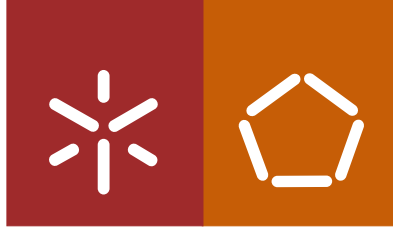


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Sofia Costa Nunes

**Bacterial Cellulose as a Nanostructured
Functional Material for Biomedical
Applications**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ana Sofia Costa Nunes

**Bacterial Cellulose as a Nanostructured
Functional Material for Biomedical
Applications**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Trabalho realizado sob a orientação do
Doutor Fernando Dourado

Outubro de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

I. Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de expressar um sincero agradecimento ao meu orientador, Prof. Fernando Dourado, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço a sua orientação, incentivo, paciência, compreensão, ajuda e voto de confiança.

Em segundo lugar, não posso deixar de referir todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta etapa, pois sem elas não seria possível a realização deste trabalho. Durante 6 meses tive o privilégio de trabalhar com um grupo fantástico de pessoas, que me ajudaram e animaram quando as coisas correram menos bem e que festejaram quando tudo correu pelo melhor... Foi pouco tempo, mas tenho a certeza que criei laços que não se vão desfazer com o passar do tempo.... Um sentido, enorme e choroso OBRIGADA!

Jorginho, não existem palavras suficientes para expressar o meu agradecimento! Obrigada por toda a tua ajuda e colaboração! Obrigada por me teres aturado e apoiado quando mais precisei e obrigada por seres assim...um bom amigo!

Agradeço com o mesmo carinho a todo o pessoal do LTEB: Dininha, Silvia, Paula, Ana, Alexandre, Sara, João Pedro, Catarina, Joana, Isabel e João.

Agradeço ainda a todos os meus amigos, que muito me aturaram, acalmaram e aconselharam!

Há duas espécies de chatos: os chatos propriamente ditos e ... os amigos, que são os nossos chatos prediletos. Obrigada Dinha pela paciência, incentivo, berros, danças, risadas, maluqueiras. Obrigada por quatro anos de companheirismo inigualável.

Pai, Mãe e Irmã obrigada pelo vosso amor incondicional, carinho, confiança e paciência, mesmos nos momentos em que não mereci...sem vocês nada disto teria sido possível. Agradeço a toda a minha família e à incomparável companhia do Si durante o processo de escrita.

Agradeço ainda a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram na concretização deste projeto.

Now I understand why Peter Pan didn't want to grow up.

II. Abstract

The exponential development of certain areas related to science and engineering, such as pharmaceuticals, biotechnology, bioengineering, among others, leads to an increasingly demand of certain biomolecules.

In this context the affinity membrane chromatography has proven to be an efficient, fast and attractive method for separation and purification of biomolecules from biological fluids. Another advantage of this separation process is its high throughput and degree of purification.

Plant cellulose is already commercially explored for use as affinity membranes for the selective separation of many biomolecules like proteins, antibodies, enzymes, among others.

Bacterial cellulose (BC) is an outstanding biomaterial with unique features, including extremely hydrophilic surface, high crystallinity and water holding capacity, high mechanical strength, high surface area and also biocompatibility. Based on these properties, it is possible to understand the versatility of materials containing BC in their composition. This biopolymer has been the focus of a growing and interesting research during the past years.

This project aim was to evaluate the potential of BC as a novel material for affinity membrane separation and purification of specific proteins.

In this work, several approaches were investigated in order to functionalize the surface of BC, with emphasis on the incorporation of PVA polymer and F3GA dye. The main purpose of these modifications is to improve some characteristics of BC matrix like its resistance, cohesion and also specific binding of proteins, instead of the nonspecific adsorption that damages the affinity chromatography process.

BC membranes have the potential to be used as affinity membranes, with a binding capacity of approximately 114.05 mg BSA / g BC and they can also be reused for at least three times.

After functionalization with PVA and F3GA, it was concluded that both membranes types exhibited increased porosity; the values obtained for the binding capacity of BSA decreased due to the reduction of nonspecific adsorption of BSA, since F3GA promotes the specific binding, although in smaller quantities.

For PVA were achieved values nearly 11.10 mg BSA/g BC (thin membranes), and it was concluded that the higher the concentration of PVA used, the lower the amount of BSA retained in the membranes. In the case of F3GA it was concluded that the concentration with best results, relative to adsorption, was 0,015 mg/mL – 27.19 mg BSA / g BC (thin membranes). These results are still much lower than those obtained for the adsorption with pure BC.

The produced membranes were also characterized using scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and contact angle measurement, taking BC as reference.

III. Resumo

O crescimento exponencial de determinadas áreas relacionadas com a ciência e engenharia, como a indústria farmacêutica, a biotecnologia, a bioengenharia, entre outras, conduz cada vez mais a uma crescente demanda de determinadas biomoléculas.

Neste contexto, a cromatografia por membranas de afinidade tem demonstrado ser um método eficiente, atrativo e rápido para separação e purificação de biomoléculas de fluidos biológicos. Outra vantagem deste processo de separação é o seu elevado rendimento e grau de purificação.

A celulose de origem vegetal tem sido já comercialmente explorada para aplicações como membrana de afinidade para a separação seletiva de vários tipos de biomoléculas, como proteínas, anticorpos, enzimas, entre outras.

A Celulose Bacteriana (CB) é um biomaterial de excelência, que possui propriedades únicas das quais se destacam uma superfície extremamente hidrofílica, elevada cristalinidade e capacidade de retenção de água, grande resistência mecânica e elevada área superficial e ainda biocompatibilidade. Frente ao exposto é possível notar a versatilidade dos materiais compostos por CB. Deste modo, este biopolímero tem sido alvo de uma crescente e interessante investigação ao longo dos últimos anos.

Este projeto tem como principal objetivo avaliar o potencial da CB, como um inovador material a ser usado como membrana de afinidade para a separação e purificação de proteínas específicas.

Neste trabalho várias abordagens foram investigadas no sentido de funcionalizar a superfície da CB, destacando-se a incorporação do polímero PVA e a ligação do corante F3GA. O principal objetivo destas modificações é melhorar algumas características da matriz de CB, tal como a sua resistência, coesão e também a ligação específica de proteínas, em detrimento da adsorção inespecífica que prejudica o processo de cromatografia por afinidade.

As membranas de CB puras possuem potencial para serem utilizadas como membranas de afinidade, possuindo uma capacidade de ligação de cerca de 114,05 mg BSA/g CB e podem, adicionalmente, ser reutilizadas pelo menos três vezes.

Relativamente à funcionalização com PVA e F3GA, concluiu-se que ambos aumentaram a porosidade da matriz de CB e que, após modificação, a adsorção inespecífica de BSA diminuiu, daí o decréscimo observado nos valores de proteína retida, uma vez que o F3GA favorece a ligação específica da proteína, embora em menores quantidades. No caso do PVA alcançaram-se valores na ordem dos 11,10 mg BSA /g CB (membranas finas), verificando-se que quanto maior a concentração de PVA utilizada, menor a quantidade de BSA retida nas membranas.

Já para o caso do F3GA concluiu-se que a concentração com melhores resultados, relativamente à adsorção, foi a de 0,015 mg/mL – 27,19 mg BSA/g CB – (membranas finas), ficando mesmo assim muito aquém dos resultados obtidos para a adsorção com a CB pura.

As membranas estudadas foram também caracterizadas através de ensaios de microscopia eletrônica de varrimento (SEM), espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e medição ângulos de contacto, usando a celulose bacteriana pura como referência.

IV. Índice

I. Agradecimentos	iii
II. Abstract	v
III. Resumo	vii
IV. Índice	ix
V. Lista de Abreviações	xii
VI. Lista de Figuras	xiv
VII. Lista de Tabelas	xviii
VIII. Introdução à estrutura da tese	xx
Capítulo I. Introdução	
I. Motivação e Objetivos	1
1. Membranas de Afinidade	3
1.1 Cromatografia por afinidade	3
1.2 Membranas	6
1.3 Membranas de afinidade	7
1.3.1 Características requeridas das matrizes de afinidade	8
1.3.2 Materiais constituintes das matrizes	9
1.3.3 Modificações das membranas de afinidade	10
1.3.4 Aplicações das membranas de afinidade	13
2. Celulose Bacteriana	16
2.1 Produção e Morfologia da CB	17
2.2 Estrutura da celulose	18
2.3 Principais propriedades da CB	19
2.4 Aplicações da CB	20
Capítulo II. Materiais e Métodos	
1. Produção e Preparação da Celulose Bacteriana	27
1.1 Produção da Celulose Bacteriana pela bactéria <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	27
1.2 Processo de lavagem da Celulose Bacteriana	27
2. Ensaios de adsorção e de eluição de proteínas na matriz da celulose não modificada	28
2.1 Ligação da proteína Albumina Bovina do Soro às membranas de celulose	28
2.1.1 Processo de lavagem das membranas de CB com Tween20	29
3. Ensaios de Isotérmicas e de Eluição da BSA das membranas de celulose	30
3.1 Isotérmicas de adsorção da BSA com celulose bacteriana	30
3.1.1 Processo de lavagem dos discos de celulose com PBS + NaCl	31
4. Modificações das membranas de Celulose Bacteriana	31

4.1 Ensaio preliminares	31
4.1.1 Modificação das membranas de celulose bacteriana por oxidação	31
4.1.1.1 Processo de oxidação com periodato de sódio	32
4.1.1.2 Ligação da BSA às membranas de celulose bacteriana modificadas	32
4.1.1.3 Processo de lavagem das membranas com Tween 20	32
4.1.2 Funcionalização das membranas por geração de grupos funcionais na sua Superfície	33
4.1.2.1 Modificação da superfície das membranas por geração de grupos amina	34
4.1.2.2 Ensaio de ligação de BSA	34
4.1.2.3 Processo de lavagem das membranas com Tween 20	34
4.2 Processo de incorporação de <i>Poly(vinyl alcohol)</i> nas membranas	35
4.3 Funcionalização das membranas através da ligação do corante Cibracon Blue F3GA	36
4.3.1 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas de celulose bacteriana	37
4.3.1.1 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA - variação nos parâmetros	38
4.3.2 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas com PVA previamente incorporado	38
4.3.4 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas de CB, sob condições alcalinas	38
5. Processo de ultrafiltração das membranas de celulose bacteriana	39
5.1 Ultrafiltração	39
5.2 Processo de eluição da proteína	40
6. Caracterização das membranas de celulose bacteriana modificadas	40
6.1 Propriedades superficiais	41
6.2 Propriedades térmicas	41
6.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	41
6.4 Caracterização morfológica	42

Capítulo III. Resultados e Discussão

1. Membranas de Celulose Bacteriana não modificadas	45
2. Ensaio de adsorção e de eluição de proteínas da matriz de celulose não modificada	46
2.1 Ligação da proteína BSA às membranas de celulose	46
2.1.1 Lavagem das membranas de CB não modificadas com Tween 20	47
3. Ensaio de Isotérmicas e de Eluição da BSA das membranas de CB não modificadas	48
3.1 Isotérmicas de adsorção da BSA	48
3.1.1 Eluição da BSA das membranas de CB não modificadas com PBS + NaCl	52
4. Modificações das membranas de Celulose Bacteriana	52
4.1 Processo de incorporação de <i>Poly(vinyl alcohol)</i> nas membranas de CB	52
4.2 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA nas membranas	55
4.2.1 Ligação do Cibracon Blue F3GA - variação nos parâmetros	61

4.2.2	Ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas com PVA previamente incorporado	62
5.	Processo de ultrafiltração e de eluição de proteínas das membranas de celulose bacteriana	64
5.1	Ultrafiltração e Reutilização das membranas de CB não modificadas	65
5.2	Ultrafiltração das membranas de CB modificadas pela incorporação de PVA	70
5.2.1	Membranas modificadas com 5% PVA	70
5.2.1.1	Membrana espessa	70
5.2.1.2	Membrana fina	71
5.2.2	Membranas modificadas com 3% PVA	72
5.2.2.1	Membrana espessa	72
5.2.2.2	Membrana fina	73
5.2.3	Membranas modificadas com 1% PVA	75
5.2.3.1	Membrana fina	75
5.2.4	Membranas modificadas com PVA	76
5.3	Ultrafiltração e Reutilização das membranas de CB modificadas pela ligação com F3GA	78
5.3.1	Membranas modificadas com F3GA (C = 0,015 mg/mL)	78
5.3.1.1	Membranas espessas	78
5.3.1.2	Membrana fina	80
5.3.2	Membranas modificadas com F3GA (C = 0,075 mg/mL):	81
5.3.2.1	Membranas espessas	81
5.3.2.2	Reutilização das membranas modificadas	82
5.3.3	Membranas modificadas com F3GA (C = 0,15 mg/mL)	85
5.3.3.1	Membrana espessa	85
5.3.4	Membranas modificadas com F3GA	86
5.4	Ultrafiltração das membranas de CB modificadas pela incorporação de PVA e ligação do F3GA	88
5.4.1	Membranas modificadas com 1% de PVA e F3GA (C = 0,015 mg/mL)	88
5.4.1.1	Membrana espessa	88
5.4.1.2	Membrana fina	89
5.4.2	Membranas modificadas com 3% de PVA e F3GA (C = 0,015 mg/mL)	91
5.4.2.1	Membrana espessa	91
5.4.3	Membranas modificadas com 5% de PVA e F3GA (C = 0,015 mg/mL)	92
5.4.3.1	Membrana espessa	92
5.4.4	Membranas modificadas com PVA e F3GA	93
6.	Caracterização das membranas de celulose bacteriana	95
6.1	Propriedades superficiais	95
6.2	Propriedades térmicas	97
6.3	Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	99
Capítulo IV.	Conclusões e Perspetivas Futuras	103
Anexos		
Anexo A-I		107
Bibliografia		110

V. Lista de Abreviações

CB	----	Celulose Bacteriana
<i>A. Xylinum</i>	----	<i>Acetobacter xylinum</i>
<i>G. Xylinus</i>	----	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
BSA	----	Albumina Bovina do Soro
PBS	----	Phosphate Buffered Saline
CDI	----	1,1' - carbonyl diimidazole
PVA	----	Polyvinyl Alcohol
F3GA	----	Cibracon Blue F3GA
SEM	----	Microscopia Eletrônica de Varrimento
TGA	----	Análise Termogravimétrica
DSC	----	Calorimetria Diferencial de Varrimento
FTIR	----	Espectroscopia de Infravermelho

VI. Lista de Figuras

Capítulo I.

Figura 1 – Esquema ilustrativo da transferência de massa de soluto na cromatografia por coluna e por membranas (“retirado de Ramakrishna e colaboradores, 2005”).....	3
Figura 2 – Imagem representativa do princípio de funcionamento da cromatografia por afinidade membranas (“adaptado de Saxena e colaboradores, 2009”).....	4
Figura 3 – Esquema representativo dos marcos e da evolução dos sistemas de membranas para a separação/purificação de biomoléculas (“adaptado de Saxena e colaboradores, 2009”).....	6
Figura 4 – Diferentes formas de obter celulose (“retirado de Klemm e colaboradores, 2001”).....	16
Figura 5 – Imagem de uma membrana de CB.....	18
Figura 6 – Ilustração representativa da estrutura molecular da celulose, como um polímero formado pela repetição de unidades de D-glucano-piranosose (“retirado de Gardner e colaboradores, 2008”).....	19

Capítulo II.

Figura 7 – Discos de celulose bacteriana de: a) 24 poços; b) 6 poços.....	27
Figura 8 – Membrana de CB após lavagem.....	28
Figura 9 - Figura representativa da estrutura molecular do agente Tween 20 (“retirado de Sigmaaldrich.com”).....	29
Figura 10 – Esquema com o resumo de todas as técnicas de modificação da CB abordadas.....	31
Figura 11 – Esquema representativo do mecanismo de oxidação por periodato de sódio com formação do DAC (“adaptado de RoyChowdhury e colaboradores, 2005”).....	32
Figura 12 – Figura representativa do processo de funcionalização da superfície da CB com formação de grupo funcional epoxy (2º passo) e geração grupo amina (3º passo) (“adaptado de Dong e colaboradores, 2007”).....	34
Figura 13 – Figura representativa da estrutura molecular do corante Cibracon Blue F3GA (“retirado de Alberghina e colaboradores, 2000”).....	36
Figura 14 - Discos de CB, secos, após reação com soluções do corante F3GA, com diferentes concentrações: a) C = 0,15 mg/mL; b) C = 0,375 mg/mL; c) C = 0,525 mg/mL.....	37
Figura 15 – Disco de celulose bacteriana pura após secagem na estufa.....	39
Figura 16 - a) Sistema de ultrafiltração Amicon. b) Esquema representativo do mesmo sistema.....	40

Capítulo III.

Figura 17 – Discos de Celulose Bacteriana: a) hidratados de 24 poços; b) hidratados de 6 poços; c) secos de 6 poços.....	45
Figura 18 – Imagens de SEM de amostras de CB puras.....	46
Figura 19 – Isotérmicas de adsorção da BSA nas membranas de CB, ao longo do tempo, em mg BSA /grama CB.....	49
Figura 20 – Isotérmicas de adsorção de BSA nas membranas de CB (mg BSA adsorvida por grama de celulose) em função da concentração inicial de BSA: a) 180 min; b) 60 min.....	50

Figura 21 – a) Representação linear da equação de Langmuir da BSA nas membranas de CB; b) Isotérmicas de adsorção da BSA nas membranas de CB não modificadas. Cada ponto representa a média de seis valores.....	51
Figura 22 – Membrana de CB seca: a) não modificada; b) modificada por incorporação de PVA.....	53
Figura 23 – Imagens de SEM amostras de: a) CB modificada com 1% PVA; b) CB modificada com 5% PVA; c) CB pura.....	54
Figura 24 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA (C = 0,15 mg/mL: a) membrana hidratada; b) membrana após remoção da água.....	55
Figura 25 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA (C = 0,375 mg/mL): a) membrana hidratada; b) membrana após remoção da água.....	55
Figura 26 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA (C= 0,525 mg/mL): a) membrana hidratada; b) membrana após remoção da água.....	55
Figura 27 – Imagens de SEM amostra: a) CB pura; b) CB funcionalizada com F3GA (C=0,00375 mg/mL).....	56
Figura 28 - Imagens de SEM de amostras de CB funcionalizadas com F3GA (C = 0,15 mg/mL).....	56
Figura 29 – Gráfico representativo do Rendimento (%) do processo de ligação do F3GA.....	58
Figura 30 – Membranas de CB modificadas com F3GA com diferentes concentrações, e os seus respetivos controlos.....	60
Figura 31 – Rendimento (%) do processo de ligação do F3GA, sob diferentes condições experimentais, em função da sua concentração inicial.....	61
Figura 32 – Imagens de SEM de amostras de CB funcionalizadas com PVA % e F3GA (C = 0,015 mg/mL): a) 1% PVA incorporado; b) 5% PVA incorporado.....	63
Figura 33 – Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) da BSA, para cada um dos três ensaios realizados. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL.....	65
Figura 34 – Valores cumulativos relativos à quantidade de BSA total (mg/g) a) retida e b) eluída, da membrana de CB reutilizada, em função do volume, para cada um dos três ensaios.....	66
Figura 35 – Fluxos (mL/min) para cada um dos três ensaios de reutilização: a) Adsorção: solução PBS + BSA; b) Eluição: solução PBS + NaCl pH= 10.0; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	68
Figura 36 – a) Valores relativos à quantidade de BSA total cumulativa (mg/g) retida na membrana, para os dois ensaios de saturação, em função do volume de solução; b) Fluxos (mL/min) para os dois ensaios de saturação: comparação entre os primeiros e os segundos 10 mL da solução de PBS + BSA.....	69
Figura 37 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	70
Figura 38 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min): Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	71
Figura 39 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	73
Figura 40 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	74

Figura 41 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 1% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: Solução PBS + NaCl.....	75
Figura 42 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/m; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	79
Figura 43 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl.....	80
Figura 44 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,075 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	81
Figura 45 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) da BSA, para cada um dos três ensaios de reutilização realizados. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/m; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl.....	83
Figura 46 – Valores cumulativos relativos à quantidade de BSA total (mg/g) a) retida e b) eluída da membrana de CB reutilizada, em função do volume, para cada um dos três ensaios.....	83
Figura 47 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,15 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	85
Figura 48 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 1% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	89
Figura 49 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 1% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	90
Figura 50 - a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	91
Figura 51 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; b) Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.....	92
Figura 52 - Diagrama da análise termogravimétrica das amostras de CB, CB - F3GA, CB -1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.....	98
Figura 53 - Curvas de DSC das amostras de CB, CB - F3GA, CB - 1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.....	99
Figura 54 – Espectros FTIR das amostras de CB, CB - F3GA, CB - 1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.....	100

VII. Lista de Tabelas

Capítulo I.

Tabela 1 – Exemplos de ligandos e respetivos ligantes, utilizados no processo de cromatografia por membranas (“adaptado de Keith e colaboradores, 1995”).....	5
Tabela 2 – Listagem de alguns materiais de base utilizados nas membranas de afinidade (“adaptado de Keith e colaboradores, 1995”).....	10
Tabela 3 – Exemplos de membranas de afinidade modificadas, com respetivo método de modificação e aplicação (“retirado Ramakrishna e colaboradores, 2005”).....	11
Tabela 4 – Membranas de Afinidade (“ adaptado de Charcosset, 1998”).....	13
Tabela 5 – Exemplos de diferentes espécies produtoras de CB (“adaptado de Bielecki e colaboradores”).....	17
Tabela 6 – Dimensões da celulose obtida a partir de diferentes fontes (“ adaptado de Gardner e colaboradores, 2008”).....	20
Tabela 7 – Aplicações da Celulose Bacteriana (“ adaptado de Jonas and Farah, 1998”).....	21
Tabela 8 – Aplicações biomédicas da celulose bacteriana e principais resultados obtidos (“ retirado de Kárine, 2010”).....	22

Capítulo II.

Tabela 9 - Resumo das condições experimentais (concentração Tween 20, temperatura, tempo exposição) utilizadas para cada ensaio.....	30
---	----

Capítulo III.

Tabela 10 – Valores obtidos para a adsorção da BSA nos discos de CB.....	46
Tabela 11 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) de F3GA ligada às amostras de CB, para cada ensaio realizado.....	57
Tabela 12 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) de F3GA ligada às amostras de CB - PVA, para cada ensaio realizado.....	62
Tabela 13 - Massa final das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as diferentes percentagens de PVA utilizadas.....	77
Tabela 14 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as diferentes concentrações de F3GA.....	87
Tabela 15 - Massa final das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as várias amostras funcionalizadas.....	94
Tabela 16 - Valores dos ângulos de contacto medidos com a água (Θ água) para as várias amostras de CB investigadas neste projeto.....	96

VIII. Introdução à estrutura da Tese:

A presente tese, intitulada *Bacterial Cellulose as a Nanostructured Functional Material for Biomedical Applications*, aborda questões de diferentes áreas da ciência. O foco principal deste projeto é a avaliação do potencial da Celulose Bacteriana como membrana de afinidade, para a sua aplicação na área biomédica. Na tentativa de melhorar algumas propriedades da matriz de CB, foram realizadas diversas modificações nas membranas de celulose.

Esta dissertação está dividida em quatro capítulos principais, cujos conteúdos são apresentados em seguida.

No *Capítulo I* é apresentada uma introdução abrangente e uma breve revisão da literatura, sobre os principais temas do trabalho. O primeiro tópico a ser abordado é as membranas de afinidade, mencionando-se algumas modificações relatadas e matrizes utilizadas, características essenciais e ainda principais aplicações deste tipo de membranas. O segundo tema explorado é a celulose bacteriana, contextualizada no tema de membranas de afinidade, apresentando-se uma visão geral da sua estrutura, principais propriedades e aplicações nas mais diversas áreas da ciência.

O *Capítulo II* descreve todos os materiais e métodos utilizados e estratégias seguidas ao longo do trabalho, para se produzirem as várias membranas de Celulose Bacteriana funcionalizadas. As membranas modificadas foram posteriormente sujeitas a uma avaliação da sua capacidade de retenção de proteínas de interesse e, como estudo complementar, foram ainda caracterizadas morfológica, superficial e termicamente.

No *Capítulo III* são apresentados e discutidos os resultados obtidos relativamente aos processos de funcionalização das membranas de Celulose Bacteriana, destacando-se a incorporação de PVA e ligação do corante Cibacon Blue F3GA. Nesta secção são também analisados os resultados relativos ao processo de ultrafiltração, com uma solução de BSA, ao qual todas as membranas modificadas foram sujeitas, bem como argumentados os resultados obtidos para a caracterização superficial, térmica e morfológica das membranas de Celulose Bacteriana funcionalizadas.

Esta tese termina com o *Capítulo IV*, que além de incluir as principais conclusões dos estudos e investigações efetuadas neste projeto, resume ainda as recomendações finais e algumas perspetivas para trabalhos futuros.

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO

I. Motivação e Objetivos

Atualmente, muita atenção tem sido dedicada à cromatografia por membranas de afinidade devido ao seu princípio de separação simples mas eficiente. Este processo foi referido pela primeira vez em 1988, num artigo científico publicado por Brandt e colaboradores.

As membranas de afinidade têm sofrido um incremento bastante acentuado no que diz respeito à gama de aplicações em que estão envolvidas. Hoje em dia, o seu campo de intervenção inclui áreas como a biotecnologia, indústria biofarmacêutica, bioengenharia, aplicações clínicas, investigação científica, imunoterapia, entre outras.

A constante inovação e aperfeiçoamento do processo e a descoberta de novas e melhores matrizes de afinidade são as bases para a evolução do processo e são dois dos pontos que fazem das membranas de afinidade um método de elevada produtividade e rendimento.

Neste trabalho, pretende-se avaliar o potencial da Celulose bacteriana (CB) como um possível e inovador material a ser usado como membrana de afinidade para a separação e purificação de determinadas proteínas. Esta eleição baseou-se, entre outros pontos, nas propriedades singulares e promissoras da CB, para este processo de afinidade.

A Celulose Bacteriana é produzida pela bactéria gram-negativa e aeróbia obrigatória *Gluconacetobacter xylinus*. Assim, apenas as bactérias na proximidade da superfície e que têm acesso ao oxigénio conseguem manter a sua atividade e produzem extracelularmente celulose, em apenas alguns dias.

Este biomaterial é um polissacarídeo composto por uma cadeia linear de moléculas de β -D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas.

A película gelatinosa de celulose formada pela fermentação da bactéria é inerte, insolúvel, permeável a líquidos e gases e também resistente à tração e alongamento. Adicionalmente, este polímero de glicose possui uma enorme capacidade de retenção de água, elevada cristalinidade, pureza e hidrofiliçidade. De realçar que, em condições de cultura estática, a celulose sintetizada pela bactéria, organiza-se extracelularmente sob a forma de nanofibras, que se organizam numa matriz 3D. A natureza nanofibrilar destas fibras e a sua organização matricial, conferem ao material uma elevada superfície específica, permitindo assim equacionar a sua exploração como membrana de afinidade. Adicionalmente, é possível modificar *in situ*, durante a biossíntese, a formação (diâmetro), a organização e a porosidade 3D das nanofibras, pelo que, potencialmente, existe a capacidade de regular as propriedades da membrana celulósica.

Devido então às suas propriedades únicas a CB oferece uma vasta gama de aplicações, nas mais diversas áreas, destacando-se o seu enorme potencial na área biomédica, tendo já sido utilizada em inúmeras aplicações na área de engenharia de tecidos. Dentro desta área, este biomaterial já foi estudado por inúmeros grupos de investigação nas áreas de cicatrização de feridas, implantes dentários,

regeneração nervosa e neuronal, próteses vasculares, libertação controlada de fármacos, entre outras aplicações.

Além desta área científica, o potencial deste polissacarídeo tem sido utilizado numa multitude de aplicações abrangendo áreas completamente distintas como a indústria de papel, indústria têxtil, cosmética, entre outras.

O foco central deste trabalho é a avaliação e caracterização da viabilidade da CB como membrana de afinidade.

O objetivo principal deste projeto é explorar o potencial de membranas de CB modificadas, por incorporação do polímero PVA e ligação do F3GA, como membranas de afinidade para aplicações biomédicas, nomeadamente separação e purificação de proteínas de interesse.

1. Membranas de Afinidade

1.1 Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade tem comprovado a sua capacidade e eficiência para a separação de alta resolução de vários compostos. Devido à sua simplicidade e ao seu elevado grau de especificidade, este método tem sido utilizado como padrão industrial para, economicamente, separar e purificar grandes quantidades de biomoléculas, presentes em baixas concentrações em fluidos biológicos. [1, 2 - 4]

Convencionalmente, a purificação por afinidade é levada a cabo em colunas preenchidas com esferas porosas nas quais um ligando de afinidade é imobilizado. Porém, este método cromatográfico possui certas limitações, tais como, taxa de fluxo reduzida, elevada queda de pressão nas colunas, transferência de massa lenta e, conseqüentemente, uma produtividade baixa e dificuldade de aplicação em larga escala na purificação de bioprodutos. [3,4]

A fim de contornar estas limitações, introduziu-se uma abordagem diferente para explorar as interações bioespecíficas entre o ligante e o ligando – a cromatografia por afinidade membranar. Este processo proporciona uma potencial solução uma vez que as membranas operam em modo convectivo o que elimina os problemas de difusão e queda de pressão, conduzindo a uma purificação que idealmente é limitada pelas cinéticas de sorção intrínseca entre a biomolécula alvo e o ligando. Este modo de operação minimiza o tempo de processamento e maximiza a eficiência da purificação. [3 - 5]

Assim, a cromatografia por afinidade pode ser executada em colunas ou em membranas, sendo que estas últimas têm sido utilizadas como alternativa às primeiras, consideradas o processo convencional, não só para este tipo de cromatografia, mas também para outros esquemas de purificação cromatográficos. Por esta razão, neste trabalho decidiu-se aprofundar somente o estudo da cromatografia por afinidade membranar. Na *Figura 1* pode-se observar as diferenças existentes, relativamente à transferência de massa, na cromatografia por afinidade em colunas e em membranas. A transferência de massa no primeiro caso efetua-se essencialmente por difusão entre os poros, e é um processo muito mais lento do que o que ocorre nas membranas, que se efetua essencialmente por fluxo convectivo.

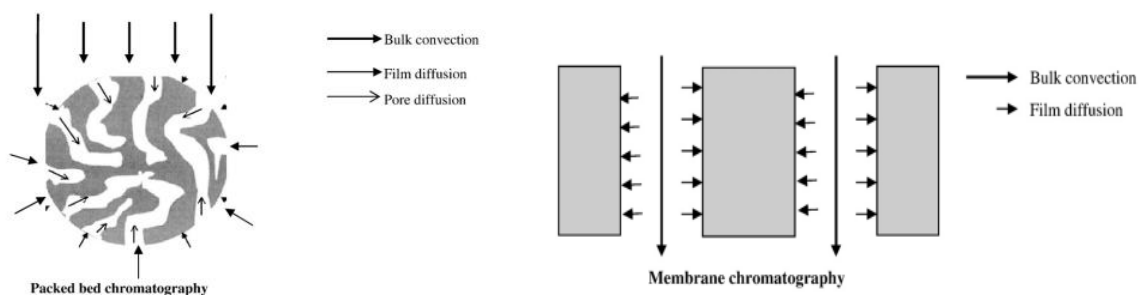


Figura 1 – Esquema ilustrativo da transferência de massa de soluto na cromatografia por coluna e por membranas ("retirado de Ramakrishna e colaboradores, 2005"). [6]

Sumariamente, esta técnica é implementada através da imobilização de ligandos específicos na superfície porosa das membranas, que em seguida adsorvem biomoléculas alvo durante o fluxo convectivo da mistura através dos poros da membrana (*Figura 2*). Deste modo, uma membrana com um tamanho de poro grande irá facilitar o acesso das proteínas aos locais de ligação (nas paredes dos poros) reduzindo significativamente a queda de pressão e o tempo de processamento. A ligação reversível e bioespecífica entre o ligando e o ligante resulta na alteração das propriedades do segundo, que fica assim retido na matriz, enquanto os restantes componentes da mistura passam livremente através da membrana. Contudo, nem todos os potenciais sítios de ligação do ligando desempenham a sua função. [1,2,7 – 11]

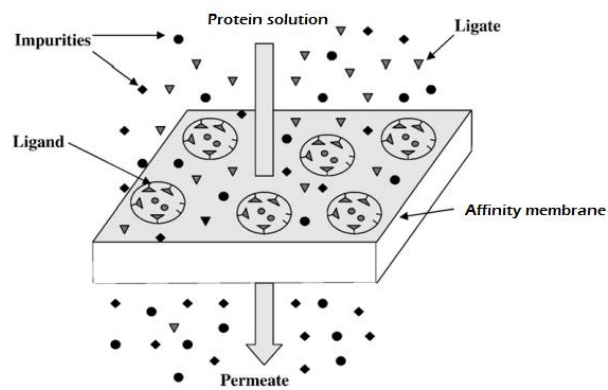


Figura 2 – Imagem representativa do princípio de funcionamento da cromatografia por afinidade membranar (“adaptado de Saxena e colaboradores, 2009”). [1]

Relativamente ao ligando, a sua seleção para a cromatografia por afinidade é influenciada por diversos requisitos dos quais se destacam a sua estabilidade, facilidade de ligação, exibição de afinidade reversível e específica para as substâncias alvo, toxicidade nula, existência de grupos quimicamente modificáveis que permitam a sua ligação à matriz e, obviamente, custo reduzido. Além destes fatores, existe um outro extremamente fulcral que consiste na sua imobilização na matriz, sem perda da atividade biológica original. [11]

Os ligandos utilizados neste tipo de cromatografia podem ser sumariamente classificados em quatro categorias: i. ligandos aminoácidos; ii. ligandos para antigénio e anticorpo ; iii. ligandos corantes; iv. outros ligandos. Na *Tabela 1*, podem-se observar diversos tipos destes agentes, bem como o seu correspondente ligante. [1, 9 - 13]

Dentro do vasto grupo de ligandos existentes evidenciam-se os corantes, que são classificados como ligandos de afinidade, uma vez que interagem com os sítios ativos de muitas biomoléculas, imitando a estrutura dos substratos, co-fatores, ou agentes de ligação para aquela molécula biológica específica.

Estes ligandos, já estavam bem estabelecidos na cromatografia por colunas, e posteriormente foram introduzidos por vários autores, na cromatografia por membranas de afinidade.

Geralmente, os corantes possuem grupos reativos (-Cl, -NH₂, -SO₃H), de modo a serem facilmente imobilizados nas matrizes que contenham grupos - OH e - NH₂. Estes corantes são capazes de se ligarem à maioria das proteínas, especialmente enzimas, de uma maneira notavelmente específica. Adicionalmente, a sua disponibilidade comercial faz com que sejam amplamente utilizados nestes processos de separação por afinidade. A título exemplificativo, destaca-se o Cibracon Blue F3GA que é um corante bem conhecido e utilizado para a ligação de diversos tipos de moléculas, das quais são exemplo as proteínas, como a BSA. [6,9 - 11, 13]

Tabela 1 – Exemplos de ligandos e respetivos ligantes, utilizados no processo de cromatografia por membranas (“adaptado de Keith e colaboradores, 1995”) [7]

Ligand	Ligante
Protein A	Y Globulin
Ligand	Trypsin, trypsin-like proteases
Ligand	Glycoproteins
Heparin-collagen	Hydrophobic proteins
Dye	Bovine sérum albumin (BSA)
Dye	Formate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase
mAb	BSA
Protein A	IgG
Phe, Tyr	IgG, IgA
Copper	Amino acids

Um dos problemas da cromatografia membranar é a saída do ligando durante o processo ou durante o ciclo de eluição. Quando estas membranas são utilizadas para a purificação de um produto, existe sempre o risco de o ligando se tornar numa nova impureza. Além disto, para ligandos com atividade biológica elevada, a sua estabilidade pode também tornar-se uma preocupação. [8]

Como supracitado, ao longo dos últimos anos, a cromatografia por afinidade membranar tornou-se um método único na tecnologia de separação de biomoléculas. Membranas microporosas têm sido modificadas e diversos ligandos de afinidade têm sido acoplados, para o seu uso em diferentes e inovadoras aplicações biomédicas.

Assim, dependendo da aplicação clínica desejada, os requisitos de alta seletividade e hidrofiliidade, estabilidade biológica, química e mecânica, distribuição e tamanho dos poros e ainda quantidade de grupos funcionais reativos deverão ser satisfeitos. [9 - 11, 13]

1.2 Membranas

Em termos gerais, uma membrana pode ser descrita como uma interface, ordinariamente heterogénea, que atua como barreira ao fluxo de espécies moleculares ou iónicas, presentes em líquidos e/ou vapores. [1]

Há várias décadas que os processos baseados em membranas têm atraído a atenção de engenheiros químicos e biotecnológicos, devido ao seu princípio de separação único e eficiente, que resulta num elevado grau de purificação. A separação por membranas não necessita de aditivos e pode ser realizada isotermicamente a baixas temperaturas, com um consumo de energia inferior a outros processos térmicos de separação. [1]

Além disso, a grande maioria das membranas possui elevada porosidade oferecendo assim a vantagem de aumentar a taxa de transferência de massa, uma vez que o comprimento do “ caminho” de difusão é reduzido pois a solução flui através dos poros.

Pelas características supracitadas, os processos de separação envolvendo membranas têm ganho um interesse crescente em diversas áreas, como a biotecnologia e indústria farmacêutica. [14,15]

Novos modelos e sistemas de membranas têm sido desenvolvidos com o objetivo de tentar satisfazer as necessidades de diversas áreas da indústria. Na *Figura 3* está esquematizada a evolução temporal e assinalados os principais marcos das técnicas de separação por membranas. [1]

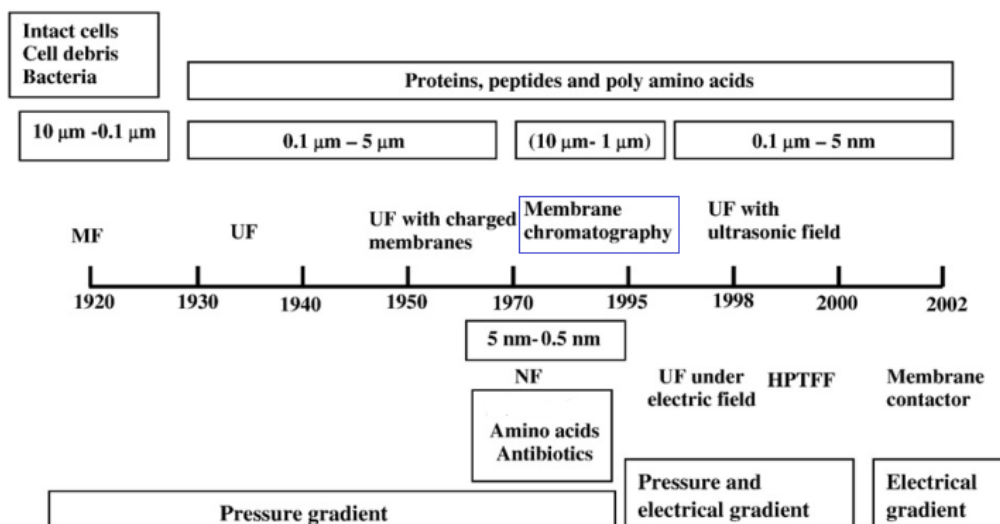


Figura 3 – Esquema representativo dos marcos e da evolução dos sistemas de membranas para a separação/purificação de biomoléculas (“adaptado de Saxena e colaboradores, 2009”). [1]

Tradicionalmente, as membranas eram utilizadas em processos de separação baseados no tamanho das partículas, com requisitos de elevado rendimento mas reduzida resolução. Contudo, por volta de 1920 e

1930, respetivamente, emergiu um interesse crescente nas tecnologias orientadas por pressão, como é o caso da MicroFiltração (MF) e UltraFiltração (UF). As membranas de MF foram adaptadas para reter células e resíduos celulares, permitindo a passagem para o filtrado de proteínas e moléculas mais pequenas. Já as membranas de UF foram concebidas para proporcionar elevada retenção de proteínas e outras macromoléculas. Quatro décadas mais tarde, o processo de NanoFiltração (NF) começou a ser utilizado para separar solventes, sais monovalentes e pequenos compostos orgânicos de iões divalentes e de outras espécies maiores. Relativamente ao processo de cromatografia membranar, este era empregue para separar biomoléculas cujo tamanho variava entre 1 e 10 μm . Em 1988, Brandt e colaboradores publicaram o primeiro artigo científico onde foi referido este processo. [1,12] Os procedimentos de purificação/separação usando estas membranas de cromatografia, já foram relatados para uma grande variedade de compostos biológicos, tais como proteínas (anticorpos monoclonais, enzimas, albumina sérica, anticorpos séricos), DNA e vírus. [1,7]

Em 1998, aplicaram-se campos elétricos e ultrasónicos às membranas, com o intuito de aumentar o seu rendimento e seletividade. Uns anos mais tarde, surgiu a tecnologia de HPTFF (*high performance tangencial flow filtration*) para a purificação de proteínas e péptidos, que baseia a sua separação nas diferenças de tamanho e de carga das biomoléculas. [1]

1.3 Membranas de afinidade

Em resposta a uma crescente procura por quantidades elevadas de biomoléculas, que o rápido desenvolvimento biotecnológico e científico exigem, a cromatografia por membranas de afinidade tem recebido especial atenção, e tem-se revelado um método atrativo, competitivo e rápido para a separação e purificação de proteínas ou outras biomoléculas. Para além de biomoléculas, estas membranas têm também sido utilizadas para recuperar ou remover restos celulares, sólidos coloidais ou suspensos e ainda partículas víricas de suspensões homogeneizadas de células bacterianas.

Estas membranas de afinidade refletem o avanço tecnológico das técnicas de cromatografia líquida de leito fixo e da filtração por membranas, combinando a proeminente seletividade da primeira e a baixa queda de pressão e elevada produtividade associada à segunda. [6, 16 - 19]

As membranas de afinidade foram concebidas para permitir a purificação de moléculas alvo, presentes em soluções complexas, baseadas não no tamanho ou massa destas, mas sim nas propriedades físicas e químicas ou funções biológicas das moléculas a separar; ou seja, em vez de operarem puramente regidas pelo mecanismo de crivagem, as membranas de afinidade baseiam o seu mecanismo de separação na seletividade da membrana para capturar moléculas, através da imobilização de ligandos específicos na sua superfície. Embora se tenham feito alguns progressos no que diz respeito à separação

de moléculas de tamanho idêntico através dos processos de filtração, estes não conseguem atingir de maneira alguma a especificidade observada com estas membranas. [6, 16, 17]

Estas membranas têm a vantagem de possuírem uma ampla área superficial e baixa queda de pressão. Como resultado do fluxo convectivo da solução através dos poros, a resistência à transferência de massa é estrondosamente reduzida, o que melhora o passo de adsorção e fomenta ainda um processamento mais rápido (taxas de fluxo elevadas a baixas pressões), traduzindo-se em procedimentos mais simples e mais seguros. Além disto, o aumento de escala deste processo é relativamente simples, bastando aumentar a área superficial da membrana. [1, 12]

No entanto, e como todos os processos em desenvolvimento, a cromatografia por membranas de afinidade possui certas limitações. Apesar da constante evolução desta técnica, existe uma distribuição não uniforme do fluxo através da matriz, isto é, em algumas áreas da membrana, o fluxo é maior do que noutras, tornando-se essas áreas em fontes de avanço do soluto, o que conduz a uma redução da eficiência do processo. Assim, é extremamente essencial a uniformidade das propriedades ao longo das membranas. [17, 19]

1.3.1 Características requeridas das matrizes de afinidade

Uma matriz ideal para uma aplicação de sucesso na cromatografia por membranas de afinidade deve possuir uma panóplia de propriedades, das quais se destacam:

- Ser microporosa para acomodar as interações livres das biomoléculas com os ligandos;
- Ser hidrofílica e neutra, para prevenir que as biomoléculas interajam não especificamente;
- Conter grupos funcionais, para permitir a sua ativação por uma grande variedade de reações;
- Ser quimicamente estável para suportar condições extremas durante o processo de adsorção, eluição e regeneração;
- Ser fisicamente estável, para suportar a pressão transmembranar e, quando aplicável, esterilização por autoclavagem;
- Estar disponível a um custo reduzido de modo a facilitar a sua utilização em aplicações industriais. [8]

1.3.2 Materiais constituintes das matrizes de afinidade

Em termos de aplicabilidade das membranas de afinidade, especialmente quando a intenção final é a purificação de proteínas, é mais adequada a utilização de um material hidrofílico, do que polímeros hidrofóbicos, de modo a evitar a adsorção não – específica de proteínas indesejáveis nas matrizes das membranas; ou seja, as matrizes devem tentar minimizar as interações van der Waals ou hidrofóbicas, que levam então a uma retenção não – específica de proteínas. [1,2]

Usualmente para a preparação destas matrizes são utilizadas membranas micro e macroporosas, comumente constituídas por polímeros sintéticos ou naturais e idealmente resistentes mecanicamente. Um dos materiais básicos e que já tem vindo a ser usado ao longo dos anos na preparação destas membranas é a celulose. Distintos géneros de matrizes podem ser utilizados dentro deste grupo, desde a celulose regenerada, acetato de celulose, nitrato de celulose, entre outros. [8]

A CB (Celulose Bacteriana) é um material extremamente hidrofílico, constituindo uma boa matriz para o acoplamento dos ligandos de afinidade. Este material possui muito potencial para ser utilizado como membrana de afinidade, devido às suas notáveis propriedades, das quais se destacam, elevada porosidade, tamanho dos poros em escala micro, elevada interconectividade dos espaços intersticiais e, acima de tudo, fibras de diâmetro nano, o que confere à CB uma elevadíssima área superficial, quando comparada com outros materiais. [6, 8, 16]

Outros materiais de base utilizados na composição destas membranas de afinidade podem incluir poliamidas alifáticas, como nylon-6 e o nylon-66, copolímeros aromáticos (policarbonato, polisulfona, polietersulfona (PES)), polímeros de hidrocarbonetos (polietileno, polipropileno), copolímeros sintéticos, copolímeros acrílicos, sílica, entre outros.

A polisulfona é usada devido à sua resistência biológica e térmica, sendo também bastante estável quimicamente. No que diz respeito às membranas microporosas de poliamida, estas são mecanicamente rígidas; já as membranas de nylon possuem um problema que se prende com a adsorção não específica de proteínas na sua superfície. [8]

Relativamente ao PVA, este é um material que também encontra aplicação nesta área. É um polímero solúvel em água, com grupos diol próximos, que são úteis para a imobilização química. Uma maior densidade de ligandos de afinidade nas matrizes pode ser conseguida através do revestimento das membranas com este polímero. [2,20]

Nas *Tabelas 2, 3 e 4* encontram-se vários exemplos de materiais vulgarmente utilizados na constituição destas membranas. [1,3]

Evidentemente, a escolha correta da membrana e a ligação covalente entre esta e o ligando são dois pontos essenciais para o sucesso da cromatografia por membranas de afinidade.

Segundo Charcosset [8], um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento das membranas de afinidade é o melhoramento das matrizes já existentes, por isso estas são muitas vezes modificadas por

diferentes técnicas como por exemplo, ativação química, revestimento com polímeros, e outros métodos de modificação. Alguns exemplos práticos destes métodos serão referidos em seguida. [2, 8, 9 - 11, 13]

Tabela 2 – Listagem de alguns materiais de base utilizados nas membranas de afinidade (“adaptado de Keith e colaboradores, 1995”) [7]

Geometry	Material
Thin sheet	Cellulose
	Regenerated cellulose
	Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate)
	Nylon
Hollow fiber	Titanium
	Polyethylene
	Silicon dioxide glass

1.3.3 Modificações das membranas de afinidade

A abrangente atividade de pesquisa sobre as membranas de afinidade é encorajada pelo seu enorme potencial em inúmeras aplicações. No entanto, a grande maioria dos polímeros que constituem estas membranas são química e biologicamente inertes e muitas vezes não possuem as propriedades superficiais necessárias, como por exemplo, hidroflicidade, rugosidade, cristalinidade e condutividade; por esta razão e para que as aplicações sejam bem sucedidas as matrizes têm de ser funcionalizadas. Este é um tópico que, cada vez mais, recebe especial atenção devido às recentes aplicações destas membranas, especialmente no campo da biotecnologia e bioengenharia. [6]

A preparação de uma matriz de afinidade é um processo de duas etapas, que consiste então na ativação do suporte quimicamente inerte e na ligação do ligando à nova matriz modificada, sendo o primeiro passo praticamente ditado pela natureza e estabilidade da matriz. [8]

O ponto de partida para o desenvolvimento de muitas membranas de afinidade foram as membranas microporosas, cuja estrutura química permitiu a sua modificação. Esta foi uma evolução natural uma vez que já em 1980 existiam tecnologias que permitiam a produção de membranas microporosas com tamanho de poro controlado, como por exemplo membranas de polietileno (PE), polipropileno (PPr) e *polyvinylalcohol* (PVA), requerendo cada uma destas categorias diferentes abordagens de modificação. Os dois primeiros materiais exibem uma grande propensão para ligações não específicas, provavelmente devido às fortes interações hidrofóbicas. Por conseguinte, a primeira modificação realizada nestas membranas foi a introdução da hidroflicidade. [6, 8]

Alguns polímeros, como os supraditos, possuem grupos funcionais hidroxilo, carboxilo, amino, éster, entre outros. Estes polímeros podem por isso ser diretamente modificados por tratamento químico, que envolve a introdução de uma ou mais espécies químicas com o objetivo de se obter uma superfície com propriedades químicas e físicas melhoradas. Alguns exemplos de modificações efetuadas nas membranas de afinidade podem ser consultados na *Tabela 3*. [6, 8]

Por volta de 1988 foi relatada, por Monsato, uma das primeiras modificações superficiais de membranas, conferindo-lhes hidrofiliidade para posteriormente serem novamente modificadas de modo a capturar h-IgG. Henis e colaboradores [21], descrevem o processo para adsorver e reticular um polímero hidrofílico sobre a superfície microporosa de uma membrana. Em 1988, um método de ligação mais direto para fibras ocas de polisulfona foi descrito por Sepracor [12], que discute os aspetos operacionais das membranas de afinidade, mas não relata a sua preparação.

Tabela 3 – Exemplos de membranas de afinidade modificadas, com respetivo método de modificação e aplicação (“retirado Ramakrishna e colaboradores, 2005”) [6]

Applications	Materials	Specific purpose	Methods
Affinity membrane	PMMA nanofiber functionalized with -cyclodextrin	Organic waste removal	blending
	poly(ether-urethane-urea) nanofiber	IgG purification	Chemical reaction between Succimidyl ester group and protein A
	Cellulose nanofiber surface functionalized with cibacron blue	Bilirubin removal and BSA purification	Chemical reaction between the hydroxyl group of cellulose and the cibacron blue F3GA

Os processos químicos envolvidos nas modificações realizadas por Sepracor, bem como a preparação necessária, foram fornecidos uns anos mais tarde numa patente [22]. A reação de base para a ligação pelo processo de Sepracor consiste na adição de um grupo terminal funcional ao grupo terminal –OH do polímero da membrana. Este grupo terminal pode ser utilizado para a ligação direta do ligando, mas os autores preferiram utilizá-lo para ligar um polímero hidrofílico contendo muitos outros sítios funcionais. Este passo, além de diminuir as ligações não específicas da membrana, aumenta ainda o número de potenciais sítios de ligação.

Uma outra modificação do grupo terminal, em fibras ocas, foi descrita em 1992 [23]. Neste caso, fibras ocas microporosas de nylon foram modificadas no grupo terminal amina para produzir uma maior concentração de grupos amina para a subsequente ligação do ligando. Este processo não conduziu a um

aumento significativo na capacidade de ligação do ligando, reforçando a ideia de que esta capacidade de ligação em suportes microporosos é limitada pela área superficial disponível e pela orientação do ligando. Ainda em 1992 [24], foi relatada a modificação de uma membrana de nylon com um corante de triazina; o corante utilizado neste artigo foi o Cibacon Blue F3GA, que é um agente bem conhecido para a ligação de diversas proteínas.

Por volta de 1997 surgiu um novo modelo de membranas capazes de recuperar proteínas solúveis de suspensões [25]. Este artigo cita uma membrana tubular modificada com o corante F3GA, que foi testada com uma solução de BSA pura em tampão.

Charcosset, em 1997, descreve a utilização de membranas de celulose reticuladas com cloreto de epoxipropano para melhorar a estabilidade mecânica e química da matriz, seguida da imobilização de corantes triazina. [8]

Outro exemplo de uma membrana de afinidade, produzida por *Sepracor Inc*, é constituída por polietersulfona (PES) e óxido de polietileno (PEO), revestida com uma camada, covalentemente ligada, de hidroxietilcelulose (HEC). O PES confere estrutura física, e o revestimento de HEC fornece grupos hidroxilo superficiais ativáveis, aos quais os ligandos se poderão ligar covalentemente. Adicionalmente, quer o PEO quer a camada de HEC conferem características de baixa ligação não específica de proteínas. [8]

Outro exemplo de modificação das membranas de afinidade é a utilização do reagente CDI (*carbonyl diimidazole*) para ativar matrizes contendo grupos hidroxilo. Os grupos *imidazolyl carbonate* então introduzidos na matriz reagem com os grupos amina dos ligandos. Um exemplo deste tipo de ativação foi descrito por Kugel e colaboradores [26], onde fibras de nylon modificadas foram ativadas com CDI, para posterior imobilização de protaminas, com o objetivo de capturar IgG. [8]

Outro reagente utilizado para a ativação de matrizes, contendo grupos hidroxilo, é o *2-fluoro-1-methyl pyridinium toluene-4-sulphonate* (FMP). Este método foi utilizado por Unarska e colaboradores [27] para imobilizar proteína A em membranas de nylon. [8]

Um reagente adequado para a ativação de todas as matrizes que contenham grupos hidroxilo é o BrCN. A reação tem de ocorrer a pH elevado (pH=11.0 – 12.0), o que leva à introdução na matriz do grupo éster – cianato. Os ligandos, contendo grupos amina, são posteriormente ligados covalentemente à matriz ativada em meio aquoso (pH=7.0 – 8.0). Um exemplo de membranas microporosas assim ativadas inclui a imobilização de poli(L-lisina) em membranas de poli(etileno vinil álcool) revestidas com polietileno. [8]

Um último exemplo é a ativação por glutaraldeído, que é usado em suportes contendo grupos amina ou amida. Para este reagente existem diferentes mecanismos de ligação. Este método foi utilizado com sucesso na ativação de membranas compósitas de celulose e acrílico, com posterior imobilização de proteína A e G. [8]

A literatura que descreve o processo de cromatografia por afinidade em colunas ou membranas é vasta e abrangente. As membranas de afinidade têm vindo a ser aplicadas em processos de separação em inúmeros campos. É óbvio que a compreensão dos princípios fundamentais da cromatografia é essencial e bastante útil, a fim de retirar vantagens dos atributos únicos das membranas como substrato. Os avanços feitos nas áreas de filtração por membranas e cromatografia em colunas aperfeiçoam também o processo de cromatografia por membranas de afinidade. [7]

1.3.4 Aplicações das membranas de afinidade

As aplicações das membranas de afinidade acompanham de perto os precedentes estabelecidos pela cromatografia por afinidade em colunas. Apesar de tudo, não convém esquecer que a finalidade das membranas de afinidade é aumentar as taxas de fluxo a baixas pressões e reduzir o tempo de processamento. Assim inicialmente, estas membranas não foram desenvolvidas para fornecer processos de separação completamente novos, em vez disso, a sua intenção era acelerar o processo de separação de muitos procedimentos já conhecidos.

Como já foi referido, esta técnica possui uma ampla gama de aplicações, cujo campo de intervenção inclui áreas como a biotecnologia, indústria biofarmacêutica, bioengenharia, aplicações clínicas, investigação científica, imunoterapia, entre outras. Na *Tabela 4*, podem-se observar vários exemplos de aplicações, bem como o tipo de ligando e material utilizados para a preparação destas membranas. A integridade desta tabela é apresentada no Anexo A-I.

Tabela 4 – Membranas de Afinidade (“ adaptado de Charcosset, 1998”) [8]

<i>Substances isolated</i>	<i>Affinity ligand</i>	<i>Membrane material</i>
<i>Amino acid ligands</i>		
Bovine γ -globulin	L-Phenylalanine Tryptophan	Polyethylene membrane grafted glycidyl methacrylate
Heparin from buffer, plasma and blood	Poly(L-lysine)	Poly(ethylene vinyl alcohol) coated polyethylene, cellulose diacetate and Hemophan membranes
Human IgG from placenta	L-Histidine	Immunodyne (Pall), silica and nylon-methacrylate composite membrane
Human IgG from plasma or serum	L-Histidine	Protein A membrane (Nygene) Poly(ethylenevinyl alcohol) membrane
<i>Antigen and antibody ligands</i>		
Bovine albumin from serum	Monoclonal antibody to BSA	Regenerated cellulose membrane
Bovine immunoglobulin G	Recombinant protein G	Regenerated cellulose (MemSep 1000, Millipore)
Human γ -globulin from plasma	Protein G	Nylon and acrylic composite membrane
Human γ -globulin from hybridoma cultures, ascites fluid and serum	Recombinant protein A Recombinant protein G	MAC TM cellulose acetate membrane (Amicon)
Mouse monoclonal antibodies IgG ₁ and IgG ₂		
Human γ -globulin	Protein A	Loprodyne nylon membrane (Pall)
Porcine γ -globulin		
Human IgG	Protein A	Polv(ether-urethane-urea) membrane

<i>Substances isolated</i>	<i>Affinity ligand</i>	<i>Membrane material</i>
Human IgG pure and from serum. Bovine IgG	Protein A Protein G	Cellulose and acrylic composite membrane
Human IgM antibodies against triosephosphate isomerase from sera	Triophosphate isomerase	Polyvinylidene difluoride membrane
Human serum amyloid P from rat blood (hSAP)	Anti-hSAP IgG (polyclonal, rabbit)	Cellulose
Interferon- α 2a (rIFN- α 2a)	Monoclonal antibody to (rIFN- α 2a)	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Interleukin-2 (rIL-2)	Monoclonal antibody to (rIL-2)	
Interleukin-2 receptor (IL-2R)	Monoclonal antibody to (IL-2R)	
Mouse IgG ₁ and IgG _{2a} monoclonal antibodies from cell culture supernatant	Protein A	Sartobind epoxy membrane (Sartorius)
Protein A	Rabbit IgG	
Rabbit IgG	Protein A	
Rat IgE from blood	Rabbit IgG specific for rat IgE	Cellulose membrane
<i>Dye ligands</i>		
Adenylate kinase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Ultipor nylon membrane (Pall)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase		
Malate dehydrogenase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Modified cellulose membrane
Alkaline phosphatase	Active Red K2BP	
Bovine serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Acrylic copolymer
Bovine serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Sartobind Blue 2 membrane (Sartorius)
Malate dehydrogenase from pig heart and cell extract		
Catalase from bovine liver	Cibacron Blue F3GA	Poly(hydroxvethyl methacrylate)
Human serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Chitosan supported on polyethersulphone
Lysozyme	Cibacron Blue F3GA	Regenerated cellulose membrane
Malate dehydrogenase from pig heart	Cibacron Blue F3GA	Ultipor, Immunodyne, Ioprodyne nylon membrane (Pall)
Formate dehydrogenase from yeast, bovine serum albumin	Procion	
Pyruvate decarboxylase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Loprodyne and Immunodyne nylon membranes (Pall)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Sartobind Blue 2 membrane (Sartorius)
Human serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Titanium dioxide membrane coated with poly(ethylene imine)

Dos exemplos acima apresentados e relativamente aos ligandos utilizados, sobressaem os corantes, especialmente o F3GA, sendo utilizado em 99% dos casos. No que diz respeito às matrizes é de interesse destacar as que utilizam membranas de celulose, celulose modificada ou membranas compósitas de celulose e outro material.

Vários estudos já foram realizados utilizando acetato de celulose, celulose regenerada, entre outras; um dos principais e mais recentes interesses da CB é a sua utilização como membrana de afinidade. [16,17] Ma e colaboradores [16] funcionalizaram a superfície duma membrana de celulose regenerada com o ligando de afinidade F3GA. As modificações químicas da superfície foram analisadas por espectro ATR-FTIR. Os resultados deste estudo revelaram que as membranas de celulose regenerada continham 130 μ mol de corante por grama de celulose e uma capacidade de captura de BSA e bilirubina (resíduo metabólico existente no sangue humano) de 13 mg/g e 4mg/g, respetivamente.

O isolamento de uma proteína ou grupo de proteínas a partir de fluidos corporais para fins terapêuticos, requer um nível elevado de purificação. Existem muitos artigos sobre a purificação de frações de globulinas e vários fatores de coagulação utilizando membranas de afinidade.

Uma outra aplicação interessante destas membranas, para fins terapêuticos, foi relatada por Hou and Zaniewski [28], que purificaram uroquinase a partir de urina humana através de um processo de múltiplos passos. A uroquinase é produzida pelo rim e excretada na urina e quando recuperada e purificada na sua forma ativa, é um agente trombolítico eficaz que catalisa a conversão do plasminogénio em plasmina. A plasmina consegue lisar os coágulos de fibrina, muitas vezes associados com os bloqueios vasculares.

Conforme o número de passos de processamento requeridos aumenta, torna-se progressivamente mais benéfico usar procedimentos de alto rendimento, tais como os oferecidos pelas membranas de afinidade. As taxas de fluxo elevadas obtidas implicam menores tempos de residência na matriz e isto, frequentemente traduz-se, numa maior retenção da atividade biológica do produto, muito importante quando se separam moléculas com propriedades terapêuticas.

Um exemplo mais tradicional de uma aplicação destas membranas é o caso relatado no trabalho de Lutkemeyer e colaboradores [29]. Neste artigo, os autores ligaram covalentemente heparina Startobind modificada (ligando), através da abertura do anel epoxy com diamina. Esta reação é extremamente lenta, demorando oito dias, mas aparentemente conduz a ligações de heparina muito estáveis.

Em vez de imobilizar heparina para capturar determinadas proteínas, Ma e colaboradores [30] modificaram uma série de diferentes tipos de fibras ocas com poli (L-lisina) com o intuito de capturar heparina do sangue. A heparina é um polissacarídeo altamente sulfatado com aproximadamente 20 kDa de massa molecular. Neste artigo, os autores estudaram três diferentes tipos de fibras; a primeira consistia numa fibra de polietileno microporosa revestida com poli (etileno – co – vinil álcool), a segunda era constituída por acetato de celulose e por último, a terceira era uma fibra diálise de celulose pura. Em todos os casos, a poli (L-lisina) foi ligada à matriz após a ativação dos grupos hidroxilo das fibras com BrCN. Os resultados mostraram que a heparina consegue difundir-se em ambas as fibras de polietileno modificadas e nas fibras de acetato celulose. No entanto, é demasiado grande para penetrar na estrutura celulósica das fibras de diálise, por isso neste caso a heparina está limitada à adsorção na superfície. Aproximadamente 15 mg de heparina por metro quadrado de área superficial foi ligada para o caso das fibras que podem ser penetradas, enquanto apenas 5 mg por metro quadrado se ligou na estrutura celulósica.

Champluvier and Kula (1992) [31] relataram a purificação de glucose – 6 – fosfato desidrogenase a partir de um homegenato de levedura - *Saccharomyces cerevisiae* - através da adsorção numa membrana modificada por F3GA, como passo final de purificação. O tempo de residência mínimo para a ligação da enzima foi estimado em 0,25 segundos e o tempo de processamento foi de 10 minutos, a uma taxa de

fluxo elevada. No mesmo ano, Briefs and Kula, relataram a adsorção dinâmica da proteína BSA em membranas de nylon modificadas com F3GA. [24]

Castilho e os seus colaboradores, em 2000 [2], descreveram a utilização de membranas de nylon revestidas com dextranos e PVA, para produzir matrizes de afinidade com características de funcionalidade química adequada e reduzida ligação não específica de proteínas; esta última característica salientou-se nas membranas modificadas com PVA. Posteriormente procederam à imobilização da proteína A nas matrizes, com a intenção de capturar IgG (imunoglobulina humana G). [8]

Xia e colaboradores em 2003, modificaram membranas de nylon através da incorporação de quitosano, de modo a melhorar a hidrofiliçidade das matrizes para assim reduzir as interações não específicas na superfície destas. Após este passo, os autores funcionalizaram a superfície das matrizes através da ligação covalente do F3GA, com o intuito final de capturar bilirubina. [11]

Como referido anteriormente inúmeras vezes, a CB é um material muito promissor na área das membranas de afinidade, pois possui propriedades únicas, das quais se destacam uma elevada área superficial, o que facilita e amplifica o acoplamento de ligandos de afinidade na sua superfície. O seu imenso potencial neste campo estende-se a infindáveis aplicações em diferentes áreas.

2. Celulose Bacteriana

A celulose é o biopolímero natural mais abundante na terra sendo por isso extensamente utilizado como matéria-prima em diversos produtos da indústria.

Diversos marcos nos estudos da síntese da celulose contribuíram para a elucidação dos mecanismos que governam não só a biogénese do produto bacteriano, mas também o das plantas, conduzindo assim à compreensão de um dos processos mais importantes da natureza. [32]

Até agora foram descobertas quatro formas diferentes de obter este polímero (*Figura 4*): isolamento a partir de plantas (processo mais vulgar e o mais importante a nível industrial); quimiossíntese a partir de derivados de glicose; síntese enzimática *in vitro*; e por fim biossíntese por diferentes tipos de microrganismos. [32, 33, 34]

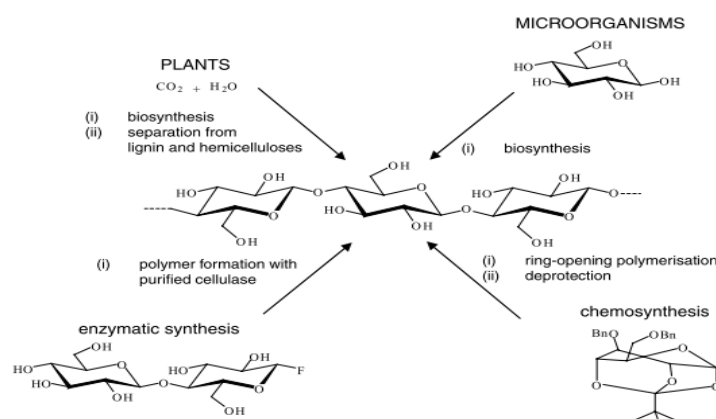


Figura 4 – Diferentes formas de obter celulose (“retirado de Klemm e colaboradores, 2001”) [33]

2.1 Produção e Morfologia da CB

Alguns organismos são bem conhecidos pela sua capacidade de, na natureza, produzirem celulose. Embora a grande maioria da celulose existente ser produzida por plantas, a síntese deste biopolímero também ocorre na maioria dos grupos de algas e em várias espécies de bactérias.

A celulose bacteriana é usualmente obtida através da fermentação pela bactéria aeróbia e gram negativa *Acetobacter xylinum*, reclassificada como *Glucanoacetobacter xylinus* uns anos mais tarde. Apesar de existirem outras bactérias produtoras CB, nem todas as espécies são capazes de a secretar na forma de fibrilas extracelulares. Na *Tabela 5* é apresentada uma visão global dos produtores conhecidos de CB [34]. A estrutura deste polímero depende do organismo, apesar do processo de biossíntese e do mecanismo que o regulam serem provavelmente comuns para a grande maioria das bactérias produtoras de CB. [32, 34]

Tabela 5 – Exemplos de diferentes espécies produtoras de CB (“adaptado de Bielecki e colaboradores”) [37]

Genus	Cellulose structure
<i>Acetobacter</i>	extracellular pellicle composed of ribbons
<i>Achromobacter</i>	fibrils
<i>Aerobacter</i>	fibrils
<i>Agrobacterium</i>	Short fibrils
<i>Alcaligenes</i>	fibrils
<i>Pseudomonas</i>	no distinct fibrils
<i>Rhizobium</i>	short fibrils
<i>Sarcina</i>	amorphous cellulose
<i>Zoogloea</i>	not well defined

Embora em 1886 A.J. Brown já tivesse relatado a síntese extracelular de uma membrana gelatinosa pela bactéria *G.xylinus*, a CB só atraiu atenção na segunda metade do século vinte. Assim, estudos intensivos sobre a sua síntese, usando *G.xylinus* como bactéria modelo, foram iniciados por volta de 1954 por Hestrin e colaboradores, que provaram que células desta bactéria em repouso, sintetizam celulose na presença de glicose e oxigénio.

O processo de síntese da CB é preciso e regulado por várias etapas, envolvendo um grande número quer de enzimas individuais, quer de complexos de proteínas catalíticas e reguladoras, cujas estruturas supramoleculares ainda não estão bem definidas. [32, 34]

Tradicionalmente, a cultura de CB faz-se em meio estacionário acumulando-se, ao longo do tempo, uma membrana gelatinosa e espessa na superfície do meio de crescimento. [35] Esta película é uma estrutura

que compreende os ingredientes do meio de cultura e uma grande proporção de água. Na sua forma final, este biomaterial apresenta-se no formato de uma membrana flexível de cor esbranquiçada (*Figura 5*).

Estudos realizados, relativos à morfologia da CB, revelam que existem duas texturas distintas entre a parte superior e inferior da membrana. A superfície que se forma na interface entre o meio de crescimento e o ar possui uma textura mais lisa e homogénea, enquanto que a superfície que não se encontra em contacto com o oxigénio é mais gelatinosa, rugosa e até mesmo heterogénea. [33] A morfologia da membrana depende da forma da interface, que pode ser facilmente manipulada ou controlada.

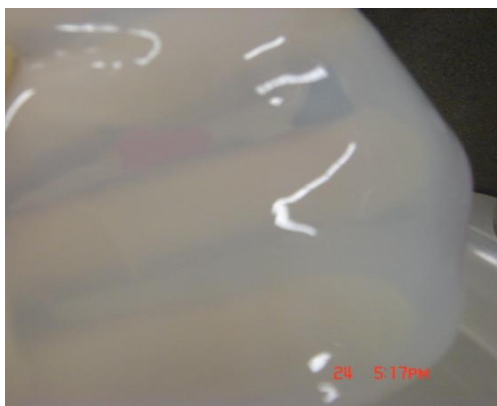


Figura 5 – Imagem de uma membrana de CB.

A celulose assim sintetizada é idêntica à celulose vegetal no que diz respeito à estrutura molecular, referida na secção seguinte deste capítulo. No entanto, investigações extensivas sobre a CB revelam que apesar de quimicamente idêntica à celulose vegetal, a sua estrutura macromolecular e as suas propriedades físicas e químicas diferem. [32, 33, 34]

A CB possui uma maior pureza química, uma vez que é livre de lignina, pectina e hemicelulose, bem como de outros produtos biogénicos, que estão normalmente associados à celulose vegetal. Adicionalmente, esta celulose extracelular difere da celulose vegetal no que diz respeito à sua maior cristalinidade (acima de 60%), maior capacidade de absorção de água, tipo de estrutura - constituída por uma rede de nanofibrilas ultrafinas, cerca de 100 vezes mais finas do que as da celulose vegetal, tornando-a num material altamente poroso - e ainda grau de polimerização - enquanto o grau de polimerização da CB varia entre 2000 a 6000, o grau da celulose vegetal pode atingir os 13000 e 14000. [33, 36]

2.2 Estrutura da celulose

Quimicamente, a CB é um polímero linear de elevado peso molecular, composto por unidades de D – glucano - piranose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas formando assim uma molécula de cadeia longa (Figura 6). As moléculas adjacentes são estabilizadas lateralmente por ligações hidrogénio entre os grupos hidroxilo, resultando em estruturas tridimensionais apelidadas de fibrilas. [37]

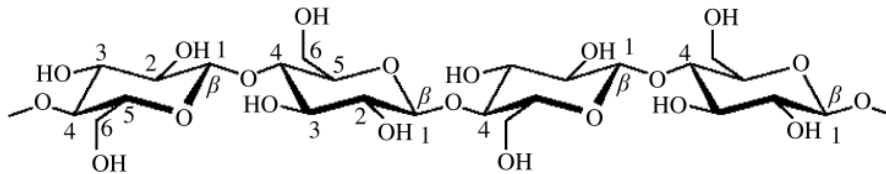


Figura 6 – Ilustração representativa da estrutura molecular da celulose, como um polímero formado pela repetição de unidades de D-glucano-piranose (“retirado de Gardner e colaboradores, 2008”) [38]

2.3 Principais propriedades da CB

A CB possui propriedades singulares e bastante promissoras, que têm sido muito procuradas por diversas áreas, das quais se destacam a medicina moderna e a investigação biomédica. As características fundamentais da CB, que fazem deste um biomaterial de excelência, estão em seguida mencionadas: [32, 33,35, 39, 40]

- Elevada cristalinidade – possui um grau de cristalinidade entre 60 e 90%, determinado por difração raio-x; o estado de cristalinização da celulose é determinado pelo arranjo das cadeias de glicose em relação umas às outras, dentro da unidade celular;
- Permeabilidade seletiva – esta característica pode ser alterada através de tratamentos após a sua produção;
- Excelentes propriedades físicas e mecânicas – a estrutura nanofibrilar única e a elevada cristalinidade determinam estas propriedades; este biomaterial possui elevada resistência e estabilidade mecânica, características estas que podem também ser alteradas por tratamentos pós produção;
- Elevada capacidade de retenção de água – esta característica da CB hidratada inclui valores na gama de 1000%; um ponto importante a salientar é que estes valores de retenção de água (VRA) parecem depender do volume de meio de cultura;
- Elevada hidroflicidade e porosidade – hidroflicidade explicada pela presença de estruturas porosas e “túneis” no interior da película húmida e que depende da extensão da área superficial interior dos espaços intersticiais da matriz hidratada; porosidade aproximadamente de 94%;

- Elevada pureza química e elevada área superficial;
- Dimensões – estrutura reticulada de fibras ultrafinas, na ordem dos micrómetros a nanómetros, entrelaçadas de tal maneira que formam uma espécie de rede tridimensional. Na *Tabela 6* pode-se observar os valores relativos às dimensões das nanofibrilas de CB segundo Gardner e colaboradores [38].

Tabela 6 – Dimensões da celulose obtida a partir de diferentes fontes (“ adaptado de Gardner e colaboradores, 2008”) [38]

Cellulose source	Length (nm)	Cross section (nm)
Algal (Valonia)	>1000	10-20
Bacterial	100 – several microns	5-10 by 30 - 50

Frente ao apresentado, é possível constatar a versatilidade dos materiais compostos por CB. Estas características, juntamente com a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e disponibilidade, fazem da CB um material com imenso potencial para as mais diversas aplicações biomédicas.

2.4 Aplicações da CB

O potencial deste polissacarídeo tem sido utilizado numa multitude de aplicações abrangendo áreas completamente distintas como a indústria de papel, indústria têxtil, cosmética, bioengenharia, entre outras. [32]

Devido essencialmente à sua elevada resistência mecânica, biocompatibilidade, elevada pureza, e permeabilidade seletiva, a CB tem ainda ganho terreno em inúmeras áreas da atualidade, como é o caso de aplicações biomédicas, especialmente no campo de engenharia de tecidos, sendo já utilizada como *scaffolds*. [41]

Dentro desta área, este biomaterial já foi estudado por inúmeros grupos de investigação nas áreas de cicatrização de feridas, implantes dentários, regeneração nervosa, cartilagem, regeneração neuronal, próteses vasculares, libertação controlada de fármacos, entre outras aplicações. [42]

A CB é considerada um material natural para o tratamento de feridas uma vez que apresenta um elevado conteúdo de água (98-99%), boa absorção de líquidos, elevada resistência à humidade e elevada pureza química. Este biomaterial pode ainda ser facilmente esterilizado sem qualquer alteração da sua estrutura

ou propriedades. Além disto, a CB protege a ferida de infecções secundárias e danos mecânicos e fornece um ambiente húmido, resultando numa melhor cicatrização da ferida.

A sua elevada resistência mecânica, quando no estado hidratado, e permeabilidade a líquidos e gases, conferem-lhe ainda enorme potencial para ser aplicada como pele artificial temporária para o tratamento de queimaduras. [33,39,43]

No sector dos cuidados de saúde, existem vários produtos de CB comercializados, dos quais se destacam o Biofill e o Gengiflex. O Biofill foi o primeiro produto feito de CB utilizado em ensaios clínicos e é utilizado como substituto de pele no caso de queimaduras de terceiro grau; já o Gengiflex é empregue para a recuperação de tecidos peridontais e implantes dentários. [33, 34]

A possibilidade de se obter um produto com qualquer tipo de estrutura ou forma aumenta ainda mais o leque de aplicações da CB. White and Brown [44] demonstraram que é possível obter uma película de CB produzida pela bactéria *G. xylinus*, em forma de luva. Outro exemplo da vantagem da moldabilidade da CB é a capacidade de obtenção de um tubo de celulose oco, aplicado como substituto de vasos sanguíneos. [33]

Até agora são conhecidas inúmeras aplicações da CB nas mais diversas áreas. Na *Tabela 7* encontram-se listadas algumas dessas áreas, destacando-se a utilização das membranas de CB como membranas de afinidade utilizadas nas técnicas cromatográficas para a imobilização de proteínas. Na *Tabela 8* listam-se várias aplicações biomédicas da CB.

Tabela 7 – Aplicações da Celulose Bacteriana (“ adaptado de Jonas and Farah, 1998”) [34]

Material	Application
Temporary artificial skin (Biofill®, Bioprocess®, Gengiflex®)	Therapy of burns, ulcers, dental implants
Nonwoven paper or fabric	Improvement of latex or other binders; repairs of old documents
Sensitive diaphragms	Stereo headphones
Cellulose	Immobilization of proteins, chromatographic techniques
Cellulose	Stabilizer of emulsions in cosmetics, food
Cellulose	Coating compositions

Em 2006, Backdhal e colaboradores [45] avaliaram a capacidade da CB para ser utilizada como biomaterial para a substituição de vasos sanguíneos. Nestes estudos as propriedades mecânicas da CB foram comparadas às propriedades de estruturas semelhantes a artéria carótida porcina (PCA), sendo que os resultados obtidos favorecem este último material.

Em 2008, o mesmo grupo de investigadores desenvolveram um novo método para a preparação de tubos tridimensionais de CB com porosidade controlada, adicionando ao meio de crescimento da *G. xylinus* cera de parafina e partículas de amido de vários tamanhos. *Scaffolds* de CB com diferentes porosidades e

interconectividades foram preparados através deste método. Os resultados obtidos mostram que esta metodologia permite o controlo da porosidade, espessura e interconectividade da CB produzida, simplesmente variando as condições de fermentação. [46]

Tabela 8 – Aplicações biomédicas da celulose bacteriana e principais resultados obtidos (“ retirado de Kárine, 2010”) [46]

Biomedical Applications	Study	Outcome
Cartilage repair	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>In vitro</i> study – BC as scaffolds for chondrocytes culture; 2. Reconstruction and rehabilitation of the nasal framework in rabbits. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Growth, cell migration and ingrowth; expression of collagen by the cells; 2. Good integration.
Vascular grafts	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>In vitro</i> studies were developed to improve BC as scaffold to tissue engeneering of vascular grafts; 2. <i>In vivo</i> studies with stents coated with BC (rabbit model); 3. <i>In vivo</i> studies of BC as microvessel endoprosthesis (rats and pig models) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Many of the strategies used (e.g. increasing the porosity, improving the mechanical properties, functionalization with adhesion peptides, etc.) improved the adhesion, migration and proliferation of smooth muscle cells or endothelial cell to BC; 2. BC accelerated re-endothelialization of the area covered by the stent, acting as a barrier to the migration of muscle cells; 3. good incorporation in the host tissue without any rejection reaction.
Wound dressing	<ol style="list-style-type: none"> 1. Corneal healing (rabbits); 2. Skin healing (swine); 3. Dural substitute exposed to intact and damaged brain of dogs; 4. Human patients with chronic venous insufficiency and lower-leg ulceration; 5. Repair of chronic lower extremity ulcers in humans; 6. Rabbit's laryngotracheal region. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Improved healing; 2. Good performance in healing and adhesion to the wound; 3. Good acceptance of the graft; 4. BC dressings create a protective, hypoxic, moist environment and improved healing. ↓ patients pain; 5. ↓ of time for epithelization and the time for wound closure over standard care; 6. No inflammatory signs.
Dental implants	<ol style="list-style-type: none"> 1. Periondontal disease treatment, dental implants and guided bone regeneration; 2. Biocompatibility evaluation with implantation of BC (Gengiflex®) in rat subcutaneous connective tissue; 3. BC (Gengiflex®) was used for guided tissue regeneration of bone defects in rabbits. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Provide a good alternative for guided tissue regeneration; ↑ regeneration of the lesions; 2. BC behaved as a stranger material to the host tissue in comparision to Milipore and Teflon membranes; 3. PTFE presented better results than Gengiflex®.
Nerve regeneration	<ol style="list-style-type: none"> 1. Micronerve reconstruction of rat sciatic nerve using BC tubes (BASYS®); 2. BC tubes (BASYS®) were used as drug depot of neuroregenerative substances; 3. BC sheets to envelop peripheral nerve lesions (dogs); 4. Facial nerves repair (rats) with BC sheets (Biofill®). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ↑ regeneration of the functional nerve; the reappearance of acetylcholine as the transmitter of nerve impulses to the executive organ was observed; 2. Improved healing; 3. A moderate fibrous reaction and realignment and axonal growth through the injury were observed. 4. Improve guidance of the nerve fibers, allowing the concentration of neurotrophic factors, which consequently promoted the nerve regeneration.

Klemm e colaboradores, em 2001 [33], investigaram a aplicação de tubos de CB patenteados – BASYC® (Bacterial SYnthesized Cellulose) – como endopróteses de microvasos para os procedimentos de anastomose, utilizando a artéria carótida de um ratinho branco. O estudo foi um sucesso, sendo o tubo completamente incorporado no organismo sem que ocorre-se qualquer tipo de rejeição.

Em 2006, Negrão e colaboradores [47], compararam a eficácia dos stents convencionais com stents revestidos de CB, utilizando um modelo de coelho. Os autores mostraram que os stents revestidos com CB não mostravam eventos adversos nos procedimentos de angioplastia. Em vez disso, estes aceleravam a re-entotelização da área coberta pelo stent, atuando como barreira à migração das células musculares, representando assim uma estratégia promissora para a prevenção e tratamento da reestenose nos procedimentos endovasculares.

No mesmo ano, Wiegand [48] desenvolveu um compósito para o tratamento de feridas crônicas, chamado CollagenBC, adicionando colagénio tipo I ao meio de cultura da CB. Este material induz, *in vitro*, uma redução da atividade da protease e concentração de interleucina, características relevantes para apoiar o processo de cicatrização de feridas. Um ano mais tarde, seguindo a mesma abordagem, Zhou e colaboradores [49] usaram um meio de cultura contendo alginato de sódio para a produção de CB, obtendo celulose com cristalinidade mais baixa.

Putra e colaboradores, em 2008 [50], descreveram uma técnica simples que permite obter um gel CB tubular com comprimento, diâmetro interno e espessura desejadas e com uma estrutura fibrilar orientada. Esta técnica requer um tempo de cultura reduzido, comparado com as metodologias descritas por outros autores.

A biocompatibilidade é um dos principais requisitos para qualquer material biomédico. Neste contexto, a CB tem vindo a ser modificada para aumentar a sua biocompatibilidade. Dependendo da aplicação biomédica prevista, diversos requisitos podem ter que ser satisfeitos de modo a imitar o tecido a ser substituído, como por exemplo, aumento da degradação *in vivo*, modificação das propriedades mecânicas, melhoramento da integração com o tecido do hospedeiro, entre outras. Com este intuito, alguns métodos, como a modificação superficial química, incorporação de moléculas bioativas, modificação da porosidade e cristalinidade, são muitas vezes empregues para tornarem a CB um biomaterial mais apto para a área de engenharia de tecidos. [46]

Um exemplo prático destes casos foi relatado por Bodin e colaboradores (2007) [51], que descreveram um novo método para ativar a superfície da CB, utilizando o péptido RGD (sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp), com o objetivo de melhorar a adesão celular da CB. Já em 1993, Watanabe e colaboradores [52] tinham desenvolvido diversos métodos de modificação química, com o mesmo objetivo.

Phisalaphong e Jatupaiboon [53], em 2008, obtiveram um compósito nano-estruturado de CB-quitosano, suplementando o meio de cultura de CB com quitosano de baixa massa molecular. Comparado com a

CB, este compósito apresentou uma estrutura fibrilar mais densa, diâmetro de poro mais pequeno e uma área superficial maior.

Scaffolds nanocompósitos de hidroxiapatite/CB combinam boas propriedades mecânicas com uma estrutura de poros aberta, sendo por isso candidatos adequados para a aplicação em engenharia de tecidos. Este material estimula a proliferação e adesão celular e melhora a diferenciação osteoblástica. Em 2006 e 2009, vários autores sintetizaram e caracterizaram *scaffolds* de CB-hidroxiapatite para regeneração óssea. [46]

Muitos outros estudos ampliam o reportório de diferentes compósitos de CB, com potencial para aplicações biomédicas.

Além das aplicações em cima referidas a CB tem sido o foco para o desenvolvimento de variadas ideias: produção de alimentos saudáveis, como a nata de coco (primeiro produto de CB comercialmente disponível); produção de papel; indústria eletrónica; e outras aplicações industriais, tais como, desenvolvimento de embalagens biodegradáveis para produtos alimentares. [54-56]

Na área eletrónica, este material tem vindo a ser testado para o revestimento de determinados componentes e já é usado na constituição de altifalantes e auscultadores de alta-fidelidade, devido a duas propriedades fundamentais - elevada velocidade sónica e perda dinâmica baixa - características estas que lhe permitem ainda ser utilizado em outras aplicações acústicas.

CAPÍTULO II.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Produção e Preparação da Celulose Bacteriana:

1.1 Produção da Celulose Bacteriana pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*:

O meio de cultura clássico para o crescimento da bactéria *G. xylinus* (ATCC 53582) é o meio Hestrin-Schramm (HS) [57] que consta da seguinte composição: 0,02 g/mL de glucose (Fluka, France); 0,005 g/mL de peptona (HiMedia Laboratories, Índia); 0,005g/mL de extrato de levedura (Panreac Quimica SAU, Espanha); 0,00338 g/mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico dihidratado) (Sigma-Aldrich, Alemanha); 0,0015 g/mL de ácido cítrico monohidratado (Pronalab, Portugal). Após a preparação deste meio em água destilada, ajustou-se o pH para 5.0 (pH ótimo para o crescimento da *G. Xylinus*) adicionado ácido clorídrico (HCl) à solução. [35, 32, 58]

Neste trabalho utilizaram-se dois tipos de tamanhos para os discos de celulose, o primeiro obtido através do crescimento em placas de cultura de 24 poços e o segundo em placas de cultura de 6 poços (*Figura 7*). No primeiro caso foi adicionado a cada poço 2 mL de meio inoculado, já no segundo e, dependendo da espessura da membrana pretendida, adicionou-se 5 mL ou 10 mL, conforme se pretende uma membrana mais fina ou mais espessa, respetivamente.

As placas de cultura inoculadas foram colocadas na estufa (WTB Binder, Itália), a 30 °C, sem agitação, durante aproximadamente quinze dias, sem qualquer necessidade de cuidados especiais ou renovação do meio de cultura. [32, 57,58]

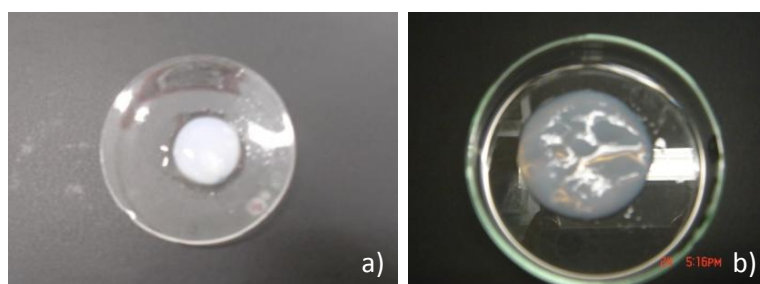


Figura 7 – Discos de celulose bacteriana de: **a)** 24 poços; **b)** 6 poços.

1.2 Processo de lavagem da Celulose Bacteriana:

Após os quinze dias de fermentação os discos de CB foram retirados das placas de cultura, lavados com água destilada e seguidamente tratados com hidróxido de sódio.

Este tratamento consiste na imersão dos discos numa solução de 4% de NaOH (Sigma-Aldrich, Alemanha), a 50 °C e com agitação, até que a cor da CB passe de amarelada a esbranquiçada (*Figura*

8). Uma vez atingida esta cor, a CB é imersa em água destilada até que o pH final seja igual a 7.0. [43, 59-61]

Este processo de lavagem da CB com hidróxido de sódio tem como objetivo assegurar a destruição das células de *G. xylinus* e ainda de remover qualquer vestígio dos componentes do meio de cultura presente na matriz.

Após este passo de lavagem todos os discos de CB foram armazenados na forma hidratada (em água destilada) e à temperatura ambiente.

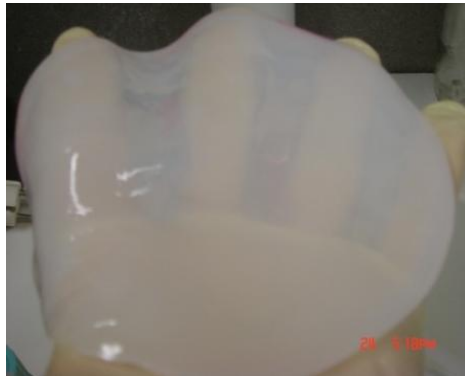


Figura 8 – Membrana de CB após lavagem.

2. Ensaio de adsorção e de eluição de proteínas na matriz da celulose não modificada:

2.1 Ligação da proteína Albumina Bovina do Soro às membranas de celulose:

A Albumina Bovina do soro (BSA) é uma proteína globular, com uma massa molecular de aproximadamente 66 kDa, constituída por 580 resíduos de aminoácidos com 17 ligações intra-cadeias de dissulfureto e um grupo tiol livre no resíduo 34. [62,63]

Admite-se que as suas dimensões estão compreendidas entre 140 Angstrom, para o eixo maior, e 40 Angstrom para o eixo menor. [64,65]

A BSA pertence à classe de proteínas que conseguem mudar facilmente a sua estrutura e conformação.

Esta proteína tem sido largamente utilizada como proteína modelo nos estudos de adsorção em diversas superfícies, estando por isso muito bem descrita. [62-66]

A adsorção de proteínas é um processo complexo, envolvendo ligações van der Waals, ligações hidrogénio e ainda interações electrostáticas. Este processo é dependente das características físicas e químicas da superfície onde a adsorção irá ocorrer. [67]

Assim, para avaliar a capacidade de ligação de proteínas às membranas CB, a BSA foi eleita como proteína modelo. Esta seleção baseou-se essencialmente em dois fatores. O primeiro relaciona-se com a sua importância, pois a albumina possui inúmeras funções fisiológicas importantes, sendo ainda a proteína mais abundante no plasma sanguíneo humano; por esta razão, a BSA é muitas vezes usada em experiências como um substituto de fluidos corporais humanos, como por exemplo, o sangue.

Por outro lado, o custo associado aos ensaios de ligação são, inevitavelmente, um ponto fulcral. A BSA é uma proteína de custo acessível, quando comparada com outras proteínas hoje em dia muito estudadas, como por exemplo, a proteína A/G (massa molecular 50,449 kDa), utilizada como proteína modelo em muitos ensaios de separação e purificação com membranas de afinidade. A primeira tem um custo mínimo de cerca de 43,30 euros (Sigma-Aldrich), enquanto a segunda tem um custo de aproximadamente 102 euros (Fisher Scientific). Por estas razões, as investigações sobre a separação desta proteína têm atraído uma atenção significativa.

Os ensaios de adsorção da BSA (Sigma-Aldrich, USA) aos discos de CB não modificados (24 poços) foram efetuados durante vinte e duas a vinte e quatro horas. Assim, num volume de 40 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) (pH=7,4) colocaram-se 200 mg de CB e adicionaram-se ainda 20 mg de BSA (0,5 mg/mL). A reação processou-se colocando esta solução sob agitação durante aproximadamente vinte e duas horas, à temperatura ambiente. O doseamento da BSA foi realizado através da medição da absorvência do sobrenadante a 280 nm, usando o leitor de microplacas Elisa (SYNERGY HT, BIOTEK, USA).

O cálculo da BSA adsorvida na superfície da CB foi obtido por diferença relativamente à BSA determinada inicialmente no sobrenadante, sendo os resultados finais expressos em mg BSA/ g de celulose. [68]

2.1.1 Processo de lavagem das membranas de celulose bacteriana com Tween 20:

O Tween 20 (*Figura 9*) ou Polisorbato 20 é um surfactante não-iônico comumente usado em diversas aplicações biológicas, sendo geralmente adicionado a soluções de tampão de PBS. É um reagente viscoso, de tonalidade amarela e solúvel em água. Este agente tensoativo não-iônico tem vindo a ser explorado como excipiente devido à sua capacidade para evitar a desnaturação e agregação de proteínas. A finalidade da sua utilização, neste caso, é remover as moléculas de BSA adsorvida à superfície das membranas de CB. [69,70]

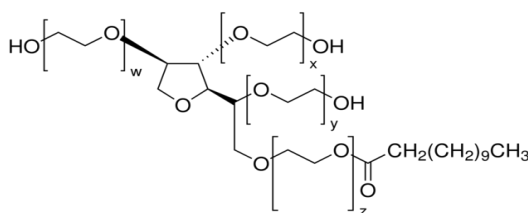


Figura 9 - Figura representativa da estrutura molecular do agente Tween 20 (“retirado de Sigmaaldrich.com”) [71]

Deste modo, após os ensaios de ligação da BSA às membranas de celulose, em cima descritos, estas sofreram um processo de lavagem com o detergente Tween 20.

Neste trabalho foram testadas diferentes condições de reação com este agente. Os parâmetros testados foram a concentração de detergente, a temperatura e o tempo de reação.

No que diz respeito à concentração de Tween 20 foram utilizadas concentrações de 1% e 2%. Relativamente à temperatura a que a reação se processou, compararam-se as temperaturas de 37 °C e 50 °C. Os tempos de exposição variaram entre 16 horas e 7 dias. [70]

Embora se tenham testado diferentes condições de reação, o procedimento seguido foi idêntico para todos os casos. Assim, num volume de 80 mL de PBS, adicionou-se 800 µL (1%) ou 1600 µL (2%) de Tween 20 deixando-se reagir, sob agitação moderada, a uma temperatura de 37 °C ou 50 °C durante o tempo pretendido. A quantificação da BSA presente no sobrenadante foi obtida através da medição da absorvência a 280 nm. [72]

Na *Tabela 9* encontram-se sumariadas as condições experimentais utilizadas para cada ensaio realizado.

Tabela 9 - Resumo das condições experimentais (concentração Tween 20, temperatura, tempo exposição) utilizadas para cada ensaio

	1% Tween	2% Tween	37 °C	50 °C	16 horas	1dia	2dias	3dias	7dias
1 ^o ensaio	S		S		S				
2 ^o ensaio		S	S			S	S	S	S
3 ^o ensaio	S			S		S	S		

3. Ensaios de Isotérmicas e de Eluição da BSA das membranas de celulose:

3.1 Isotérmicas de adsorção da BSA com celulose bacteriana não modificada:

Neste trabalho foram realizados dois ensaios independentes de isotérmicas de adsorção da BSA.

Para cada um dos ensaios, cerca de 20 mg (17,9 mg de massa média no caso do primeiro ensaio e 21,9 mg no segundo) de CB foram colocados em soluções com diferentes concentrações de BSA (PBS, pH=7,4). As concentrações finais de BSA utilizadas em ambos os ensaios foram as seguintes: 0 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,31 mg/mL, 0,46 mg/mL, 0,62 mg/mL, 0,77 mg/mL, 1,15 mg/mL, 1,54 mg/mL e 1,92 mg/mL (triplicado para cada concentração). Os ensaios decorreram a 37 °C, com uma agitação de 100 rpm, durante seis horas. Até às duas horas de ensaio, foram recolhidas amostras, para cada uma das diferentes concentrações de BSA, de trinta em trinta minutos. A partir daí, as amostras foram recolhidas de hora em hora até se atingirem as seis horas de ensaio. [67, 72, 73 - 76]

3.1.1 Processo de lavagem dos discos de celulose com PBS + NaCl:

Após estes ensaios de isotérmicas de absorção, os discos de CB foram tratados com uma solução de PBS + NaCl (pH=10.0; 1,5 M) (Panreac, Espanha), na tentativa de eluir a proteína adsorvida na matriz de celulose. A reação decorreu durante duas horas, à temperatura ambiente e a 100 rpm. [9, 16, 66, 72, 74, 76 - 78]

Para quantificar a BSA presente no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford (595nm).

4. Modificações das membranas de Celulose Bacteriana:

Ao longo deste trabalho diferentes métodos de funcionalização da superfície da CB foram estudados. A *Figura 10* resume todos os processos abordados e que irão ser posteriormente descritos nesta secção.

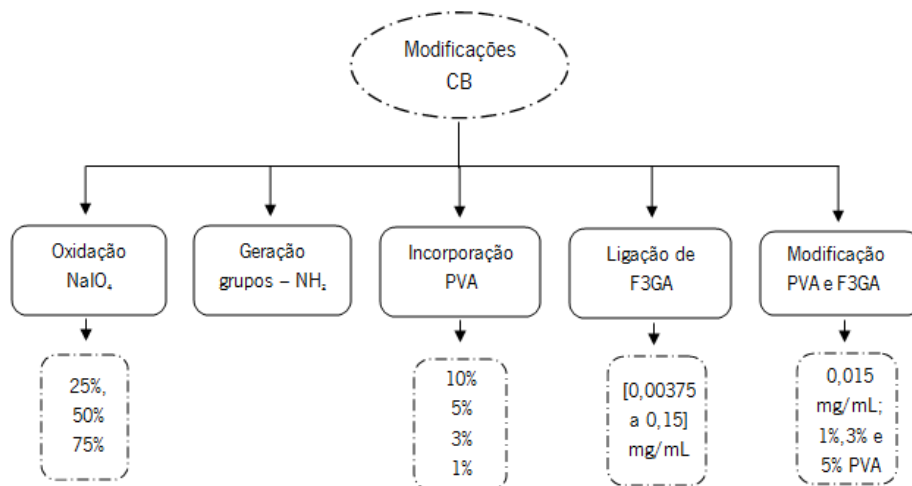


Figura 10 – Esquema com o resumo de todas as técnicas de modificação da CB abordadas.

4.1 Ensaio preliminares:

4.1.1 Modificação das membranas de celulose bacteriana por oxidação:

A primeira abordagem realizada no sentido de funcionalizar a superfície das membranas de CB foi a oxidação por periodato de sódio, resultando num composto de celulose biodegradável e biocompatível: 2,3 – dialdeído celulose (DAC) (*Figura 11*). A oxidação por este composto é uma reação extremamente

específica caracterizada pela clivagem da ligação C2-C3 do anel de glucopiranosídeo, resultando na formação na superfície da celulose, de dois grupos aldeído por unidade de glicose. [79]

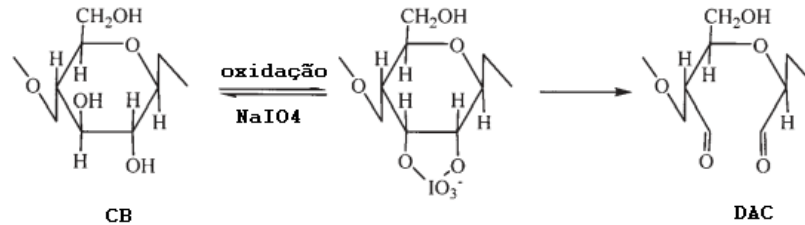


Figura 11 – Esquema representativo do mecanismo de oxidação por periodato de sódio com formação do DAC (“adaptado de RoyChowdhury e colaboradores, 2005”). [80]

4.1.1.1 Processo de oxidação com periodato de sódio:

Em três matrizes colocaram-se 75 mL de água destilada e 200 mg de CB. Após o pré-aquecimento durante dez minutos a 50 °C, adicionaram-se 260 mg de periodato de sódio (NaIO₄) (Sigma-Aldrich, USA). Seguidamente, deixou-se reagir à temperatura de 50 °C, com agitação moderada e no escuro, até atingir a percentagem de oxidação pretendida (25%, 50% e 75%), calculada a partir da medição da absorvência no comprimento de onda de 290 nm (comprimento de adsorção máximo do periodato). Após o final da reação procedeu-se à lavagem das amostras modificadas com água destilada e PBS, com o intuito de retirar qualquer resíduo de periodato. [72, 81, 82]

4.1.1.2 Ligação da BSA às membranas de celulose bacteriana modificadas:

Para evitar a degradação da CB oxidada, logo após o final do processo supracitado, foi testada a ligação de diferentes concentrações (0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 1 mg/mL) de BSA para cada um dos diferentes graus de oxidação (25%, 50% e 75%). Os ensaios decorrem durante vinte e duas horas com agitação moderada. [68, 72] A quantificação da BSA presente no sobrenadante foi medida por absorvência a 595 nm (Método Bradford).

4.1.1.3 Processo de lavagem das membranas com Tween 20:

Após a conclusão dos ensaios de ligação colocaram-se as membranas de celulose oxidadas em contacto com 10 mL PBS e 0,1 mL Tween 20 (1%), deixando-se reagir a 37 °C durante vinte e quatro horas, sob agitação moderada. Após uma forte centrifugação, quantificou-se a BSA presente no sobrenadante a 280

nm. [72] Esta etapa tem como intuito verificar que quantidade de BSA ficou realmente covalentemente ligada às membranas de CB oxidadas.

Nas primeiras horas de reação verificou-se uma irregularidade/instabilidade relativamente à percentagem de oxidação das amostras de CB, que foi diminuindo com o avançar do tempo. Como o objetivo era obter amostras de CB com uma percentagem de oxidação de 25%, 50% e 75%, o processo de oxidação termina quando se alcançam estas mesmas percentagens. No entanto, e devido a problemas experimentais, as percentagens de oxidação finais obtidas foram de 46,55%, ao fim de nove horas de reação, 56,2% ao fim de doze horas de oxidação e por fim 80,4% ao fim de vinte e quatro horas de reação.

Após o final dos ensaios de adsorção de BSA, verificou-se que, independentemente da concentração inicial de proteína e do grau de oxidação das amostras de CB, os valores de adsorção para todos os casos rondaram os 80%.

Após avaliação dos resultados do processo de lavagem concluiu-se que estes não foram satisfatórios, pois a percentagem de BSA retirada das amostras de CB oxidadas, após lavagem com o detergente Tween 20, foi muito irregular e elevada, não existindo uma uniformidade nos resultados, nem mesmo para os casos em que a concentração inicial de BSA utilizada foi a mesma.

Devido não só à marcante degradação apresentada pelas amostras de CB após o processo de oxidação, mas também aos resultados irregulares e não satisfatórios, não se realizaram mais ensaios para este processo e decidiu-se abordar outro procedimento de modificação que não degrada-se tanto as amostras de celulose.

4.1.2 Funcionalização das membranas por geração de grupos funcionais na sua superfície:

O segundo processo de modificação abordado foi a formação de grupos amina ($-NH_2$) na superfície das nanofibra da CB. Posteriormente, este grupo funcional irá proporcionar a ligação covalente da proteína selecionada (BSA) à matriz da CB, com o auxílio de um ativador CDI (*1,1'-carbonyl diimidazole*).

O CDI é um reagente que converte os grupos hidroxilo livres em grupos *imidazolyl-carbamate*, sendo que uma das suas particularidades é a capacidade de reagir com álcoois, ácidos carboxílicos e grupos amina, tornando-o por isso adequado para esta etapa do trabalho – ativação da superfície da CB. [83,84]

4.1.2.1 Modificação da superfície das membranas por geração de grupos amina:

Inicialmente gerou-se grupos funcionais epoxy na superfície da CB através da reação com epícloridrina. Assim fez-se reagir 13,4 mg de celulose com 6,3 μL de epícloridrina em NaOH (1M, 132 mL/g celulose), deixando-se reagir durante duas horas a 60 °C. Seguidamente, procedeu-se à diálise em dois litros de água destilada, renovando-se a água, até o pH da mistura ser inferior a 12.

Posteriormente, com o objetivo de gerar os grupos amina ($-\text{NH}_2$), fez-se reagir a celulose (com o anel epoxy) com hidróxido de amónio (NH_4OH) (*Figura 12*).

Assim, após ajustar o pH para 12.0, com NaOH (32%), adicionou-se NH_4OH (25%, 5mL/g celulose) e deixou-se reagir durante duas horas a 60 °C, procedendo-se depois novamente à diálise em água destilada até o pH=7.0.

Após o término da diálise adicionou-se 800 μmol CDI/g celulose, colocando-se a agitar durante três horas a 60 °C numa atmosfera de azoto. Após o final da reação filtrou-se rapidamente a mistura e lavaram-se as membranas duas vezes com tolueno, para eliminar qualquer vestígio de CDI. [83 - 87]

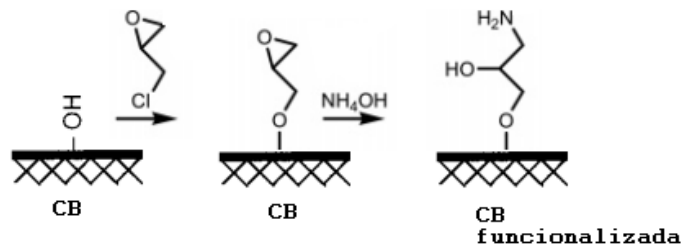


Figura 12 – Figura representativa do processo de funcionalização da superfície da CB com formação do grupo funcional epoxy (2º passo) e geração do grupo amina (3º passo) (“adaptado de Dong e colaboradores, 2007”). [85]

4.1.2.2 Ensaio de ligação de BSA:

Após a lavagem com tolueno seguida de várias lavagens com PBS, as membranas de celulose modificadas foram colocadas em contacto com uma solução de 0,5 mg/mL de BSA, previamente preparada. Os ensaios decorreram durante vinte e duas horas à temperatura ambiente e sob agitação moderada. A concentração de proteína no sobrenadante foi obtida através do método de Bradford.

4.1.2.3 Processo de lavagem das membranas com Tween 20:

Após a conclusão dos ensaios de ligação colocaram-se as membranas de celulose modificadas em contacto com 10 mL PBS e 0,1 mL Tween 20 (1%), deixando-se reagir a 37 °C durante vinte e quatro horas sob agitação moderada. A BSA presente no sobrenadante foi quantificada pela medição da absorvência a 280 nm.

Para este procedimento realizou-se apenas um ensaio no qual a quantidade de BSA ligada às membranas de CB modificadas foi de 0,372 mg/mL, correspondente a 74,4 % de proteína ligada.

Após lavagem com Tween 20 verificou-se que este foi capaz de remover cerca de 15% da BSA inicialmente ligada à superfície da CB modificada.

Uma vez que só se realizou um ensaio preliminar para este método de modificação, não se justifica incluí-lo no *Capítulo III. Resultados e Discussão*.

4.2 Processo de incorporação do *Poly(vinyl alcohol)* nas membranas:

Poly(vinyl alcohol) (PVA) é um polímero de natureza cristalina, hidrofílico e biocompatível possuindo características adequadas e aliciantes para diversas aplicações biomédicas.

Este polímero tem uma estrutura química relativamente simples, com um grupo hidroxilo pendente e é produzido pela polimerização do *vinyl acetate* a *poly(vinyl acetate)* (PVAc), seguido de hidrólise do PVAc a PVA. [88, 89]

Comercialmente, estão disponíveis vários tipos de PVA com diferentes graus de hidrólise. Este conteúdo do polímero em grupos acetato (grau de hidrólise) influencia as suas propriedades químicas, cristalinidade e ainda solubilidade na água – PVA com elevado grau de hidrólise é menos solúvel.

Este composto é anisotrópico e, controlando a sua composição e parâmetros de processamento, pode obter-se um produto com a forma e propriedades mecânicas pretendidas. [46, 89 - 92]

De modo a funcionalizar a superfície das membranas de CB, conferindo-lhes uma maior resistência mecânica e coesão, procedeu-se à incorporação do polímero *Poly(vinyl alcohol)* PVA 4-98 (Mw = 27,000) (Sigma-Aldrich, Alemanha) na sua matriz.

O procedimento adotado foi o descrito por Wang e colaboradores [91]. Resumidamente, prepararam-se quatro soluções de diferentes concentrações de PVA em água destilada. As concentrações escolhidas foram: 10%, 5%, 3% e 1%. Após a dissolução completa do PVA a 80 °C, as membranas de CB foram imersas nas respetivas soluções durante vinte e quatro horas ou sete horas, sob agitação, mantendo-se a temperatura constante (80 °C). Seguidamente e para promover a incorporação do PVA na matriz da CB, as membranas sofreram um processo de congelação a -4 °C durante aproximadamente vinte e quatro

horas. O processo inverso, isto é, a descongelação completa e à temperatura ambiente das membranas de celulose com PVA, demorou cerca de seis horas.

O último passo deste procedimento experimental prende-se com a lavagem, em água destilada, das membranas já com o PVA incorporado, para retirar os resíduos do polímero não ligados à celulose. [61, 92 - 94]

4.3 Funcionalização das membranas através da ligação do corante Cibracon Blue F3GA:

Nas últimas décadas diversos corantes têm sido utilizados como ligandos de afinidade sintéticos, para a separação e purificação de biomoléculas de uma grande variedade de fontes biológicas. Alguns destes ligandos são mesmo capazes de separar diferentes classes de proteínas. [95 - 97]

O corante reativo de triazina Cibracon Blue F3GA (*Figura 13*) é um exemplo deste tipo de corantes, sendo o mais utilizado na preparação de matrizes insolúveis para cromatografia de afinidade de proteínas e enzimas. [97]

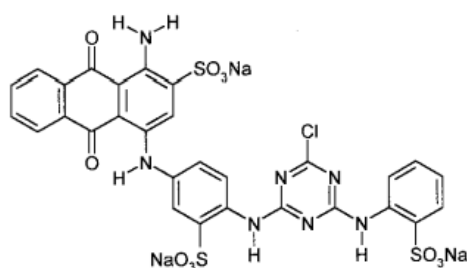


Figura 13 – Figura representativa da estrutura molecular do corante Cibracon Blue F3GA (“ retirado de Alberghina e colaboradores, 2000”) [96]

A versatilidade do F3GA advém da combinação, na mesma molécula, de grupos aromáticos (não – polares) e grupos sulfonato (iônicos). Este corante liga-se covalentemente à superfície das fibras da CB através da reação nucleofílica entre o cloro do seu anel *triazine* e o grupo hidroxilo das moléculas de celulose. [16, 98 - 101]

Assim, neste trabalho, e devido às características supracitadas, o emprego deste corante terá como objetivo final incrementar a ligação específica das biomoléculas à matriz de CB. Como proteína modelo a usar nestes ensaios, foi utilizada novamente a BSA comercial.

4.3.1 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas de celulose bacteriana:

O protocolo eleito foi o descrito por Miyauchi e colaboradores [74]. Sinteticamente, as membranas de CB pura foram imersas em diferentes soluções de F3GA (Polysciences, EUA), previamente aquecidas a 60 °C, com concentrações que variaram entre 0,00375 e 0,15 mg/mL. Aproximadamente dez minutos após a adição das membranas de celulose (1mg/ml), adicionou-se NaCl (0,22 mg/mL), para estimular a deposição do corante na superfície da matriz de CB, e deixou-se reagir durante uma hora à temperatura de 60 °C, com agitação moderada. Posteriormente, a temperatura da reação foi aumentada para 80 °C e adicionou-se Na₂CO₃.10 H₂O (0,054 mg/mL), deixando-se reagir durante duas horas, novamente com agitação moderada, com o intuito de acelerar a ligação entre o F3GA e a CB.

A quantidade de corante presente no sobrenadante foi quantificada a 600 nm (comprimento de onda de adsorção máximo do F3GA). Face à concentração inicial preparada, a diferença relativamente ao sobrenadante permitiu estimar a quantidade de corante ligado à CB.

As membranas de CB modificadas foram sucessivamente e extensamente lavadas com água destilada até as soluções de lavagem não obterem absorvência a 600 nm.

Para estes ensaios de funcionalização foram realizados controlos.

Por fim e com o intuito de preparar as membranas modificadas para o processo de ultrafiltração, estas foram colocadas a secar na estufa, segundo o protocolo descrito na secção 5 deste capítulo. O resultado final pode ser observado na *Figura 14*. [9, 11, 16, 74, 77, 102, 103]

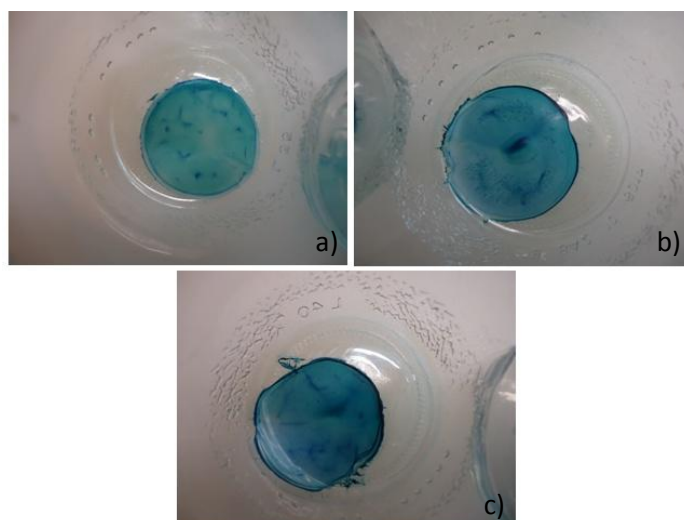


Figura 14 - Discos de CB, secos, após reação com soluções do corante F3GA, com diferentes concentrações: **a)** C = 0,15 mg/mL; **b)** C = 0,375 mg/mL; **c)** C= 0,525 mg/mL.

4.3.1.1 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA - variação nos parâmetros:

Com o intuito de averiguar qual a concentração de sais, concentração de corante e tempo de exposição mais adequados, efetuaram-se várias experiências onde se variaram estes mesmos parâmetros. Relativamente à concentração de sais, as quantidades comparadas foram as de 0,22 mg/mL e 0,44 mg/mL para o NaCl e 0,054 mg/mL e 0,108 mg/mL para o Na₂CO₃.10 H₂O. No que diz respeito aos tempos de exposição, testaram-se os períodos de uma hora e duas horas no caso da primeira etapa, a 60 °C, e duas horas e quatro horas para a segunda etapa, a 80 °C. Já para o caso da concentração de F3GA, utilizaram-se concentrações entre 0,00375 e 0,6 mg/mL. Para estes ensaios foram também utilizadas membranas de CB sem adição de sais como controlo.

4.3.2 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas com PVA previamente incorporado:

O procedimento experimental adotado foi idêntico ao descrito anteriormente. Resumidamente, as membranas de CB com PVA incorporado (1%, 3% e 5%) foram imersas numa solução de F3GA, com uma concentração de 0,015 mg/mL, previamente aquecida a 60 °C. Aproximadamente dez minutos após a adição das membranas de celulose com PVA (1mg/ml), adicionou-se 0,22 mg/mL de NaCl e deixou-se reagir, com agitação moderada, durante uma hora a 60 °C. A temperatura da reação foi aumentada para 80 °C e posteriormente adicionou-se 0,054 mg/mL de Na₂CO₃.10 H₂O, deixando-se reagir durante duas horas, novamente com agitação moderada.

As membranas de celulose bacteriana modificadas foram sucessiva e extensamente lavadas com água destilada até as soluções de lavagem não registarem absorvência a 600 nm. [9,11, 16, 74, 77, 102,103]

4.3.3 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas de CB, sob condições alcalinas:

Um outro procedimento de ligação efetuado consistiu em colocar 25 mg de CB em 25 mL de uma solução de F3GA, com uma concentração de 0,075 mg/mL, onde posteriormente foi adicionado 1 g de NaOH, para que a reação ocorresse em condições alcalinas (pH final aproximadamente de 12.0). Seguidamente, este preparado foi sujeito a uma temperatura de 80 °C durante quatro horas, com agitação moderada. Mais uma vez foram utilizadas membranas de CB como controlo. [77, 104 - 106]

Devido à escassez de tempo, só foi efetuado um ensaio de ligação com este tipo de protocolo. Os resultados obtidos mostraram que a quantidade de F3GA ligada à CB era idêntica à obtida para o protocolo *standard* (4.3.1). Além disso, o controlo efetuado para este procedimento exibiu a mesma

quantidade de corante ligada relativamente às amostras, o que levou a descartar a realização de mais ensaios de ligação de F3GA através deste protocolo.

5. Processo de ultrafiltração das membranas de celulose bacteriana:

Para todos os ensaios de ultrafiltração realizados, as amostras de CB modificadas e não modificadas, foram previamente secas na estufa (WTB Binder, Itália) a 50 °C durante aproximadamente dezasseis horas (*Figura 15*). Neste trabalho optou-se pelo processo de secagem na estufa, uma vez que as membranas resultantes apresentam uma espessura extremamente fina e uma estrutura relativamente resistente, plana e homogênea, características estas procuradas e essenciais para a realização do processo de ultrafiltração. Adicionalmente, este processo de secagem não altera o formato original da CB.



Figura 15 – Disco de celulose bacteriana pura após secagem na estufa.

5.1 Ultrafiltração:

Diferentes categorias de membranas de celulose tais como, CB pura, CB modificada com PVA, CB funcionalizada pela ligação com F3GA e por fim CB alterada com PVA e F3GA, foram sujeitas a um processo de ultrafiltração pelo sistema Amicon, representado na *Figura 16* (Modelo 8010, USA), com uma área de filtração efetiva de cerca de 4,1 cm² e com capacidade para membranas com um diâmetro de 25mm. [76]

Para todos os ensaios de ultrafiltração foram utilizadas soluções de BSA com uma concentração de 0,5 mg/mL em PBS pH=7,4, em constante agitação, e uma pressão contínua de aproximadamente 10 psi. [66, 73,78,107] Para a quantificação da proteína presente no permeado, após a ultrafiltração da solução, foi utilizado o método Bradford a 595 nm.

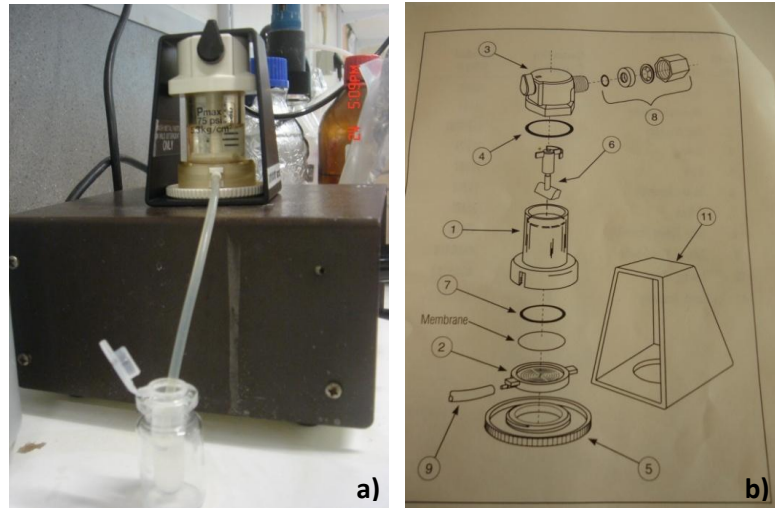


Figura 16 - a) Sistema de ultrafiltração Amicon; **b)** Esquema representativo do mesmo sistema.

5.2 Processo de eluição da proteína:

Após o procedimento de ultrafiltração, em cima descrito, experimentou-se eluir a proteína retida na matriz das membranas, para posterior reutilização dos discos de CB.

Este procedimento foi realizado nas mesmas condições do processo de ultrafiltração (solução sob agitação e pressão contínua de 10 psi), utilizando-se uma solução de lavagem constituída por PBS + NaCl (1,5M com pH=10.0). Mais uma vez, para a quantificação da BSA presente no permeado, após a passagem da solução de lavagem, foi utilizado o método Bradford a 595 nm. [9, 16, 66, 74]

6. Caracterização das membranas de celulose bacteriana modificadas:

Com o intuito de complementar o estudo até aqui realizado, determinaram-se as propriedades superficiais, térmicas e morfológicas das membranas de celulose bacteriana produzidas, utilizando sempre como controlo discos de CB pura. Todas as amostras utilizadas para a realização destes testes foram sujeitas ao procedimento de remoção de água descrito na secção 5.

6.1 Propriedades superficiais:

Para a medição dos ângulos de contacto formados na superfície das membranas de CB, foi utilizado o método da gota séssil usando o aparelho da marca OCA 15 PLUS, DATAPHYSICS. As medições foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando água. Para cada substrato foram realizados dois ensaios independentes, efetuando-se cinco medições em cada um deles. Para este procedimento foram utilizadas amostras com as dimensões de 1 cm x 1 cm, e sem qualquer tipo de tratamento prévio.

6.2 Propriedades térmicas:

As membranas de CB modificadas sofreram ainda uma caracterização térmica através da análise pelos métodos de DSC – calorimetria diferencial de varrimento - e TGA – análise termogravimétrica.

A análise por TGA foi realizada usando o aparelho termogravimétrico (SHIMADZU, TGA – 50). Em cada ensaio, cerca de 2 mg de amostra foram colocados em painéis abertas de alumínio (Izasa, S.A., Portugal). As amostras foram aquecidas até uma temperatura máxima de 500 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min.

As medições por DSC foram efetuadas utilizando o aparelho SHIMADZU DSC – 50. As variações de temperatura situaram-se entre 25 °C e 500 °C, novamente a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. Mais uma vez, para cada ensaio foram utilizadas painéis abertas de alumínio e cerca de 2 mg de amostra.

6.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR):

As amostras das membranas de CB modificadas foram sujeitas a análise por FTIR de modo a confirmar a presença de alterações específicas dos grupos funcionais, indicando assim que ocorreram modificações na sua estrutura química após funcionalização.

Os espectros das várias amostras estudadas foram obtidos pela análise por FTIR-ATR (espectroscopia de infravermelho – reflectância total atenuada), utilizando o espectrómetro do modelo FTIR - 4100, Jasco e o ATR Golden gate Specac, com célula de diamante. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, com uma resolução de 8 cm⁻¹, um varrimento do intervalo de 600 a 4000 cm⁻¹ e uma acumulação de 64.

Para a caracterização por este método nenhuma amostra sofreu qualquer tipo de tratamento prévio.

6.4 Caracterização morfológica:

Por último e para completar os estudos de caracterização das amostras, foi realizada uma análise morfológica da superfície das membranas de CB modificadas através da técnica de microscopia electrónica de varrimento (SEM) de elevada resolução (FEI Nova NanoSEM 200). Esta técnica fornece informações sobre a topografia das amostras, sendo possível observar não só o tamanho dos poros como também o tamanho e diâmetro das fibras constituintes.

Previamente à análise por SEM todas as amostras, com dimensões de aproximadamente 5 mm x 5mm, foram colocadas cuidadosamente em suportes metálicos (alumínio ou cobre), com a ajuda de uma fita de dupla face de carbono. Estes três elementos são muito condutores, o que beneficia a obtenção de imagens através de SEM. Posteriormente, as amostras sofreram uma preparação inicial – metalização – conseguida pela deposição de um filme fino de ouro (Au) e paládio (Pd), também ambos condutores, por *sputtering*. Só após este tratamento é que as amostras foram observadas com a aplicação de 15 kV de tensão de aceleração.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Membranas de Celulose Bacteriana não modificadas:

As membranas de CB obtidas pela fermentação da bactéria *G. xylinus* em meio HS foram o ponto de partida para o desenvolvimento de todas as atividades efetuadas neste projeto.

Como já foi referido anteriormente, utilizaram-se dois tipos de tamanhos para os discos de celulose. O primeiro tamanho foi obtido através do crescimento da CB em placas de cultura de 24 poços e o segundo em placas de cultura de 6 poços (*Figura 17 a) e b)*). No caso do segundo tamanho, introduziu-se ainda uma variável que foi a espessura das membranas produzidas. Assim, obtiveram-se membranas finas com uma espessura de aproximadamente $1,52 \text{ mm} \pm 0,23$, e membranas espessas com uma espessura de cerca de $3,44 \text{ mm} \pm 1,08$. Para uma grande parte dos ensaios realizados, as membranas de CB tiveram de sofrer um processo de remoção de água, via secagem em estufa, resultando numa membrana com uma espessura extremamente fina, com cerca de $0,056 \text{ mm} \pm 0,015$ (*Figura 17 c)*).

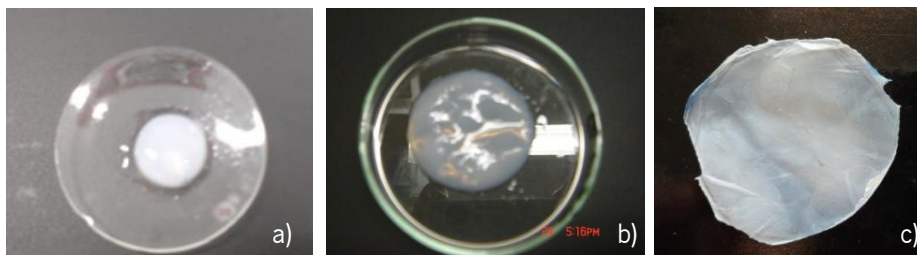


Figura 17 – Discos de Celulose Bacteriana: **a)** hidratados de 24 poços; **b)** hidratados de 6 poços; **c)** secos de 6 poços.

A topografia destas amostras foi usada como controlo, para a análise das imagens de SEM das amostras modificadas, que irão ser apresentadas e discutidas mais a frente neste capítulo.

A estrutura morfológica da CB produzida pela *G. xylinus* é caracterizada por uma orientação aleatória de nanofibrilas, com diâmetro entre 63 e 73 nm, interconectadas entre si, formando, após secagem em estufa, uma estrutura tridimensional compacta e não uniforme. Pela observação da *Figura 18*, pode-se visualizar que a estrutura morfológica das amostras não é toda uniforme, existindo áreas que revelam a presença de agregados de estruturas fibrilares, e outras onde as fibras estão mais dispersas, e onde a matriz é por isso mais porosa. Esta organização poderá ser um artefacto resultante do processo de secagem. A secagem em estufa não é o processo mais indicado para manter a estrutura porosa original e a permeabilidade da CB hidratada. A remoção de água da matriz 3D resulta na aproximação das nanofibras que irão agregar via estabelecimento de pontes de hidrogénio. Sendo a organização tridimensional destas fibras aleatória, a sua agregação também o será, resultando neste efeito de regiões mais agregadas de fibras e outras mais dispersas. [33, 58, 108]

Adicionalmente, esta nano-morfologia única resulta numa elevada capacidade de retenção de água, que é um indicativo de uma área superficial elevada. Por sua vez a elevada superfície específica externa implica uma elevada capacidade de adsorção de biomoléculas. [38,109,110]

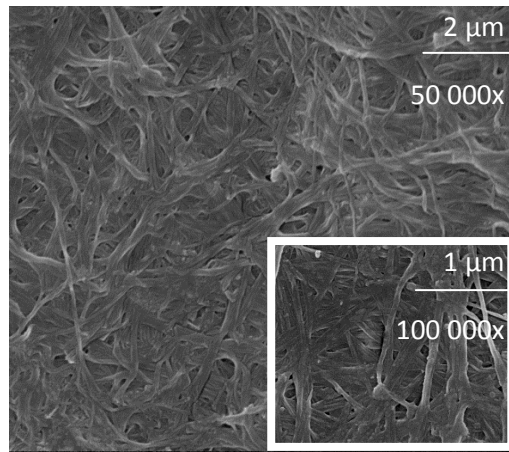


Figura 18 – Imagens de SEM de amostras de CB puras.

2. Ensaio de adsorção e de eluição de proteínas da matriz de celulose não modificada:

2.1 Ligação da proteína BSA às membranas de celulose:

Os ensaios de adsorção da BSA (0,5 mg/mL) aos discos de CB não modificados (24 poços) decorreram durante vinte e duas horas, à temperatura ambiente.

A quantificação da BSA presente no sobrenadante foi obtida através da medição da absorvência a 280 nm. O cálculo da BSA adsorvida na superfície da CB foi obtido por diferença relativamente à BSA determinada inicialmente no sobrenadante, sendo os resultados finais expressos em mg BSA/ g de celulose (*Tabela 10*).

Tabela 10 – Valores obtidos para a adsorção da BSA nos discos de CB

	[BSA] adsorvida na CB (mg/g)
1º ensaio	62,41
2º ensaio	69,62

Os valores obtidos para os dois ensaios, temporalmente independentes, e realizados exatamente nas mesmas condições experimentais, foram praticamente iguais. Em média, cerca de 66,02 mg de BSA ficaram adsorvidos na superfície da CB, por cada grama de celulose. Na secção 3.1 deste capítulo será feita uma análise mais detalhada do perfil de adsorção de BSA, onde serão discutidos os resultados obtidos e contrastados com literatura relevante.

2.1.1 Lavagem das membranas de CB não modificadas com Tween 20:

Após os ensaios de ligação de proteína em cima descritos, as membranas de celulose sofreram um processo de lavagem com o Tween 20, com a finalidade de investigar se este detergente poderia remover a BSA adsorvida na superfície da CB, na perspetiva de avaliar a possibilidade de reutilização das membranas de CB num processo de cromatografia por afinidade.

Como referido anteriormente, nestes ensaios foram testadas diferentes condições de reação (*Tabela 9*).

Relativamente ao 1º ensaio, utilizou-se uma concentração de 1% de Tween, a uma temperatura de 37 °C e com um tempo de exposição de 16 horas (*overnight*). Após o término do ensaio, quantificou-se a proteína presente no sobrenadante, obtendo-se o valor de 26,4 mg de BSA removidas por grama de celulose, o que corresponde a uma percentagem de eluição de 21,15 % (% eluição é igual à razão entre a BSA eluída e a BSA adsorvida, multiplicando o resultado por 100%).

No 2º ensaio efetuado colocaram-se membranas de CB numa solução de Tween 20 (2%), sob agitação moderada a 37 °C e mediu-se a absorvência a 280 nm ao fim de 1,2, 3 e 7 dias. As leituras obtidas mostraram que a quantidade de BSA libertada das membranas de CB manteve-se constante ao longo dos 7 dias de experiência, ou seja, não houve um aumento da libertação da proteína, em vez disso, esta quantidade manteve-se constante, e aproximadamente igual à medida logo no primeiro dia de ensaio. Para este ensaio não foi possível quantificar a BSA presente no sobrenadante, por isso as conclusões retiradas basearam-se simplesmente nos valores da absorvência obtidos a 280 nm.

Equiparando o primeiro com o segundo ensaio, pode-se afirmar que um aumento do tempo de exposição e da concentração de Tween, não fomentam a ação do agente, não aumentando por isso a libertação de proteína das membranas de CB para o sobrenadante. Esta comparação foi efetuada através do confronto entre valores da absorvência a 280 nm, para os dois ensaios em causa.

No caso do 3º e último ensaio foi testada a temperatura de 50 °C durante um tempo de incubação de 1 e 2 dias, sem mudança de solução, com uma concentração de 1% de Tween 20.

Os resultados obtidos mostram que ao fim de um dia de incubação, a 50 °C, o Tween foi capaz de retirar das membranas de CB cerca de 25,2 mg de BSA eluída por grama de celulose, o que corresponde a uma percentagem de eluição de 18,10%. Após mais um dia de contato com as membranas de CB, conseguiu-se eluir cerca de 22,99% de BSA, isto é, o aumento do tempo de incubação de um para dois

dias, aumentou apenas em 4,89% a capacidade do Tween eluir a BSA das membranas de CB não modificadas.

Em suma, comparando os resultados obtidos para este ensaio com os do 1º ensaio, pode-se concluir que um aumento da temperatura e do tempo de exposição, não aumentam significativamente a quantidade de BSA libertada das membranas para o sobrenadante. Não sendo por isso justificável nem um aumento de temperatura de reação de 37 °C para 50 °C, aumento este que pode danificar ou até mesmo desnaturar as proteínas; nem um aumento do tempo de exposição, uma vez que a quantidade de BSA eluída overnight é idêntica à removida durante 1 e 2 dias de reação.

Da realização destes ensaios pode-se aferir que, globalmente, este agente permitiu uma dessorção significativa de proteínas da CB, uma vez que aproximadamente 20% da proteína total adsorvida na superfície das membranas foi removida das matrizes. No entanto, este valor não é de todo satisfatório, por isso optou-se por investigar outras soluções de eluição de proteínas, nomeadamente uma solução de lavagem constituída por PBS + NaCl (1,5 M, pH=10.0), que será abordada mais à frente neste capítulo.

3. Ensaio de Isotérmicas e de Eluição da BSA das membranas de CB não modificadas:

3.1 Isotérmicas de adsorção da BSA:

Como mencionado no Cap.II (Materiais e Métodos), neste trabalho foram realizados dois ensaios independentes de isotérmicas de adsorção da BSA nos discos de CB não modificados. Em cada um cerca de 20 mg de CB foram colocados em contacto com soluções de diferentes concentrações de BSA, dentro do intervalo de 0 a 1,92 mg/mL.

Na *Figura 19* podem-se observar os resultados obtidos, ao longo do tempo, para estes ensaios de adsorção da BSA nas membranas de CB não modificadas.

Pela observação do gráfico apresentado, pode-se afirmar que a quantidade absorvida tem uma tendência a aumentar consoante o aumento da concentração de BSA inicial. Contudo, quando as membranas atingem o seu ponto de saturação no tempo, os discos de CB não são capazes de continuar a adsorver mais moléculas de proteína, mesmo que a concentração inicial da proteína aumente.

Esta situação de saturação das membranas é visível no gráfico, em regra geral, aproximadamente a partir dos 180 min, em que a quantidade de BSA adsorvida mantém-se sensivelmente constante ao longo do tempo, e é maior quanto maior for a concentração inicial de BSA.

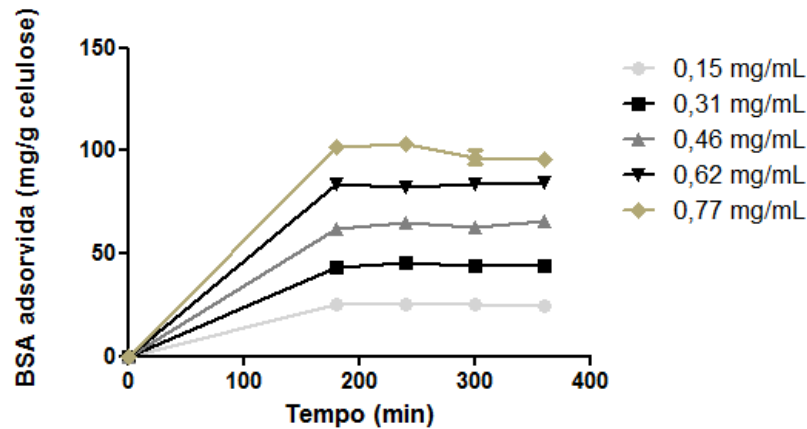


Figura 19 – Isotérmicas de adsorção da BSA nas membranas de CB, ao longo do tempo, em mg BSA /grama CB.

Deste modo, afere-se que consoante o aumento da concentração de proteína, a diferença entre a quantidade de BSA inicial e a BSA adsorvida vai diminuindo. A *Figura 20 a)* corrobora esta situação, uma vez que mostra a ocorrência da saturação da membrana aos 180 min. Na *Figura 20 b)* estão ainda representados os resultados obtidos para os mesmos ensaios, discriminando o tempo de 60 minutos ao fim dos quais ainda não ocorreu a saturação da membrana.

Em suma, ao fim de três horas de ensaio, os discos de CB não modificados, já adsorveram a quantidade máxima de proteína possível (os sítios de ligação já se encontram todos ocupados) e por isso encontram-se saturados, não conseguindo adsorver mais BSA; a quantidade de moléculas de proteína adsorvidas à superfície da CB aumenta com o aumento da concentração inicial de BSA.

Tal situação está de acordo com os resultados relatados por Jia e colaboradores [73], Jeyachandran e colaboradores [66]. Neste último artigo, os autores descrevem e comparam ensaios de adsorção da BSA em ambas superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, utilizando-se diferentes concentrações de BSA, em PBS (pH=7,4). A adsorção decorreu à temperatura ambiente, para diferentes tempos de incubação (30 minutos, 2 horas e 12 horas). Os resultados mostram que para a concentração de 1 mg/mL, a adsorção da proteína aumenta inicialmente, entre os tempos de incubação de 30 min a 2 horas, seguida de uma fase constante até às 12h de incubação. Para esta concentração inicial, os valores de adsorção de BSA nas amostras ao fim de 30 min são de 35% e após duas horas são de aproximadamente 53%. Para a concentração de 10 mg/mL obtém-se uma percentagem de adsorção de 62% para 30 minutos de incubação. No caso das superfícies hidrofílicas, os autores mostraram que a adsorção da BSA aumenta gradualmente com o aumento do tempo de incubação, o que corrobora os resultados exibidos na *Figura 19*. Neste artigo investigou-se ainda a formação de agregados proteicos, que ocorrem preferencialmente para concentrações de BSA mais elevadas (10 mg/mL) ou ao fim de mais de duas horas de incubação. Assim, um aumento do tempo de incubação ou da concentração inicial da proteína, resulta na alteração

da conformação da BSA. Os resultados mostram que as moléculas de BSA adsorvem primeiro à superfície e só depois é que se formam os complexos (agregados) proteicos. Estes resultados de Jeyachandran e colaboradores, justificam o ocorrido nestes ensaios: concentrações iniciais de BSA elevadas permitem a adsorção de uma maior quantidade de proteína na superfície da CB, devido à formação de agregados proteicos; isto é, uma maior concentração inicial traduz –se, no tempo, por uma maior quantidade de BSA adsorvida na membrana.

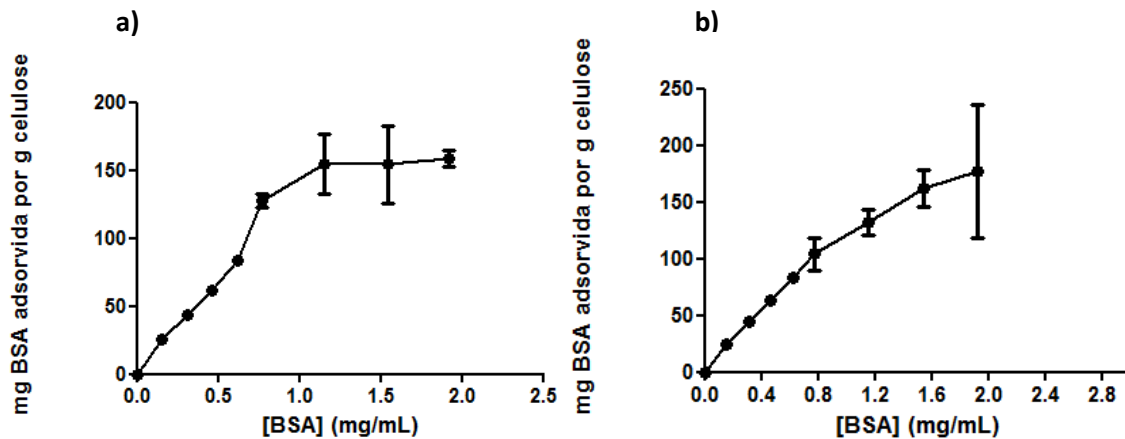


Figura 20 – Isotérmicas de adsorção de BSA nas membranas de CB (mg BSA adsorvida por grama de celulose) em função da concentração inicial de BSA: **a)** 180 min; **b)** 60 min.

Analisando a figura *b)*, pode-se afirmar que entre as concentrações iniciais de 0 mg/mL a aproximadamente 0,77 mg/mL a curva de adsorção exibe um comportamento plateau, seguido de uma fase mais constante. Comportamento este explicado em cima, e que está em concordância com o descrito por Jeyachandran e colaboradores [66].

No artigo já mencionado de Jia e colaboradores [73], realizaram-se ensaios de isotérmicas de adsorção de BSA em microesferas de celulose bacteriana. Os ensaios de adsorção decorreram durante duas horas, a 100 rpm e à temperatura de 37 °C, sendo a BSA presente no sobrenadante quantificada pelo Método de Bradford. Os autores obtiveram valores de adsorção de BSA na ordem dos 0,20 mg/mL, 0,55 mg/mL, 0,90 mg/mL e 1,25 mg/mL para as concentrações iniciais de 0,2, 0,6, 1 e 2 mg/mL de BSA, respetivamente. Para as mesmas concentrações, todos os valores obtidos neste trabalho são ligeiramente inferiores aos obtidos no artigo referido.

No artigo de Ma e colaboradores [16], estão descritos estudos de adsorção de BSA em celulose regenerada obtida por electrospinning. Os resultados obtidos são muito inferiores aos obtidos neste projeto: enquanto estes autores apresentam valores de absorção na ordem dos 1 mg/g e 2 mg/g para

concentrações iniciais de 0,15 mg/mL e 0,6 mg/mL, respetivamente, nestes ensaios, para as mesmas concentrações iniciais obtiveram-se resultados na ordem dos 25 mg/g e 83 mg/g de BSA adsorvida nas membranas de CB.

Adicionalmente, comparando os valores obtidos para estes ensaios com os apresentados na *Tabela 10*, verifica-se a existência de uma conformidade entre ambos, uma vez que nestes ensaios para uma concentração inicial de BSA de aproximadamente 0,5 mg/mL obtiveram-se valores na gama de 65 mg BSA adsorvida por grama de celulose, que são em tudo semelhantes aos obtidos na tabela.

Há dois modelos teóricos que têm vindo a ser usados para a interpretação dos resultados experimentais do comportamento de ligação das biomoléculas: Langmuir e Freundlich.

O modelo de Langmuir baseia-se na suposição da homogeneidade da adsorção (cobertura da superfície por uma monocamada, e a não interação entre as espécies adsorvidas), enquanto o modelo de Freundlich baseia-se na heterogeneidade de adsorção e na interação entre as moléculas das espécies adsorvidas.

Normalmente, a adsorção de uma única proteína nas membranas de afinidade pode ser descrita pela equação de Langmuir (*Equação 1*), que pressupõe uma interação homogénea e única entre a proteína e o ligando/matriz.

Equação 1 – Modelo de Langmuir

$$P_{ads} = \frac{K \times P_{ads,m} \times P}{1 + K \times P}$$

Onde P_{ads} representa a proteína adsorvida (mg proteína/g celulose); K a constante equilíbrio de adsorção (mL/mg proteína); $P_{ads,m}$ a quantidade máxima de proteína adsorvida (mg proteína/ mg celulose) e P a concentração proteína no sobrenadante (mg proteína/mL).

A *Figura 21 b)* apresenta a isotérmica de equilíbrio para a adsorção de BSA para esta situação, obtida considerando os valores dos parâmetros de equilíbrio termodinâmico - $P_{ads,m}$ e K - exibidos na figura.

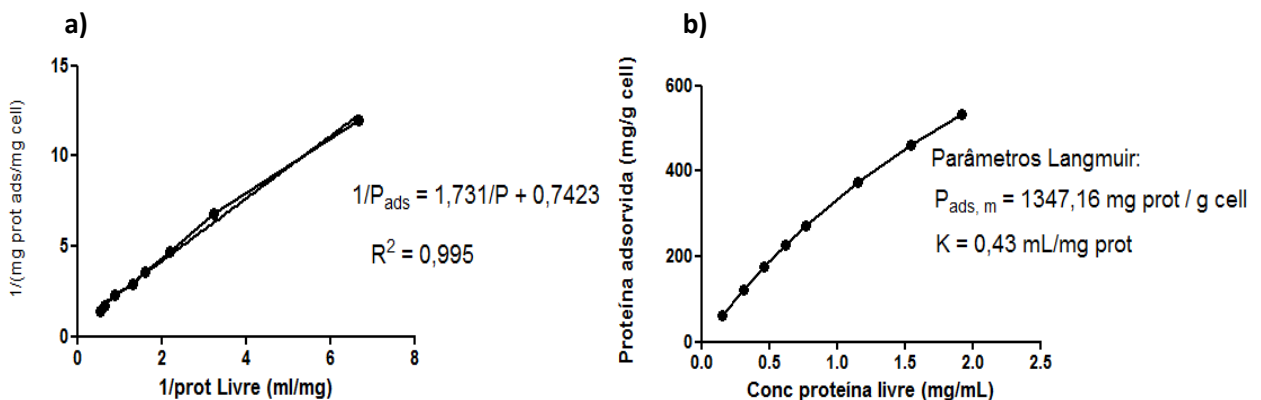


Figura 21 – a) Representação linear da equação de Langmuir da BSA nas membranas de CB; b) Isotérmicas de adsorção da BSA nas membranas de CB não modificadas. Cada ponto representa a média de seis valores.

Os dados experimentais das isotérmicas de equilíbrio de adsorção da proteína nas membranas de CB parecem seguir o modelo de Langmuir, uma vez que o coeficiente de correlação (R^2) é 0,995, o que sugere uma relação linear (*Figura 21 a*).

Em suma, embora a quantidade de BSA adsorvida pelas membranas de CB aumentem com o aumento da concentração da proteína, este efeito é limitado pelo ponto de saturação da matriz.

3.1.1 Eluição da BSA das membranas de CB não modificadas com PBS + NaCl:

Na tentativa de eluir a BSA adsorvida nos discos de CB, estes foram tratados com uma solução de PBS + NaCl (pH=10.0, 1,5 M). Para quantificar a BSA presente no sobrenadante, após eluição, foi utilizado o método de Bradford (595nm), pois após algumas medições da absorvência do sobrenadante a 280 nm, descobriu-se que os sedimentos da CB dispersos na solução, resultantes da constante agitação que esta sofre durante o processo de eluição, alteram as medições por este comprimento de onda, e consequentemente influenciam a quantificação da proteína.

Para ambos os ensaios de eluição realizados, não se conseguiu dosear a BSA presente no sobrenadante, provavelmente devido à reduzida quantidade eluída (abaixo do limite de detecção do método de leitura) ou à influência do NaCl, presente em elevada quantidade, no método de leitura da absorvência. Esta última possibilidade não foi melhor investigada face às limitações de tempo no contexto do trabalho realizado.

4. Modificações das membranas de Celulose Bacteriana:

Nesta secção serão descritos os métodos de funcionalização da superfície da CB estudados ao longo do projeto.

4.1 Processo de incorporação de *Poly(vinyl alcohol)* nas membranas de CB:

Na *Figura 22*, podem-se observar as diferenças existentes entre uma membrana de CB pura e uma membrana de CB modificada pela incorporação de PVA. Como descrito por Mori e colaboradores [111], a membrana modificada exibe uma superfície mais opaca, com uma tonalidade esbranquiçada, embora apenas em algumas áreas, resultado da distribuição heterogénea do polímero na matriz da CB; alternativamente, a própria heterogeneidade da membrana (espessura) pode resultar no surgimento de regiões mais densas e menos densas, após combinação com o PVA. Numa escala temporal, a

biossíntese da CB ocorre pelo crescimento do inóculo e formação das primeiras fibras de CB, que se organizam em novelos ou agregados discretos à superfície do meio de cultura (2-3 dias de fermentação); estes novelos iniciais acabam por unir-se como consequência do crescimento bacteriano e formação adicional de nanofibras (3-6 dias). Se o processo fermentativo for interrompido numa fase inicial, embora permita a obtenção de películas (ou filmes) finas de CB acarreta como consequência a falta de homogeneidade das membranas. Dentro do mesmo lote de fermentação, existe uma grande variabilidade entre as membranas produzidas – porosidade, tamanho dos poros, coeficientes de permeabilidade.

A espessura média da película de CB seca, afeta fortemente o seu desempenho e por este motivo, deve ser cuidadosamente controlada. O processo de fermentação deve então ser interrompido num certa fase, de modo a obter, após os tratamentos de secagem, uma película seca com uma massa dentro do intervalo desejado. No entanto, e devido à relativa complexidade do processo, é difícil determinar o momento certo para o interromper. [112,113]

Adicionalmente, as membranas assim funcionalizadas apresentam uma superfície mais rígida e resistente, pois o PVA confere-lhes uma maior resistência mecânica e uma maior coesão.

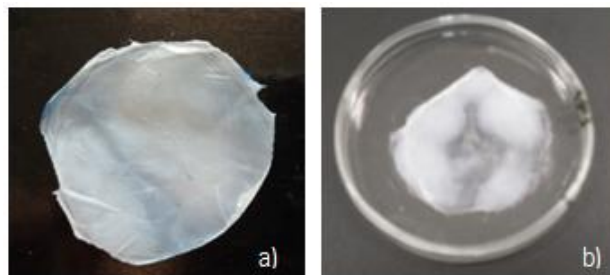


Figura 22 – Membrana de CB seca: **a)** não modificada; **b)** modificada por incorporação de PVA.

Numa fase inicial destes ensaios, utilizou-se um PVA de elevada massa molecular, PVA 98-99 ($M_w = 31,000 - 50,000$). No entanto, devido à elevada rigidez e espessura das membranas resultantes (a média do aumento de massa da CB após combinação com o PVA foi de 6 vezes) optou-se por eleger um PVA de mais baixa massa molecular testando-se diferentes concentrações: 10%, 5%, 3% e 1%. Após a escolha do PVA indicado - PVA 4-98 ($M_w = 27,000$) - testaram-se dois tempos de reação com a solução de polímero: sete e vinte e quatro horas. Porém, ao contrário da situação em cima descrita, para as sete horas de exposição, obtiveram-se membranas muito frágeis e extremamente finas, que em alguns casos quebraram depois de sujeitas ao processo de remoção de água na estufa, não constituindo por isso amostras viáveis para o processo de ultrafiltração. Por esta razão, logicamente, excluiu-se deste projeto os ensaios com este tempo de incubação.

Os discos de CB que sofreram incorporação de 10 % de PVA manifestaram uma quantidade excessiva de polímero (a média do aumento de massa da CB após combinação com o PVA foi de 4 vezes), produzindo discos com uma espessura e rigidez demasiado elevadas para ser utilizada no sistema de ultrafiltração. Por esta razão, para os ensaios de ultrafiltração testaram-se apenas as concentrações de PVA mais baixas (5%, 3% e 1%), cuja média do aumento de massa das membranas de CB foi de 1,3 vezes.

A incorporação do polímero na matriz é confirmada pela observação das imagens de SEM (*Figura 23*), de amostras de CB modificadas com 1% e 5% de PVA, respetivamente. A inclusão dá-se através do revestimento das nanofibras por uma camada de PVA, resultando num ligeiro aumento do diâmetro das fibras, afetando por isso a morfologia das membranas. Aparentemente esta modificação fomenta a agregação das fibras de CB em determinadas zonas, devido à quebra/interrupção parcial das ligações de hidrogénio entre as fibrilas, devido ao seu revestimento com o PVA, o que resulta num aumento da porosidade da matriz [2, 61]. Contudo, para concentrações mais elevadas (*Figura 23 b*), esta porosidade diminui ligeiramente, pois o polímero começa a formar agregados na superfície da matriz o que obstrói a malha e consequentemente diminui a sua porosidade.

No que diz respeito à distribuição do polímero esta não é homogénea, o que se verifica na *Figura 23 b*) e corrobora a situação apresentada na *Figura 22*.

Em suma, enquanto em baixas concentrações, o PVA parece promover a porosidade da membrana, para concentrações mais altas, o polímero poderá preencher os poros da matriz, diminuindo a porosidade da membrana modificada. Esta hipótese foi confirmada pelos resultados obtidos relativamente ao fluxo (mL/min) da solução de BSA através das membranas de CB-PVA, que serão apresentados e discutidos mais a frente neste capítulo.

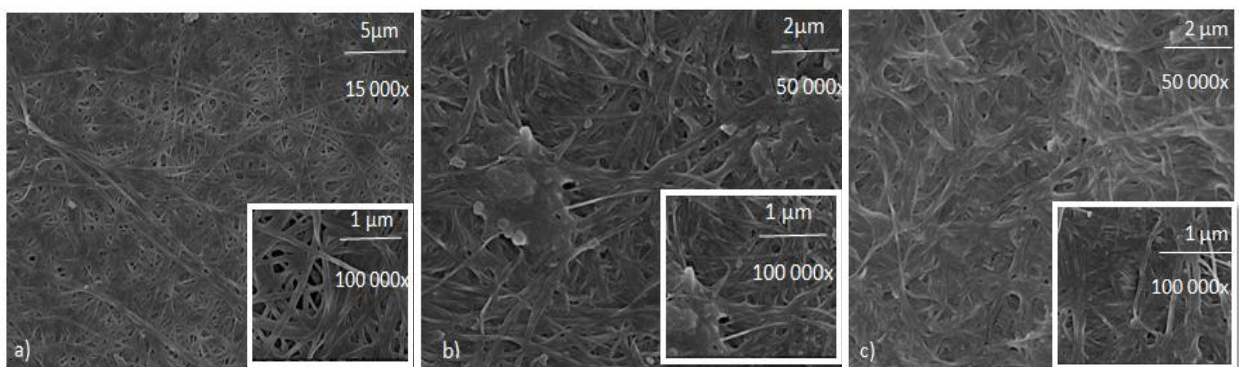


Figura 23 – Imagens de SEM amostras de: **a)** CB modificada com 1% PVA; **b)** CB modificada com 5% PVA; **c)** CB pura.

4.2 Processo de ligação do Cibracon Blue F3GA nas membranas:

Estes ensaios de ligação do F3GA ($M_w = 840,1 \text{ g/mol}$) têm como finalidade tentar incrementar a ligação da BSA à matriz da CB.

Com o intuito de investigar qual a concentração de corante mais adequada e com maior taxa de ligação às membranas, testaram-se diferentes concentrações de F3GA na gama de $[0,00375 \text{ a } 0,6] \text{ mg/mL}$.

Para estes ensaios de funcionalização foram realizados controlos sujeitos às mesmas condições de reação das amostras, mas sem a adição de sais na solução (Capítulo II., secção 4.3.1).

Nas *Figuras 24, 25 e 26*, são apresentadas imagens de membranas de CB (hidratadas e secas) funcionalizadas com diferentes concentrações de F3GA ($C = 0,15 \text{ mg/mL}$; $0,375 \text{ mg/mL}$ e por fim $0,525 \text{ mg/mL}$, respetivamente).

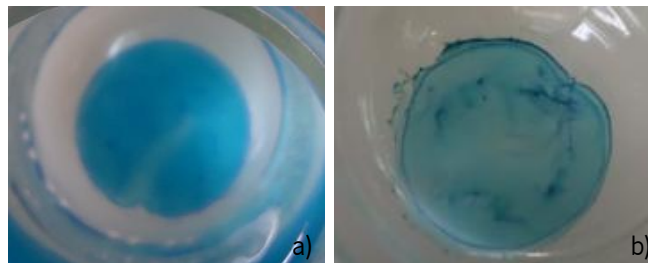


Figura 24 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA ($C = 0,15 \text{ mg/mL}$): **a)** membrana hidratada; **b)** membrana após remoção da água.

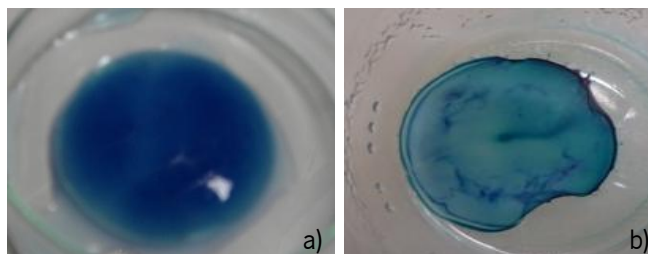


Figura 25 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA ($C = 0,375 \text{ mg/mL}$): **a)** membrana hidratada; **b)** membrana após remoção da água.

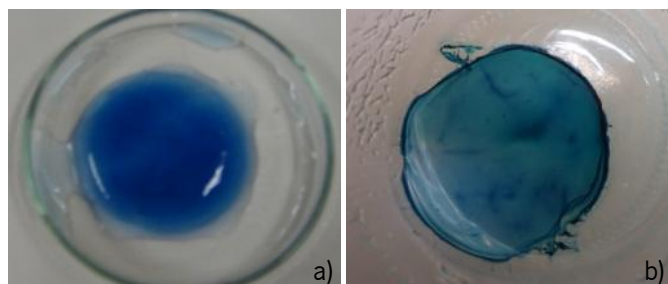


Figura 26 – Membrana de CB funcionalizada com F3GA ($C = 0,525 \text{ mg/mL}$): **a)** membrana hidratada; **b)** membrana após remoção da água.

Visualmente pode afirmar-se que a ligação das moléculas do corante aos discos de CB realizou-se com sucesso (cor azulada das membranas) e que quando no estado hidratado, a distribuição do corante na matriz da CB aparenta ser extremamente homogênea. No entanto, após o processo de remoção de água, verifica-se que existem aglomerados de corante em determinadas zonas, isto é, existem áreas com uma maior concentração de F3GA do que outras, concluindo-se então que a distribuição do corante ao longo da matriz de CB não é uniforme, à semelhança do ocorrido com o PVA. Esta situação é confirmada pela visualização das imagens de SEM (*Figuras 27 e 28*) destas mesmas membranas.

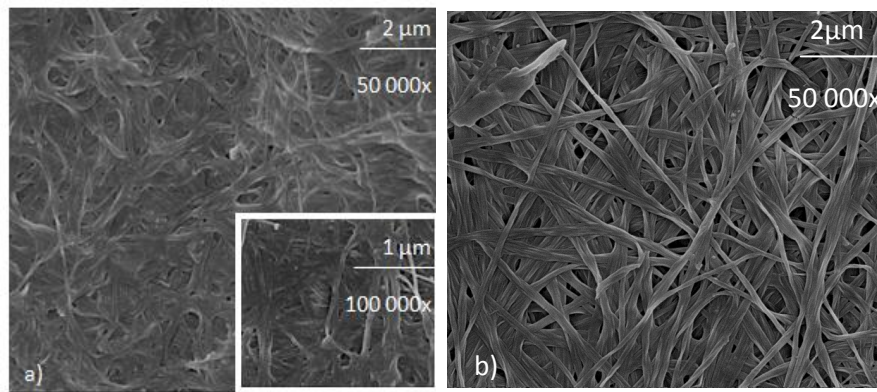


Figura 27 – Imagens de SEM amostra: **a)** CB pura; **b)** CB funcionalizada com F3GA (C=0,00375 mg/mL).

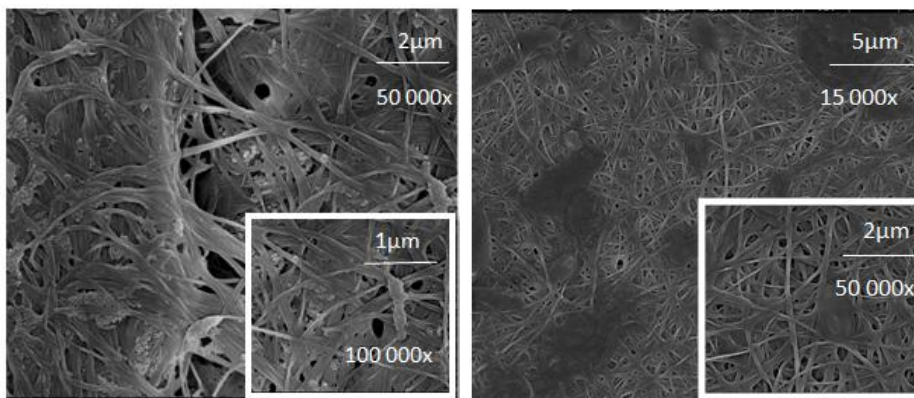


Figura 28 - Imagens de SEM de amostras de CB funcionalizadas com F3GA (C = 0,15 mg/mL).

Após a ligação do corante, em baixas concentrações na membrana, não se verifica uma diferença significativa na estrutura morfológica da matriz de CB (*Figura 27*), embora parece que estas possuem uma estrutura mais porosa do que a CB não modificada, provavelmente devido às temperaturas que o processo de modificação exige. Esta hipótese do aumento de porosidade da matriz é descrita por Lu e Hsieh [102], em 2009, que afirmam que a ligação do corante além de causar um ligeiro aumento da

área superficial, é responsável ainda por um aumento do tamanho e volume dos poros da matriz da celulose.

Por outro lado, para concentrações mais elevadas (*Figura 28*) ocorre a formação de agregados/aglomerados de corante, em determinadas zonas da matriz, o que vem confirmar a tonalidade mais escura de determinadas áreas, visualizadas nas *Figuras 25 e 26*, e que inevitavelmente diminui a porosidade da matriz, nessas regiões.

Comparativamente às membranas modificadas por PVA, em cima mencionadas, estas aparentam possuir uma porosidade muito semelhante.

Resumidamente, à semelhança do ocorrido com as membranas modificadas com PVA, enquanto a ligação do corante em baixas concentrações favorece o aumento da porosidade da matriz, para altas concentrações este aumento da porosidade é equilibrado com a formação de agregados de corante na superfície da matriz, o que leva a um ligeiro decréscimo da porosidade da amostra. Esta hipótese foi igualmente confirmada pelos resultados obtidos relativamente ao fluxo (mL/min) da solução de BSA através das membranas, que serão apresentados e discutidos mais a frente neste capítulo.

Na *Tabela 11* estão expressos os valores relativos à quantidade de F3GA, em mg de corante por grama de celulose, ligada às amostras de CB. Para uma consulta mais facilitada, as membranas de celulose foram subdivididas em membranas designadas por “finas” ou “espessas”, conforme a sua massa.

Tabela 11 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) de F3GA ligada às amostras de CB, para cada ensaio realizado

Membranas de CB - F3GA (mg/mL)	Massa membrana (mg)	Quantidade F3GA ligada por massa de CB (mg/g)
C = 0,015	Membranas finas	
	20,5	9,71
C = 0,015 C = 0,015 C = 0,075 C = 0,075 C = 0,075 C = 0,15	Membranas espessas	
	50,3	9,94
	49,3	4,73
	55,2	18,69
	52,1	23,43
	47,7	25,58
	54,1	29,93

Equiparando-se os valores obtidos para os ensaios com membranas finas e espessas, para a concentração de 0,015 mg/mL de F3GA, verifica-se que os resultados são idênticos, concluindo-se assim que, aparentemente e nas condições experimentais utilizadas, a espessura das amostras não influencia a ligação das moléculas do corante na matriz de CB.

Para a concentração inicial de 0,015 mg/mL de F3GA, a quantidade do mesmo ligado às amostras de CB é de aproximadamente 8,13 mg/g.

Comentando agora só as membranas espessas, para uma concentração inicial de 0,075 mg/mL de corante utilizada, verifica-se que a quantidade de F3GA ligada às amostras é sensivelmente a mesma para os três ensaios, tendo uma média de 22,57 mg/g, valor muito superior ao obtido para a concentração de 0,015 mg/mL.

Já no caso da concentração inicial 0,15 mg/mL a quantidade de corante ligada foi de 29,93 mg/g, valor aproximadamente idêntico ao obtido para a concentração de 0,075 mg/mL.

Em suma, pode-se concluir que a quantidade de F3GA ligada às membranas de CB aumenta com o aumento da concentração inicial do corante, independentemente de a membrana utilizada ser fina ou espessa. Para averiguar a veracidade desta situação e para estudar o comportamento de ligação do corante para concentrações mais elevadas, efetuaram-se mais alguns ensaios utilizando-se concentrações entre 0,00375 e 0,6 mg/mL.

A *Figura 29* resume, graficamente, os resultados obtidos relativamente ao rendimento de ligação do corante nos ensaios realizados, obtido através da razão entre a quantidade de corante ligado e a quantidade de corante inicial, multiplicando-se o resultado por 100%.

Uma observação preliminar do gráfico indica que com o aumento progressivo da quantidade inicial de F3GA, apesar de se verifica um aumento da quantidade de corante ligado às amostras, o rendimento da reação diminui, isto é, a diferença entre a quantidade de corante inicial e absorvida aumenta, daí o decréscimo do rendimento apresentado no gráfico, para as altas concentrações.

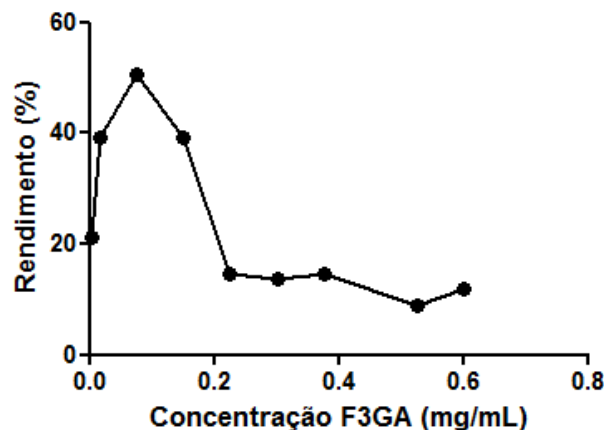


Figura 29 – Gráfico representativo do Rendimento (%) do processo de ligação do F3GA.

Pela observação do gráfico verifica-se que há um aumento acentuado do rendimento da reação até à concentração de 0,075 mg/mL, atingindo aí o seu pico mais elevado (51%). Para os valores de concentração seguintes, o rendimento decresce drasticamente, estabilizando por volta dos 15%, para a concentração de 0,225 mg/mL, mantendo-se aproximadamente por volta desse valor até à concentração

de 0,6 mg/mL. Assim, concluiu-se que a concentração de corante com melhor rendimento é a de 0,075 mg/mL, ou seja, é para esta concentração que a diferença entre a quantidade de F3GA inicial e absorvida é a menor. Um aumento da concentração acima deste valor leva a uma diminuição da percentagem do rendimento da reação.

Em suma, pode-se afirmar que não se justifica utilizar concentrações de corante elevadas, uma vez que o rendimento para estas concentrações é praticamente constante e muito inferior ao constatado para concentrações mais baixas.

Tamahkar e colaboradores, em 2010, [110] investigaram igualmente a ligação do corante F3GA nas nanofibras de CB, para a extração de albumina sérica humana do plasma. Os resultados descritos neste artigo mostram uma capacidade de ligação do F3GA à CB de cerca de 149,54 mg/g para uma concentração de corante de 1,6 mg/mL.

Neste projeto, por exemplo, para concentração de 0,15 mg/mL a capacidade de ligação das moléculas do corante à matriz foi de 29,93 mg/g de celulose. Fazendo a correspondência entre estes valores e os resultados obtidos pelo autor, pode-se concluir que os primeiros são muito superiores, uma vez que, teoricamente, com base no artigo descrito, seria de esperar cerca de 14,02 mg/g de corante ligado para a concentração de 0,15 mg/mL.

Já em 2011, Miyauchi e colaboradores [74], estudaram o potencial de fibras de celulose obtidas por electrospinning e posteriormente modificadas com F3GA, para a separação da BSA. Este autor conseguiu obter uma capacidade de ligação do corante às nanofibras de aproximadamente 0,22 g/g fibras secas, para uma concentração de corante inicial de 15 mg/mL. Mais uma vez, os resultados obtidos neste artigo são inferiores aos alcançados nestes ensaios. Por exemplo, para uma concentração inicial de 0,15 mg/mL, segundo o descrito no artigo, teoricamente seria de se esperar cerca de 0,022 g/g, e não os 0,02993 g/g obtidos neste projeto.

Em 1994, Guo e colaboradores [114], testaram a capacidade da celulose regenerada funcionalizada com F3GA, como membrana de afinidade. Os resultados obtidos pelos autores exibem uma capacidade de imobilização do corante à matriz de celulose de cerca de 0,10 mg/mg.

Como referido anteriormente, para estes ensaios de ligação do F3GA às membranas de CB foram realizados controlos, com o intuito de verificar se o corante que visualmente se vê incorporado nas membranas (cor azulada), está mesmo covalentemente ligado à matriz ou simplesmente adsorvido na sua superfície. Estes controlos foram sujeitos às mesmas condições de reação do processo normal de ligação do corante às membranas, sendo que a única diferença é que não se acrescentaram na solução de reação os sais (NaCl e o $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), não promovendo assim a ligação covalente entre o corante e os grupos hidroxilo da CB. Na *Figura 30* pode-se observar três imagens de membranas de CB funcionalizadas com F3GA, com diferentes concentrações, e os seus respetivos controlos.

Como se pode verificar, de um modo geral, visualmente, as membranas modificadas com F3GA são idênticas aos seus respectivos controlos, o que nos leva a concluir que a grande maioria do corante ligado às membranas de CB está simplesmente adsorvido na sua superfície e não ligado covalentemente. Esta teoria é corroborada pela análise do gráfico da *Figura 31*.

A linha correspondente à variável “Controlo” (sem adição de sais) segue o comportamento das duas outras variáveis. Comparando estes resultados com os do gráfico representado na *Figura 29*, pode-se afirmar que a única disparidade existente reside para as concentrações mais baixas. Ao contrário do que acontece na *Figura 29*, neste gráfico o decréscimo ocorre logo para a concentração de 0,00375 mg/mL, estabilizando nos 15% para a concentração de 0,15 mg/mL.

Estes resultados confirmam que praticamente toda a totalidade de F3GA ligado às membranas de CB está fortemente adsorvido na sua superfície e não ligado covalentemente, como seria de esperar.

Tal situação não é concordante com o descrito na literatura por Miyauchi e colaboradores, para fibras de celulose [74]. Supostamente, a ligação das moléculas do corante na matriz de CB faz-se covalentemente entre os grupos funcionais dos dois elementos, o que é promovido pelos reagentes adicionados na solução de reação (NaCl e Na₂CO₃·10 H₂O). Uma vez que o primeiro sal é o que fomenta a deposição do F3GA na superfície da matriz de CB, sem a sua adição não deveria ocorrer a ligação do corante às amostras, devido à interação repulsiva entre a celulose e o F3GA, pois ambas as superfícies são negativamente carregadas.

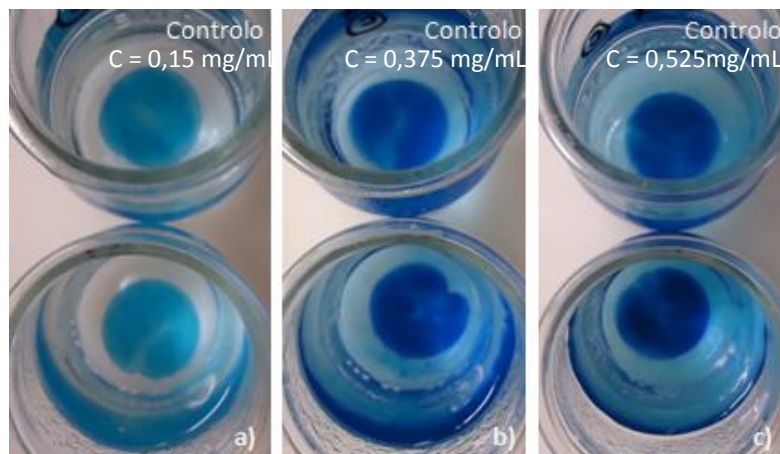


Figura 30 – Membranas de CB modificadas com F3GA com diferentes concentrações, e os seus respectivos controlos.

4.2.1 Ligação do Cibracon Blue F3GA - variação nos parâmetros:

Com a intenção de otimizar o rendimento de ligação do corante às membranas fizeram-se variar dois dos parâmetros considerados fulcrais para o processo de imobilização – concentração de sais e tempo de exposição. No gráfico da *Figura 31*, encontram-se representados os valores, em %, obtidos para as experiências realizadas.

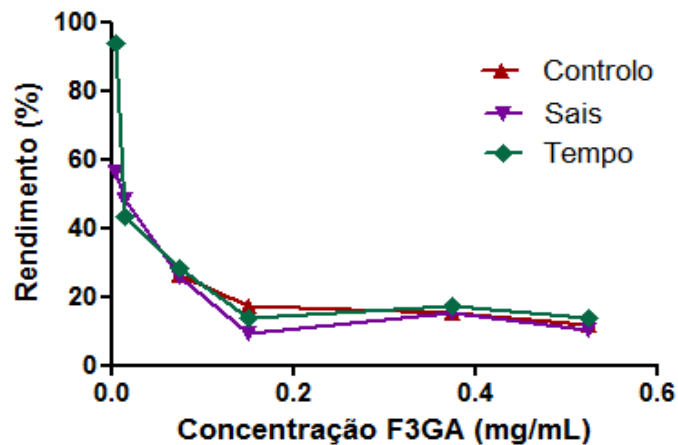


Figura 31 – Rendimento (%) do processo de ligação do F3GA, sob diferentes condições experimentais, em função da sua concentração inicial.

Pela observação do gráfico pode-se concluir que os três parâmetros estudados exibem o mesmo comportamento. De um modo geral, tal como o gráfico do rendimento em cima exibido (*Figura 29*), onde as condições experimentais utilizadas foram as *standard*, para estas novas condições experimentais, considerando as concentrações de F3GA mais altas, o valor do rendimento de ligação do corante à CB (%) mantém-se relativamente constante a partir da concentração de 0,15 mg/mL, sendo que se situa na gama de 11 a 17%, valor muito semelhante ao obtido anteriormente (15%).

Apesar de para as altas concentrações de F3GA, este gráfico apresentar um comportamento idêntico ao gráfico da *Figura 29*, para as concentrações mais baixas isto já não é verificado. Assim, o valor de rendimento mais elevado ocorre para a concentração de 0,00375 mg/mL.

Relativamente à linha correspondente aos “Sais”, que corresponde na prática a um aumento para o dobro da concentração de NaCl e Na₂CO₃.10 H₂O, utilizados no processo de reação, comparativamente às condições *standard*, observa-se um máximo de rendimento de cerca de 56% para a concentração de 0,00375 mg/mL. A partir desta concentração o rendimento da reação baixa consideravelmente estabilizando por volta dos 12% a partir da concentração de 0,15 mg/mL de F3GA.

Em suma, concluiu-se que esta variação de sais não melhora o rendimento da reação, uma vez que só incrementou o rendimento para duas concentrações de F3GA. Contudo, estes resultados não estão de

acordo com o descrito na literatura, pois segundo o artigo de Miyauchi e colaboradores [74], a quantidade de F3GA ligado na matriz de CB aumenta com o aumento da quantidade de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. Por fim, no que diz respeito à linha de “Tempo”, destaca-se o maior valor de rendimento observado em todo o gráfico (93%), que ocorre para a concentração de 0,00375 mg/mL. A partir dessa concentração verifica-se um decréscimo acentuado, que estabiliza, por volta dos 13%, novamente para a concentração de 0,15 mg/mL. Confrontando novamente este gráfico com o gráfico da *Figura 29*, pode aferir-se que o aumento desta variável não promove o incremento do rendimento de ligação do F3GA às membranas de CB.

4.2.2 Ligação do Cibracon Blue F3GA às membranas com PVA previamente incorporado:

Como referido no Capítulo II, as membranas de CB com PVA incorporado (CB-PVA) (1%, 3% e 5%) foram ainda funcionalizadas com corante, com o objetivo de obter membranas cujas características sejam uma junção destas duas modificações diferentes.

A média do aumento de massa das membranas de CB após a modificação com o PVA foi semelhante à obtida para os ensaios anteriores (4.1), cerca de 1,1 vezes.

Os resultados referentes à quantidade (mg F3GA/g de celulose) de F3GA ligada aos discos de CB com PVA previamente incorporado, em cada um dos ensaios efetuados, são apresentados na *Tabela 12*.

Tabela 12 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) de F3GA ligada às amostras de CB - PVA, para cada ensaio realizado

CB - PVA % - F3GA	Massa membrana (mg)	Quantidade F3GA ligada por massa celulose (mg/g)
Membranas finas		
1% PVA	21,8	9,56
Membranas espessas		
1% PVA	56,9	1,91
3% PVA	56,6	2,79
5% PVA	59,1	1,69

Comparando os resultados relativos à quantidade de corante ligada e a percentagem de PVA incorporado na matriz, concluiu-se que a quantidade de polímero imobilizado não afetou a ligação do corante nas membranas de CB.

Observando os resultados relativos às membranas finas e espessas detona-se uma grande diferença relativamente à quantidade de F3GA imobilizada em cada grupo. Nas membranas espessas, esta quantidade foi inferior à obtida para as membranas finas, talvez devido à maior dificuldade das moléculas de corante atravessarem a camada de PVA e de CB e ligarem-se nos poros mais interiores da matriz.

Relacionando agora os resultados obtidos nestes ensaios com os da *Tabela 11*, que mostram a ligação de F3GA em membranas de CB não modificadas, verifica-se que para a mesma concentração de corante (0,015 mg/mL), a quantidade imobilizada nestes ensaios é muito inferior para as membranas espessas, tendo uma média de 2,13 mg/g, comparativamente com os 7,34 mg/g, obtidos anteriormente. Contudo, no caso das membranas finas, esta quantidade é aproximadamente igual à obtida nos ensaios com CB não modificada (9,71 mg/g).

Büyüktüncel e colaboradores [105], em 2000, descreveram a imobilização de F3GA em fibras ocas de polipropileno com PVA incorporado, para a remoção de iões de cádmio de sistemas aquosos. Os valores obtidos neste estudo, relativamente à quantidade de corante imobilizado nas amostras, foi de 87,9 μmol de F3GA por grama de polímero, para uma concentração de 2 mg/mL de corante.

Para o caso das membranas finas a capacidade de ligação do F3GA, para os ensaios realizados neste projeto, é de 11,40 $\mu\text{mol/g}$, enquanto que para as membranas espessas é de 2,49 $\mu\text{mol/g}$, para uma concentração de 0,015 mg/mL. Estes valores são muito superiores aos teoricamente esperados, segundo o artigo, para a esta concentração inicial de corante (0,66 $\mu\text{mol/g}$). Tal discrepância provavelmente deve-se ao tipo de matriz usada, uma vez que a CB utilizada neste trabalho possui uma área superficial muito superior às fibras ocas de polipropileno utilizadas pelos autores, aumentando assim a probabilidade de ligação das moléculas de corante na sua superfície.

Visualmente, as membranas obtidas após estes ensaios são semelhantes às exibidas nas *Figuras 24, 25 e 26*. Mais uma vez, a ligação das moléculas do corante à matriz das membranas de CB - PVA confirma-se através da cor azulada que estas exibem. Esta imobilização do corante é também confirmada pelas imagens de SEM destas mesmas amostras (*Figura 32*).

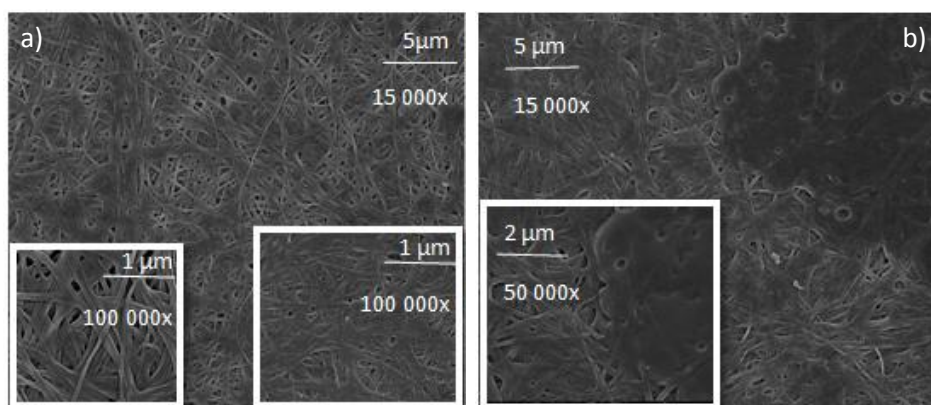


Figura 32 – Imagens de SEM de amostras de CB funcionalizadas com PVA % e F3GA (C = 0,015 mg/mL): **a)** 1% PVA incorporado; **b)** 5% PVA incorporado.

Após uma análise das imagens, verifica-se que no caso da membrana modificada com 1% PVA (*Figura 32 a)*) esta apresenta uma estrutura morfológica semelhante às imagens da *Figura 23 a)* – CB modificada com 1% PVA. No entanto, visualizam-se dois tipos diferentes de áreas; uma em que se destaca um aumento da porosidade da malha, devido à agregação das fibrilas da CB, fenómeno já discutido previamente, e outra onde predomina uma camada homogénea de polímero (PVA) sobre a superfície da matriz e portanto onde a porosidade é muito reduzida.

No que diz respeito às membranas funcionalizadas com 5% de PVA (*Figura 32 b)*), estas também se assemelham às imagens das membranas representadas na *Figura 23 b)* – CB funcionalizada com 5% PVA. Neste caso a malha apresenta-se ligeiramente mais obstruída, comparativamente com a da *Figura 32 a)*, e portanto com uma porosidade mais reduzida, talvez devido à maior concentração de polímero utilizado, o que leva à sua fusão aquando da modificação superficial das membranas.

Em geral a modificação das amostras com PVA seguida da ligação com o F3GA parece promover uma ligeira diminuição da porosidade da matriz, relativamente às membranas funcionalizadas isoladamente com PVA e F3GA. Tal hipótese é confirmada pelos resultados obtidos em relação ao fluxo das soluções através destas membranas, que serão discutidos mais a frente neste capítulo.

Relativamente à imobilização do F3GA nestas amostras, esta destaca-se no caso da *Figura 32 b)*, verificando-se a presença de um enorme aglomerado escuro, supostamente constituído por corante. No entanto, quando se compara esta imagem com as da *Figura 28*, verifica-se que este aglomerado é muito mais pronunciado, por isso, deve ser fruto da imobilização do corante numa zona de aglomeração de PVA, daí a sua grande acentuação. Excluindo esta situação, a imobilização do corante em ambas as membranas de PVA (1% e 5%) parece ser idêntica.

5. Processo de ultrafiltração e de eluição de proteínas das membranas de celulose bacteriana:

Para todas as modificações introduzidas nos discos de CB, o objetivo final é estudar a capacidade de ligação da BSA e posterior potencial de reutilização das membranas modificadas.

Assim as membranas de CB funcionalizadas com PVA, com F3GA, com PVA e F3GA e por último as amostras de CB não modificadas (controlo) foram sujeitas a um processo de ultrafiltração com uma solução de BSA (0,5 mg/mL), seguido de um procedimento de eluição da proteína com uma solução de PBS + NaCl (1,5 M, pH = 10.0), procedimentos estes realizados na totalidade à temperatura ambiente.

Para a quantificação da proteína presente no permeado foi utilizado o método Bradford a 595 nm, pelas razões já anteriormente referidas.

5.1 Ultrafiltração e Reutilização das membranas de CB não modificadas:

Numa primeira fase investigou-se o potencial de reutilização das membranas de CB não modificadas, ou seja, a capacidade de retenção da BSA na matriz ao longo de três ciclos de adsorção (A) e eluição (E) da proteína. Os resultados obtidos relativamente a estes ensaios, onde se utilizou uma membrana com uma massa de 12,5 mg, estão representados na *Figura 33*, que representa o perfil de adsorção e de eluição da proteína para cada um dos três ensaios de reutilização realizados.

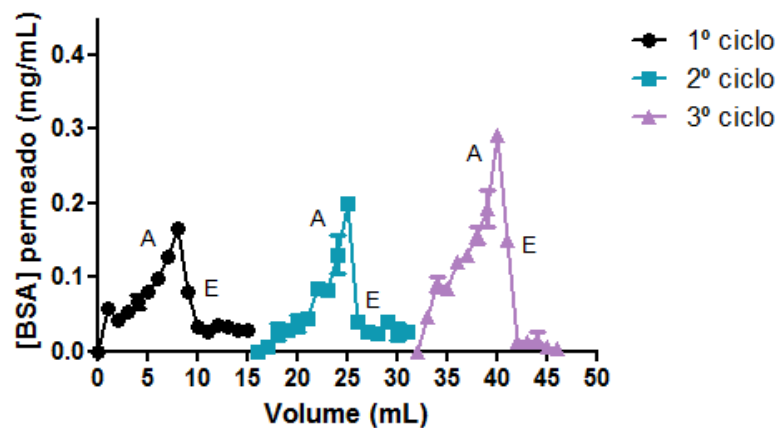


Figura 33 – Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) da BSA, para cada um dos três ensaios realizados. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL.

Pela observação da figura pode-se aferir que os perfis são idênticos para os três ensaios efetuados, o que desde já valida a ideia de estabilidade e reutilização da membrana. No entanto, com o avançar das reutilizações, nota-se um aumento da quantidade (mg/mL) da proteína no ultrafiltrado, o que significa que em cada ciclo de reutilização a membrana de CB retém cada vez menos BSA na sua matriz. Esta situação pode ser explicada através da saturação progressiva da membrana em BSA, pois em cada ciclo de adsorção, as moléculas da proteína vão formando uma espécie de camada na sua superfície. A intenção do passo de eluição com PBS + NaCl é precisamente remover essas moléculas de BSA retidas na matriz. No entanto, os resultados exibidos mais à frente, mostram que este procedimento não consegue remover nem metade das moléculas imobilizadas. Consequentemente, estas ficam retidas na membrana, o que conduz a uma diminuição progressiva da capacidade da matriz adsorver moléculas adicionais de BSA.

De facto, no caso do primeiro, segundo e terceiro ciclo de adsorção destes ensaios, a membrana de CB pura conseguiu reter cerca de 69,21%, 49,68% e 37,91% da BSA total ultrafiltrada, respetivamente. Relativamente à percentagem de proteína eluída com a solução de lavagem, esta foi de 18,15%, 21,26% e 68,32% para o primeiro, segundo e terceiro caso, respetivamente.

A forma e a semelhança entre os perfis de adsorção e eluição estão totalmente de acordo com o descrito por Castilho e colaboradores [115], Zeng e Ruckenstein [116] e Ma e colaboradores [76].

Zeng e Ruckenstein, em 1995 [116], estudaram a ultrafiltração (Nuclepore Costar Incorp., diâmetro de 43 mm e área efetiva de membrana de 11,3 cm²) de uma solução de HSA (0,5 mg/mL) em membranas microporosas de quitosano funcionalizadas com F3GA, seguida do processo de eluição da proteína com uma solução de lavagem (50 mM Tris-HCl/50 mM NaCl, pH = 8), para retirar as proteínas fracamente aderidas à matriz da membrana. O perfil de adsorção e dessorção obtido por estes autores é idêntico ao alcançado nestes ensaios. No entanto, neste artigo este procedimento de adsorção/dessorção ocorreu durante apenas uma hora, obtendo-se cerca de 2,34 mg adsorvidas e 2,07 mg eluídas, isto é, conseguiu-se eluir praticamente todas as moléculas de proteína.

Ma e colaboradores, [76] em 2006, investigaram o potencial de uma membrana de PSU obtida por electrospinning e posteriormente modificada com F3GA, para ser usada como membrana de afinidade na separação de BSA. Posteriormente à utilização destas membranas funcionalizadas com F3GA, estas foram lavadas com uma solução de eluição (PBS + 2 M NaCl, pH = 11), concluindo que a elevada força iônica e o elevado valor de pH promovem eficazmente a dessorção da BSA capturada na membrana.

São inúmeros os estudos realizados que contêm os passos de adsorção da proteína de interesse, seguida da sua remoção, com as mais variadas soluções de eluição, destacando-se entre elas a solução de PBS + NaCl, utilizada nestes ensaios. [9, 66, 76, 116]

Na *Figura 34* estão representados os perfis cumulativos relativos à quantidade de BSA total (mg/g de celulose) retida (*a*) e eluída (*b*) da membrana de CB, para cada uma dos ciclos de reutilização.

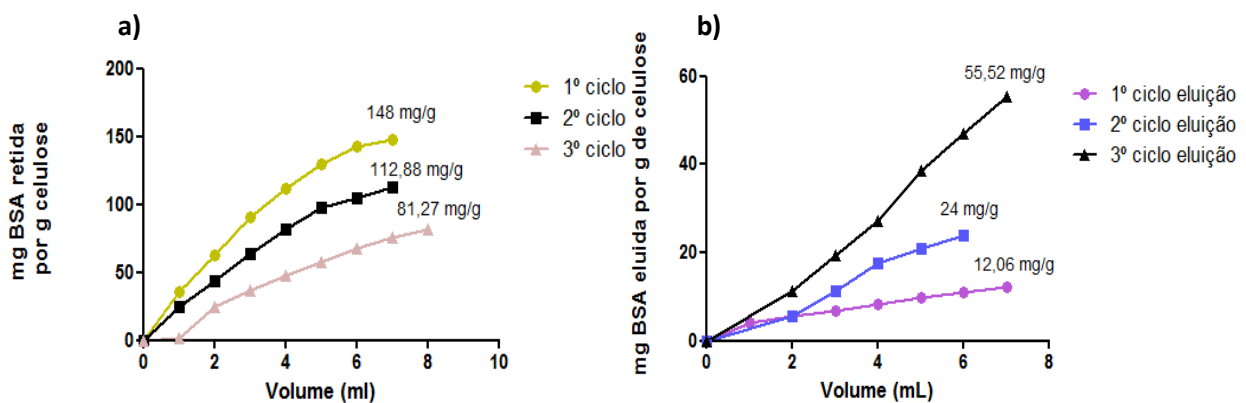


Figura 34 – Valores cumulativos relativos à quantidade de BSA total (mg/g) **a**) retida e **b**) eluída, da membrana de CB reutilizada, em função do volume, para cada um dos três ensaios.

Como se pode observar pelo gráfico *a)*, a quantidade de BSA (mg/g) retida na membrana de CB não modificada, vai diminuindo ao longo dos ciclos de reutilização, atingindo o seu máximo de 148 mg/g na primeira utilização. Tal situação além de estar de acordo com o observado na *Figura 33*, que mostra um aumento da quantidade (mg/mL) da BSA presente no permeado (A), está ainda concordante com o descrito na literatura por Ma e colaboradores [76]. Neste artigo, apesar de os autores utilizarem um substrato diferente, verifica-se uma diminuição da capacidade de ligação da BSA (mg/g) com o avançar dos ciclos de reutilização da membrana.

Relativamente ao gráfico *b)*, contrariamente, verifica-se um aumento da quantidade de proteína (mg/g) eluída da membrana de CB, ao longo dos ciclos de eluição, tendo o valor máximo de 55,52 mg/g no último ciclo. Este aumento verificado provavelmente deve-se à desorção de moléculas de BSA retidas na matriz dos ciclos anteriores de adsorção, ou seja, como as moléculas de BSA não são todas eluídas da matriz nos ciclos de eluição, a quantidade de proteína retida na membrana vai aumentando, o que significa que a em cada ciclo de eluição, estão disponíveis mais moléculas de BSA para eluir e consequentemente aumenta a quantidade de BSA removida. Esta situação está novamente de acordo com a representada na *Figura 33 (E)*.

Outro ponto a destacar da análise da *Figura 34*, é que após todos os ciclos de eluição, ainda ficaram retidos na membrana de CB cerca de 250,57 mg/g de BSA. Este valor elevado traduz a não eficácia da solução de lavagem (PBS + NaCl) em remover as moléculas de BSA retidas na matriz, contrariando o descrito na literatura [76,116].

Comparando estes resultados com os obtidos para as isotérmicas de adsorção da BSA (*Figura 19*), concluiu-se que para a mesma concentração inicial (0,5 mg/mL), nas isotérmicas obteve-se cerca de 67 mg/g de BSA adsorvidas, valor significativamente inferior ao obtida para o primeiro ciclo de adsorção destes ensaios (*Figura 34 a)*).

No artigo de Jia e colaboradores [73], anteriormente descrito para a comparação com as isotérmicas de adsorção deste projeto, para a concentração de 0,5 mg/mL os autores obtiveram valores de adsorção de BSA na ordem dos 200 mg/g, valor superior aos obtidos nestes ensaios. À semelhança do que ocorreu para as isotérmicas de adsorção de BSA, todos os valores obtidos neste trabalho são ligeiramente inferiores aos obtidos no artigo referido.

Os valores relatados por Ma e colaboradores, já anteriormente referidos [16], são muito inferiores aos obtidos neste projeto, pois os autores obtiveram valores de absorção na ordem dos 1,8 mg/g para a concentração inicial de BSA de 0,5 mg/mL.

Resumidamente, pode concluir-se que as membranas de CB não modificadas têm potencial de reutilização, uma vez que a sua estabilidade leva à obtenção de perfis de adsorção e eluição idênticos ao longo dos ciclos. Contudo, a quantidade de proteína adsorvida diminui com a reutilização da membrana.

Outra conclusão a apontar é a não eficácia na eluição das proteínas retidas na matriz, da solução de lavagem de PBS + NaCl.

Relativamente ao fluxo da solução de BSA e da solução de lavagem, a comparação entre os três ensaios realizados está representada na *Figura 35 a)*, para a solução da proteína, e na *Figura 35 b)*, para a solução de PBS + NaCl.

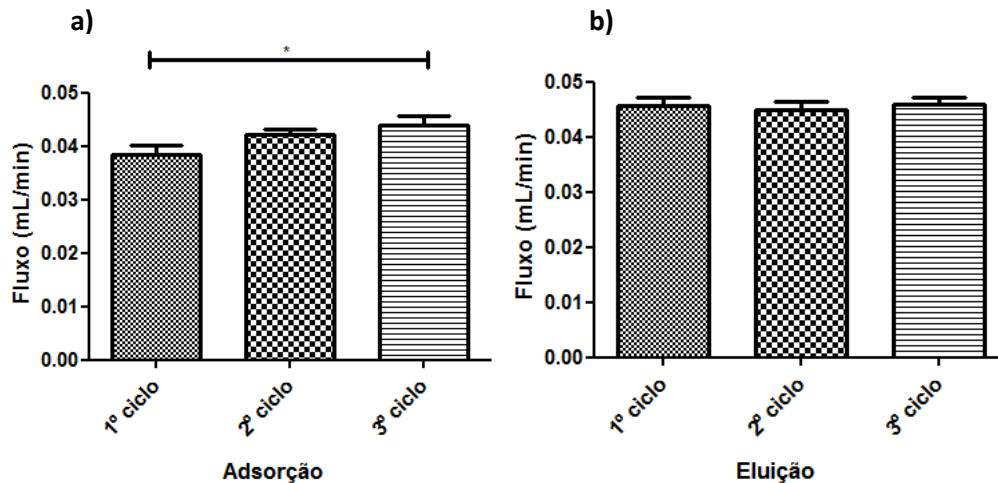


Figura 35 – Fluxos (mL/min) para cada um dos três ensaios de reutilização: **a)** Adsorção: solução PBS + BSA; **b)** Eluição: solução PBS + NaCl pH= 10.0; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Após análise estatística (Bonferroni's Multiple Comparison Test) conclui-se que relativamente à *Figura 35 a)*, apenas os fluxos do 1º e 3º ciclo de adsorção são significativamente diferentes, embora para todos os casos a sua média ronde o valor de 0,04 mL/min. Já relativamente à *Figura 35 b)* verifica-se que os fluxos para todos os ciclos de eluição são idênticos, com uma média na gama de 0,045 mL/min.

Para se investigar a capacidade de saturação, em BSA, das membranas de CB não modificadas num único ensaio de adsorção, realizaram-se ensaios que decorreram durante cerca de 18 horas. No primeiro caso utilizou-se uma membrana com uma massa de 52,5 mg, e no segundo caso com 52,6 mg. Para ambos os casos foi utilizada uma solução de BSA de 0,5 mg/mL.

Na *Figura 36 a)* está representada a quantidade cumulativa de BSA total retida na matriz, em função do volume, para os dois ensaios efetuados.

Pela observação deste gráfico pode aferir-se que o perfil é idêntico para os dois ensaios realizados.

No caso do primeiro ensaio cerca de 13,87 % da BSA ultrafiltrada ficou retida na membrana de CB. Já no caso do segundo ensaio apenas 9,2% da proteína ficou retida na matriz da membrana. Assim, a

quantidade de BSA total retida na membrana é superior no primeiro ensaio realizado - 36,28 mg/g - comparativamente com 15,54 mg/g, obtidos no segundo ensaio. Independentemente da variabilidade de resultados, o perfil das curvas de adsorção atinge valores de saturação após a ultrafiltração de aproximadamente 5 mL de solução de BSA, o que significa que a ponderar o uso da CB como membrana de afinidade, o valor de 5 mL de recolha, seria o instante após o qual se poderia proceder à etapa de eluição, uma vez que a membrana já atingiu o seu ponto de saturação e portanto a quantidade de BSA estabiliza até ao final do ensaio.

Inexplicavelmente, os valores atingidos nestes ensaios são significativamente inferiores aos obtidos nos ensaios anteriores, apesar da concentração inicial de proteína ser a mesma, e o volume utilizado ser duas vezes superior (20 mL em vez de 10 mL).

No que diz respeito ao fluxo da solução de BSA (*Figura 36 b*), comparam-se as diferenças existentes entre os primeiros e os últimos dez mililitros utilizados em cada um dos ensaios de saturação.

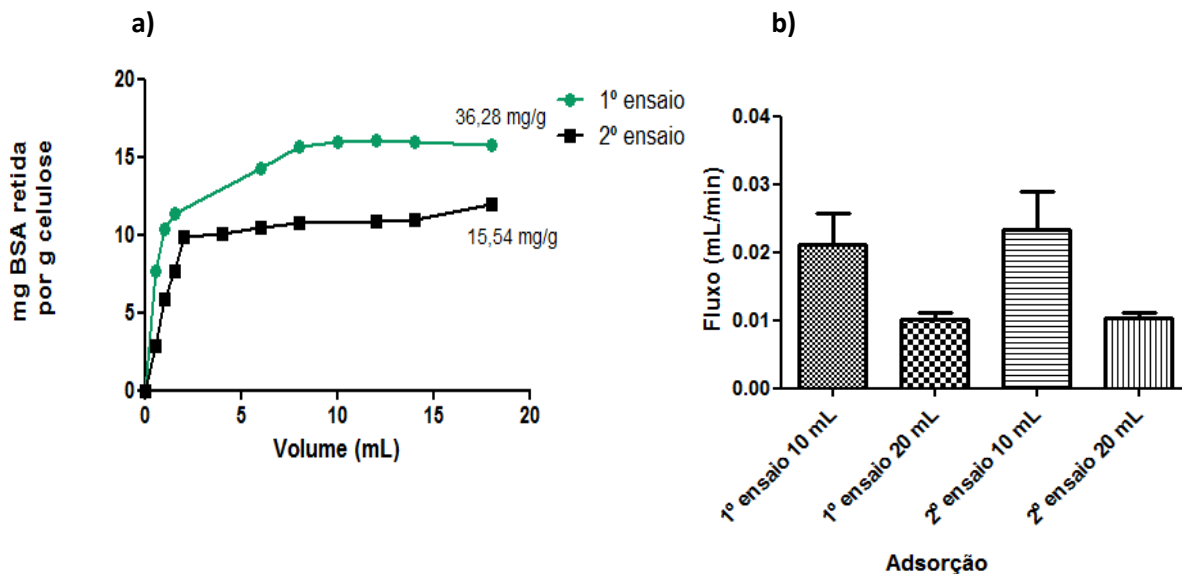


Figura 36 – a) Valores relativos à quantidade de BSA total cumulativa (mg/g) retida na membrana, para os dois ensaios de saturação, em função do volume de solução; **b)** Fluxos (mL/min) para os dois ensaios de saturação: comparação entre os primeiros e os segundos 10 mL da solução de PBS + BSA.

Após análise estatística (Bonferroni's Multiple Comparison Test), concluiu-se que todos os fluxos analisados são idênticos. No entanto, para ambos os ensaios efetuados, os dez primeiros mL da solução de BSA possuem um valor de fluxo maior (aproximadamente 0,02 mL/min), do que os segundos dez mL de solução (0,01 mL/min).

Os valores de fluxo atingidos nestes ensaios de saturação são inferiores aos obtidos nos ensaios de reutilização, devido à diferença existente na espessura das membranas utilizadas. Enquanto nos primeiros utilizaram-se membranas espessas, nestes as membranas usadas eram finas,

consequentemente, a resistência ao fluxo das soluções é menor no segundo caso o que leva a valores de fluxo mais elevados.

5.2 Ultrafiltração das membranas de CB modificadas pela incorporação de PVA:

Como já foi referido ao longo deste trabalho, para estes ensaios foram utilizadas membranas não só com diferentes concentrações de PVA (1%,3% e 5%), mas também com diferentes espessuras (espessas e finas). Por isso, esta secção do trabalho irá ser dividida consoante a percentagem de PVA utilizada nas membranas, e dentro dessa percentagem as amostras irão ainda ser subdivididas conforme a sua massa.

5.2.1 Membranas modificadas com 5% PVA:

Para esta percentagem de PVA foram realizados dois ensaios de ultrafiltração, nos quais se utilizaram uma membrana espessa e posteriormente uma membrana fina.

5.2.1.1 Membrana espessa:

No primeiro ensaio realizado utilizou-se uma membrana de CB, que após incorporação do PVA ficou com uma massa final de 74,7 mg.

Na *Figura 37 a)* pode-se observar o perfil de adsorção de BSA e a sua posterior eluição, em função do volume.

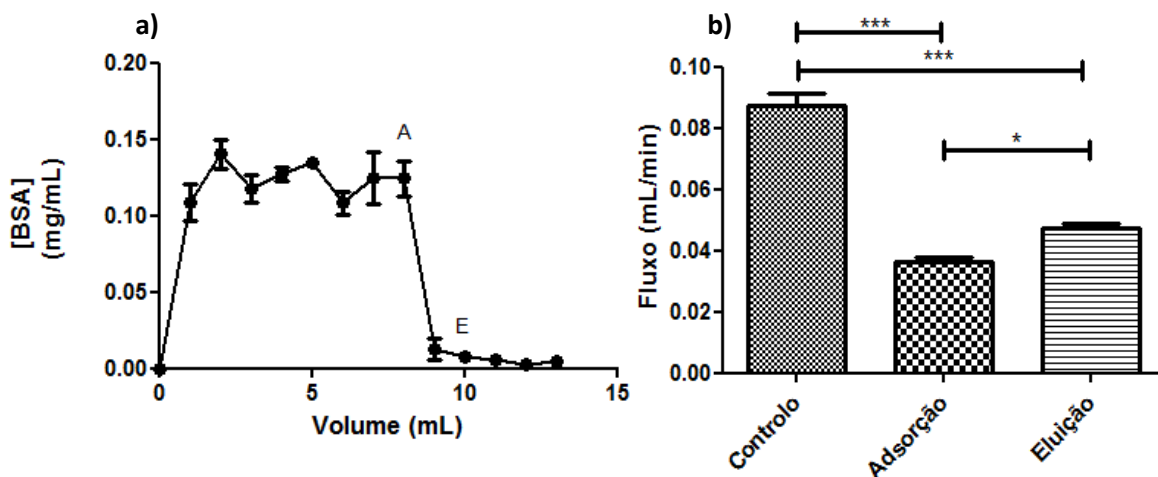


Figura 37 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Pela observação do perfil de adsorção (A), verifica-se que o comportamento é idêntico ao das membranas de CB não modificadas. No entanto, esta membrana funcionalizadas atingem a saturação logo por volta dos 3 mL, mais cedo do que a membrana de CB pura. O perfil de eluição parece igualmente idêntico ao das membranas não modificadas, embora com valores muito mais reduzidos.

Em termos quantitativos, neste ensaio cerca de 17,16% da BSA total ultrafiltrada ficou retida na matriz, sendo que a solução de eluição só conseguiu retirar cerca de 3,68% da proteína imobilizada.

Na *Figura 37 b)*, estão representados os fluxos (mL/min) das soluções de proteína e de lavagem.

Pela observação do gráfico verifica-se que os fluxos comparados são todos significativamente diferentes (Bonferroni's Multiple Comparison Test), sendo que os mais idênticos são os fluxos das soluções de BSA e NaCl. Enquanto a solução de controlo possui uma média de fluxo de aproximadamente 0,09 mL/min, a solução de NaCl tem uma média de 0,05 mL/min, seguido da solução de BSA com 0,04 mL/min. Estes valores são idênticos aos obtidos na *Figura 35*, onde se utilizou uma membrana de CB pura fina, sendo no entanto superiores aos obtidos com a membrana CB não modificada espessa.

5.2.1.2 Membrana fina:

Relativamente ao segundo ensaio efetuado, utilizou-se uma membrana de CB cuja massa, após a incorporação do polímero, foi de 24,9 mg. Mais uma vez, na *Figura 38 a)* encontra-se representado o perfil de adsorção e eluição da BSA (mg/mL).

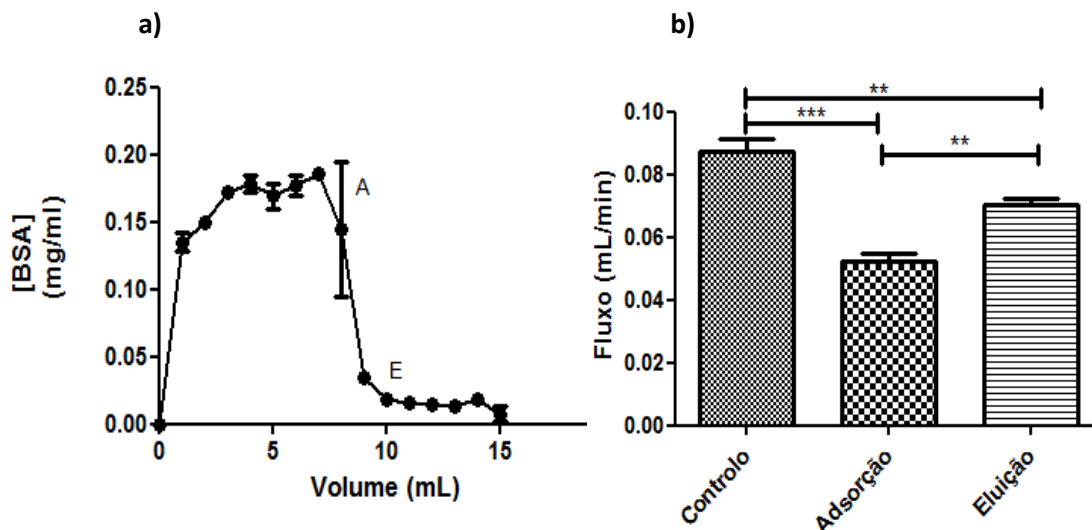


Figura 38 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min): Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Qualitativamente, a análise deste gráfico leva a concluir que o perfil representado é em tudo semelhante ao da *Figura 37*, apesar dos valores de eluição serem relativamente superiores. Quantitativamente a membrana modificada conseguiu reter cerca de 4,52% da BSA total ultrafiltrada. Para este ensaio não foi possível calcular a percentagem de BSA eluída com a solução de lavagem, pois os valores de absorvência obtidos foram superiores aos valores alcançados na fase de adsorção.

Pela observação do gráfico *b)* da figura em cima apresentada, concluiu-se após análise estatística que os três fluxos comparados são significativamente diferentes. Em termos quantitativos, o fluxo da solução de controlo é o que possui uma maior média (0,09 mL/min), seguido da solução de NaCl (0,07 mL/min) e por último a solução de BSA (0,05 mL/min). Estes valores são superiores aos atingidos nos ensaios com CB não modificada com membrana fina e espessa (*Figura 35 e 36*). Como era de esperar, estes valores são também superiores aos valores alcançados no ensaio anterior, uma vez que a membrana aqui utilizada possui uma espessura mais reduzida, o que reduz a resistência à passagem da solução e consequentemente aumenta o valor de fluxo.

5.2.2 Membranas modificadas com 3% PVA:

Para esta concentração de polímero efetuaram-se igualmente dois ensaios de ultrafiltração independentes. No primeiro caso utilizou-se uma membrana espessa e no segundo uma fina.

5.2.2.1 Membrana espessa:

Assim, para o primeiro ensaio realizado utilizou-se uma membrana de CB que após a incorporação do polímero passou a ter uma massa de 62,4 mg.

Na *Figura 39 a)* está representado o perfil de adsorção e de eluição da proteína (mg/mL), em função do volume.

Pela observação do perfil de adsorção (A), verifica-se que o comportamento é idêntico ao das membranas de CB não modificadas e ao das membranas com 5% PVA. Em analogia ao sucedido para a membrana com 5% PVA, a saturação ocorre igualmente por volta dos 3/4 mL. O perfil de eluição parece igualmente idêntico ao das membranas não modificadas e com 5% PVA.

Quantitativamente, a membrana de CB modificada com 3% PVA conseguiu reter cerca de 9,87% da BSA total ultrafiltrada. À semelhança do ocorrido num dos ensaios com 5% PVA, não se conseguiu quantificar a BSA eluída com a solução de PBS + NaCl, pelas mesmas razões em cima referidas.

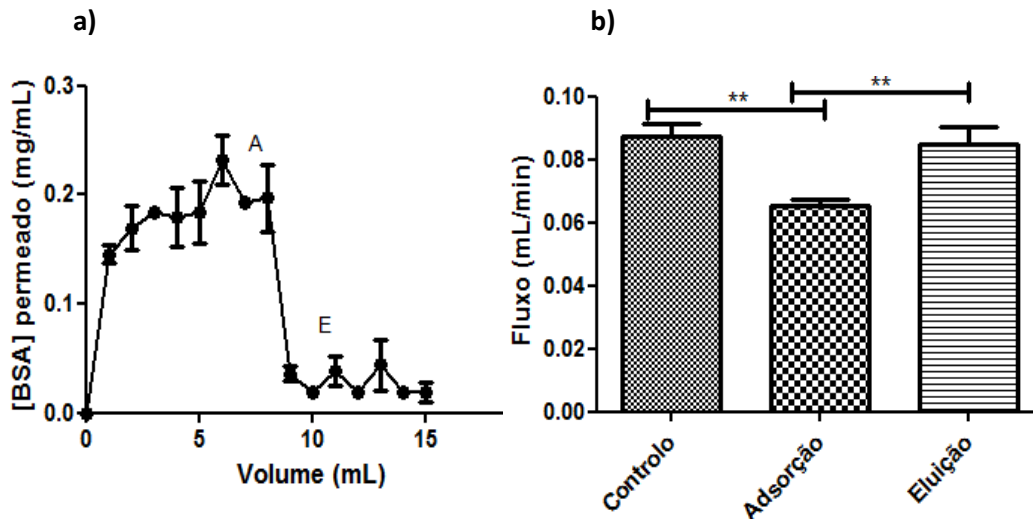


Figura 39 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Pela observação do gráfico *b)* acima apresentado, que compara os fluxos da solução de BSA e de PBS+NaCl com uma solução controle de PBS, verifica-se que os únicos fluxos não significativamente diferentes são os da solução de NaCl e de controle. A média mais elevada é a da solução de controle (0,09 mL/min), acompanhada de muito perto pela solução de lavagem (0,085 mL/min), e seguida pela solução de proteína (0,07 mL/min). Estes valores são superiores aos atingidos para as membranas (espessas e finas) de CB não modificadas e modificadas com 5% PVA.

5.2.2.2 Membrana fina:

No que diz respeito ao segundo ensaio realizado para esta percentagem de PVA, foi utilizada uma membrana, cuja massa final após modificação foi de 30,9 mg.

Novamente, no gráfico da *Figura 40 a)* está representado o perfil de adsorção e de eluição da BSA para a membrana em causa.

Qualitativamente, através da observação deste gráfico, concluiu-se que o perfil nele representado é em tudo semelhante ao da *Figura 39 a)*, embora os valores de eluição da proteína sejam relativamente inferiores.

Em termos quantitativos da percentagem total da BSA ultrafiltrada, esta membrana foi capaz de adsorver cerca de 5,06%. Mais uma vez para este ensaio não foi possível calcular a percentagem de BSA eluída com a solução de lavagem, à semelhança do ocorrido em ensaios anteriores.

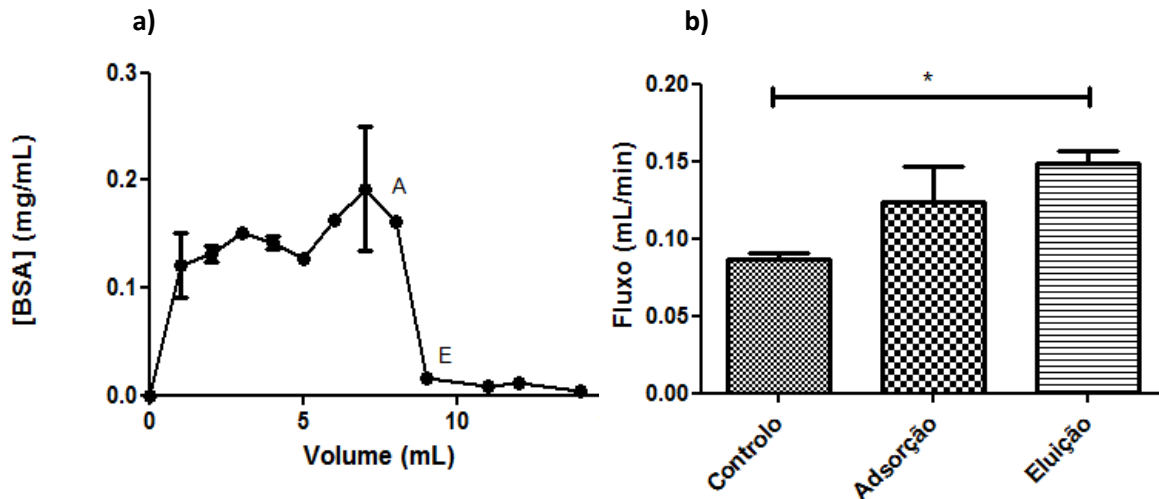


Figura 40 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Novamente, na *Figura 40 b)*, estão representados os fluxos (mL/min) das soluções de proteína e de lavagem. Pela observação do gráfico concluiu-se que, ao contrário do observado até aqui, a média dos fluxos das soluções de BSA e NaCl é superior à do fluxo da solução de controlo.

Após análise estatística, concluiu-se que apenas a solução de controlo e a solução de PBS + NaCl são significativamente diferentes. A maior média de fluxo pertence à solução de eluição, com aproximadamente 0,15 mL/min, seguida de perto pela solução de BSA, com cerca de 0,13 mL/min.

Como era de esperar, os valores dos fluxos atingidos neste ensaio são superiores aos valores alcançados no ensaio anterior, uma vez que a membrana aqui utilizada possui uma espessura mais reduzida.

Neste ensaio destacam-se os valores de fluxo mais elevados obtidos até agora neste projeto, relativamente às membranas de CB não modificadas e modificadas com 5% PVA, espessas e finas.

5.2.3 Membranas modificadas com 1% PVA:

Para esta concentração de polímero realizou-se apenas um ensaio de ultrafiltração onde se utilizou uma membrana fina.

5.2.3.1 Membrana fina:

Para este ensaio usou-se uma membrana com uma massa final de 25,6 mg.

No gráfico representado na *Figura 41 a)* pode-se observar os perfis de adsorção e de eluição da proteína.

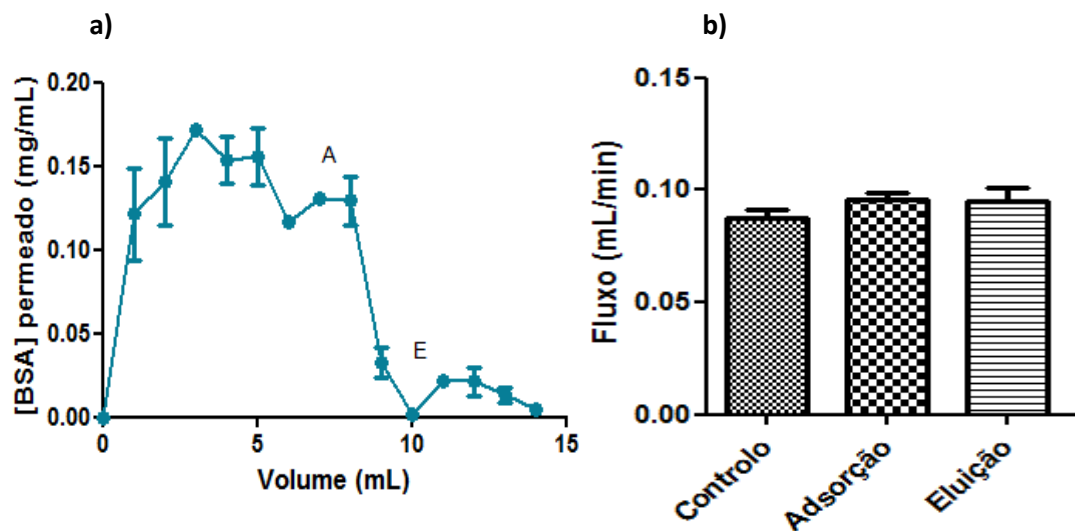


Figura 41 – a) Perfil de adsorção (**A**) e de eluição (**E**) para a membrana com 1% PVA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl.

Observando o perfil de adsorção da BSA, verifica-se que o seu comportamento é idêntico ao das membranas de CB não modificadas e ao das membranas modificadas com 5% e 3% de PVA.

A semelhança no comportamento desta membrana estende-se igualmente à saturação da matriz, que analogamente ao que ocorreu para as membranas com 5% e 3% de PVA, atingem a saturação após a ultrafiltração de 3/4 mL de solução de proteína. O perfil de eluição parece igualmente idêntico ao das membranas não modificadas e modificadas com 5% e 3% de PVA.

Em termos quantitativos, esta membrana de CB modificada com 1% de PVA foi capaz de reter aproximadamente 10,83% da BSA total ultrafiltrada, não se conseguindo, mais uma vez, quantificar a proteína total eluída da matriz.

No gráfico *b)* podem-se observar os fluxos da solução de proteína e de lavagem, verificando-se que estes são idênticos entre si. A maior média é atribuída à solução de BSA (0,10 mL/min), acompanhada de muito perto pela solução de NaCl (0,095 mL/min) e por fim do a solução de PBS (0,090 mL/min).

Uma conclusão a retirar é que estes valores de fluxos são superiores aos alcançados para as membranas de CB não modificadas (finas e espessas), membranas modificadas com 5% PVA (finas e espessas) e ainda membranas com 3% de PVA (espessas).

5.2.4 Membranas modificadas com PVA:

Sumariamente, em relação aos valores dos fluxos para as diferentes membranas testadas, como era de esperar, atingiram-se valores mais elevados deste parâmetro para as membranas finas comparativamente às membranas espessas. Equiparando-se as membranas de CB modificadas com as diferentes concentrações de PVA, concluiu-se que as amostras com 1% de PVA são as que possuem valores de fluxo superiores, seguidas das membranas com 3% de PVA e por último as membranas com 5%. As membranas de CB não modificadas apresentam valores de fluxo ligeiramente inferiores às membranas funcionalizadas com 5% PVA.

Tal situação consolida a conclusão retirada através da observação das imagens de SEM das amostras com diferentes concentrações de PVA. Assim, confirma-se que a incorporação de PVA, em baixas percentagens, favorece o aumento da porosidade da matriz, daí os valores elevados de fluxo para as membranas com 1% de polímero; enquanto concentrações mais elevadas fomentam a agregação do polímero e conseqüentemente um ligeiro decréscimo da porosidade da matriz, o que leva a uma diminuição dos valores de fluxo, exibido pelas membranas com 5% de PVA. Os valores obtidos mostram que mesmo assim estas membranas possuem uma porosidade superior às membranas de CB puras.

Na *Tabela 13* encontram-se organizados os valores relativos à quantidade de BSA retida e eluída das membranas de CB modificadas com diferentes percentagens de PVA (mg BSA / g celulose).

Pela análise dos resultados exibidos e relativamente à percentagem de 1% de PVA, verifica-se que esta é a percentagem que possui valores de capacidade de ligação mais elevados (19,60 mg/g).

No que diz respeito à percentagem de 3%, os resultados mostram que os valores obtidos para a membrana espessa são superiores aos valores atingidos para a membrana fina. O mesmo acontece para a percentagem de 5%, em que a quantidade de proteína retida na membrana espessa é aproximadamente o dobro da adsorvida na membrana fina. Assim, embora para estas duas percentagens

de PVA se possa afirmar que as membranas espessas retêm mais proteína do que as finas, tal situação não é totalmente apoiada pelo resultado da membrana fina modificada com 1%, uma vez que este é muito superior aos das outras duas percentagens. Para apoiar esta teoria seria necessário efetuar um ensaio com uma membrana espessa de 1%, e que os valores alcançados fossem superiores aos obtidos com a membrana fina.

Tabela 13 - Massa final das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as diferentes percentagens de PVA utilizadas

Membranas CB - PVA	Massa membrana (mg)	Quantidade BSA retida na membrana (mg/g)	Quantidade BSA eluída na lavagem (mg/g)
Membranas finas			
1% PVA	25,6	19,60	-
3% PVA	30,9	6,88	-
5% PVA	24,9	6,83	-
Membranas espessas			
3% PVA	62,4	14,42	-
5% PVA	74,7	13,13	0,48

Equiparando globalmente os resultados obtidos concluiu-se que as membranas com maior capacidade de retenção de BSA são as modificadas com 1% de PVA, seguidas das amostras com 3% e 5%, que possuem valores idênticos. Deste modo, pode aferir-se que quanto maior a concentração de PVA utilizada, menor a quantidade de BSA retida nas amostras.

Em relação à BSA eluída das membranas com a solução de lavagem só foi possível quantificar a proteína num dos ensaios realizados, não sendo por isso possível indicar um valor aproximado da quantidade de BSA removida por massa de celulose.

Comparando os resultados da tabela acima apresentada com os atingidos para as membranas de CB puras pode-se aferir que quer para as membranas finas, como para as espessas, os valores destes ensaios são substancialmente inferiores. Para o caso das membranas finas, a incorporação de PVA levou a uma diminuição de cerca de 90,27% da quantidade de BSA adsorvida, comparativamente com a CB não modificada, enquanto que para as membranas espessas a retenção de BSA decresceu apenas 46,84%.

Em suma, concluiu-se que a incorporação de PVA nas membranas de CB, independentemente da sua concentração, não fomenta a adsorção de proteínas, como a BSA, na sua matriz, o que está de acordo com o descrito por Leonard e colaboradores [117], Barret e colaboradores [93], e ainda Zhang e colaboradores [118]. Embora o substrato usado não tenha sido a CB - mas sim o poliestireno, no caso do

artigo de Leonard e Barret; e o polipropileno no artigo de Zhang - estes artigos consolidam os resultados e as conclusões retiradas dos ensaios deste projeto. Assim, concluiu-se não só que a incorporação do PVA diminui a quantidade de BSA adsorvida, mas também que com um aumento da concentração deste polímero a porção de proteína retida é ainda menor.

5.3 Ultrafiltração e Reutilização das membranas de CB modificadas pela ligação com F3GA:

Como referido no capítulo anterior, nestes ensaios foram testadas várias concentrações de corante e dois tipos de espessura de membranas.

De uma forma análoga ao efetuado na secção anterior deste capítulo, para uma melhor compreensão e uma consulta mais rápida, esta secção irá ser dividida de acordo com a concentração de corante utilizada, e dentro desta consoante a massa das amostras.

5.3.1 Membranas modificadas com F3GA (C = 0,015 mg/mL):

Para esta concentração de corante foram realizados três ensaios de ultrafiltração independentes. No primeiro e segundo foram utilizadas membranas espessas, enquanto no terceiro usou-se uma membrana fina.

5.3.1.1 Membranas espessas:

Para os dois primeiros ensaios foram utilizadas duas membranas com uma massa de 50,3 mg e 49,3 mg, respetivamente.

Na *Figura 42 a)* está representada a quantidade de BSA, presente no permeado, para o ciclo de adsorção e de eluição, dos dois ensaios realizados.

Após uma análise do gráfico concluiu-se que o perfil de adsorção da BSA é idêntico aos das membranas de CB não modificadas e modificadas com PVA. A semelhança no comportamento destas membranas estende-se igualmente à saturação da matriz, que analogamente ao que ocorre para as membranas com 5% e 3% de PVA, atingem a saturação após a ultrafiltração de 3/4 mL de solução de proteína. O perfil de eluição da proteína é igualmente idêntico ao das membranas anteriormente estudadas, embora pareça possuir valores ligeiramente superiores.

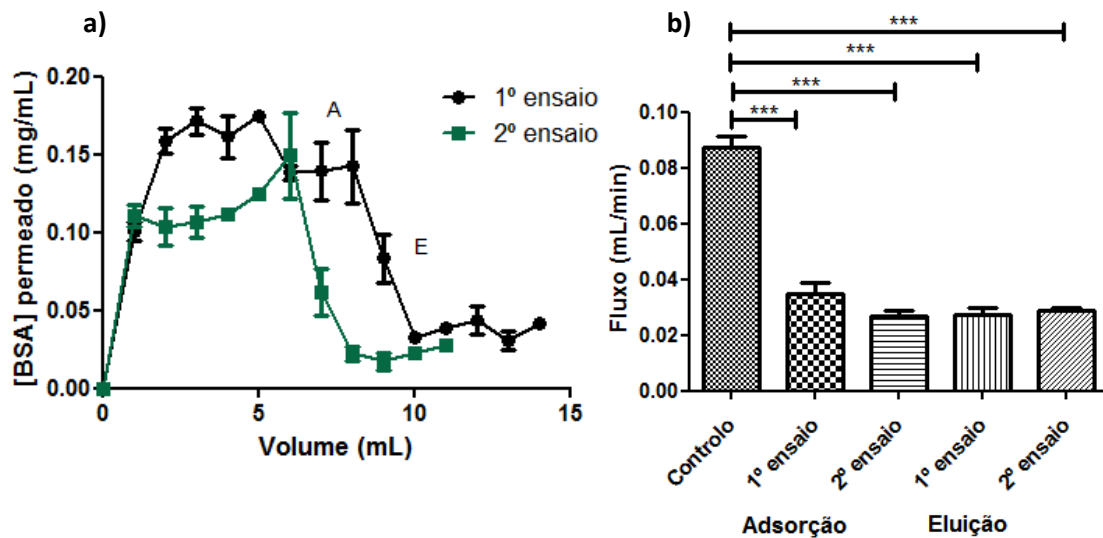


Figura 42 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/m; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controlo: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Enquanto no primeiro ensaio a membrana modificada conseguiu reter cerca de 11,78% da BSA, no segundo ensaio ficou retida na membrana apenas 7,1% da proteína total ultrafiltrada. Para ambos os ensaios não se conseguiu quantificar a proteína eluída após a ultrafiltração com a solução de lavagem, pelas razões já referidas.

O gráfico *b)* compara os fluxos das soluções de proteína e de lavagem para ambos os ensaios de ultrafiltração. Após análise estatística verifica-se que os fluxos das soluções de proteína e de lavagem, para ambos os ensaios realizados, são idênticos entre si, diferindo apenas da solução de controlo. Por ordem decrescente do valor da média do fluxo tem-se a solução de PBS (0,09 mL/min), a solução de BSA do primeiro ensaio (0,035 mL/min), e seguidamente todas as restantes soluções com um valor de aproximadamente 0,03 mL/min.

Estes valores de fluxo são inferiores aos atingidos com as amostras modificadas com 1%,3% e 5% de PVA, para o caso das membranas finas e espessas, e ainda com as amostras de CB finas não modificadas.

5.3.1.2 Membrana fina:

Ainda para esta concentração de corante foi realizado um terceiro ensaio, utilizando uma membrana com uma massa de 20,5 mg.

A quantidade de BSA, presente no permeado, para o ciclo de adsorção e de eluição está representada na *Figura 43 a)*.

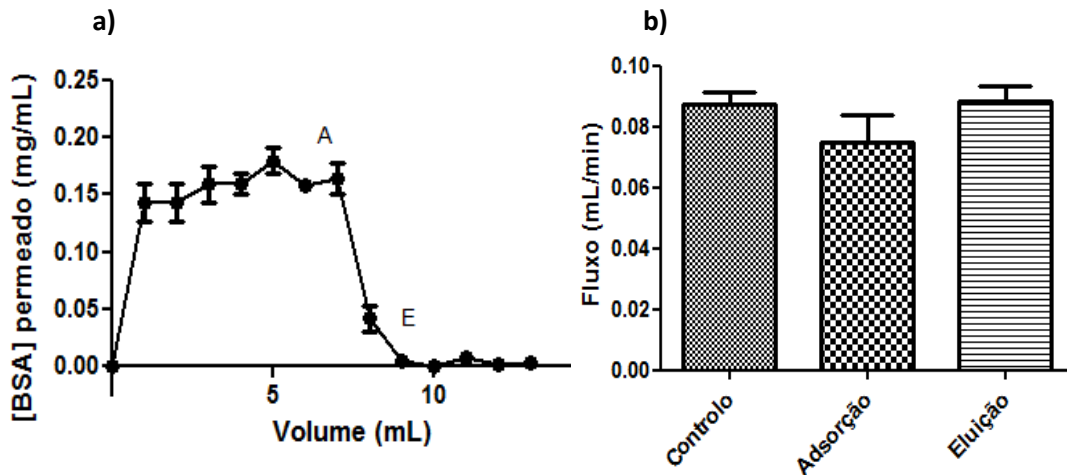


Figura 43 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl.

O perfil de adsorção da BSA, representado no gráfico, é análogo ao da *Figura 42*, apenas diferindo na saturação da membrana, que é atingida mais cedo, por volta dos 2/3 mL. O perfil de eluição é igualmente semelhante, embora possua valores significativamente inferiores.

Para este ensaio, a membrana de CB modificada com F3GA reteve cerca de 11,06% da BSA total ultrafiltrada, sendo que a ultrafiltração com a solução de PBS + NaCl conseguiu eluir aproximadamente 38,23 % da BSA retida na membrana.

A observação do gráfico *b)* leva a afirmar que os fluxos são idênticos entre si, sendo que o que possui maior valor de média é o da solução de NaCl (0,095 mL/min), seguido do da solução de PBS e por fim, o da solução de BSA (0,075 mL/min).

Como era de esperar, os valores dos fluxos alcançados neste ensaio são superiores aos do ensaio anterior, uma vez que a membrana aqui utilizada possui uma espessura menor. Adicionalmente, estes valores são inferiores aos atingidos para as amostras de 1% de PVA, para as membranas finas e espessas, e ainda para as amostras 3% de PVA, no caso das membranas finas.

5.3.2 Membranas modificadas com F3GA (C = 0,075 mg/mL):

Para esta concentração de corante realizaram-se dois ensaios utilizando-se em ambas membranas espessas. Numa fase posterior efetuaram-se ensaios de reutilização das membranas modificadas, usando mais uma vez membranas espessas.

5.3.2.1 Membranas espessas:

Para os dois ensaios efetuados inicialmente usaram-se duas membranas com uma massa de 55,2 mg e 52,1 mg.

A quantidade de BSA, presente no permeado, para o ciclo de adsorção e de eluição, para os dois ensaios realizados, está representada na *Figura 44 a)*.

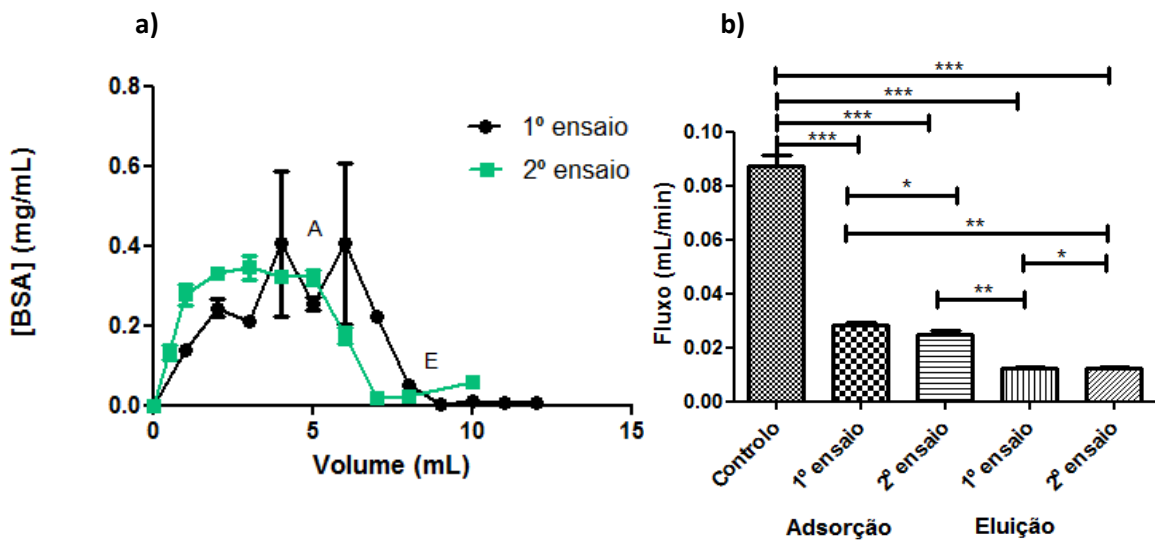


Figura 44 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,075 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Examinando o gráfico pode-se afirmar que o perfil de adsorção da BSA é análogo aos das membranas modificadas com F3GA, para a concentração de 0,015 mg/mL. A saturação destas membranas é atingida após a ultrafiltração de 3 mL de solução de proteína. O perfil de eluição é equitativamente idêntico ao das membranas previamente investigadas.

Quantitativamente, no primeiro e segundo ensaios, as membranas funcionalizadas retiveram cerca de 11,51% e 21,98% da BSA total ultrafiltrada, respetivamente. Após ultrafiltração da solução de PBS + NaCl, conseguiu-se eluir 27,3% e 56,4% da BSA inicialmente retida nas membranas, para o caso do primeiro e segundo caso.

A *Figura 44 b)* representa o fluxo das soluções de BSA e NaCl, destacando-se duas situações: os fluxos das duas soluções de BSA são significativamente diferentes, o mesmo ocorrendo para as soluções de NaCl. A solução com maior valor de fluxo é a solução de PBS, seguida da solução de BSA para o primeiro ensaio (0,03 mL/min), seguida de muito perto pela solução de BSA do segundo ensaio (0,025 mL/min), e por último as duas soluções de NaCl (0,01 mL/min).

Os valores dos fluxos destes ensaios só superam os alcançados com as amostras espessas não modificadas de CB.

5.3.2.2 Reutilização das membranas modificadas:

À semelhança do que foi realizado com as amostras de CB não modificadas, investigou-se o potencial de reutilização das membranas de CB funcionalizadas com F3GA, ou seja, a capacidade de ligação da BSA na matriz ao longo de três ciclos de adsorção e eluição da proteína. Os resultados obtidos relativamente a estes ensaios, onde se utilizou uma membrana com uma massa de 47,7 mg, estão representados na *Figura 45 a)*, que representa o perfil de adsorção e de eluição da proteína.

Pela observação da figura pode-se aferir que os perfis são idênticos para os três ensaios efetuados, o que desde já valida a ideia de estabilidade e reutilização da membrana. Adicionalmente, estes perfis não diferem do das membranas não modificadas e modificadas até aqui estudadas. Como seria de esperar a saturação é atingida por volta dos 3 mL de solução, tal como nas membranas anteriormente descritas, com a mesma concentração de corante.

No caso do primeiro, segundo e terceiro ciclos, ficou retida na membrana modificada cerca de 11,5%, 11,8% e 15,5 % da BSA total ultrafiltrada. Após ultrafiltração com a solução de PBS + NaCl conseguiu-se eluir cerca de 98,30%, 94,38% e 73,23% da BSA retida, para o caso do primeiro, segundo e terceiro ciclo, respetivamente.

Relativamente ao fluxo da solução de BSA e da solução de lavagem, a comparação entre os três ensaios realizados está representada na *Figura 45 b)*.

Após análise estatística conclui-se que nenhum dos fluxos das soluções de BSA e de NaCl são significativamente diferentes entre si, possuindo todos uma média de aproximadamente 0,0195 mL/min. Como seria de esperar os valores dos fluxos destes ensaios de reutilização são parecidos com os alcançados nos ensaios realizados na secção 5.3.2.1., onde as condições experimentais utilizadas foram

as mesmas. Adicionalmente, estes valores são também análogos aos obtidos nos ensaios onde se utilizaram membranas espessas de CB não modificadas.

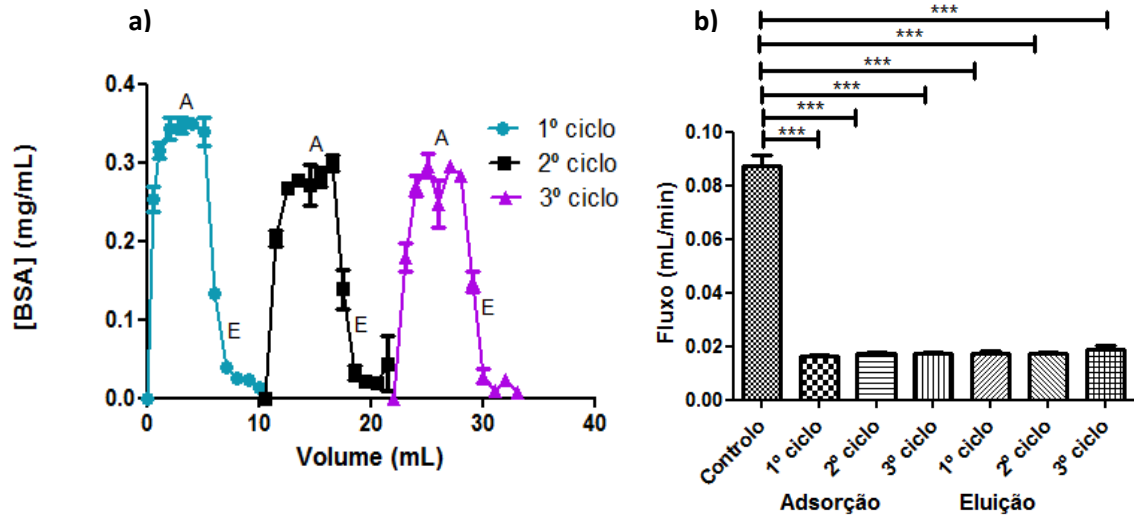


Figura 45 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) da BSA, para cada um dos três ensaios de reutilização realizados. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/m; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de P <0.05; ** P <0.01 e *** P <0.001. significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Na *Figura 46* apresentam-se os valores relativos à quantidade cumulativa de BSA retida (*a*) e eluída (*b*) da membrana de CB funcionalizada, para cada uma dos ciclos de reutilização.

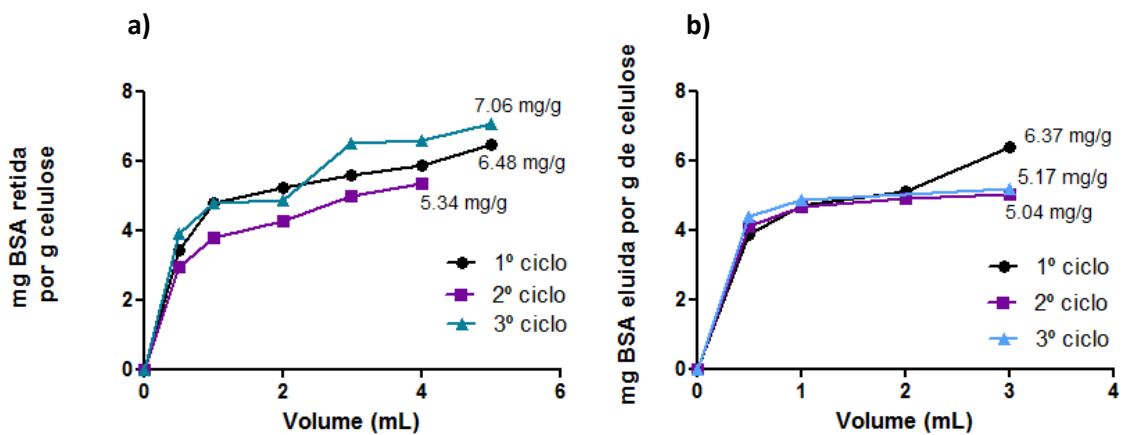


Figura 46 – Valores cumulativos relativos à quantidade de BSA total (mg/g) **a)** retida e **b)** eluída da membrana de CB reutilizada, em função do volume, para cada um dos três ensaios.

Diversos estudos já foram realizados no campo da reutilização de várias membranas funcionalizadas com F3GA, utilizando-se na grande maioria delas proteínas albuminas séricas, como proteínas modelo [9, 16,74, 76, 103,110].

Como se pode observar pelo gráfico *a)*, ao contrário do que a *Figura 45* transparecia, não existe uma relação linear entre a quantidade de BSA retida na matriz e o avançar dos ciclos de adsorção, uma vez que por ordem decrescente de BSA adsorvida na matriz tem-se o 3º ciclo, seguido do 1º e por último o 2º ciclo de adsorção.

Relativamente ao gráfico *b)*, verifica-se novamente a ocorrência desta irregularidade nos valores uma vez que o valor máximo eluído é de 6,37 mg/g para o primeiro ciclo, seguido do terceiro e só depois o segundo ciclo de eluição.

Tais irregularidades nos perfis de adsorção e eluição estão de acordo com o descrito por alguns autores, tais como, Ma e colaboradores [16, 76] e Miyauchi e colaboradores [74].

Em termos quantitativos, os resultados obtidos nestes ensaios são inferiores aos relatados por Ma e colaboradores [76] (22 mg/g, 16 mg/g e 19 mg/g), e por Miyauchi e colaboradores [74], e superiores quando comparados com os obtidos por Ma e colaboradores num outro artigo [16].

Esta relação não linear entre a quantidade de BSA retida e eluída da membrana e o avançar dos ciclos de reutilização deve-se à falta de uniformidade e homogeneidade da membrana de CB, tal como discutido anteriormente, e ao pouco controlo da alimentação das soluções de proteína e de eluição.

Outro ponto a destacar da análise da *Figura 46*, é que após todos os ciclos de eluição só ficaram cerca de 2,3 mg/g de BSA retidos na membrana, valor muito reduzido comparando com os ensaios de reutilização realizados para a CB não modificada (250,57 mg/g). Assim, estes valores de eluição contestam os resultados até aqui atingidos, que afirmavam que a solução de PBS + NaCl não era eficaz na remoção da proteína. Estes novos resultados estão em concordância com os valores descritos por Ma e colaboradores [76] (80%) e por Miyauchi e colaboradores [74]. De notar, todavia, que esta argumentação é especulativa, na medida em que o número de ensaios realizados foi reduzido.

Em suma, pode-se concluir que, tal como as amostras de CB não modificadas, as membranas de CB funcionalizadas com F3GA têm potencial de reutilização, embora a quantidade de proteína adsorvida seja irregular. Outra conclusão a apontar é a eficácia na eluição das proteínas retidas na matriz, da solução de lavagem de PBS + NaCl.

5.3.3 Membranas modificadas com F3GA (C = 0,15 mg/mL):

Para esta concentração de corante efetuou-se apenas um ensaio, onde se utilizou uma membrana espessa.

5.3.3.1 Membrana espessa:

Neste ensaio foi utilizada uma membrana com uma massa de 54,1 mg.

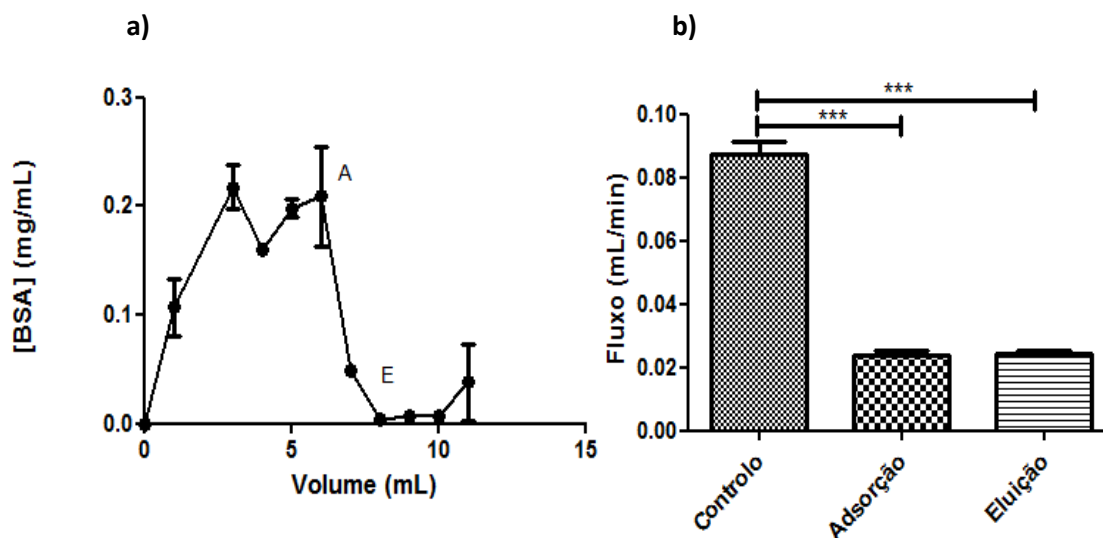


Figura 47 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 0,15 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Observando a *Figura 47 a)*, concluiu-se que os perfis de adsorção e de eluição da BSA são semelhantes aos obtidos nos ensaios realizados até agora. Apesar de um pouco irregular, a saturação desta membrana funcionalizada, é obtida no 3/4 mL de solução, tal como ocorreu para as outras membranas modificadas com F3GA.

Para este ensaio, a amostra reteve cerca de 26,76% da BSA total ultrafiltrada, e a solução de eluição foi capaz de remover cerca de 15,14% da BSA retida na matriz.

Relativamente ao fluxo da solução de proteína e NaCl (*Figura 47 b)*, verifica-se que estes são estatisticamente idênticos, tendo ambos uma média de 0,025 mL/min.

Os valores dos fluxos obtidos nestes ensaios só superam os alcançados para as amostras espessas de CB não modificadas e as amostras de CB espessas modificadas com F3GA, para a concentração de 0,075 mg/mL.

5.3.4 Membranas modificadas com F3GA:

Relativamente aos valores dos fluxos atingidos para as diferentes membranas testadas, como era de esperar, este parâmetro atingiu valores mais elevados para o caso das amostras finas, comparativamente às amostras espessas.

Equiparando-se as membranas de CB funcionalizadas com as diferentes concentrações de F3GA, concluiu-se que as membranas modificadas com 0,015 mg/mL de corante são as que possuem valores de fluxo superiores, seguidas as membranas com 0,075 mg/mL e por último, mas com valores muito próximos dos anteriores, as amostras modificadas com 0,15 mg/mL. As membranas de CB não modificadas apresentam valores de fluxo muito semelhantes aos das membranas modificadas com 0,15 mg/mL de corante. Assim, de uma forma geral, pode-se afirmar que com o aumento da concentração inicial do corante, os valores dos fluxos através das amostras vão diminuindo.

Tal situação consolida a conclusão retirada através da observação das imagens de SEM das amostras com diferentes concentrações de F3GA (*Figuras 27 e 28*). Confirma-se assim que a ligação do corante favorece o aumento da porosidade da matriz, sendo que este aumento é mais acentuado para as concentrações mais baixas, daí os valores de fluxo mais elevados para as membranas funcionalizadas com 0,015 mg/mL. Para concentrações mais elevadas este aumento é equilibrado com a formação de agregados de corante na superfície da matriz o que conseqüentemente leva a um ligeiro decréscimo na porosidade das amostras, e à inevitável diminuição dos valores de fluxo, exibido pelas membranas modificadas com 0,15 mg/mL. Os valores obtidos mostram que mesmo assim, em geral, estas membranas possuem uma porosidade ligeiramente superior às membranas de CB puras.

Comparando estas membranas com as modificadas com PVA, concluiu-se que os valores obtidos para as últimas são, em todos os casos, superiores às membranas modificadas com F3GA, exceto para as amostras finas com 5% PVA, concluindo-se assim que as membranas com PVA incorporado possuem uma porosidade maior do que as membranas modificadas com corante.

Na *Tabela 14* encontram-se organizados os valores relativos à quantidade de BSA retida e eluída das membranas de CB modificadas com diferentes concentrações de F3GA.

Pela análise dos valores apresentados na tabela e relativamente às concentrações de 0,015 mg/mL e 0,075 mg/mL, os valores obtidos nos dois ensaios das amostras espessas são muito díspares entre si. Considerando os valores dos restantes ensaios decidiu-se excluir, para efeitos de cálculo, os valores mais baixos (3,19 mg/g e 4,22 mg/g).

É provável que a falta de reprodutibilidade nestes e noutros ensaios esteja associada à heterogeneidade das membranas produzidas. Cada poço corresponde a uma cultura em estado estacionário individualizada. Os efeitos de formação de agregados iniciais e posterior coalescência na forma de filme ou película, discutidos anteriormente, serão igualmente únicos (em cada poço obtém-se globalmente uma película fina mas aleatoriamente terá regiões mais densas e mais finas de fibras entrecruzadas).

Tabela 14 – Massa das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as diferentes concentrações de F3GA

Membranas de CB - F3GA (mg/mL)	Massa membrana (mg)	Quantidade BSA retida na membrana (mg/g)	Quantidade BSA eluída na lavagem (mg/g)
Membranas espessas			
C = 0,015	50,3	13,56	-
C = 0,015	49,3	3,19	-
C = 0,075	55,2	4,22	1,16
C = 0,075	52,1	11,08	6,25
C = 0,15	54,1	12,15	1,84
Membranas finas			
C = 0,015	20,5	27,19	10,40

Para a concentração de 0,015 mg/mL existe uma diferença entre a quantidade de BSA retida por massa de celulose entre as amostras finas e espessas, tendo as primeiras alcançado valores superiores. Uma vez que não se realizaram mais ensaios com amostras finas para confirmar esta situação, nada se pode concluir. Apenas se pode referir que os resultados da *Tabela 13*, mostram exatamente o oposto, isto é, que as membranas espessas possuem uma capacidade de retenção de BSA superior às finas.

Observando os resultados obtidos de uma forma geral verifica-se que não existe uma relação linear entre o aumento da concentração inicial de corante, e o incremento da quantidade de proteína retida nas amostras, uma vez que da concentração de 0,015 mg/mL para a de 0,075 mg/mL ocorre uma diminuição da capacidade de retenção, no entanto, desta última concentração para a de 0,15 mg/mL ocorre um aumento. A única conclusão que se pode retirar é que a membrana com maior capacidade de retenção de BSA é a funcionalizada com 0,015 mg/mL de F3GA, sendo por isso, aparentemente, esta a concentração que melhor fomenta a ligação de proteínas na matriz de CB.

Em relação à BSA eluída das membranas, os resultados obtidos foram novamente irregulares, obtendo-se valores de 27,49% e 56,41% para a concentração de 0,075 mg/mL e ainda valores de 15,14% e 38,25% para as concentrações de 0,15 e 0,015 mg/mL, respetivamente.

Quantitativamente, comparando os resultados destes ensaios com os obtidos na *Tabela 13*, para as membranas modificadas com PVA, concluiu-se que para as amostras espessas os valores obtidos são sensivelmente iguais, enquanto para as amostras finas as membranas funcionalizadas com F3GA parecem possuir uma capacidade de retenção maior.

Equiparando os resultados da tabela acima apresentada com os atingidos para as membranas de CB puras, pode-se concluir que quer para as membranas finas, como para as espessas, os valores destes ensaios são substancialmente inferiores, devido à diminuição da BSA adsorvida na matriz, pois o F3GA

fomenta a ligação específica da BSA. De um modo geral, verifica-se uma diminuição da capacidade de retenção da BSA de 52,67% e de 76,16% para as membranas espessas e finas, respetivamente, comparativamente às amostras de CB não modificadas.

Realizando-se uma equiparação entre os resultados apresentados na tabela e os obtidos por alguns autores, verifica-se que não existe uma concordância total entre uns e outros. Enquanto Miyauchi e colaboradores [74], obtêm valores muito acima dos aqui atingidos (230 mg/g BSA adsorvida e 90% proteína eluída), Ma e colaboradores [16,76], em relação à quantidade de BSA capturada atingiram valores inferiores, mas relativamente à eluição alcançaram valores superiores (ordem dos 70%).

Em suma, concluiu-se que a ligação do F3GA nas membranas de CB, independentemente da sua concentração, diminui a capacidade de adsorção inespecífica da BSA, aumentando no entanto a ligação específica desta à matriz de CB, daí os valores decrescerem. Muitos estudos já foram realizados para avaliar o potencial do F3GA como ligando para a captura de diversas proteínas, todos eles mostrando que após a incorporação do corante, a capacidade de retenção aumenta significativamente. [11, 105,110, 119,120]

5.4 Ultrafiltração das membranas de CB modificadas pela incorporação de PVA e ligação do F3GA:

Nesta secção as amostras serão divididas consoante a percentagem de PVA incorporado, uma vez que a concentração de F3GA usada foi igual para todos os ensaios ($C = 0,015 \text{ mg/mL}$).

5.4.1 Membranas modificadas com 1% de PVA e F3GA ($C = 0,015 \text{ mg/mL}$):

Para estas condições experimentais foram realizados dois ensaios de ultrafiltração independentes, utilizando-se membranas com diferentes espessuras.

5.4.1.1 Membrana espessa:

No primeiro ensaio realizado foi utilizada uma membrana com uma massa, após modificação, de 56,9 mg.

Após uma análise do gráfico da *Figura 48 a)*, que representa o perfil de adsorção e de eluição da BSA, concluiu-se que o perfil de adsorção é idêntico aos das amostras modificadas com 1% de PVA e modificadas com 0,015 mg/mL de F3GA. A semelhança no comportamento estende-se igualmente à

saturação da matriz, que analogamente ao que ocorre para as membranas previamente referidas, atinge a saturação após a ultrafiltração de 3 mL de solução de proteína. O perfil de eluição da proteína é igualmente idêntico ao das membranas anteriormente estudadas.

Neste caso, a membrana modificada com PVA e F3GA reteve cerca de 54,15% da BSA total ultrafiltrada, conseguindo-se posteriormente eluir aproximadamente 7,41% da BSA retida.

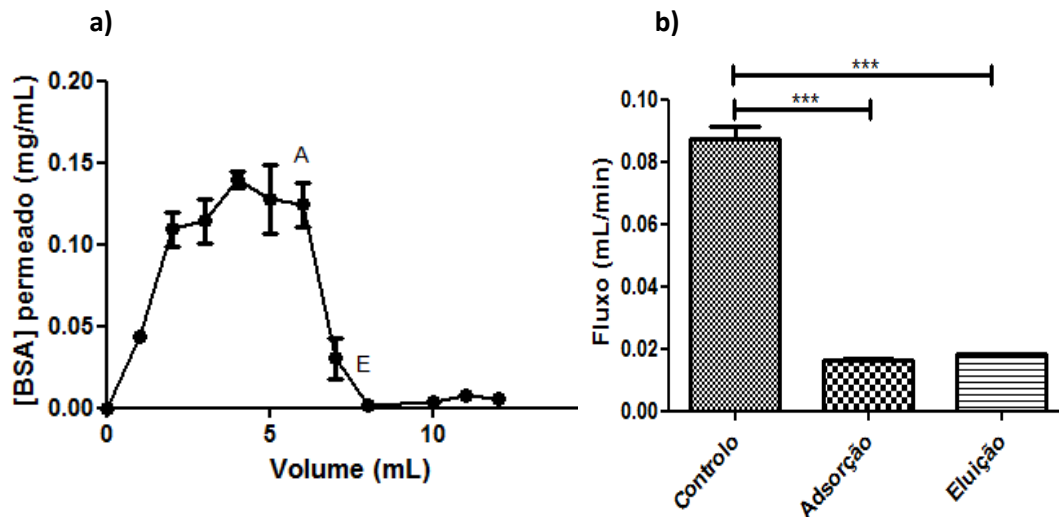


Figura 48 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 1% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Após análise estatística dos fluxos das soluções de BSA e de lavagem, gráfico *b)*, verifica-se que estes são idênticos entre si, apenas diferindo em relação à solução de controle. A média do fluxo da solução de NaCl é de 0,02 mL/min e a da solução de BSA é de 0,0195 mL/min.

Comparando com os valores de fluxo atingidos para as membranas modificadas com 1% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA, previamente estudados, estes valores são inferiores.

5.4.1.2 Membrana fina:

Já no caso do segundo ensaio efetuado, utilizou-se uma membrana com uma massa final de 21,8 mg. Após a observação do gráfico da *Figura 49 a)*, que representa a quantidade de BSA, presente no permeado, para o ciclo de adsorção e de eluição, concluiu-se que o perfil de adsorção da BSA é idêntico

ao da *Figura 48 a)*. A saturação da membrana é atingida após a ultrafiltração de 2/3 mL de solução de proteína. O perfil de eluição é igualmente idêntico ao das membranas anteriormente estudadas.

Neste segundo caso, a membrana modificada com PVA e F3GA foi capaz de reter apenas 8,86% da BSA total ultrafiltrada, conseguiu-se posteriormente eluir aproximadamente 50,52% da BSA retida.

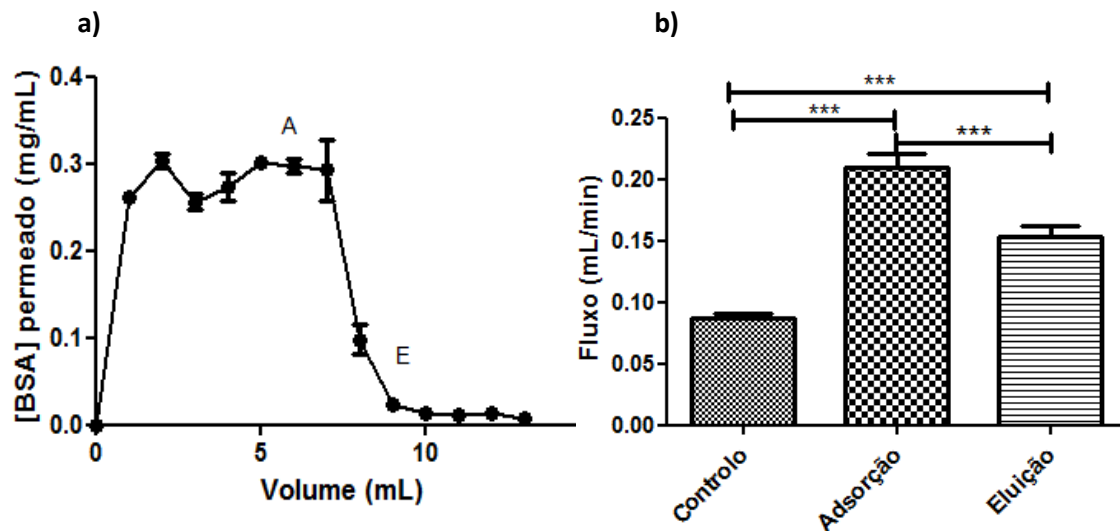


Figura 49 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 1% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Após a análise estatística apresentada no gráfico *b)*, verifica-se que os fluxos das soluções de proteína e de lavagem são significativamente diferentes. O valor da média para as soluções de BSA e NaCl são, respetivamente, 0,2 mL/min e 0,155 mL/min. Como era de esperar os valores alcançados neste ensaio são superiores aos do ensaio anterior, devido à espessura mais fina da membrana, o que consequentemente aumenta a facilidade com que a solução atravessa a matriz.

Comparando com os valores de fluxo atingidos para as membranas finas modificadas com 1% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA, previamente estudados, estes valores são significativamente superiores.

5.4.2 Membranas modificadas com 3% de PVA e F3GA (C = 0,015 mg/mL):

Para estas condições experimentais foi realizado um único ensaio de ultrafiltração, no qual se utilizou uma membrana espessa.

5.4.2.1 Membrana espessa:

A massa da membrana usada neste ensaio foi de 56,6 mg.

Depois da análise do gráfico da *Figura 50 a)*, que representa a quantidade de BSA, presente no permeado, para o ciclo de adsorção e de eluição, concluiu-se que o perfil de adsorção da BSA é idêntico aos das amostras modificadas com 3% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA. A semelhança no comportamento destas membranas estende-se igualmente à saturação da matriz, que analogamente ao que ocorre para as membranas previamente referidas, atingem a saturação após a ultrafiltração de 2/3 mL de solução de proteína. O perfil de eluição é igualmente idêntico ao das membranas anteriormente estudadas.

Para este caso a membrana modificada com o polímero e o corante reteve cerca de 40,98% da BSA total ultrafiltrada, conseguindo-se posteriormente eluir aproximadamente 10,71% da BSA retida.

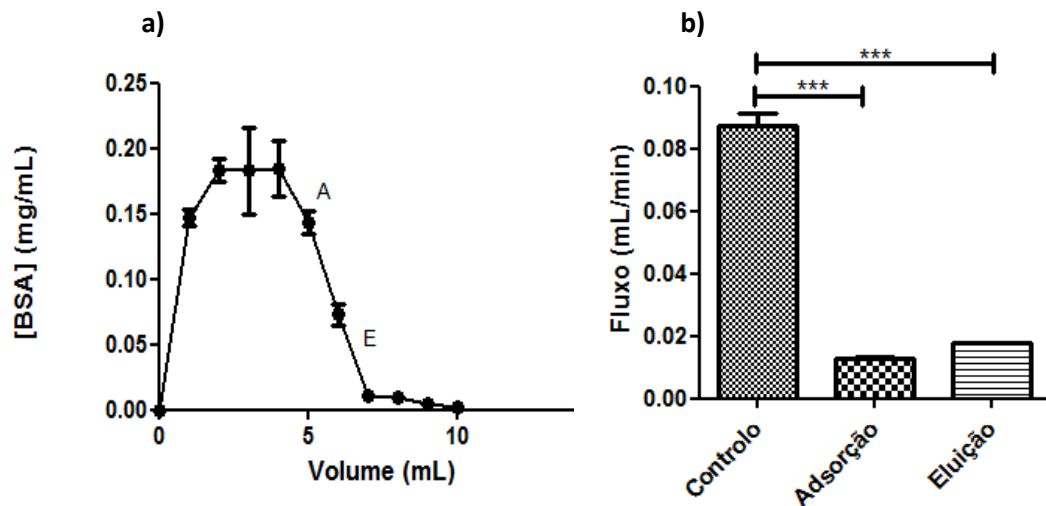


Figura 50 - a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 3% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Após análise estatística dos fluxos das soluções de BSA e NaCl, gráfico *b)*, verifica-se que estes são idênticos entre si, apenas diferindo em relação à solução de controlo. A média do fluxo da solução de NaCl é de 0,0195 mL/min e a da solução de BSA é de 0,0190 mL/min.

Comparando estes valores com os atingidos para as membranas modificadas com 3% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA, previamente estudados, estes valores são muito inferiores.

5.4.3 Membranas modificadas com 5% de PVA e F3GA (C = 0,015 mg/mL):

Para estas condições experimentais foi realizado um ensaio de ultrafiltração utilizando uma membrana espessa.

5.4.3.1 Membrana espessa:

Assim, no único ensaio efetuado usou-se uma membrana com uma massa final de 59,1 mg.

Depois de uma análise do gráfico da *Figura 51 a)*, que representa o perfil de adsorção e de eluição da BSA, concluiu-se que o perfil de adsorção é idêntico aos das amostras modificadas com 5% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA. A saturação da membrana foi atingida após a ultrafiltração de 3 mL de solução de proteína. O perfil de eluição da proteína é igualmente idêntico ao das membranas anteriormente estudadas.

Neste caso a membrana modificada com o polímero e o corante reteve apenas 11,88% da BSA total ultrafiltrada, conseguindo-se posteriormente eluir, com a solução de lavagem, aproximadamente 50,83% da BSA retida.

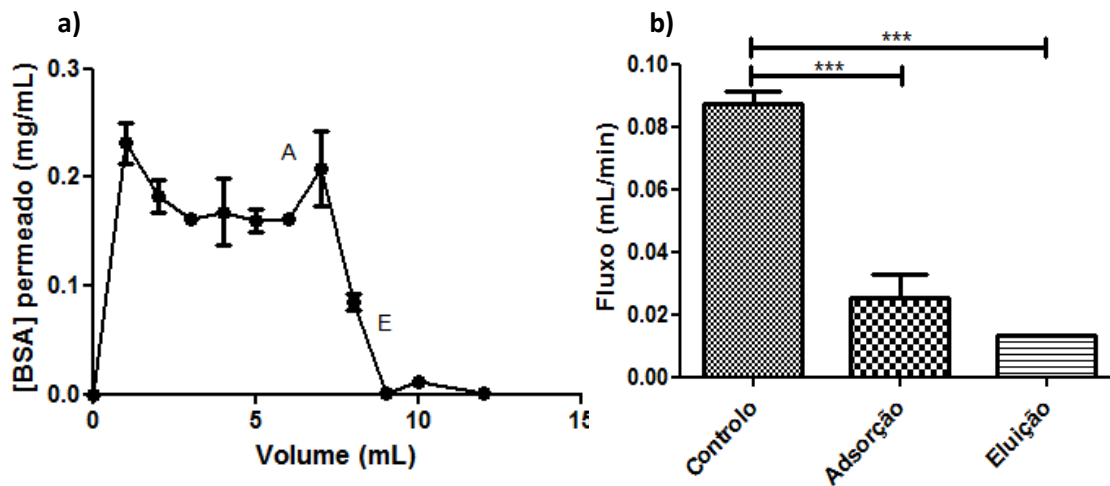


Figura 51 – a) Perfil de adsorção (A) e de eluição (E) para a membrana com 5% PVA e 0,015 mg/mL de F3GA. Quantificação da BSA presente no permeado em mg/mL; **b)** Comparação dos fluxos (mL/min); Controle: Solução PBS; Adsorção: solução PBS + BSA; Eluição: solução PBS + NaCl; onde * corresponde a um valor de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, significando assim ordem crescente de valor de diferença significativa.

Após análise estatística dos fluxos das soluções de BSA e NaCl (gráfico *b*), verifica-se que estes são idênticos entre si, apenas diferindo em relação à solução de controlo. A média do fluxo da solução de NaCl é de 0,015 mL/min e a da solução de BSA é de 0,025 mL/min. Comparando estes valores com os atingidos para as membranas modificadas com 5% de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA, previamente estudados, estes são muito inferiores.

5.4.4 Membranas modificadas com PVA e F3GA:

Sumariamente, no que diz respeito aos valores dos fluxos atingidos para as diferentes membranas testadas, como era de esperar, e como foi verificada para todos os ensaios realizados, este parâmetro atingiu valores mais elevados para o caso das amostras finas, comparativamente às amostras espessas.

Equiparando-se as membranas espessas de CB funcionalizadas com as diferentes concentrações de PVA e 0,015 mg/mL de F3GA, concluiu-se que as amostras com 5% de PVA são as que possuem valores de fluxo superiores, seguidas das membranas com 1% de PVA e por fim as com 3%, contrariando o ocorrido nos ensaios com amostras modificadas somente com PVA, em que por ordem decrescente de valores de fluxo tinha-se 1% PVA, 3% e 5%. No entanto, os valores obtidos para os ensaios realizados nesta secção não diferem muito uns dos outros.

Adicionalmente, os valores obtidos para os fluxos são relativamente idênticos aos obtidos para as membranas de CB não modificadas.

Comparando os valores dos fluxos atingidos para as membranas funcionalizadas somente com PVA e somente com F3GA, já anteriormente estudadas, verifica-se que os resultados obtidos são, de uma forma geral, muito superiores aos alcançados nestas experiências. Deste modo, pode-se afirmar que embora em separado, estes dois reagentes fomentem o aumento da porosidade da matriz de CB, quando em conjunto, este aumento da porosidade em relação às amostras de CB não modificadas quase que não se verifica. Estes resultados consolidam a conclusão retirada da observação das imagens de SEM das amostras modificadas por estes dois procedimentos (*Figura 32*).

Na *Tabela 15* encontram-se os valores relativos à quantidade de BSA retida e eluída das membranas de CB modificadas com as diferentes concentrações de PVA e com 0,015 mg/mL de F3GA.

Tabela 15 - Massa final das membranas utilizadas (mg) e quantidade (mg/g) da BSA retida e eluída da matriz, para as várias amostras funcionalizadas

Membranas CB – PVA % – F3GA (0,015 mg/mL)	Massa membrana (mg)	Quantidade BSA retida na membrana (mg/g)	Quantidade BSA eluída na lavagem (mg/g)
Membranas espessas			
1% PVA	56,9	22,14	1,63
3% PVA	56,6	18,04	1,99
5% PVA	59,1	8,06	4,13
Membranas finas			
1% PVA	21,8	13,67	6,92

Pela observação da tabela acima apresentada, a primeira conclusão que se retira é que a espessura das membranas parece não influenciar a quantidade de proteína retida na matriz, uma vez que o único ensaio realizado com uma membrana fina enquadra-se perfeitamente nos valores obtidos para as membranas espessas.

Em termos quantitativos, verifica-se que estas amostras seguem o comportamento observado para as amostras modificadas somente com PVA. Deste modo, concluiu-se que por ordem decrescente de retenção de BSA (mg/g) temos as membranas modificadas com 1% de PVA e F3GA, seguidas das amostras com 3% e por fim as com 5%. Analogamente aos ensaios realizados só com incorporação de PVA, pode-se concluir que quanto maior a concentração de polímero utilizada, menor a quantidade de BSA retida nas amostras, e que por isso, a ligação das moléculas do corante parecem não influenciar a capacidade de adsorção da matriz com PVA.

Relativamente à BSA eluída da matriz, não se pode apontar um valor como média, uma vez que os resultados obtidos são bastantes díspares. Enquanto para as amostras modificadas com 1% e 3% de polímero obteve-se cerca de 7,36% e 11,03% de proteína eluída, para as concentrações de 5% e para a membrana fina de 1% atingiu-se cerca de 51,24% e 50,62%.

Comparando estes resultados com os obtidos para as amostras funcionalizadas isoladamente com PVA, verifica-se que para a concentração de 1% (19,60 mg/g) e 3% (14,42 mg/g) de polímero, os valores atingidos nestes ensaios são ligeiramente superiores, embora a diferença existente seja muito reduzida. Por outro lado, para a concentração de 5% (13,13 mg/g), nestas experiências atingiram-se valores ligeiramente inferiores, embora novamente as diferenças existentes não sejam significativas.

Equiparando agora os valores destes ensaios com as amostras espessas funcionalizadas somente com 0,015 mg/mL de F3GA, verifica-se que a média dos valores obtidos neste ensaio (16,08 mg/g) é ligeiramente superior aos resultados obtidos nos ensaios com o corante (13,56 mg/g). Já para o caso

das amostras finas, o valor obtido para os ensaios só com 0,015 mg/mL de corante (27,19 mg/g) é superior ao valor alcançado nestes ensaios (13,67 mg/g).

Assim, concluiu-se que esta modificação promove uma diminuição da adsorção inespecífica de BSA, comparativamente com as membranas de CB não modificadas, à semelhança dos outros procedimentos estudados. De um modo geral, nestes ensaios verifica-se uma diminuição da capacidade de retenção de BSA de 37,94% e de 88,01% para as membranas espessas e finas, respetivamente, comparativamente às amostras de CB não modificadas.

Em termos quantitativos, os resultados obtidos nestes ensaios estão em concordância com os descritos por Denizli e colaboradores [107] no que diz respeito à quantidade de BSA retida (15 mg/g), no entanto para a BSA eluída os valores alcançados por este autor são muito superiores (83-95%).

Por outro lado, segundo Büyüktuncel e colaboradores [105], a ligação das moléculas de F3GA deveriam ter aumentado a capacidade de ligação específica da matriz modificada com PVA.

6. Caracterização das membranas de celulose bacteriana:

Com o intuito de complementar o estudo até aqui realizado, determinaram-se as propriedades superficiais, térmicas e morfológicas das membranas de celulose bacteriana produzidas, utilizando sempre como controlo discos de CB pura.

6.1 Propriedades superficiais:

Um dos parâmetros importantes das membranas de afinidade é o seu carácter hidrofílico/hidrofóbico, que determina a sua interação com vários compostos e tem uma grande influência sobre a adsorção de proteínas na sua superfície.

A medição das propriedades superficiais das várias amostras de CB modificadas, com e sem proteína adsorvida, foi realizada através da medição dos ângulos de contacto formados na superfície do substrato por um líquido de referência polar, a água (*Tabela 16*). Esta determinação serve para avaliar, qualitativamente, as alterações da hidrofilicidade do substrato perante os vários cenários estudados.

Uma superfície hidrofóbica possui um ângulo de contacto com a água elevado, enquanto um substrato hidrofílico permite que a gota de água se espalhe e por isso tem um ângulo de contacto baixo. De acordo com van Oss e Giese [121], um ângulo de contacto, formado pela água, menor do que 50° corresponde a uma superfície com carácter hidrofílico. Observando os valores apresentados na tabela verifica-se que

todas as amostras de CB testadas são hidrofílicas (θ água $<50^\circ$), existindo no entanto algumas discrepâncias.

Tabela 16- Valores dos ângulos de contacto medidos com a água (θ água) para as várias amostras de CB investigadas neste projeto

	θ água ($^\circ$) \pm DP
CB	42,8 \pm 4,1
CB - BSA	46,2 \pm 6,2
CB - 1% PVA	32,4 \pm 7,4
CB - 1% PVA - BSA	43,95 \pm 4,7
CB - 5% PVA	32,53 \pm 11,4
CB - 5% PVA - BSA	44,87 \pm 4,1
CB - F3GA (C= 0,00375 mg/mL)	24,55 \pm 4,6
CB - F3GA (C= 0,15 mg/mL)	-
CB - F3GA (C= 0,525 mg/mL) - BSA	-
CB - 1% PVA - F3GA	17,77 \pm 0,6
CB - 1%PVA - F3GA - BSA	29,4 \pm 4,2
CB - 5% PVA - F3GA	32,8 \pm 6,1
CB - 5% PVA - F3GA - BSA	32,4 \pm 8,9

D.P. – Desvio Padrão; “-” amostras onde não foi possível medir ângulos de contacto

Em relação ao controlo - membranas de CB puras - embora se conclua que este seja hidrofílico, o que está em concordância com o descrito por Pértile [109] e Gardner [38], verifica-se que o valor obtido é significativamente superior ao relatado por estes autores - aproximadamente 27° .

Já para o caso das membranas funcionalizadas com PVA, os valores obtidos para ambas as concentrações do polímero (1% e 5%) são idênticos e estão de acordo com o descrito por Thomas e colaboradores [122]. Equiparando estes valores com o do controlo, regista-se uma diminuição de cerca de dez graus o que significa que estas amostras são mais hidrofílicas, ou seja, após a incorporação do PVA o carácter hidrofílico das membranas de CB aumentou.

No entanto, segundo Zhang e colaboradores [118], um aumento da concentração de PVA deveria equivaler a uma diminuição dos ângulos de contacto, situação esta não verificada nestes ensaios.

Relativamente ao F3GA, após a sua ligação na matriz de CB verifica-se um decréscimo bastante acentuado do ângulo de contacto medido. Esta diminuição, como já foi referido, é indicativa de um aumento da hidroflicidade do substrato, ou seja, analogamente ao ocorrido com o PVA, a imobilização do F3GA torna a CB ainda mais hidrofílica. O valor apresentado na tabela está plenamente de acordo com o descrito por Tamakhar e colaboradores [110], que obtiveram um ângulo de contacto, formado pela água numa amostra de CB funcionalizada com F3GA de 28° .

Equiparando os valores dos ângulos formados na matriz de CB após a funcionalização com PVA e F3GA, verifica-se que os valores obtidos para o segundo caso são inferiores aos do primeiro, isto é, a modificação com o F3GA torna a matriz de CB mais hidrofílica do que o PVA.

Por fim, analisando os valores obtidos para a matriz de CB funcionalizada com PVA e com F3GA, verifica-se novamente um decréscimo dos ângulos medidos, em relação à amostra controle. No entanto, os valores atingidos nestes dois ensaios são significativamente diferentes, embora em ambos se verifique um aumento da hidrofílicidade da matriz de CB. Enquanto um dos ensaios possui valores próximos dos medidos para as membranas somente com PVA (CB - 5% PVA - F3GA), o outro possui valores idênticos aos atingidos para as membranas apenas com F3GA (CB - 1% PVA - F3GA).

Em todos os casos, após a adsorção da BSA na superfície das diferentes amostras verifica-se um aumento dos ângulos de contato formados, que em alguns ensaios pode ser ignorado devido ao elevado desvio padrão apresentado. No entanto, embora se considere que as amostras permanecem hidrofílicas, este incremento da hidrofobicidade, que em alguns casos chega a atingir os dez graus, não está de acordo com o descrito por Windvoel [123], que reporta uma diminuição de cerca de 10 graus após a adsorção da BSA nos substratos.

Em suma, concluiu-se que os métodos de funcionalização introduziram modificações superficiais na CB, embora as alterações de hidrofílicidade tenham sido muito reduzidas.

Em geral, todas as amostras estudadas revelaram um carácter mais hidrofílico do que a CB pura, isto é, a incorporação de PVA e de F3GA fomentaram o aumento da hidrofílicidade da matriz de CB.

6.2 Propriedades térmicas:

A análise por TGA mede a variação de massa de uma amostra em função da temperatura, enquanto o método de DSC fornece informação sobre alterações térmicas que não envolvem mudanças na massa da amostra analisada.

Para avaliar algumas alterações nas propriedades físico-químicas e na estabilidade térmica das amostras de CB funcionalizadas, as propriedades térmicas destas amostras foram investigadas e estão representadas nas *Figuras 52 e 53*. As curvas de TG e DSC da CB pura estão também representadas para comparação.

Como se pode observar no gráfico da *Figura 52*, as curvas de TG das diferentes amostras, que fornecem informação sobre a perda de massa (mg) com a variação da temperatura, são praticamente idênticas entre si.

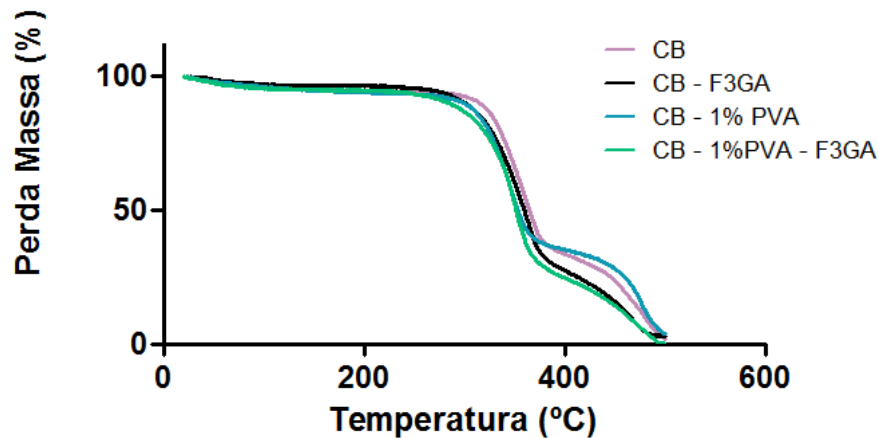


Figura 52 - Diagrama da análise termogravimétrica das amostras de CB, CB - F3GA, CB -1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.

Para todas as amostras, verifica-se a existência de três etapas distintas de perda de massa. Durante uma fase inicial - temperatura ambiente até aproximadamente 100 °C - existe uma pequena perda de massa relacionada com a evaporação das moléculas de água residual (proveniente do processo de secagem) fisicamente adsorvidas e fortemente ligadas por ligações hidrogénio à superfície das amostras. Uma segunda fase de 220 °C até 380 °C, onde as amostras sofrem uma acentuada perda de massa, que pode ser explicada pela combustão com consequente degradação da celulose, etapa esta que se estende à região dos 380 °C até aos 500 °C, terceira e última fase - degradação termo-oxidativa da celulose.

Assim, comparando os perfis das curvas, pode-se concluir que as modificações introduzidas na CB não alteraram as suas propriedades térmicas. Observando com atenção o perfil da curva de TG da celulose não modificada verifica-se que o início da segunda fase de perda de massa inicia-se a uma temperatura um pouco mais elevada do que para as restantes amostras, além disto a perda de massa na fase oxidativa é também mais gradual. Estas pequenas diferenças podem estar associadas a ligações hidrogénio intra e intermoleculares mais fracas para o caso das amostras modificadas.

A única diferença a destacar das modificações introduzidas na CB é que no caso das amostras com PVA verifica-se uma perda de massa mais gradual ao longo da variação da temperatura, e que os perfis das amostras com F3GA são praticamente 100% idênticos, registando-se em ambos uma perda de massa mais acentuada na segunda e terceira fases. Este comportamento térmico está em concordância com os resultados obtidos por Lu e colaboradores [102], e Wang e colaboradores [91].

O gráfico da *Figura 53* representa os perfis das curvas de DSC das várias amostras funcionalizadas.

Como se pode observar, para todos os casos, verifica-se a existência de um pequeno pico endotérmico, ocorrido entre os 0 °C e os 90 °C, atribuído à remoção das moléculas de água fracamente ligadas na matriz das amostras.

Após este pico, verifica-se a ocorrência de grandes picos exotérmicos. Para todas as amostras este pico ocorre por volta dos 380 °C, que corresponde ao início da fase de oxidação do material.

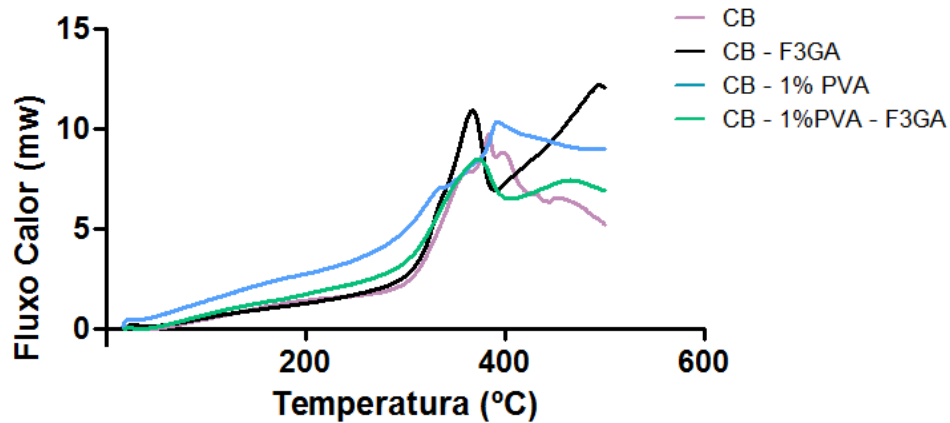


Figura 53 - Curvas de DSC das amostras de CB, CB - F3GA, CB - 1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.

No entanto, para as amostras de CB pura e CB funcionalizada com 1% de PVA, este pico apresenta-se mais largo, o que sugere que estas amostras são termicamente mais estáveis do que as restantes.

Para além disto, a única diferença a destacar é que o comportamento das duas amostras modificadas com F3GA é muito semelhante.

A ocorrência do pico exotérmico pronunciado deve-se a uma transição do material, a alterações de ligações, ou seja, a degradação destas amostras libertou energia.

6.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR):

Para caracterizar a estrutura química superficial das várias amostras funcionalizadas ao longo deste trabalho, realizou-se uma análise por FTIR-ATR, estando os espectros obtidos representados na *Figura 54*.

Como se pode observar todos os espectros obtidos são muito semelhantes no que diz respeito aos picos registados. A única diferença verificada, nos diferentes espectros das amostras, é a intensidade desses mesmos picos, que por ordem decrescente de superioridade ordenam-se: amostra de CB - 1% PVA - F3GA, amostra de CB, amostra CB - F3GA (C = 0,15 mg/mL) e por último a amostra de CB - 1% PVA.

Tal como todos os outros, o espectro de FTIR da CB pura exhibe um pico principal aproximadamente aos 1055 cm⁻¹, que corresponde à vibração do anel piranose C-O-C. O pico ocorrido aos 1116 cm⁻¹ surge do alongamento da ponte assimétrica da ligação C-O. Já o pico registado aos 1350 cm⁻¹ é atribuído à dobra das ligações O-H.

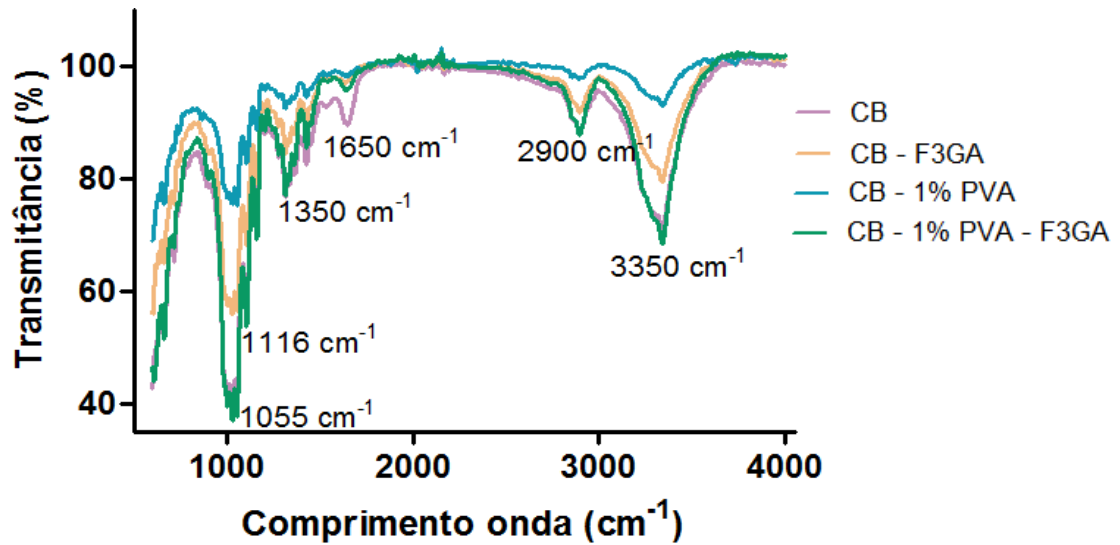


Figura 54 – Espectros FTIR das amostras de CB, CB - F3GA, CB - 1% PVA, CB - 1%PVA - F3GA.

A banda de adsorção, para os valores de cerca de 1650 e 2900 cm^{-1} , é atribuída à dobra da ligação H-OH das moléculas água adsorvidas e ao alongamento C-H no anel piranóide, respetivamente. Por último, o espectro apresenta um pico forte aos 3350 cm^{-1} que corresponde ao alongamento dos grupos hidroxilo. [33,124, 125]

Segundo Lu e colaboradores [102, 125], as membranas de CB funcionalizadas com F3GA deveriam possuir os picos de adsorção aromáticos característicos deste reagente: 2337 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} . No entanto, observando os espectros obtidos para as amostras funcionalizadas com o F3GA, não se verifica a presença de tais picos característicos.

Por outro lado, os picos principais do PVA, dos quais são exemplo 3239 cm^{-1} e 2908 cm^{-1} , encontram-se nos mesmos comprimentos de onda dos picos característicos da CB, o que conseqüentemente leva à obtenção de bandas mais largas para as amostras funcionalizadas com este polímero, devido ao maior número de grupos funcionais a vibrar nos mesmos comprimentos de onda específicos. [126] No entanto, analisando o espectro da amostra CB-PVA, concluiu-se que tal situação não se verifica.

Esta ausência de diferenças nos espectros das amostras funcionalizadas, comparativamente às amostras de CB não modificadas, pode ser justificada pela heterogeneidade das amostras modificadas com estes dois reagentes, que pode ser observada nas Figuras 22 e 25, respetivamente, o que pode ter levado à análise por FTIR de uma área da amostra que não contivesse incorporado o corante ou o polímero.

Em suma, embora não existam diferenças nos picos dos espectros das amostras funcionalizadas, confirma-se o sucesso da incorporação do PVA e F3GA nas nanofibras de CB, através da visualização das imagens de SEM das amostras após o processo de modificação (Figura 23, Figura 27 e 28).

CAPÍTULO IV.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A principal conclusão a retirar dos estudos efetuados é a de que as membranas de CB possuem potencial para serem utilizadas como membranas de afinidade. Adicionalmente, verificou-se que estas membranas podem ainda ser reutilizadas, embora a quantidade de BSA retida na sua matriz diminuía ao longo dos ciclos de reutilização, atingindo um máximo de 148 mg BSA/g CB e um mínimo de 81,27 mg/g.

Preliminarmente abordaram-se dois métodos de funcionalização da superfície da CB – oxidação com periodato de sódio e geração de grupos amina – que devido aos resultados atingidos e por questões de rentabilidade do tempo disponível acabaram por ser descartados.

Relativamente ao procedimento de incorporação de PVA na matriz de CB, verificou-se que as membranas obtidas exibiram uma estrutura mais rígida, resistente e coesa. As imagens de SEM destas amostras permitiram confirmar a incorporação do polímero na matriz de CB e verificar que este procedimento aumenta a porosidade da matriz. Em termos de fluxo aferiu-se que as membranas com 1% de PVA são as que possuem valores superiores, seguidas das membranas com 3% de PVA, 5% de PVA e por último as membranas de CB puras; ou seja, quanto menor a concentração de PVA incorporado, maior a porosidade da malha. Quanto à capacidade de ligação da BSA na matriz funcionalizada, concluiu-se não só que a incorporação do PVA diminui a quantidade de BSA adsorvida, mas também que com um aumento da concentração deste polímero a porção de proteína retida é ainda menor. De uma forma geral, nestes ensaios verificou-se uma diminuição da capacidade de ligação da BSA, por adsorção, de 46,84% e 90,27 % para as membranas espessas e finas, respetivamente, em relação às membranas de CB pura.

No que diz respeito à imobilização do F3GA na matriz de CB, a sua ligação foi confirmada não só pela cor azulada apresentada pelas membranas, mas também pelas imagens de SEM das amostras. Adicionalmente, estas imagens mostraram que à semelhança do ocorrido para o procedimento com PVA, esta modificação também promove o aumento da porosidade da matriz de CB. Assim, em relação ao fluxo verificou-se que as membranas modificadas com 0,015 mg/mL de corante são as que possuem valores superiores, seguidas das membranas com 0,075 mg/mL e por último as amostras com 0,15 mg/mL; isto é, mais uma vez, à semelhança do ocorrido com o PVA, quanto menor a concentração de F3GA utilizada, maior a porosidade da malha. Os valores obtidos mostram que todas estas membranas possuem uma porosidade ligeiramente superior às membranas de CB puras, mas inferior às membranas modificadas com PVA.

Independentemente da concentração de F3GA utilizada, concluiu-se que os valores obtidos para a capacidade de ligação, por adsorção inespecífica, da BSA diminuiram cerca de 52,67% e de 76,16% para as membranas espessas e finas, respetivamente, comparativamente às amostras de CB não modificadas. As membranas que apresentam resultados superiores, relativamente à adsorção de BSA, foram as funcionalizadas com 0,015 mg/mL de F3GA. Outra conclusão a apontar é a de que, tal como as amostras

de CB não modificadas, as membranas de CB funcionalizadas com F3GA têm potencial de reutilização, embora a quantidade de proteína adsorvida seja irregular, nas condições ensaiadas.

Por fim, para o último método de funcionalização abordado – PVA e F3GA – verificou-se que a prévia incorporação do PVA diminuiu a quantidade de corante imobilizado na matriz de CB, para o caso das membranas espessas. Em geral a modificação das amostras com PVA seguida da ligação com o F3GA parece promover uma ligeira diminuição da porosidade da matriz, relativamente às membranas funcionalizadas isoladamente com PVA e F3GA. Os valores obtidos para os fluxos são relativamente idênticos aos obtidos para as membranas de CB não modificadas. Em termos da capacidade de ligação da BSA, estas amostras seguem o comportamento e a hierarquia observada para as amostras modificadas somente com PVA. De um modo geral, nestes ensaios, à semelhança do ocorrido nos procedimentos anteriores, verifica-se um decréscimo na capacidade de adsorção inespecífica de BSA de 37,94% e de 88,01% para as membranas espessas e finas, respetivamente, comparativamente às amostras de CB não modificadas.

Os métodos de funcionalização em cima referidos introduziram modificações superficiais na CB tornando-a mais hidrofílica. No entanto, a análise por TGA mostra que as modificações introduzidas não alteraram as propriedades térmicas da CB.

Para trabalhos futuros sugere-se uma investigação mais exaustiva no que diz respeito à influência da espessura das membranas de CB, na capacidade de ligação de proteínas na matriz, uma vez que os resultados obtidos foram muito irregulares. Outro ponto a abordar será o ciclo de eluição da proteína da matriz, pois neste trabalho os escassos resultados obtidos não foram, de um modo geral, satisfatórios nem regulares. Por este motivo sugere-se investigar a eficácia de outras soluções de eluição, como por exemplo, NaOH, SDS, NaSCN, testando-se diferentes condições experimentais, como o tempo de exposição, pH e concentração.

Um dos principais problemas com que este projeto se deparou prendeu-se com a heterogeneidade existente entre as membranas de CB puras, mesmo dentro do mesmo lote de fermentação. Uma possível solução para esta situação será a produção de uma membrana suficientemente grande de CB para a partir dela se extraírem várias amostras individuais, na tentativa de obter membranas mais homogêneas entre si e assim aumentar a reprodutibilidade dos resultados.

Outros estudos que poderão ser realizados de forma a complementar as experiências efetuadas neste projeto prendem-se com a realização de isotérmicas de BSA, com membranas de CB funcionalizadas com F3GA, para se averiguar a semelhança com as efetuadas com membranas de CB puras; realização de ensaios de ultrafiltração com diferentes condições experimentais: concentração de BSA, pH e pressões; testar o potencial de reutilização das membranas modificadas com PVA.

Anexo A-I.

A figura seguinte mostra a integridade da *Tabela 4* exibida no Capítulo I, que se refere a exemplos de aplicações, e contém ainda vários tipos de ligandos e materiais utilizados para a preparação das membranas de afinidade.

Tabela 4 – Membranas de Afinidade (“retirado de Charcosset, 1998”) [8]

<i>Substances isolated</i>	<i>Affinity ligand</i>	<i>Membrane material</i>
<i>Amino acid ligands</i>		
Bovine γ -globulin	L-Phenylalanine Tryptophan	Polyethylene membrane grafted glycidyl methacrylate
Heparin from buffer, plasma and blood	Poly(L-lysine)	Poly(ethylene vinyl alcohol) coated polyethylene, cellulose diacetate and Hemophan membranes
Human IgG from placenta	L-Histidine	Immunodyne (Pall), silica and nylon-methacrylate composite membrane
Human IgG from plasma or serum	L-Histidine	Protein A membrane (Nygene) Poly(ethylenevinyl alcohol) membrane
<i>Antigen and antibody ligands</i>		
Bovine albumin from serum	Monoclonal antibody to BSA	Regenerated cellulose membrane
Bovine immunoglobulin G	Recombinant protein G	Regenerated cellulose (MemSep 1000, Millipore)
Human γ -globulin from plasma	Protein G	Nylon and acrylic composite membrane
Human γ -globulin from hybridoma cultures, ascites fluid and serum	Recombinant protein A Recombinant protein G	MAC™ cellulose acetate membrane (Amicon)
Mouse monoclonal antibodies IgG ₁ and IgG ₂		
Human γ -globulin	Protein A	Loprodyne nylon membrane (Pall)
Porcine γ -globulin		
Human IgG	Protein A	Poly(ether-urethane-urea) membrane
Human IgG	Protein A	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Human IgG	Protein A	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Human IgG	Recombinant protein A	Poly(ethersulphone) membrane-coated chitosan
Human IgG	Recombinant protein A	Polysulphone membrane-coated hydroxyethyl cellulose
Human IgG	Recombinant protein A	Cellulose and acrylic composite membrane
Human IgG	Recombinant protein A and G	Modified poly(caprolactam)
Human IgG from plasma	Modified C-reactive protein Protein A	Cellulose, polyamide and modified polyvinylidene difluoride membranes
Human IgG pure and from serum. Bovine IgG	Protein A Protein G	Cellulose and acrylic composite membrane
Human IgM antibodies against triosephosphate isomerase from sera	Triphosphate isomerase	Polyvinylidene difluoride membrane
Human serum amyloid P from rat blood (hSAP)	Anti-hSAP IgG (polyclonal, rabbit)	Cellulose
Interferon- α 2a (rIFN- α 2a)	Monoclonal antibody to (rIFN- α 2a)	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Interleukin-2 (rIL-2)	Monoclonal antibody to (rIL-2)	
Interleukin-2 receptor (IL-2R)	Monoclonal antibody to (IL-2R)	
Mouse IgG ₁ and IgG _{2a} monoclonal antibodies from cell culture supernatant	Protein A	Sartobind epoxy membrane (Sartorius)
Protein A	Rabbit IgG	
Rabbit IgG	Protein A	
Rat IgE from blood	Rabbit IgG specific for rat IgE	Cellulose membrane
<i>Dye ligands</i>		
Adenylate kinase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Ultipor nylon membrane (Pall)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase		
Malate dehydrogenase from yeast		
Alkaline phosphatase	Cibacron Blue F3GA Active Red K2BP	Modified cellulose membrane
Bovine serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Acrylic copolymer
Bovine serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Sartobind Blue 2 membrane (Sartorius)
Malate dehydrogenase from pig heart and cell extract		
Catalase from bovine liver	Cibacron Blue F3GA	Poly(hydroxyethyl methacrylate)

<i>Substances isolated</i>	<i>Affinity ligand</i>	<i>Membrane material</i>
Formate dehydrogenase from yeast, bovine serum albumin Pyruvate decarboxylase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Loprodyne and Immunodyne nylon membranes (Pall)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast	Cibacron Blue F3GA	Sartobind Blue 2 membrane (Sartorius)
Human serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Titanium dioxide membrane coated with poly(ethylene imine)
Human serum albumin	Cibacron Blue F3GA	Chitosan supported on polyethersulphone
Lysozyme	Cibacron Blue F3GA	Regenerated cellulose membrane
Malate dehydrogenase from pig heart	Cibacron Blue F3GA Procion	Ultipor, Immunodyne, loprodyne nylon membrane (Pall)
<i>Other ligands</i>		
Annexins	Collagen	Poly(glycidyl methacrylate) membrane
Hydrophobic proteins from Morris hepatoma plasma membranes	Heparin	
Antithrombin III from cell culture supernatant	Heparin	Sartobind A membrane (Sartorius)
Antithrombin III from human plasma	Heparin	Quick Disc (Säulentchnik Knauer)
Carbonic anhydrase from haemolysates of human erythrocytes	<i>p</i> -Aminomethylbenzoyl sulphonomide	Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) membrane
Chymosin, pepsin	Pepstatin A	Immobilon AV membrane (Millipore)
Fibronectin from human plasma	Gelatin	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Heparin	Protamine	Poly(caprolactam) membrane
Interleukin-2	Interleukin-2-receptor (IL-2R)	Composite membrane (Sepracor Inc.)
Monoclonal antibody to IL-2R		
Interleukin-2 exotoxin fusion protein		
Membrane proteins from liver, Morris hepatoma and kidney	Collagen Heparin	Epoxy Mem Sep 1000 (Millipore)
Monoclonal antibodies IgG ₁ and IgG _{2a} from hydroma culture supernatant	Thiophilic ligands	Sartobind epoxy membrane (Sartorius)
Porcine trypsin	Soybean trypsin inhibitor	Modified cellulose membranes
Proteases from human plasma	<i>p</i> -Aminobenzamidine	
Trypsin	<i>p</i> -Aminobenzamidine	Membranes (Domnick Hunter Filters Ltd)
Trypsin inhibitor from soybean	Trypsin	Modified polysulphone membrane

BIBLIOGRAFIA

- [1] SAXENA, A., et al, "Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview". *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009. **145**: 1-22
- [2] CASTILHO, L. R., DECKWER W.-D., and ANSPACH F.B., "Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes". *Journal of Membrane Science*, 2000. **172**: 269-277
- [3] GE, D., et al, "Variation analysis of affinity-membrane model based on Freundlich adsorption". *Journal of Chromatography A*, 2006. **1114**: 40-44
- [4] ZOU, H., and LUO, Q., "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins". *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001. **49**: 199-240
- [5] KOCHAN, E., WU, Y.-J., and ETZEL, M., "Purification of Bovine Immunoglobulin G via Protein G Affinity Membranes". *Ind.Eng. Chem.Res.*, 1996. **35**: 1150-1155, American Chemical Society
- [6] RAMAKRISHNA, S., et al, "An Introduction to Electrospinning and Nanofibers". *World Scientific Publishing*, 2005
- [7] ROPERA, K., and LIGHTFOOT, E.N., "Separation of biomolecules using adsorptive membranes". *Journal of Chromatography A*, 1995. **702**: 3-26
- [8] CHARCOSSET, C., "Purification of proteins by membrane chromatography". *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998. **71**: 95-110
- [9] KASSAB, A., et al, "Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide hollow fiber affinity membranes". *Journal of Chromatography B*, 2000. **746**: 123 – 132.
- [10] SENEL, S., et al, "Bilirubin removal from human plasma by dye affinity membrane microporous hollow fibers". *Separation Sci. Technol.*, 2002. pp. 37
- [11] XIA, B., ZHANG, G., ZHANG, F., "Bilirubin removal by Cibacron Blue F3GA attached nylon-based hydrophilic affinity membrane". *Journal of Membrane Science*, 2003. **226**: 9-20
- [12] BRANDT, S., et al, "Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications". *Biotechnology* **6**, 1998. pp. 779-782
- [13] DENIZLI, A., and PIGSKIN, E., "Dye-ligand affinity systems". *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 2001. **49**:391
- [14] BOI, C., et al, "Influence of different spacer arms on Mimetic Ligand TM A2P and B14 membranes for human IgG purification". *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**: 1633-1640
- [15] VIERA, C., YANG, H., and ETZEL, M., "Affinity Membranes: Competitive Binding of the Human IgG Subclasses to Immobilized Protein G". *Ind. Eng. Res., American Chemical Society*, 2000. **39**: 3356-3363
- [16] MA, Z., KTAKI, M., and RAMAKRISHNA, S., "Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane". *Journal of Membrane Science*, 2005. **265**: 115-123
- [17] KLEIN, E., "Affinity membranes: a 10-year review". *Journal of Membrane Science*, 2000. **179**: 1-27
- [18] CATTOLI, F. SARTI, G.C., "Separation of MBP fusion proteins through affinity membranes". *Biotechnology Progress*, 2002. **18**: 94-100
- [19] BOI, C., et al, "Adsorption of lectins on affinity membranes". *J. Mem. Science*, 2006. **273**: 12-19.
- [20] SCHULTE, M., MANJINI, S., and VIJAYALAKSHMI, M.A., "Comparative affinity chromatography studies using novel grafted polyamide and poly(vinyl-alcohol) media". *J.Chromatogr.*, 1991. **539**:307

- [21] HENIS, J.M., TRIPODI, M.K., STIMPSON, D.I., "Modified polymeric surfaces and processes for preparing same". *US Paten, t4*, 1988. pp. 794
- [22] AZAD, R.M., GOFFE, R.A., "Covalent attachment of macromolecules to polysulfone or polyethersulfones modified to contain functionalizable chain ends". *US Patent 5*, 1995. pp. 462
- [23] KIM, M., et al, "Protein adsorption capacity of porous phenylalanine-containing membrane based on a polyethylene matrix". *J. Chromatogr.*, 1991. **586**: 27–33
- [24] BRIEFS, K.-G., KULA, M.-R., "Fast protein chromatography on analytical and preparative scale using modified microporous membranes". *Chem. Eng. Sci.*, 1992. **47**: 141–149
- [25] NAJARIAN, S., BELLHOUSE, B.J., "Effect of oscillatory flow on the performance of a novel cross-flow affinity membrane device". *Biotechnol. Prog.*, 1997. **13**: 113–116
- [26] KUGEL, K., et al, "Microporous poly(caprolactam) hollow fibers for therapeutic affinity adsorption". *J. Membr. Sci.*, 1992. **74**: 115-29
- [27] UNARSKA, et al, "Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems". *J. Chromatogr.*, 1990. **519**: 53-67
- [28] HOU, K.C., ZANIEWSKI, R., "Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatography cartridges". *J. Chromatogr.*, 1990. **525**: 297–306
- [29] LUTKEMEYER, D., et al, "Membrane chromatography for rapid purification of recombinant antithrombin III and monoclonal antibodies from cell culture supernatant". *J. Chromatogr.*, 1993. **639**: 57–66
- [30] MA, X., MOHAMMAD, S.F., and KIM, S.W., "Heparin removal from blood using poly(L-lysine) immobilized hollow fiber". *Biotechnol. Bioeng.*, 1992. **40**: 530–536
- [31] J. Thommes and M.-R. Kula, "Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins", *Biotechnol. Prog.* 1995, **11**:357-367
- [32] BIELECKI, S. et al, "BACTERIAL CELLULOSE". *Institute of Technical Biochemistry*. pp. 37-46
- [33] KLEMM, D., et al, "Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery". *Prog. Polym. Sci.*, 2001. **26**: 1561-1603
- [34] JONAS, R., FARAH, L.F., "Production and application of microbial cellulose". *Polym Degrad Stab*, 1998. **59**: 101-106
- [35] WU, S.-C., LIA, Y.-K., "Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008. **54**: 103-108
- [36] YAMANAKA, S., et al, "The Structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose". *J Mater Sci*, 1989. **24**:141-145
- [37] DOURADO, F., et al, "Characterization of Cellulose surface free energy". *J. Adhesion Sci. Technol*, 1998, **12**(10): 1081 – 1090
- [38] GARDNER, D. J., et al, "Adhesion and Surface issues in cellulose and nanocellulose". *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2008. **22**: 545-567
- [39] ANDRADE, F. K., et al, "Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD". *Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho*, 2008. *Journal of Biomedical Materials Research*.

- [40] SOKOLNICKI, A. M., et al, "Permeability of bacterial cellulose membranes". *Journal of Membrane Science*, 2006. **272**: 15-27
- [41] GEORGE, J., et al, "Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005. **21**: 1323 – 1327
- [42] ANDRADE, F. K., et al, "Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide". *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**: 4034-4041
- [43] YANO, S., et al, "Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles". *Cellulose-Springer Science*, 2008. **15**:111-120
- [44] WHITE, DG., BROWN, RM., "Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose". *In: Schuerch C, editor. Cellulose and wood – chemistry and technology. New York*, 1989. pp. 573-90
- [45] BACKDAHL, H., et al, "Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells". *Biomaterials*, 2006. **27**(9):2141-2149
- [46] ANDRADE, F. K., "Development of Structures Based on Bacterial Cellulose for the Production of Vascular Prostheses", Universidade do Minho, 2010
- [47] NEGRÃO, SW, et al, "A eficácia do stent recoberto com celulose biosintética comparado ao stent convencional em angioplastia em coelhos". *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, 2006. **14**(1):10-19
- [48] WIEGAND, C., et al, "Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I in vitro". *Cellulose*, 2006 **13**(6):689-696
- [49] ZHOU, L., et al, "Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*". *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007 . **34**(7):483-489
- [50] PUTRA, A., et al., "Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface". *Polymer*, 2008. **49**(7):1885-1891
- [51] BODIN, A., et al, "Modification of nanocellulose with a xyloglucan-RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: Implications for tissue engineering". *Biomacromolecules*, 2007. **8**(12):3697-3704
- [52] WATANABE, K., et al, "A New Bacterial Cellulose Substrate for Mammalian-Cell Culture - a New Bacterial Cellulose Substrate". *Cytotechnology*, 1993. **13**(2):107-114
- [53] PHISALAPHONG, M., JATUPAIBOON, N., "Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film". *Carbohydrate Polymers*, 2008. **74**(3):482-488
- [54] CAZAJA, WK., et al, "The future prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications". *Biomacromolecules*, 2007. **8**(1):1-12
- [55] IGUCHI, M., YAMANAKA, S., and BUDHIONO, A., "Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts". *Journal of Materials Science*, 2000. **35**(2):261-270
- [56] MCKENNA, B., et al, "Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524". *Cellulose*, 2009. **16**:1047-1055

- [57] HESTRIN, S., and SCHRAMM, M., "Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, PREPARATION OF FREEZE-DRIED CELLS CAPABLE OF POLYMERIZING GLUCOSE TO CELLULOSE". *Laboratory of Microbiological Chemistry*, 1954. **58**: 345 – 352
- [58] ANDRADE, F., et al, "BACTERIAL CELLULOSE: PROPERTIES, PRODUCTION AND APPLICATIONS". *Nova Science Publishers*, 2010. Capítulo 18, pp 427 – 458
- [59] GEORGE, J., et al, "World Journal of Microbiology and Biotechnology", 2005. **21**: 8-9
- [60] GROMET, Z., and HESTRIN, S., "SYNTHESIS OF CELLULOSE BY *ACETOBACTER XYLINUM*". *Journal Bacteriol*, 1963. **85**: 284 – 292
- [61] CHICIUDEAN, T., STOICA, A., DOBRE, T., TOOREN, M., "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(VINYL ALCOHOL)- BACTERIAL CELLULOSE NANOCOMPOSITE". *U.P.B. Sci. Bull*, 2011. **73**(2):1454 – 2331
- [62] NAKANISHI, K., SAKIYAMA, T., and IMAMURA, K., "On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001. **91**(3): 233-244.
- [63] HLADY, V., and BUIJS, J., "Protein adsorption on solid surfaces". *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, pp.72-77;
- [64] MA, Z.-Y., GUAN, Y.-P., LIU, H.-Z., "Affinity adsorption of albumin on Cibacron Blue F3GA-coupled non-porous micrometer-sized magnetic polymer microspheres". *Reactive and Functional Polymers*, 2006. **66**: 618-624
- [65] WRIGHT, A., THOMPSON, M., "Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence". *Biophysical Journal*, 1975. **15**: 138
- [66] JEYACHANDRAN, Y., et al, "Quantitative and Qualitative Evaluation of Adsorption/Desorption of Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces". *Langmuir, American Chemical Society*, 2009. **25** (19): 1164-11620
- [67] VASCONCELOS, C., et al, "Adsorption of Bovine Serum Albumin on Template-Polymerized Chitosan/Poly(methacrylic acid) complexes". *Langmuir*, 2007. **23**: 7687 – 7694
- [68] SANDERSON, C., and WILSON, D., "A Simple Method for Coupling Proteins to Insoluble Polysaccharides". *Immunology*, 1971. **20**: 1061
- [69] WILDE, P., CLARK, D., "The competitive Displacement of Beta – lactoglobulin by Tween 20 from Oil-water and Air-water interfaces". *Science Direct Volume*, 1993. **1**:155.
- [70] BATTEIGER, B., NEWHALL, W., and JONES, R., "The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes". *Journal of Immunological Methods*, 1982. **55**(3): 297-307
- [71] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p1379?lang=pt®ion=PT>, consultado em 2012 - 07- 12
- [72] MA, Z., RAMAKRISHNA, S., "Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification". *Journal of Membrane Science*, 2008. **319**: 23-28
- [73] JIA, S., et al, "PREPARATION AND APPLICATION OF BACTERIAL CELLULOSE SPHERE: A NOVEL BIOMATERIAL". *BIOTECHNOL. AND BIOTECHNOL. EQ*, 2011. **25**(1): 2233-2236
- [74] MIYAUCHI, M., et al, "Flexible Electrospun Cellulose Fibers as an Affinity Packing Material for the Separation of Bovine Serum Albumin". *Chromatography, Separation techniques*, 2011. **2**(2): 2157-7064

- [75] SHI, W. , et al, "Poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-alumina composite membrane for affinity adsorption of bilirubin". *Journal of Membrane Science*, 2010. **353**: 151-158
- [76] MA, Z., MASAYA, K., RAMAKRISHNA, S., "Immobilization of Cibacron blue F3GA on electrospun polysulphone ultra-fine fiber surfaces towards developing an affinity membrane for albumin adsorption". *Journal Membrane Science*, 2006. **282**: 237-244
- [77] DENIZLI, A., "Dye-Ligand Column Chromatography: Albumin Adsorption from Aqueous Media and Human Plasma with Dye-Affinity Microbeads". *Journal of Applied Polymer Science*, 1999. **74**: 2803-2810
- [78] ODABA, M.,DENIZLI, A., "Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption". *Polymer International, Society of Chemical Industry*, 2004. **53**: 332-338
- [79] LI, J., et al, "Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds". *Materials Science and Engineering C29*, 2009. pp. 1635-1642
- [80] CHOWDHURY, P., and KUMAR, V., "Fabrication and evaluation of porous 2,3-dialdehydecellulose membrane as a potential biodegradable tissue-engineering scaffold". *Wiley InterScience*, 2005. pp. 300-309
- [81] VARMA, A., and KULKARNI, M., "Oxidation of cellulose under controlled conditions". *Polymer Degradation and Stability*, 2002. **77**: 25-27
- [82] KIM, U., et al, "Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose". *Biomacromolecules*, 2000, **1**: 488-492
- [83] ALILA, S., et al, "Controlled surface modification of cellulose fibers by amino derivatives using N,N'-carbonyldiimidazole as activator". *Carbohydrate Polymers*, 2009. **77**: 553-562
- [84] STOLLNER, D., SCHELLER, F., and WARSINKE, A., "Activation of Cellulose Membranes with 1,1-Carbonyldiimidazole or 1-Cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate as a Basis for the Development of Immunosensors". *Analytical Biochemistry*, 2002. **304**: 157-165
- [85] DONG, S. and ROMAN, M., "Fluorescently Labeled Cellulose Nanocrystals for Bioimaging Applications". *JACS Communications*, 2007. **129**: 13010-13811
- [86] DOURADO, F., et al, "Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate". *Journal of Biotechnology*, 2002. **99**: 121-131
- [87] AY, B., VOLKMER, R. and BOISGUERIN, P., "Synthesis of cleavable peptides with authentic C-termini: an application for fully automated SPOT synthesis". *Tetrahedron Letters*, 2007. **48**: 361-364
- [88] FINCH, C., "Poly (vinyl alcohol): properties and applications". *Wiley, New York*, 1973
- [89] HASSAN, C., PEPPAS, N., "Structure and Applications of Poly (vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods". *Advances in Polymer Science*, 2000. **153**: 38-40
- [90] GEA, S., et al, "Bacterial cellulose-poly (vinyl alcohol) nanocomposites prepared by an in-situ process". *Materials Letter*, 2010. **64**: 901 -904
- [91] WANG, J., et al, "Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial". *Materials Science and Engineering*, 2010. **30**:214-218
- [92] MILLON, L., WAN, W., "The Polyvinyl Alcohol-Bacterial Cellulose System As A New Nanocomposite for Biomedical Applications". *Wiley InterScience*, 2006. **79B**: 245-253

- [93] BARRETT, D., et al, "Resistance to Nonspecific Protein Adsorption by Poly (vinyl alcohol) Thin Films Adsorbed to a Poly(styrene) Support Matrix Studied Using Surface Plasmon Resonance". *American Chemical Society*, 2001. **73**(21): 5232-5239
- [94] MILLON, L., GUHADOS, G., WAN, W., "Anisotropic Polyvinyl Alcohol–Bacterial Cellulose Nanocomposite for Biomedical Applications". *Wiley InterScience, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 2008. **86B**: 444-452
- [95] LOWE, C., et al, "Protein–dye interactions: development and applications". *Applied Science*
- [96] ALBERGHINA, G., et al, "Dimerization of Cibacron Blue F3GA and other dyes: influence of salts and temperature". *Dyes and Pigment*, 2000. **46**: 129-137
- [97] LIU, Y.-C. and STELLWAGEN, E., "Accessibility and Multivalency of Immobilized Cibacron Blue F3GA". *The Journal of biological chemistry*, 1987. **262**: 583-588
- [98] HERMANSON, G., MALLIA, A., and SMITH, P., "Immobilized Affinity Ligand Techniques". *Academic Press*, 1992. pp. 174–176
- [99] HAFF, L., and EASTERDAY, R., "Cibacron Blue Sepharose: a tool for general ligand affinity chromatography". *in Theory and Practice in Affinity Techniques, Academic Press*, 1978, pp. 23
- [100] BURGETT, M., and GREENLEY, L., "Cibacron Blue F3GA affinity chromatography". *Amb. Lab.*, 1977. pp. 74
- [101] SUBRAMANIAN, S., "DYE-LIGAND AFFINITY CHROMATOGRAPHY: THE INTERACTION OF CIBACRON BLUE F3GA WITH PROTEINS AND ENZYMES". *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 2003. **16**(2): 169-203
- [102] LU, P., HSIEH, Y., "Lipase bound cellulose nanofibrous membrane via Cibacron Blue F3GA affinity ligand". *Journal of Membrane Science*, 2009. **330**: 288 – 296
- [103] NIE, H., ZHU, L., "Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007. **40**: 261-267
- [104] KOCAKULAK, M., et al, "New sorbent for bilirubin removal from human plasma: Cibacron Blue F3GA-immobilized poly(EGDMA–HEMA) microbeads". *Journal of Chromatography B*, 1997. **693**: 271-276
- [105] BUYUKTUNCEL, E., et al, "Poly (vinyl-alcohol) coated/Cibacron Blue F3GA-attached polypropylene hollow fiber membranes for removal of cadmium ions from aquatic systems". *Reactive and Functional Polymers*, 2001. **47**: 1-10
- [106] DENIZLI, A., et al, "Cibacron Blue F3GA and Cu (II) derived poly (2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for lysozyme adsorption". *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 1998. **11**: 113-122
- [107] ADIL, D., et al, "Cibacron Blue F3G-A Attached Poly (Vinyl Alcohol) Particles for Specific Albumin Adsorption". *Separation Science and Technology*, 2006. **32**(5): 1003-1015
- [108] CLASEM, C., et al, "Effects of Different Drying Processes on the Material Properties of Bacterial Cellulose Membranes". *Macromol. Symp.*, 2006. **244**: 48–58
- [109] PÉRTILE, R. "Bacterial cellulose: studies on biocompatibility, surface modification and interaction with cells", Centre os Biological Engineering, Universidade do Minho, 2010
- [110] TAMAHKAR, E., et al, "Bacterial cellulose nanofibers for albumin depletion from human serum". *Process Biochemistry*, 2010. **45**: 1713–1719

- [111] MORI, Y., TOKURA, H., YOSHIKAWA, M., "Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications". *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE*, 1997. **32**: 491–496,
- [112] WANICHAPICHART, P., et al, "Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*". *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 2002. **24**: 855-862
- [113] BORZANI, W. and SOUZA, S.J., "A simple method to control the bacterial production of cellulosic films in order to obtain dried pellicles presenting a desired average thickness". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998. **14**: 59-61
- [114] GUO, W., SHANG, Y., ZHOU, L., "Membrane affinity chromatography of alkaline phosphatase". *Journal Chromatogr.*, 1994. **685**:344-348
- [115] CASTILHO, L.R., ANSPACH, F., DECKWER, W., "Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins". *Journal of Membrane Science*, 2002. **207**: 253–264
- [116] ZENG, X., RUCKENSTEIN, E., "Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption", *Journal of Membrane Science*, 1996. **117**: 271-278
- [117] LEONARD, M., FOURNIER, E., " Polyvinyl alcohol-coated macroporous polystyrene particles as stationary phases for the chromatography of proteins". *Journal of Chromatography B*, 1995. **664**: 39-46
- [118] ZHANG, C., et al, "Preparation and characterization of hydrophilic modification of polypropylene non-woven fabric by dip-coating PVA (polyvinyl alcohol)". *Separation and Purification Technology*, 2008. **61**:276–286
- [119] YAVUZ, H., et al, "Cibacron Blue F3GA incorporated poly(methylmethacrylate) beads for albumin adsorption in batch system". *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2003. **223**:185-193
- [120] ZHANG, J., et al, "Bovine serum albumin (BSA) adsorption with CibacronBlue F3GA attached chitosan microspheres". *Reactive & Functional Polymers*, 2006. **66**: 916–923
- [121] VAN OSS, C.J., GIESE, R.F., " The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals". *Clay Minerals*, 1995.**2**: 347-369
- [122] THOMAS, L., et al, "A biodegradable and biocompatible PVA–citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering". *J Mater Sci: Mater Med*, 2009. **20**:S259–S269
- [123] WINDVOEL, V., MBANJWA, M., LAND, K., "Contact Angle Studies on PDMS surfaces Fouled by Bovine Serum Albumin". *European Cells and Materials*, 2010. **19**(1): 23
- [124] SMITH, A. et al, "Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy". *Carbohydrate Research*, 2002. **337**:1145–1153
- [125] LU, P. and HSIEH, Y., "Layer-by-layer self-assembly of Cibacron Blue F3GA and lipase on ultra-fine cellulose fibrous membrane". *Journal of Membrane Science*, 2010. **348**:21–27
- [126] DOBRE, L., DOBRE, T., FERDES, M., "Biodegradation Kinetics of Antimicrobial Composite Films Based on Polyvinyl Alcohol-bacterial Cellulose". *Applied Chemistry and Materials Science*, 2012. **5**: 63