



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

GIZELE DAS GRAÇAS FARIAS DE ANDRADE

**PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO MEMBRANAS DE
POLIACRILONITRILA MODIFICADAS COM QUITOSANA**

Recife

2025

GIZELE DAS GRAÇAS FARIAS DE ANDRADE

**PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO MEMBRANAS DE
POLIACRILONITRILA MODIFICADAS COM QUITOSANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Física

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada e de Materiais

Orientador (a): Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Andrade, Gizele Das Graças Farias de.

Purificação de proteínas utilizando membranas de poliacrilonitrila modificadas com quitosana / Gizele Das Graças Farias de Andrade. - Recife, 2025.

120f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Física, 2025.

Orientação: Celso Pinto de Melo.

Inclui referências.

1. Purificação de proteínas; 2. Albumina de soro bovino (BSA); 3. Imunoglobulina G (IgG); 4. Membranas eletrofiadas. I. Melo, Celso Pinto de. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

Esta tese é dedicada aos meus amados pais, Maria e Givaldo, e ao meu querido irmão, Filipe. Amo vocês infinitamente.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado de uma colaboração sincera e do apoio generoso de muitas pessoas. Sem o encorajamento e o suporte recebidos ao longo desta desafiadora jornada acadêmica, este trabalho não teria sido possível. Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me mostrar que as dificuldades da vida frequentemente nos conduzem a destinos melhores do que imaginamos.

Expresso minha sincera gratidão ao professor Celso P. de Melo, meu orientador, por assumir o papel desafiador de me guiar e por me dar a oportunidade de trabalhar neste fascinante campo de pesquisa. Sou também imensamente grata aos meus colegas do Laboratório de Polímeros Não Convencionais da UFPE: Jéssica, Joyce e Rubênia foram companheiras indispensáveis, contribuindo diretamente para o desenvolvimento desta pesquisa. Com elas, compartilhei não apenas conhecimento, mas também uma amizade que me fortaleceu ao longo do caminho.

Ao Romário, agradeço profundamente por todos os ensinamentos e pelas valiosas contribuições à minha pesquisa. Andressa, Winnie e Mauricio, expressei meu sincero reconhecimento pelo auxílio e apoio, especialmente nos momentos mais críticos, e pela dedicação essencial na execução dos experimentos. Carol, Gabriela, Elton e Herica, sou extremamente grata pela acolhida calorosa no laboratório desde o início, cuja gentileza e colaboração foram fundamentais.

Minha gratidão também se estende aos meus colegas dos departamentos de Física e Química da UFPE: Felipe Assis, Helena, Jhennifer, Marcone, Danilo, Emerson, Nathan, Leandro e Thais. Compartilhamos muitos momentos marcantes nos corredores, aulas, reuniões online e laboratórios. Agradeço também profundamente aos professores do Departamento de Física da UFPE: Clécio C. de S. Silva, José R. R. Leite, Michael Cabrera Baez, Paulo Roberto de Araujo Campos e Leonardo Ribeiro Eulálio Cabral, cuja orientação nos cursos avançados, seminários e encontros informais foi crucial para minha formação científica.

Lucas, obrigada por estar presente e pelo incentivo e apoio ao final dessa trajetória. Sua presença foi verdadeiramente valorizada e contribuiu para o sucesso desta jornada. A Bárbara e Alexandre, meus amigos, colegas de casa e companheiros de estudo ao longo de anos de convivência acadêmica, expressei minha profunda gratidão.

Ao meu amigo Jefferson, com quem compartilhei uma década de experiências acadêmicas, agradeço de coração. Ninguém compreende melhor que você o longo caminho que percorremos até aqui. Sua amizade e apoio foram inestimáveis. Minha prima Êylla, que é muito mais que uma amiga — uma irmã em quem posso confiar plenamente —, meu agradecimento mais

profundo. Seu incentivo e fé em mim foram fundamentais, e ter você ao meu lado foi essencial.

E, finalmente, às pessoas mais importantes da minha vida: minha família, especialmente meus pais, meu irmão, minha cunhada Ravana, minha tia e madrinha Zuis, meu tio Lopes e minha avó Lourdes. Obrigada por acreditarem em mim e me apoiarem quando ninguém mais o fez. Cada sacrifício que fizeram para me proporcionar educação é inestimável e vai além das palavras. Suas contribuições foram essenciais para moldar quem sou hoje, e por isso, expresso minha eterna gratidão.

Por linhas tortas minha história ainda resiste
A vida é um conto escrito com tinta áspera
Eu lutei muito pra superar minhas crises
Cada palavra me forçou a virar a página
Restaram letras sujas com minhas cicatrizes
Depois de tanto morrer, me sinto vivo.

LetoDie

RESUMO

A purificação de proteínas é essencial para aplicações biomédicas e industriais, mas os métodos atuais frequentemente enfrentam desafios como baixa eficiência, alto custo e seletividade limitada. Para superar essas limitações, desenvolvemos membranas de Poliacrilonitrila (PAN) eletrofiadas com Quitosana (Cs) e avaliamos sua capacidade de capturar Albumina de Soro Bovino (BSA) e Imunoglobulina G (IgG) a partir de soluções aquosas. As membranas foram caracterizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), testes de tração, Análise de Área Superficial (BET), espectroscopia de Dispersão de Raios X (EDS) e medições de Ângulo de Contato (AC). As membranas de PAN/Cs exibiram fibras lisas e uniformes, com diâmetro médio de $0,454 \mu m$. Tanto as soluções de BSA quanto de IgG foram analisadas por meio de espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis) para acompanhar a variação da concentração das proteínas no meio. A capacidade máxima de adsorção de BSA (q_e^{max}) foi de $75,61 mg/g$ para PAN/Cs e $21,17 mg/g$ para PAN, enquanto para IgG, q_e^{max} foi de $28,83 mg/g$ para PAN/Cs e $19,77 mg/g$ para PAN. Um destaque importante deste trabalho é que as membranas de PAN/Cs demonstraram ser capazes de realizar a separação seletiva de BSA e IgG conjuntamente presentes em soluções binárias, um avanço significativo para aplicações biomédicas e industriais. A eficiência de eluição das membranas de PAN/Cs atingiu $89,13\%$ para BSA e $62,16\%$ para IgG, mantendo a qualidade e a integridade das proteínas recuperadas, como confirmado pela Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Esses resultados posicionam as membranas de PAN/Cs eletrofiadas como materiais promissores para purificação de proteínas de maneira eficiente, econômica e seletiva.

Palavras-chaves: Purificação de proteínas. Albumina de soro bovino (BSA). Imunoglobulina G (IgG). Adsorção de proteínas. Membranas eletrofiadas. Membranas modificadas com quitosana. Separação seletiva de proteínas.

ABSTRACT

Protein purification is essential for biomedical and industrial applications, but current methods often face challenges such as low efficiency, high cost, and limited selectivity. To overcome these limitations, we developed electrospun Polyacrylonitrile (PAN) membranes modified with Chitosan (Cs) and evaluated their capacity to capture Bovine Serum Albumin (BSA) and Immunoglobulin G (IgG) from aqueous solutions. The membranes were characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), tensile tests, Surface Area Analysis (BET), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), and Contact Angle (CA) measurements. PAN/Cs membranes exhibited smooth and uniform fibers with an average diameter of $0.454 \mu\text{m}$. Both BSA and IgG solutions were analyzed using Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectroscopy to monitor the concentration variations of the proteins in the medium. The maximum adsorption capacity (q_e^{max}) for BSA was 75.61 mg/g for PAN/Cs and 21.17 mg/g for PAN, while for IgG, q_e^{max} was 28.83 mg/g for PAN/Cs and 19.77 mg/g for PAN. A significant highlight of this work is that PAN/Cs membranes demonstrated the ability to perform selective separation of BSA and IgG simultaneously present in binary solutions, representing a major advance for biomedical and industrial applications. The elution efficiency of PAN/Cs membranes reached 89.13% for BSA and 62.16% for IgG, maintaining the quality and integrity of the recovered proteins, as confirmed by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). These results position electrospun PAN/Cs membranes as promising materials for efficient, economical, and selective protein purification.

Keywords: Protein purification. Bovine serum albumin (BSA). Immunoglobulin G (IgG). Protein adsorption. Electrospun membranes. Chitosan-modified membranes. Selective protein separation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural genérica de um aminoácido, com o carbono alfa (C_{α}) destacado.	32
Figura 2 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas.	34
Figura 3 – Adsorção de proteína em uma superfície polimérica; a difusão da proteína hidratada, possibilidades de adsorção e desidratação.	45
Figura 4 – Representação esquemática do processo de eletrofiação adotado para produzir as membranas de PAN/Cs.	53
Figura 5 – Representação esquemática da preparação de colunas de centrifugação usando as membranas de PAN/Cs ou PAN.	63
Figura 6 – Representação esquemática dos principais passos do protocolo de separação de proteínas baseado em membranas de PAN/Cs.	63
Figura 7 – Materiais utilizados no procedimento de eletroforese.	72
Figura 8 – Esquematização das principais etapas.	74
Figura 9 – Micrografias das membranas de PAN/Cs preparadas usando diferentes concentrações relativas dos dois componentes: <i>a)</i> 10/1% em peso; <i>b)</i> 10/2% em peso; <i>c)</i> 10/3% em peso; <i>d)</i> 10/4% em peso; <i>e)</i> 12/1% em peso; <i>f)</i> 12/2% em peso. Todas as imagens têm a mesma ampliação ($15 k\times$).	77
Figura 10 – Micrografias de MEV das membranas de: <i>a)</i> PAN 10% em peso, <i>b)</i> PAN/Cs 10/4% em peso e <i>c)</i> distribuição do diâmetro das membranas de PAN/Cs. (Ampliação: $15 k\times$).	77
Figura 11 – Mapa da composição elementar e espectro EDS para a área analisada da membrana de PAN.	78
Figura 12 – Mapa da composição elementar e espectro EDS para a área analisada da membrana de PAN/Cs.	78
Figura 13 – Espectros FTIR da quitosana e das membranas de PAN e PAN/Cs.	80
Figura 14 – Espectros FTIR da BSA e das membranas de PAN/Cs.	82
Figura 15 – Imagens das medidas do ângulo de contato das membranas de <i>a)</i> PAN (0°) e <i>b)</i> PAN/Cs (0°).	83
Figura 16 – Resistência à tração das membranas de PAN e PAN/Cs.	85

Figura 17 – Porcentagem de adsorção da BSA em função do valor do pH do meio para as membranas de PAN/Cs e PAN.	87
Figura 18 – Potencial Zeta em função do pH da solução da proteína BSA em meio tamponado (concentração 0,6 mg/mL).	88
Figura 19 – Efeito da variação da concentração inicial da BSA sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs, a pH 5,6.	88
Figura 20 – Efeito da variação da concentração inicial da BSA sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN, a pH 5,0.	89
Figura 21 – Ajuste dos dados experimentais para os modelos de isothermas de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson para a adsorção da BSA pelas membranas de PAN/Cs. Observe a superposição quase completa das duas últimas curvas.	91
Figura 22 – Espectro UV-Vis da solução da BSA antes (curva <i>a</i>) e depois (curva <i>b</i>) da interação com as membranas de PAN/Cs e do meio aquoso após a eluição da proteína capturada com uma solução de eluição de <i>Tris – HCl</i> a 1,5 M (pH 10) (curva <i>c</i>).	93
Figura 23 – Eletroforese SDS-PAGE das soluções de BSA em diferentes estágios do processo de separação: Poço 1: padrão original de proteína; Poço 2: a solução original da BSA em tampão de acetato 0,5 M pH 5,6; Poço 3: sobrenadante da solução de BSA após a interação com as membranas; e Poço 4: após as moléculas de proteína adsorvidas terem sido eluídas usando uma solução de <i>Tris – HCl</i> 1,5 M pH 10.	94
Figura 24 – Porcentagem de adsorção da IgG em função do valor do pH do meio para as membranas de PAN/Cs.	99
Figura 25 – Potencial Zeta em função do pH da solução da proteína IgG em meio tamponado (concentração 0,6 mg/mL).	99
Figura 26 – Efeito da variação da concentração inicial da IgG sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs, a pH 6,2.	100
Figura 27 – Efeito da variação da concentração inicial da IgG sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN, a pH 6,2.	101
Figura 28 – Ajuste dos modelos lineares de Freundlich e Redlich-Peterson aos dados experimentais para a adsorção de IgG nas membranas de PAN/Cs. Note a quase completa sobreposição das curvas de Freundlich e Redlich-Peterson. .	102

- Figura 29 – Espectro UV-Vis da solução de IgG antes (curva *a*) e depois (curva *b*) da interação com as membranas de PAN/Cs e do meio aquoso após a eluição da proteína capturada com uma solução de eluição de *Tris – HCl* 1,5 M a pH 10 (curva *c*) e uma solução de eluição de *NaOH* 0,25 M (curva *d*). . 104
- Figura 30 – Eletroforese SDS-PAGE das soluções de IgG em diferentes estágios do processo de separação: Poço 1: a solução original de IgG a pH 6,2; Poços 2, 4 e 6: experimentos em triplicata usando o sobrenadante da solução de IgG após a interação com as membranas; Poços 3 e 5: experimentos em duplicata após as moléculas de proteína adsorvidas terem sido eluídas usando uma solução de *Tris – HCl* 1,5 M pH 10; e Poço 7: meio aquoso após a fração de proteína capturada ter sido eluída usando uma solução de *NaOH* 0,25 M. 106
- Figura 31 – Resultados da eletroforese em gel SDS-PAGE para uma mistura binária das proteínas IgG e BSA. Poço 1: solução da BSA a 0,6 mg/mL; Poço 2: solução de IgG a 0,6 mg/mL; Poço 3: solução binária (BSA + IgG); Poços 4 e 5: solução mista (BSA + IgG) após interação com as membranas (em duplicata); e Poços 6 e 7: sobrenadante após eluição da fração capturada da mistura (BSA + IgG), usando uma solução de *Tris – HCl* 1,5 M pH 10 (em duplicata). 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tampão 1,5 M <i>Tris</i> – <i>HCl</i> pH 8,8	70
Tabela 2 – Tampão 0,5 M <i>Tris</i> – <i>HCl</i> pH 6,8	71
Tabela 3 – Tampão de corrida pH 8,3	71
Tabela 4 – Gel 10%	71
Tabela 5 – Gel 4%	72
Tabela 6 – Tampão de amostra	72
Tabela 7 – Comprimento de onda de absorção no infravermelho dos diferentes grupos funcionais presentes nas amostras das membranas antes e após o experimento de adsorção e para a BSA.	82
Tabela 8 – Influência do tipo de solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína BSA previamente captada pela membrana de PAN/Cs.	91
Tabela 9 – Influência do volume da solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína BSA previamente captada pela membrana de PAN/Cs.	92
Tabela 10 – Comparação do desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína BSA com outros adsorventes reportados na literatura.	96
Tabela 11 – Influência do tipo de solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína IgG previamente captada pela membrana de PAN/Cs.	103
Tabela 12 – Comparação do desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína IgG com outros adsorventes reportados na literatura.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcH Ácido acético

NaAc Acetato de sódio

NaOH Hidróxido de sódio

Na₂HPO₄ Fosfato de sódio dibásico anidro

NaH₂PO₄ Fosfato de sódio monobásico anidro

AC Ângulo de Contato

AN Acrilonitrila

APS Persulfato de amônio

BET Análise de Área Superficial

BSA Albumina de Soro Bovino

CNFs Nanofibras de carbono

Cs Quitosana

DMF Dimetilformamida

EDS Dispersão de Raios X

FTIR Infravermelho por Transformada de Fourier

HCl Ácido clorídrico

IgG Imunoglobulina G

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

PAN Poliacrilonitrila

pH Potencial hidrogeniônico

pI Ponto isoelétrico

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TEMED *N, N, N', N'*-tetrametiletilenodiamina

UV-Vis Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

q_e^{max}	Capacidade máxima de adsorção
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio
C_0	Concentração inicial de proteína
C_e	Concentração da solução de proteína no equilíbrio
V	Volume de proteína na solução
q_m	Capacidade de adsorção
K_e	Constante de Langmuir
K_f	Constante de Freundlich
n	Parâmetro de heterogeneidade de Freundlich
β	Constante de Redlich-Peterson
α	Parâmetro de intensidade das interações cooperativas de Redlich-Peterson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	POLÍMEROS	24
2.1.1	Poliacrilonitrila	25
2.1.2	Quitosana	26
2.2	MEMBRANAS POLÍMERICAS	28
2.2.1	Eletrofiação: Princípios, Processo e Aplicações	28
2.3	ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS	31
2.3.1	Albumina de Soro Bovino (BSA): Estrutura e Aplicações	36
<i>2.3.1.1</i>	<i>Fatores Influenciando a Adsorção da BSA em Membranas de PAN e PAN/Cs</i>	<i>37</i>
2.3.2	Imunoglobulinas: Estrutura e Função	40
2.3.3	Métodos de Purificação de Proteínas	43
2.3.4	Mecanismos de Adsorção	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	ELETROFIAÇÃO	51
3.1.1	Estudo de Concentração	52
3.1.2	Preparação da Membrana de PAN/Cs	52
3.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	54
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	55
3.4	ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO	57
3.5	ÂNGULO DE CONTATO	58
3.6	ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	61
3.7	POTENCIAL ZETA	62
3.8	ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS	62
3.8.1	Adsorção da BSA	64
3.8.2	Adsorção da IgG	65
3.8.3	Isotermas de Adsorção	66
3.8.4	Eletroforese	68
<i>3.8.4.1</i>	<i>Protocolo para o Experimento de Eletroforese</i>	<i>69</i>

3.8.4.2	<i>Descrição do Procedimento de Eletroforese</i>	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	76
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	76
4.1.2	Estrutura e Características Físicas	78
4.1.2.1	<i>Análise EDS das Membranas</i>	78
4.1.2.2	<i>Espectros FTIR</i>	79
4.1.2.3	<i>FTIR da BSA</i>	81
4.1.2.4	<i>Medidas do Ângulo de Contato</i>	83
4.1.2.5	<i>Ensaio Mecânico</i>	84
4.2	MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS MEMBRANAS E AS PRO- TEÍNAS	85
4.3	EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA BSA	85
4.3.1	Resultados Experimentais para a BSA	85
4.3.1.1	<i>Efeito do pH sobre a Adsorção</i>	86
4.3.1.2	<i>Influência da Concentração Inicial</i>	87
4.3.1.3	<i>Modelos de Isotermas</i>	89
4.3.1.4	<i>Dessorção e Recuperação</i>	90
4.3.1.5	<i>Comparação do Desempenho das Membranas de PAN/Cs para Adsorção da BSA com outros Adsorventes da Literatura</i>	95
4.4	EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA IGG	97
4.4.1	Resultados Experimentais para a IgG	97
4.4.1.1	<i>Efeito do pH sobre a Adsorção</i>	97
4.4.1.2	<i>Influência da Concentração Inicial</i>	100
4.4.1.3	<i>Modelos de Isotermas</i>	101
4.4.1.4	<i>Dessorção e Recuperação</i>	103
4.4.1.5	<i>Comparação do Desempenho de Membranas de PAN/Cs para Adsorção de IgG com outros Adsorventes da Literatura</i>	106
4.5	SELETIVIDADE DAS MEMBRANAS DE PAN/CS	108
5	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

Para o uso prático de proteínas em aplicações médicas e científicas, é necessário realizar previamente sua adequada separação e purificação a partir das amostras biológicas originais. No entanto, como o rendimento e a qualidade dos produtos proteicos frequentemente não são suficientes para atender às demandas ou aos requisitos do mercado, muitos esforços têm sido feitos para desenvolver materiais eficazes e de baixo custo, capazes de obter amostras de proteínas de alta qualidade.

Diversos materiais naturais e sintéticos, como nanopartículas (ALI et al., 2022; SATZER et al., 2016; LUNDQVIST; SETHSON; JONSSON, 2004), nanocompósitos (FU et al., 2018), hidrogéis (SAYGILI et al., 2021; KAYALVIZHY; RAJAN; PAZHANISAMY, 2020) e membranas eletrofiadas, têm sido utilizados para adsorver proteínas (LI et al., 2017). Embora métodos como filtração, precipitação, adsorção e cromatografia sejam usados para a extração de proteínas, a adsorção é uma tecnologia promissora devido ao seu baixo custo e alta eficiência (LI et al., 2017).

Entre as técnicas de obtenção de membranas poliméricas, a eletrofiação destaca-se por sua simplicidade e conveniência, permitindo a preparação de mantas altamente adsorventes que oferecem uma grande área superficial e porosidade adequada. Além disso, facilita a modificação das nanofibras constituintes por meio de processos químicos simples, como a incorporação de nanopartículas metálicas, polímeros condutores, agentes de acoplamento e ligantes de afinidade, como anticorpos (NAJAFI; FREY, 2020).

Membranas adsorventes existem em diversas composições e geometrias, possibilitando seu uso em etapas cruciais nos processos de clarificação, concentração, fracionamento e purificação de biomoléculas (ROPER; LIGHTFOOT, 1995). Para essas aplicações, as membranas devem apresentar propriedades adequadas, como alta porosidade, resistência mecânica, além de estabilidade química e térmica, uma vez que podem ser expostas a diferentes temperaturas, variações do Potencial hidrogeniônico (pH) e estresse durante o uso. Além disso, para um desempenho otimizado no processo de separação, elas devem ter alta seletividade para o alvo desejado e, idealmente, manter suas propriedades por vários ciclos de reutilização (LI et al., 2017). Uma vantagem significativa das membranas poliméricas é sua alta capacidade de purificação, combinada com a facilidade de fabricação e uso, além de sua economia de produção (NAJAFI; FREY, 2020).

As membranas podem ser projetadas para atender às demandas de aplicações específicas,

como a separação de biomoléculas, ajustando-se sua estrutura e propriedades físico-químicas (como hidrofiliabilidade, porosidade, densidade de carga, e estabilidade térmica e mecânica), além de introduzir funcionalidades que otimizem sua capacidade de adsorção. Características como tamanho de poro, molhabilidade, carga superficial, rugosidade, resistência térmica, estabilidade química, permeabilidade, espessura e resistência mecânica devem ser selecionadas de acordo com o objetivo desejado. Portanto, um conhecimento detalhado dessas propriedades é essencial para uma escolha adequada de membranas eletrofiadas para cada aplicação específica.

Neste trabalho, descrevemos a preparação, via eletrofição, de membranas nanofibras de poliacrilonitrila (PAN) e de PAN modificadas com quitosana (PAN/Cs) e investigamos seu uso na adsorção das proteínas BSA e IgG dispersas em soluções aquosas. Adotamos a BSA como sistema modelo inicial para avaliar a capacidade da membrana de PAN para a separação de proteínas, tanto antes quanto depois da modificação com quitosana, considerando que os grupos hidroxila e amino da quitosana podem favorecer a captura.

As membranas de PAN puras, de fácil fabricação, apresentam estabilidade térmica e boas propriedades mecânicas. A presença de grupos funcionais nitrila permite uma fácil funcionalização, ampliando as possibilidades de aplicação (RYŠÁNEK et al., 2019). Espera-se que os grupos hidroxila e amino presentes na quitosana (ROPER; LIGHTFOOT, 1995) aumentem a capacidade das membranas de PAN para a adsorção de biomoléculas.

A quitosana é solúvel em meio ácido, formando um polímero catiônico após a protonação do grupo amino (NH_3^+). Devido a essas cargas positivas, a quitosana atrai moléculas com superfícies carregadas negativamente. É possível controlar a carga na superfície ajustando o pH do meio, uma vez que a desprotonação dos grupos amino ocorre em meio neutro ou básico. Dessa forma, essa propriedade pode ser explorada para controlar o grau de adsorção de proteínas (ZHAO; WANG; WANG, 2003). Ajustamos o pH da solução tampão de modo a otimizar a capacidade da membrana de PAN/Cs de capturar proteínas. Após a eluição da BSA adsorvida, utilizamos a técnica de UV-Vis para estimar a fração de moléculas liberadas. Observamos que, em valores de pH próximos a 5,0, que corresponde ao ponto isoelétrico da BSA, as membranas modificadas com quitosana apresentam maior capacidade de adsorção da proteína em comparação com as membranas não modificadas.

Além disso, investigamos a capacidade das membranas de PAN e PAN/Cs nos processos de adsorção e dessorção da proteína IgG (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). A proteína IgG, o produto sanguíneo mais consumido no mundo, é utilizada no tratamento de pessoas com AIDS, outras deficiências imunológicas, e doenças autoimunes e infecciosas. Sua produção a

partir do plasma de doadores da mesma população que receberá o medicamento aumenta sua eficácia contra antígenos. Como as proteínas estão presentes em todos os fluidos do corpo humano, e mais de 100 delas desempenham funções fisiológicas no plasma, a adequada separação e caracterização dessas proteínas são passos essenciais para seu uso em diagnósticos e terapias (MATHEW; SANKAR; VARACALLO, 2023). Especificamente, escolhemos trabalhar com IgG (WESTERMEIER, 2016) devido à sua importância no diagnóstico clínico de doenças (ÖZCAN; ÇİFTÇIOĞLU, 2022; MUZZARELLI et al., 2015).

Diversas técnicas, como eletroforese, ensaios bioquímicos, espectroscopia e microscopia eletrônica, podem ser utilizadas para examinar a possível desnaturação de proteínas e avaliar sua integridade estrutural e funcional (KURIEN; SCOFIELD, 2015). Neste estudo, realizamos experimentos de SDS-PAGE para analisar as soluções de IgG em diferentes etapas do processo de separação. A SDS-PAGE é uma das técnicas mais simples, acessíveis e amplamente utilizadas para avaliar a pureza, o peso molecular e possíveis alterações estruturais, como agregação ou fragmentação. (KIRLEY; NORMAN, 2018; MASSON; LUSHCHEKINA, 2022; WESTERMEIER, 2016; RAD, 2012). Como detergente aniônico, o SDS desnatura as proteínas, formando complexos com os polipeptídeos que migram pelo gel de acordo com seu tamanho molecular. O SDS liga-se às proteínas, conferindo-lhes uma carga negativa uniforme proporcional ao tamanho da cadeia polipeptídica. Isso mascara as cargas intrínsecas das proteínas e faz com que a migração no gel dependa principalmente do tamanho molecular, não da carga ou forma. Essa técnica pode ser realizada sob condições redutoras ou não redutoras. No primeiro caso, as proteínas são aquecidas, e um agente redutor, como o beta-mercaptoetanol, é utilizado para romper pontes de dissulfeto ($-S-S-$), desestabilizando estruturas terciárias e quaternárias. Já em condições não redutoras, não se utilizam agentes redutores, preservando as pontes dissulfeto. Nesse caso, a proteína migra como uma unidade mais próxima de sua conformação nativa (KIRLEY; NORMAN, 2018; BASS et al., 2017).

Para avaliar o potencial das membranas PAN/Cs em aplicações realistas, investigamos sua seletividade na adsorção das proteínas BSA e IgG co-dissolvidas em meio aquoso. Considerando as diferenças no Ponto isoelétrico (pI) dessas proteínas, ajustamos o pH das soluções de ligação (pH 6,2 em solução salina) e eluição (pH 10 em Tris-HCl) para otimizar a captura seletiva de IgG e BSA. A escolha dessas proteínas como modelos se deve à sua relevância biológica e industrial, bem como às suas propriedades distintas e comportamentos complementares na adsorção. A BSA (66 kDa, pI = 5) é uma proteína globular amplamente utilizada em formulações farmacêuticas e ideal para investigar interações hidrofóbicas. Já a IgG (150

kDa, pI 6,1–9,0) é um anticorpo de maior complexidade estrutural, fundamental para avaliar seletividade em sistemas de purificação. Além disso, ambas são comercialmente acessíveis, de alta pureza e baixo custo, tornando-se modelos versáteis para o desenvolvimento de técnicas aplicadas à purificação de biofármacos e diagnósticos.

Os resultados demonstraram que as membranas PAN/Cs exibem capacidades de adsorção significativamente maiores em comparação com as membranas PAN não modificadas. A incorporação de quitosana na matriz de PAN aumenta substancialmente a adsorção de proteínas, fornecendo sítios ativos adicionais para interações eletrostáticas com proteínas carregadas negativamente. Essas descobertas oferecem insights valiosos para o desenvolvimento de sistemas de purificação de proteínas mais eficientes e econômicos, avançando as tecnologias de membranas eletrofiadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, apresentaremos os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do nosso trabalho. Inicialmente, discutiremos os conceitos básicos sobre o estudo de polímeros, uma área da ciência dos materiais que investiga a estrutura, as propriedades e o comportamento de longas cadeias moleculares formadas pela repetição de unidades monoméricas. A estrutura e a sequência dessas unidades exercem grande influência sobre as propriedades físicas e químicas dos polímeros.

No contexto deste estudo, destacaremos dois polímeros principais: poliacrilonitrila e quitosana. A poliacrilonitrila, um polímero sintético conhecido por sua estabilidade térmica e excelentes propriedades mecânicas, é amplamente utilizada em aplicações industriais. Já a quitosana, um polímero natural derivado da quitina, apresenta grupos funcionais hidroxila e amino que a tornam especialmente atrativa para aplicações biomédicas, como a adsorção de biomoléculas.

Outro tema relevante são as membranas poliméricas, que desempenham um papel crucial em processos de separação de substâncias dissolvidas em líquidos e gases. Essas membranas se destacam por sua facilidade de fabricação, alta seletividade e ampla aplicação em filtração, purificação e separação.

Abordaremos também a eletrofiação, uma técnica de processamento de polímeros que utiliza um campo elétrico para produzir fibras ultrafinas a partir de uma solução polimérica. Devido a sua versatilidade, a eletrofiação tem sido aplicada em áreas como engenharia de tecidos e liberação controlada de medicamentos, sendo uma ferramenta importante em nosso estudo.

Além disso, exploraremos o papel de proteínas específicas, como BSA e IgG, que são de grande interesse em estudos de interação com polímeros e aplicações biomédicas. A BSA é amplamente utilizada como modelo em estudos de adsorção e transporte de proteínas, enquanto a IgG é um anticorpo essencial em processos imunológicos.

Por fim, realizaremos uma breve revisão da literatura relacionada, abordando os principais avanços e lacunas de pesquisa nas áreas mencionadas. Esse levantamento contextualizará nosso trabalho dentro do cenário científico atual e evidenciará a relevância de nossas contribuições.

2.1 POLÍMEROS

O termo polímero refere-se a materiais formados por longas cadeias moleculares compostas pela repetição de unidades monoméricas ligadas entre si. Esses materiais estão amplamente presentes na natureza, com exemplos como seda, látex, celulose e madeira. Além disso, os polímeros podem ser sintetizados para criar uma vasta gama de materiais com propriedades físicas e químicas distintas (SIEGEL; SAUKKO, 2012).

A diversidade de propriedades físicas dos polímeros contribui para sua ampla aplicação em setores como construção civil e indústria automotiva. Devido à sua durabilidade, resistência mecânica e leveza, são utilizados em componentes estruturais, como tubos e perfis. Além disso, materiais poliméricos são comuns em revestimentos internos e mobiliário, destacando-se pela sua versatilidade, estética e facilidade de processamento (SIEGEL; SAUKKO, 2012).

Os polímeros desempenham um papel essencial na **separação de proteínas**, pois possuem propriedades versáteis que podem ser ajustadas conforme as necessidades do processo. Para essa aplicação, algumas características fundamentais dos polímeros incluem **estabilidade química e mecânica**, essencial para que as membranas resistam a variações de pH, temperatura e forças mecânicas sem comprometer sua eficiência.

A **hidrofilicidade** também desempenha um papel crucial, já que polímeros contendo grupos funcionais hidrofílicos interagem fortemente com as regiões hidrofílicas das biomoléculas, favorecendo a adsorção seletiva. Além disso, uma **alta área superficial** aumenta a capacidade de adsorção e o contato com as proteínas, otimizando o desempenho da separação. Outra propriedade essencial é a **biocompatibilidade**, que se refere à capacidade do material de interagir com sistemas biológicos sem causar reações adversas, como toxicidade ou inflamação, garantindo segurança em aplicações biomédicas. Por fim, a **resistência térmica** é fundamental para manter as propriedades físicas, químicas e mecânicas do polímero estáveis mesmo sob exposição ao calor.

A mistura de **quitosana** com **PAN** apresenta benefícios significativos para a separação de proteínas. A PAN atua como um **suporte estrutural**, conferindo maior robustez e resistência a tensões e deformações, sem interferir diretamente nos grupos funcionais da quitosana. Além disso, essa combinação melhora a **estabilidade química** da membrana, aumentando sua resistência em meios ácidos e básicos, o que a torna uma opção promissora para aplicações que exigem durabilidade e eficiência na adsorção de biomoléculas.

2.1.1 Poliacrilonitrila

A PAN é um polímero polar devido à presença do grupo nitrila em sua estrutura. Essa polaridade influencia sua hidrofiliçidade, que é a capacidade de uma superfície de interagir com a água, ou seja, de se "molhar" facilmente quando em contato com o líquido. Inicialmente, a PAN era insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e inorgânicos, o que dificultava a produção de fibras. No entanto, a introdução do solvente Dimetilformamida (DMF) revolucionou esse processo, permitindo a fabricação de fibras a partir da PAN. Como polímero termoplástico, a PAN apresenta alta resistência química e excelentes propriedades mecânicas, sendo amplamente utilizada como matéria-prima em diversas aplicações, incluindo membranas de ultrafiltração, fibras têxteis, fibras de carbono e, em menor grau, fibras ocas para filtração. Além disso, as fibras de PAN são empregadas em áreas como adsorção de metais pesados, tecnologia aeroespacial, catálise heterogênea e curativos para feridas (XU et al., 2022).

A PAN destaca-se especialmente como precursor na produção de fibras de carbono nanométricas (Nanofibras de carbono (CNFs)). As CNFs têm atraído grande atenção devido as suas características excepcionais, como alta resistência mecânica, estabilidade térmica e condutividade elétrica. Entre os diversos precursores disponíveis, a PAN se sobressai por seu alto rendimento de carbono e pela flexibilidade na modificação estrutural das CNFs finais. O processo de estabilização térmica da PAN resulta na formação de uma estrutura em escada, conferindo maior estabilidade térmica às fibras durante a carbonização (NATARAJ; YANG; AMINABHAVI, 2012).

Embora o monômero de acrilonitrila (Acrilonitrila (AN)) tenha sido descoberto em 1893, a conversão bem-sucedida da PAN em fibras viáveis ocorreu apenas em 1925, após superar os desafios de solubilidade. Além de ser usado na PAN, o AN é amplamente empregado como copolímero, especialmente em combinação com estireno e butadieno para formar o terpolímero ABS, um material conhecido por sua alta resistência e versatilidade em aplicações industriais (NATARAJ; YANG; AMINABHAVI, 2012).

Entre os métodos disponíveis para produzir nanofibras, destaca-se a eletrofiação (electrospinning), uma técnica amplamente utilizada devido à sua eficiência e versatilidade. Desenvolvida na década de 1930, a eletrofiação permite a produção de fibras com diâmetros que variam de 10 *nm* a 10 *µm*. Esse método utiliza uma solução polimérica submetida a um campo eletrostático, o que possibilita a formação de fibras ultrafinas de maneira contínua e econômica, sem a necessidade de equipamentos sofisticados ou altas temperaturas (NATARAJ;

YANG; AMINABHAVI, 2012; RAHAMAN; ISMAIL; MUSTAFA, 2007).

2.1.2 Quitosana

A **quitosana**, obtida pela desacetilação da quitina, é um polímero solúvel em meio ácido que se torna **catiônico** quando seus grupos amino (NH_2) são **protonados**, formando grupos amônio (NH_3^+) (DESAI et al., 2023). Devido à presença dessas cargas positivas, a quitosana apresenta **alta afinidade por moléculas carregadas negativamente**, como proteínas e íons. Sua **carga superficial** pode ser ajustada pelo **pH do meio**, pois, em condições ácidas, os grupos amino permanecem protonados, conferindo uma carga positiva elevada que favorece a **adsorção de proteínas** negativamente carregadas. Já em pH neutro ou básico, ocorre a **desprotonação** desses grupos, reduzindo a carga superficial e, conseqüentemente, a afinidade por proteínas de carga negativa (ZHAO; WANG; WANG, 2003). Essa capacidade de ajuste da carga torna a quitosana uma ferramenta versátil em sistemas de adsorção, especialmente em aplicações que exigem **controle preciso das interações biomoleculares**.

A quitosana apresenta alta viscosidade e baixa solubilidade em água, o que dificulta sua incorporação em nanofibras de alta qualidade. Esses fatores complicam o processamento e limitam a uniformidade e a continuidade das fibras durante a eletrofiação, além de exigir condições específicas de solvente e ajustes no método de preparo para otimizar sua dispersão e estabilidade na matriz fibrosa (AUGUSTINE et al., 2020; ALHARBI et al., 2020). Por esse motivo, no processo de eletrofiação, é comum combinar a quitosana com outros polímeros, visando melhorar a resistência mecânica das membranas resultantes e conferir-lhes propriedades biológicas desejáveis. Essa combinação facilita a formação de fibras contínuas e homogêneas, aprimorando não apenas a estabilidade estrutural das membranas, mas também suas características funcionais, como biocompatibilidade e capacidade de adsorção de biomoléculas (AUGUSTINE et al., 2020; ALHARBI et al., 2020).

Para tanto, é geralmente necessário empregar solventes tóxicos para o ser humano e o meio ambiente, além da utilização de temperaturas mais elevadas de modo a dissolver agentes químicos adicionados que favorecem a reticulação da matriz polimérica, como ácido fórmico, diclorometano, ácido trifluoroacético e glutaraldeído. Ademais, o processo exige a aplicação de altas voltagens e baixas taxas de fluxo na eletrofiação, a fim de obter fibras contínuas e uniformes. Esses ajustes tornam o procedimento mais complexo e requerem rigorosos cuidados com segurança e controle ambiental (AUGUSTINE et al., 2020; ALHARBI et al., 2020; MAKAREMI

et al., 2016). Por outro lado, na produção de nossas membranas compostas, a quitosana, uma vez homogeneamente dispersa na solução de PAN solubilizada, atua como agente de modificação, eliminando a necessidade de solventes tóxicos e agentes de reticulação. Essa abordagem simplifica o processo, tornando-o mais seguro e ambientalmente amigável, além de preservar as propriedades bioativas da quitosana, que potencializam a funcionalidade das membranas sem comprometer sua integridade estrutural.

A **solubilidade** da quitosana pode ser explorada estrategicamente para a captura de proteínas. As proteínas, por sua vez, sofrem **adaptações conformacionais** em resposta às variações de pH, uma vez que o estado de ionização dos seus grupos funcionais se altera. Existe um **pI** característico para cada proteína, no qual ela apresenta **carga líquida zero**. Fora desse pH, a proteína adquire carga positiva ou negativa, o que influencia diretamente sua interação com a quitosana e pode ser explorado para processos seletivos de adsorção.

Diversas formas de quitosana são relatadas na literatura, incluindo hidrogéis (MA et al., 2023), nanopartículas (JU et al., 2020), esferas (POPE et al., 2023), membranas (WENG et al., 2020) e fibras (RISTIĆ et al., 2019). Essas diferentes morfologias ampliam seu uso em aplicações tecnológicas e biomédicas.

No formato de nanofibras, a quitosana se destaca por suas excelentes propriedades mecânicas e estruturais. Assim como em esferas, as fibras de quitosana combinam resistência mecânica e flexibilidade, tornando-se ideais para aplicações que requerem materiais robustos e maleáveis, como biomateriais e processos de adsorção (MIRANDA et al., 2023). Além disso, a estrutura dessas fibras pode ser ajustada para alcançar propriedades físicas e químicas específicas.

A produção de nanofibras de quitosana pode ser realizada por técnicas como a eletrospinning. Nesse processo, uma solução de quitosana é colocada em uma seringa e submetida a alta tensão elétrica. Sob a ação do campo elétrico, a solução é ejetada por um capilar, formando um jato polimérico. Durante o trajeto, o solvente evapora rapidamente, resultando em fibras nanométricas que são depositadas sobre um substrato (BIGOGNO et al., 2022). A eletrospinning possibilita a fabricação de fibras com alta área de superfície e maior porosidade, características essenciais em aplicações que exigem alta capacidade de interação.

A combinação de quitosana com outros polímeros, como a poliacrilonitrila (PAN), permite criar materiais com propriedades sinérgicas. Esses sistemas combinados oferecem maior flexibilidade e controle na captura e liberação controlada de proteínas sob diferentes condições de pH (ZHAO; WANG; WANG, 2003). Isso abre novas possibilidades para aplicações em biotecnologia

e engenharia de tecidos, onde a interação controlada com biomoléculas é fundamental.

2.2 MEMBRANAS POLÍMERICAS

A tecnologia de membranas tem sido amplamente utilizada há décadas em processos de separação de líquidos e gases (LIN; DING, 2020; RULKENS; KONING, 2012). Sua popularidade se deve principalmente à combinação de facilidade de fabricação e operação, alta seletividade e à ausência de regeneração de sorventes (SALEH; GUPTA, 2016).

i) **Vantagens das Membranas Poliméricas:**

1) **Alta seletividade:** As membranas poliméricas podem separar componentes com base em propriedades moleculares, como tamanho, polaridade e carga, tornando-as adequadas para uma ampla gama de aplicações (SALEH; GUPTA, 2016).

2) **Facilidade de modificação:** Elas podem ser facilmente modificadas para melhorar propriedades como seletividade, estabilidade térmica e química, ou capacidade de adsorção, possibilitando sua adaptação a requisitos específicos (RULKENS; KONING, 2012).

3) **Versatilidade de fabricação:** Podem ser produzidas em diferentes formas, incluindo filmes planos, fibras ocas e membranas assimétricas, utilizando métodos como extrusão, eletrofiação e deposição de polímeros (SALEH; GUPTA, 2016).

Devido a essas características, as membranas poliméricas são amplamente empregadas em setores como tratamento de água, separação de gases, purificação e concentração de produtos químicos, biotecnologia e indústria farmacêutica, onde processos de separação eficientes são essenciais (SALEH; GUPTA, 2016).

Em resumo, as membranas poliméricas destacam-se por sua eficiência, facilidade de uso e ampla gama de aplicações, consolidando-se como componentes indispensáveis em diversas tecnologias de separação.

2.2.1 Eletrofiação: Princípios, Processo e Aplicações

A eletrofiação (electrospinning) é uma técnica versátil e eficiente para a produção de nanofibras a partir de polímeros, cerâmicas e compósitos. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo engenharia de materiais, biotecnologia e filtração, devido à capacidade de gerar fibras com alta razão superfície/volume, porosidade controlada e pro-

priedades mecânicas ajustáveis (XUE et al., 2019; THOMAS; GROHENS; NINAN, 2015; QIN, 2015).

i) **Princípios da Eletrofiação:**

O processo de eletrofiação baseia-se no uso de um campo elétrico para estirar uma solução polimérica ou um fundido, convertendo-o em fibras ultrafinas. O princípio fundamental da técnica é a competição entre a força eletrostática aplicada e a tensão superficial da solução. Quando a força eletrostática supera a tensão superficial, o jato polimérico é ejetado da extremidade do capilar e sofre um estiramento contínuo até atingir um coletor.

A formação das nanofibras ocorre devido à instabilidade eletro-hidrodinâmica do jato, levando à deposição aleatória ou controlada sobre o substrato. Esse fenômeno resulta em fibras com diâmetro na escala de nanômetros a micrômetros, dependendo dos parâmetros do processo (QIN, 2015; WASIM et al., 2019).

ii) **Equipamento e Parâmetros do Processo:**

O sistema de eletrofiação consiste basicamente em três componentes principais:

1) **Fonte de alta tensão** (10–30 *kV*), responsável por gerar o campo elétrico necessário para induzir a formação do jato polimérico.

2) **Bomba de Injeção e Seringa**, controla o fluxo da solução polimérica através de um capilar ou agulha metálica.

3) **Coletor**, superfície condutora (geralmente uma placa metálica ou um tambor rotativo) onde as fibras são depositadas (XUE et al., 2019).

Os principais parâmetros que influenciam a morfologia e as propriedades das fibras eletrofiadas incluem:

Concentração e viscosidade da solução polimérica: determinam a formação do jato e a estabilidade do processo. Soluções muito diluídas podem levar à formação de partículas ao invés de fibras, enquanto soluções muito viscosas podem impedir a ejeção do jato.

Tensão elétrica aplicada: deve ser suficientemente alta para superar a tensão superficial da solução, permitindo a formação de um jato contínuo. Tensões inadequadas podem resultar em gotas ou fibras com espessuras irregulares.

Distância entre o capilar e o coletor: influencia o tempo de voo do jato e a evaporação do solvente. Distâncias curtas podem levar à fusão das fibras no coletor, enquanto distâncias muito longas podem reduzir a uniformidade das fibras.

Taxa de fluxo da solução polimérica: afeta a espessura e a continuidade das fibras. Fluxos elevados podem produzir fibras mais grossas e menos uniformes.

Velocidade do coletor: em coletores rotativos, a velocidade pode influenciar a orientação das fibras, permitindo a obtenção de alinhamento controlado.

iii) **Mecanismo de Formação das Fibras:**

O processo de eletrofiação ocorre em três etapas principais:

1) **Formação do Cone de Taylor:** ao aplicar um campo elétrico, a superfície da solução polimérica na ponta do capilar se deforma, formando uma estrutura cônica chamada cone de Taylor.

2) **Emissão do Jato e Estiramento:** quando o campo elétrico atinge um valor crítico, um jato fino é ejetado do vértice do cone. Esse jato sofre um estiramento devido às forças eletrostáticas e começa a se deslocar em direção ao coletor.

3) **Instabilidade e Solidificação:** durante o trajeto, o jato sofre instabilidades de whipping (movimento oscilatório), que ajudam a reduzir ainda mais o diâmetro da fibra. Ao longo desse percurso, o solvente evapora, resultando na deposição de fibras secas sobre o coletor.

iv) **Aplicações da Eletrofiação:**

A eletrofiação tem sido explorada em diversas aplicações devido à capacidade de produzir fibras com alta porosidade e grande área superficial. Algumas das principais áreas de aplicação incluem:

Engenharia de Tecidos e Biomateriais: produção de scaffolds biocompatíveis para regeneração tecidual e liberação controlada de fármacos.

Filtração de Ar e Água: membranas eletrofiadas são altamente eficientes na captura de partículas finas e contaminantes. Sensores e Dispositivos Eletrônicos: Uso de nanofibras condutoras para desenvolvimento de sensores flexíveis e baterias avançadas.

Purificação de Proteínas e Bioseparações: membranas eletrofiadas podem ser projetadas para adsorção seletiva de biomoléculas, como proteínas e anticorpos.

Vários estudos anteriores exploraram o uso de membranas poliméricas eletrofiadas para a separação e purificação de proteínas. Li et al. (LI et al., 2017) desenvolveram uma membrana nanofibrosa eletrofiada controlável por pH (NFM) após funcionalizar membranas de poliácridonitrila (PAN) com lisina (LYS) para a adsorção seletiva de pepsina e lisozima, obtendo uma capacidade máxima de adsorção (q_e^{max}) de 425,49 mg/g para pepsina e 54,98 mg/g para

lisozima. Além da excelente seletividade, essa membrana mostrou-se reutilizável. Por meio de eletrofição multicomponente e nanodoping, Fan et al. (FAN et al., 2015) prepararam uma membrana nanofibrosa de carbono com poros hierárquicos (CNF), que exibiu alta capacidade de adsorção para a BSA, alcançando 30 mg/g .

Esfahani et al. (ESFAHANI et al., 2016) criaram uma superfície positivamente carregada em nanofibras de Nylon-6 eletrofiadas (NFs), ao incorporar nanopartículas de hidroxiapatita dopadas com zinco, melhorando a adsorção seletiva de moléculas de BSA carregadas negativamente. Essa membrana foi capaz de separar 250 mg/cm^3 de BSA após uma hora de filtração.

Soldan et al. (SOLDAN; NUNES, 2021) desenvolveram membranas poliméricas funcionalizadas com nanopartículas de ouro e compostos de politiol, aplicadas na separação de anticorpos em uma corrente contendo diversas biomoléculas. Além disso, membranas de PAN e polisulfona (PSf), funcionalizadas com enxerto de ligantes de amina terciária (poli(metacrilato de glicidila - GMA)) por polimerização UV, foram utilizadas na formação de membranas baseadas em troca iônica (IEX) com dietilamina (DEA) para a captura de BSA (CHEN; WICKRAMASINGHE; QIAN, 2020). Para as membranas eletrofiadas de PAN e PSf funcionalizadas, foram obtidas capacidades de ligação estática e dinâmica na ordem de aproximadamente 100 mg/mL e 200 mg/mL , respectivamente, embora fosse necessário um tempo relativamente longo (~ 12 horas) para saturação do processo.

Esses estudos representam avanços significativos na área de purificação e separação de proteínas, fornecendo insights para o desenvolvimento de membranas com propriedades específicas de adsorção seletiva para proteínas de interesse.

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS

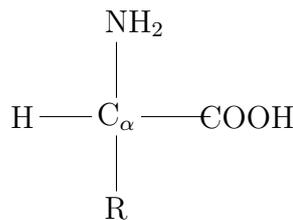
As proteínas são macromoléculas biológicas essenciais para os organismos vivos, formadas por **aminoácidos** ligados por ligações peptídicas. Existem 20 aminoácidos comuns, cada um com um átomo de **carbono central** (C_α) ligado covalentemente a um átomo de **hidrogênio** (H), um grupo **amino** ($\alpha - amino$), um grupo **carboxilo** ($\alpha - carboxilo$) e uma **cadeia lateral** (R). A cadeia lateral determina as propriedades específicas de cada aminoácido, como polaridade, carga elétrica e características químicas (KESSEL; BEN-TAL, 2010; BHAKTA et al., 2015). A sequência de aminoácidos define a **estrutura primária** de uma proteína (KESSEL; BEN-TAL, 2010).

i) **Estrutura Geral de um Aminoácido:**

A Figura 1 representa a estrutura genérica de um aminoácido, com os seguintes componentes:

- **H:** Átomo de hidrogênio ligado ao carbono central (C_{α}).
- **N:** Átomo de nitrogênio do grupo amina.
- **C:** Átomo de carbono central (C_{α}).
- **COOH:** Grupo carboxílico.
- **R:** Cadeia lateral (C_{β}), que confere propriedades únicas ao aminoácido.

Figura 1 – Fórmula estrutural genérica de um aminoácido, com o carbono alfa (C_{α}) destacado.



ii) **Funções das Proteínas:**

As proteínas exercem diversas funções vitais nos organismos vivos, incluindo (MORRIS; BLACK; STOLLAR, 2022):

- 1) **Catálise de processos metabólicos:** Enzimas aceleram reações bioquímicas essenciais (KESSEL; BEN-TAL, 2010).
- 2) **Armazenamento e transporte de oxigênio:** Hemoglobina e mioglobina transportam e armazenam oxigênio (BHAKTA et al., 2015).
- 3) **Regulação da expressão genética:** RNA polimerases e fatores de transcrição controlam a expressão gênica.
- 4) **Transporte transmembranar:** Proteínas de membrana (como canais e transportadores) facilitam o transporte seletivo de moléculas e íons.
- 5) **Comunicação celular:** Hormônios proteicos (ex.: insulina) e fatores de crescimento (ex.: EGF) desempenham papéis importantes na sinalização celular.
- 6) **Defesa imunológica:** Anticorpos reconhecem e neutralizam patógenos.

7) **Estrutura e suporte:** Proteínas como colágeno e actina formam estruturas intracelulares e extracelulares.

iii) **Organização Estrutural:**

As proteínas possuem uma estrutura hierárquica composta por quatro níveis, primário, secundário, terciário e quaternário (Fig. 2), o que contribui para sua complexidade e funcionalidade, permitindo que desempenhem uma ampla variedade de funções biológicas (KESSEL; BEN-TAL, 2010; BHAKTA et al., 2015; MORRIS; BLACK; STOLLAR, 2022).

1) **Primária:** Sequência linear de aminoácidos, a qual define a função e as propriedades da proteína .

A partir dessa sequência, ocorrem interações entre aminoácidos vizinhos que levam à formação de estruturas secundárias.

2) **Secundária:** É caracterizada pela organização local da cadeia polipeptídica e inclui arranjos locais, como α – hélices e β – folhas estabilizados por ligações de hidrogênio.

As α -hélices são formadas por aminoácidos dispostos em uma espiral regular, estabilizada por ligações de hidrogênio entre o grupo carbonila ($C = O$) de um resíduo e o grupo amino ($N - H$) de outro resíduo situado quatro posições à frente na sequência polipeptídica. Já as β -folhas consistem em segmentos da cadeia polipeptídica que se alinham lado a lado em uma estrutura estendida, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre grupos carbonila e amino de diferentes segmentos. Esses segmentos podem se organizar de forma paralela, com todas as cadeias na mesma direção, ou antiparalela, com cadeias orientadas em direções opostas.

Além das estruturas secundárias, as proteínas apresentam níveis adicionais de hierarquia. A estrutura terciária é o arranjo tridimensional completo da proteína, enquanto a estrutura quaternária ocorre quando a proteína é composta por várias subunidades. Esses níveis conferem complexidade e funcionalidade adicionais, permitindo que as proteínas desempenhem uma grande variedade de papéis biológicos (KESSEL; BEN-TAL, 2010; BHAKTA et al., 2015).

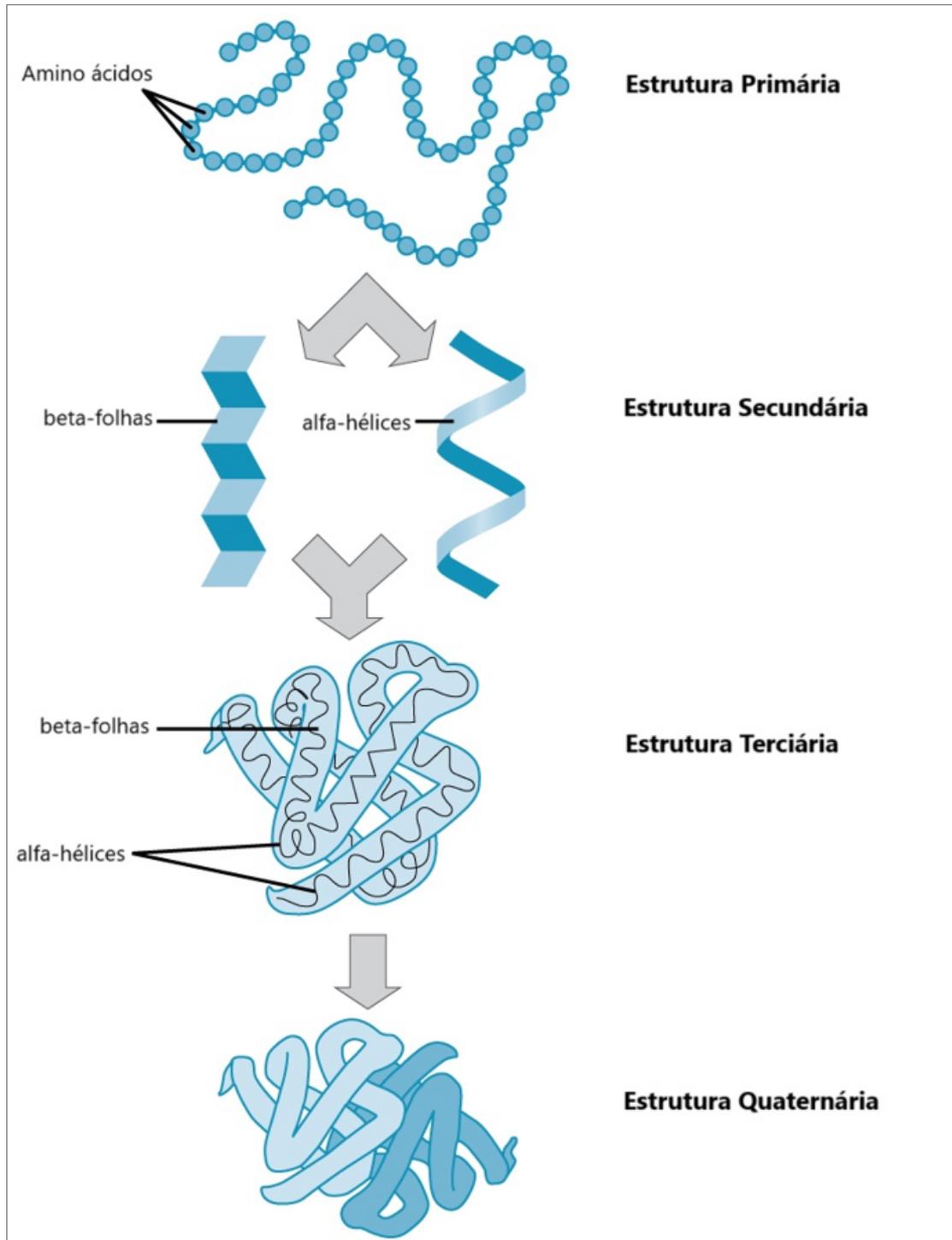
3) **Terciária:** Conformação tridimensional completa.

4) **Quaternária:** Organização de múltiplas subunidades proteicas.

iv) **Propriedades Físico-Químicas**

As proteínas, em solução aquosa, formam uma camada elétrica dupla devido à presença de grupos ionizáveis, e suas cargas líquidas variam conforme o pH do meio. O pI, no qual a carga líquida da proteína é zero, desempenha um papel crucial em processos como eletroforese

Figura 2 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas.



Fonte: RYE ROBERT WISE (2024)

e na formulação de bioprodutos, influenciando diretamente a solubilidade e estabilidade das proteínas (KIRKWOOD et al., 2015; KRAUSS et al., 2013). Na eletroforese, por exemplo, o pI é utilizado para separar proteínas com base em suas cargas elétricas. Além disso, o conhecimento do pI é essencial na formulação de produtos farmacêuticos e na otimização de processos

biotecnológicos, pois afeta as interações proteicas em diferentes ambientes.

No pl, a minimização da repulsão eletrostática entre moléculas de proteína reduz a solubilidade e favorece a agregação. Esse comportamento facilita a formação de agregados devido a interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. A disposição de cargas nas proteínas influencia sua conformação estrutural e suas interações com meios biológicos ou materiais, impactando propriedades como adsorção e solubilidade (KIRKWOOD et al., 2015; KRAUSS et al., 2013; PHAM; MENG, 2020).

v) **Classificação das Proteínas**

As proteínas podem ser diferenciadas com base em sua composição e forma, e nas funções que desempenham nos organismos vivos.

1) **Por Composição:**

- **Homoproteínas:** compostas exclusivamente por aminoácidos. Exemplos incluem albumina, queratina e insulina.
- **Heteroproteínas:** Contêm grupos prostéticos. Esses grupos podem ser de natureza lipídica (lipoproteínas), fosfato (fosfoproteínas), carboidrato (glicoproteínas), metal (metaloproteínas) ou ácido nucleico (nucleoproteínas).

2) **Por Forma:**

- **Globulares:** são caracterizadas por sua forma aproximadamente esférica ou elipsoidal, resultante do dobramento das cadeias polipeptídicas de forma compacta. Esse dobramento permite que as regiões hidrofóbicas fiquem voltadas para o interior, enquanto as regiões hidrofílicas ficam na superfície, o que contribui para a solubilidade em água, embora esta possa variar dependendo da proteína específica. A hemoglobina é um exemplo clássico de proteína globular.
- **Fibrosas:** apresentam uma estrutura alongada, semelhante a uma lâmina ou filamento, devido ao arranjo linear das cadeias polipeptídicas. Exemplos incluem o colágeno e a queratina, que são praticamente insolúveis em água.

A forma e a solubilidade das proteínas estão intimamente relacionadas com sua **função biológica**, refletindo a diversidade de papéis que desempenham nos sistemas vivos. De modo geral, proteínas globulares estão associadas a funções dinâmicas, como catálise (enzimas),

transporte (hemoglobina), regulação (hormônios), e defesa (anticorpos). Sua solubilidade em água permite que atuem eficientemente em ambientes aquosos, como o citoplasma ou o plasma sanguíneo. Já as proteínas fibrosas desempenham funções estruturais, como fornecer suporte e resistência, como no caso do colágeno (tecido conjuntivo) e da queratina (cabelos e unhas).

Essas classificações refletem a diversidade estrutural e funcional das proteínas, fundamentais para a complexidade dos processos biológicos (KESSEL; BEN-TAL, 2010; BHAKTA et al., 2015). Por fim, é importante notar que essa classificação não é rígida; algumas proteínas podem apresentar características intermediárias ou não se encaixar perfeitamente nessas categorias.

2.3.1 Albumina de Soro Bovino (BSA): Estrutura e Aplicações

A BSA é uma proteína globular amplamente utilizada em estudos bioquímicos, com uma massa molecular aproximada de 66 *kDa* (HAMES, 1998). Devido à sua estabilidade e baixa interferência em reações biológicas, a BSA é empregada em diversas áreas, como imunologia, bioquímica e biotecnologia. Nessas áreas, pesquisadores têm investigado diferentes estratégias e avanços tecnológicos para aprimorar os métodos de purificação e separação de proteínas, visando maior eficiência, pureza e rendimento.

i) Aplicações Bioquímicas:

A BSA é amplamente utilizada em ensaios imunológicos, incluindo ensaios ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), testes de imunoblot (Western blot e dot blot), além de na imunocitoquímica (imunohistoquímica e microscopia de imunofluorescência) (HAMES, 1998).

ii) Estrutura Molecular e Propriedades:

A BSA contém 35 resíduos de cisteína, responsáveis por formar 17 pontes dissulfeto intramoleculares, conferindo estabilidade estrutural e resistência a condições adversas. Essas pontes criam pequenos loops que reforçam sua conformação tridimensional. Além disso, a BSA possui um grupo sulfidrila livre, que pode ser quimicamente ativo em determinadas condições.

Notavelmente, a BSA compartilha cerca de 76% de similaridade estrutural com a albumina do soro humano (HSA), incluindo composição de aminoácidos e organização tridimensional. Tal semelhança faz com que ambas as proteínas apresentem funções biológicas e propriedades físico-químicas comparáveis, sendo úteis em estudos de transporte de substâncias, interação

com fármacos e aplicações biomédicas (CAO et al., 2013).

iii) **Comportamento Eletrostático e Ponto Isoelétrico:**

A carga elétrica da BSA varia conforme o pH do meio. Abaixo do *pI*, entre 4,7 e 5,0 a proteína possui carga líquida positiva, enquanto que acima do *pI* a BSA apresenta carga líquida negativa. Essa característica eletrostática é explorada em processos de separação e adsorção, como eletroforese e modificação de superfícies, para purificação ou imobilização de biomoléculas. A capacidade da BSA de se ligar a diferentes materiais por interações eletrostáticas facilita seu uso em diversas aplicações biotecnológicas, como a entrega de fármacos, a biofuncionalização de superfícies e a fabricação de biossensores. (SALIS et al., 2011; YU et al., 2024).

iv) **Conformações Estruturais:**

A BSA pode adotar diferentes conformações estruturais (isômeros) em resposta a alterações no pH do meio, o que impacta suas propriedades e funções. A conformação nativa, ou forma normal (**N**), ocorre quando o pH está entre 5,0 e 7,0. A forma básica (**B**) é observada em pH entre 8,0 e 10,0. Quando o pH ultrapassa 10,0, a BSA é considerada estar na forma envelhecida (**A**). Existe ainda uma faixa de transição chamada migração rápida (**F**), na qual a BSA apresenta uma conformação parcialmente expandida, ocorrendo em pH entre 3,0 e 4,3. Por fim, a conformação expandida (**E**) da BSA é encontrada em valores de pH abaixo de 2,7. Essas variações conformacionais refletem a sensibilidade da BSA ao pH, influenciando suas propriedades e interações em diferentes contextos biológicos e tecnológicos (BEYKAL et al., 2015; JACHIMSKA; PAJOR, 2012).

2.3.1.1 Fatores Influenciando a Adsorção da BSA em Membranas de PAN e PAN/Cs

O comportamento de adsorção da BSA em membranas de PAN/Cs está intimamente ligado à composição de seus aminoácidos, à distribuição de cargas na molécula da proteína e às características químicas do adsorvente, fatores que são fortemente influenciados pelo pH do meio.

i) **Influência do pH no Processo de Adsorção:**

O pH do meio tem papel crucial na ionização dos grupos funcionais da BSA e da superfície das membranas (LI et al., 2017). No *pI* da BSA, a proteína possui carga líquida nula, o

que reduz repulsões eletrostáticas internas e facilita interações hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio com a superfície do adsorvente (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Abaixo do pI , a BSA é carregada positivamente, enquanto acima do pI , ela adquire carga negativa devido à desprotonação de seus grupos carboxílicos ($-COO^-$), ou seja,

- **Abaixo do pI :** a BSA é carregada positivamente devido à protonação de seus grupos funcionais.
- **Acima do pI :** a proteína adquire carga negativa, pois os grupos carboxílicos se desprotonam.

Essas mudanças afetam a interação eletrostática com a quitosana, cujos grupos amino ($-NH_2$) se protonam em pH ácido, conferindo carga positiva. Isso favorece interações eletrostáticas atrativas quando a BSA é negativamente carregada, otimizando a adsorção. Assim, o pH do meio pode ser ajustado para otimizar a adsorção ou promover a dessorção seletiva de proteínas.

ii) **Interações entre Quitosana e BSA em Diferentes Faixas de pH:**

As interações entre a BSA e as membranas de PAN/quitosana variam conforme o pH.

1) **pH Ácido (abaixo do pI da BSA):** Tanto a BSA quanto a quitosana são carregadas positivamente, resultando em repulsão eletrostática e reduzindo a eficiência de adsorção.

2) **pH Próximo ao pI da BSA:** a carga líquida da BSA é próxima de neutra, enquanto a quitosana permanece protonada. Nessa faixa de pH, as interações eletrostáticas são minimizadas.

3) **pH Básico (acima do pI da BSA):** a BSA adquire carga negativa, enquanto os grupos amino da quitosana permanecem protonados em pH levemente ácido. É importante destacar que, ao considerar a faixa de pH levemente ácido em que ocorre a adsorção da BSA pelas membranas, é provável que as cargas negativas nas membranas estejam neutralizadas ou diminuídas, permitindo uma interação favorável com a proteína carregada negativamente. Interações eletrostáticas atrativas entre os grupos $-NH_3^+$ (quitosana) e $-COO^-$ (BSA) resultam em uma adsorção eficiente. Já em pH fortemente básico, a carga negativa tanto da membrana quanto da BSA reduz drasticamente a adsorção devido à repulsão eletrostática.

Portanto, a adsorção máxima da BSA pela quitosana ocorre em pH ligeiramente básico ou levemente ácido, onde a BSA está carregada negativamente e os grupos amino da quitosana estão protonados.

iii) **Mecanismos de Interação entre BSA e Quitosana:**

Os principais mecanismos de interação entre a BSA e os grupos funcionais das membranas de PAN/Cs incluem:

1) **Interações eletrostáticas:** em condições favoráveis do pH, grupos $-NH_3^+$ da quitosana interagem com $-COO^-$ da BSA.

2) **Ligações de hidrogênio:** grupos hidroxila ($-OH$) da quitosana formam pontes de hidrogênio com os grupos funcionais (amino e carboxílicos) da BSA.

3) **Interações hidrofóbicas:** resíduos hidrofóbicos da BSA, expostos em pH ácido ou próximo ao pl, podem interagir com regiões apolares das membranas.

iv) **Características dos Aminoácidos da BSA:**

A sequência de aminoácidos da BSA influencia sua interação com a superfície das membranas:

- **Aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina e histidina):** são aminoácidos básicos com cargas positivas em pH abaixo de seu ponto isoelétrico. Eles participam principalmente de interações eletrostáticas com grupos carregados negativamente, como carboxilas.
- **Aminoácidos polares não carregados (glutamina e asparagina):** contribuem para ligações de hidrogênio.
- **Aminoácidos apolares (triptofano):** assim como outros aminoácidos hidrofóbicos, facilita interações hidrofóbicas, essenciais para a estabilização da adsorção em superfícies apolares.

A lisina, mais abundante na BSA (59 resíduos), seguida pela arginina (23 resíduos) e pela histidina (17 resíduos). No pl da BSA, a proteína adota uma conformação compacta e estável, minimizando repulsões internas. Aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina, histidina) permanecem expostos na superfície, enquanto grupos carregados negativamente (carboxílicos) tendem a se localizar internamente. Essa conformação facilita interações específicas entre os grupos amino da proteína e os grupos funcionais da quitosana, promovendo adsorção seletiva. Devido a esse comportamento, a BSA tem a capacidade de se ligar de maneira reversível com diferentes materiais, por meio de ligações eletrostáticas (MALEKI; MORADI; TAHMASEBI, 2017; MCCLELLAN; FRANSES, 2003; KOPAC; BOZGEYIK; YENER, 2008; BEYKAL et al., 2015; PETERS, 1995).

v) **Impacto da Solução de Ligação:**

A solução de ligação, ajustada para pH próximo ao pl da BSA, favorece condições ideais para a interação proteína-membrana, de forma que minimiza repulsões entre moléculas da BSA.

Tendo esses pontos em consideração realizamos experimentos para investigar como o pH do meio e o valor da concentração inicial da proteína BSA afetariam sua capacidade de adsorção das membranas de PAN e PAN/Cs.

2.3.2 Imunoglobulinas: Estrutura e Função

As imunoglobulinas (anticorpos) são glicoproteínas essenciais para a resposta imune humoral, constituindo cerca de 20% das proteínas plasmáticas. Produzidas por células plasmáticas, derivadas das células B, elas reconhecem e neutralizam uma ampla gama de antígenos, como microrganismos e toxinas. Essas proteínas desempenham um papel crucial no sistema imunológico, sendo responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos, como bactérias, vírus, fungos, e parasitas, além de reconhecer antígenos celulares, produtos químicos e substâncias sintéticas (BENGTEN et al., 2000; BURTON, 1990).

As células B do sistema imunológico são ativadas por imunógenos específicos, como proteínas bacterianas, e passam por um processo de diferenciação, transformando-se em células plasmáticas. Essas células especializadas têm como função principal a produção e secreção de imunoglobulinas para combater agentes invasores (BURTON, 1990).

As imunoglobulinas são essenciais para a resposta imune humoral, pois atuam como identificadores de antígenos, facilitando sua neutralização e eliminação pelo sistema imunológico. Além disso, desempenham um papel importante em processos inflamatórios e na opsonização, ou seja, a marcação de antígenos para facilitar sua fagocitose (BURTON, 1990).

i) **Estrutura Molecular:**

Com uma estrutura complexa, essas moléculas são compostas por uma ou mais unidades funcionais, cada uma contendo quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas idênticas (**H**) e duas cadeias leves idênticas (**L**), que se combinam para formar diferentes tipos de anticorpos, cada um específico para um determinado antígeno (BENGTEN et al., 2000). Essas cadeias formam uma estrutura quaternária específica, com regiões variáveis (responsáveis pelo reconhecimento do antígeno) e regiões constantes (responsáveis por funções efetoras, como

ativação do complemento).

ii) **Tipos Principais de Imunoglobulinas:**

Em humanos, existem cinco classes principais de imunoglobulinas, cada uma com funções e características específicas (HJELHOLT et al., 2013; BENGTEEN et al., 2000; VASILEV et al., 2016; PALMEIRA et al., 2012; DAHA; KOOTEN, 2016; MAURER et al., 2018):

1) **IgM (Imunoglobulina M):** É o primeiro tipo de anticorpo produzido durante uma resposta imune inicial. É geralmente encontrado na forma de pentâmeros, o que lhe confere uma maior eficácia na aglutinação de antígenos. IgM está envolvida na resposta imune primária e na neutralização de toxinas.

2) **IgG (Imunoglobulina G):** É o tipo mais abundante de imunoglobulina no sangue e nos fluidos corporais. IgG é produzida em resposta a infecções anteriores ou após a administração de vacinas. Ela pode atravessar a placenta, fornecendo proteção imune passiva para o feto. IgG é importante na resposta imune secundária, opsonização de antígenos para fagocitose, ativação do sistema complemento e neutralização de toxinas.

3) **IgA (Imunoglobulina A):** É encontrada principalmente nas secreções mucosas, como saliva, lágrimas, leite materno e muco. A IgA desempenha um papel essencial na proteção das superfícies mucosas contra patógenos, impedindo sua adesão e invasão.

4) **IgE (Imunoglobulina E):** É associada a reações alérgicas e respostas de hipersensibilidade. A IgE está envolvida na resposta imune contra parasitas e desempenha um papel na liberação de histamina e outras substâncias químicas envolvidas nas reações alérgicas.

5) **IgD (Imunoglobulina D):** Sua função ainda não é totalmente compreendida, mas acredita-se que esteja envolvida na ativação das células B e na regulação da resposta imune.

Cada tipo de imunoglobulina desempenha um papel específico na resposta imune, proporcionando defesa contra diversos tipos de patógenos e substâncias estranhas. A presença desses anticorpos é, portanto, essencial para um sistema imunológico saudável e eficaz.

iii) **Imunoglobulina G (IgG) - Estrutura, Função e Aplicações:**

A IgG destaca-se por sua alta especificidade e abundância no soro humano, constituindo aproximadamente 75% das imunoglobulinas séricas totais, com sua concentração variando entre 10–16 mg/mL. É uma molécula central na resposta imune adaptativa, especialmente na resposta secundária, desempenhando múltiplas funções protetoras contra patógenos e toxinas (SCIENTIFIC, 2017; SCIENTIFIC, 2016; WU; BREYDO, 2014).

1) Estrutura da IgG:

A IgG é composta por quatro cadeias polipeptídicas:

- Duas cadeias pesadas (gama, 53 *kDa* cada).
- Duas cadeias leves (kappa ou lambda, 25 *kDa* cada).

Essas cadeias estão unidas por pontes dissulfeto, formando uma estrutura em forma de **Y** com duas regiões principais:

- **Região Fab** (Fragment antigen-binding): Contém os sítios de ligação ao antígeno. É responsável pela especificidade da IgG para diferentes antígenos.
- **Região Fc** (Fragment crystallizable): Responsável pelas funções efetoras, como ativação do sistema complemento e interação com receptores Fc em células imunes.

2) Subclasses de IgG:

Em humanos, a IgG possui quatro subclasses, cada uma com funções e características específicas:

- **IgG1:** Mais abundante (60-70% do total de IgG). Excelente na opsonização e neutralização de toxinas.
- **IgG2:** Responde principalmente a antígenos polissacarídicos. Menos eficiente na ativação do sistema complemento.
- **IgG3:** Mais eficaz na ativação do complemento devido a sua região Fc alongada.
- **IgG4:** Envolvida em respostas a antígenos proteicos e associada a reações de hipersensibilidade tardia.

3) Funções da IgG:

- **Neutralização de Patógenos e Toxinas:** a IgG se liga diretamente a vírus, bactérias e toxinas, bloqueando sua capacidade de invadir células hospedeiras.
- **Opsonização:** marca antígenos para fagocitose por células imunes, como macrófagos e neutrófilos.

- **Ativação do Sistema Complemento:** a ligação da IgG a antígenos desencadeia a via clássica do complemento, promovendo a lise de patógenos.
- **Imunidade Passiva:** única imunoglobulina capaz de atravessar a placenta, fornecendo imunidade passiva ao feto durante a gravidez.
- **Regulação da Resposta Imune:** a IgG também participa de processos de feedback negativo, ajudando a modular a atividade do sistema imunológico e evitar reações excessivas ou danos aos tecidos saudáveis.

4) Aplicações em Pesquisa e Diagnóstico:

Devido à sua alta especificidade e abundância, a IgG é amplamente utilizada em diversas áreas:

- **Imunoensaios:** ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) são testes de detecção de antígenos ou anticorpos específicos.
- **Western Blot:** identificação de proteínas específicas em amostras complexas.
- **Terapias Monoclonais:** anticorpos monoclonais baseados em IgG são amplamente usados no tratamento de doenças como câncer, doenças autoimunes e infecções.
- **Vacinas:** a produção de IgG é uma resposta desejada após a administração de vacinas, garantindo imunidade de longo prazo.
- **Purificação e Separação:** a IgG é alvo em tecnologias de separação, como cromatografia de afinidade, para isolamento de anticorpos em pesquisas biomédicas.
- **Diagnóstico Clínico:** IgG é frequentemente medida para avaliar imunidade adquirida ou presença de infecções passadas, como em testes para COVID-19 ou doenças autoimunes (WU; BREYDO, 2014).

2.3.3 Métodos de Purificação de Proteínas

A purificação de proteínas é uma etapa essencial para o estudo detalhado de suas propriedades e funções. A pureza das proteínas é crucial em diversas investigações científicas, como análises estruturais, estudos funcionais, desenvolvimento de medicamentos e aplicações

biotecnológicas. Essa purificação baseia-se em propriedades intrínsecas das proteínas que podem variar amplamente, como carga elétrica, pI, tamanho molecular, polaridade, solubilidade e afinidade por ligantes específicos. Essas diferenças são exploradas para separar e purificar proteínas de amostras complexas (RABE; VERDES; SEEGER, 2011; LI et al., 2017; SMITH, 2017).

Entre os métodos mais utilizados estão (LI et al., 2017; LIU et al., 2020; SMITH, 2017):

1) **Filtração e Precipitação:**

A filtração é usada para remover partículas grandes ou insolúveis, já a precipitação, como com sulfato de amônio, explora diferenças de solubilidade.

2) **Cromatografia:**

- **Troca iônica:** separa proteínas com base em diferenças de carga elétrica.
- **Afinidade:** utiliza interações específicas entre a proteína-alvo e um ligante imobilizado na matriz para facilitar a separação.
- **Interação hidrofóbica:** baseia-se nas diferenças de hidrofobicidade entre as proteínas (COSKUN, 2016).

Apesar de sua eficiência, a cromatografia apresenta limitações, como alto custo, necessidade de grandes volumes de solventes e sais, além de ser um processo demorado e de difícil aplicação em escala industrial (ARUNKUMAR; ETZEL, 2014).

3) **Eletroforese:**

Técnica comum que separa proteínas conforme seu tamanho molecular e carga elétrica. Um exemplo é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), amplamente usada para caracterização de proteínas (HAMES, 1998). Uma análise mais detalhada sobre a técnica de eletroforese será apresentada posteriormente.

Cada um desses métodos apresenta vantagens e limitações, e a escolha da técnica adequada depende das propriedades específicas da proteína de interesse e das necessidades da pesquisa ou aplicação em questão. A combinação de diferentes métodos de separação é muitas vezes empregada para alcançar uma purificação mais completa e eficiente das proteínas desejadas. Pesquisas recentes têm se dedicado ao desenvolvimento de novos materiais e tecnologias que possam superar desafios. Nesse contexto, os processos de separação de proteínas por membranas têm recebido grande atenção (SAXENA et al., 2009).

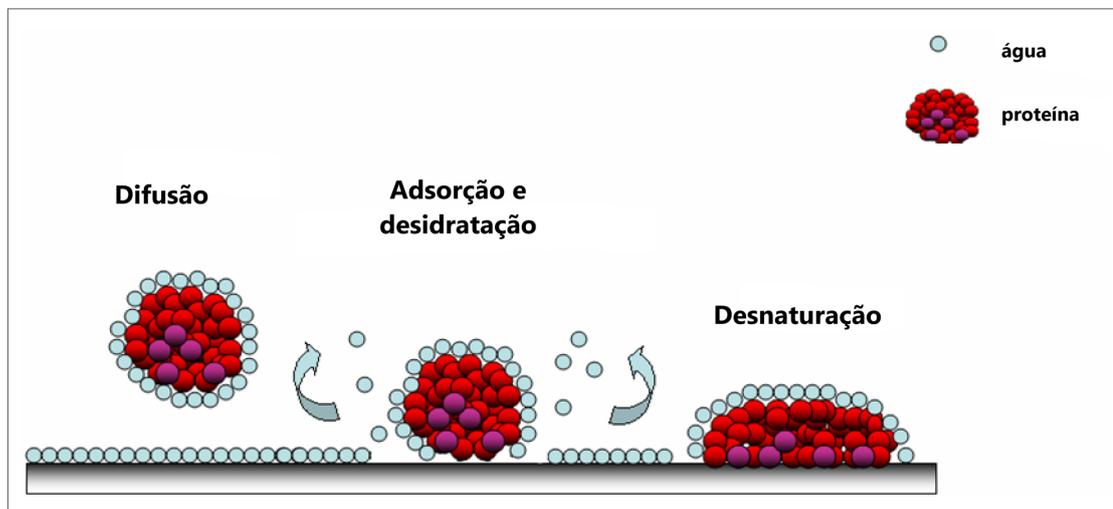
A separação por membranas tem se destacado como uma alternativa eficiente. Esse método é geralmente mais econômico, requer menos solventes e sais e é mais rápido. Sistemas de

membranas são mais simples de operar e podem ser funcionalizados com grupos químicos específicos, que interagem seletivamente com proteínas-alvo, resultando em separações precisas (SAXENA et al., 2009; MA; RAMAKRISHNA, 2008).

Um exemplo é a utilização de colunas de centrifugação (spin columns), que combinam simplicidade e eficiência, permitindo a separação de proteínas com mínima perda e degradação (MA; RAMAKRISHNA, 2008). Essas colunas são ideais para aplicações biotecnológicas, possibilitando a produção de proteínas altamente purificadas de forma rápida, econômica e sustentável (SAXENA et al., 2009; MA; RAMAKRISHNA, 2008).

Em síntese, os processos de separação de proteínas por membranas baseiam-se em propriedades como carga elétrica, pI , tamanho, polaridade, solubilidade e afinidade específica, visando a obtenção de proteínas purificadas por métodos de adsorção em interfaces sólidas. A natureza hidrofílica ou hidrofóbica dessas superfícies desempenha um papel crucial nesse contexto, influenciando diretamente o arranjo estrutural das proteínas que interagem com elas (Fig. 3) (PONCIN-EPAILLARD et al., 2012).

Figura 3 – Adsorção de proteína em uma superfície polimérica; a difusão da proteína hidratada, possibilidades de adsorção e desidratação.



Fonte: PONCIN-EPAILLARD et al. (2012)

Quando uma proteína entra em contato com uma superfície hidrofóbica, a interação ocorre predominantemente por meio de seus aminoácidos hidrofóbicos. Esses aminoácidos, normalmente localizados no interior da proteína para preservar sua estrutura, são então expostos, resultando no desdobramento da proteína e na dispersão de seu núcleo hidrofóbico sobre a superfície. Por outro lado, ao interagir com uma superfície hidrofílica, as proteínas estabelecem ligações através de seus grupos funcionais polares, que se conectam aos grupos carregados

da interface. Nesse ambiente, a tendência de desdobramento irreversível é significativamente menor, preservando a integridade estrutural da proteína (PONCIN-EPAILLARD et al., 2012).

Os processos de purificação por membranas frequentemente envolvem a imobilização de proteínas em interfaces sólidas. Existem duas principais estratégias: adsorção não covalente e imobilização covalente. Na adsorção não covalente, as proteínas se ligam passivamente à superfície sólida por meio de interações físicas ou químicas. Essas interações físicas ocorrem em superfícies hidrofóbicas, enquanto as interações químicas envolvem ligações eletrostáticas com superfícies carregadas. Uma vantagem desse método é a ausência de reagentes de acoplamento ou modificações na proteína de interesse, além de ser um processo reversível, o que facilita a dessorção da proteína (WONG; KHAN; MICKLEFIELD, 2009). A imobilização covalente, por outro lado, envolve a formação de ligações químicas estáveis entre a proteína e a superfície sólida. Esse processo normalmente exige a introdução de grupos químicos reativos tanto na proteína quanto na superfície, permitindo a ligação covalente. Esse método proporciona uma imobilização mais estável e duradoura, mas pode exigir reagentes específicos e etapas adicionais de modificação da proteína (WONG; KHAN; MICKLEFIELD, 2009).

Cada estratégia de imobilização apresenta vantagens e desvantagens. A adsorção não covalente é mais simples e reversível, facilitando a dessorção da proteína, enquanto a imobilização covalente oferece maior estabilidade da ligação, mas pode requerer modificações e reagentes adicionais. A escolha da estratégia ideal depende das necessidades específicas da aplicação, considerando fatores como estabilidade da ligação, reversibilidade, simplicidade do processo e preservação da atividade da proteína imobilizada.

2.3.4 Mecanismos de Adsorção

A adsorção é um fenômeno de transferência de massa que ocorre na interface entre duas fases, resultando na adesão de substâncias em uma superfície específica. Esse processo pode acontecer em várias interfaces, como líquido-sólido, líquido-líquido, líquido-gás e gás-sólido (DĄBROWSKI, 2001).

Nos processos de separação de biomoléculas por membranas, a adsorção desempenha um papel fundamental, especialmente em interfaces líquido-sólido, que são comumente utilizadas na extração em fase sólida. Esse tipo de adsorção facilita a separação, recuperação e purificação de compostos dissolvidos em um meio fluido. Nessa abordagem, a superfície sólida, denominada adsorvente, captura os compostos de interesse (adsorbatos) presentes no meio

líquido (DĄBROWSKI, 2001).

Dois principais mecanismos de adsorção podem ocorrer nesse processo: a fisissorção e a quimissorção. A fisissorção é caracterizada por interações físicas, como forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas, e geralmente não altera quimicamente o adsorbato ou a superfície. A quimissorção, por outro lado, envolve a formação de ligações químicas entre o adsorbato e a superfície do adsorvente, como ligações covalentes ou iônicas, resultando em uma interação mais forte e específica (DĄBROWSKI, 2001).

A escolha do mecanismo de adsorção depende das propriedades do adsorbato e das características da superfície do adsorvente. A compreensão desses mecanismos é essencial para otimizar processos de separação e purificação de compostos, visando a alta seletividade e eficiência (DĄBROWSKI, 2001).

A adsorção de proteínas em substratos sólidos é um fenômeno complexo, influenciado por diversos fatores inter-relacionados. **Propriedades intrínsecas das proteínas**, como pl, tamanho molecular, conformação tridimensional e afinidade por superfícies, desempenham papéis fundamentais nesse processo. **Fatores externos**, como temperatura, pH, força iônica e composição do tampão, também têm impacto direto na eficiência da adsorção. Além disso, as **características químicas e físicas do adsorvente**, como rugosidade, hidrofobicidade e funcionalidade química da superfície, são determinantes cruciais para a eficácia e seletividade da adsorção (WANG et al., 2012; ANAND et al., 2010).

A variabilidade nas conformações, cargas e propriedades das biomoléculas gera uma diversidade de interações possíveis durante o processo de adsorção, incluindo interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (CHO et al., 2024; WANG et al., 2012; NOROUZI; MIRMOHAMMADI; TEHRANI, 2022).

Interações eletrostáticas: Essas ocorrem quando há cargas opostas entre a superfície do adsorvente e a proteína. Influenciadas pelo pH e pela força iônica do meio, as interações eletrostáticas são essenciais para a adsorção de proteínas em substratos sólidos. A complementaridade de cargas entre as regiões carregadas das proteínas e a superfície do substrato facilita o processo de adsorção.

Interações hidrofóbicas: Envolvem segmentos não polares das proteínas interagem com regiões hidrofóbicas do adsorvente, especialmente em substratos com baixa exposição à água. Essas interações são significativas para a retenção de proteínas nas superfícies das membranas.

Ligações de hidrogênio: Ocorrem entre grupos funcionais das proteínas (como amino e carboxílicos) e a superfície do adsorvente, contribuindo para a estabilidade da adsorção.

Forças de van der Waals: Embora individualmente fracas, essas forças tornam-se significativas em distâncias muito curtas entre a proteína e o adsorvente, complementando as demais interações.

Em alguns casos, a adsorção ocorre por meio de ligações químicas diretas entre grupos funcionais do substrato e grupos específicos das proteínas, formando ligações covalentes ou interações químicas mais fortes.

Em aplicações específicas, como a separação de proteínas com membranas, o material do adsorvente exerce um papel duplo. Além de atuar como barreira física, as membranas podem adsorver proteínas diretamente por meio de interações específicas entre grupos funcionais (como carboxílicos, amino ou hidroxila) e os aminoácidos das proteínas. Essas interações não apenas promovem uma captura eficiente, mas também permitem a funcionalização das membranas para aplicações em biotecnologia e bioengenharia.

A escolha dos materiais constituintes das membranas e a otimização das condições experimentais afetam diretamente a intensidade e a seletividade das interações químicas, influenciando significativamente a eficiência dos processos de adsorção e separação.

A compreensão detalhada dos mecanismos de interação proteína-substrato é essencial para o desenvolvimento de processos otimizados. A manipulação de fatores como design de materiais, pH, força iônica e temperatura permite atender a necessidades específicas de aplicação, garantindo alta seletividade e eficiência na recuperação de biomoléculas.

Para descrever e quantificar o processo de adsorção, utilizam-se modelos teóricos conhecidos como isotermas de adsorção (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017). As isotermas de adsorção representam graficamente a quantidade de substância adsorvida em uma superfície (adsorvente) em função da concentração ou pressão do adsorbato na fase líquida ou gasosa. Esses modelos são obtidos experimentalmente e ajudam a entender as interações entre o adsorbato e o adsorvente em diferentes condições (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017).

Alguns dos modelos teóricos mais comuns para descrever as isotermas de adsorção incluem (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017):

- 1) O **modelo de Langmuir** baseado na premissa de que a adsorção ocorre em uma superfície homogênea, onde cada sítio de adsorção é energeticamente equivalente e independente. Nesse modelo, supõe-se que cada sítio da superfície pode acomodar apenas uma molécula de adsorbato, formando uma monocamada sem interações entre as moléculas adsorvidas. Além disso, a taxa de adsorção é proporcional à concentração do adsorbato na fase líquida ou gasosa até que todos os sítios estejam ocupados. A forma da curva de adsorção de Langmuir é típica-

mente sigmoïdal, refletindo um aumento inicial na quantidade adsorvida com a concentração até atingir um platô quando a superfície fica saturada.

2) O **modelo de Freundlich**, diferente do modelo de Langmuir, considera que a adsorção ocorre em uma superfície heterogênea, com diferentes sítios de adsorção possuindo energias variadas. Esse modelo admite que a adsorção pode acontecer em múltiplas camadas, sem limitar-se a uma monocamada, tornando-o útil para sistemas onde a superfície do adsorvente possui afinidade variada pelos adsorbatos. A curva de adsorção de Freundlich é caracteristicamente não linear e possui uma inclinação que diminui à medida que a concentração do adsorbato aumenta, refletindo a diminuição de sítios de alta energia conforme a superfície é preenchida. Esse modelo é particularmente útil para descrever sistemas onde a adsorção é mais significativa em concentrações baixas, como no caso de poluentes ou moléculas de biomoléculas em solução diluída.

3) O **modelo de Redlich-Peterson** é uma isoterma híbrida que combina aspectos dos modelos de Langmuir e Freundlich. Ele foi desenvolvido para descrever sistemas que não se ajustam bem a nenhum dos modelos individuais, especialmente quando ocorre uma transição entre adsorção em monocamada e multicamada. Esse modelo é especialmente útil para descrever a adsorção em superfícies heterogêneas, onde as características de adsorção variam de acordo com o tipo e a energia dos sítios disponíveis. Esse modelo é flexível, pois permite ajustar a isoterma para que ela melhor represente sistemas onde a adsorção não segue um padrão estritamente linear. Dessa forma, a isoterma de Redlich-Peterson é amplamente utilizada em estudos de adsorção onde há grande diversidade nos sítios de adsorção e nas interações entre adsorbato e adsorvente.

Esses modelos teóricos são de fato essenciais para interpretar o comportamento da adsorção em uma variedade de sistemas, permitindo insights valiosos sobre os mecanismos envolvidos e a eficiência dos processos de separação. A escolha criteriosa de um modelo permite não só uma análise mais precisa dos dados experimentais, mas também uma otimização de processos com base nas propriedades do adsorvente e adsorbato.

Além disso, esses modelos orientam o desenvolvimento de novos materiais adsorventes e o aprimoramento de processos para aplicações específicas, como purificação de biomoléculas, tratamento de efluentes e outras aplicações industriais. A análise das isotermas de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson na metodologia será crucial para estabelecer o modelo que melhor descreve o sistema em estudo e, assim, permitir um dimensionamento mais eficaz dos processos de adsorção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada para o desenvolvimento das membranas de PAN e PAN/Cs envolveu várias etapas detalhadas, abrangendo a escolha dos reagentes e materiais, preparação das soluções, eletrofição das membranas, além de caracterizações físicas e químicas para assegurar a funcionalidade das membranas como adsorventes na purificação de proteínas. A seguir, descrevemos as etapas principais:

- Eletrofição das membranas;
- Caracterização das membranas: análise da morfologia e propriedades de superfície;
- Teste de adsorção de proteínas: avaliação da capacidade de adsorção das membranas.

i) **Produção das Membranas:**

O processo de eletrofição foi conduzido para obter membranas de PAN e PAN/Cs adequadas para o processo de adsorção. A quitosana foi incorporada à solução de PAN para produzir membranas de PAN/Cs.

ii) **Caracterização das Membranas:**

1) **Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR):**

A composição química das membranas foi investigada usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão). Amostras em pastilhas de KBr foram preparadas, e os espectros de FTIR foram coletados na faixa de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, confirmando a incorporação adequada da quitosana às membranas de PAN.

2) **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):**

As características morfológicas das membranas de PAN e PAN/Cs foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram revestidas com uma camada de ouro de 20 nm usando um metalizador SC701 (Sanyu Electron, China), e as imagens foram obtidas em um microscópio MIRA3 (Tescan, República Tcheca). A análise morfológica permitiu a avaliação da distribuição de diâmetros das fibras e da uniformidade das membranas.

3) **Espectroscopia de Dispersão de Raios X (EDS):**

A composição elementar das membranas foi investigada por Espectroscopia de Dispersão de Raios X (EDS). Esta técnica permitiu confirmar a presença de elementos-chave, como o

nitrogênio da quitosana, indicando a incorporação bem-sucedida deste polímero às membranas de PAN.

4) **Análise de Área de Superfície Específica (BET):**

As medições de área de superfície específica foram realizadas utilizando a técnica BET. Os resultados mostraram que a incorporação da quitosana resultou em um aumento significativo na área de superfície das membranas de PAN/Cs em comparação com as membranas de PAN puras, o que pode contribuir para uma maior capacidade de adsorção de proteínas.

5) **Propriedades Mecânicas:**

As propriedades de tração das membranas foram avaliadas utilizando uma máquina de ensaios DL 10000 (EMIC, Brasil). Amostras com dimensões de $40\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 0,18\text{ mm}$ foram submetidas a testes de tração a uma velocidade de $5,0\text{ mm/min}$, proporcionando informações sobre a resistência mecânica e flexibilidade das membranas.

6) **Molhabilidade da Superfície:**

As propriedades de molhabilidade foram analisadas através de medidas de ângulo de contato estático utilizando um goniômetro CAM 100 (KSV, Finlândia). Essa análise permitiu explorar a hidrofiliabilidade das membranas, fator crítico para sua eficiência em aplicações de adsorção.

iii) **Testes de Adsorção de Proteínas:**

A capacidade de adsorção das membranas foi avaliada expondo-as a soluções contendo proteínas. O desempenho das membranas de PAN e PAN/Cs foi comparado em termos de eficiência de adsorção, indicando o potencial das membranas modificadas como plataformas para a purificação de proteínas.

A integração de diversas técnicas de caracterização, incluindo EDS e BET, demonstrou que as membranas de PAN/Cs apresentaram melhorias significativas na área de superfície e propriedades químicas. Essas melhorias são fundamentais para o desenvolvimento de membranas eficientes e multifuncionais, com potencial para aplicações biotecnológicas avançadas.

3.1 ELETROFIAÇÃO

Existe uma demanda contínua por técnicas aprimoradas para a separação de biomoléculas com base no uso de membranas poliméricas. Para que uma membrana encontre uso prático como agente adsorvente, ela deve exibir uma combinação de características adequadas, como poros do tamanho certo, alto nível de estabilidade química e física, resistência mecânica robusta

e a possibilidade de ser preparada por uma técnica de fabricação simples e econômica (LI et al., 2017; NAJAFI; FREY, 2020). Nesse contexto, por apresentar vantagens como ser de baixo custo e relativamente simples de operar, a eletrofiação emerge como um dos métodos mais convenientes para a preparação de filmes poliméricos.

3.1.1 Estudo de Concentração

Para otimizar a morfologia das membranas de PAN/Cs de modo a obter uma adsorção de proteínas mais eficiente, variamos a concentração relativa das massas de ambos os polímeros componentes.

Preparamos a membrana de PAN/Cs, utilizando como base uma membrana de PAN já padronizada e caracterizada, seguindo um protocolo desenvolvido no grupo de Polímeros Não-Convencionais. A membrana de PAN MW 150,000 (Sigma Aldrich, EUA) foi preparada a partir de uma solução com concentrações de 10 e 12% de PAN em N-dimetilformamida (*DMF*) - *HCON(CH₃)₂* (Dinâmica, Brasil).

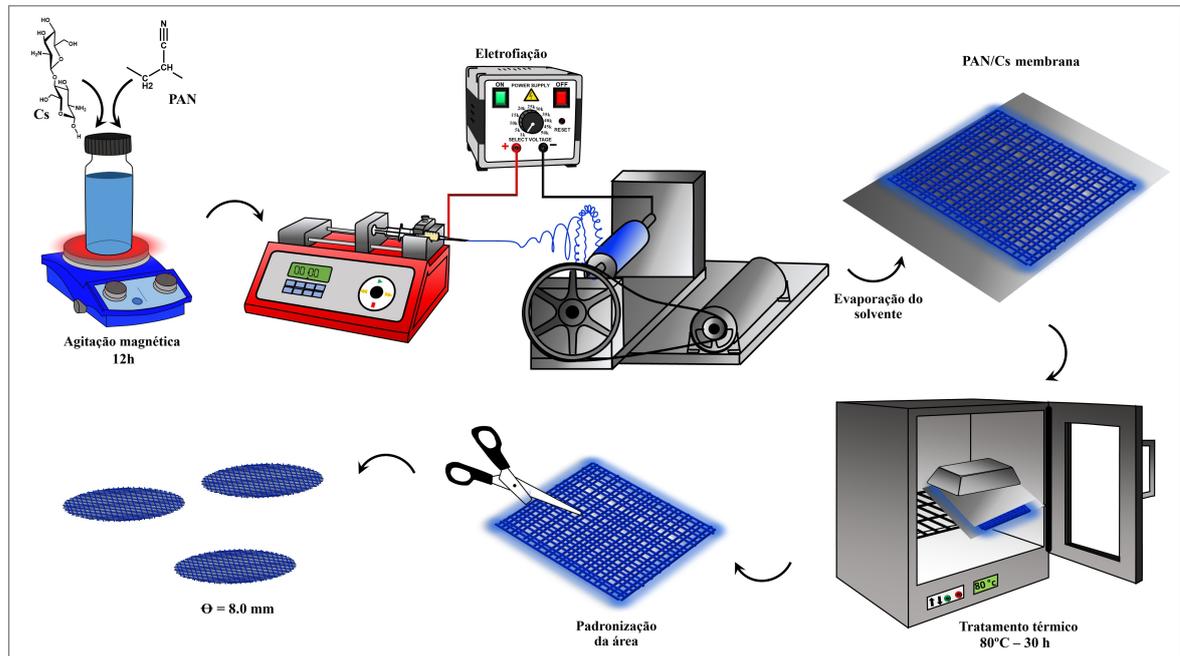
Em seguida avaliamos a quantidade apropriada de quitosana que levaria a nanofibras de maior qualidade funcional. A membrana composta preparada com concentrações de massa de 10% e 4% de quitosana (PAN/Cs 10/4%) apresentou uma qualidade de nanofibras superior, com a presença de fibras contínuas sem a presença de "contas". Para concentrações de quitosana superiores a 4%, a formação de microfibras não foi possível.

3.1.2 Preparação da Membrana de PAN/Cs

Para a obtenção das membranas de PAN MW 150,000 (Sigma Aldrich, EUA), utilizamos a técnica de eletrofiação (electrospinning) em uma configuração horizontal Fig. 4. Inicialmente, dissolvemos 1 g de PAN em 10 mL de N-dimetilformamida (*DMF*) - *HCON(CH₃)₂* (Dinâmica, Brasil), mantendo a mistura em constante agitação por 12 horas para formar uma solução a 10% (p/v). A solução foi então carregada em uma seringa plástica conectada a uma agulha de aço inoxidável 18G. Os parâmetros de eletrofiação adotados foram:

- uma taxa de fluxo de 1,0 mL/h, controlada por uma bomba NE-4000 (New Era, EUA);
- uma distância de 12 cm entre a ponta da agulha e o coletor rotativo, coberto com papel alumínio;

Figura 4 – Representação esquemática do processo de eletrofição adotado para produzir as membranas de PAN/Cs.



- uma tensão aplicada de 20 kV entre a agulha e o coletor;
- condições ambientes de 20 $^{\circ}C$ e 50% de umidade relativa.

O processo foi mantido por 5 horas. Em seguida, as membranas resultantes foram submetidas a um tratamento térmico em forno a 80 $^{\circ}C$ por 30 horas, sob um peso de 5 kg , e então cortadas em amostras de 8 mm de diâmetro.

Para a síntese das membranas de PAN/Cs, utilizamos os mesmos parâmetros aplicados às membranas de PAN, ajustando a solução para avaliar seis diferentes composições de quitosana (Cs) (MW 50.000, Sigma-Aldrich, EUA). A quitosana foi dispersa na solução de PAN sob agitação constante por 12 horas, nas seguintes concentrações:

- 1 $g/0,1 g$ (10/1%);
- 1 $g/0,2 g$ (10/2%);
- 1 $g/0,3 g$ (10/3%);
- 1 $g/0,4 g$ (10/4%);
- 1,2 $g/0,1 g$ (12/1%) e
- 1,2 $g/0,2 g$ (12/2%).

Essas condições foram otimizadas para obter membranas com diferentes incorporações de Cs na matriz de PAN, visando avaliar o impacto das diferentes concentrações na capacidade de adsorção e seletividade das membranas para proteínas específicas. Embora a combinação de PAN e Cs seja explorada em outros estudos, a metodologia de preparação usada neste trabalho é distinta devido ao processo específico desenvolvido para otimizar a adsorção seletiva de proteínas.

3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de espectroscopia por infravermelho é amplamente utilizada para obter informações estruturais sobre uma amostra. Quando um material é exposto à radiação infravermelha, ocorrem transições vibracionais e rotacionais se a frequência da radiação coincidir com os modos de rotovibracionais das moléculas que compõem o material. Os modos de vibração podem ser classificados em dois tipos principais: vibrações de estiramento e vibrações de deformação angular (PAVIA et al., 2010).

As vibrações de estiramento envolvem a alteração do comprimento das ligações químicas, resultando no aumento ou diminuição da distância entre os átomos na molécula. Essas vibrações podem ser simétricas, quando ambos os lados da ligação se movem em sincronia, ou antissimétricas, quando os lados da ligação se movem em direções opostas (PAVIA et al., 2010).

Já as vibrações de deformação angular envolvem a alteração do ângulo de ligação, ou seja, a mudança na posição dos átomos em relação ao eixo de ligação inicial. Essas deformações angulares podem ocorrer dentro do plano da molécula, conhecidas como vibrações de torção e de tesoura, ou fora do plano, chamadas de vibrações de balanço e rotação (PAVIA et al., 2010).

A análise dos diferentes modos de vibração presentes no espectro infravermelho permite obter informações valiosas sobre a estrutura molecular, tais como a identificação de grupos funcionais, a presença de ligações químicas específicas e até mesmo a conformação tridimensional da molécula. Portanto, a espectroscopia por infravermelho desempenha um papel fundamental na caracterização estrutural de materiais em diversas áreas, como química, física, biologia e ciência dos materiais (PAVIA et al., 2010).

A espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica avançada de análise espectral que utiliza um interferômetro para medir simultaneamente diferentes frequências no espectro infravermelho. Essa abordagem difere da que ocorre nos espectrômetros dispersivos, nos quais as frequências são medidas sequencialmente (PAVIA et al., 2010).

No interferômetro, a radiação infravermelha é dividida em dois caminhos: um caminho de referência e um caminho de amostra. Esses dois caminhos são então recombinados para gerar um padrão de interferência que contém informações sobre as frequências presentes na amostra (PAVIA et al., 2010).

A principal vantagem da FTIR é que ela permite a obtenção rápida e simultânea de um espectro completo. Isso significa que todas as frequências do espectro infravermelho são medidas de uma só vez, resultando em uma análise mais rápida em comparação com os métodos dispersivos, nos quais as frequências são medidas uma de cada vez (PAVIA et al., 2010).

Além disso, a FTIR oferece maior sensibilidade, pois permite uma maior quantidade de radiação infravermelha a ser utilizada para a detecção das frequências. Isso resulta em espectros mais nítidos e maior resolução espectral (PAVIA et al., 2010).

Devido à sua velocidade, sensibilidade e capacidade de fornecer espectros de alta qualidade, a espectroscopia por transformada de Fourier é amplamente utilizada em diversas áreas, como química, física, ciência dos materiais, biologia e indústria farmacêutica. É uma técnica poderosa para a análise de compostos químicos, identificação de grupos funcionais e investigação de propriedades estruturais de materiais (PAVIA et al., 2010).

Em nossas análises os espectros de FTIR das membranas foram coletados utilizando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão). Os espectros foram obtidos na faixa de frequências de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras para análise de FTIR foram preparadas macerando 0,5 mg de membrana com 50 mg de Brometo de Potássio (KBr). A mistura macerada contendo as membranas e o KBr foi colocada em uma prensa hidráulica de 2 tons, exercendo uma pressão equivalente a 2000 kg, durante 10 minutos. Esse procedimento foi realizado para compactar a mistura em forma de pastilha, facilitando a coleta do espectro de FTIR e garantindo uma amostra homogênea para análise.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica avançada que utiliza um feixe de elétrons para visualizar e analisar a superfície de uma amostra com alta resolução. Essa técnica é amplamente utilizada em diversos campos da ciência, incluindo a física, a biologia, a química e a ciência dos materiais (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O princípio básico da MEV é o seguinte: um feixe de elétrons é emitido por um filamento de tungstênio aquecido ou por um canhão eletrônico de emissão de campo. Esse feixe de elétrons

é focalizado e direcionado para a superfície da amostra por meio de lentes eletromagnéticas. Quando os elétrons atingem a superfície da amostra, ocorre interação entre eles e os átomos da amostra, resultando na emissão de diferentes sinais (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Os principais sinais gerados durante a MEV são o elétron secundário (ES) e o elétron retroespalhado (ER). O elétron secundário é emitido quando um elétron primário colide com um átomo da amostra e é desviado para fora da superfície. O elétron retroespalhado é emitido quando um elétron primário colide com um átomo da amostra e sofre um desvio em sua trajetória, retornando para o detector (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Esses sinais são capturados por detectores adequados, processados eletronicamente e convertidos em imagens em uma tela de visualização. Através da varredura do feixe de elétrons na superfície da amostra e a detecção dos sinais gerados, é possível obter imagens detalhadas e tridimensionais da topografia e da morfologia da amostra com uma resolução muito alta, da ordem de nanômetros (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura tem uma ampla gama de aplicações. Ela é utilizada para investigar a estrutura de materiais, como metais, cerâmicas, polímeros e amostras biológicas. É uma ferramenta poderosa para estudar a morfologia de superfícies, a topografia de amostras, a distribuição de elementos químicos, a análise de falhas e defeitos, e a caracterização de nanoestruturas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A preparação adequada da amostra é crucial para garantir resultados precisos na MEV. Quando a amostra não é condutora, é necessário realizar um processo de metalização para evitar o acúmulo de cargas elétricas na superfície da amostra, o que poderia interferir na obtenção de uma imagem de qualidade (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A metalização envolve a aplicação de uma fina camada metálica na superfície da amostra. Essa camada metálica serve como um revestimento condutor que ajuda a dissipar as cargas elétricas geradas pelo feixe de elétrons durante a análise na MEV. Isso evita a repulsão do feixe de elétrons e permite uma aquisição de imagem mais nítida (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Existem diferentes materiais que podem ser usados para a metalização, como ouro, ouro/paládio, platina, tungstênio, grafite, entre outros. A escolha do material de metalização depende das características da amostra e das necessidades específicas da análise (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

É importante ressaltar que atualmente já existem microscópios eletrônicos de varredura que dispensam a etapa de metalização das amostras. Esses microscópios possuem tecnologias

avançadas, como a detecção de elétrons secundários de baixa energia (BSE), que permitem a análise de amostras não condutoras sem a necessidade de metalização prévia. Essa tecnologia é especialmente útil para amostras sensíveis ou que não podem ser metalizadas devido à natureza dos materiais (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Em resumo, a MEV é uma técnica essencial para a visualização e análise de superfícies com alta resolução, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura e a morfologia das amostras estudadas.

A caracterização morfológica das membranas de PAN e PAN/Cs obtidas foi realizada após o processo de eletrofição com o tratamento térmico. As amostras de PAN e PAN/Cs foram revestidas com uma camada de ouro de 20 *nm* de espessura utilizando um metalizador SC701 (Sanyu Electron, China). As imagens MEV foram coletadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura MIRA3 (Tescan, República Tcheca). Essa caracterização permitiu a análise da morfologia e estrutura das membranas, fornecendo informações sobre sua textura, porosidade e distribuição de fibras.

3.4 ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO

Os ensaios mecânicos de tração em membranas poliméricas por exemplo são realizados para avaliar as propriedades de resistência e deformação desses materiais sob tensão. Esses ensaios são amplamente utilizados na caracterização de diversos materiais (NARDUCCI et al., 2016; BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CALLISTER; RETHWISCH et al., 2007).

O procedimento do ensaio de tração envolve a aplicação de uma força gradualmente crescente em uma amostra material, enquanto são registradas as variações de carga e deformação. Durante o ensaio, a amostra é fixada em uma máquina de ensaio mecânico, que possui garras ou mandíbulas para segurar as suas extremidades (NARDUCCI et al., 2016; BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CALLISTER; RETHWISCH et al., 2007).

À medida que a máquina de ensaio aplica uma força de tração, a amostra se estica e sofre deformação. Durante esse processo, são registradas as alterações na carga (força aplicada) e na deformação (variação no comprimento da amostra) ao longo do tempo. Essas informações são usadas para construir uma curva de tensão-deformação, que descreve o comportamento mecânico do material analisado (NARDUCCI et al., 2016; BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CALLISTER; RETHWISCH et al., 2007).

A partir da curva tensão-deformação, diversos parâmetros e propriedades mecânicas podem

ser calculados, como a tensão máxima (resistência à tração), a deformação máxima (alongamento), a rigidez (módulo de elasticidade), a tenacidade (energia absorvida até a ruptura) e a extensibilidade (capacidade de deformação antes da ruptura). Esses dados são essenciais para compreender as propriedades mecânicas do material e sua aplicabilidade em diferentes contextos (CALLISTER; RETHWISCH et al., 2007).

Além dos ensaios de tração uniaxial, existem também outras técnicas de ensaios mecânicos para caracterizar as propriedades dos materiais, como ensaios de compressão, flexão e cisalhamento. Cada tipo de ensaio fornece informações específicas sobre o comportamento mecânico do material em diferentes condições de carga (NARDUCCI et al., 2016; CALLISTER; RETHWISCH et al., 2007).

As propriedades mecânicas de tração das membranas de PAN e PAN/Cs foram investigadas utilizando o equipamento DL 10000 (EMIC, Brasil). Nos testes, foram utilizados corpos de prova com dimensões de $40\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 0,18\text{ mm}$. A velocidade do equipamento foi ajustada para $5,0\text{ mm}/\text{min}$ durante os testes de tração. Esses testes permitiram a avaliação da resistência à tração, fornecendo informações importantes sobre sua resistência e comportamento sob tensão.

3.5 ÂNGULO DE CONTATO

A afinidade de uma membrana eletrofiada por água, ou sua capacidade de absorver água, é determinada principalmente pela natureza química do material usado na produção das fibras, bem como pela morfologia e estrutura superficial da membrana. Diversos fatores influenciam a hidrofiliabilidade de uma membrana eletrofiada, dentre eles (NIEMCZYK-SOCZYNSKA; GRADYS; SAJKIEWICZ, 2020):

1) **Composição do polímero:** polímeros hidrofílicos conferem hidrofiliabilidade às membranas eletrofiadas devido à presença de grupos funcionais polares, como $-OH$ e $-COOH$, que formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água.

2) **Aditivos e modificações de superfície:** a funcionalização da superfície das fibras com substâncias hidrofílicas, como surfactantes, nanopartículas ou copolímeros, pode aumentar significativamente a afinidade da membrana por água.

3) **Morfologia e estrutura das fibras:** a finura das fibras e a porosidade da membrana desempenham papéis cruciais na definição da hidrofiliabilidade. Estruturas mais abertas e porosas facilitam a penetração e o transporte de água. Além disso, diâmetros menores de fibra

umentam a área superficial da membrana, promovendo uma interação mais intensa com a água.

4) **Tratamentos de superfície:** pós-processamento, como exposição a plasma, radiação UV ou revestimentos químicos, podem alterar a energia superficial das fibras eletrofiadas, melhorando sua hidrofiliidade.

5) **Parâmetros do processo de eletrofiiação:** variáveis como concentração do polímero, viscosidade da solução, taxa de alimentação, voltagem aplicada e distância entre o bico e o coletor influenciam a morfologia das fibras e, conseqüentemente, as propriedades hidrofílicas da membrana.

A hidrofiliidade de uma membrana eletrofiada resulta da combinação desses fatores e pode ser ajustada para atender a requisitos específicos de aplicação. Existem diversos métodos para quantificar a hidrofiliidade de uma membrana eletrofiada, sendo a medição do ângulo de contato com a água uma técnica fundamental.

O ângulo de contato é uma medida utilizada para avaliar a molhabilidade de uma superfície por um determinado líquido. Esse ângulo é determinado pela interseção entre a interface líquido-sólido e a interface líquido-ar na superfície do material. Trata-se de um parâmetro fundamental para entender as interações entre líquidos e materiais em diversas aplicações, como revestimentos, membranas, materiais biomédicos, entre outros. O ângulo de contato fornece informações valiosas sobre a energia superficial, a adesão de líquidos e a capacidade de uma superfície em repelir líquidos, aspectos essenciais para o desempenho de materiais em ambientes específicos. (HURWITZ; GUILLEN; HOEK, 2010; CHINI; AMIRFAZLI, 2011).

Quando uma gota de líquido se espalha completamente sobre a superfície, formando um ângulo de contato próximo de 0° , isso revela que a superfície é hidrofílica, ou seja, possui alta afinidade com a água. Em contraste, se a gota mantém sua forma arredondada, com um ângulo de contato próximo de 180° , a superfície é considerada hidrofóbica, indicando uma forte repulsão à água. Superfícies com ângulos de contato entre 90° e 150° são classificadas como super-hidrofóbicas, apresentando uma notável resistência ao espalhamento de líquidos (HURWITZ; GUILLEN; HOEK, 2010; CHINI; AMIRFAZLI, 2011).

Existem valores de referência amplamente aceitos para classificar as superfícies com base nos ângulos de contato. Aqui estão as categorias comumente usadas (HURWITZ; GUILLEN; HOEK, 2010; CHINI; AMIRFAZLI, 2011):

1) **Superfícies hidrofílicas:** Quando o ângulo de contato da gota de água com a superfície é inferior a 90° , considera-se que a superfície é hidrofílica. Nesses casos, a água tende a se

espalhar e se aderir à superfície.

2) **Superfícies hidrofóbicas:** Se o ângulo de contato da gota de água com a superfície é superior a 90° , a superfície é considerada hidrofóbica. Nesses casos, a gota de água forma uma forma mais esférica e tem menor aderência à superfície.

3) **Superfícies super-hidrofóbicas:** As superfícies super-hidrofóbicas exibem um ângulo de contato entre 150° e 180° . Essas superfícies são altamente repelentes à água, e as gotas de água formam uma forma esférica e rolam facilmente na superfície, devido à baixa aderência.

Essas classificações baseadas nos ângulos de contato são úteis para descrever e entender as propriedades de molhabilidade das superfícies, aplicando-se a uma ampla gama de campos, como materiais de revestimento, biomateriais, microfluidos, entre outros. A medição do ângulo de contato da água sobre a superfície das membranas é uma prática comum para avaliar suas características de molhabilidade e determinar se a superfície é hidrofílica, hidrofóbica ou super-hidrofóbica. Esse ângulo é obtido ao observar o formato da gota de água depositada sobre a superfície da membrana, oferecendo uma indicação precisa do comportamento da superfície em relação à água.

Para realizar a medição do ângulo de contato, geralmente segue-se os seguintes passos (CHINI; AMIRFAZLI, 2011):

- 1) Prepare uma amostra da membrana limpa e seca, de preferência em formato plano.
- 2) Coloque uma pequena gota de água (geralmente cerca de 1 a 5 microlitros) na superfície da membrana usando uma seringa ou um dispositivo de dispensação de líquidos.
- 3) Capture uma imagem da gota de água na superfície da membrana usando um dispositivo de captura de imagem.
- 4) Utilize um software apropriado para medir o ângulo de contato formado pela gota de água. O software pode fornecer ferramentas para medir automaticamente o ângulo de contato ou permitir que você faça medições manuais usando linhas tangentes à gota de água.
- 5) Repita as medições em diferentes áreas da superfície da membrana para obter uma média confiável do ângulo de contato.

Utilizamos medições de ângulo de contato para avaliar o grau de molhabilidade das membranas tratadas termicamente. Para isso, utilizamos um goniômetro CAM 100 (KSV, Finlândia). As medições de ângulo de contato permitem determinar a capacidade das membranas em interagir com líquidos, fornecendo informações sobre a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade das superfícies das membranas. Esses dados são úteis para entender a interação das membranas com líquidos, o que pode influenciar suas propriedades de adsorção e separação de substâncias

em soluções aquosas.

3.6 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis (Ultravioleta-Visível) é amplamente utilizada na análise de materiais para obter informações importantes sobre a amostra em estudo. Essa técnica baseia-se na absorção de radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta e visível pela amostra, e fornece dados sobre a estrutura eletrônica e as propriedades químicas das substâncias (ROUESSAC; ROUESSAC, 2022).

A espectroscopia de absorção utiliza um espectrofotômetro UV-Vis, um instrumento que mede a quantidade de luz absorvida por uma amostra em diferentes comprimentos de onda nas regiões do ultravioleta e do visível, permitindo a obtenção do espectro correspondente. Para isso, a amostra é exposta a uma fonte de luz com energia na faixa do ultravioleta e visível, enquanto um detector registra a quantidade de luz transmitida em cada comprimento de onda. A diferença entre a intensidade da luz incidente e a luz transmitida é utilizada para calcular a absorbância da amostra (ROUESSAC; ROUESSAC, 2022).

A absorbância é diretamente relacionada à concentração da substância presente na amostra, de acordo com a Lei de Beer-Lambert. Essa lei estabelece que a absorbância é proporcional à concentração da substância e ao comprimento do percurso óptico da luz através da amostra. Portanto, a espectroscopia UV-Vis pode ser usada para determinar a concentração de uma determinada amostra, utilizando uma curva de calibração com amostras de concentração conhecida (ROUESSAC; ROUESSAC, 2022).

A espectroscopia UV-Vis também é capaz de fornecer dados sobre a estrutura molecular da amostra. Cada substância possui um espectro de absorção característico, que é uma representação gráfica da absorbância em função do comprimento de onda incidente. Esses espectros podem revelar informações sobre a presença de grupos funcionais, a presença de ligações duplas ou conjugadas, e até mesmo a presença de impurezas na amostra (ROUESSAC; ROUESSAC, 2022).

Em nosso trabalho, os espectros das soluções de proteínas foram registrados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) na faixa UV-Visível. Medimos a absorção óptica das soluções de proteínas no comprimento de onda de 280 *nm*, que é amplamente utilizado para quantificar a concentração de proteínas devido à forte absorção devida à presença da ligação peptídica nas proteínas. Essa medida nos fornece informações

sobre a concentração das proteínas nas soluções e nos ajuda a avaliar a pureza das amostras.

3.7 POTENCIAL ZETA

Realizamos medições de potencial zeta com o objetivo de avaliar a carga superficial das proteínas BSA e IgG em função do pH e das soluções tampão utilizadas. Este estudo foi fundamental para compreender melhor os resultados obtidos nos experimentos de adsorção.

Para isso, as proteínas foram diluídas em diferentes faixas de pH (4,0 a 8,0), empregando uma proporção de 1:1 com cada solução tampão, resultando em uma concentração final de 0,6 mg/mL. A carga das proteínas nas soluções tampão foi investigada utilizando a técnica de potencial zeta, medida com o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar). Esses dados são cruciais para correlacionar as características de carga das proteínas com as condições experimentais, proporcionando uma análise mais detalhada das interações proteína-membrana no processo de adsorção.

3.8 ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

Nos experimentos de adsorção, avaliamos a influência da variação do pH e da concentração inicial da proteína, dois fatores conhecidos por afetarem a capacidade de captura das membranas. Em cada experimento, foram utilizados 9 mg da membrana (equivalente a quatro amostras de PAN/Cs e seis amostras de PAN), dispostas no interior de uma coluna de centrifugação junto com 500 μ L de solução proteica (BSA ou IgG) em uma concentração de 0,6 mg/mL. Em seguida, a coluna de centrifugação foi submetida a rotações de 5000 rpm por cinco ciclos consecutivos, com duração de um minuto. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Uma representação esquemática da disposição das membranas na coluna de centrifugação é apresentada na Fig. 5.

As soluções-tampão foram preparadas usando os seguintes reagentes: Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) e Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), adquiridos da Nuclear (Brasil), Hidróxido de sódio ($NaOH$) em pérolas, Ácido clorídrico (HCl) e Acetato de sódio ($NaAc$) obtidos da Química Moderna (Brasil), e Ácido acético (AcH), da Dinâmica (Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18,2 M Ω a 25 °C) obtida após passagem por um sistema Milli-Q da Millipore (EUA).

Os principais passos do protocolo de separação de proteínas baseado em membranas de

Figura 5 – Representação esquemática da preparação de colunas de centrifugação usando as membranas de PAN/Cs ou PAN.

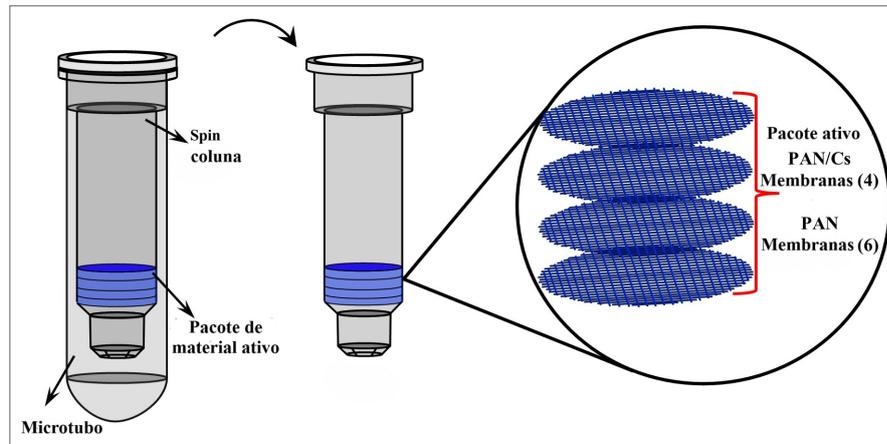
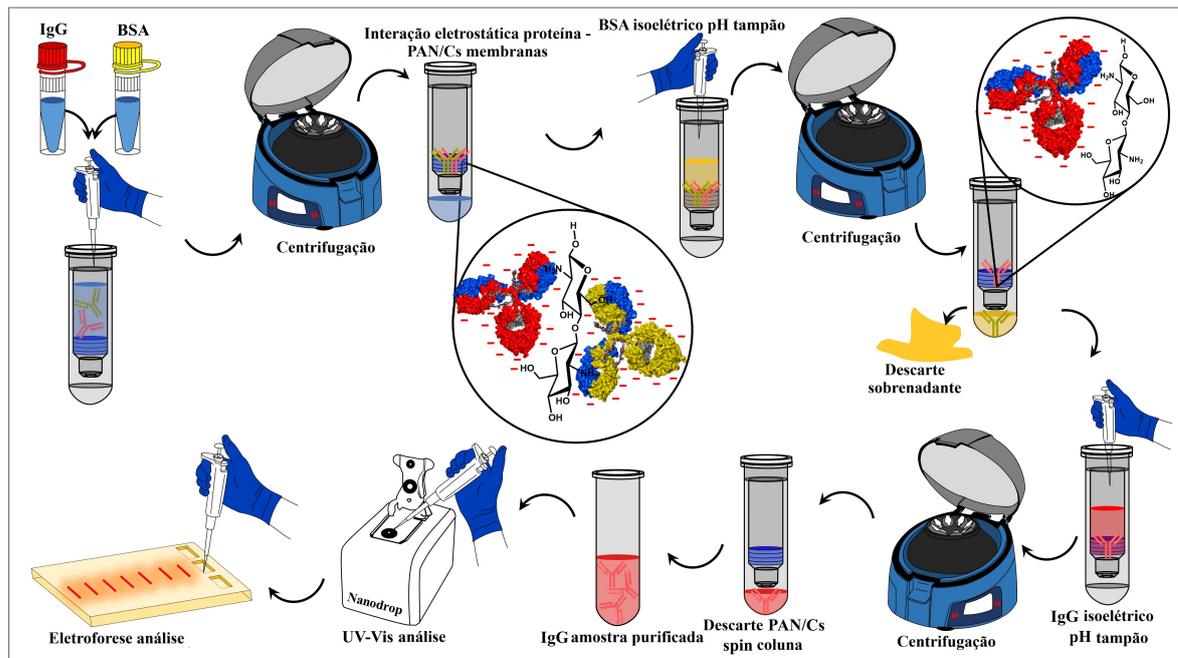


Figura 6 – Representação esquemática dos principais passos do protocolo de separação de proteínas baseado em membranas de PAN/Cs.



PAN/Cs são apresentados esquematicamente na Fig. 6.

Como mencionado, os espectros das soluções de proteína foram registrados usando um espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, EUA) para determinar a absorção óptica característica a 280 nm.

A absorção na região do UV pelas proteínas ocorre predominantemente entre 260 e 280 nm, com maior intensidade em 280 nm, principalmente devido à presença de aminoácidos aromáticos como triptofano (280 nm), tirosina (275 nm) e, em menor grau, fenilalanina (258 nm) (SCHMID, 2001). A quantidade de proteína adsorvida foi calculada como

$$q_e = V \times \frac{C_0 - C_e}{m} \quad (3.1)$$

Essa quantidade é expressa em termos da quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa do adsorvente. Na Eq.3.1, q_e (mg/g) representa a capacidade de adsorção no equilíbrio; C_0 a concentração inicial de proteína; C_e (mg/mL) a concentração da solução de proteína no equilíbrio; V (mL) é o volume de proteína na solução e m (g) a massa das membranas.

O percentual de adsorção (Eq.3.2) é calculado como

$$(\%) = \frac{C_0 - C_e}{m} \times 100 \quad (3.2)$$

3.8.1 Adsorção da BSA

Adotamos a BSA, com peso molecular de 66 kDa (obtida da Sigma Aldrich, EUA), como modelo para avaliar o desempenho das membranas de PAN e PAN/Cs na separação de proteínas. A escolha da BSA como proteína modelo se deve a sua ampla utilização em estudos de adsorção devido às suas propriedades bem caracterizadas, como ponto isoelétrico e estabilidade em diferentes condições de pH (LE et al., 2024).

A quitosana, quando dissolvida em meio ácido, forma um polímero catiônico devido à protonação dos grupos amino (NH_3^+) (ZHAO; WANG; WANG, 2003). Essas cargas positivas permitem a atração de moléculas com superfícies carregadas negativamente, como a BSA em condições adequadas de pH. Ajustando-se o pH do meio, é possível controlar a carga de superfície da quitosana. Em pH ácido os grupos amino são protonados, resultando em uma carga positiva, que favorece a interação com moléculas carregadas negativamente. Por outro lado, em pH neutro ou básico ocorre a desprotonação dos grupos amino, reduzindo a carga positiva da quitosana e alterando sua capacidade de interação com as proteínas (ZHAO; WANG; WANG, 2003). Exploramos essa propriedade ajustando cuidadosamente o pH da solução tampão para otimizar a adsorção de BSA pela membrana de PAN/Cs. A BSA possui um pI próximo a 5,0, no qual suas cargas líquidas são neutras. Observamos que, em condições de pH próximo ao ponto isoelétrico, as membranas modificadas com quitosana exibiram uma capacidade significativamente maior de adsorção da BSA em comparação com as membranas de PAN. Isso se deve à maior interação eletrostática entre a superfície catiônica da quitosana e a BSA, que apresenta regiões de carga negativa residual.

Para quantificar a eficiência de adsorção e recuperação da BSA, utilizamos a espectroscopia UV-Vis, onde a absorbância a 280 *nm* foi medida em um espectrofotômetro para determinar as concentrações iniciais e finais de BSA nas soluções aquosas. A eficiência de adsorção foi calculada com base na diferença de concentração antes e após o processo de adsorção. Após o processo de adsorção, a BSA foi eluída das membranas, e as frações liberadas também foram quantificadas por UV-Vis. Os resultados demonstraram que as membranas de PAN/Cs apresentaram um desempenho superior na captura e liberação controlada da BSA em comparação com as membranas de PAN puras, confirmando o impacto positivo da modificação com quitosana na eficiência de adsorção de proteínas.

3.8.2 Adsorção da IgG

Para avaliar a aplicação prática das membranas de PAN/Cs, investigamos sua seletividade na adsorção de Imunoglobulina G (IgG), dada a importância dessa proteína em aplicações clínicas, como no diagnóstico de doenças (ARUMUGAM et al., 2009). A IgG utilizada neste estudo foi gentilmente fornecida pelo Departamento de Farmácia da UFPE e extraída do plasma humano (PINTO et al., 2019).

Adotamos uma abordagem similar à utilizada nos experimentos com a BSA para estudar o desempenho das membranas de PAN e PAN/Cs na captura e liberação de IgG. Avaliamos a eficiência das membranas sob diferentes condições de pH, variando desde valores ácidos até básicos, a fim de explorar o comportamento da proteína em função de sua carga líquida. A quantificação da IgG adsorvida foi realizada por espectroscopia UV-Vis, medindo a absorbância a 280 nm antes e após a adsorção, garantindo a consistência nas condições experimentais. Após o processo de adsorção, a IgG foi eluída das membranas, e as frações liberadas também foram quantificadas por UV-Vis.

A IgG é uma proteína complexa composta por quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada uma com sua faixa de ponto isoelétrico (pI). O pI da IgG varia aproximadamente de 6,1 a 9,0, dependendo da subclasse (JEFFERIS, 2012). Abaixo do seu pI, a IgG possui carga líquida positiva, e acima desse valor, carga líquida negativa. Em valores de pH entre 6,1 e 9,0, pode coexistir uma mistura de moléculas de IgG com cargas positivas, neutras e negativas. Alguns estudos sugerem que o pI médio é próximo a 7,4, embora essa média varie entre as subclasses.

3.8.3 Isotermas de Adsorção

Nos estudos de adsorção, os modelos de isotermas são essenciais para entender como as moléculas de adsorbato interagem com a superfície do adsorvente. Esses modelos descrevem a relação entre a concentração do adsorbato na solução e a quantidade adsorvida na membrana no equilíbrio.

Com a finalidade de encontrar a isoterma de adsorção capaz de descrever de maneira satisfatória os fenômenos de adsorção envolvidos entre as proteínas e a superfície das membranas, testamos a qualidade do ajuste dos nossos dados experimentais com os modelos das isotermas de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson, respectivamente (MAJD et al., 2022).

O modelo de isoterma de Langmuir assume que a adsorção ocorre em uma monocamada sobre uma superfície homogênea, onde as interações entre as moléculas de proteína são independentes entre si. A forma linear da equação de Langmuir é expressa pela Eq.3.3 (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_e} + \frac{C_e}{q_m} \quad (3.3)$$

onde q_e (mg/g) é a capacidade de adsorção no equilíbrio; q_m (mg/g) é a capacidade máxima de adsorção, C_e (mg/mL) é a concentração da proteína no equilíbrio e K_e (g/mg) é a constante de equilíbrio de adsorção (constante de Langmuir) que representa a afinidade entre o adsorbato e o adsorvente (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017).

A isoterma de Freundlich é um modelo empírico que descreve a adsorção em superfícies heterogêneas, assumindo a possibilidade de adsorção em multicamadas. Esse modelo é especialmente útil para sistemas nos quais a superfície do adsorvente possui sítios com afinidades variadas pelo adsorbato. A forma linear da equação de Freundlich é dada por (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017)

$$\log(q_e) = \frac{1}{n} \log(C_e) + \log(K_f), \quad (3.4)$$

da mesma forma, q_e (mg/g) é a capacidade de adsorção no equilíbrio; C_e (mg/g) é a concentração da proteína no equilíbrio; K_f é uma constante relacionada à capacidade de adsorção e à afinidade da proteína pela superfície (corresponde ao valor teórico calculado para a capacidade máxima de adsorção de um material que se ajusta ao modelo Freundlich) e n é um parâmetro que descreve a heterogeneidade da superfície de adsorção (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017).

O parâmetro $1/n$ na isoterma de Freundlich representa a intensidade de adsorção, refletindo a heterogeneidade da superfície do adsorvente. Um valor mais alto de K_f indica uma maior capacidade de adsorção, enquanto o valor de $1/n$ fornece informações sobre a favorabilidade do processo de adsorção. Quando $1/n < 1$, a adsorção é considerada favorável, pois sugere que a adsorção se torna mais fácil à medida que mais moléculas são adsorvidas. O modelo de Freundlich é amplamente utilizado em sistemas onde a adsorção não forma uma monocamada uniforme, o que é frequentemente observado na adsorção de proteínas em membranas, como as de PAN/Cs.

A isoterma de Redlich-Peterson é um modelo híbrido que combina elementos dos modelos de Langmuir e Freundlich, tornando-se mais flexível para a modelagem de processos de adsorção. A equação é dada por (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017)

$$\log\left(\frac{C_e}{q_e}\right) = \beta \log(C_e) - \log(\alpha), \quad (3.5)$$

Na equação de Redlich-Peterson, α representa uma constante relacionada à capacidade de adsorção, enquanto β é um expoente que varia de 0 a 1, indicando a heterogeneidade da superfície. Ambos, α e β , são ajustados aos dados experimentais para melhor representar o comportamento do sistema. O modelo de Redlich-Peterson aproxima-se do modelo de Freundlich quando β é significativamente menor que 1, o que sugere a presença de locais de adsorção altamente heterogêneos. Em contraste, quando β se aproxima de 1, o modelo se comporta de forma semelhante à isoterma de Langmuir, refletindo uma superfície mais homogênea para adsorção (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017).

Esse modelo é capaz de descrever sistemas homogêneos e heterogêneos, dependendo dos valores das constantes ajustadas, e oferece uma vantagem significativa por descrever sistemas que não se encaixam perfeitamente nem nos modelos de Langmuir nem nos de Freundlich. Para a adsorção de proteínas nas membranas de PAN/Cs, o modelo de Redlich-Peterson oferece a flexibilidade necessária para capturar comportamentos complexos de adsorção, nos quais múltiplas interações podem ocorrer entre as proteínas e a superfície da membrana.

Ao ajustar os dados experimentais a esses modelos, é possível obter uma compreensão mais detalhada do mecanismo de adsorção de proteínas nas membranas de PAN/Cs, determinando se as propriedades da superfície favorecem a adsorção em monocamada, multicamadas ou se envolvem interações mais complexas com as moléculas de proteína. O modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais (indicado por um coeficiente de correlação R^2 mais alto)

fornece insights sobre a eficácia e a adequação da membrana para aplicações de purificação seletiva de proteínas.

3.8.4 Eletroforese

No presente trabalho, utilizamos a técnica de eletroforese em gel de SDS-PAGE para caracterizar tanto as proteínas BSA quanto IgG. A técnica de eletroforese SDS-PAGE funciona bem para a maioria das proteínas, pois o surfactante as torna solúveis em água e confere uma carga negativa proporcional ao seu tamanho. Como resultado, a IgG pode aparecer como uma banda mais larga no gel, enquanto proteínas menores, como a BSA, geralmente migram mais facilmente e produzem bandas mais nítidas no gel (BIO-RAD, 2012; WESTERMEIER, 2016).

Nas experiências de eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS e na preparação das amostras a serem analisadas por essa técnica, utilizamos os seguintes reagentes:

- Glicina (Gly) de grau de biologia molecular da Promega (EUA): a glicina foi utilizada como um componente da solução tampão de corrida eletroforética, que ajuda a estabilizar o pH do sistema.
- Acrilamida/Bis (30% *T*, 2,67% *C*): a mistura de acrilamida e bis-acrilamida foi utilizada para preparar os géis de poli(acrilamida), a matriz onde a eletroforese é realizada. A proporção de acrilamida para bis-acrilamida determina a porcentagem do gel (*T*) e a relação entre acrilamida e bis-acrilamida (*C*) influencia a resolução da separação.
- Persulfato de amônio (APS): o APS é um iniciador de polimerização utilizado para iniciar a reação de polimerização da acrilamida e bis-acrilamida, formando o gel de poli(acrilamida).
- *N, N, N', N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED): o TEMED é um agente catalisador usado em conjunto com o APS para iniciar a polimerização da acrilamida e bis-acrilamida.
- Azul de bromofenol: o azul de bromofenol é um corante de triagem que é adicionado à amostra eletroforética para auxiliar na visualização e monitoramento da migração das amostras no gel.

- Comassie Brilliant Blue R-250: essa solução de coloração é usada para corar as proteínas após a eletroforese, permitindo sua visualização no gel. O Comassie Brilliant Blue R-250 se liga às proteínas e as torna visíveis.
- Tris[hidroximetil]aminometano (Tris): o Tris é uma base utilizada para preparar as soluções tampão usadas nos géis e no sistema de corrida eletroforética. Ele ajuda a manter o pH adequado durante a eletroforese.
- Dodecil sulfato de sódio (SDS): para os experimentos de SDS-PAGE. O SDS é um surfactante aniônico que, adicionado à solução tampão, confere uma carga negativa uniforme às proteínas, permitindo sua separação com base no tamanho molecular.
- Padrões de proteína para eletroforese: são amostras com pesos moleculares conhecidos que são utilizadas como referência para determinar o tamanho e a migração das proteínas desconhecidas no gel.

Todos esses reagentes foram adquiridos da BioRad (EUA), uma empresa conhecida por fornecer produtos e reagentes para eletroforese e análise de proteínas. O protocolo seguido para a preparação dos géis e o experimento de eletroforese foi baseado nas diretrizes fornecidas pela Bio-Rad. Para obter informações detalhadas sobre o protocolo específico e os ajustes realizados é possível acessar o manual em formato PDF disponível no site da Bio-Rad no endereço: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>. Neste manual estão as instruções para a preparação dos géis e a realização da eletroforese, conforme recomendado pela Bio-Rad.

3.8.4.1 Protocolo para o Experimento de Eletroforese

É fundamental preparar todas as soluções tampão necessárias para a preparação das amostras e dos géis de eletroforese no dia anterior ao experimento, armazenando-as adequadamente em refrigeração. A seguir, listamos os reagentes necessários e as respectivas quantidades para a preparação de cada solução.

1) Preparar 120 mL de Tris base-Glicina, em seguida diluir 100 mL deste tampão para 900 mL de água deionizada (H_2O).

2) Diluir Tris base em 30,00 *mL* de H_2O , ajustar o pH desta solução para 8,8 com *HCl* 6 N (Tabela 1). Em seguida, completar para 50,00 *mL*. Esta solução tampão será utilizada na preparação do géis de 10% e 4% que são os géis de corrida e de amostra respectivamente.

3) Diluir Tris base em 30,00 *mL* de H_2O , ajustar o pH desta solução para 6,8 com *HCl* 6 N (Tabela 2). Em seguida, completar para 50,00 *mL*. Esta solução tampão será utilizada na preparação do tampão de amostra.

4) **Preparação do tampão de corrida pH (8,3):** Primeiramente, o tampão de corrida (Tabela 3), que possui pH 8,3, é composto por uma solução de Tris base e Glicina. A solução inicial é preparada com 3,64 *g* de Tris base e 17,30 *g* de glicina, diluídos em um volume final de 120 *mL*. Para o uso no experimento, 100 *mL* dessa solução são diluídos em 900 *mL* de água deionizada.

5) **Preparação do tampão de Tris-HCl (pH 8,8):** Para a preparação do gel de corrida (10%) e o gel de 4% (Tabelas 4 e 5 respectivamente), utiliza-se uma solução tampão de *Tris – HCl* com pH ajustado para 8,8 (Tabela 1), a partir de 3,00 *g* de Tris base diluídos em 30,00 *mL* de água e ajustados com *HCl* 6 N, completando o volume final para 50,00 *mL*.

Observação: na preparação do géis de 10% e 4%, o TEMED e o APS 10% somente devem ser introduzidos na solução no momento em que for necessário polimerizar o gel, antes de colocá-lo entre as placas.

6) **Preparação do tampão de amostra (pH 6,8):** O tampão de amostra (6) é uma solução crítica para manter a estabilidade e integridade das amostras durante o processo de eletroforese, sendo responsável por manter o pH adequado, controlar a condutividade e fornecer íons que estabilizam as cargas das amostras. No caso específico de eletroforese em SDS-PAGE, ele também pode conter agentes redutores para evitar a formação de pontes dissulfeto indesejadas.

Tabela 1 – Tampão 1,5 *M Tris – HCl* pH 8,8

Tris base	3,00 <i>g</i>
H_2O	30,00 <i>mL</i>

Fonte: A autora (2024).

Tabela 2 – Tampão 0,5 M *Tris* – *HCl* pH 6,8

Tris base	3,00 g
H_2O	30,00 mL

Fonte: A autora (2024).

Tabela 3 – Tampão de corrida pH 8,3

Tris base	3,64 g
Glicina	17,30 g

Fonte: A autora (2024).

Tabela 4 – Gel 10%

H_2O	2905 μL
1,5 M <i>Tris</i> – <i>HCl</i> pH 8,8	1750 μL
Acrilamida/Bis	2310 μL
TEMED	4,9 μL
APS 10%	35,00 μL

Fonte: A autora (2024).

3.8.4.2 Descrição do Procedimento de Eletroforese

No dia da realização do experimento, é essencial organizar todos os materiais e realizar a limpeza da bancada e dos equipamentos com álcool a 70% (Fig. 7). As soluções, bem como a acrilamida/bisacrilamida, devem ser retiradas da geladeira e retirar do freezer o marcador de proteínas para que atinjam a temperatura ambiente. Este processo inclui o preparo do gel de corrida na concentração de 10% e do gel de amostra na concentração de 4%. O gel de corrida é polimerizado entre placas de vidro fixadas ao suporte, com a adição de água ou butanol para nivelar a superfície do gel durante sua polimerização (40 a 60 minutos). A adição de TEMED e APS 10% deve ser feita apenas no momento da polimerização, garantindo a correta formação do gel.

Após a polimerização do gel de corrida, procede-se à preparação do gel de 4%, que também é polimerizado entre as placas de vidro, utilizando uma solução contendo 1860 μL de água, 750 μL de tampão *Tris* – *HCl* 1,5 M pH 8,8, 402 μL de acrilamida/bisacrilamida, 3,00 μL de TEMED e 15,00 μL de APS 10%. Este processo garante a formação de poços adequados para a aplicação das amostras.

Após a polimerização do gel a 4%, as placas de vidro que compõem o cassete de fundição

Tabela 5 – Gel 4%

H_2O	1860 μL
1,5 M Tris – HCl pH 8,8	750 μL
Acrilamida/Bis	402 μL
TEMED	3,00 μL
APS 10%	15,00 μL

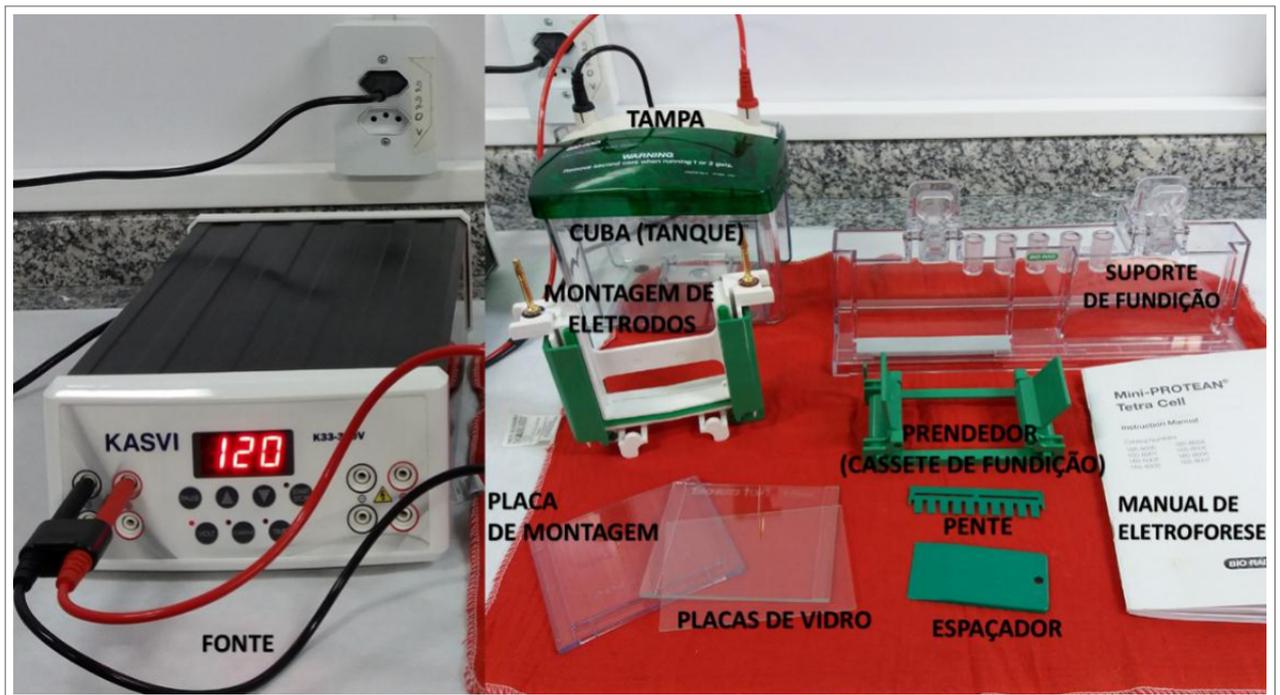
Fonte: A autora (2024).

Tabela 6 – Tampão de amostra

H_2O	2,78 mL
0,5 M Tris – HCl pH 6,8	0,63 mL
Glicerol	1,50 mL
Azul de bromofenol 4%	0,10 mL

Fonte: A autora (2024).

Figura 7 – Materiais utilizados no procedimento de eletroforese.



Fonte: MONTE et al. (2017)

são cuidadosamente removidas e fixadas ao suporte de eletrodos, juntamente com a placa de montagem apropriada. Em seguida, o suporte montado é inserido na cuba de eletroforese, que é preenchida com o tampão de corrida previamente preparado, garantindo um ambiente adequado para a separação das amostras.

Com a cuba montada, o pente que formou os poços no gel é retirado, e as amostras

preparadas são cuidadosamente adicionadas em cada poço. O primeiro poço geralmente recebe uma amostra padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos, servindo como referência para a análise posterior das amostras.

O sistema de eletroforese é então fechado com a tampa, e os eletrodos são conectados à fonte de energia. Inicialmente, aplica-se uma voltagem de 80 V para permitir que as amostras migrem pelo gel de menor concentração (4%). Quando a amostra atinge o gel de maior concentração (10%), a voltagem é aumentada para 120 V, facilitando a separação adequada das proteínas de acordo com seus tamanhos.

O processo de corrida é mantido até que o corante de rastreamento alcance a extremidade inferior do gel, momento em que a corrente é interrompida. Em seguida, as placas são removidas e lavadas com água deionizada para facilitar o desprendimento do gel, utilizando um espaçador para separar as placas e liberar o gel.

Após a remoção, o gel é imerso em uma solução corante de Azul de Coomassie por aproximadamente uma hora ou durante a noite, a depender da intensidade desejada das bandas de proteínas. Esse corante permite a visualização das bandas correspondentes às proteínas separadas no gel. Finalizada a coloração, o gel é cuidadosamente lavado com água deionizada e transferido para uma solução descolorante. Esse passo é essencial para remover o excesso de corante e destacar as bandas, revelando assim o padrão de separação das proteínas que foram submetidas à eletroforese.

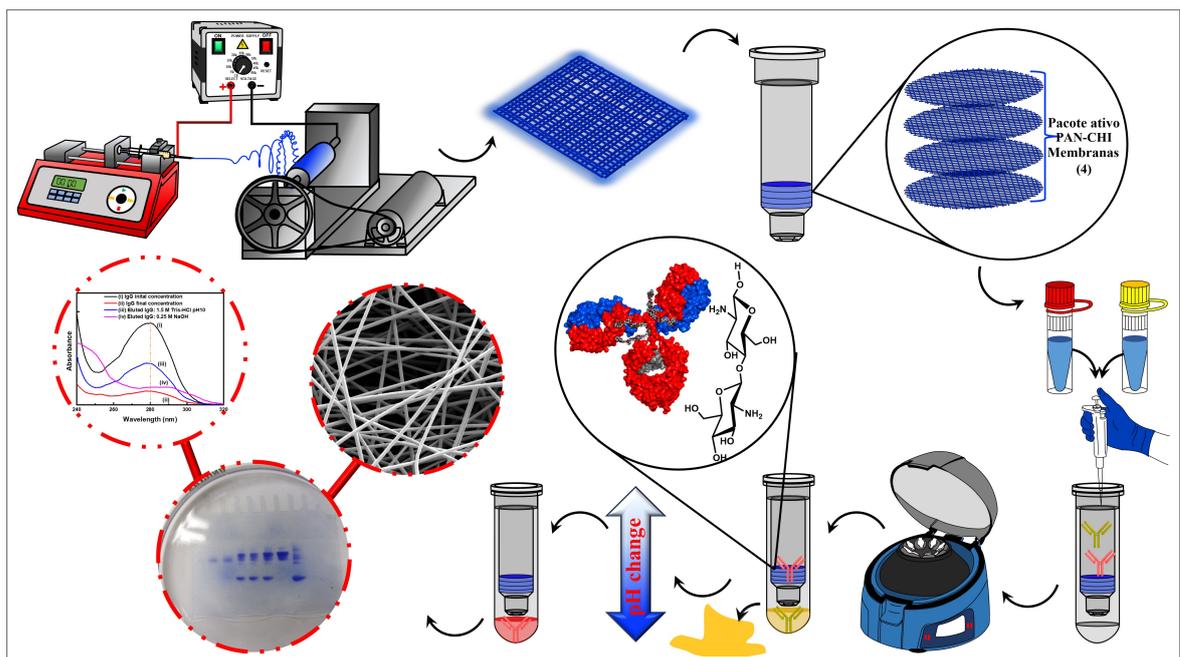
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, apresentaremos os resultados experimentais obtidos durante a preparação e modificação das membranas eletrofiadas, detalhando os principais resultados e discutindo sua relevância à luz da literatura existente. Além disso, abordaremos os processos de adsorção e dessorção das proteínas estudadas, BSA e IgG, analisando a capacidade das membranas de adsorver e liberar essas proteínas em diferentes condições experimentais. Essa análise nos permitirá avaliar o desempenho das membranas eletrofiadas como adsorventes na extração de proteínas dissolvidas em meio aquoso.

A seguir os tópicos que serão discutidos no presente capítulo:

- **Apresentação das membranas de PAN/Cs como material de estudo.**
- **Capacidade de adsorção de proteínas:**
 - 1) Descrição dos experimentos realizados para avaliar a capacidade das membranas de adsorver proteínas.
 - 2) Apresentação dos resultados obtidos, incluindo a quantidade de proteína adsorvida em diferentes condições.

Figura 8 – Esquematização das principais etapas.



-
- **Influência do pH e da concentração inicial da proteína:**
 - 1) Discussão dos experimentos realizados para investigar a influência do pH do meio e da concentração inicial de proteína nas propriedades de adsorção das membranas.
 - 2) Análise dos resultados obtidos e identificação de tendências ou padrões observados.

 - **Mecanismos de ligação:**
 - 1) Explicação dos mecanismos de ligação entre as membranas e as proteínas BSA e IgG.
 - 2) Descrição dos experimentos e técnicas utilizadas para investigar esses mecanismos.
 - 3) Apresentação dos resultados e discussão das interações observadas.

 - **Isotermas de adsorção:**
 - 1) Apresentação e discussão dos modelos de isoterma utilizados para descrever os processos interfaciais de adsorção entre as membranas e as proteínas.
 - 2) Comparação dos dados experimentais com as curvas de isoterma para determinar o modelo que melhor se ajusta aos resultados.

 - **Adsorção de misturas de proteínas:**
 - 1) Descrição dos experimentos realizados para analisar a adsorção de misturas da BSA e IgG em solução aquosa pelas membranas.
 - 2) Apresentação dos resultados obtidos e discussão sobre a seletividade e capacidade das membranas na adsorção dessas misturas.

 - **Capacidade de dessorção e qualidade das proteínas:**
 - 1) Discussão dos experimentos realizados para avaliar a capacidade de dessorção das proteínas adsorvidas pelas membranas.
 - 2) Análise dos resultados obtidos, incluindo a eficiência de dessorção e a qualidade das proteínas recuperadas.

 - **Análise por eletroforese:**
 - 1) Descrição dos experimentos de eletroforese realizados para avaliar a qualidade das proteínas adsorvidas e dessorvidas.

2) Apresentação dos resultados das análises e discussão sobre a integridade estrutural das proteínas após o processo de adsorção e dessorção.

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para otimizar a morfologia das membranas de PAN/Cs visando uma adsorção eficiente de proteínas, ajustamos as concentrações relativas em massa dos polímeros.

Ao analisar as micrografias correspondentes obtidas por MEV (Fig. 9 e Fig. 10), pudemos avaliar a quantidade apropriada de quitosana que levaria a nanofibras de maior qualidade funcional. A membrana composta preparada com concentrações de massa de 10% e 4% de quitosana (PAN/Cs 10/4%) apresentou uma qualidade de nanofibras superior, com a presença de fibras contínuas sem a presença de "contas". Para concentrações de quitosana superiores a 4%, a formação de microfibras não foi possível. Essas imagens nos permitem visualizar e comparar as características morfológicas das membranas em diferentes condições, auxiliando na identificação da composição mais adequada para a obtenção de uma membrana de PAN/Cs com a morfologia desejada para a adsorção eficiente das proteínas.

Com a incorporação de quitosana, as membranas de PAN/Cs exibiram fibras lisas e uniformes. Essa modificação facilita a interação com biomoléculas, ampliando o potencial das membranas para aplicações específicas (WANG et al., 2023). No entanto, em concentrações mais elevadas de quitosana, a formação das fibras foi prejudicada. Imagens de MEV, com ampliação de 30.000 vezes e analisadas no software ImageJ, indicaram um diâmetro médio das fibras de $0,454 \mu m$ (Fig. 10 c)). As medições BET mostraram que a área de superfície aumentou de $6,87 m^2g^{-1}$ (PAN) para $8,33 m^2g^{-1}$ (PAN/Cs), aprimorando a eficiência de adsorção. Esse aumento contribui para uma maior funcionalidade das membranas devido à ampliação da área de superfície ativa.

Essa abordagem oferece vantagens consideráveis, como a simplificação do processo, a redução de riscos e a facilidade de manipulação. Além disso, a utilização da quitosana como agente de modificação permite explorar suas propriedades biológicas, ampliando o potencial de aplicação das membranas tanto na adsorção de proteínas quanto em outras áreas da biotecnologia e bioengenharia. Essa estratégia não só aprimora a funcionalidade das membranas, mas

Figura 9 – Micrografias das membranas de PAN/Cs preparadas usando diferentes concentrações relativas dos dois componentes: *a)* 10/1% em peso; *b)* 10/2% em peso; *c)* 10/3% em peso; *d)* 10/4% em peso; *e)* 12/1% em peso; *f)* 12/2% em peso. Todas as imagens têm a mesma ampliação ($15\ k\times$).

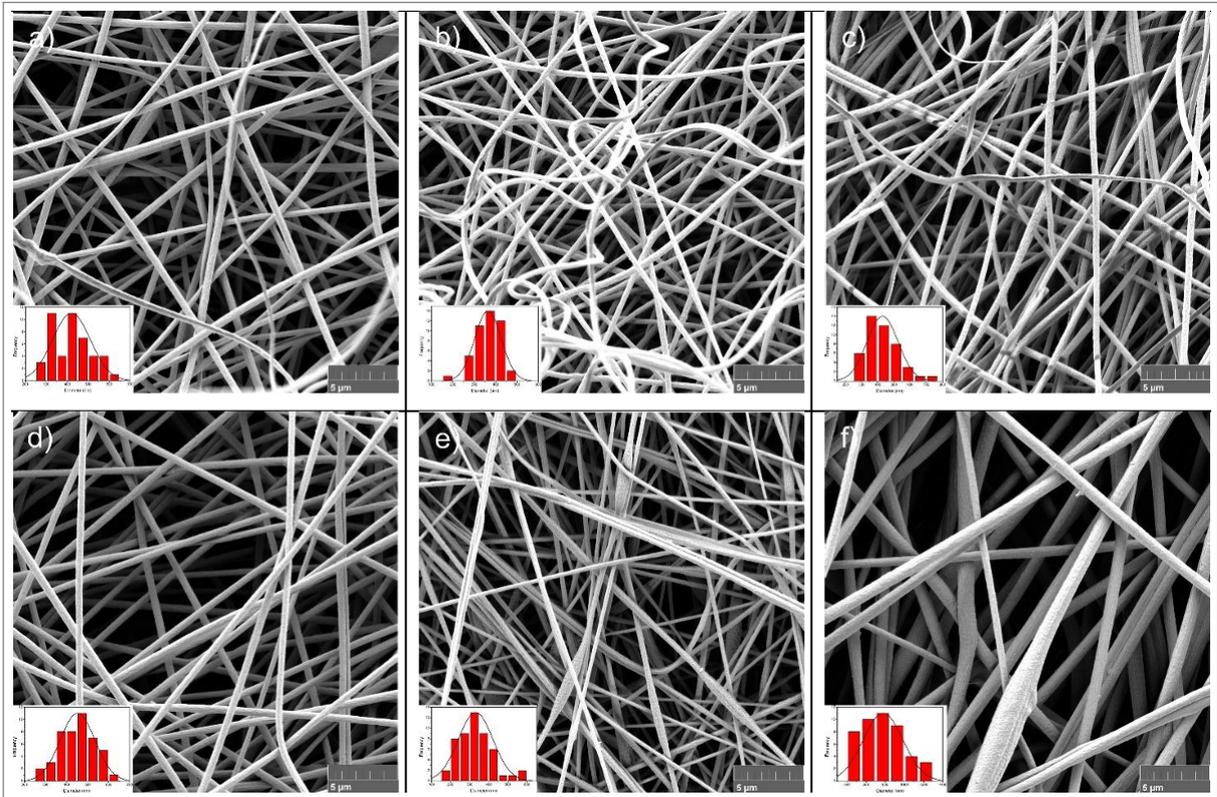


Figura 10 – Micrografias de MEV das membranas de: *a)* PAN 10% em peso, *b)* PAN/Cs 10/4% em peso e *c)* distribuição do diâmetro das membranas de PAN/Cs. (Ampliação: $15\ k\times$).

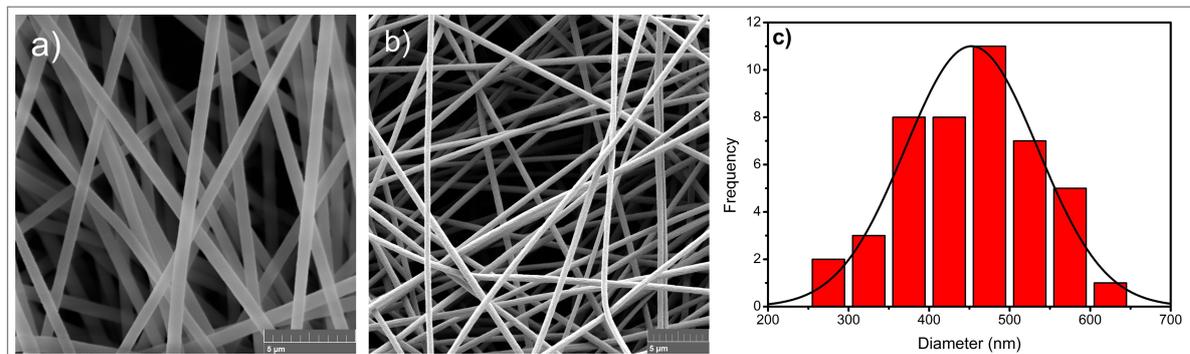


Figura 11 – Mapa da composição elementar e espectro EDS para a área analisada da membrana de PAN.

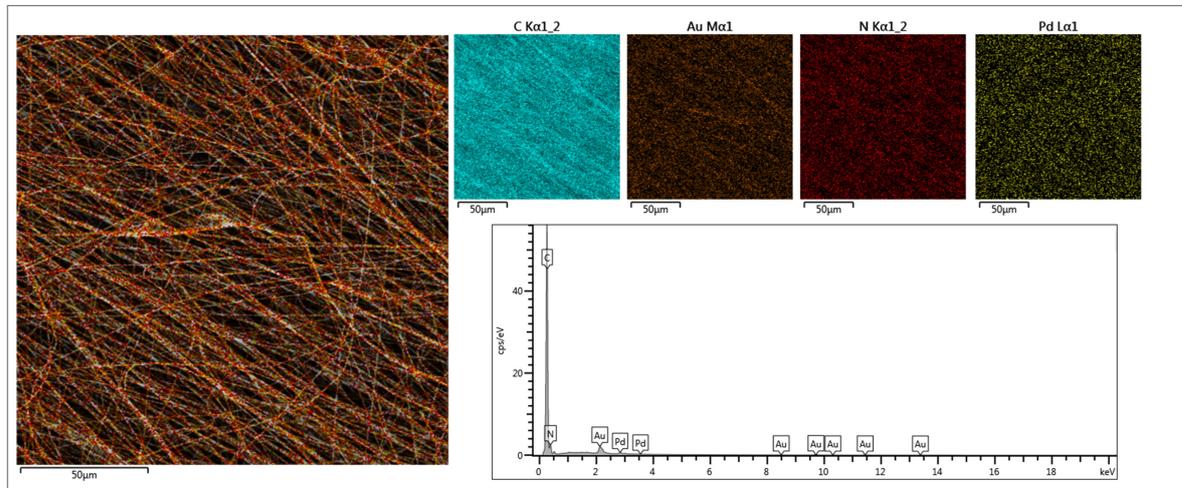
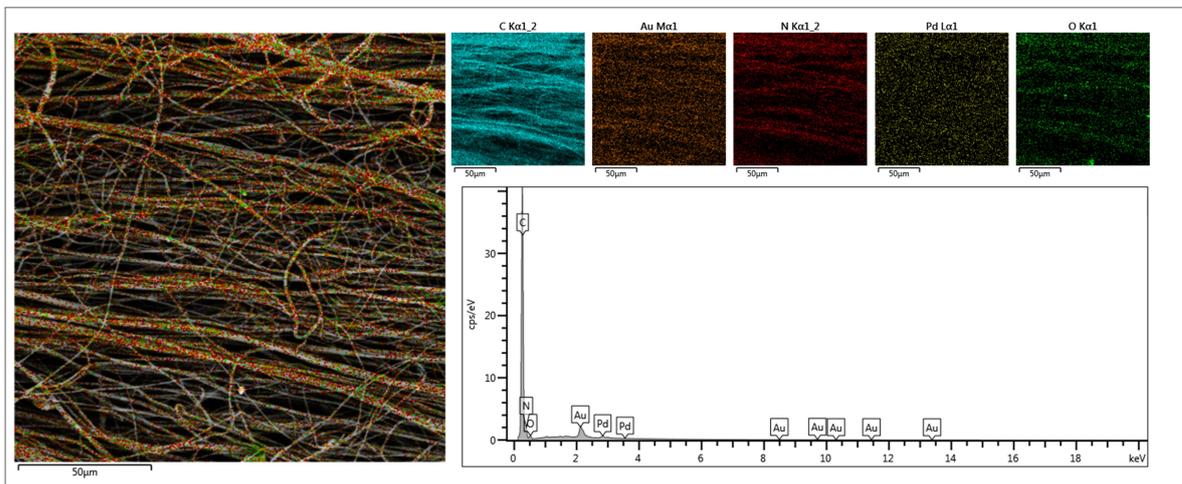


Figura 12 – Mapa da composição elementar e espectro EDS para a área analisada da membrana de PAN/Cs.



também as torna mais versáteis e eficazes para aplicações específicas em ambientes biológicos.

4.1.2 Estrutura e Características Físicas

4.1.2.1 Análise EDS das Membranas

A análise de EDS reflete a composição química da matriz de PAN e da quitosana incorporada, fornecendo informações detalhadas sobre a distribuição elementar dos constituintes.

No mapa de composição elementar da membrana de PAN (Fig. 11), os principais elementos identificados foram carbono (*C*) e nitrogênio (*N*), que correspondem à estrutura básica do polímero. O espectro de EDS confirmou essa composição, com um sinal predominante de carbono, acompanhado por um pequeno pico de nitrogênio, evidenciando a natureza química

da PAN. Além disso, foram observados picos adicionais de ouro (*Au*) e paládio (*Pd*), que estão associados à preparação da amostra, uma vez que a cobertura metálica é frequentemente utilizada para melhorar a condutividade durante a análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Na membrana PAN/Cs (Fig. 12), o mapa de composição elementar revelou, além dos sinais de *C* e *N*, um aumento significativo no sinal de oxigênio (*O*). Esse resultado indica a presença da quitosana, um polímero rico em grupos oxigenados, como hidroxilas ($-OH$) e carbonilas ($C=O$). A distribuição homogênea de oxigênio ao longo da matriz sugere uma boa integração da quitosana com a PAN, confirmando uma modificação bem-sucedida na composição da membrana.

O espectro de EDS da PAN/Cs reforçou esses achados, evidenciando um sinal mais intenso de oxigênio em comparação com a membrana de PAN pura. Além disso, observou-se um aumento relativo no pico de nitrogênio, que pode estar relacionado à presença de grupos amínicos da quitosana, confirmando sua incorporação na estrutura.

A introdução desses grupos hidrofílicos e quimicamente ativos pode resultar em melhorias significativas nas propriedades da membrana, especialmente no aumento da hidrofilicidade e na capacidade de adsorção, tornando-a mais eficiente para aplicações em separação de biomoléculas.

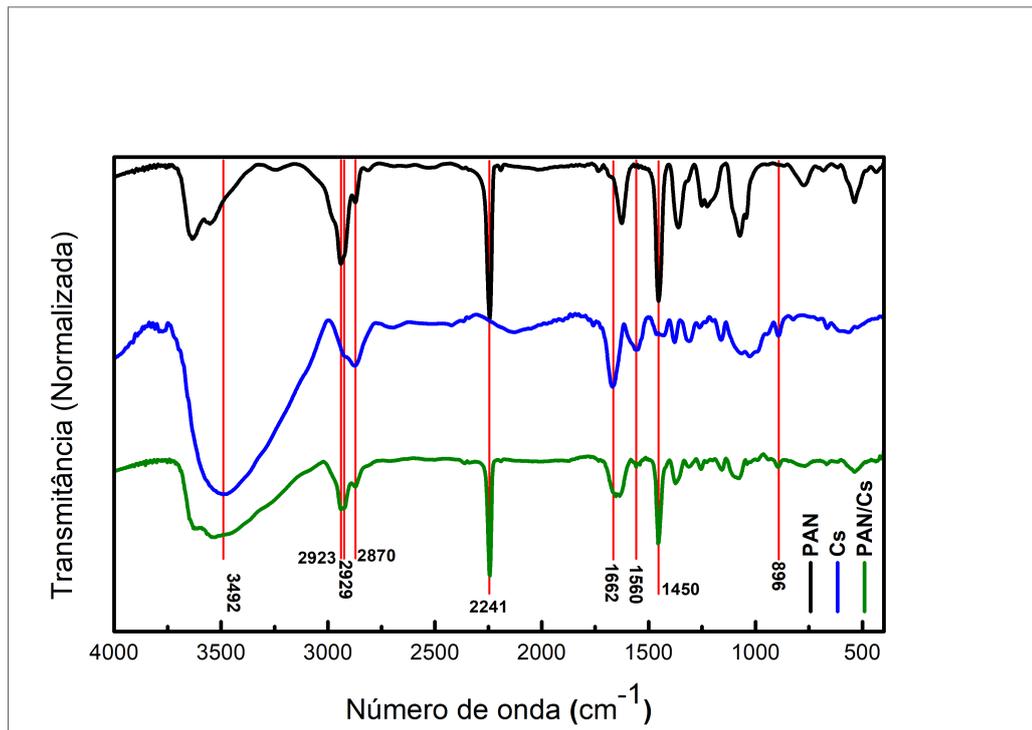
4.1.2.2 Espectros FTIR

Os espectros de FTIR da quitosana, da PAN e das membranas de PAN/Cs (Fig. 13) apresentam picos característicos que fornecem informações sobre suas estruturas químicas. A seguir estão descritos os principais picos observados nos espectros:

1) Espectro de FTIR da PAN pura:

- Pico em 2929 cm^{-1} : Vibração de estiramento de CH_2 , que é característica da presença de grupos metileno (CH_2) na estrutura da poliacrilonitrila.
- Pico em 2241 cm^{-1} : Vibração de estiramento de $C \equiv N$, indicando a presença de grupos ciano ($C \equiv N$) na estrutura da poliacrilonitrila.
- Pico em 1450 cm^{-1} : Vibração de flexão de CH_2 , também associada aos grupos metileno (CH_2) presentes na poliacrilonitrila.

Figura 13 – Espectros FTIR da quitosana e das membranas de PAN e PAN/Cs.



2) Espectro de FTIR da membrana híbrida de PAN/Cs:

- Banda larga em 3492 cm^{-1} : Associa-se à deformação axial dos grupos $O-H$ e $N-H$ presentes nas amidas I e II, indicando a presença de grupos funcionais de hidroxila e amino.
- Pico em 2870 cm^{-1} : Correspondente à vibração simétrica e assimétrica do grupo metileno ($-CH-$) presente na estrutura da membrana híbrida.
- Pico em 1662 cm^{-1} : Refere-se à deformação axial $C=O$ da amida I, que indica a presença de grupos carbonila ($C=O$) na estrutura da membrana híbrida.
- Pico em 1560 cm^{-1} : Está associado à deformação angular da ligação $N-H$ das amidas I e II, fornecendo evidências da presença de grupos amino ($N-H$) na estrutura da membrana.

Esses picos e bandas de absorção nos espectros de FTIR (13) são indicativos das ligações químicas e grupos funcionais presentes na PAN e nas membranas de PAN/Cs, permitindo a identificação e caracterização de suas estruturas químicas. Os dados obtidos através de FTIR revelam que, durante o processo de produção das membranas de PAN/Cs, não houve

uma modificação química das fibras de PAN, mas sim uma incorporação física da quitosana na matriz de nanofibras. Essa conclusão é corroborada por diferentes evidências, como a ausência de novos picos nos espectros de FTIR, o que indica que não houve formação de novas ligações covalentes entre PAN e quitosana. Além disso, os picos característicos de ambos os componentes permanecem inalterados, como o pico da PAN em 2241 cm^{-1} e o da quitosana em 3442 cm^{-1} , o que demonstra a preservação de suas estruturas químicas originais. A superposição de picos de ambos os materiais sugere que a incorporação da quitosana ocorreu por interações físicas, como ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas, em vez de reações químicas que levariam ao desaparecimento ou deslocamento dos picos.

4.1.2.3 FTIR da BSA

O espectro FTIR da BSA (Fig. 14) demonstra a presença de grupos funcionais da proteína na superfície da membrana, sugerindo uma interação entre a BSA e a membrana de PAN/Cs. No entanto, para comprovar a eficiência da adsorção, é necessário o uso de técnicas complementares, como a análise por UV-Vis.

O pico em 1681 cm^{-1} , atribuído às amidas primárias, corresponde às vibrações de alongamento do $C = O$, evidenciando a presença de ligações peptídicas características das amidas primárias da BSA.

Já o pico em 1533 cm^{-1} é associado às amidas secundárias, correspondendo às vibrações de flexão do $N - H$ e do $C - N$. Esse pico confirma a presença de ligações peptídicas típicas das amidas secundárias na proteína.

Por fim, o pico em 3481 cm^{-1} é atribuído às vibrações de alongamento dos grupos hidroxila (OH), presentes na estrutura da BSA devido a aminoácidos como serina e treonina, que possuem grupos OH em suas cadeias laterais. A presença desse pico confirma a presença de grupos hidroxila na proteína (WANG; BUCK; CHEN, 2002; BERAGOUI et al., 2015). Esses resultados estão sintetizados na Tabela 7.

A interação entre a membrana de PAN/Cs e a BSA ocorre provavelmente por meio de interações físicas, como:

1) **Interações de Hidrogênio:** A presença de grupos hidroxila (OH) na membrana e na BSA possibilita a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias laterais dos aminoácidos e os grupos funcionais na superfície da membrana.

2) **Interações Eletrostáticas:** Dependendo das condições do pH do meio, a quitosana

Figura 14 – Espectros FTIR da BSA e das membranas de PAN/Cs.

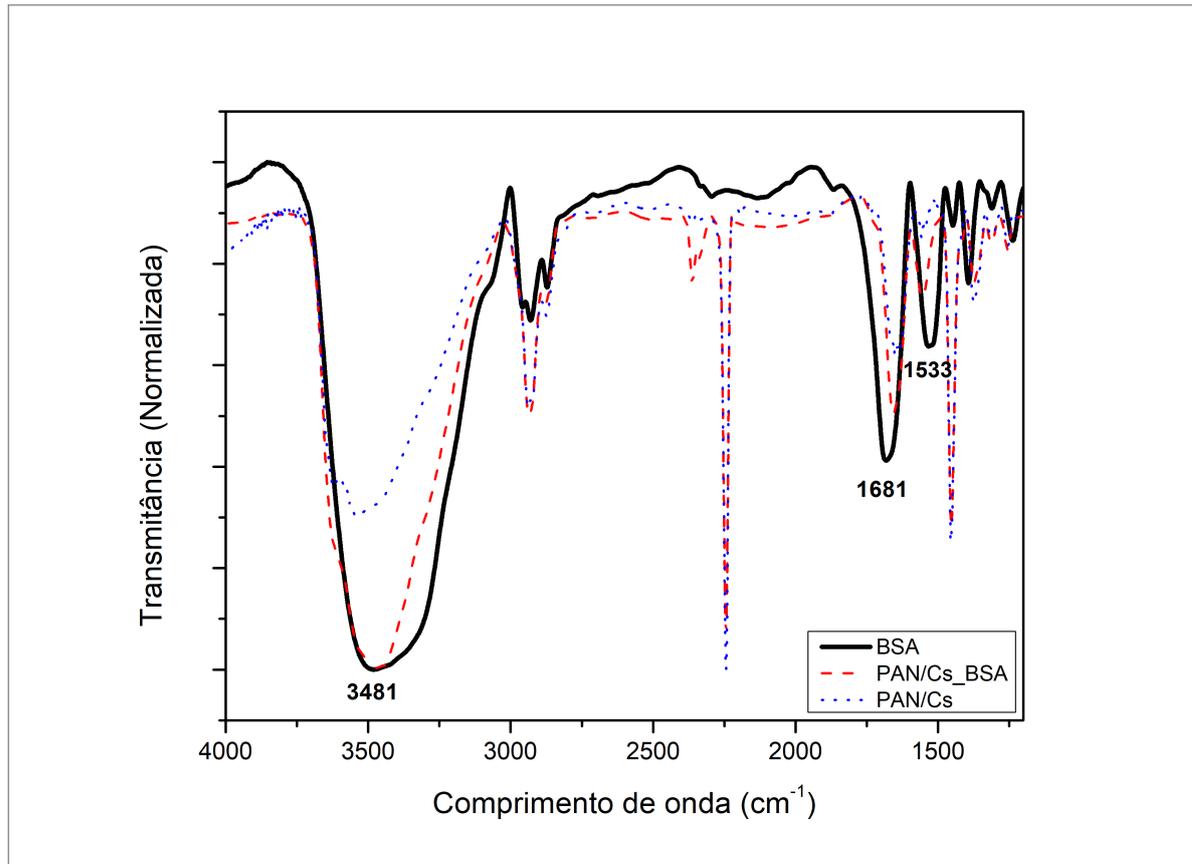


Tabela 7 – Comprimento de onda de absorção no infravermelho dos diferentes grupos funcionais presentes nas amostras das membranas antes e após o experimento de adsorção e para a BSA.

Atribuições	PAN/Cs (cm^{-1})	BSA (cm^{-1})	PAN/CS_BSA (cm^{-1})
O – H	3481	3481	3473
C – H	2935		2935
C – H	2870		2870
C \equiv N	2243		2243
C = O	1652 (C = C)	1681 (C = O)	1664 (C = O)

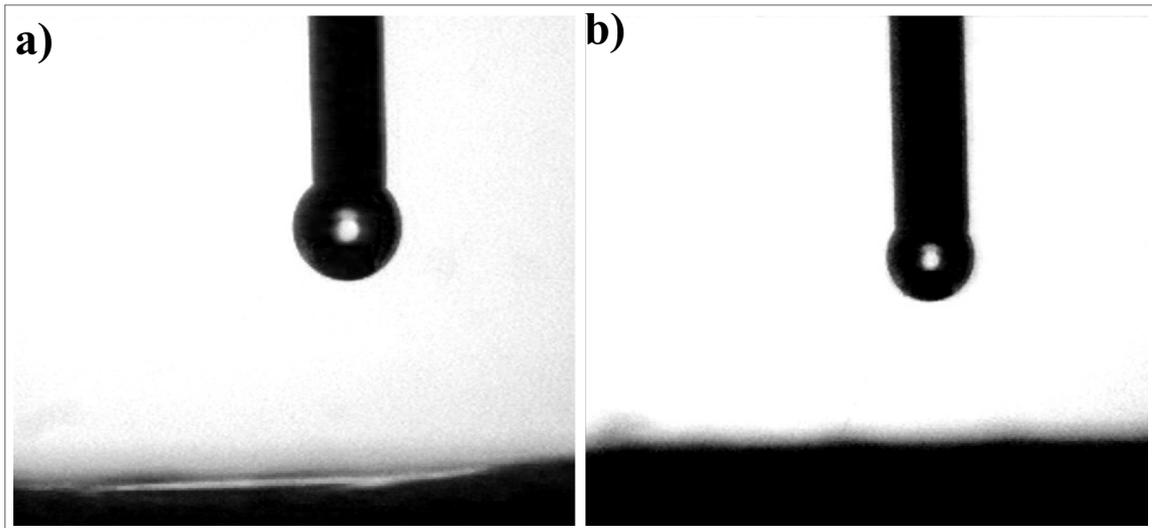
Fonte: A autora (2024).

(Cs) presente na membrana pode apresentar grupos amina protonados (NH_3^+), que podem interagir eletrostaticamente com regiões da BSA que possuem carga oposta.

3) **Interações Hidrofóbicas:** Algumas regiões da proteína e da membrana podem interagir através de forças hidrofóbicas, que promovem a associação entre regiões não polares.

Essas interações não-covalentes sugerem que o processo de adsorção é reversível, permitindo que a BSA seja desorvida da membrana sob condições específicas (alteração do pH, força iônica, etc).

Figura 15 – Imagens das medidas do ângulo de contato das membranas de a) PAN (0°) e b) PAN/Cs (0°).



4.1.2.4 Medidas do Ângulo de Contato

O ângulo de contato é uma medida para avaliar a molhabilidade de uma superfície. Utilizamos essa técnica para quantificar a hidrofiliicidade das membranas de PAN e PAN/Cs.

Na Fig. 15, são apresentados os resultados das medições do ângulo de contato para membranas de PAN e PAN/Cs. Observa-se que a modificação da membrana de PAN não afeta significativamente sua hidrofiliicidade superficial, mantendo-se excelente, com um ângulo de contato ($\theta = 0^\circ$). Essa alta hidrofiliicidade é uma característica crucial, pois permite a adsorção eficaz de moléculas proteicas dispersas em meio aquoso.

A modificação com a quitosana pôde conferir outras propriedades às membranas. Uma vez que o caráter hidrofílico das membranas é relevante para estudos de separação de proteínas em soluções aquosas, pois, a maior hidrofiliicidade facilita o contato das moléculas alvo com sua superfície, permitindo uma interação mais eficiente entre as proteínas e a membrana durante o processo de separação.

Essa interação pode ocorrer por meio de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, facilitando a adsorção seletiva de proteínas na superfície da membrana.

Em particular, as membranas hidrofílicas que possuem grupamentos amino e ácidos carboxílicos em sua superfície apresentam propriedades adicionais benéficas. Esses grupos funcionais podem conferir propriedades anticoagulantes às membranas, prevenindo assim a coagulação sanguínea durante o processo de separação de amostras de sangue. Além disso, esses grupos também podem ter propriedades anti-incrustantes, de modo a reduzir a formação de incrus-

tações e melhorar a estabilidade do desempenho da membrana ao longo do tempo (TRIPATHI; DUBEY; STAMM, 2014).

Dessa forma, as membranas hidrofílicas com grupos amino e ácidos carboxílicos em sua superfície têm grande potencial para serem utilizadas em processos de separação de proteínas em amostras biológicas, como o sangue, devido a sua capacidade de interação seletiva, compatibilidade e propriedades adicionais benéficas.

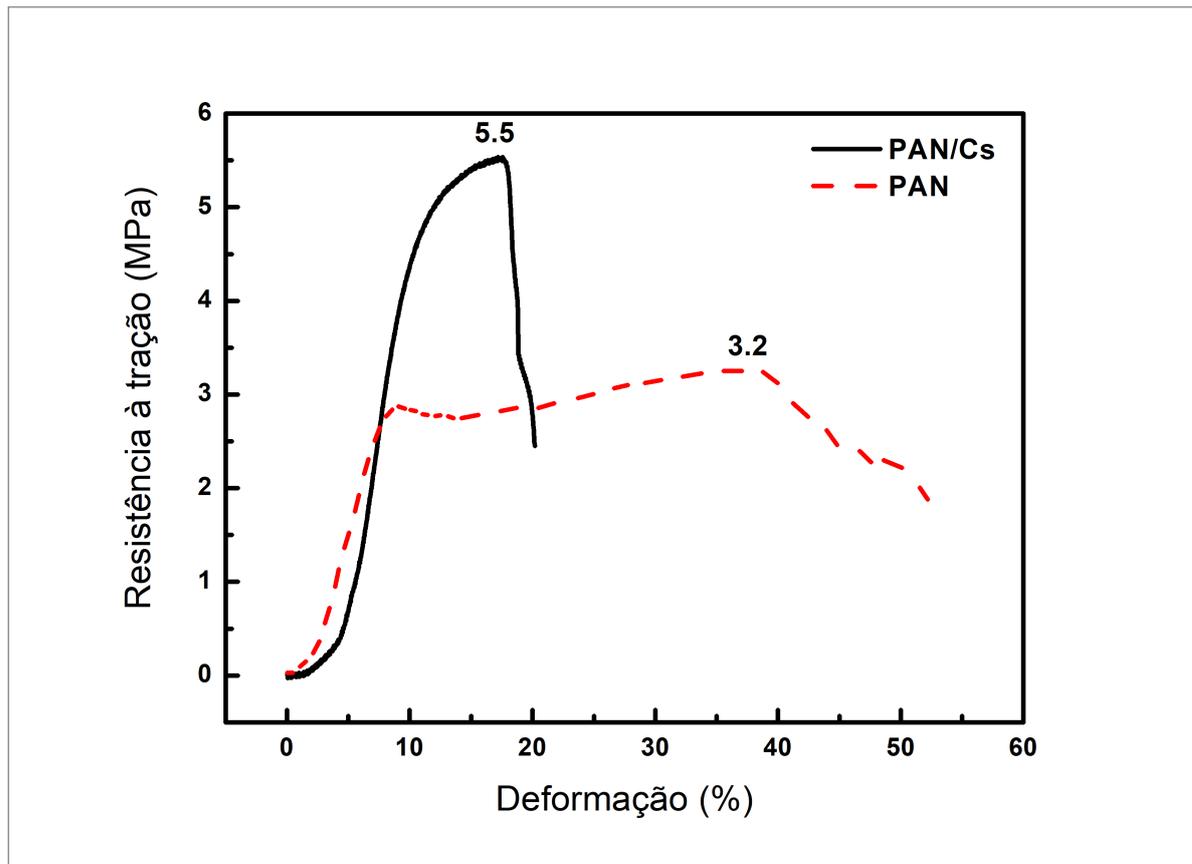
4.1.2.5 *Ensaio Mecânico*

Na Fig. 16, são apresentadas as curvas de tensão-deformação das membranas de PAN e PAN/Cs, obtidas por meio de ensaios de tração mecânica. As membranas de PAN modificadas apresentam menor ductilidade em comparação com as membranas puras, exibindo maior rigidez, com resistência à tração aproximadamente 70% superior, alcançando um valor estimado de 5,5 *MPa*. Esses resultados indicam que as membranas compósitas possuem resistência mecânica suficiente para serem reutilizadas em experimentos de adsorção.

A incorporação da Cs contribui para aumentar a rigidez das membranas, tornando-as menos dúcteis e com menor capacidade de deformação antes da ruptura em comparação às membranas de PAN puras. A maior resistência à tração das membranas de PAN/Cs indica uma robustez aprimorada sob estresse mecânico, permitindo que suportem cargas sem romper. Essas propriedades mecânicas são fundamentais para garantir durabilidade e possibilitar o uso repetido das membranas em processos de adsorção. Dessa forma, o resultado da mistura física onde a quitosana foi distribuída na matriz de nanofibras de PAN, contribuiu para aprimorar as propriedades mecânicas da membrana. Esse comportamento é corroborado pela curva de tensão-deformação, que reflete uma boa dispersão das cadeias de quitosana, resultando assim em uma maior rigidez da membrana.

O comportamento da curva tensão-deformação das membranas de PAN/Cs indica um grau adequado de aderência entre os dois materiais componentes. A incorporação de Cs aumentou a rigidez, visto que, em comparação com as membranas de PAN puras, as membranas de PAN/Cs são menos dúcteis e apresentam uma capacidade reduzida de deformação antes da ruptura. A maior resistência à tração das membranas de PAN/Cs sugere que elas têm uma boa capacidade de suportar cargas mecânicas sem quebrar. Essas características mecânicas são importantes para garantir a durabilidade, permitindo o uso repetido das membranas em experimentos de adsorção.

Figura 16 – Resistência à tração das membranas de PAN e PAN/Cs.



4.2 MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS MEMBRANAS E AS PROTEÍNAS

4.3 EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA BSA

A vasta literatura existente sobre a BSA, que abrange parâmetros como concentração, pH e conformação estrutural, fornece uma base teórica sólida para a realização de experimentos. Um aspecto adicional importante é a possibilidade de extrapolar os resultados obtidos para sistemas que envolvam outras proteínas de interesse, ampliando a aplicabilidade dos procedimentos desenvolvidos.

4.3.1 Resultados Experimentais para a BSA

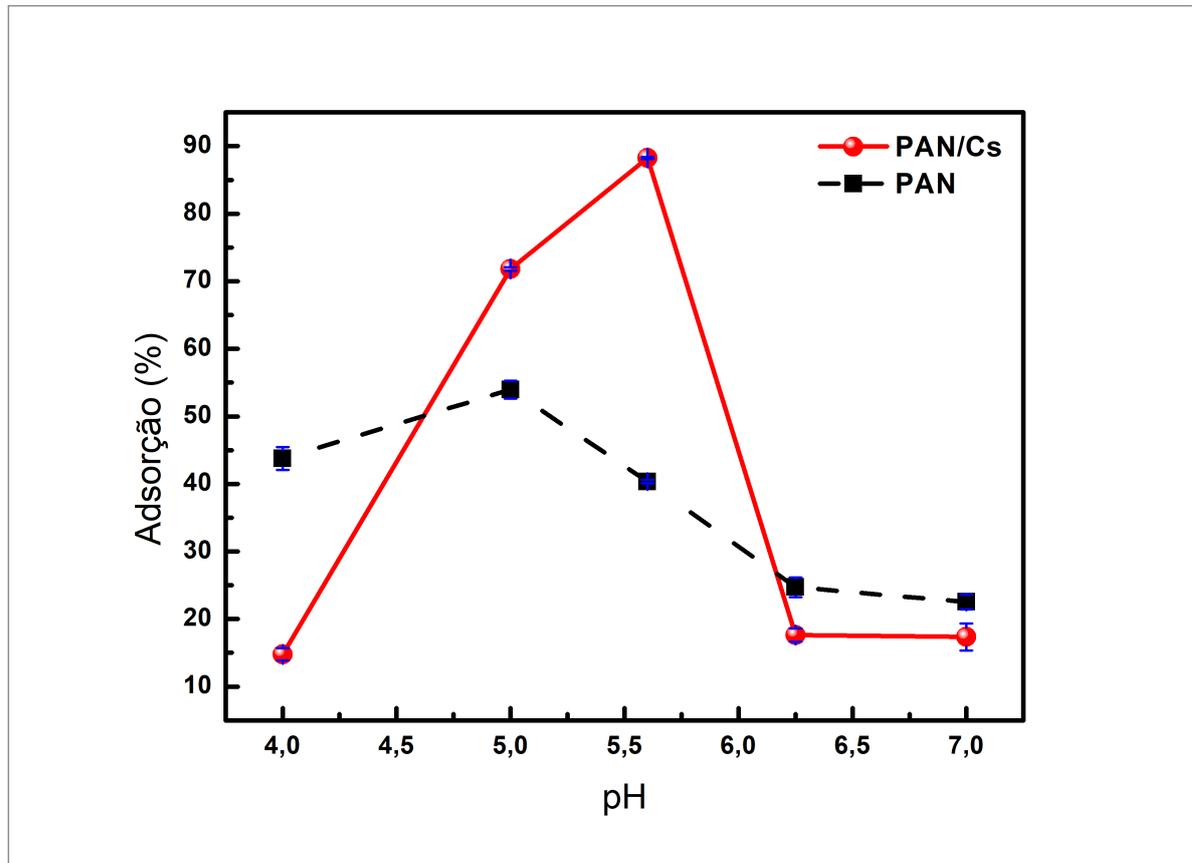
Os experimentos realizados para avaliar a influência do pH e da concentração inicial da BSA mostraram que a adsorção é máxima em condições de pH ligeiramente ácido a neutro, onde predominam interações eletrostáticas favoráveis e ligações de hidrogênio. Em contrapartida, a adsorção é reduzida em pH fortemente ácido ou básico devido às repulsões eletrostáticas.

Em cada experimento, foram utilizados 9 *mg* da membrana (equivalente a quatro amostras de PAN/Cs e seis amostras de PAN), dispostas no interior de uma coluna de centrifugação junto com 500 μL de solução proteica em uma concentração de 0,6 *mg/mL*. Em seguida, a coluna de centrifugação foi submetida a rotações de 5000 *rpm* por cinco ciclos consecutivos, com duração de um minuto.

4.3.1.1 Efeito do pH sobre a Adsorção

Primeiramente, investigamos o efeito da variação de pH nas soluções de proteína BSA sobre a capacidade de adsorção das membranas (Fig. 17). A máxima adsorção da BSA foi de aproximadamente 88,25% (em pH 5,6) para a membrana PAN/Cs e 53,96% (em pH 5,0) para a membrana PAN com uma solução de ácido acético e acetato de sódio sendo usado como tampão. O aumento na capacidade de adsorção da PAN/Cs é atribuído ao fato de o pH do meio estar acima do *pI* da BSA ($pI \equiv 5$), o que torna a BSA carregada negativamente devido à desprotonação de seus grupos carboxila ($-\text{COO}^-$). Essa desprotonação favorece as interações com os grupos amino protonados da quitosana, como indicado nas referências (DAGO-SERRY et al., 2024; HE et al., 2018; SIRIJAREE; PRAIIPAT, 2023; SUN; OU; CHEN, 2022). Quando dissolvidas em solução a um determinado pH, as proteínas frequentemente apresentam cargas em sua superfície, o que resulta na atração de íons de carga oposta do meio circundante e na formação de uma camada elétrica dupla. O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico medido na interface entre a camada estacionária, onde os íons estão fortemente ligados à superfície da partícula, e a camada difusa, onde os íons apresentam maior mobilidade. Esse parâmetro fornece informações sobre a carga líquida da proteína em diferentes valores de pH, sendo essencial para prever sua interação com as membranas. A compreensão desse comportamento permite a otimização do pH da solução para maximizar a adsorção da proteína, facilitando seu controle em aplicações específicas. Na Fig. 18, é apresentada a variação do potencial zeta das moléculas da BSA dissolvidas nas soluções tampão, utilizadas para promover a interação entre a BSA e as membranas. Os resultados confirmam que, em pH abaixo do *pI* da BSA, as moléculas apresentam carga líquida positiva, enquanto em pH acima desse valor, a carga líquida torna-se negativa.

Figura 17 – Porcentagem de adsorção da BSA em função do valor do pH do meio para as membranas de PAN/Cs e PAN.



4.3.1.2 Influência da Concentração Inicial

Também examinamos a influência da concentração inicial da solução da BSA na capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs e PAN (Fig. 19 e Fig. 20). Nesses experimentos, o pH foi mantido em 5,6 para as membranas de PAN/Cs e em 5,0 para as membranas de PAN. Em ambos os casos, observou-se um aumento na capacidade de adsorção com o aumento da concentração de proteína, atingindo capacidades máximas de adsorção (q_e^{max}) para uma concentração de proteína igual a 1,6 mg/mL de 75,61 mg/g para a membrana PAN/Cs e 21,16 mg/g para a membrana PAN. Esse resultado pode ser atribuído à intensificação da interação entre a proteína e a membrana à medida que a concentração da proteína aumenta. Além disso, o gradiente de concentração elevado favorece a transferência de massa entre o adsorbato na fase fluida e os sítios ativos na superfície da membrana. No entanto, o percentual de remoção diminui à medida que os sítios ativos disponíveis se tornam progressivamente saturados.

Os resultados ressaltam a influência crítica do pH do meio e da concentração inicial da proteína na eficiência do processo de adsorção em membranas. Além disso, a escolha do

Figura 18 – Potencial Zeta em função do pH da solução da proteína BSA em meio tamponado (concentração 0,6 mg/mL).

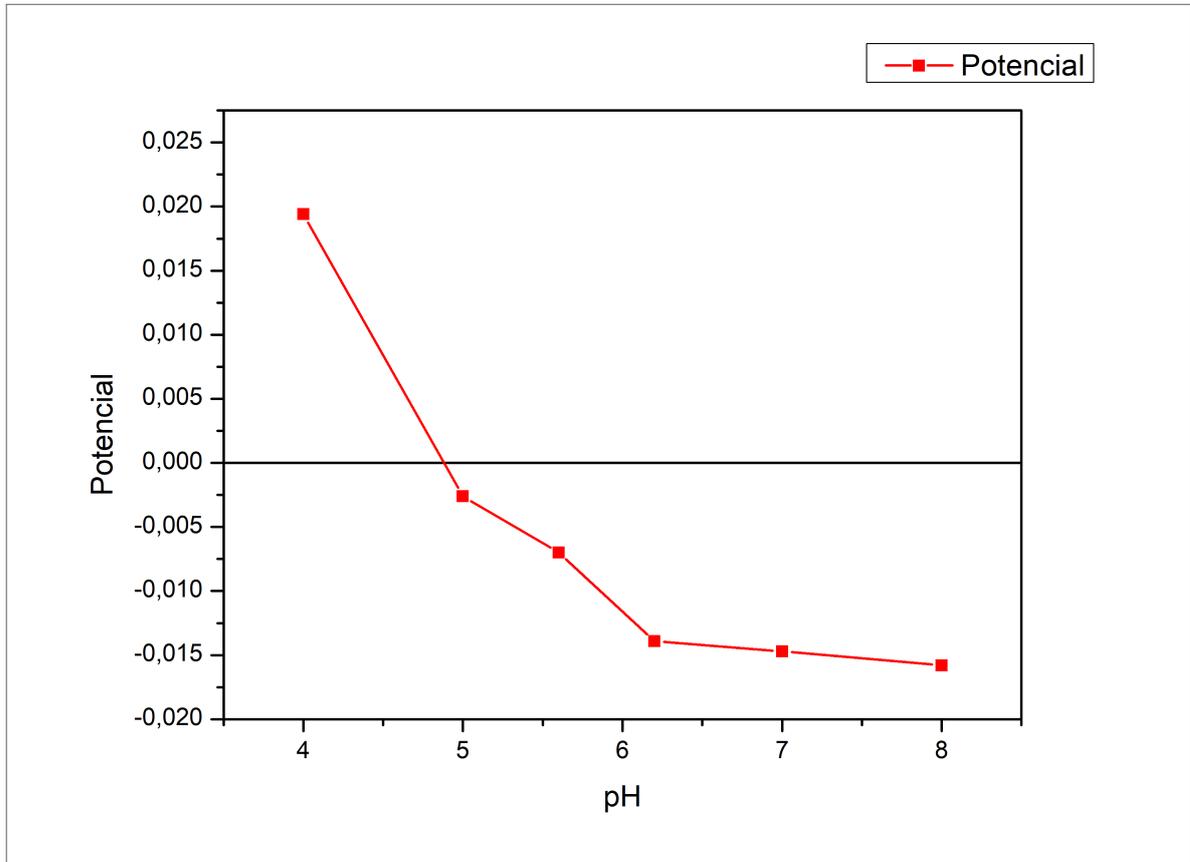


Figura 19 – Efeito da variação da concentração inicial da BSA sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs, a pH 5,6.

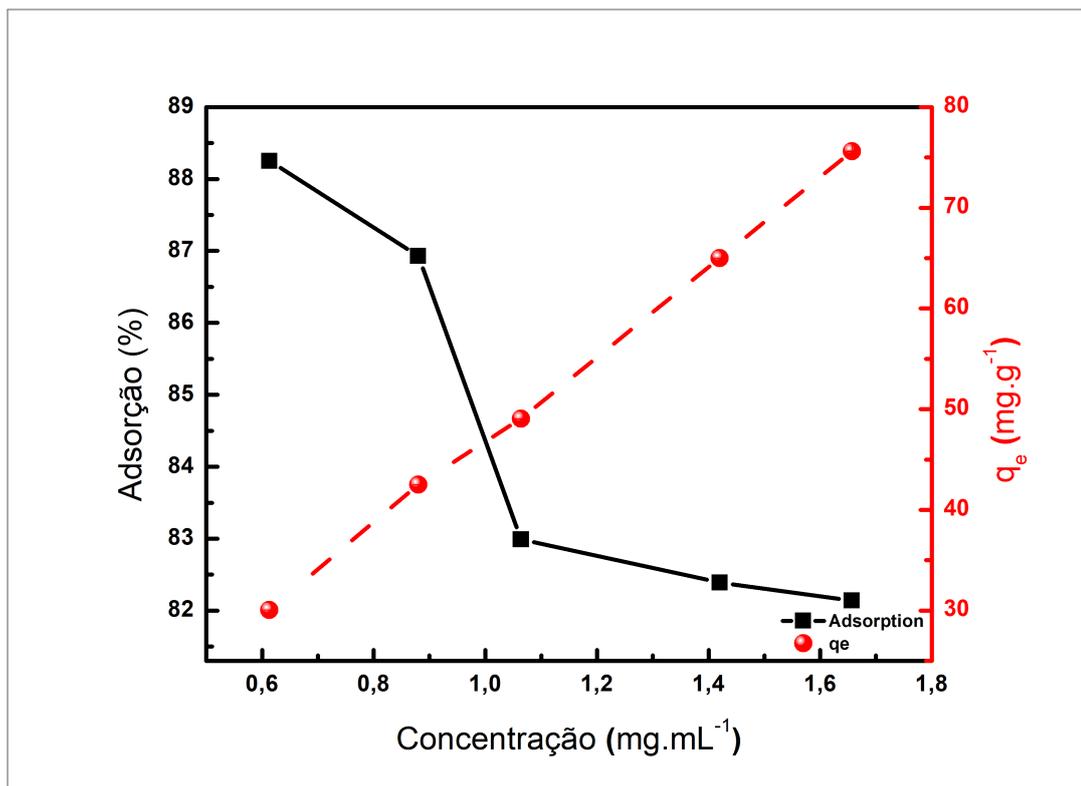
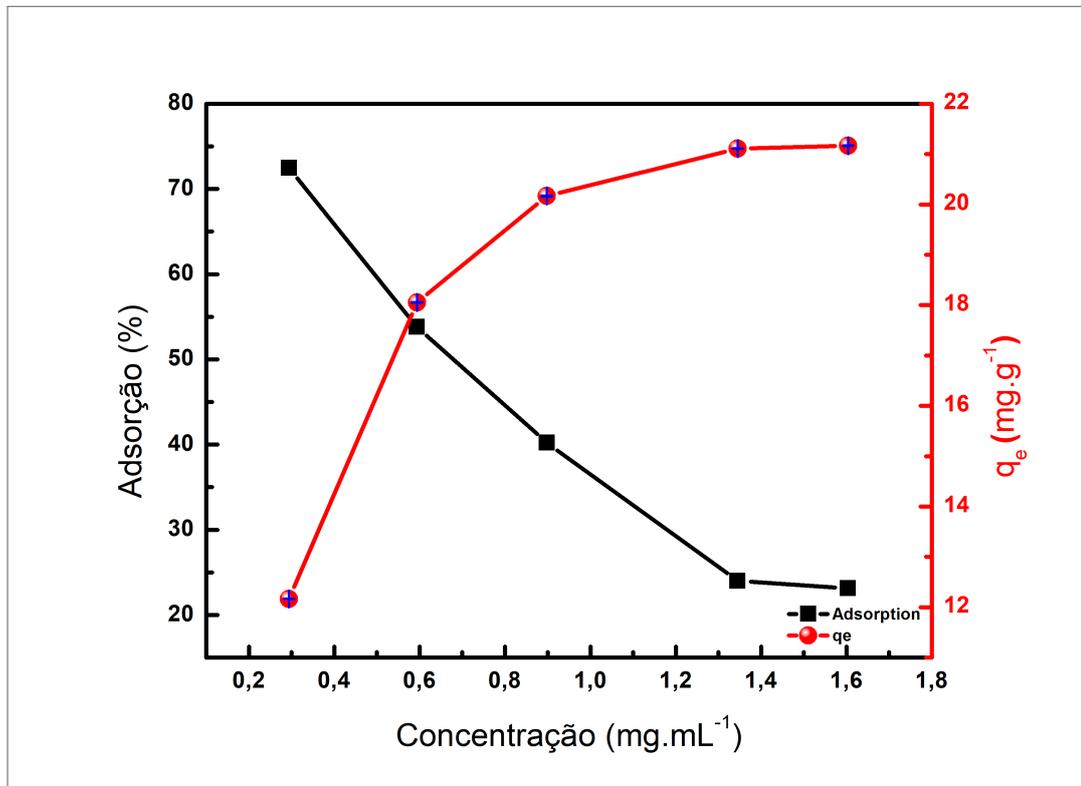


Figura 20 – Efeito da variação da concentração inicial da BSA sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN, a pH 5,0.



tampão adequado desempenha um papel fundamental, uma vez que controla o equilíbrio de cargas entre a proteína e a superfície do adsorvente.

Compreender essas relações permite otimizar as condições experimentais para alcançar a máxima eficiência de adsorção, mesmo em diferentes concentrações de proteína. Esse conhecimento não apenas aprofunda a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na adsorção, mas também oferece subsídios valiosos para o desenvolvimento de estratégias eficazes no uso de membranas eletrofiadas para separação e purificação de biomoléculas.

Por fim, esses insights são essenciais para determinar as condições ideais de adsorção em futuras aplicações práticas, contribuindo para a melhoria de processos biotecnológicos e industriais relacionados à purificação e imobilização de proteínas.

4.3.1.3 Modelos de Isotermas

Para compreender melhor os mecanismos microscópicos envolvidos na adsorção da BSA em membranas poliméricas, aplicamos os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson (WU et al., 2010) aos dados experimentais (Fig. 21). O modelo de Redlich-Peterson,

com seus três parâmetros, é eficaz em lidar com desvios observados em alguns sistemas de adsorção em relação aos modelos mais simples de Langmuir e Freundlich. No entanto, ele apresenta precisão semelhante ao modelo de Freundlich quando a constante correspondente atinge valores suficientemente altos (VERMA; CHAKRABORTY; BASU, 2006; PREETHA; VIRUTHAGIRI, 2007). Apesar das semelhanças nas curvas, o modelo de Freundlich apresentou o melhor ajuste, com um valor de R^2 de 0,984, em comparação com 0,981 para Langmuir e 0,974 para Redlich-Peterson. Com base nesse modelo e usando regressão linear, a capacidade teórica de adsorção da BSA pelas membranas de PAN/Cs foi estimada em $75,17 \text{ mg/g}$, em conformidade com a maior capacidade de adsorção experimental observada ($75,61 \text{ mg/g}$).

Esse fato sugere que a adsorção ocorre com a formação de uma camada múltipla em uma superfície heterogênea. Para as membranas PAN/Cs, essa heterogeneidade pode ser atribuída à presença de grupos funcionais da quitosana, que oferecem diferentes tipos de interações para a molécula de BSA. Além disso, a rugosidade da superfície da membrana, confirmada por MEV, contribui para a variabilidade dos sítios de adsorção. A adsorção ocorre em múltiplas camadas, de modo que, após o preenchimento dos primeiros sítios de adsorção, moléculas adicionais podem se adsorver sobre as já adsorvidas, aumentando a capacidade de retenção da proteína na membrana.

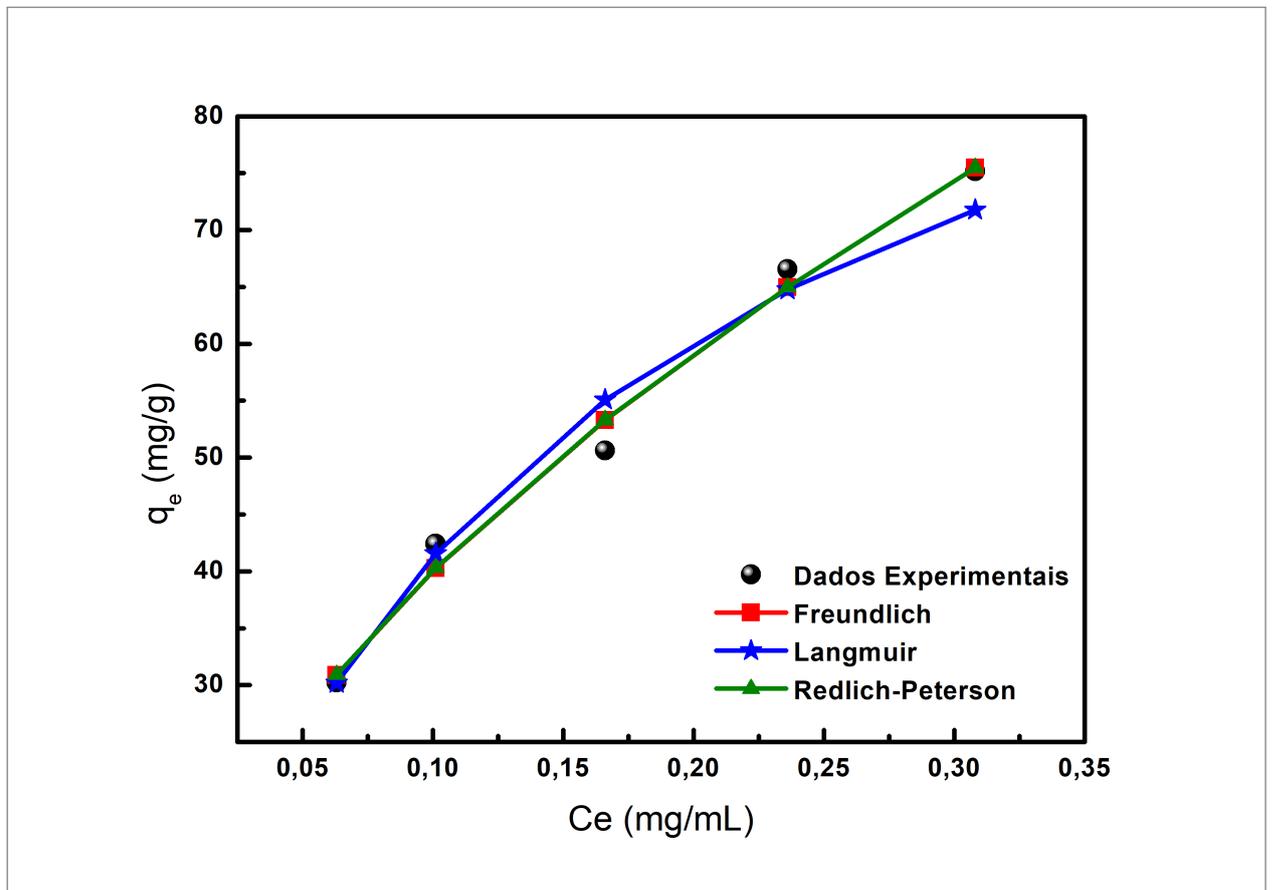
A consistência entre os valores teóricos e experimentais reforça a validade do modelo adotado e fornece uma estimativa confiável da capacidade máxima de adsorção das membranas de PAN/Cs para a proteína BSA. Essas informações são importantes para o planejamento e a otimização de futuros estudos e aplicações relacionadas à adsorção de proteínas em membranas poliméricas eletrofiadas.

4.3.1.4 Dessorção e Recuperação

Testes com diferentes soluções de eluição mostraram que o tampão *Tris* – *HCl* $1,5 \text{ M}$ (pH 10) proporcionou maior eficiência de dessorção (72,40%). Utilizando 2 alíquotas de $250 \mu\text{L}$, a taxa de recuperação da BSA alcançou 90%.

Para otimizar o processo de dessorção das moléculas da BSA capturadas, avaliamos diversas soluções tampão de eluição (Tabela 8): (1) Glicina - 2 M de Hidróxido de Sódio pH 10,6; (2) *Tris* – *HCl* $0,1 \text{ M}$ pH 8,8; (3) Fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 8 e (4) *Tris* – *HCl* $1,5 \text{ M}$ pH 10. Em pH básico, as interações entre as moléculas da BSA e a superfície da membrana se enfraquecem, facilitando a ruptura das ligações eletrostáticas e promovendo a liberação da proteína no meio

Figura 21 – Ajuste dos dados experimentais para os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson para a adsorção da BSA pelas membranas de PAN/Cs. Observe a superposição quase completa das duas últimas curvas.



aquoso (SADEGH; SAHAY; SONI, 2019; SAYGILI et al., 2021; FAN et al., 2015).

Tabela 8 – Influência do tipo de solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína BSA previamente captada pela membrana de PAN/Cs.

Protocolo	Porcentagem de dessorção (%)
Glicina - Hidróxido de Sódio 2 M pH 10,6	19,27
Tris – HCl 0,1 M pH 8,8	46,38
Fosfato 0,1 M pH 8	56,81
Tris – HCl 1,5 M pH 10	72,40

Fonte: A autora (2024).

Para investigar o efeito do volume de eluição na dessorção da proteína da membrana PAN/Cs, testamos três protocolos diferentes (Tabela 9), nos quais volumes variados de solução de eluição - **P1** (500 μ L, de uso único), **P2** (125 μ L, usado duas vezes) e **P3** (250 μ L, usado duas vezes)- foram adicionados a uma coluna de centrifugação contendo as membranas com as proteínas adsorvidas, seguidos de centrifugação por 1 minuto. Verificamos que o uso de

duas alíquotas consecutivas de 250 μL da solução de eluição resultou em maior eficiência de dessorção, alcançando uma excelente taxa de recuperação ($\equiv 90\%$) da proteína BSA ao utilizar uma solução de eluição de *Tris* – *HCl* 1,5 M (pH 10).

Tabela 9 – Influência do volume da solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína BSA previamente captada pela membrana de PAN/Cs.

Protocolo	Porcentagem de dessorção (%)
P1: 500 μL (1 \times)	72,40
P2: 125 μL (2 \times)	62,90
P3: 250 μL (2 \times)	89,13

Fonte: Elaborada pelo autor (2024)

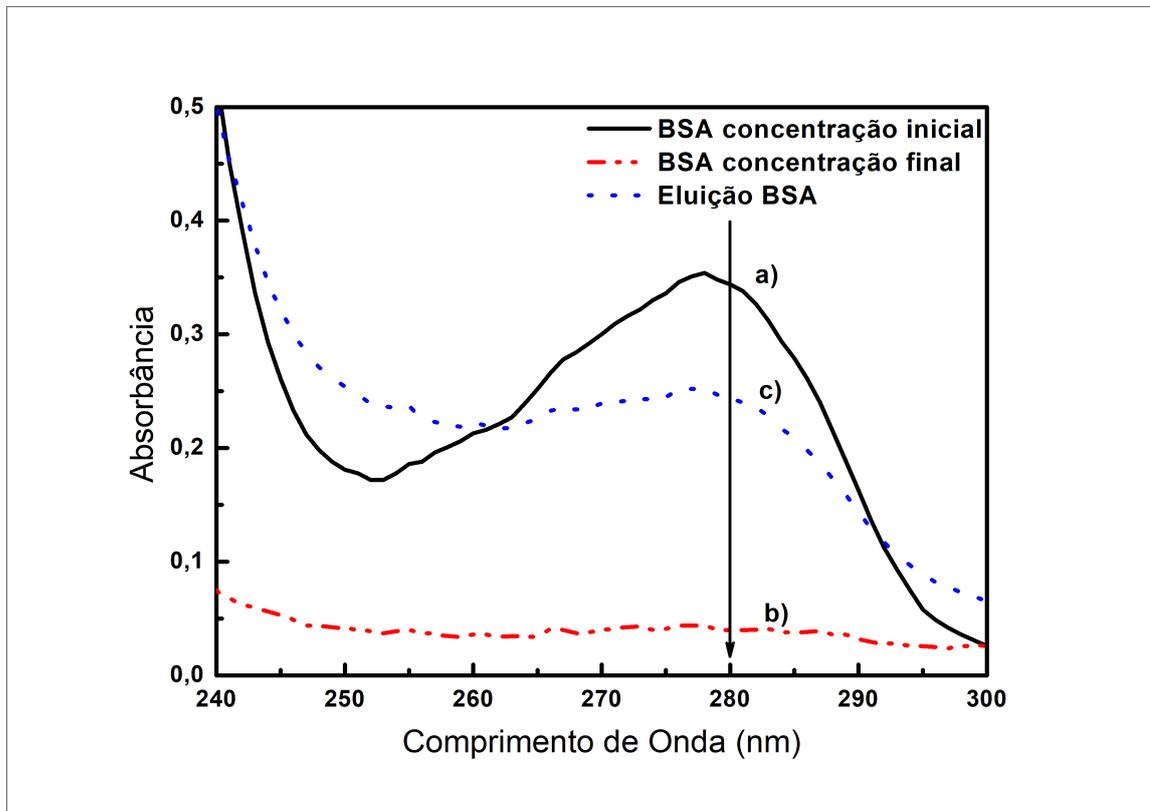
Essas informações são relevantes para o desenvolvimento de procedimentos eficientes de dessorção em estudos futuros relacionados à recuperação de proteínas adsorvidas em membranas poliméricas.

Na Fig. 22, apresentamos os espectros de UV-Vis das soluções da BSA antes (curva *a*), com concentração de 0,531 mg/mL e após (curva *b*), com concentração reduzida para 0,088 mg/mL) a interação com as membranas de PAN/Cs, bem como após a etapa de dessorção utilizando uma solução de eluição de *Tris* – *HCl* 1,5 M em pH 10 (curva *c*), onde a concentração aumentou para 0,397 mg/mL . Observa-se que o uso dessa solução de eluição não altera a estrutura nativa da BSA, uma vez que não houve deslocamento no comprimento de onda de máxima absorbância da BSA, situado em 280 nm . Sabe-se que alterações nas condições do solvente e na conformação da proteína podem deslocar o pico de absorção para a faixa de 290-300 nm , indicando alterações na estrutura nativa da molécula (SCHMID, 2001).

Além disso, empregamos a eletroforese em gel de SDS-PAGE para caracterizar as amostras das proteínas.

Diversas técnicas, como eletroforese, ensaios bioquímicos, espectroscopia e microscopia eletrônica, podem ser empregadas para investigar a desnaturação de proteínas e avaliar sua integridade estrutural e funcional (KURIEN; SCOFIELD, 2015). Entre essas, a SDS-PAGE destaca-se como um dos métodos mais simples, econômicos e amplamente utilizados para análise de pureza proteica (KIRLEY; NORMAN, 2018). O dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico, desnatura as proteínas formando complexos com os polipeptídeos, que então migram através do gel com base no seu tamanho. Essa técnica pode ser conduzida em condições não redutoras ou redutoras. No último caso, as proteínas são aquecidas e um agente redutor, como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), é utilizado para romper as pontes dissulfeto

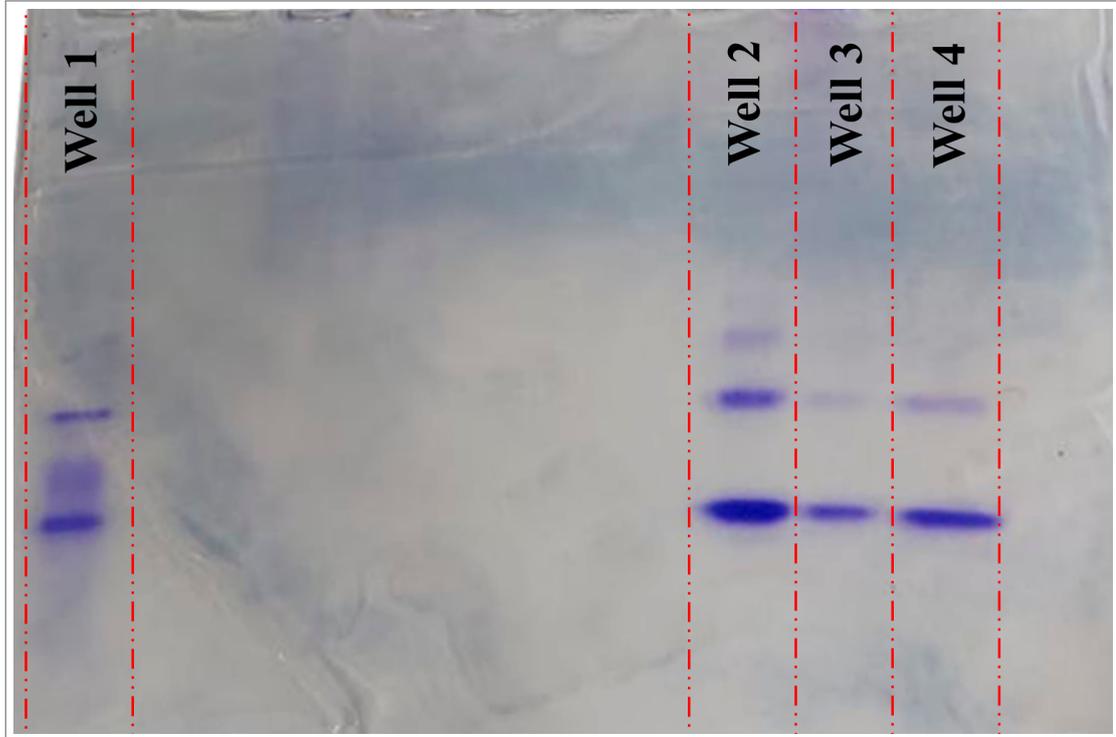
Figura 22 – Espectro UV-Vis da solução da BSA antes (curva *a*) e depois (curva *b*) da interação com as membranas de PAN/Cs e do meio aquoso após a eluição da proteína capturada com uma solução de eluição de *Tris – HCl* a 1,5 M (pH 10) (curva *c*).



($-S-S-$), desestruturando completamente as estruturas quaternária e terciária das proteínas (MASSON; LUSHCHEKINA, 2022).

Em um experimento de eletroforese, a desnaturação proteica pode ser identificada por meio de diferentes indicadores (MASSON; LUSHCHEKINA, 2022; WESTERMEIER, 2016): 1) Padrões de migração alterados, decorrentes de mudanças na carga líquida e/ou estrutura tridimensional, e 2) Modificações no padrão de bandas, causadas por alterações nas estruturas secundária e terciária, levando à redistribuição de subunidades ou fragmentos proteicos. No entanto, é importante observar que o desaparecimento de bandas na análise por SDS-PAGE nem sempre indica diretamente a desnaturação da proteína. Fatores como degradação proteica, insuficiente carga de proteína, perda de afinidade com o corante ou a concentração de eluentes durante a etapa de eluição também podem resultar na ausência de uma banda, especialmente em proteínas de maior peso molecular. Assim, assegurar condições ideais de eletroforese é fundamental para preservar a integridade das proteínas em análise, evitando alterações estruturais que possam comprometer a precisão dos resultados e a interpretação das características da amostra.

Figura 23 – Eletroforese SDS-PAGE das soluções de BSA em diferentes estágios do processo de separação: Poço 1: padrão original de proteína; Poço 2: a solução original da BSA em tampão de acetato 0,5 M pH 5,6; Poço 3: sobrenadante da solução de BSA após a interação com as membranas; e Poço 4: após as moléculas de proteína adsorvidas terem sido eluídas usando uma solução de *Tris - HCl* 1,5 M pH 10.



Realizamos a eletroforese em gel de SDS-PAGE para monitorar cada etapa dos procedimentos de adsorção e eluição da BSA, avaliando a preservação da integridade estrutural das moléculas proteicas. As amostras foram coletadas antes e após os experimentos de adsorção, bem como após o processo de eluição da BSA, e então submetidas à SDS-PAGE. Os resultados são apresentados na Fig. 23.

No Poço 1, as bandas de eletroforese da amostra padrão de proteínas (uma mistura de proteínas recombinantes coradas de azul, variando de 10 a 250 *kDa*, incluindo três bandas de referência em 25 *kDa*, 50 *kDa* e 75 *kDa*) são claramente identificáveis, com as proteínas separadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares. Esse padrão serve como referência para identificar a banda correspondente à fração da BSA, que possui peso molecular de 66 *kDa*. No Poço 2, é apresentada a amostra de solução da BSA depositada antes da interação com as membranas de PAN/Cs, enquanto o Poço 3 exibe a solução de sobrenadante da BSA após a interação com as membranas. A qualidade da BSA dissolvida na solução de ligação (tampão de acetato, pH 5,6) foi preservada, uma vez que as bandas características permaneceram intactas. Por fim, no Poço 4, as bandas correspondentes à etapa de dessorção confirmam que

a qualidade da proteína foi mantida na fração recuperada.

Esses experimentos complementares fornecem evidências adicionais de que tanto a interação da BSA com as membranas de PAN/Cs quanto a subsequente dessorção da proteína com a solução de eluição não comprometeram sua conformação nativa. Esse aspecto é fundamental para assegurar a integridade estrutural e a funcionalidade da proteína em aplicações futuras, reforçando a viabilidade de reutilização da BSA após o processo de adsorção e eluição.

4.3.1.5 Comparação do Desempenho das Membranas de PAN/Cs para Adsorção da BSA com outros Adsorventes da Literatura

Na Tabela 10, comparamos o desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína BSA com o de outros adsorventes relatados na literatura. Essa comparação é importante para avaliar as características e a eficiência das membranas de PAN/Cs em relação a outros materiais utilizados para a adsorção de biomoléculas.

Tabela 10 – Comparação do desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína BSA com outros adsorventes reportados na literatura.

Adsorvente	q_e	% ads.	pH ads.	Tempo ads.	% eluição	pH eluição	Tempo eluição	Ref.
Filmes de hidroxiapatita	2,62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		100 mM PBS	150 min				(ÖZCAN; ÇIFTÇIOĞLU, 2022)
Resinas Core-shell: Captocore 400 e 700	108 mg/mL		7,5	24 h				(MI et al., 2021)
Magnetic Tubular Carbon Nanofibers	430,39 mg/g			30 min				(YANG et al., 2020)
Membranas de (SiO ₂ @CNF)	30 mg/mL	66						(FAN et al., 2015)
Membranas baseadas em PES	10,4 mg/mL			3 dias	22	10	3 dias	(SADEGH; SAHAY; SONI, 2019)
Membrana composta à base de celulose	241,6 mg/mL							(ZHOU et al., 2020)
Membranas de poliestireno	48,08 mg/g	44,86		5 min	70	10	2 min	(MONTE et al., 2017)
Memb. [PSf e PAN]-GMA-DEA	201.30 e 87.20 mg/mL			12 h	56 e 96			(CHEN; WICKRAMASINGHE; QIAN, 2020)
Membranas de PAN/Cs	76,61 mg/g	82,99	5,6	5 min	89,13	10	2 min	Este trabalho

Fonte: A autora (2024).

Os dados indicam que as membranas de PAN/Cs geralmente requerem menos tempo (5 minutos) para atingir a saturação na adsorção de moléculas da BSA dissolvidas, em comparação aos adsorventes listados. Ao serem expostas a uma solução da BSA com concentração inicial de $1,60 \text{ mg/mL}$, as membranas de PAN/Cs foram capazes de capturar 82,99% da proteína dissolvida, com uma capacidade de adsorção (q_e) de $75,61 \text{ mg/mL}$. Além disso, obtivemos a liberação de aproximadamente 89,13% da proteína adsorvida, valor superior aos observados para os demais adsorventes listados na Tabela 10. Um resultado importante, confirmado pelos experimentos de eletroforese, é que a estrutura nativa da BSA não foi afetada pela interação com as membranas de PAN/Cs, assegurando que a qualidade das moléculas proteicas foi preservada durante os processos de adsorção e dessorção.

Esses resultados destacam as vantagens das membranas de PAN/Cs como adsorventes para a captura e liberação de biomoléculas, como a BSA. As membranas de PAN/Cs apresentam uma combinação de características desejáveis, como baixo custo, simplicidade de preparação, alta capacidade de adsorção e eficiência na liberação da proteína, o que as torna materiais promissores para uso em aplicações práticas na separação e purificação de biomoléculas.

4.4 EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA IGG

Seguindo a mesma metodologia usada para os experimentos com BSA, investigamos a capacidade das membranas de PAN/Cs de adsorver IgG sob diferentes condições de pH. Nossas amostras de IgG (150 kDa) foram fornecidas pelo Departamento de Farmácia (UFPE, Brasil). A quantidade de IgG adsorvida em cada membrana foi quantificada medindo a absorbância da solução antes e depois da captura.

4.4.1 Resultados Experimentais para a IgG

4.4.1.1 Efeito do pH sobre a Adsorção

Testamos diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 5,6, 6,2, 7,0, 8,0 e 9,0), mantendo as outras condições experimentais constantes (Fig. 24). Após centrifugar $500 \mu\text{L}$ da solução (com concentração inicial de $0,6 \text{ mg/mL}$) cinco vezes consecutivas (1 minuto cada), lavamos as membranas com água deionizada para eliminar as proteínas não adsorvidas. Para quantificar a quantidade de IgG adsorvida em cada membrana, empregamos a espectrofotometria UV-Vis.

No pH ideal, que é ligeiramente ácido, há um equilíbrio ideal em que a IgG carrega carga negativa enquanto a quitosana permanece fortemente protonada, promovendo máxima adsorção devido à forte atração eletrostática entre os dois. Isso é claramente observado em pH 6,2, onde a adsorção atinge seu pico, com 63,29%. A adsorção começa a aumentar significativamente à medida que o pH sobe de 4 (com apenas 0,44% de adsorção) para 5,6, onde alcança 51,41%. No entanto, além do pH ideal de 6,2, a adsorção diminui ligeiramente, mas ainda se mantém elevada. Em pH 7, a adsorção é de 56,1%, e em pHs 8 e 9 permanece relativamente estável, com 59,41% e 56,07%, respectivamente. Na Fig. 24, observa-se que em pHs baixos, a adsorção reduzida em membranas de PAN/Cs provavelmente ocorre devido à repulsão eletrostática entre a IgG carregada positivamente e a quitosana protonada. Em pHs ligeiramente ácidos a neutros, a atração eletrostática favorece a adsorção. Em pH levemente ácido a neutro, a atração eletrostática passa a favorecer a adsorção, já que a quitosana protonada interage de forma mais eficaz com a IgG quando esta apresenta carga negativa, o que ocorre quando o pH está acima do seu pl. Isso resulta em uma forte atração eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana ($-NH_3^+$) e os grupos carboxilato ($-COO^-$) da IgG. Conforme o pH se aproxima do pl da IgG ou se torna mais básico, a afinidade entre quitosana e IgG tende a diminuir, pois os grupos amino da quitosana perdem a protonação e a IgG se torna neutra ou com menor carga negativa.

Esses valores indicam que, embora as interações eletrostáticas sejam maximizadas em condições ligeiramente ácidas, a adsorção ainda é eficiente em condições básicas. Isso sugere que outras interações, como forças hidrofóbicas ou de van der Waals, podem desempenhar um papel na manutenção de níveis significativos de adsorção, mesmo quando a quitosana está menos protonada. Por exemplo, em pH 9, a adsorção ainda é de 56,07%, valor apenas ligeiramente inferior ao pico, indicando que o processo de adsorção não depende exclusivamente de forças eletrostáticas. Na Fig. 25, é apresentada a variação do potencial zeta das moléculas de IgG dissolvidas nas soluções tampão, utilizadas para promover a interação entre a IgG e as membranas.

Em seguida, identificamos a solução de ligação adequada, um tampão salino em pH 6,2. Nesse tampão, as membranas adsorveram aproximadamente 63,29% da proteína IgG, correspondendo a uma capacidade de adsorção (q_e) de 21,94 mg/g.

Figura 24 – Porcentagem de adsorção da IgG em função do valor do pH do meio para as membranas de PAN/Cs.

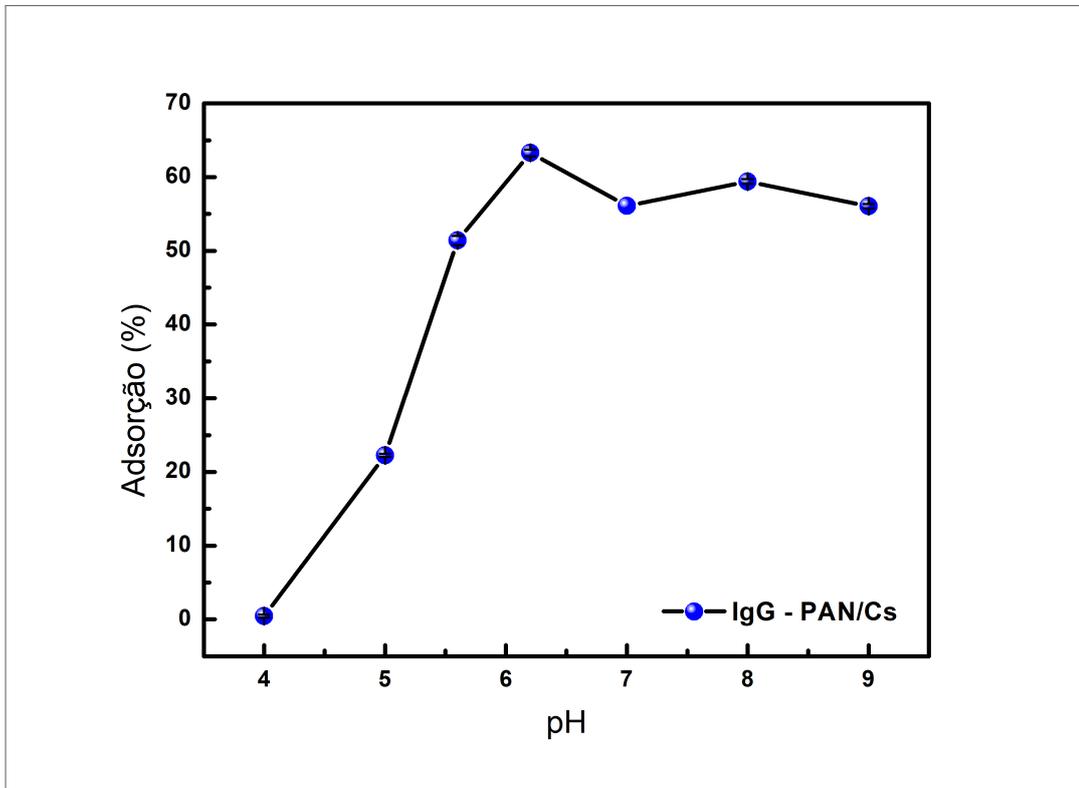


Figura 25 – Potencial Zeta em função do pH da solução da proteína IgG em meio tamponado (concentração 0,6 mg/mL).

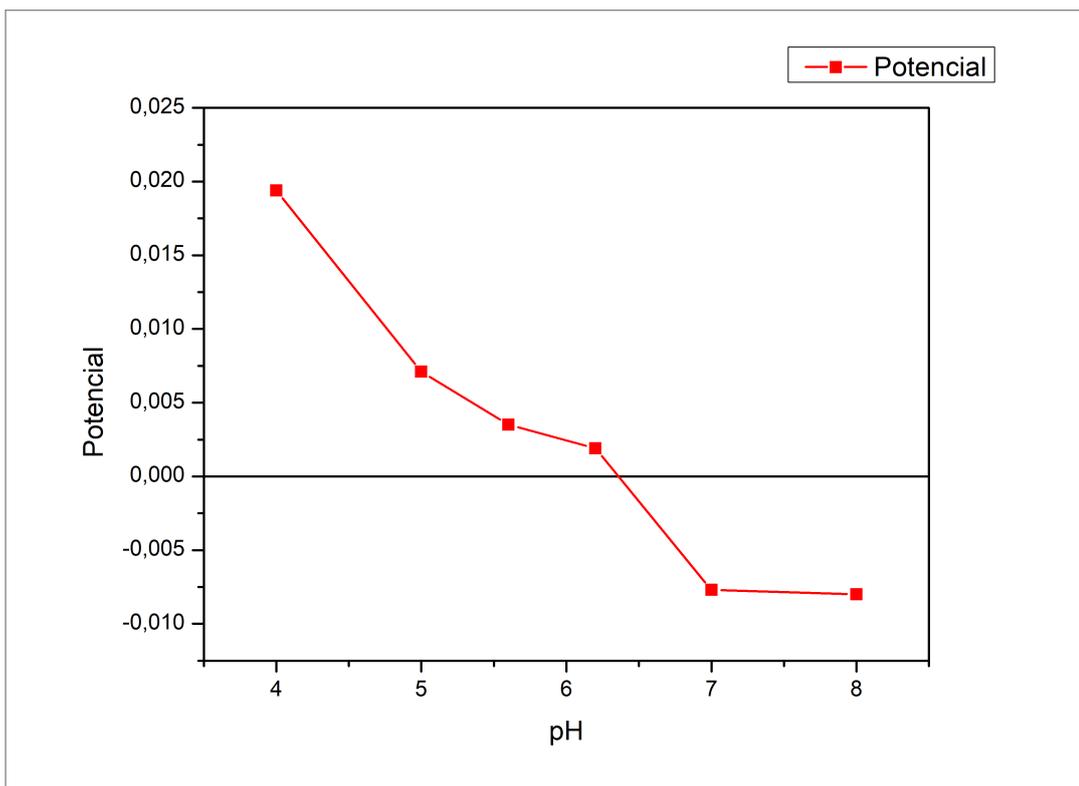
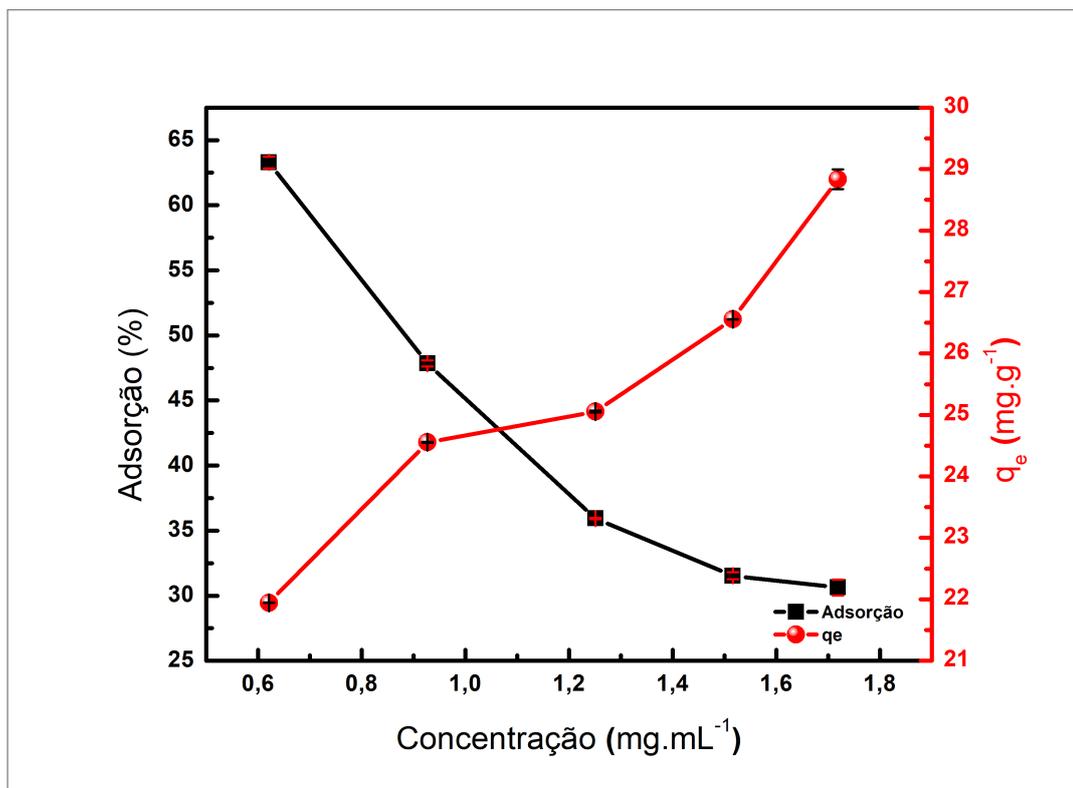


Figura 26 – Efeito da variação da concentração inicial da IgG sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs, a pH 6,2.

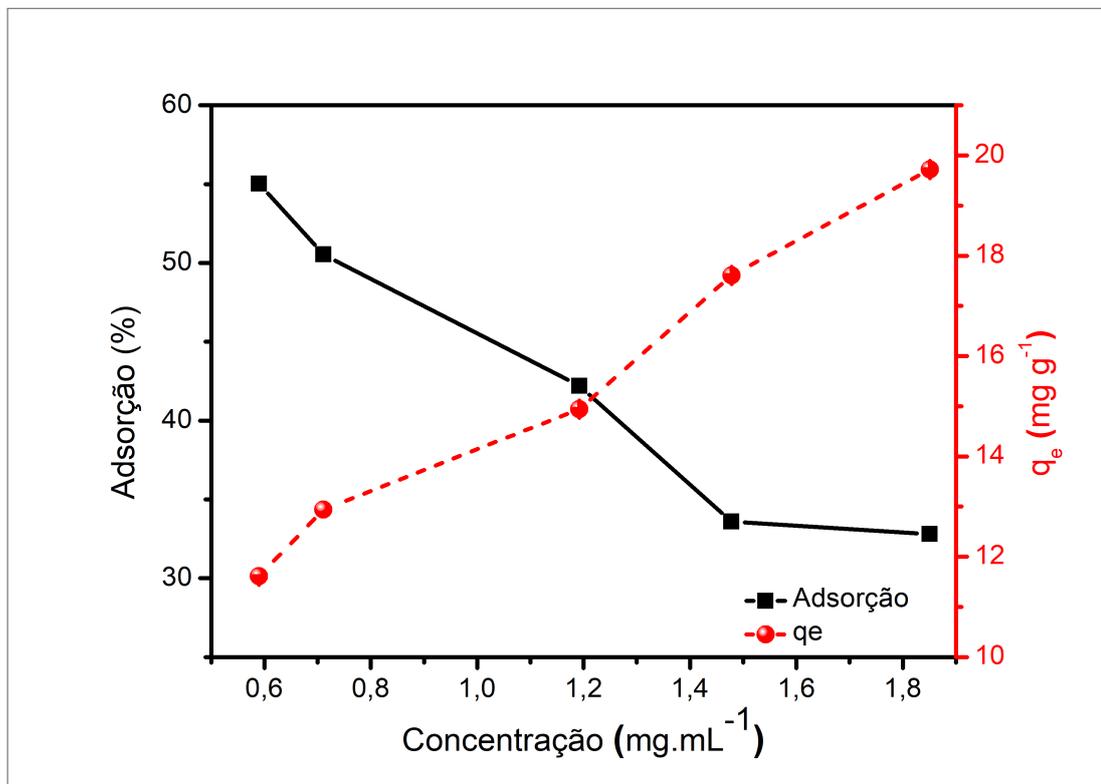


4.4.1.2 Influência da Concentração Inicial

Para ambas as membranas, o percentual de adsorção diminui com o aumento da concentração inicial de IgG. Isso ocorre porque, com concentrações mais altas, há maior competição pelos sítios ativos da membrana, levando à saturação. A membrana PAN/Cs apresenta um percentual de adsorção inicial maior em comparação à PAN, indicando que a quitosana melhora a interação da proteína com a membrana. Para as membranas de PAN/Cs (Fig. 26) e PAN (Fig. 27), obtemos valores máximos de (q_e) de 28,83 mg/g e 19,77 mg/g para PAN/Cs e PAN, respectivamente. A adição de quitosana (Cs) à membrana PAN alterou a capacidade de adsorção de IgG, tornando-a mais eficiente.

A diferença na adsorção de IgG e BSA em membranas de PAN/Cs pode ser explicada pelas interações eletrostáticas e características distintas dessas proteínas. A BSA, com um pI em torno de 5,0, possui carga negativa em pH 6,2, promovendo interações atrativas com a quitosana protonada, que é carregada positivamente. Em contraste, a IgG, com pI variando de 6,1 a 9,0, apresenta carga quase neutra ou ligeiramente positiva nesse pH, resultando em interações eletrostáticas mais fracas ou até mesmo repulsivas, o que explica a menor adsorção

Figura 27 – Efeito da variação da concentração inicial da IgG sobre o rendimento e a capacidade de adsorção das membranas de PAN, a pH 6,2.



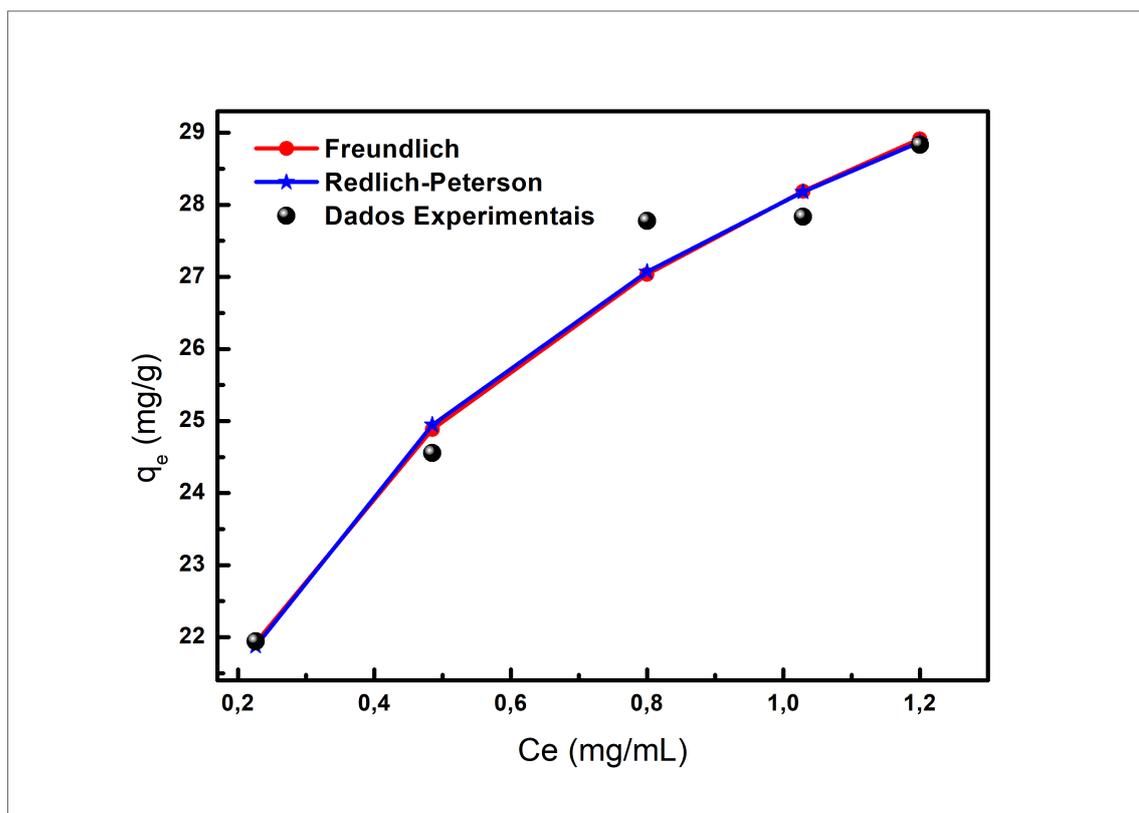
em PAN/Cs. Além disso, a IgG é uma proteína maior e estruturalmente mais complexa, o que dificulta seu acesso aos sítios ativos da membrana em comparação com a BSA, que é mais compacta e acessível (JEFFERIS, 2012).

Para ambas as membranas, o aumento da concentração de proteína influenciou diretamente a capacidade de adsorção ao intensificar a transferência de massa entre o adsorvato na fase líquida e os sítios ativos na superfície da membrana. Em contrapartida, a porcentagem de proteína removida diminuiu à medida que esses sítios ativos se saturaram progressivamente.

4.4.1.3 Modelos de Isotermas

Para compreender melhor os mecanismos físicos envolvidos no processo de adsorção das moléculas de IgG nas membranas de PAN/Cs, ajustamos os modelos de isotermas de Freundlich e Redlich-Peterson aos dados experimentais de adsorção de IgG nessas membranas ((Fig.28)). Observou-se que ambos os modelos, de Redlich-Peterson e de Freundlich, apresentaram ajuste similar aos dados, com valores de R^2 de 0,976 e 0,975, respectivamente, descrevendo adequadamente o processo de adsorção da IgG nas membranas de PAN/Cs. Os resultados indicam

Figura 28 – Ajuste dos modelos lineares de Freundlich e Redlich-Peterson aos dados experimentais para a adsorção de IgG nas membranas de PAN/Cs. Note a quase completa sobreposição das curvas de Freundlich e Redlich-Peterson.



que a capacidade de adsorção das membranas de PAN/Cs está em concordância com ambos os modelos sugerindo que a adsorção é influenciada por uma combinação de interações físicas e químicas em uma superfície heterogênea. Esses modelos são adequados para o processo de adsorção nas membranas de PAN/Cs porque ele consegue capturar as características do sistema, combinando a superfície heterogênea da membrana com a adsorção multi-camada e a variação nas energias de adsorção.

Por meio de regressão linear, a capacidade máxima teórica de adsorção da IgG pelas membranas de PAN/Cs foi estimada em $21,92 \text{ mg/g}$ segundo o modelo de Freundlich e em $21,87 \text{ mg/g}$ segundo o modelo de Redlich-Peterson. O modelo de Langmuir, que assume que a adsorção ocorre em uma única camada molecular na superfície do adsorvente, com todos os locais de adsorção sendo equivalentes e independentes, não se ajusta adequadamente aos nossos dados.

4.4.1.4 Dessorção e Recuperação

Após estabelecer as condições ideais para a captura de IgG (Fig. 24 e Fig. 26), investigamos como obter uma remoção eficiente das moléculas adsorvidas de volta ao meio aquoso. Para isso, testamos diferentes soluções de eluição em uma coluna de centrifugação contendo as membranas com as proteínas adsorvidas (Tabela 11). A taxa de dessorção mais alta, de 62,16%, foi obtida com o uso de uma solução tampão de *Tris* – *HCl* 1,5 M em pH 10.

Tabela 11 – Influência do tipo de solução de eluição na porcentagem de dessorção da fração de proteína IgG previamente captada pela membrana de PAN/Cs.

Protocolo	Porcentagem de dessorção (%)
Citrato 0,1 M pH 5,0	3,23
Etilenoglicol pH 7,0	3,70
Glicina Hidróxido de sódio 2 M pH 10,6	50,54
<i>Tris</i> – <i>HCl</i> 1,5 M pH 10,0	62,16

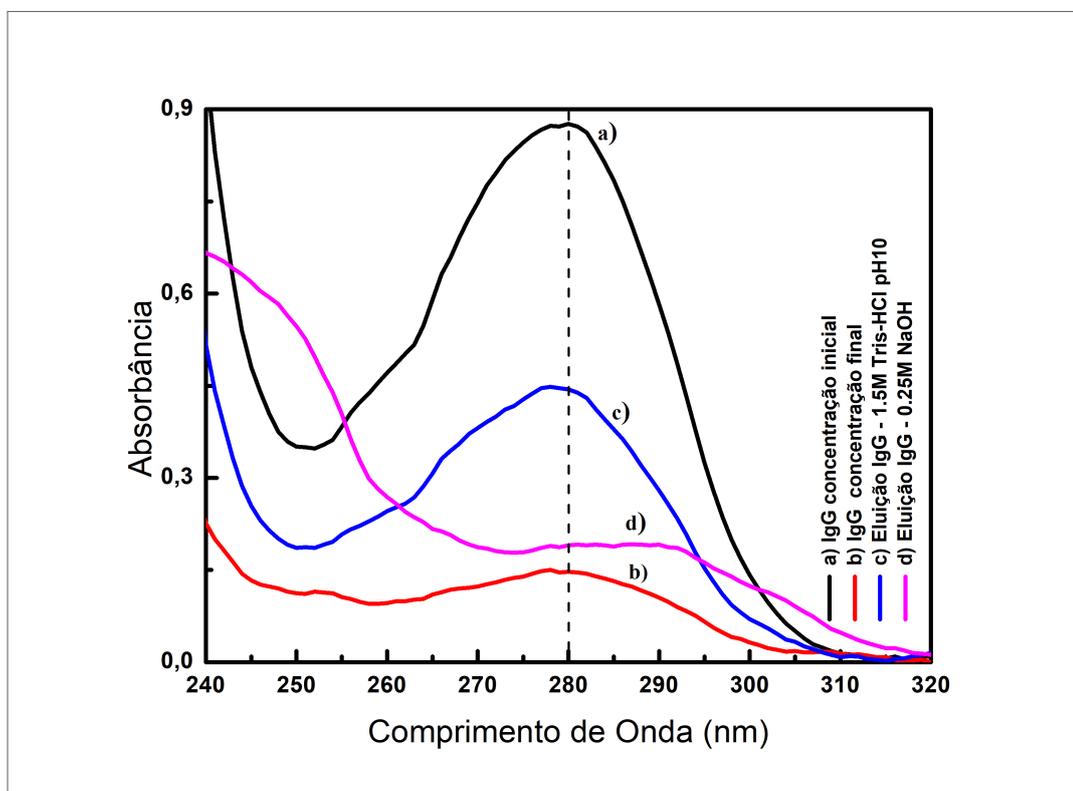
Fonte: A autora (2024).

Mudanças nas condições do solvente e no dobramento da proteína podem deslocar o pico de absorção característico das proteínas para a região de 290-300 nm. Conforme ilustrado na Fig. 29), após a adsorção bem-sucedida das moléculas de IgG nas membranas de PAN/Cs (curvas *a* e *b*), a subsequente eluição com a solução de *Tris* – *HCl* 1,5 M (curva *c*) não alterou a estrutura nativa da proteína, uma vez que não houve deslocamento perceptível no comprimento de onda de absorção máxima (280 nm). Esse resultado indica que, ao utilizar a solução de eluição de *Tris* – *HCl* 1,5 M, a proteína manteve sua estrutura durante o processo de dessorção.

É importante destacar que, ao utilizar soluções diluídas de *NaOH* no processo de eluição, o espectro de absorção da proteína IgG foi substancialmente modificado (curva *d*), com a banda de absorção característica se tornando mais larga e deslocando-se para a região de 290 nm.

Esse resultado indica que a solução de *NaOH* compromete a estrutura nativa da IgG, promovendo sua completa desnaturação. A análise técnica por UV-Vis revelou que a eluição da IgG com solução de *NaOH*, mesmo em baixa concentração molar, provoca alterações significativas na conformação da proteína, logo o uso de *NaOH* é inadequado para manter a integridade estrutural da IgG durante o processo de dessorção.

Figura 29 – Espectro UV-Vis da solução de IgG antes (curva *a*) e depois (curva *b*) da interação com as membranas de PAN/Cs e do meio aquoso após a eluição da proteína capturada com uma solução de eluição de *Tris* – *HCl* 1,5 M a pH 10 (curva *c*) e uma solução de eluição de *NaOH* 0,25 M (curva *d*).



Essas informações são cruciais para entender o impacto das condições de eluição na estrutura da IgG e na eficácia do processo de separação. A preservação da conformação nativa da proteína é fundamental para garantir sua funcionalidade e atividade biológica, uma vez que a integridade estrutural é diretamente relacionada à sua capacidade de atuar em aplicações subsequentes. Assim, é desejável que a recuperação da IgG ocorra de forma íntegra, sem desnaturação significativa, permitindo sua reutilização em condições adequadas.

A capacidade de adsorção e dessorção da IgG pelas membranas de PAN/Cs em diferentes condições abre perspectivas para o desenvolvimento de dispositivos de detecção de proteínas e para o uso dessas membranas em protocolos de recuperação e purificação de proteínas, com potenciais aplicações no diagnóstico e tratamento de doenças.

Para confirmar os resultados obtidos anteriormente, realizamos experimentos de eletroforese em gel de SDS-PAGE para analisar as soluções de IgG em diferentes etapas do processo de separação. Anticorpos da classe IgG são compostos por duas cadeias pesadas glicosiladas, com aproximadamente 50 *kDa* cada, e duas cadeias leves, com cerca de 25 *kDa* cada. Esse arranjo confere ao anticorpo um peso molecular total próximo a 150 *kDa*, na forma intacta

(KIRLEY; NORMAN, 2018; MASSON; LUSHCHEKINA, 2022).

No SDS-PAGE, a separação das bandas da IgG varia conforme o uso de agentes redutores. Sob condições redutoras a adição de agentes redutores, como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), rompe as ligações dissulfeto entre as cadeias, permitindo que cada tipo de cadeia seja visualizado separadamente. Nesse caso, observamos duas bandas distintas, uma próxima a 50 *kDa*, referente às cadeias pesadas, e outra próxima a 25 *kDa*, referente às cadeias leves. Essa condição fornece uma confirmação visual da composição das subunidades da IgG.

Já sob condições não redutoras, ou seja, quando não utilizamos agentes redutores, as ligações dissulfeto entre as cadeias pesadas e leves permanecem intactas. Assim, o anticorpo intacto aparece no SDS-PAGE como uma única banda de aproximadamente 150 *kDa*, representando a estrutura completa da IgG.

Essa análise complementar pelo SDS-PAGE permite confirmar a integridade estrutural da IgG em cada etapa do processo de separação, garantindo que o anticorpo permanece em sua conformação nativa quando necessário e que a estrutura de suas subunidades está preservada.

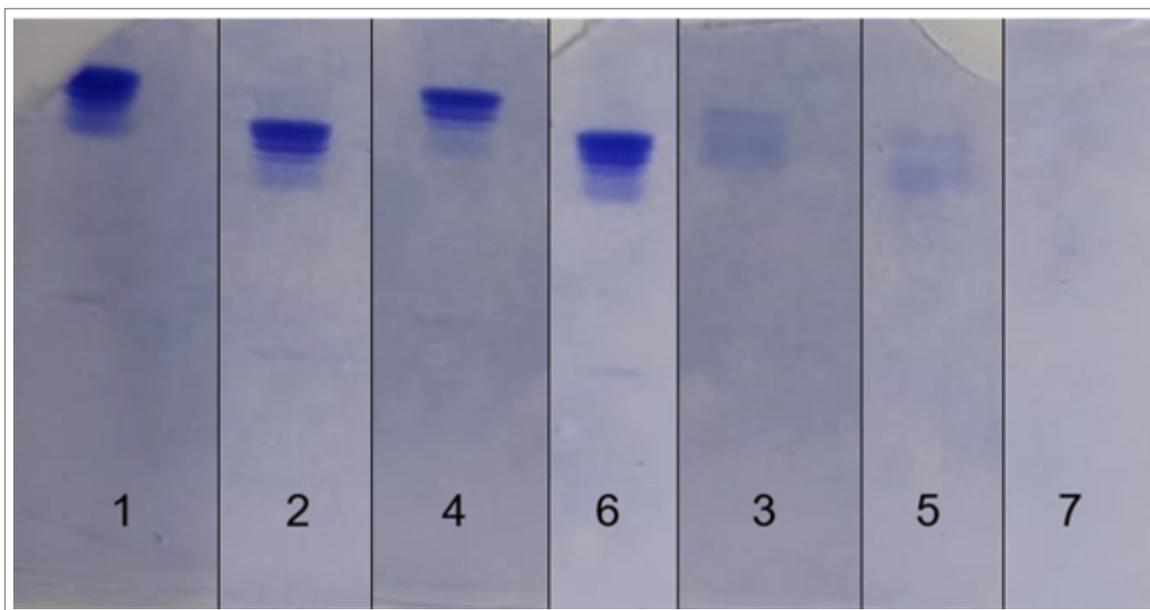
Os resultados dos experimentos de eletroforese SDS-PAGE para a IgG são apresentados na Fig. 30. A imagem no Poço 1 corresponde à solução original de IgG, antes da interação com as membranas de PAN/Cs. Já as imagens nos Poços 2, 4 e 6 mostram os resultados dos experimentos triplicados com o sobrenadante da solução da IgG após a interação com as membranas, quando o equilíbrio de adsorção foi alcançado. Nesses poços, pode-se observar que a qualidade da IgG dissolvida na solução de ligação (solução salina de tampão, pH 6,2) não foi afetada, pois as bandas características da proteína permanecem intactas.

Nos Poços 3 e 5, estão as amostras dos experimentos duplicados após a eluição das moléculas de proteína adsorvidas, utilizando uma solução de *Tris* – *HCl* pH 10 a 1,5 *M*. Nesses casos, as bandas características da IgG são claramente visíveis, confirmando que a estrutura da proteína foi preservada durante a dessorção.

Finalmente, no Poço 7, encontra-se o sobrenadante após a eluição da proteína usando uma solução de *NaOH* a 0,25 *M*. Nenhuma banda da IgG é visível, indicando que a proteína foi desnaturada sob as condições alcalinas severas do processo de eluição com *NaOH*. Esse resultado confirma que a utilização de *NaOH* causa a quebra da estrutura nativa da IgG, levando à sua desnaturação.

Em seu conjunto, esses resultados confirmam que a qualidade das moléculas de IgG é preservada durante os processos de adsorção e desorção, ressaltando a eficácia das membranas de PAN/Cs como um adsorvente de bom desempenho que mantém a integridade estrutural das

Figura 30 – Eletroforese SDS-PAGE das soluções de IgG em diferentes estágios do processo de separação: Poço 1: a solução original de IgG a pH 6,2; Poços 2, 4 e 6: experimentos em triplicata usando o sobrenadante da solução de IgG após a interação com as membranas; Poços 3 e 5: experimentos em duplicata após as moléculas de proteína adsorvidas terem sido eluídas usando uma solução de *Tris – HCl* 1,5 M pH 10; e Poço 7: meio aquoso após a fração de proteína capturada ter sido eluída usando uma solução de *NaOH* 0,25 M.



proteínas. Isso demonstra que as membranas de PAN/Cs não apenas são eficazes na captura da IgG, mas também garantem a recuperação da proteína sem comprometer sua funcionalidade, o que é crucial para aplicações biotecnológicas e terapêuticas que exigem proteínas ativas e estruturadas.

4.4.1.5 Comparação do Desempenho de Membranas de PAN/Cs para Adsorção de IgG com outros Adsorventes da Literatura

Na Tabela 12, apresentamos uma comparação do desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína IgG em relação a outros adsorventes reportados na literatura. As membranas de PAN/Cs demonstram uma vantagem significativa, alcançando uma saturação mais rápida na captura das moléculas de IgG dissolvidas. Quando expostas a uma solução de IgG com concentração inicial de 0,6 mg/mL, as membranas de PAN/Cs capturaram 63,29% da proteína dissolvida, com uma alta capacidade de adsorção de 21,94 mg/g. Além disso, o processo de dessorção permitiu a recuperação de aproximadamente 62,16% da proteína adsorvida, superando o desempenho dos outros adsorventes.

Tabela 12 – Comparação do desempenho das membranas de PAN/Cs na captura da proteína IgG com outros adsorventes reportados na literatura.

Adsorvente	q_e	% ads.	pH ads.	Tempo ads.	% eluição	pH eluição	Tempo eluição	Ref.
Membranas de Nylon-6	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	45	PBS	1,5 h				(SENKOVENKO et al., 2022)
MC: RC-HIC/IEC e MC:RC-RPC/IEC	73,5 e 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	79,6	8 e 0,5 mol/L NaCl em PB/ 6,5 em PB	24 h		9		(YE et al., 2020)
Cell/Cs-modified e CMC-modified Cell	2,5 e 5,6 mg/m^2		5	30 min				(ORELMA et al., 2011)
Membranas de PAN/Cs	21,94 mg/g	63,29	6,2	5 min	62,16	10	2 min	Este trabalho

Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

4.5 SELETIVIDADE DAS MEMBRANAS DE PAN/CS

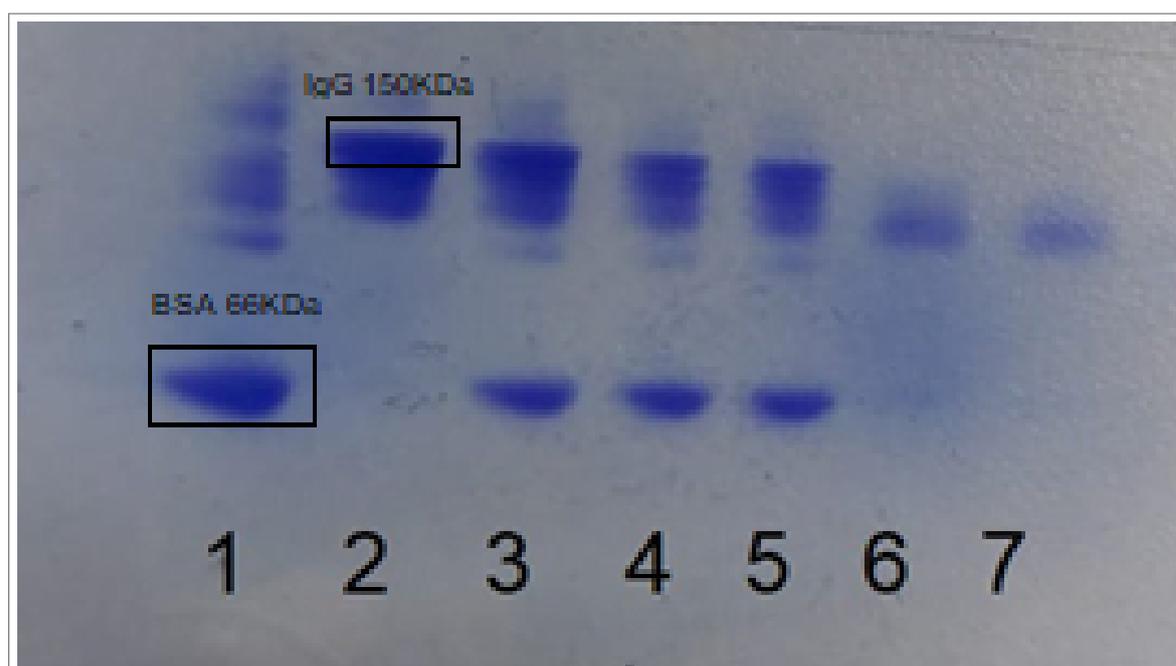
Para avaliar o potencial das membranas de PAN/Cs para aplicações reais, examinamos sua seletividade na adsorção separada das proteínas BSA e IgG co-dissolvidas em meio aquoso. Considerando as diferenças nos pontos isoelétricos dessas proteínas, ajustamos cuidadosamente o pH das soluções de ligação e eluição (pH 6,2 para a solução salina e pH 10 para *Tris-HCl*, respectivamente) a fim de otimizar a captura seletiva das moléculas de IgG e BSA. Na Fig. 31, apresentamos os resultados da eletroforese SDS-PAGE para uma mistura binária das proteínas IgG e BSA, mostrando os seguintes poços sucessivos:

- Poço 1, solução inicial da BSA a 0,6 mg/mL;
- Poço 2, solução inicial da IgG a 0,6 mg/mL;
- Poço 3, solução inicial da mistura de BSA + IgG;
- Poços 4 e 5, solução mista de BSA + IgG após interação com as membranas de PAN/Cs (em duplicata);
- Poços 6 e 7, sobrenadante após eluição da fração capturada da mistura (BSA + IgG) utilizando uma solução de *Tris-HCl* 1,5 M a pH 10 (em duplicata).

Após a interação com as membranas de PAN/Cs, a concentração da BSA e IgG na solução diminui significativamente (Poços 4 e 5, que correspondem à etapa de adsorção). Durante a etapa de eluição (Poços 6 e 7), a banda característica da IgG, com peso molecular de 150 kDa, torna-se proeminente, confirmando sua recuperação. Ao controlar cuidadosamente o pH da solução contendo as proteínas co-dissolvidas, é possível separar seletivamente as moléculas de IgG. Em pH 6,2, as interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados da quitosana e os grupos carboxilato da IgG carregada negativamente favorecem a captura. Já em pH 10, a desprotonação da quitosana reduz essas interações, promovendo a liberação de IgG das membranas.

Esse conjunto de resultados serve como prova do conceito de que as membranas PAN/Cs podem ser aplicadas de forma eficiente em processos de purificação seletiva de proteínas, mantendo a qualidade e a funcionalidade das moléculas.

Figura 31 – Resultados da eletroforese em gel SDS-PAGE para uma mistura binária das proteínas IgG e BSA. Poço 1: solução da BSA a 0,6 mg/mL; Poço 2: solução de IgG a 0,6 mg/mL; Poço 3: solução binária (BSA + IgG); Poços 4 e 5: solução mista (BSA + IgG) após interação com as membranas (em duplicata); e Poços 6 e 7: sobrenadante após eluição da fração capturada da mistura (BSA + IgG), usando uma solução de *Tris - HCl* 1,5 M pH 10 (em duplicata).



5 CONCLUSÕES

A purificação de proteínas é um processo essencial na bioquímica e biotecnologia, garantindo a obtenção de amostras de alta pureza para diversas aplicações, incluindo diagnósticos, terapias e pesquisa científica. Duas proteínas frequentemente utilizadas no desenvolvimento de métodos de purificação são a albumina sérica bovina (BSA) e a imunoglobulina G (IgG). A eletrofiliação, uma técnica que emprega a aplicação de um campo elétrico para produzir membranas poliméricas com fibras ultrafinas, tem se mostrado particularmente promissora nesse contexto devido à alta área superficial e porosidade dos materiais gerados. Essas características tornam as membranas eletrofiadas ferramentas valiosas para a captura e separação de proteínas, especialmente quando combinadas com funcionalizações específicas para aprimorar suas propriedades. Neste estudo, membranas de poli(acrilonitrila) (PAN) modificadas com quitosana (PAN/Cs) foram desenvolvidas e avaliadas quanto ao seu desempenho na purificação seletiva de proteínas. A incorporação de quitosana na matriz polimérica resultou em um aumento significativo na capacidade de adsorção para a BSA, alcançando $75,61 \text{ mg/g}$, em comparação aos $21,16 \text{ mg/g}$ das membranas de PAN não modificadas. Para a IgG, embora o incremento na capacidade de adsorção tenha sido menos acentuado, as membranas de PAN/Cs ainda demonstraram uma funcionalidade valiosa, com capacidade de adsorção de $21,94 \text{ mg/g}$ e eficiência de captura de 63,29%. Os experimentos de dessorção destacaram o uso eficiente de uma solução de eluição de $1,5 \text{ M Tris-HCl}$ (pH 10), que permitiu uma taxa de recuperação de 89,13% para a BSA e 62,16% para a IgG, preservando a estrutura nativa das proteínas, conforme confirmado por espectroscopia UV-Vis e eletroforese em gel de SDS-PAGE. Essas análises reforçaram a capacidade das membranas de PAN/Cs de adsorver e liberar proteínas sem comprometer sua integridade estrutural, um aspecto crítico para aplicações biomédicas e biotecnológicas. A análise dos dados experimentais por modelos de isotermas revelou que o comportamento de adsorção da BSA foi melhor descrito pelo modelo de Freundlich, enquanto o modelo de Redlich-Peterson se ajustou de forma mais eficaz para a IgG. Esses resultados sugerem que a adsorção ocorre em superfícies heterogêneas, com formação de multicamadas, destacando a versatilidade das membranas de PAN/Cs em diferentes cenários de purificação proteica. Além do uso em protocolos de purificação, as membranas de PAN/Cs apresentam potencial para aplicações mais amplas, como a funcionalização com anticorpos específicos para detecção de biomoléculas ou a extração seletiva de proteínas de amostras biológicas comple-

xas. Sua simplicidade de fabricação, alto desempenho e baixo custo tornam essas membranas candidatas promissoras para uso em dispositivos de detecção e em processos industriais de recuperação de biomoléculas. No entanto, para maximizar o impacto e a aplicabilidade dessas membranas, estudos adicionais são necessários. O refinamento das condições experimentais, como o ajuste preciso de pH, concentrações proteicas e protocolos de adsorção e dessorção, pode aprimorar ainda mais seu desempenho. A avaliação em sistemas biológicos mais complexos, como fluidos corporais ou extratos celulares, permitirá verificar sua eficácia em condições reais. Além disso, explorar modificações adicionais na composição das membranas, incluindo a incorporação de nanopartículas ou polímeros híbridos, pode expandir sua funcionalidade para novas aplicações. A separação bem-sucedida das proteínas e a preservação da estrutura da IgG mostram que a membrana PAN/Cs não apenas é eficiente na adsorção, mas também mantém a integridade das proteínas ao longo do processo de adsorção e dessorção.

Como possíveis extensões deste trabalho, podemos mencionar:

- 1) Tratamento de superfície da PAN: plasma ou tratamentos químicos e incorporação de nanopartículas.
- 2) A avaliação e aperfeiçoamento da durabilidade e a reusabilidade das membranas em ciclos prolongados de adsorção e dessorção, visando aplicações industriais.
- 3) Funcionalização para separação específica de IgG: imobilização de ligantes específicos (como anti-IgG marcado, anti-IgG biotinizado, estreptavidina, proteína A, Concanavalina A, proteína G, etc).
- 4) A investigação de interações com outras biomoléculas, incluindo enzimas ou ácidos nucleicos, para ampliar seu escopo de utilização.

Em conclusão, as membranas de PAN/Cs demonstraram alto desempenho na captura e liberação de proteínas, destacando-se como uma tecnologia promissora para aplicações biomédicas e industriais. A combinação de eficiência, seletividade e preservação estrutural das biomoléculas adsorvidas reforça o potencial dessas membranas para transformar os processos de purificação de proteínas e avançar o desenvolvimento de soluções inovadoras no campo da biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ALHARBI, H. F.; HADDAD, M. Y.; AIJAZ, M. O.; ASSAIFAN, A. K.; KARIM, M. R. Electrospun bilayer pan/chitosan nanofiber membranes incorporated with metal oxide nanoparticles for heavy metal ion adsorption. *Coatings*, MDPI, v. 10, n. 3, p. 285, 2020.
- ALI, M. S.; UTTINGER, M. J.; ROMEIS, S.; SCHMIDT, J.; PEUKERT, W. Effect of protein adsorption on the dissolution kinetics of silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 214, p. 112466, 2022.
- ANAND, G.; SHARMA, S.; DUTTA, A. K.; KUMAR, S. K.; BELFORT, G. Conformational transitions of adsorbed proteins on surfaces of varying polarity. *Langmuir*, ACS Publications, v. 26, n. 13, p. 10803–10811, 2010.
- ARUMUGAM, T. V.; WOODRUFF, T. M.; LATHIA, J. D.; SELVARAJ, P. K.; MATTSON, M. P.; TAYLOR, S. M. Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy. *Neuroscience*, Elsevier, v. 158, n. 3, p. 1074–1089, 2009.
- ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M. R. Fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from bovine milk serum using staged, positively charged, tangential flow ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, Elsevier, v. 454, p. 488–495, 2014.
- AUGUSTINE, R.; REHMAN, S. R. U.; AHMED, R.; ZAHID, A. A.; SHARIFI, M.; FALAHATI, M.; HASAN, A. Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 156, p. 153–170, 2020.
- AYAWEI, N.; EBELEGI, A. N.; WANKASI, D. Modelling and interpretation of adsorption isotherms. *Journal of chemistry*, Hindawi, v. 2017, 2017.
- BASS, J. J.; WILKINSON, D. J.; RANKIN, D.; PHILLIPS, B. E.; SZEWCZYK, N. J.; SMITH, K.; ATHERTON, P. J. An overview of technical considerations for western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, Wiley Online Library, v. 27, n. 1, p. 4–25, 2017.
- BENGTEN, E.; WILSON, M.; MILLER, N.; CLEM, L.; PILSTRÖM, L.; WARR, G. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*, Springer, p. 189–219, 2000.
- BERAGOUI, M.; AGUIR, C.; KHALFAOUI, M.; ENCISO, E.; TORRALVO, M. J.; DUCLAUX, L.; REINERT, L.; VAYER, M.; LAMINE, A. B. In situ studies of bovine serum albumin adsorption onto functionalized polystyrene latices monitored with a quartz crystal microbalance technique. *Journal of Applied Polymer Science*, Wiley Online Library, v. 132, n. 23, 2015.
- BEYKAL, B.; HERZBERG, M.; OREN, Y.; MAUTER, M. S. Influence of surface charge on the rate, extent, and structure of adsorbed bovine serum albumin to gold electrodes. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 460, p. 321–328, 2015.
- BHAKTA, S. A.; EVANS, E.; BENAVIDEZ, T. E.; GARCIA, C. D. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. *Analytica chimica acta*, Elsevier, v. 872, p. 7–25, 2015.

- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.
- BIGOGNO, R. G.; DIAS, M. L.; MANHÃES, M. B. N.; RODRIGUEZ, R. J. S. Integrated treatment of mining dam wastewater with quaternized chitosan and pan/hpnc/agno 3 nanostructured hydrophilic membranes. *Journal of Polymers and the Environment*, Springer, p. 1–16, 2022.
- BIO-RAD, L. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. *Laboratories Bio-Rad.*, 2012.
- BURTON, D. R. Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends in biochemical sciences*, Elsevier, v. 15, n. 2, p. 64–69, 1990.
- CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. et al. *Materials science and engineering: an introduction*. [S.l.]: John Wiley & sons New York, 2007. v. 7.
- CAO, X.-L.; LI, H.-W.; YUE, Y.; WU, Y. pH-induced conformational changes of bsa in fluorescent auncs@ bsa and its effects on ncs emission. *Vibrational Spectroscopy*, Elsevier, v. 65, p. 186–192, 2013.
- CHEN, S.-T.; WICKRAMASINGHE, S. R.; QIAN, X. Electrospun weak anion-exchange fibrous membranes for protein purification. *Membranes*, MDPI, v. 10, n. 3, p. 39, 2020.
- CHINI, S. F.; AMIRFAZLI, A. A method for measuring contact angle of asymmetric and symmetric drops. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 388, n. 1-3, p. 29–37, 2011.
- CHO, M.; MAHMOODI, Z.; SHETTY, P.; HARRISON, L. R.; MONTECILLO, M. A.; PERUMAL, A. S.; SOLANA, G.; JR, D. V. N.; NICOLAU, D. V. Protein adsorption on solid surfaces: Data mining, database, molecular surface-derived properties, and semiempirical relationships. *ACS Applied Materials & Interfaces*, ACS Publications, 2024.
- COSKUN, O. Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, Istanbul Northern Anatolian Association of Public Hospitals, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.
- DAJBROWSKI, A. Adsorption—from theory to practice. *Advances in colloid and interface science*, Elsevier, v. 93, n. 1-3, p. 135–224, 2001.
- DAGO-SERRY, Y.; MAROULAS, K. N.; TOLKOU, A. K.; KOKKINOS, N. K.; KYZAS, G. Z. How the chitosan structure can affect the adsorption of pharmaceuticals from wastewaters: An overview. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, Elsevier, p. 100466, 2024.
- DAHA, M. R.; KOOTEN, C. van. Role of complement in iga nephropathy. *Journal of nephrology*, Springer, v. 29, p. 1–4, 2016.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. [S.l.]: EdIPUCRS, 2007.
- DESAI, N.; RANA, D.; SALAVE, S.; GUPTA, R.; PATEL, P.; KARUNAKARAN, B.; SHARMA, A.; GIRI, J.; BENIVAL, D.; KOMMINENI, N. Chitosan: A potential biopolymer in drug delivery and biomedical applications. *Pharmaceutics*, MDPI, v. 15, n. 4, p. 1313, 2023.

- ESFAHANI, H.; PRABHAKARAN, M. P.; SALAHI, E.; TAYEBIFARD, A.; RAHIMIPOUR, M. R.; KEYANPOUR-RAD, M.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun nylon 6/zinc doped hydroxyapatite membrane for protein separation: mechanism of fouling and blocking model. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 59, p. 420–428, 2016.
- FAN, G.; GE, J.; KIM, H.-Y.; DING, B.; AL-DEYAB, S. S.; EL-NEWEHY, M.; YU, J. Hierarchical porous carbon nanofibrous membranes with an enhanced shape memory property for effective adsorption of proteins. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 5, n. 79, p. 64318–64325, 2015.
- FU, L.-H.; QI, C.; LIU, Y.-J.; CAO, W.-T.; MA, M.-G. Sonochemical synthesis of cellulose/hydroxyapatite nanocomposites and their application in protein adsorption. *Scientific reports*, Springer, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. Chitinase family gh18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC evolutionary biology*, BioMed Central, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2007.
- HAMES, B. D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. [S.l.]: OUP Oxford, 1998. v. 197.
- HE, M.; CHEN, H.; ZHANG, X.; WANG, C.; XU, C.; XUE, Y.; WANG, J.; ZHOU, P.; ZHAO, Q. Construction of novel cellulose/chitosan composite hydrogels and films and their applications. *Cellulose*, Springer, v. 25, p. 1987–1996, 2018.
- HJELHOLT, A.; CHRISTIANSEN, G.; SØRENSEN, U. S.; BIRKELUND, S. Igg subclass profiles in normal human sera of antibodies specific to five kinds of microbial antigens. *Pathogens and disease*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 67, n. 3, p. 206–213, 2013.
- HURWITZ, G.; GUILLEN, G. R.; HOEK, E. M. Probing polyamide membrane surface charge, zeta potential, wettability, and hydrophilicity with contact angle measurements. *Journal of membrane science*, Elsevier, v. 349, n. 1-2, p. 349–357, 2010.
- JACHIMSKA, B.; PAJOR, A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 87, p. 138–146, 2012.
- JEFFERIS, R. Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Archives of biochemistry and biophysics*, Elsevier, v. 526, n. 2, p. 159–166, 2012.
- JU, S.; ZHANG, F.; DUAN, J.; JIANG, J. Characterization of bacterial cellulose composite films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 237, p. 116167, 2020.
- KAYALVIZHY, E.; RAJAN, M. S.; PAZHANISAMY, P. Bsa adsorption, anthelmintic activity and swelling behavior of poly (n-cyclohexyl acrylamide-co-amps il) hydrogel. *Journal of Molecular Liquids*, Elsevier, v. 314, p. 113692, 2020.
- KESSEL, A.; BEN-TAL, N. *Introduction to proteins: structure, function, and motion*. [S.l.]: Crc Press, 2010.
- KIRKWOOD, J.; HARGREAVES, D.; O'KEEFE, S.; WILSON, J. Using isoelectric point to determine the ph for initial protein crystallization trials. *Bioinformatics*, Oxford University Press, v. 31, n. 9, p. 1444–1451, 2015.

- KIRLEY, T. L.; NORMAN, A. B. Unfolding of igg domains detected by non-reducing sds-page. *Biochemical and biophysical research communications*, Elsevier, v. 503, n. 2, p. 944–949, 2018.
- KOPAC, T.; BOZGEYIK, K.; YENER, J. Effect of ph and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 322, n. 1-3, p. 19–28, 2008.
- KRAUSS, I. R.; MERLINO, A.; VERGARA, A.; SICA, F. An overview of biological macromolecule crystallization. *International journal of molecular sciences*, Molecular Diversity Preservation International (MDPI), v. 14, n. 6, p. 11643–11691, 2013.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting: an introduction. *Western Blotting: Methods and Protocols*, Springer, p. 17–30, 2015.
- LE, S. P.; KRISHNA, J.; GUPTA, P.; DUTTA, R.; LI, S.; CHEN, J.; THAYUMANAVAN, S. Polymers for disrupting protein–protein interactions: Where are we and where should we be? *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 25, n. 10, p. 6229–6249, 2024.
- LI, G.; LI, T.; LI, Y.; AN, L.; LI, W.; ZHANG, Z. Preparation of ph-controllable nanofibrous membrane functionalized with lysine for selective adsorption of protein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 531, p. 173–181, 2017.
- LIN, H.; DING, Y. *Polymeric membranes: chemistry, physics, and applications*. [S.l.]: Wiley Online Library, 2020. 2433–2434 p.
- LIU, S.; LI, Z.; YU, B.; WANG, S.; SHEN, Y.; CONG, H. Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, Elsevier, v. 284, p. 102254, 2020.
- LUNDQVIST, M.; SETHSON, I.; JONSSON, B.-H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, ACS Publications, v. 20, n. 24, p. 10639–10647, 2004.
- MA, W.; LIU, X.; LU, H.; HE, Q.; DING, K.; WANG, X.; WANG, W.; GUO, F. Chitosan-based composite hydrogel with a rigid-in-flexible network structure for ph-universal ultra-efficient removal of dye. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier, v. 241, p. 124579, 2023.
- MA, Z.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein a/g for igg purification. *Journal of Membrane Science*, Elsevier, v. 319, n. 1-2, p. 23–28, 2008.
- MAJD, M. M.; KORDZADEH-KERMANI, V.; GHALANDARI, V.; ASKARI, A.; SILLANPÄÄ, M. Adsorption isotherm models: A comprehensive and systematic review (2010- 2020). *Science of The Total Environment*, Elsevier, v. 812, p. 151334, 2022.
- MAKAREMI, M.; LIM, C. X.; PASBAKHSH, P.; LEE, S. M.; GOH, K. L.; CHANG, H.; CHAN, E. S. Electrospun functionalized polyacrylonitrile–chitosan bi-layer membranes for water filtration applications. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 59, p. 53882–53893, 2016.

- MALEKI, M.; MORADI, O.; TAHMASEBI, S. Adsorption of albumin by gold nanoparticles: Equilibrium and thermodynamics studies. *Arabian Journal of Chemistry*, Elsevier, v. 10, p. S491–S502, 2017.
- MASSON, P.; LUSHCHEKINA, S. Conformational stability and denaturation processes of proteins investigated by electrophoresis under extreme conditions. *Molecules*, MDPI, v. 27, n. 20, p. 6861, 2022.
- MATHEW, J.; SANKAR, P.; VARACALLO, M. Physiology, blood plasma. 2023 apr 24. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2023.
- MAURER, M.; ALTRICHTER, S.; SCHMETZER, O.; SCHEFFEL, J.; CHURCH, M.; METZ, M. Immunoglobulin e-mediated autoimmunity. *front immunol* 2018; 9: 689. *Preprint not peer reviewed Preprint not peer reviewed*, 2018.
- MCCLELLAN, S. J.; FRANSES, E. I. Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 28, n. 1, p. 63–75, 2003.
- MI, X.; FUKS, P.; WANG, S.-c.; WINTERS, M. A.; CARTA, G. Protein adsorption on core-shell particles: comparison of capto™ core 400 and 700 resins. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, v. 1651, p. 462314, 2021.
- MIRANDA, C. S.; SILVA, A. F. G.; SEABRA, C. L.; REIS, S.; SILVA, M. M. P.; PEREIRA-LIMA, S. M.; COSTA, S. P.; HOMEM, N. C.; FELGUEIRAS, H. P. Sodium alginate/polycaprolactone co-axial wet-spun microfibers modified with n-carboxymethyl chitosan and the peptide aapv for staphylococcus aureus and human neutrophil elastase inhibition in potential chronic wound scenarios. *Biomaterials Advances*, Elsevier, v. 151, p. 213488, 2023.
- MONTE, R. S. et al. *Separação e adsorção de proteínas por membranas nanoestruturadas de poliestireno*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- MORRIS, R.; BLACK, K. A.; STOLLAR, E. J. Uncovering protein function: from classification to complexes. *Essays in Biochemistry*, Portland Press Ltd., v. 66, n. 3, p. 255–285, 2022.
- MUZZARELLI, R. A.; MEHTEDI, M. E.; BOTTEGONI, C.; AQUILI, A.; GIGANTE, A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine drugs*, MDPI, v. 13, n. 12, p. 7314–7338, 2015.
- NAJAFI, M.; FREY, M. W. Electrospun nanofibers for chemical separation. *Nanomaterials*, MDPI, v. 10, n. 5, p. 982, 2020.
- NARDUCCI, R.; CHAILAN, J.-F.; FAHS, A.; PASQUINI, L.; VONA, M. L. D.; KNAUTH, P. Mechanical properties of anion exchange membranes by combination of tensile stress–strain tests and dynamic mechanical analysis. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, Wiley Online Library, v. 54, n. 12, p. 1180–1187, 2016.
- NATARAJ, S.; YANG, K.; AMINABHAVI, T. Polyacrylonitrile-based nanofibers—a state-of-the-art review. *Progress in polymer science*, Elsevier, v. 37, n. 3, p. 487–513, 2012.
- NIEMCZYK-SOCZYNSKA, B.; GRADYS, A.; SAJKIEWICZ, P. Hydrophilic surface functionalization of electrospun nanofibrous scaffolds in tissue engineering. *Polymers*, MDPI, v. 12, n. 11, p. 2636, 2020.

- NOROUZI, P.; MIRMOHAMMADI, M.; TEHRANI, M. H. H. Anticancer peptides mechanisms, simple and complex. *Chemico-Biological Interactions*, Elsevier, v. 368, p. 110194, 2022.
- ORELMA, H.; FILPPONEN, I.; JOHANSSON, L.-S.; LAINE, J.; ROJAS, O. J. Modification of cellulose films by adsorption of cmc and chitosan for controlled attachment of biomolecules. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 12, n. 12, p. 4311–4318, 2011.
- ÖZCAN, S.; ÇİFTÇİOĞLU, M. Enhanced model protein adsorption of nanoparticulate hydroxyapatite thin films on silk sericin and fibroin surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Springer, v. 33, n. 1, p. 6, 2022.
- PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; ZAGO, C. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*, Hindawi, v. 2012, 2012.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia*. [S.l.]: Cengage Learning, 2010.
- PETERS, T. The albumin molecule. *All about albumin*, Elsevier, p. 9–II, 1995.
- PHAM, N. B.; MENG, W. S. Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. *International journal of pharmaceutics*, Elsevier, v. 585, p. 119523, 2020.
- PINTO, A. F.; NASCIMENTO, J. M. do; SOBRAL, R. V. da S.; AMORIM, E. L. C. de; SILVA, R. O.; LEITE, A. C. L. Tannic acid as a precipitating agent of human plasma proteins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, v. 138, p. 105018, 2019.
- PONCIN-EPAILLARD, F.; VRLINIC, T.; DEBARNOT, D.; MOZETIC, M.; COUDREUSE, A.; LEGEAY, G.; MOUALIJ, B. E.; ZORZI, W. Surface treatment of polymeric materials controlling the adhesion of biomolecules. *Journal of functional biomaterials*, MDPI, v. 3, n. 3, p. 528–543, 2012.
- POPE, F.; JONK, J.; FOWLER, M.; LAAN, P. C.; GEELS, N. J.; DRANGAI, L.; GITIS, V.; ROTHENBERG, G. From shrimp balls to hydrogen bubbles: borohydride hydrolysis catalysed by flexible cobalt chitosan spheres. *Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 25, n. 14, p. 5727–5734, 2023.
- PREETHA, B.; VIRUTHAGIRI, T. Batch and continuous biosorption of chromium (vi) by rhizopus arrhizus. *Separation and Purification Technology*, Elsevier, v. 57, n. 1, p. 126–133, 2007.
- QIN, Y. *Micromanufacturing engineering and technology*. [S.l.]: William Andrew, 2015.
- RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, Elsevier, v. 162, n. 1-2, p. 87–106, 2011.
- RAD, B. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. *Bulletin 6040 Rev B*, 2012.
- RAHAMAN, M. S. A.; ISMAIL, A. F.; MUSTAFA, A. A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber. *Polymer degradation and Stability*, Elsevier, v. 92, n. 8, p. 1421–1432, 2007.

RISTIĆ, T.; PERSIN, Z.; KUNCIC, M. K.; KOSALEC, I.; ZEMLJIC, L. F. The evaluation of the in vitro antimicrobial properties of fibers functionalized by chitosan nanoparticles. *Textile research journal*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 89, n. 5, p. 748–761, 2019.

ROPER, D. K.; LIGHTFOOT, E. N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, v. 702, n. 1-2, p. 3–26, 1995.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2022.

RULKENS, R.; KONING, C. Chemistry and technology of polyamides. In: *Polymer science: a comprehensive reference*. [S.l.]: Elsevier, 2012. p. 431–467.

RYE ROBERT WISE, V. J. J. D. J. C. Y. A. C. *Biology*. 2024. Disponível em: <<https://openstax.org/books/biology/pages/3-4-proteins>>. Acesso em: 27 nov. 2024.

RYŠÁNEK, P.; BENADA, O.; TOKARSKÝ, J.; SYROVÝ, M.; ČAPKOVÁ, P.; PAVLÍK, J. Specific structure, morphology, and properties of polyacrylonitrile (pan) membranes prepared by needleless electrospinning; forming hollow fibers. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 105, p. 110151, 2019.

SADEGH, H.; SAHAY, R.; SONI, S. Protein–polymer interaction: Transfer loading at interfacial region of pes-based membrane and bsa. *Journal of Applied Polymer Science*, Wiley Online Library, v. 136, n. 36, p. 47931, 2019.

SALEH, T. A. A.; GUPTA, V. K. *Nanomaterial and polymer membranes: synthesis, characterization, and applications*. [S.l.]: Elsevier, 2016.

SALIS, A.; BOSTROM, M.; MEDDA, L.; CUGIA, F.; BARSE, B.; PARSONS, D. F.; NINHAM, B. W.; MONDUZZI, M. Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of bsa protein. *Langmuir*, ACS Publications, v. 27, n. 18, p. 11597–11604, 2011.

SATZER, P.; SVEC, F.; SEKOT, G.; JUNGBAUER, A. Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Engineering in life sciences*, Wiley Online Library, v. 16, n. 3, p. 238–246, 2016.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in colloid and interface science*, Elsevier, v. 145, n. 1-2, p. 1–22, 2009.

SAYGILI, E.; KAYA, E.; ILHAN-AYISIGI, E.; SAGLAM-METINER, P.; ALARCIN, E.; KAZAN, A.; GIRGIC, E.; KIM, Y.-W.; GUNES, K.; EREN-OZCAN, G. G. et al. An alginate-poly (acrylamide) hydrogel with $\text{tgf-}\beta 3$ loaded nanoparticles for cartilage repair: Biodegradability, biocompatibility and protein adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier, v. 172, p. 381–393, 2021.

SCHMID, F.-X. *Biological macromolecules: Uv-visible spectrophotometry. e LS*, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, 2001.

SCIENTIFIC, T. F. Comparison of antibody igg binding proteins. *Thermo Fisher Scientific*, 2016.

- SCIENTIFIC, T. F. *Protein Assay Technical Handbook*. [S.l.]: ThermoFisher Scientific, 2017.
- SENKOVENKO, A.; MOYSENOVICH, A.; MASLAKOVA, A.; PAVLOVA, E.; BAGROV, D. Measurements of igg antibodies adsorption onto electrospun nylon-6 membranes. *Biophysics*, Springer, v. 67, n. 3, p. 440–444, 2022.
- SIEGEL, J. A.; SAUKKO, P. J. *Encyclopedia of forensic sciences*. [S.l.]: Academic Press, 2012.
- SIRIJAREE, T.; PRAIPIPAT, P. Adsorption of lead (ii) ions onto goethite chitosan beads: Isotherms, kinetics, and mechanism studies. *ChemEngineering*, MDPI, v. 7, n. 3, p. 52, 2023.
- SMITH, D. M. Protein separation and characterization procedures. *Food analysis*, Springer, p. 431–453, 2017.
- SOLDAN, G.; NUNES, S. *Functionalized polymeric membranes for the separation, recovery, and/or purification of antibodies*. [S.l.]: Google Patents, 2021. US Patent App. 16/770,899.
- SUN, W.; OU, H.; CHEN, Z. Study on preparation of chitosan/polyvinyl alcohol aerogel with graphene- intercalated attapulgite (go- atp@ cs- pva) and adsorption properties of crystal violet dye. *Nanomaterials*, MDPI, v. 12, n. 22, p. 3931, 2022.
- THOMAS, S.; GROHENS, Y.; NINAN, N. *Nanotechnology applications for tissue engineering*. [S.l.]: William Andrew, 2015.
- TRIPATHI, B. P.; DUBEY, N. C.; STAMM, M. Polyethylene glycol cross-linked sulfonated polyethersulfone based filtration membranes with improved antifouling tendency. *Journal of membrane science*, Elsevier, v. 453, p. 263–274, 2014.
- UQUILLAS, J. A.; MORONI, L.; BOER, J. de. An introduction to tissue engineering; the topic and the book. In: *Tissue Engineering*. [S.l.]: Elsevier, 2023. p. 1–12.
- VASILEV, N.; SMALES, C. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R.; SCHIERMEYER, A. Developments in the production of mucosal antibodies in plants. *Biotechnology Advances*, Elsevier, v. 34, n. 2, p. 77–87, 2016.
- VERMA, A.; CHAKRABORTY, S.; BASU, J. Adsorption study of hexavalent chromium using tamarind hull-based adsorbents. *Separation and Purification Technology*, Elsevier, v. 50, n. 3, p. 336–341, 2006.
- WANG, J.; BUCK, S. M.; CHEN, Z. Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on protein adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 106, n. 44, p. 11666–11672, 2002.
- WANG, K.; ZHOU, C.; HONG, Y.; ZHANG, X. A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface focus*, The Royal Society, v. 2, n. 3, p. 259–277, 2012.
- WANG, P.; LV, H.; CAO, X.; LIU, Y.; YU, D.-G. Recent progress of the preparation and application of electrospun porous nanofibers. *Polymers*, MDPI, v. 15, n. 4, p. 921, 2023.
- WASIM, M.; SABIR, A.; SHAFIQ, M.; JAMIL, T. Electrospinning: A fiber fabrication technique for water purification. In: *Nanoscale materials in water purification*. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 289–308.

- WENG, R.; HUANG, X.; LIAO, D.; XU, S.; PENG, L.; LIU, X. A novel cellulose/chitosan composite nanofiltration membrane prepared with piperazine and trimesoyl chloride by interfacial polymerization. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 3, p. 1309–1318, 2020.
- WESTERMEIER, R. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2016.
- WONG, L. S.; KHAN, F.; MICKLEFIELD, J. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 109, n. 9, p. 4025–4053, 2009.
- WU, F.-C.; LIU, B.-L.; WU, K.-T.; TSENG, R.-L. A new linear form analysis of redlich–peterson isotherm equation for the adsorptions of dyes. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 162, n. 1, p. 21–27, 2010.
- WU, J. W.; BREYDO, L. Conformation-dependent antibodies as tools for characterization of amyloid protein aggregates. In: *Bio-nanoimaging*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 81–94.
- XU, X.; ZHANG, M.; LV, H.; ZHOU, Y.; YANG, Y.; YU, D.-G. Electrospun polyacrylonitrile-based lace nanostructures and their Cu(II) adsorption. *Separation and Purification Technology*, Elsevier, v. 288, p. 120643, 2022.
- XUE, J.; WU, T.; DAI, Y.; XIA, Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 119, n. 8, p. 5298–5415, 2019.
- YANG, Z.; CHEN, J.; WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, B. Self-driven bsa surface imprinted magnetic tubular carbon nanofibers: fabrication and adsorption performance. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, ACS Publications, v. 8, n. 8, p. 3241–3252, 2020.
- YE, J.; CHU, J.; YIN, J.; ZHANG, Y.; MENG, J. Surface modification of regenerated cellulose membrane based on thiolactone chemistry—a novel platform for mixed mode membrane adsorbers. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 511, p. 145539, 2020.
- YU, X.; MENG, W.; LI, Y.; LUO, X. A low-fouling electrochemical biosensor based on bsa hydrogel doped with carbon black for the detection of cortisol in human serum. *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, v. 1307, p. 342645, 2024.
- ZHAO, Z.-P.; WANG, Z.; WANG, S.-C. Formation, charged characteristic and bsa adsorption behavior of carboxymethyl chitosan/pes composite mf membrane. *Journal of Membrane Science*, Elsevier, v. 217, n. 1-2, p. 151–158, 2003.
- ZHOU, Q.; BAO, Y.; ZHANG, H.; LUAN, Q.; TANG, H.; LI, X. Regenerated cellulose-based composite membranes as adsorbent for protein adsorption. *Cellulose*, Springer, v. 27, p. 335–345, 2020.