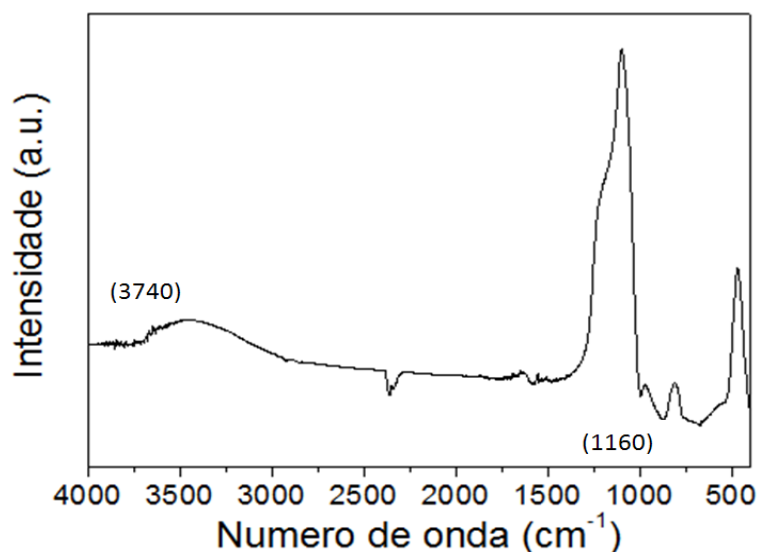
Figura 13 – Difratoograma de raio-x em baixo ângulo para SBA-F-TMB



Fonte: Autora (2016).

As frequências de vibração e seus respectivos papéis no quadro de sílica porosa foram investigadas por espectros FTIR na faixa de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (Figura 14).

Figura 14 – Espectros FTIR para SBA-F-TMB

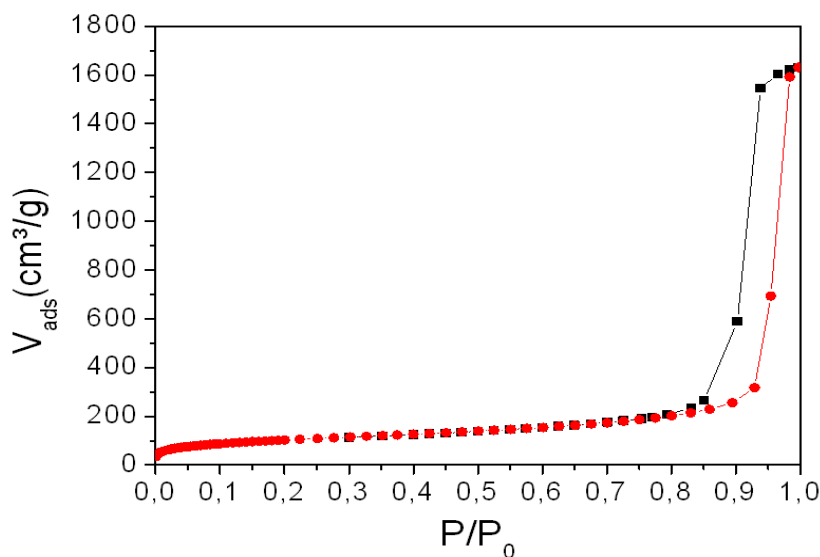


Fonte: Autora (2016).

Os espectros FTIR para a amostra é tipicamente dominada pelo Si-O-Si assimétrica alongamento em 1054 cm^{-1} com um ombro a 1160 cm^{-1} , revelando a existência de uma rede de sílica densa, onde os átomos de oxigênio desempenham o papel das pontes entre dois locais de sílica. As vibrações que ocorrem estiramento simétrico em 805 cm^{-1} foram designadas para o modo de flexão Si-O-Si. A banda a 960 cm^{-1} pode ser atribuída ao Si-O no plano vibrações de alongamento de grupos silanol (Si-OH) gerado pela presença de locais de defeito. As bandas de largura no intervalo de $3740\text{-}3415\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas à sobreposição do O-H no alongamento das bandas de moléculas de água ligadas por hidrogênio (H-O-H) e SiO-H o modo de hidrogênio de silanol da superfície de alongamento ligado a água molecular (SiO-O ... H₂O). A banda acentuada localizado em 3700 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento simétrico do modo de vibração O-H a partir de grupos silanol isolados terminais (VILARRASA-GARCIA *et al.*, 2014).

De acordo com a investigação anteriormente realizada em Santos *et al.* (2016), a adição de espécies de flúor no procedimento sintético limita o crescimento dos meso canais que minimizar os problemas difusionais, bem como provoca uma mudança do ciclo de histerese para uma pressão mais elevada em relação juntamente com uma diminuição da área da superfície e o volume de microporos. As isotermas de sílicas sintetizados com TMB e floreto de amônia (NH₄F) assumem a forma tipo II, em vez do tipo IV típico do SBA-15, o que confirma a perda da estrutura hexagonal evoluindo para uma estrutura de MCF (*mesostructured cellular foam*) como ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – Isotherma de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K para o SBA-15 F-TMB



Fonte: Autora (2016).

Além disso, a incorporação de um agente de expansão de poros tal como TMB leva a um laço de histerese no lugar de mais elevada pressão relativa (P/P_0) que confirma um aumento do volume de poros em comparação com outros SBA-15 como em Santos *et al.* (2016), onde o SBA-15 obtido possuía 16,7 nm de diâmetro de poro e volume de poro 1,65, já o material deste trabalho sintetizado com TMB possui área superficial de 373,17m²/g, volume de poro de 2,52 cm³/g e diâmetro de 27 nm, o material sintetizado pode ser comparado com outros materiais como na Tabela 6 onde é possível observar o aumento do volume de poros em relação a outras materiais.

Tabela 6 – Propriedades texturais de materiais mesoporosos

Amostras	SBET [m ² /g]	VP [cm ³ /g]	D [nm]	Referências
SBA-F-TMB	373,17	2,52	27,0	Neste trabalho
SBA-15 HD**	609	1,65	16,7	Santos <i>et al.</i> (2013)
SBA-15 TMB	579	2,13	11,7	Santos <i>et al.</i> (2013)
MCF-1*	647	1,7	39,2	Kim <i>et al.</i> (2012)

* *mesostructured cellular foam*

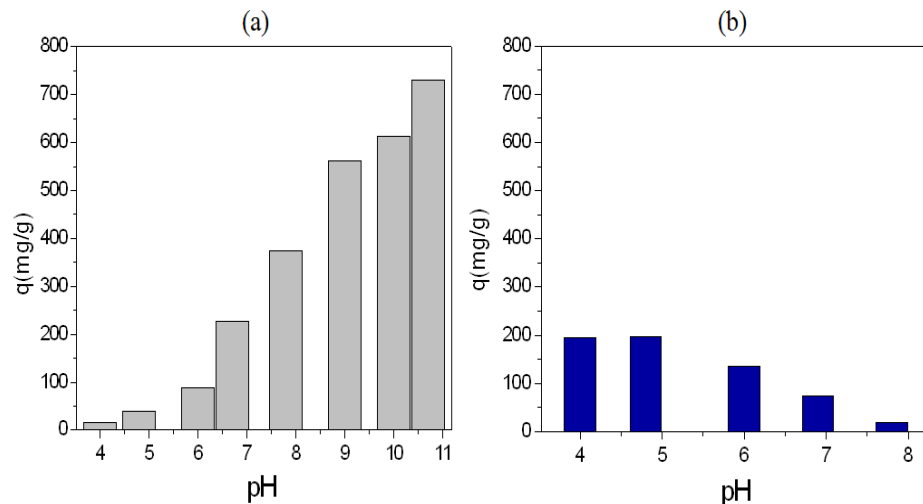
** SBA-15 sintetizado pelo método hidrotérmico sem TMB

Fonte: Autora (2016).

3.4.2 Ensaios de Adsorção

A adsorção das biomoléculas BSA e LYZ em sílica mesoporosa do tipo SBA-15 foi investigada em diferentes valores de pH e os resultados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Adsorção em SBA-15- F-TMB (a) de LYZ (b) de BSA sob influência de diferentes sistemas tamponantes, tempo de contato 2h, massa de adsorvente 15mg



Fonte: Autora (2016).

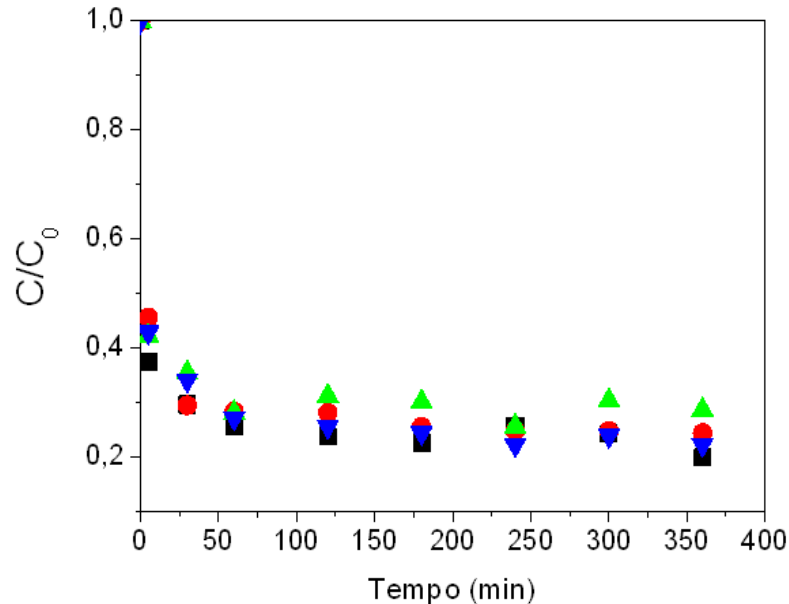
Um importante parâmetro que afeta tanto a adsorção quanto a liberação de proteínas em um suporte é o pH da solução em que ocorre a adsorção. Para investigar esse parâmetro, da influência de pH na adsorção de LYZ e BSA em SBA-15 modificado com TMB e NH_4F , experimentos foram realizados variando o pH em uma faixa que contenha o ponto isoelétrico (pI) da biomolécula. É possível observar nos resultados apresentados na Figura 16 que a adsorção das proteínas ocorre de forma significativa no pI (pH em que a carga líquida da proteína é zero) sendo $\text{pH} = 4,8$ usando o tampão acetato de sódio 50 mM para a BSA e $\text{pH} = 10,7$ usando o tampão bicarbonato de sódio 50 mM para a LYZ. Isso permite uma modulação do desempenho global do processo de adsorção, ou seja, condições experimentais adequadas para adsorção e liberação de proteínas, podendo ser reproduzidas.

No ponto isoelétrico da proteína há redução das repulsões entre as moléculas de proteína devido aos resíduos das sequências de aminoácidos com carga semelhante ser mínima, o que ajuda na deposição mais próxima da superfície do adsorvente do que em outros pH's, assim uma superfície menor é requerida para cada molécula de proteína, aumentando a quantidade de proteína adsorvida por área de adsorvente (SANG; VINU; COPPENS, 2011).

Neste sentido, Bhattacharyya *et al.* (2010) reportaram similar comportamento na adsorção da lisozima (LYZ) próximo ao seu ponto isoelétrico em sílica mesoporosa do tipo SBA-15 afirmando que a utilização do valor $\text{pI} = 11$ prejudica o processo de adsorção pois a sílica se tornar solúvel em altos valores de pH. Também na literatura é reportada a adsorção de proteínas em seus pontos isoelétricos onde ocorre uma interação hidrofílica entre a proteína e a SBA-15 devido à presença de grupos hidroxilas na superfície da sílica e os grupos funcionais da proteína (SANTOS *et al.*, 2013).

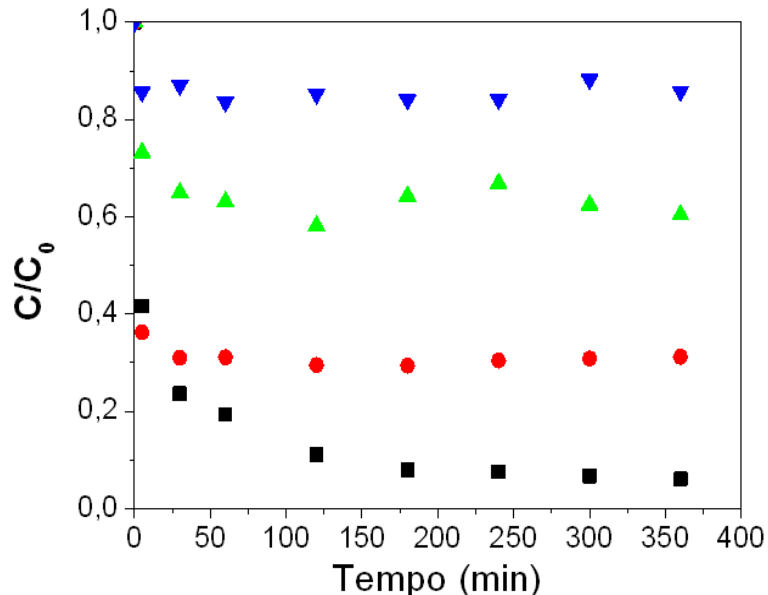
Os experimentos seguintes (cinéticas e isotermas) então foram realizados nas melhores condições de pH estabelecidas no experimento de influencia de pH, ou seja, tampão acetato de sódio 50mM a pH 4,8 para a BSA e tampão Tris HCl 50mM a pH 10 para a LYZ, devido a possibilidade de solubilização da sílica a pH 10,7 como reportado anteriormente. Para a lisozima (LYZ) teremos tanto a superfície do adsorvente quanto a da proteína com cargas favorecendo interações eletrostáticas e forças mais fracas do tipo Van Der Waals. As cinéticas são apresentadas nas Figuras 17 e 18 mostrando que ambas as proteínas alcançam o equilíbrio, em torno de 120 min. Comportamentos diferentes nos resultados são observados para cada proteína quando há adição de NaCl no meio em que ocorre a adsorção.

Figura 17 – Cinética de adsorção de BSA em SBA-15 - F-TMB no tampão acetato pH 4,8, concentração de BSA 3 mg/mL com 0,0M NaCl (■), 0,2M NaCl (●), 0,4M NaCl (▲) e 0,7M NaCl (▼), massa de adsorvente 15 mg



Fonte: Autora (2016).

Figura 18 – Cinética de adsorção de LYZ em SBA-15-F-TMB no tampão tris HCl pH 10, concentração de LYZ 3 mg/mL com 0,0M NaCl (■), 0,2M NaCl (●), 0,4M NaCl (▲) e 0,7M NaCl (▼), massa de adsorvente 15 mg



Fonte: Autora (2016).

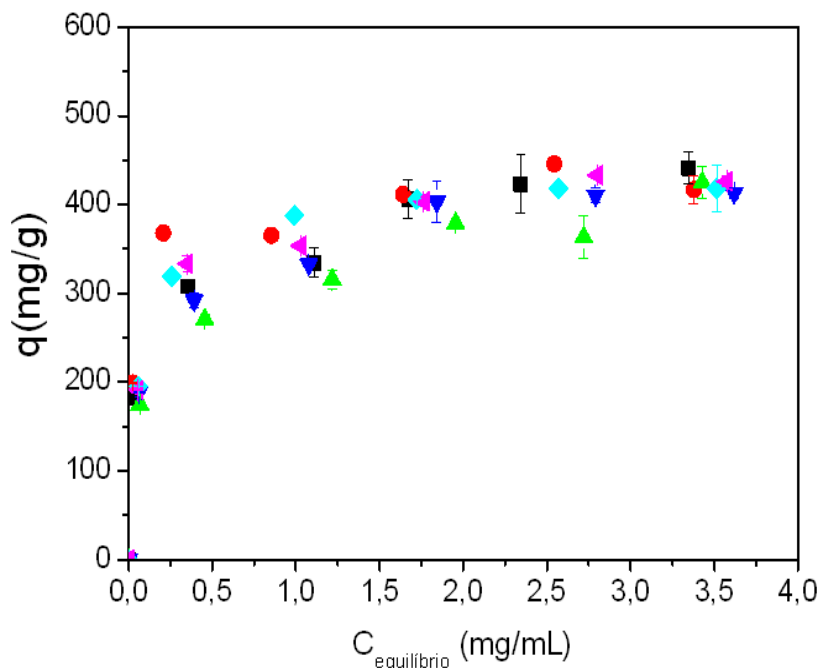
É reportado na literatura Sang, Vinu e Coppens (2011), que LYZ tem alta estabilidade interna (capacidade de manter a estrutura), sendo conhecida como “hard” proteína, sua quantidade adsorvida é pequena em superfície hidrofílicas, a menos que exista

atração eletrostática. A proteína BSA é de baixa estabilidade interna, sendo chamada “soft”, tende a adsorver em toda a superfície independente da interação eletrostática devido a um ganho de entropia conformacional resultante da adsorção.

Adsorção de LYZ é fortemente afetada pela força iônica, este efeito se origina a partir da diferença estrutural da proteína em diferentes soluções salinas como observado nas figuras de cinéticas que ao aumentar a quantidade de sal presente no meio, menor é a capacidade de adsorção da proteína para uma mesma concentração inicial de proteína (3 mg/mL).

As isotermas de adsorção para BSA e LYZ são apresentadas nas figuras 19 e 20 e nas tabelas 7 e 8. O modelo para isotermas de Langmuir foi utilizado para modelagem dos dados experimentais usando algoritmo não linear (Origin 6.0 – Originlab.Corp.) com valores de R^2 muito próximos da unidade para ambas as biomoléculas. O modelo empregado mostrou valores similares de q_{\max} para a proteína BSA em todas as concentrações de sal utilizadas com valores de 410 mg/g em média. Para a LYZ os valores encontrados diminuem com a adição de sal no meio e para altas concentrações de proteína e altas concentrações de sal é observado o fenômeno de “salting-out”, ou seja, precipitação pela diminuição da solubilidade da proteína ocasionada pela dissolução do sal (SCOPE, 1994).

Figura 19 – Isoterma de adsorção de BSA em SBA-F-TMB no tampão acetato de sódio pH 4,8 com 0,0M NaCl (■), 0,1M NaCl (●), 0,2M NaCl (◀), 0,4M de NaCl (▲), 0,7M de NaCl (▼) e 1,0M de NaCl (◆)



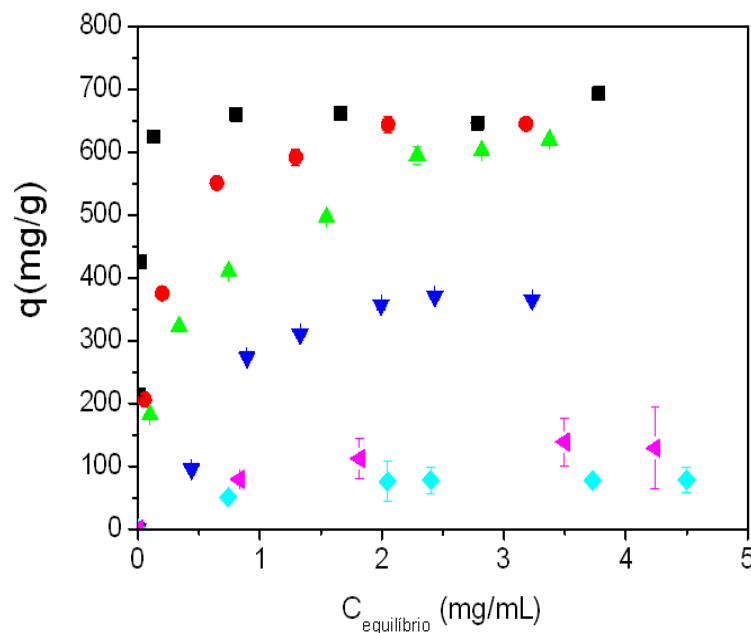
Fonte: Autora (2016).

Tabela 7 – Parâmetros do modelo de Langmuir para a BSA

Parâmetros	Modelo Langmuir Isotermas com BSA					
	0M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,4M NaCl	0,7M NaCl	1,0M NaCl
q_m (mg/g)	403,63	418,23	420,39	387,31	403,91	423,17
Erro (\pm)	21,61	11,66	12,80	22,64	18,03	4,21
K_d (L/mg)	20,88	34,03	12,86	8,63	10,89	13,54
Erro (\pm)	9,15	7,63	2,80	3,47	3,43	0,92
R^2	0,944	0,983	0,984	0,948	0,967	0,998
χ^2	1679,27	518,46	490,32	1318,05	920,21	52,435

Fonte: Autora (2016).

Figura 20 – Isoterma de adsorção de LYZ em SBA-15-F-TMB no tampão Tris HCl pH 10 com 0,0M NaCl (■), 0,1M NaCl (●), 0,2M NaCl (▲), 0,4M de NaCl (▼), 0,7M de NaCl (◆) e 1,0M de NaCl (◀)



Fonte: Autora (2016).

Tabela 8 – Parâmetros do modelo de Langmuir para a LYZ

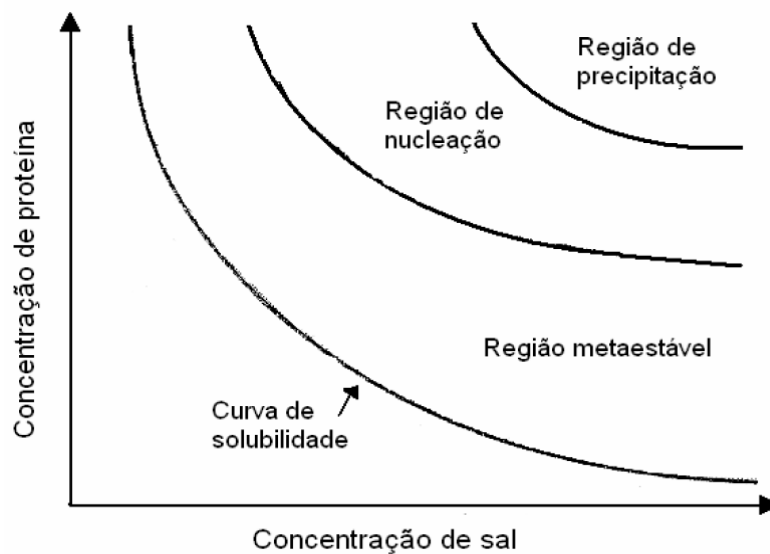
Parâmetros	Modelo Langmuir Isotermas com LYZ					
	0M NaCl	0,1M NaCl	0,2M NaCl	0,4M NaCl	0,7M NaCl	1,0M NaCl
q_m (mg/g)	677,93	672,46	669,13	524,87	90,38	162,97
Erro (\pm)	16,10	14,28	28,68	77,93	3,91	10,46
K_d (L/mg)	0,018	0,144	0,378	1,067	0,516	0,844
Erro (\pm)	8,72	0,67	0,49	0,37	0,43	0,28
R^2	0,981	0,997	0,983	0,954	0,991	0,991
χ^2	1310,23	245,54	961,23	1200,52	10,327	36,71

Fonte: Autora (2016).

Os resultados das isotermas confirmam o que já havia sido observado anteriormente nas cinéticas. Para a biomolécula LYZ, a solubilidade sofre interferência pelas características do solvente. A Figura 21 descreve como a solubilidade varia com a concentração do agente precipitante e a concentração de proteína. A curva de solubilidade é dividida em regiões de insaturação e supersaturação. Cristais de proteína dissolvem-se

na região insaturada, em que a concentração está abaixo da solubilidade da proteína e crescem ou agregam-se na região supersaturada. Na zona de nucleação já pode ocorrer o aparecimento de pequenas regiões com arranjos de moléculas e próximo a precipitação, estruturas desordenadas, como agregados ou precipitados podem se formar.

Figura 21 – Ilustração de um diagrama de fase mostrando a solubilidade de uma proteína em solução em função da concentração do agente precipitante



Fonte: Ries-Kautt, Ducruix e Van Dorsselaer (1994).

Desta forma para a adsorção da Lisozima em altas concentrações e elevada concentração salina, os íons salinos competem com os grupos polares da proteína pelas moléculas de água e após essa camada de hidratação ser parcialmente removida, as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas se tornam relevantes à formação de agregados insolúveis (SCOPE, 1994), ocorrendo uma redução brusca na quantidade adsorvida na sílica mesoporosa.

Este fenômeno de precipitação não ocorre com a BSA, onde para a variação de sal com o aumento da concentração de proteína não há alteração no perfil das isotermas. Comportamento semelhante ao desse trabalho foi reportado por Zhang *et al.* (2007) onde os parâmetros de ajuste do estudo das interações da BSA com a variação da concentração de sal indica que o potencial de atração causado por altas concentração de sal é fraco e nenhuma ocorrência de precipitação foi observada, podendo ser explicado pelo aumento da interação repulsiva entre as moléculas da proteína através da formação de uma camada de hidratação devido ao aumento da concentração salina.

3.4.3 Estimativa de Parâmetros de Transporte de Massa

Yoshida, Yoshikawa e Kataoka (1994) e Maekawa, Nagai e Magara (2000) estudaram o transporte paralelo de albumina de soro bovino (BSA) através das difusões na superfície e nos poros com base no pressuposto de que a concentração do soluto e as difusividades nos poros e na superfície (D_p e D_s) são constantes durante o processo de adsorção. No presente trabalho, procuramos melhorar o estudo de difusão com base em resultados de cinética juntamente com a análise da difusão nos poros, difusão de superfície através do modelo de difusão paralelo e com adição de NaCl no meio. A adsorção de BSA e LYZ é realizada para investigar a validade e utilidade deste modelo, e os coeficientes de difusão das proteínas como uma função da concentração de proteína inicial serão discutidos.

Para os ensaios cinéticos, o modelo de difusão paralelo foi escolhido para representar o sistema difusivo do sistema, tendo em vista que o modelo de difusão paralelo é uma combinação dos modelos de difusão do poro e de difusão de superfície, que considera ambas as difusões da proteínas no fluido dentro dos poros e na superfície da parede do poro.

Os parâmetros de entrada estão resumidos na Tabela 9. O coeficiente de transferência de massa no filme foi obtido pela equação 15, a porosidade da partícula foi obtida em laboratório na Universidade Federal do Ceara e o parâmetro de diâmetro de partícula foi obtido de um trabalho anterior (SANTOS *et al.*, 2013).

Tabela 9 – Parâmetros matemáticos inseridos no modelo

Parâmetros	SBA-15 F TMB
Porosidade da partícula, ε_p	0,74
Densidade da partícula, D_{ap} ($g\ cm^{-3}$)	1,55
Diâmetro de partícula, d (μm)	19,34
Coeficiente de difusão molecular, DAB ($cm^2\ min^{-1}$) – BSA	$4,64 \cdot 10^{-5}$
Coeficiente de difusão molecular, DAB ($cm^2\ min^{-1}$) – LYS	$8,22 \cdot 10^{-5}$
Coeficiente de transferência de massa no filme, k_f ($cm\ min^{-1}$) – BSA	$1,15 \cdot 10^{-1}$
Coeficiente de transferência de massa no filme, k_f ($cm\ min^{-1}$) – LYS	$1,83 \cdot 10^{-1}$

Fonte: Autora (2016).

Na Tabela 10, a seguir, pode-se observar o perfil cinético sem sal e os perfis obtidos com as seguintes concentrações salinas 0,4 e 0,7M apresentam fator de correlação R^2 com valores satisfatórios. O parâmetro de correlação foi obtido a partir da matriz de covariância (calculado automaticamente pelo gPROMS). Como D_p e D_s são ditos independentes, é esperado que esse parâmetro informe valores próximos de zero.

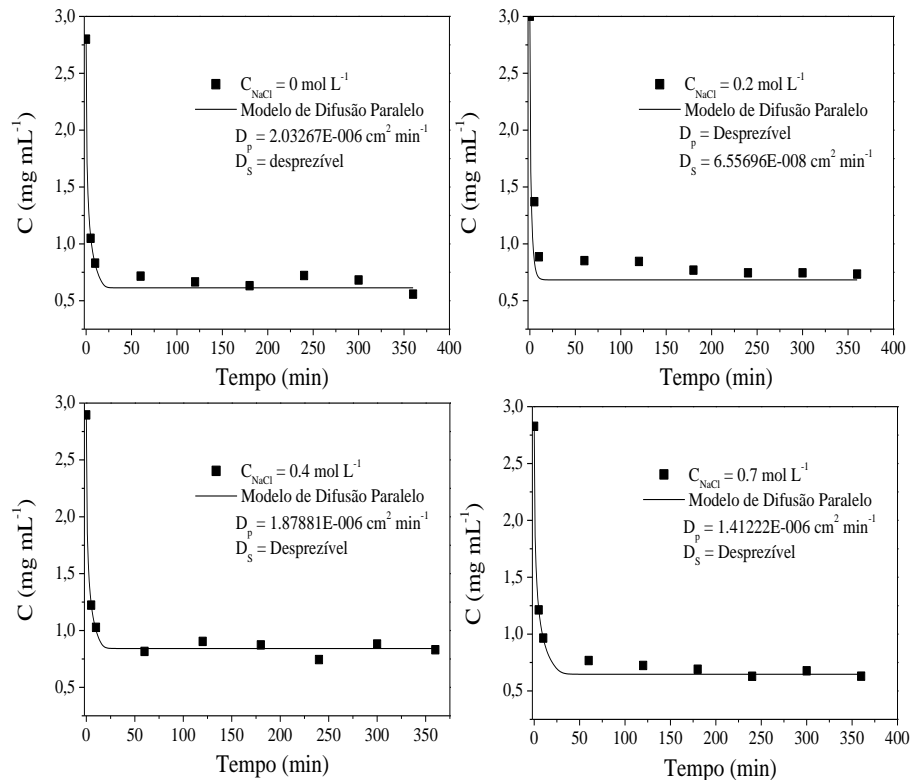
Tabela 10 – Valores estimados obtidos pelo gPROMS da modelagem cinética da BSA em SBA-15 F TMB nas diferentes concentrações salinas

NaCl (M)		Valor ($\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$)	R^2
0,0	D_p	$2,03 \times 10^{-6}$	0,9916
	D_s	Desprezível	
0,2	D_p	Desprezível	0,9121
	D_s	$6,56 \times 10^{-8}$	
0,4	D_p	$1,88 \times 10^{-6}$	0,9952
	D_s	Desprezível	
0,7	D_p	$1,41 \times 10^{-6}$	0,9940
	D_s	Desprezível	

Fonte: Autora (2016).

Para os vários D_s estimados (Figura 22), de um modo geral houve bom ajuste das cinéticas experimentais que foram obtidas para pH de valor 4,8 e forças iônicas correspondentes entre 0,0 a 0,7 M. É interessante notar que, para determinada cinética (concentração salina 0,2M), a difusividade não pôde ser determinada de forma conclusiva. No que diz respeito à dependência da força iônica, o declive das curvas de todos os valores de difusividade estimados mostrou uma concordância razoável até uma força iônica de cerca de 0,7 M. Para forças iônicas entre 0,1 e 0,7 M, o modelo foi capaz de reproduzir o diminuição acentuada da difusividade no poro com o aumento força iônica.

Figura 22 – Modelagem dos perfis cinéticos da BSA para diferentes valores da força iônica. Concentração inicial da proteína foi de 3 mg/mL para todos os experimentos



Fonte: Autora (2016).

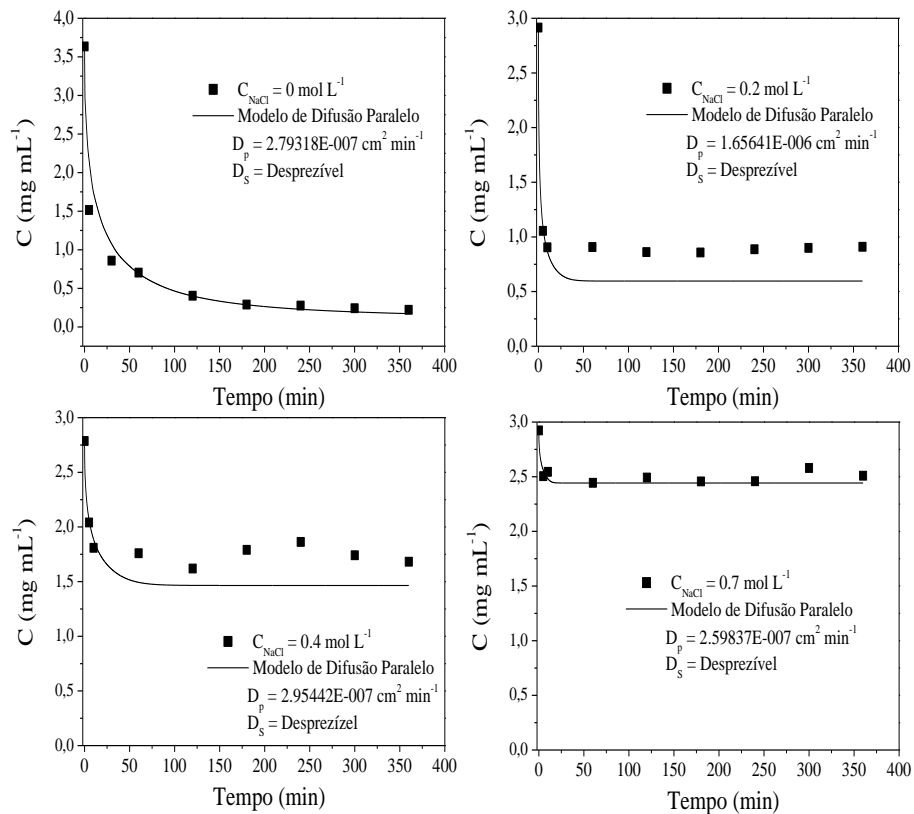
Como podemos observar na Tabela 11 o perfil cinético sem sal dentre os perfis obtidos foi o que apresentou fator de correlação R^2 satisfatório em relação aos demais. Para os vários D_s estimados (Figura 23), de um modo geral não ocorreu bom ajuste das cinéticas experimentais que foram obtidas para pH de valor 10 e forças iônicas correspondentes entre 0,0 a 0,7 M. Assim para as forças iônicas entre 0,1 e 0,7 M, o modelo não foi capaz de reproduzir e estimar de forma adequada os parâmetros para a difusividade no poro com o aumento da força iônica.

Tabela 11 – Valores estimados obtidos pelo gPROMS da modelagem cinética da LYS em SBA-15 F TMB nas diferentes concentrações salinas

NaCl (M)		Valor ($\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$)	R^2
0,0	D_p	$2,79 \times 10^{-7}$	0,9514
	D_s	Desprezível	
0,2*	D_p	$1,65 \times 10^{-6}$	0,8577
	D_s	Desprezível	
0,4*	D_p	$2,95 \times 10^{-7}$	0,5094
	D_s	Desprezível	
0,7*	D_p	$2,59 \times 10^{-7}$	0,8132
	D_s	Desprezível	

Fonte: Autora (2016).

Figura 23 – Modelagem dos perfis cinéticos para a LYS em diferentes valores da força iônica (concentração inicial da proteína foi de $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para todos os experimentos)



Fonte: Autora (2016).

Na literatura, temos trabalhos que utilizam modelos de difusão para avaliar os parâmetros de BSA em suporte mesoporoso do tipo SBA-15. Alguns trabalhos, como o de Lu, Song e He (2011) explanam sobre o efeito do tamanho de poros da SBA-15 na difusão intraparticular da lipase pancreática suína. Os autores mostraram que o coeficiente de difusão do poro aumenta gradualmente de $8,52 \times 10^{-8}$ para $3,73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ quando o raio é aumentado de 5 nm a 9,7 nm.

Para o nosso trabalho, por exemplo, a difusividade efetiva da BSA (com concentração inicial de $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi encontrada com valor de $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ que decresce com o aumento da concentração de sal.

Para a lisozima não foi encontrado comportamento que possa ser correlacionado, pois os valores obtidos não possuem valor estatístico. Desta forma, faz-se necessária a mudança do modelo utilizado ou a obtenção de mais pontos de cinética para um tempo inferior 10 minutos e assim estimar parâmetros iniciais de difusividade.

3.5 Conclusão

A SBA-F-TMB foi sintetizada pelo método hidrotérmico com a adição de um agente expander de poros TMB, para este material obtivemos área superficial de $373,17 \text{ m}^2/\text{g}$, volume de poro de $2,52 \text{ cm}^3/\text{g}$ e diâmetro de 27 nm, assim o material obtido possui propriedades texturais e estrutura características de um adsorvente de sílica mesoporosa.

Os experimentos em batelada para avaliação da influência do pH e da concentração de sal mostraram que, para a adição de sal no meio, não há variação na quantidade adsorvida da biomolécula (BSA), esta adsorve em toda a superfície independente da interação eletrostática devido a um ganho de entropia conformacional (FERREIRA, 2009).

Já para a LYS os valores encontrados diminuem com a adição de sal no meio onde é observado o fenômeno de “salting-out”, ou seja, precipitação pela diminuição da solubilidade da proteína ocasionada pela dissolução do sal.

Os estudos de cinéticas mostraram que o sistema alcança o equilíbrio em torno de 60 minutos para ambas as biomoléculas e as isotermas de adsorção foram descritas utilizando o modelo de Langmuir de forma satisfatória com capacidade máxima de adsorção de $197,8 \text{ mg/g}$ para BSA e $346,54 \text{ mg/g}$ para a LYS.

A modelagem do processo iniciou um estudo sobre a difusividade do meio onde há variação da concentração salina. Este estudo mostra uma diminuição da difusividade de

acordo com o aumento da concentração salina, assim temos no meio um aumento de forças eletrostáticas entre o adsorvente e proteína.

Observa-se que o material SBA-15 permite o entendimento da adsorção de biomoléculas em meio salino, porém se faz necessário um maior estudo das forças coulombianas na adsorção das biomoléculas em sílica mesoporosa.

4 CONCLUSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi alcançado ao sintetizar e caracterizar hidróxidos duplos lamelares através dos métodos de difração de raio x, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e adsorção de nitrogênio a -196°C com dois diferentes metais (zinco e magnésio) para avaliar a capacidade de adsorção de albumina de soro bovino (BSA) em sistema batelada e contínuo demonstrando potencial de adsorção de biomoléculas nanométricas na superfície deste material devido às dimensões obtidas dos cristais de hidróxidos duplos lamelares em comparação ao tamanho da biomolécula BSA.

Também foi realizada a síntese e caracterização de peneiras mesoporosas de sílica a partir de agentes direcionadores de mudanças das características típicas do material SBA-15, que em sínteses convencionais possuem distinto ordenamento de poro e estrutura. Visando estudar a influência da expansão do tamanho dos poros e encurtamento dos canais dois proteínas de tamanhos distintos foram utilizadas, a lisozima adsorve mais na sílica do que a albumina de soro bovino, pois a mesma é relativamente pequena, empacotando-se melhor nos canais do material sintetizado. Avaliou-se também a influência da concentração salina na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS) constatando a ocorrência do fenômeno de “salting-out” para a adsorção de lisozima e que ambas as proteínas adsorvem também no poro do material, não somente na superfície como para os hidróxidos duplos lamelares gerando quantidades adsorvidas cinco vezes maiores.

4.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Com o objetivo de se determinar com maior precisão a como as biomoléculas efetivamente estão se ligando aos adsorventes e estabelecer com mais refinamento a natureza das ligações que estão ocorrendo, recomenda-se caracterizar os suportes mesoporosos após processo de adsorção por técnicas como Fluorescência de Raios-X (FRX), Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Eletroforese.
- Realizar ensaios de adsorção com em leito fixo também para o material de sílica mesoporosa a fim de avaliar sua capacidade de adsorção e dessorção em sistema contínuo.
- Aplicar um modelo dos dados obtidos com adição de cloreto de sódio ao meio, em que se considere as forças iônicas relevantes para a adsorção.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EL-SHERBINI, K. S. et al. Synthesis of novel $\text{CO}_3^{2-}/\text{Cl}^-$ -bearing $3(\text{Mg}^{+}\text{Zn})/(\text{Al}^{+}\text{Fe})$ layered double hydroxides for the removal of anionic hazards. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 4, Part A, p. 2707-2721, 2015.
- AGUIAR, J. E. et al. Adsorption of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solution on Non-Calcined Mg-Al Layered Double Hydroxide: Experimental and Theoretical Study. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 15, p. 2307-2316, 2013.
- AKASAKA, H. et al. Detailed evaluation of protein adsorption on alumina surface through surface plasmon resonance phenomenon. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 24, p. 9526-9530, 2012.
- ALBERTAZZI, S.; BASILE, F.; VACCARI, A. Catalytic Properties of Hydrotalcite-Type Anionic Clays. **ChemInform**, v. 36, n. 7, 2005.
- AUXILIO, A. R. et al. The adsorption behavior of C.I. Acid Blue 9 onto calcined Mg-Al layered double hydroxides. **Dyes and Pigments**, v. 81, n. 2, p. 103-112, 2009.
- BELLEZZA, F. et al. Protein interactions with nanosized hydrotalcites of different composition. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 134-142, 2012.
- BELLEZZA, F. et al. Structure and catalytic behavior of myoglobin adsorbed onto nanosized hydrotalcites. **Langmuir**, v. 25, n. 18, p. 10918-10924, 2009.
- BENITO, P. et al. Influence of microwave radiation on the textural properties of layered double hydroxides. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 94, n. 1-3, p. 148-158, 2006.
- BHAKTA, S. A. et al. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. **Analytica chimica acta**, v. 872, p. 7-25, 2015.
- BHATTACHARYYA, M. S. et al. Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 47, p. 19928-19934, 2010.
- BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Transport Phenomena**. New York: John Wiley & Sons, 1960.
- BLOOMFIELD, V. The Structure of Bovine Serum Albumin at Low pH*. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 684-689, 1966.
- BRANDES, N. et al. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: Differential scanning calorimetry and FTIR analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, n. 1, p. 56-69, 2006.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in protein chemistry**, v. 45, n. 45, p. 153-203, 1994.

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis Today**, v. 11, n. 2, p. 173-301, 1991.

CENGİZ, S.; ÇAVAŞ, L.; YURDAKOÇ, K. Bentonite and sepiolite as supporting media: immobilization of catalase. **Applied Clay Science**, v. 65, p. 114-120, 2012.

CHEN, W.-D.; DONG, X.-Y.; SUN, Y. Analysis of diffusion models for protein adsorption to porous anion-exchange adsorbent. **Journal of chromatography A**, v. 962, n. 1, p. 29-40, 2002.

CHIANG, H. et al. Diffusivity of microporous carbon for benzene and methyl-ethyl ketone adsorption. **Chemosphere**, v. 38, n. 12, p. 2733-2746, 1999.

CIESLA, U.; SCHÜTH, F. Ordered mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, n. 2-3, p. 131-149, 1999.

COSTA, D. G. et al. Ab Initio Simulation of Changes in Geometry, Electronic Structure, and Gibbs Free Energy Caused by Dehydration of Hydrotalcites Containing Cl^- and CO_3^{2-} Counteranions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 13, p. 3531-3537, 2011.

COSTA, D. G. et al. Comparative Structural, thermodynamic and electronic analyses of Zn Al A n^- hydrotalcite-like compounds ($\text{A} n^- \text{Cl}^-$, F^- , Br^- , OH^- , CO_3^{2-} or NO_3^-): an ab initio study. **Applied Clay Science**, v. 56, p. 16-22, 2012.

CUATRECASAS, P. Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 12, p. 3059-3065, 1970.

DOADRIO, A. L. et al. A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 195, p. 43-49, 2014.

DUARTE-SILVA, R. et al. Structural, textural and protein adsorption properties of kaolinite and surface modified kaolinite adsorbents. **Applied Clay Science**, v. 90, p. 73-80, 2014.

ELLINGSEN, J. E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO_2 . **Biomaterials**, v. 12, n. 6, p. 593-596, 1991.

FERREIRA, E. S. **Interação da proteína albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FULVIO, P. F.; PIKUS, S.; JARONIEC, M. Tailoring properties of SBA-15 materials by controlling conditions of hydrothermal synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 47, p. 5049-5053, 2005.

GARCÍA-SANCHO, C. et al. Etherification of glycerol to polyglycerols over MgAl mixed oxides. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 84-90, 2011.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and separation process principles (includes unit operations)**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall Press, 2003.

HIRAYAMA, K. et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 173, n. 2, p. 639-46, 1990.

HOFFMANN, F. et al. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006.

IP, A. W. M.; BARFORD, J. P.; MCKAY, G. A comparative study on the kinetics and mechanisms of removal of Reactive Black 5 by adsorption onto activated carbons and bone char. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 2-3, p. 434-442, 2010.

IYI, N.; SASAKI, T. Decarbonation of MgAl-LDHs (layered double hydroxides) using acetate-buffer/NaCl mixed solution. **Journal of colloid and interface science**, v. 322, n. 1, p. 237-245, 2008.

JAIRO, T. et al. Conducting Polymers. Layered Double Hydroxides Intercalated Nanocomposites. In: MASTAI, Y. (Ed.). **Materials Science: Advanced Topics**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 3-31.

JIN, L. et al. Protein adsorption on gold nanoparticles supported by a layered double hydroxide. **Materials Letters**, v. 77, p. 67-70, 2012.

KANDORI, K. et al. Selective adsorption of acidic protein of bovine serum albumin onto sheet-like calcium hydroxyapatite particles produced by microreactor. **Advanced Powder Technology**, v. 25, n. 1, p. 354-359, 2014.

KATIYAR, A. et al. Adsorption of Bovine Serum Albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 80, n. 1-3, p. 311-320, 2005.

KIM, J. et al. Adsorption of biomolecules on mesostructured cellular foam silica: Effect of acid concentration and aging time in synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 149, n. 1, p. 60-68, 2012.

KIM, J. et al. Energetics of lysozyme adsorption on mesostructured cellular foam silica: Effect of salt concentration. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6697-6704, 2011.

KIM, J.; SOMORJAI, G. A. Molecular Packing of Lysozyme, Fibrinogen, and Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Studied by Infrared-Visible Sum Frequency Generation and Fluorescence Microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 10, p. 3150-3158, 2003.

KONDO, A.; OKU, S.; HIGASHITANI, K. Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 1, p. 214-221, 1991.

LAZARIDIS, N. K.; KARAPANTSIOS, T. D.; GEORGANTAS, D. Kinetic analysis for the removal of a reactive dye from aqueous solution onto hydrotalcite by adsorption. **Water Research**, v. 37, n. 12, p. 3023-3033, 2003.

LEPOITEVIN, M. et al. BSA and lysozyme adsorption on homoionic montmorillonite: Influence of the interlayer cation. **Applied Clay Science**, v. 95, p. 396-402, 2014.

LEROUX, F.; TAVIOT-GUEHO, C. Fine tuning between organic and inorganic host structure: new trends in layered double hydroxide hybrid assemblies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 35-36, p. 3628-3642, 2005.

LETTOW, J. S. et al. Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. **Langmuir**, v. 16, n. 22, p. 8291-8295, 2000.

LI, R. et al. Enhancing phosphate adsorption by Mg/Al layered double hydroxide functionalized biochar with different Mg/Al ratios. **Science of The Total Environment**, v. 559, p. 121-129, 2016.

LIU, B.; YANG, Y.; REN, Q. Parallel pore and surface diffusion of levulinic acid in basic polymeric adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, n. 1, p. 190-200, 2006.

LÓPEZ-SANZ, J. et al. New inorganic-organic hybrid materials based on SBA-15 molecular sieves involved in the quinolines synthesis. **Catalysis Today**, v. 187, n. 1, p. 97-103, 2012.

LU, S.; SONG, Z.; HE, J. Diffusion-controlled protein adsorption in mesoporous silica. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 24, p. 7744-7750, 2011.

LUENSMANN, D.; JONES, L. Albumin adsorption to contact lens materials: A review. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 31, n. 4, p. 179-187, 2008.

LV, T. et al. Physicochemical characterization and sorption behavior of Mg-Ca-Al (NO₃) hydrotalcite-like compounds toward removal of fluoride from protein solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 237-238, p. 121-132, 2012.

MAEKAWA, M.; NAGAI, H.; MAGARA, K. Mixture diffusion of sulfonated dyes into cellulose membrane. III. Application of parallel diffusion model to binary system of direct dyes with different affinity. **Journal of Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 170, n. 2-3, p. 191-198, 2000.

MARCOUX, L.; FLOREK, J.; KLEITZ, F. Critical assessment of the base catalysis properties of amino-functionalized mesoporous polymer-SBA-15 nanocomposites. **Applied Catalysis A: General**, v. 504, p. 493-503, 2015.

MASCOLO, G.; MASCOLO, M. C. On the synthesis of layered double hydroxides (LDHs) by reconstruction method based on the "memory effect". **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 214, p. 246-248, 2015.

MILLS, S. et al. Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides. **Mineralogical Magazine**, v. 76, n. 5, p. 1289-1336, 2012.

MITCHELL, J.; IRONS, L.; PALMER, G. A study of the spread and adsorbed films of milk proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 200, n. 1, p. 138-150, 1970.

NIETO, A. et al. Surface electrochemistry of mesoporous silicas as a key factor in the design of tailored delivery devices. **Langmuir**, v. 26, n. 7, p. 5038-5049, 2010.

NORDE, W.; BUIJS, J.; LYKLEMA, H. Adsorption of globular proteins. In: LYKLEMA, J. (Ed.). **Fundamentals of interface and colloid science: Soft colloids**. Amsterdam: Elsevier, 2005. v. 5, p. 3.1-3.59.

PANG, H.-X. et al. A catalysis study of mesoporous MCM-41 supported Schiff base and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in a highly regioselective synthesis of 4-thiazolidinone derivatives from cyclocondensation of mercaptoacetic acid. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 3, p. 335-339, 2016.

PARÉS, D.; SAGUER, E.; CARRETERO, C. Blood by-products as ingredients in processed meat. In: KERRY, J. P.; KERRY, J. F. (Eds.). **Processed meats: improving safety, nutrition and quality**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2011. p. 218-242.

PATTERSON, K.; LISAL, M.; COLINA, C. M. Adsorption behavior of model proteins on surfaces. **Fluid Phase Equilibria**, v. 302, n. 1, p. 48-54, 2011.

RALLA, K. et al. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 217-225, 2011.

RIES-KAUTT, M.; DUCRUIX, A.; VAN DORSSELAER, A. Crystallization of previously desalted lysozyme in the presence of sulfate ions. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 50, n. 4, p. 366-369, 1994.

ROUQUEROL, J.; ROUQUEROL, F. 4 - Adsorption at the Liquid-Solid Interface: Thermodynamics and Methodology. In: MAURIN, F. R. R. S. W. S. L. (Ed.). **Adsorption by Powders and Porous Solids**. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2014. p. 105-158.

SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M. Specific ion effects on adsorption of lysozyme on functionalized SBA-15 mesoporous silica. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7996-8001, 2010.

SANG, L.-C.; VINU, A.; COPPENS, M.-O. General description of the adsorption of proteins at their iso-electric point in nanoporous materials. **Langmuir**, v. 27, n. 22, p. 13828-13837, 2011.

SANTOS, S. M. L. et al. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 180, p. 284-292, 2013.

SANTOS, S. M. L. et al. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 53-64, 2016.

SCOPEs, R. K. **Protein purification**. New York: Springer-Verlag, 1994.

SEFTEL, E. M. et al. Zn-Al layered double hydroxides: Synthesis, characterization and photocatalytic application. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 113, n. 1-3, p. 296-304, 2008.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. **Separation science and technology**, v. 37, n. 15, p. 3491-3511, 2002.

SIGMA-ALDRICH. **Bovine Serum Albumin**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8806>>. Acesso em: 26 set. 2016.

SKIDMORE, G. L.; HORTSMANN, B. J.; CHASE, H. A. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose[®] FF. **Journal of Chromatography A**, v. 498, p. 113-128, 1990.

SOCOLOFSKY, S. A.; JIRKA, G. H. **Special topics in mixing and transport processes in the environment**. Engineering-lectures. 5. ed. College Station, TX: Coastal and Ocean Engineering Division, Texas A&M University, 2005.

SOUZA, M. C. M. D. **Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose**. 2009. 165 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

STERI, D.; MONDUZZI, M.; SALIS, A. Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 170, p. 164-172, 2013.

SZEWCZUK-KARPISZ, K.; WIŚNIEWSKA, M.; MYŚLIWIEC, D. Albumin adsorption influence on the stability of the mesoporous zirconia suspension. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 113-119, 2015.

TAMURA, H. et al. Formation of hydrotalcite in aqueous solutions and intercalation of ATP by anion exchange. **Journal of colloid and interface science**, v. 300, n. 2, p. 648-654, 2006.

VERMONDEN, T.; GIACOMELLI, C. E.; NORDE, W. Reversibility of Structural Rearrangements in Bovine Serum Albumin during Homomolecular Exchange from AgI Particles. **Langmuir**, v. 17, n. 12, p. 3734-3740, 2001.

VILARRASA-GARCIA, E. et al. CO₂ adsorption on APTES functionalized mesocellular foams obtained from mesoporous silicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 187, p. 125-134, 2014.

VIOLANTE, A. et al. Sorption/desorption of arsenate on/from Mg-Al layered double hydroxides: Influence of phosphate. **Journal of colloid and interface science**, v. 333, n. 1, p. 63-70, 2009.

VOROBYOV, I.; ALLEN, T. W. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 6, p. 1673-1683, 2011.

WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

WRIGHT, A.; THOMPSON, M. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. **Biophysical journal**, v. 15, n. 2 Pt 1, p. 137, 1975.

YANG, K.; SUN, Y. Structured parallel diffusion model for intraparticle mass transport of proteins to porous adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 3, p. 298-310, 2007.

YOSHIDA, H.; YOSHIKAWA, M.; KATAOKA, T. Parallel transport of BSA by surface and pore diffusion in strongly basic chitosan. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 12, p. 2023-2044, 1994.

YOU, Y.; VANCE, G. F.; ZHAO, H. Selenium adsorption on Mg-Al and Zn-Al layered double hydroxides. **Applied Clay Science**, v. 20, n. 1-2, p. 13-25, 2001.

ZHANG, F. et al. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 1, p. 251-259, 2007.

ZHANG, T. et al. Biomimetic fabrication of hierarchically structured LDHs/ZnO composites for the separation of bovine serum albumin. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, p. 278-285, 2013.

ZHAO, D. et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. **Science**, v. 279, p. 548-552, 1998.

ZOUNGRANA, T.; FINDENEGG, G. H.; NORDE, W. Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 190, n. 2, p. 437-448, 1997.