



## **CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADAS COM CORANTES IMOBILIZADOS**

A. M. Baptistioli<sup>1</sup>; D. R. Gondim<sup>2</sup>; I. J. Silva Jr<sup>2</sup>; R. M. Matricarde-Falleiro<sup>1</sup>; I. T. L. Bresolin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP Diadema

Rua São Nicolau, 210 – CEP: 09913-030 – Diadema – SP – Brasil

Telefone: (11) 3319-3588 – Email: [bresolin@unifesp.br](mailto:bresolin@unifesp.br)

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará.

Campus do Pici, Bl. 709 – CEP: 60455-760 – Fortaleza – CE – Brasil.

**RESUMO:** No campo da biotecnologia, técnicas cromatográficas de adsorção seletiva (troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade) têm sido utilizadas nas etapas de recuperação e purificação de biomoléculas (RPB) para que estas sejam obtidas em um nível de pureza requerido para sua aplicação. Por esta razão, há a necessidade constante de obtenção de adsorventes com alta capacidade de adsorção e seletividade e baixo custo. Este trabalho teve como objetivo caracterizar microesferas de quitosana/alginato epoxiladas com corantes Procion Blue MX-R, Procion Green H-4G, Cibacon Blue F-3GA imobilizados para serem aplicados na adsorção de biomoléculas. Utilizaram-se as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia FTIR-ATR, Termogravimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados obtidos foram compatíveis com dados da literatura, demonstrando que estes adsorventes apresenta potencial para ser aplicado como fase estacionária em cromatografia de afinidade com corantes imobilizados.

**PALAVRAS-CHAVE:** caracterização, quitosana, alginato, corantes imobilizados.

**ABSTRACT:** In the biotechnology area, selective adsorption chromatographic techniques (such as ion exchange, hydrophobic interaction and affinity) have been used in the stages of recovery and purification of biomolecules (downstream processing) in order to achieve the required purity levels for the application. For this reason, there is the constant need to obtain new adsorbents with high adsorption capacity and selectivity with a low cost. This study aimed to characterize chitosan/alginate microspheres with immobilized dyes Procion Blue MX-R, Procion Green H-4G and Cibacron Blue F-3GA to be used in biomolecules adsorption. Techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectroscopy, thermogravimetry and differential scanning calorimetry (DSC) were used. The results were consistent with published data and can demonstrate that the adsorbents have potential to be applied as stationary phase in immobilized dyes affinity chromatography.

**KEYWORDS:** characterization; chitosan; alginate, immobilized dyes

### **1. INTRODUÇÃO**

A adsorção é uma operação unitária com aplicações em diversas áreas. No campo da biotecnologia, por exemplo, técnicas

cromatográficas de adsorção seletiva (troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade) têm sido utilizadas nas etapas de recuperação e purificação de biomoléculas (RPB) para que estas sejam

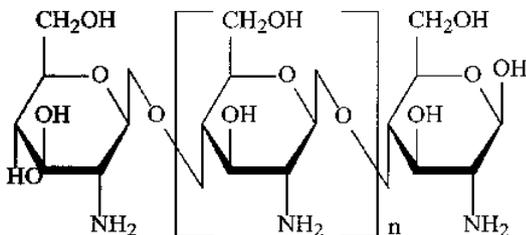


obtidas em um nível de pureza requerido para sua aplicação (Voigt e Zintl, 1999).

Um dos métodos mais úteis e eficazes para a separação de biomoléculas é a cromatografia de afinidade, uma técnica de adsorção baseada na habilidade de substâncias se ligarem especificamente e reversivelmente a substâncias complementares, os ligantes, que devem estar imobilizados a uma matriz cromatográfica (Vijayalakshmi, 1989).

Neste contexto, o desenvolvimento de adsorventes de baixo custo com alta capacidade de adsorção e seletividade tem sido um grande desafio. Além disso, a adsorção deve ser perfeitamente reversível para não afetar a atividade biológica das biomoléculas após serem desorvidas (Bresolin et al., 2010).

Adsorventes de quitosana (Figura 1) têm sido amplamente relatados na literatura como um potencial devido à sua abundância na natureza, baixo custo e boa capacidade de adsorção (Kamari et al., 2009). É um biopolímero composto de unidades de D-glucosamina, que pode ser obtido a partir de quitina pela desacetilação dos seus grupos acetamida em meio alcalino forte.



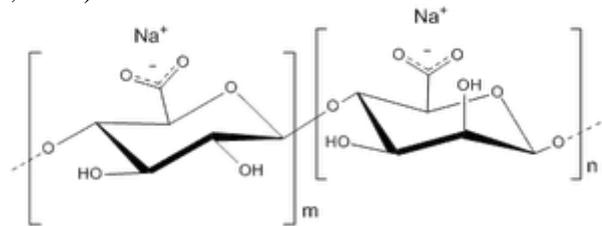
**Figura 1.** Estrutura molecular da quitosana

Na maioria dos estudos, a quitosana é utilizada sob a forma de flocos, pó ou grânulos de hidrogel e vários métodos químicos e físicos têm sido relatados em sua modificação para reduzir seu estado cristalino e melhorar sua resistência mecânica e estabilidade em meio ácido (Kamari et al., 2009; Nadavala et al., 2009).

Semelhante a quitosana, o alginato (Figura 2) é também um polímero natural encontrado em abundância extraído a partir de algas marinhas marrons (Qin et al., 2007). Este polímero é composto de unidades  $\beta$ -D-manuronato (M) e  $\alpha$ -L-glucuronato (G) unidas por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. Grupos carboxila permitem que o polímero tenha a capacidade de sofrer uma transição sol-gel na presença de cátions

polivalentes e mais especificamente com íons de cálcio (Rocher et al., 2008).

Mesmo que estes biopolímeros têm sido amplamente relatados individualmente para a adsorção de bioprodutos (Shi et al., 2003; Hoven et al., 2007; Torres et al., 2007; Xu et al., 2009; Feng et al., 2009), há poucos registros sobre o seu uso combinado como fase estacionária (adsorvente) em cromatografia de afinidade para a adsorção de biomoléculas (Gondim et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).



**Figura 2.** Estrutura molecular do alginato

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar adsorventes de quitosana e alginato contendo corantes imobilizados para serem utilizados como fase estacionária em cromatografia de afinidade para purificação de biomoléculas. Para tal, utilizaram-se as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análises termogravimétricas (TGA e DTA).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

As microesferas de quitosana/alginato epoxiladas com os corantes Procion Blue MX-R, Procion Green H-4G, Cibacron Blue F-3GA foram sintetizadas conforme protocolo descrito por Gondim et al. (2012).

### 2.2. Caracterização dos adsorventes

*2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):* os ensaios foram realizados no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, na escala de 20 $\mu$ m (1.00KX).



**2.2.2 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR):** as esferas foram analisadas sob a forma de pastilha KBr em comprimentos de onda na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  no equipamento Shimadzu modelo IR Prestige-21 (disponível na Central Analítica da Unifesp, campus Diadema).

**2.2.3 Análises Térmicas: TGA e DTA:** as condições de realização das análises termogravimétricas foram: uma vazão de 50 mL/min de  $\text{N}_2$ , na faixa de temperatura de 30 à 900°C em uma razão de 10°C/min, a quantidade de amostra analisada foi de aproximadamente 6 mg. Estas análises foram realizadas no equipamento da marca Shimadzu, modelo DTG-60H, (disponível na Central Analítica da Unifesp, campus Diadema).

**2.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC):** as condições de realização das análises foram: uma vazão de 100 mL/min de  $\text{N}_2$ , em um cadinho de alumínio, na faixa de temperatura de 30 à 500°C em uma razão de 10°C/min, a quantidade de amostra analisada foi variável. Estas análises foram realizadas no equipamento DSC-60, marca Shimadzu (disponível na Central Analítica da Unifesp, campus Diadema).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização dos adsorventes por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR-ATR)

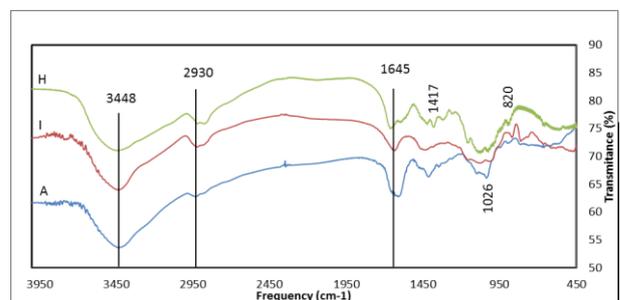
Através da análise de espectros de infravermelho é possível identificar alguns grupos funcionais de um dado composto, se tornando uma técnica de extrema importância na caracterização de diversos materiais. Merece destaque que materiais compósitos de quitosana/alginate foi estudado por Rodrigues et al., (2013) na adsorção de celulase e BSA e por Gondim et al. (2012) na purificação de IgG do soro humano.

Para que um adsorvente possa ser utilizado sob pressão é necessário que este tenha uma boa resistência mecânica. Com a adição do alginato e dos grupos epóxis à quitosana, há um aumento na resistência mecânica do compósito, tornando-a

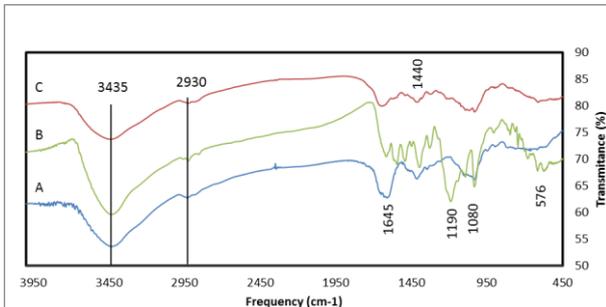
mais rígida e favorável para a imobilização dos corantes utilizados (Gondim et al., 2013).

A curva A dos espectros das Figuras 2-6 é referente às esferas de quitosana/alginate epoxiladas, a adição da epicloridrina dos grupos epóxidos ao compósito, além dos já existentes como grupos hidróxi, amino e carboxílicos. Observa-se todas as curvas apresentam banda larga em torno de 3435  $\text{cm}^{-1}$ , possivelmente devido ao estiramento da ligação -OH, a curva F diferente das demais apresenta uma acentuada intensidade podendo ser associada a maior interação dos grupos hidroxilas após a imobilização do corante Procion Blue MX-R. As bandas 2930 e 2865  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento de C-H, podendo ser observado em todos os espectros. As bandas 1645 e 1584  $\text{cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento C=O de amida secundária e a deformação de N-H de amina primária. A banda pequena em 1388  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à C-H do grupo  $\text{CH}_3$  referente ao grupo acetamido presente em pequena proporção e o pico em 1084  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao - $\text{CH}_2\text{-OH}$  em álcool primário (Leidens et al., 2005 e Gondim et al., 2012).

Na curva H, referente a Quitosana, observa-se picos parecidos com as da curva A supracitada. Na curva I, referente ao Alginato de Sódio, observa-se picos em 1623 e 1422  $\text{cm}^{-1}$  possivelmente aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo carboxilato livre. As bandas 1030 e 825  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento do C-O-C e do C-O respectivamente, como registrado por Huang e Yeom esses picos são relativos aos ácidos manurônico e gulorônico (Huang et al., 1999; Yeom et al., 1998).



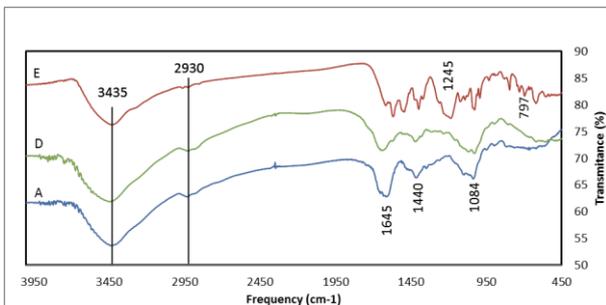
**Figura 3.** Espectro de Quitosana/ Alginato Epoxilada (A), Quitosana (H) e Alginato (I) em pastilhas de KBr.



**Figura 4.** Espectro de Quitosana/ Alginato Epoxilada (A), Procion Green H-4G (B), Quitosana/Alginato imobilizado (C) em pastilhas de KBr.

A curva B, referente ao Reativo Verde (Procion Green H-4G), possui uma banda na região entre  $1600-1450\text{ cm}^{-1}$  referente ao anel benzênico que são típicos dos corantes utilizados em imobilizações. As bandas  $573$  e  $1190\text{ cm}^{-1}$  são referentes aos grupos sulfônicos e ao estiramento simétrico de  $S=O$  respectivamente.

A curva E referente ao Cibacron Blue F-3GA possui bandas de absorção na região entre  $1600 - 1450\text{ cm}^{-1}$  referente ao anel de benzênio. As bandas  $1245$  e  $797\text{ cm}^{-1}$  são provavelmente dos grupos ácidos sulfônicos e amina primária e secundária presente na molécula.

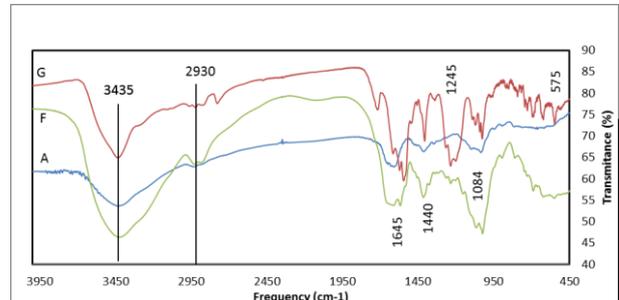


**Figura 5.** Espectro de Quitosana/ Alginato Epoxilada (A), Cibacron Blue F-3GA (E), Quitosana/Alginato imobilizado (D) em pastilhas de KBr.

A curva G referente ao Procion Blue MX-R possui bandas de absorção na região entre  $1600-1450\text{ cm}^{-1}$  do anel benzênio, a região de  $1245$  e  $575\text{ cm}^{-1}$  provavelmente são referentes aos grupos sulfônicos presentes.

No geral, pode-se observar que quando comparados os espectros de infravermelho não ocorre diferença significativas entre eles, principalmente quando comparados as

microesferas de quitosana/alginate epoxiladas com e sem corante.

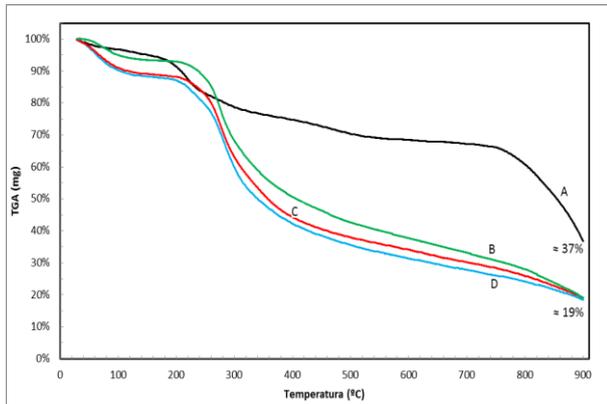


**Figura 6.** Espectro de Quitosana/Alginato Epoxilada (A), Procion Blue MX-R (G), Quitosana/Alginato imobilizado (F) em pastilhas de KBr.

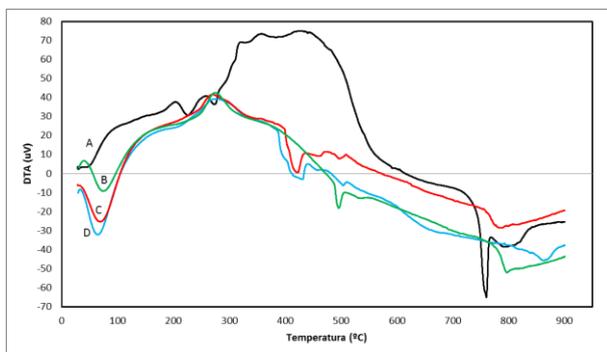
## 3.2. Caracterização dos adsorventes por análises térmicas

**3.2.1. Termogravimetria (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA):** A termogravimetria é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra, que pode ser perda ou ganho de massa, é determinada em função da temperatura ou em função do tempo, enquanto essa amostra é submetida a variações de temperatura (Canevarolo, 2007). Com essa técnica é possível observar as alterações que um aquecimento pode provocar na massa de uma dada substância, como a temperatura em que a amostra começa a se decompor, a sofrer reações de desidratação que ocorre geralmente em torno da temperatura de  $0$  à  $100^\circ\text{C}$ , reações de oxidação, combustão, entre outras. Na análise Térmica Diferencial as curvas são dadas a partir da derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo, essas curvas são mais facilmente observáveis pois mostra a temperatura em que a taxa de variação de massa é máxima.

A termogravimetria apresentada na Figura 7 mostra que as esferas sem corante possui uma maior estabilidade térmica, pois quando submetida a uma temperatura de  $30$  à  $900^\circ\text{C}$  ocorre a degradação de aproximadamente  $63\%$  do material inicial, a análise começou com  $6,607\text{ mg}$  da amostra e terminou com  $2,420\text{ mg}$ . Já as esferas que estavam imobilizadas com corantes obtiveram resultados bem semelhantes iniciando a análise com aproximadamente  $6\text{mg}$  e terminando com  $1,0\text{ mg}$  perdendo cerca de  $79\%$  do material.



**Figura 7** . Termogravimetria de Qitosana/Alginato Epoxilada (A), esfera imobilizada com corantes Cibacron Blue F-3GA (D), Procion Blue MX-R (C) e Procion Green H-4G (B).



**Figura 8**. Análise Térmica Diferencial da Qitosana/Alginato Epoxilada (A), esfera imobilizada com corantes Cibacron Blue F-3GA (D), Procion Blue MX-R (C) e Procion Green H-4G (B).

Para melhor visualização das etapas de perda de massa, as curvas DTA são dadas na Figura 8. A curva DTA da quitosana em atmosfera de  $N_2$  apresentaram quatro picos característicos de etapas de perda de massa. A primeira etapa entre 25 e 90°C, corresponde ao processo de desidratação do polímero. Dentre as temperaturas de 250 e 400 °C, a decomposição acontece principalmente por desacetilação e despolimerização dos compostos, a última etapa, aproximadamente 750°C é atribuída a degradações correspondentes aos resíduos finais do polímero (Chavez, J. A. P. et al, 2009).

A curva DTA das esferas imobilizadas com corantes apresentam curvas bem similares, essas curvas possuem três picos característicos, sendo o primeiro relacionado a desidratação do polímero entre 30 e 120°C, já o segundo pico entre 400 e

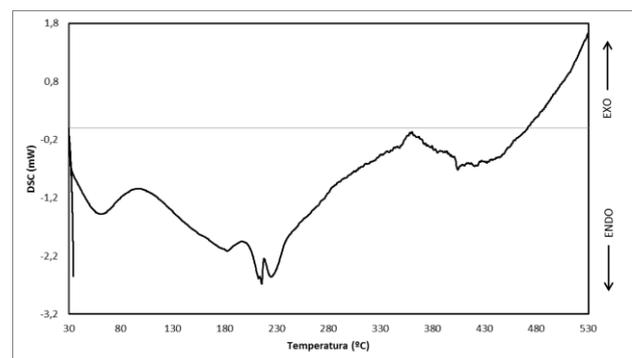
500°C pode ter ocorrido a despolimerização dos compostos e o terceiro pico, bem diferente daquele apresentado nas esferas sem corantes, pode ser referente a decomposição do polímero. Segundo registros da literatura, os produtos de decomposição em torno de 400 e 700°C são caracterizados como material carbonáceo (SOARES, et al., 2004).

### 3.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

**(DSC):** Nas curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial é possível observar as chamadas transições de primeira ordem, que ocorre a formação de picos na curva, podendo ser endotérmica e exotérmica. Como exemplos de eventos endotérmicos que podem ocorrer em polímeros são fusão, a perda de massa da amostra por vaporização de água e produtos voláteis ou decomposição; já nos eventos exotérmicos podemos citar a cristalização, reações de polimerização, cura, oxidação, adsorção entre outros. (Canevarolo, 2007).

No DSC fluxo de calor, a diferença entre as temperaturas de início e final do pico serve como base para o cálculo do calor absorvido ou liberado pela amostra, onde o resultado será negativo ( $\Delta T < 0$ ) para eventos endotérmicos e positivo ( $\Delta T > 0$ ) para exotérmicos.

Foram realizadas análises de DSC para as microesferas de quitosana/alginate epoxilados sem corante apresentado na Figura 9 e com corante apresentado na Figura 10.



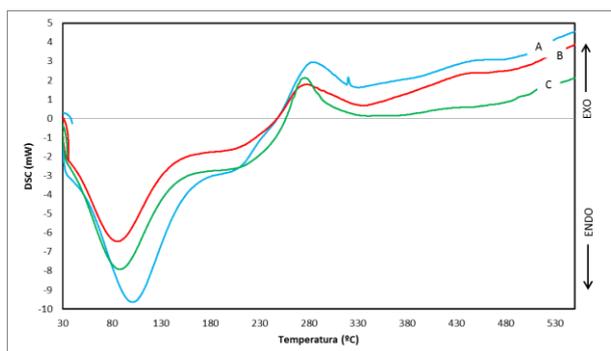
**Figura 9**. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) das microesferas de quitosana/alginate epoxilada sem corante.

Analisando a Figura 9 pode-se observar um pico endotérmico a 61,01°C devido a desidratação do composto, nas temperaturas de 181,88°C, 215,56°C e 225,39°C obtivemos três picos



endotérmicos, seguido de um pico exotérmico à 358,6°C e outro endotérmico à 404,32°C.

O pico endotérmico em 181,88°C é provavelmente resultante da interação entre os grupos amino da quitosana e carboxilato do alginato de sódio. O pico exotérmico largo por volta de 358°C pode ser atribuído aos polímeros, ocorrendo um deslocamento para temperaturas mais baixas (Horst, B. L., et. al., 2005).



**Figura 10.** Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos corantes Cibacron Blue F-3GA (A), Procion Blue MX-R (B), Procion Green H-4G (C).

Analisando a Figura 10 pode-se observar que os 3 corantes possuem curvas similares. Os picos endotérmicos são observados para a curva A em uma temperatura de 100,93°C, para a curva B em 85,53°C e para curva C em 87,95°C. Os picos endotérmicos que ocorrem na faixa de 60- 100°C é devido a desidratação dos polímeros. Os picos exotérmicos são observados a uma temperatura de 284,18°C para a curva A, 277,96°C para a curva B e 276,16°C para a curva C.

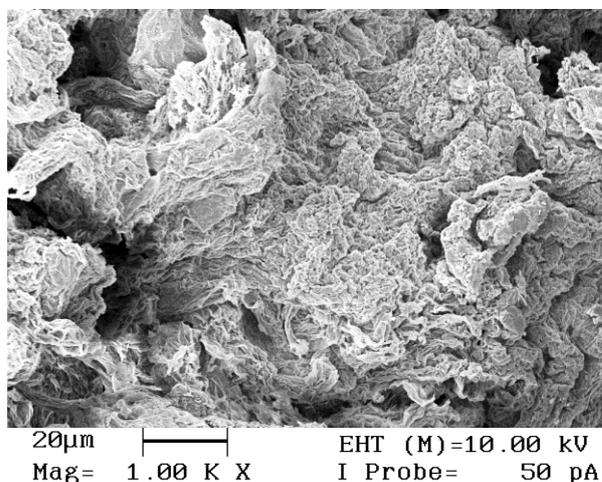
O descolamento dos picos exotérmicos para uma temperatura mais baixa, quando comparado ao pico endotérmico da Figura 9, pode ser atribuído a possíveis interações entre o corante e a matriz polimérica (Horst, B. L., et. al., 2005).

Como observado as duas figuras apresentam diferenças significativas, sugerindo que ocorre interação entre as esferas e os corantes com formação de um novo produto, visto que há o desaparecimento dos picos endotérmicos na faixa de 200 à 300°C e o aparecimento de um pico exotérmico em aproximadamente 280°C.

### 3.3. Caracterização dos adsorventes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

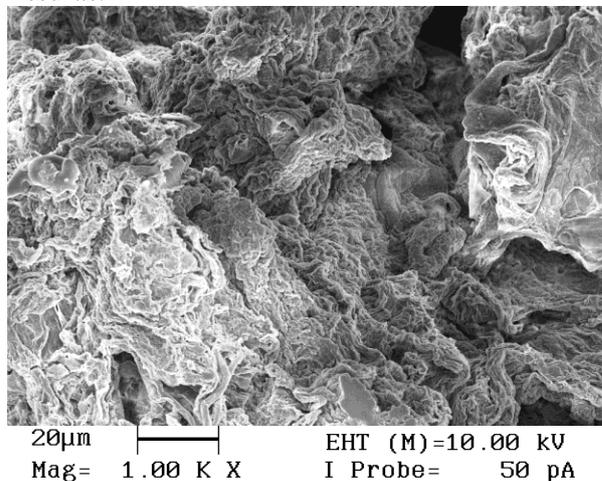
A MEV permite observar informações sobre as características morfológicas das microesferas quando imobilizadas aos corantes, por exemplo, a visualização de fissuras, poros, áreas de superfície de contato, aspecto em várias amplitudes entre outros. Para um adsorvente eficiente é fundamental que esse possua uma grande superfície de contato, com fissuras e rugosidades visíveis.

A Figura 11 mostra a MEV das esferas imobilizadas no corante Procion Blue MX-R, pode se observar a presença de várias fissuras e uma superfície com rugosidades, apresentando uma grande superfície de contato.



**Figura 11:** Microscopia Eletrônica de Varredura do Procion Blue MX-R

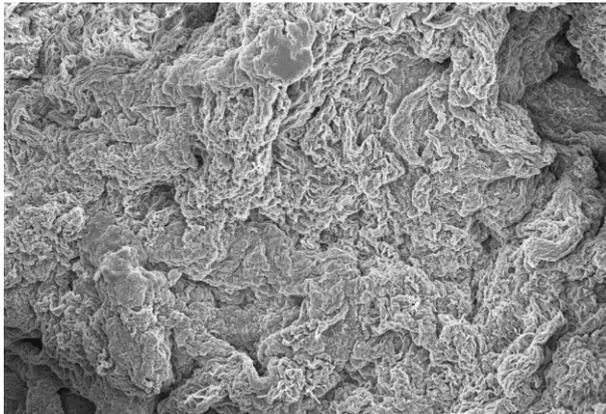
A Figura 12 mostra o MEV das esferas imobilizadas com o corante Procion Green H- 4G, a imagem é bem parecida quando comprada a figura 11, porem com uma menor quantidade de fissuras.



**Figura 12:** Microscopia Eletrônica de Varredura do Procion Green H-4G



A Figura 14 mostra o MEV das esferas imobilizadas com o corante Cibacron Blue F-3GA, sua superfície é bem diferente quando comprada a das demais esferas, por não apresentar fissuras, porem apresenta uma grande quantidade de rugosidades na superfície.



20µm  
Mag= 1.00 K X  
EHT (M)=10.00 kV  
I Probe= 50 pA

**Figura 14:** Microscopia Eletronica de Varredura do Cibacron Blue F-3GA

Com base nas análises de microscopia eletrônica de varredura pode-se observar que as esferas apresentam perfis semelhantes uma das outras, com algumas particularidades quando referente as fissuras e rugosidades.

#### 4. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que estes adsorventes apresentam potencial para ser aplicado como fase estacionária em cromatografia de afinidade com corantes imobilizados.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

#### 6. REFERÊNCIAS

BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; AUGUSTO, E.F.P.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for

IgG1 monoclonal antibodies purification: the effect of chelating ligand and support. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 160, p. 2148-2165, 2010.

CANEVAROLO, S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. Artliber Editora Ltda, p65 – 260, 2007.

FENG, Z.; SHAO, Z.; YAO, J.; HUANG, Y.; CHEN, X. Protein adsorption and separation with chitosan-based amphoteric membranes, *Polymer*, v. 50, p. 1257-1263, 2009.

GONDIM, D.R.; LIMA, L.P.; SOUZA, M.C.M; BRESOLIN, I.T.L.; ADRIANO, W.S.; AZEVEDO, D.C.S.; SILVA JR, I.J. Dye Ligand Epoxide Chitosan/Alginate: A Potential New Stationary Phase for Human IgG Purification. *Adsorption Sci. Technol.*, v. 30, p. 701-712, 2012.

HOVEN, V.P.; TANGPASUTHADOL, V.; ANGKITPAIBOON, Y.; VALLAPA, N.; KIATKAMJORNWONG, S.; Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption, *Carbohydr. Polym.*, v. 68, p. 44-53, 2007.

HORST, B.L. Estudo da estabilidade do corante natural betalaína microencapsulado com matriz polimérica de quitosana/alginate . Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, 2005.

HUANG, R.Y.M.; PAL, R.; MOON, G.Y. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures *J. Membrane Sci.*, v. 160, p. 101-113, 1999.

KAMARI, A.; WAN NGAH, W.S.; LIEW, L.K. Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption, *J. Environ. Sci.*, v. 21, p. 296-302, 2009.

NADAVALA, S.K. SWAYAMPKULA, K.; BODDU, V.M.; ABBURI, K. Biosorption of phenol and o-clorophenol from aqueous solutions onto chitosan-calcium alginate blended beads, *J. Harzardous Mat.*, v. 162, p. 482-489, 2009.

QIN, Y.; CAI, L.; FENG, D.; SHI, B.; LIU, J.; ZHANG, W.; SHEN, Y. Combined use of chitosan and alginate in the treatment of



wastewater, *J. Appl. Polymer Sci.*, v. 104, p. 3581-3587, 2007.

ROCHER, V.; SIAUGUE, J.-M.; CABUIL, V.; BEE, A. Removal of organic dyes by magnetic alginate beads, *Water Res.*, v. 42, p. 1290-1298, 2008.

RODRIGUES, E.C.; BEZERRA, B.T.C.; FARIAS, B.V.; ADRIANO, W.S.; VIEIRA, R.S.; AZEVEDO, D.C.S.; SILVA JR, I.J. Adsorption of Cellulase Isolated from *Aspergillus niger* on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin. *Adsorption Sci. Technol.*, v. 31, p. 17-34, 2013.

SHI, Q.-H.; TIAN, Y.; DONG, X.-Y.; BAI, S.; SUN, Y. Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption, *Biochem. Eng. J.*, v. 16, p. 317-322, 2003.

TORRES, M.A.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Characterization of chemically modified chitosan microspheres as adsorbents using standard proteins (bovine serum albumin and lysozyme), *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 24, p. 325 – 336, 2007.

VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends Biotechnol.*, v. 7, p. 71-76, 1989.

VOIGT, A.; ZINTL, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J. Biotechnol.*, v. 68, p. 213-226, 1999.

XU, C.; HE, D.; ZENG, L.; LUO, S. A study of adsorption behavior of human serum albumin and ovalbumin on hydroxyapatite/chitosan composite, *Colloids Surf. B*, v. 73, p. 360-364, 2009.

YEOM, C.K.; LEE, K.H. Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 67, 209-219, 1998.