



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS



LIVIA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE EM MATERIAL MESOPOROSO  
SBA-15 COM SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS POR DIFERENTES  
COMPOSTOS ORGÂNICOS.**

MACEIÓ

2016

LIVIA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE EM MATERIAL MESOPOROSO  
SBA-15 COM SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS POR DIFERENTES  
COMPOSTOS ORGÂNICOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Materiais.

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Osimar Sousa da Silva

**Coorientador(a):** Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Maria Rosas Garcia de Almeida

MACEIÓ

2016

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

R484i    Ribeiro, Livia Maria de Oliveira.  
          Imobilização da enzima invertase em material mesoporoso SBA-15 com Superfícies funcionalizadas por diferentes compostos orgânicos / Livia Maria de Oliveira Ribeiro. – Maceió, 2016.  
          107 f. : il.

          Orientador: Antônio Osimar Sousa da Silva.  
          Coorientadora: Renata Maria Rosas Garcia de Almeida.  
          Tese (Doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Materiais. Maceió, 2016.

          Bibliografia: f. 89-99.  
          Apêndice: f. 100-107.

          1. Santa Barbara Amorphous number 15 (SBA-15). 2. Silanos.  
          3. Funcionalização. 4. Invertase - Imobilização. I. Título.

CDU: 546.281:66.017



**ATA DA 7ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS**

No dia quatro de julho do ano de dois mil e dezesseis, às 14 horas e 05 minutos, no LCCV/CTEC, foi iniciado a DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de Livia Maria de Oliveira Ribeiro, tendo como título: "Imobilização da enzima invertase em material mesoporoso SBA-15 com superfícies funcionalizadas por diferentes compostos orgânicos", como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de DOUTOR EM MATERIAIS. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva (Orientador - PPGMateriais/UFAL), Prof. Dr. Renata Maria Rosas Garcia de Almeida (Coorientadora - PPGEQ/UFAL), Prof. Dr. Fabiane Coxico de Azevedo Galvão (PPGMateriais/UFAL), Prof. Dr. Adriana Santos Ribeiro (PPGMateriais/UFAL), Prof. Dr. Lucas Meili (PPGMateriais/UFAL), Prof. Dr. Jailma Barros dos Santos (UNIT), Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima (IFAL). A candidata fez a sua apresentação em 55 minutos. A Defesa foi encerrada às 17 horas e 15 minutos. Após o encerramento da Defesa, em reunião fechada, a Banca Examinadora, com base no Regimento Interno, decidiu por APROVAR a tese de Doutorado.

Em 04 de Julho de 2016.

Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva  
(Orientador - PPGMateriais/UFAL)

Antonio Osimar S. Silva

Prof. Dr. Renata Maria Rosas Garcia de Almeida  
(Coorientadora - PPGEQ/UFAL)

Renata Almeida

Prof. Dr. Adriana Santos Ribeiro  
(PPGMateriais/UFAL)

Adriana Santos Rib

Prof. Dr. Fabiane Coxico de Azevedo Galvão  
(PPGMateriais/UFAL)

Fabiane Coxico de Azevedo Galvão

Prof. Dr. Jailma Barros dos Santos  
(UNIT)

Jailma Barros dos Santos

Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima  
(IFAL)

Phabyanno Rodrigues Lima

Livia Maria de Oliveira Ribeiro  
(Doutoranda PPGMateriais)

Livia Maria de Oliveira Ribeiro

*A Deus, aos meus pais, meu esposo e meu filho que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por tudo de maravilhoso que ele proporciona em minha vida.

Aos meus pais, Amadeu e Zelda, por não medirem esforços quando eu sempre precisei e por terem investido na minha educação, o que me fez chegar até aqui.

A minha irmã, Kalina, por ter me ajudado nas horas de cansaço e nervosismo.

Ao meu esposo, Diego, por toda atenção, amor, paciência e, principalmente, ter ficado boa parte do tempo com nosso filho para que eu pudesse me dedicar na finalização desse trabalho.

Ao meu filho, Bernardo, que mesmo tão pequeno, sorria para mim nos momentos que eu estava mais cansada, renovando as minhas energias.

Ao professor Osimar, pela paciência incansável, por todo ensinamento e por ter acreditado no meu trabalho.

A professora Renata, pela coorientação e pelo apoio dado em todos os momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Síntese de Catalisadores (LSCat) pela amizade, risadas e colaboração na realização das análises deste trabalho, especialmente a professora Soraya Lira, Albanise Enide, Tiago Pereira, Ramiro Batinga, Thayane Dantas, Julyane Santos e Bruno Barros.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA), em especial a Margarete Cabral, por toda ajuda e amizade.

A todos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em especial a Larissa Falleiros, por todo ensinamento e ajuda nos experimentos de imobilização.

A CAPES pelo suporte financeiro, imprescindível para a realização deste meu objetivo profissional.

Aos professores Lucas Meili, Fabiane Caxico e Severino Marques por terem contribuído com o crescimento e desenvolvimento desse trabalho durante a qualificação.

Aos professores Adriana Ribeiro, Phabyanno Lima e Jailma Barros por terem aceitado a participar dessa banca.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram e me apoiaram para a realização de mais uma etapa da minha vida. A todos vocês meu muito obrigada! Que Deus os abençoe!

## RESUMO

A busca por suportes adequados para imobilização de enzimas vem sendo motivo de crescentes pesquisas na área da biocatálise. As enzimas imobilizadas são catalisadores de grande interesse industrial, pois une as vantagens da catálise heterogênea com a alta seletividade e condições amenas de operação das enzimas. Em 1998, um novo material mesoporoso com estrutura hexagonal altamente ordenada foi desenvolvido na Universidade de Santa Bárbara, nos Estados Unidos, e denominado SBA-15. Esse material possui mesoporos de aproximadamente 6,0 nm de diâmetro, área superficial específica da ordem de 800 m<sup>2</sup>/g e, além disso, possui uma grande quantidade de grupos silanóis livres ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) presentes nas paredes dos poros. A presença desses grupos permite funcionalizar sua superfície, tornando o material mais eficiente e seletivo como adsorvente. Neste trabalho foram sintetizadas peneiras moleculares mesoporosas SBA-15, as quais tiveram suas superfícies funcionalizadas por diferentes moléculas orgânicas, tais como: trimetoxifenilsilano (TMOS), viniltrimetoxisilano (VMOS) e  $\gamma$ -aminopropiltriethoxisilano (APTES). As amostras sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), análise térmica (TG/DTG), adsorção de nitrogênio (BET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As peneiras moleculares mesoporosas SBA-15, após funcionalização, foram utilizadas para a imobilização da enzima invertase, com diâmetro de aproximadamente 4,5 nm. Avaliou-se o rendimento de imobilização para cada suporte empregado e os melhores resultados de rendimento de imobilização, na faixa de 80%, foram alcançados utilizando o suporte funcionalizado com o agente silano APTES, devido à maior ancoragem de enzimas em sua superfície. Estes resultados indicam a funcionalização como uma alternativa promissora para aplicação do suporte na obtenção de biocatalisador imobilizado.

Palavras-chaves: SBA-15, silanos, funcionalização, invertase, imobilização.

## ABSTRACT

The search for appropriate supports for enzyme immobilization has attracted increasing interest in the field of biocatalysis. Immobilized enzymes are catalysts of enormous industrial interest because they combine the advantages of heterogeneous catalysis with the high selectivity and mild operational conditions of enzymes. In 1998, a new mesoporous material with highly ordered hexagonal structure was developed at the University of Santa Barbara, United States, and called SBA-15. This material has mesopores of about 6.0 nm in diameter, specific surface area of the order of 800 m<sup>2</sup>/g and, in addition, it has a large amount of free silanol groups ( $\equiv\text{Si} - \text{OH}$ ) present on the pore walls. The presence of these groups allows functionalize its surface, making it more efficient and selective as adsorbing materials. In this work we were synthesized mesoporous molecular sieves SBA-15, which have had their surfaces modified by various organic molecules, such as trimethoxyphenylsilane (TMOS), vinyltrimethoxysilane (VMOS) and  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). The synthesized samples were characterized by spectroscopy in the infrared (FT-IR), thermal analysis (TG / DTG), nitrogen adsorption (BET) and scanning electron microscopy (SEM). The mesoporous molecular sieves SBA-15 after functionalization, were used for the immobilization of invertase diameter of approximately 4.5 nm. We evaluated the performance of immobilization for each support and the best results of immobilization yield in the range of 80% were achieved using the support functionalized with silane agent APTES due to greater anchoring enzymes on its surface. These results indicate functionalization as a promising alternative to applying the support in obtaining immobilized biocatalyst.

*Keywords:* SBA-15, silanes, functionalization, invertase, immobilization.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Principais classes das peneiras moleculares.	24
<b>Figura 2</b>	Desenho ilustrativo das estruturas do grupo de materiais mesoporosos pertencentes a família SBA.	25
<b>Figura 3</b>	Esquema ilustrativo da espessura dos poros do MCM-41 e SBA-15.	25
<b>Figura 4</b>	Presença de microcanais na estrutura do SBA-15.	26
<b>Figura 5</b>	Tipos de surfactantes.	27
<b>Figura 6</b>	Agregados micelares.	28
<b>Figura 7</b>	Esquema da formação da estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura.	29
<b>Figura 8</b>	Representação da fórmula estrutural do Pluronic P123.	31
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática da ocorrência de microporos na estrutura do SBA-15.	31
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática da formação da sílica mesoporosa SBA-15 segundo Mesa, Sierra e Guth (2008).	33
<b>Figura 11</b>	Esquema representativo da estrutura de SBA-15 antes e após a calcinação.	34
<b>Figura 12</b>	Presença de grupos silanóis livres na superfície do SBA-15.	35
<b>Figura 13</b>	Disposição dos grupos silanóis na sílica.	35
<b>Figura 14</b>	Funcionalização pós-síntese para organosilanos terminais do tipo $(R'O)_3SiR$ , onde R= grupos funcionais orgânicos.	37
<b>Figura 15</b>	Método de co-condensação para funcionalização de sílica mesoporosas, onde R= grupos funcionais orgânicos.	38
<b>Figura 16</b>	Métodos para imobilização de enzimas.	45
<b>Figura 17</b>	Gráfico que relaciona velocidade de reação com a concentração de substrato.	51
<b>Figura 18</b>	Complexo enzima-substrato.	51
<b>Figura 19</b>	Esquema de modificação do SBA-15 com os diferentes agentes silanos.	57
<b>Figura 20</b>	Reator tipo cesta.	63
<b>Figura 21</b>	Representação esquemática da unidade experimental utilizada nas reações de hidrólise.	63

<b>Figura 22</b>	Curvas de TG e DTG das amostras de SBA-15 calcinada e com suas superfícies modificadas pelos agentes silanos.	68
<b>Figura 23</b>	Espectros de FTIR do SBA-15 não modificado e modificados.	70
<b>Figura 24</b>	Isotermas de adsorção para amostras de SBA-15 não modificada e modificadas.	73
<b>Figura 25</b>	Imagem de microscopia eletrônica de varredura do material SBA-15 não modificado.	74
<b>Figura 26</b>	Micrografias das amostras: a) SBA-15 modificado com TMOS, b) invertase imobilizada no suporte SBA-15/TMOS, c) SBA-15 modificado com VMOS, d) invertase imobilizada no suporte SBA-15/VMOS, e) SBA-15 modificado com APTES, f) invertase imobilizada no suporte SBA-15/APTES.	76
<b>Figura 27</b>	Gráfico da concentração de glicose <i>versus</i> tempo para cada agente funcionalizante a diferentes concentrações enzimáticas: a)TMOS, b) VMOS, c) APTES.	78
<b>Figura 28</b>	Variação da atividade enzimática em função da concentração de enzima.	80
<b>Figura 29</b>	Estudo da estocagem do biocatalisador imobilizado com agente APTES.	84
<b>Figura 30</b>	Distribuição dos átomos de oxigênio ao redor do átomo de silício.	98
<b>Figura 31</b>	Curva padrão de albumina (BSA)	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos suportes orgânicos e inorgânicos.	17
<b>Tabela 2</b>	Principais trabalhos reportados na literatura sobre imobilização de enzimas em diferentes suportes.	20
<b>Tabela 3</b>	Classificação das enzimas.	40
<b>Tabela 4</b>	Comparação entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos.	42
<b>Tabela 5</b>	Propriedades da Invertase.	43
<b>Tabela 6</b>	Fórmulas moleculares e estruturais e peso molecular dos grupos silanos.	56
<b>Tabela 7</b>	Quantidade de moléculas ancoradas na superfície do material SBA-15.	69
<b>Tabela 8</b>	Cálculo das densidades óticas das bandas.	71
<b>Tabela 9</b>	Adsorção de N <sub>2</sub> das amostras sintetizadas.	72
<b>Tabela 10</b>	Valores de concentração de glicose calculados paracada suporte imobilizado.	77
<b>Tabela 11</b>	Valores de $V_{max}$ , $K_m$ e $K_{cat}$ para os biocatalisadores.	81
<b>Tabela 12</b>	Valores obtidos pelo método das taxas iniciais para os biocatalisadores.	83
<b>Tabela 13</b>	Valores da perda de atividade obtidos para o biocatalisador imobilizado com agente APTES a diferentes concentrações enzimáticas.	85
<b>Tabela 14</b>	Quantidadede agente funcionalizante utilizada na etapa de modificação.	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SBA-15	Santa Barbara Amorphous number 15
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
TEOS	Tetraetilortossilicato
CMC	Concentração Micelar Crítica
PEO	Poli óxido de etileno
PPO	Poli óxido de propileno
TMC	Temperatura Micelar Crítica
TMOS	Trimetoxifenilsilano
VMOS	Viniltrimetoxisilano
APTES	$\gamma$ -aminopropiltrimetoxisilano
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho
TG/DTG	Análise térmica
BET	Adsorção de nitrogênio pelo método BET
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ICTAC	Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria
ASAP	Accelerated Surface Area and Porosimetry System
$A_{\text{espec.}}$	Atividade específica da invertase
BSA	Albumina do Soro Bovino
R	Rendimento de Imobilização
$A_i$	Atividade enzimática da enzima livre
$A_f$	Atividade enzimática da enzima imobilizada
$V_{\text{max}}$	Velocidade Máxima
$v_0$	Velocidade inicial
[S]	Concentração de substrato
$K_{\text{cat}}$	Constante catalítica
$S_{\text{BET}}$	Área pelo método BET
$S_{\text{BJH}}$	Área no ramo da dessorção
$S_{\text{Ex}}$	Área externa
$S_{\text{Micro}}$	Área dos microporos
$V_t$	Volume total dos poros
$V_{\text{BJH}}$	Volume dos poros na dessorção

$V_{\text{Micro}}$	Volume de microporos
$D_A$	Média do diâmetro de poros
$D_{\text{BJH}}$	Diâmetro dos poros na dessorção.
BDDT	Braunauer, Deming e Teller
$Q_p$	Quantidade de Proteína
Ef	Eficiência de imobilização
$P_{\text{atividade}}$	Perda de atividade

## BREVE CURRÍCULO DO AUTOR

Livia Maria de Oliveira Ribeiro nasceu na cidade de Maceió, no estado de Alagoas, em 20 de julho de 1984.

Em 2002 ingressou no curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), concluindo o mesmo em março de 2007. No segundo ano da graduação, foi contemplada com uma bolsa de pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, FAPEAL, sob orientação da professora doutora Adriana Santos Ribeiro, cujo trabalho de conclusão de curso foi intitulado “*Síntese e eletrodeposição de derivados substituídos de polipirrol para aplicação em baterias e capacitores*”.

Em 2007, foi aprovada em primeiro lugar, no curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, na área de Desenvolvimento e Pesquisa de Processos Regionais. Em março de 2010, defendeu a dissertação intitulada “*Estudo do processo de produção de biodiesel de óleo de coco catalisado enzimaticamente*”, sob orientação da professora doutora Renata Maria Rosas Garcia de Almeida.

Em outubro de 2011, começou seu estudo a nível de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Materiais da mesma instituição (UFAL), submetendo-se em 04 de julho a defesa de tese intitulada “*Imobilização da enzima invertase em material mesoporoso SBA-15 com superfícies funcionalizadas por diferentes compostos orgânicos*”, sob orientação do professor doutor Antônio Osimar Sousa da Silva.

### Principais Publicações

#### *Publicações em Jornais Científicos*

1. Silva, A.E., **Ribeiro, L.M.O.**, Silva, B.J.B., Costa, T.P.M., Meneguetti, S.M.P., Silva, A.O.S. Synthesis and characterization of mesoporous materials containing cerium, lanthanum and praseodymium by nonhydrothermal method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 75, p. 413-423, **2015**.

2. **Ribeiro, L.M.O.**, Silva, A.E., Silva, M.C.S., Almeida, R.M.R. A Study on Ethanolysis and Methanolysis of Coconut Oil is enzymatically Catalyzed Production of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, v. 4, p. 215 - 224, **2014**.

3. Silva, B.J.B., Silva, T.O., Modesto Neto, P.P., Costa, T.P.M., Sousa Junior, L.V., **Ribeiro, L.M.O.**, Alencar, S.L., Silva, A.E. Quantitative analysis of ferrierite zeolites, ZSM-5 and mordenite present in samples synthesized. *Ceramics*, v. 61, p. 14 - 22, **2014**.

4. **Ribeiro, L.M.O.**, Cesar, B., Almeida, R.M.R.G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a Catalys. *Biomass & Bioenergy*, v. 47, p. 498 - 503, **2012**.

5. **Ribeiro, L.M.O.**, Silva J.G. Jr, Navarro, M.C., Fonseca, P., Neves, S., Tonholo, J., Ribeiro, A.S., Silva, A.U., Leite, S.M. The effect of the conditions of electrodeposition on the capacitive properties of dinitrobenzoyl-derivative polypyrrole films. *Journal of Power Sources*, v. 177, p. 669 - 675, **2008**.

6. Ribeiro, A.S., **Ribeiro, L.M.O.**, Leite, S.M., Silva, J.G. Jr, Navarro, M, Tonholo, J. Electrochemical thiophene derivative of polimerisation induced by Lewis acid: Electrosynthesis of poly [(R) - (-) - 2- (3'-thienyl) ethyl- (3', 5' '- dinitrobenzoyl) -alpha-phenylglycinate]. *Polymer*, v. 47, p. 8430 - 8435, **2006**.

7. Ribeiro, A.S., **Ribeiro, L.M.O.**, Silva, J.G. Jr, Navarro, M, Tonholo, J. Characterization by Atomic Force Microscopy of Electrodeposited Films of Polypyrrole Dinitrobenzoyl-derivative. *Microscopy & Microanalysis*, v. 11, p. 146 - 149, **2005**.

8. Ribeiro, A.S., **Ribeiro, L.M.O.**, Silva, A.U., Silva, J.G. Jr, Navarro, M, Tonholo, J. Electrochemical and morphological characterization of poly [(R) - (-) - 3- (1-pyrrolyl) propyl-N- (3,5-dinitrobenzoyl) -alpha-phenylglycinate] films deposited on ITO electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 580, p. 313 – 318, **2005**.

#### *Artigos em revistas*

1. Ribeiro, A.S., **Ribeiro, L.M.O.**, Silva, J.G. Jr, Navarro, M, Tonholo, J., Effect of the deposition charge, electrolyte and substituent on the morphological properties of polypyrrole derivatives films. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. **2005**.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
2	<b>RELEVÂNCIA DO TEMA</b>	19
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	22
3.1	<b>Peneiras Moleculares</b>	22
3.2	<b>Material Mesoporoso SBA-15</b>	24
3.3	<b>Modificação de Superfícies – Funcionalização</b>	34
3.4	<b>Enzimas</b>	39
3.4.1	Invertase	42
3.4.2	Imobilização de Enzimas	43
3.4.2.1	Imobilização por adsorção física	45
3.4.2.2	Imobilização por ligações covalentes	46
3.4.3	Suportes para imobilização	47
3.4.4	Cinética enzimática	49
4	<b>OBJETIVOS</b>	52
4.1	<b>Objetivo Geral</b>	52
4.2	<b>Objetivos Específicos</b>	52
5	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	53
5.1	<b>Síntese do material mesoporoso SBA-15</b>	53
5.1.1	Reagentes necessários	53
5.1.2	Procedimento	53
5.2	<b>Funcionalização da Superfície do SBA-15 com agentes silanos</b>	54
5.2.1	Reagentes necessários	54
5.2.2	Procedimento	54
5.3	<b>Caracterização dos Materiais</b>	55
5.3.1	Análise Térmica (TG/DTG)	56
5.3.2	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	57
5.3.3	Adsorção de Nitrogênio (BET)	58
5.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59



5.4	<b>Enzima</b>	59
5.5	<b>Imobilização do biocatalisador</b>	59
5.5.1	Ativação do suporte	59
5.5.2	Imobilização da enzima	60
5.6	<b>Unidade experimental</b>	60
5.6.1	Determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais	60
5.6.2	Determinação da concentração de proteína	63
5.6.3	Rendimento de Imobilização	64
5.6.4	Efeito da concentração da enzima na atividade enzimática	66
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	66
6.1	<b>Síntese do Material Mesoporoso SBA-15</b>	66
6.2	<b>Caracterização dos Materiais</b>	66
6.2.1	Análise Térmica	66
6.2.2	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho	69
6.2.3	Adsorção de nitrogênio	71
6.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura	73
6.3	<b>Imobilização Enzimática</b>	74
6.4	<b>Estocagem do biocatalisador imobilizado com o agente APTES</b>	82
7	<b>CONCLUSÃO</b>	85
	<b>REFERÊNCIAS</b>	86
	<b>APÊNDICE</b>	97

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são grupos de substâncias orgânicas de natureza geralmente protéica, com atividade intracelular ou extracelular, cuja função primordial nos organismos é proporcionar uma rota reacional de menor energia de ativação e, conseqüentemente, com um menor tempo de reação e em condições brandas de temperatura e pressão. As enzimas convertem uma substância chamada de substrato para outra chamada de produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam (CHIBATA, 1978; BOBBIO; BOBBIO, 1995; FABER, 2011). Nos processos biológicos, as enzimas são preferíveis a catalisadores químicos, pois são mais seletivas, resulta em um produto mais limpo e tem um maior rendimento (MOFFAT et al., 1994). No entanto, a dificuldade em recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, as torna inadequada para uso em diversos processos. Com base nisso, a imobilização enzimática vem surgindo como alternativa para contornar essas questões.

A imobilização de enzimas tem se mostrado uma ferramenta poderosa para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como por exemplo: a alta atividade e seletividade (PALOMO et al., 2007). A imobilização é um processo que pode ser definido como a fixação de enzimas ou células vivas em uma superfície, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). O uso em processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do biocatalisador são as principais vantagens propiciadas pela imobilização (CANILHA; CARVALHO, 2006).

Pesquisas avaliando suportes para utilização na imobilização de enzimas vêm crescendo cada vez mais. Diversos materiais, orgânicos ou inorgânicos, Tabela 1, podem ser utilizados como suportes para imobilização e, durante uma seleção para um dado processo de imobilização, as principais propriedades que devem ser analisadas são: área superficial, insolubilidade, regenerabilidade, reutilização, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação (MARQUEZ et al., 2008).

**Tabela 1- Classificação dos suportes orgânicos e inorgânicos.**

<i>Suportes</i>				
<i>Orgânicos</i>		<i>Inorgânicos</i>		
<b>Naturais</b>		<b>Sintéticos</b>	<b>Minerais</b>	<b>Fabricados</b>
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areias	Vidro
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica
Ágar	Gelatina	Nylon	Pedra pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de ferro
Amido		Vinil		Óxido de níquel
		Policrilamidas		

Fonte: GALVÃO, 2004.

No entanto, a escolha do suporte para a imobilização não está associada apenas às suas propriedades químicas e físicas, mas também, as características da enzima a ser imobilizada e do processo em que será aplicado. Diante do exposto, pode-se dizer que não há um suporte universal que possa ser empregado em todas as situações (CORCORAN, 1985; AQUARONE et al., 2001).

Os materiais mesoporosos com estruturas bem ordenadas são objetos de um número crescente de estudo visando aplicações variadas (CIESLA; SCHUTH, 1999; GALARNEAU et al., 2003; DOADRIO et al., 2004). A presença de poros de tamanho uniforme juntamente com os grupos silanóis superficiais conferem a estes materiais propriedades interessantes para aplicação como suporte de uma grande quantidade de espécies químicas, tais como moléculas orgânicas, metais e polímeros.

A descoberta da família M41S em 1992, um dos primeiros sólidos mesoporosos a serem sintetizados (BECK et al., 1992) com um arranjo de poros ordenados e com uma distribuição de tamanho muito estreita, possibilitou uma variedade de aplicações em diversos campos (MONNIER et al., 1993; LUAN et al., 1999), levando ao desenvolvimento de sílicas mesoporosas com estrutura altamente ordenada e maior diâmetro de poro, denominada de SBA-15. Este material é sintetizado utilizando surfactantes comerciais em meio fortemente ácido (ZHAO et al., 1998). O SBA-15 possui uma rede hexagonal contendo mesoporos de aproximadamente 6,0 nm de diâmetro e área superficial específica da ordem de 800 m<sup>2</sup>/g. Além disso, apresenta uma elevada estabilidade térmica e hidrotérmica, podendo representar uma alternativa ao uso do MCM-41, que oferece mesoporos inferior a 3 nm.

Uma característica relevante do SBA-15 é a presença de uma grande quantidade de grupos silanóis livres ( $\equiv\text{Si-OH}$ ), presentes nas paredes dos poros (MUÑOZ et al., 2003). Aliadas às propriedades estruturais e texturais que o SBA-15 apresenta, ainda é possível funcionalizar sua superfície, tornando o material mais eficiente e seletivo como adsorvente. Dessa forma, uma das grandes vantagens deste material mesoporoso é a sua versatilidade em adsorver compostos específicos, através da interação com diferentes grupos ligantes ancorados na sua superfície (HOFFMANN et al., 2006). Esta metodologia pode ser utilizada em vários aspectos tecnológicos, tais como catálise, imobilização de enzimas, adsorção de metais pesados, confecção de sistemas de liberação controlada de drogas, entre outras (BENVINDO, 2006; SENA, 2012).

A funcionalização mais comum emprega moléculas contendo grupos silanos, que interagem com grupamentos similares presentes na superfície do sólido formando ligações covalentes. O termo silanização refere-se à fixação no suporte de um composto contendo um grupo silano, obtendo assim, compostos silanos organofuncionalizados (SING et al., 1985).

De um modo geral, a funcionalização de materiais permite o controle preciso de diversas propriedades superficiais, tais como: modificação do caráter hidrofílico/hidrofóbico, alteração da reatividade (proteção da superfície ao ataque de certas espécies químicas), além da estabilização do sólido frente a reações de hidrólise (HOFFMANN et al., 2006).

Diante do que foi explanado, este trabalho teve como enfoque sintetizar o material mesoporoso SBA-15 visando sua utilização para a imobilização de biomoléculas. Esta imobilização foi realizada através da introdução de moléculas contendo grupos funcionais orgânicos capazes de conferir propriedades hidrofóbicas a superfície, permitindo a ancoragem de biomoléculas, afim de avaliar qual suporte tem melhor afinidade com a enzima em estudo.

## 2 RELEVÂNCIA DO TEMA

A imobilização de biocatalisadores tem se tornado uma estratégia chave para minimizar o custo relativamente alto das enzimas aplicáveis em processos biocatalíticos, de modo a viabilizar seu uso em escala comercial. Ao longo dos anos, vários estudos têm sido realizados no sentido de se obter enzimas cataliticamente ativas e insolúveis no meio reacional e, ao mesmo tempo, reutilizáveis para novos processos catalíticos.

Nelson e Griffin (1916) foram os primeiros pesquisadores a reportarem o uso de enzima imobilizada quando adicionaram uma preparação biológica da enzima invertase ao carvão ativo e observaram que o sistema imobilizado foi capaz de hidrolisar a sacarose e, mesmo depois de ser lavado, mantinha-se cataliticamente ativo. No entanto, o baixo potencial de imobilização (5,2%) fez com que esse método não fosse reconhecido nos 40 anos sucessivos (CAO, 2005).

Na década de 60, surgiu a idéia de ligar as enzimas por meios químicos a suportes inertes insolúveis, ocorrendo, assim, uma considerável difusão dessa técnica. No entanto, foi a partir da década de 70 que houve um grande crescimento, tanto do número de artigos publicados, como do número de patentes registradas referentes ao emprego de enzimas imobilizadas (ROSEVEAR, 1984). Em 1997, estimava-se que existiam cerca de 25000 enzimas na natureza, e destas, 3000 já haviam sido identificadas, onde apenas 10% encontravam-se disponíveis comercialmente (FABER, 2011).

Com o auxílio do site *web of science* foi realizado um estudo preliminar, primordial para a escolha do suporte e da enzima utilizada para realizar a imobilização. Nos últimos 10 anos existem cerca de 7 mil trabalhos publicados a respeito do material mesoporoso SBA-15, seguidos por cerca de 3 mil a respeito da enzima invertase. No entanto, uma curiosidade foi despertada por não existir trabalho na literatura sobre imobilização da invertase no SBA-15, fazendo dessa tese uma publicação inédita diante a comunidade científica.

Dentro do vasto campo da biotecnologia, os principais trabalhos publicados a respeito da imobilização de enzimas em suportes estão reportados na Tabela 2. Esta tabela apresenta, também, o valor do rendimento de imobilização obtido em cada trabalho.

**Tabela 2 – Principais trabalhos reportados na literatura sobre imobilização de enzimas em diferentes suportes.**

<i><b>Autores</b></i>	<i><b>Enzima</b></i>	<i><b>Suporte</b></i>	<i><b>R*</b></i>
ELLALIAH et al. (2010)	Acilase	Alginato de sódio	42,1
SIMÕES et al. (2010)	Invertase	SiO <sub>2</sub> -quitosana	68,3
MENDES (2011)	Lipase	Agarose	61,0
AMORIM et al. (2012)	Protease	Resina	89,3
KNEZEVIC et al. (2013)	Invertase	Resina	78,9
MENDES et al. (2013)	Lipase	Hidrogéis de quitosana	77,1
HUMPHREY et al. (2014)	Tripsina	SBA-15	48,0
BHANGE et al. (2015)	Hidrolase	SBA-15	71,2

\* Rendimento de imobilização (%).

Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2014.

Um fato interessante a respeito da Tabela 2 refere-se aos valores de rendimento de imobilização obtidos por diversos grupos de pesquisa. Como pode ser visto, os dois maiores rendimentos de imobilização (89,3% e 78,9%) foram alcançados quando se utilizou suportes obtidos comercialmente, Duolite A-568 e Eupergite<sup>R</sup> C, respectivamente, acarretando a um aumento de custo, já que ambas resinas possuem alto valor comercial.

Humphrey et al. (2014) e Bhange et al. (2015), conseguiram imobilizar a tripsina e a hidrolase, respectivamente, no material mesoporoso SBA-15. As técnicas usadas por esses pesquisadores para a síntese do material mesoporoso e para imobilização de enzimas foram semelhantes às utilizadas nesse trabalho, contudo, um maior valor de rendimento de imobilização foi adquirido por nosso grupo de pesquisa (84,5%), quando utilizado a invertase como enzima.

Infelizmente, o alto custo das enzimas ainda faz com que esses microorganismos não se tornem tão interessantes ao ponto de visto comercial, porém, sua reutilização acaba compensando seu custo. Dentre tantas enzimas existentes comercialmente, a invertase é uma das que possuem menor custo, fazendo que com seu uso a torne mais atrativa, quando comparada a outras enzimas (GAVA, 2007). Com base nisso, esse trabalho apresentou outro ponto positivo, pois o maior rendimento de imobilização foi obtido quando se utilizou a concentração mais baixa de enzima (0,1 g/L), enquanto que os altos rendimentos conseguidos nos outros trabalhos, foram para um valor superior (0,5 g/L).

Assim, diante dos resultados obtidos nessa tese e, posteriormente apresentados, espera-se contribuir de maneira significativa para o fortalecimento desse assunto na área científica e no desenvolvimento de novos materiais a serem utilizados como biocatalisadores.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho, dando ênfase para o material mesoporoso SBA-15, bem como a síntese e mecanismo utilizado na sua formação e a funcionalização da sua superfície utilizando grupos silanos. Também são apresentados fundamentos teóricos sobre enzimas, destacando a invertase e os processos de imobilização dessas enzimas nos materiais mesoporosos sintetizados.

#### 3.1 Peneiras Moleculares

A natureza, mais especificamente o reino mineral, é abundante em exemplos de materiais porosos. O que muitas vezes, aos olhos do homem, parece uma superfície lisa, compacta e contínua, pode vir a ser um material de superfície porosa, por esses com diâmetros em escala nanométrica, sendo dessa forma, imperceptível ao olho humano (SENA, 2012).

O desenvolvimento dessa porosidade em minerais na natureza depende de uma série de fatores que controlam a cristalização do magma em médias e grandes profundidades, sendo as altas pressões e temperaturas os principais. Nessas condições, compostos anidros cristalizam primeiro, fazendo com que componentes voláteis, água na forma de soluções salinas ou alcalinas, fiquem retidos no interior do cristal. A incorporação desses componentes seria responsável pela estabilização da estrutura porosa formada, uma vez que a mesma poderia colapsar em altas pressões caso seus poros não estivessem preenchidos (SENA, 2012). Devido a existência dos poros no interior desses sólidos, esses materiais foram denominados de peneiras moleculares.

O termo peneira molecular foi utilizado pela primeira vez, em 1932, por McBain o qual conceituou que peneiras moleculares são sólidos porosos que possuem capacidade de difusão seletiva de moléculas em seu espaço intracristalino. Segundo McBain, essa propriedade se deve à existência de canais e cavidades de dimensões bem definidas em suas estruturas cristalinas (BENVINDO, 2006).

De acordo com a IUPAC (1972), as peneiras moleculares podem ser classificadas em três classes dependendo do diâmetro de poro ( $D_p$ ): (i) *materiais microporosos*, tamanhos de poros abaixo de 2,0 nm, (ii) *materiais mesoporosos*, com tamanhos de poros intermediários entre 2,0 e 50,0 nm e (iii) *materiais macroporosos*, com tamanhos de poros que excedem 50,0 nm.

Na classe dos materiais microporosos destacam-se as zeólitas, que são aluminossilicatos naturais ou sintéticos que apresentam elevada área superficial e estreita

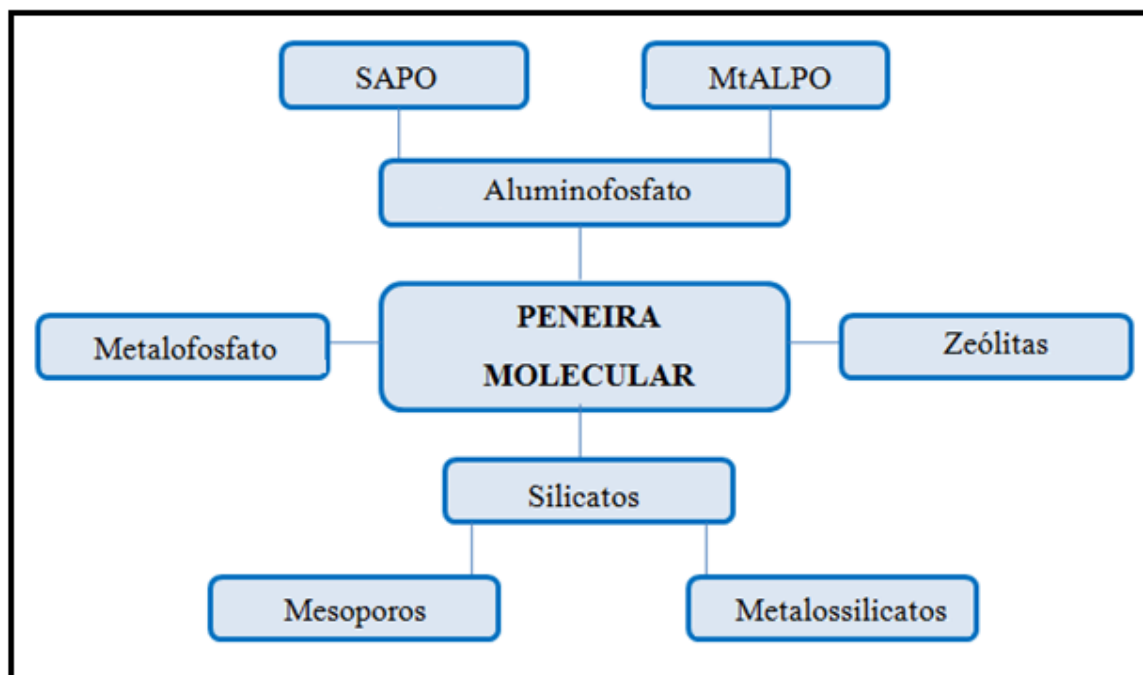


distribuição de tamanho de poros, decorrentes do seu sistema de poros cristalograficamente definido. Esses aluminossilicatos possuem sistemas de microporos abertos e elevada estabilidade térmica. Essas propriedades são as responsáveis pela diversidade de aplicações desses materiais, tais como: atuação como adsorventes e/ou catalisadores; suportes para catalisadores, etc. Todavia, o pequeno tamanho de poros restringe o uso de zeólitas a processos que envolvem moléculas relativamente pequenas (CIESLA; SCHUTH, 1999).

Devido à limitação imposta pelos microporos das zeólitas, em 1992, pesquisadores da Mobil Oil Corporation anunciaram a descoberta dos chamados materiais mesoporosos, compostos de silicatos ou aluminossilicatos, os quais foram chamados de família M41S (BECK et al., 1992; KRESGE et al., 1992). Esses novos materiais possuem diâmetros de poro bem definidos na faixa de 2,5 a 10 nm, estreita distribuição de tamanho de poros e elevadas áreas superficiais (1000 m<sup>2</sup>/g). Ao invés de usar pequenas moléculas orgânicas modeladoras, como na síntese das zeólitas, os pesquisadores utilizaram longas cadeias de surfactante (*templates*) para direcionar a estrutura desses materiais. Além de modelar a estrutura final, os *templates* são responsáveis pela formação do sistema de poros do material. Dependendo da matéria-prima inicial e variando as condições de síntese, óxidos de sílica mesoporosa com diferentes estruturas ordenadas em forma hexagonal (denominada MCM-41), cúbica (denominada MCM-48) e lamelar (denominada MCM-50) podem ser formadas (SOUSA, 2006).

Nos últimos 50 anos, com o avanço nas pesquisas realizadas pela comunidade científica, foram sintetizados vários tipos de peneiras moleculares micro e mesoporosas, com composições químicas e estruturais variadas, onde as principais são apresentadas na Figura 1.

**Figura 1 – Principais classes das peneiras moleculares.**



SAPO: Silicoaluminofosfatos; MtALPO: Metaloaluminofosfato.

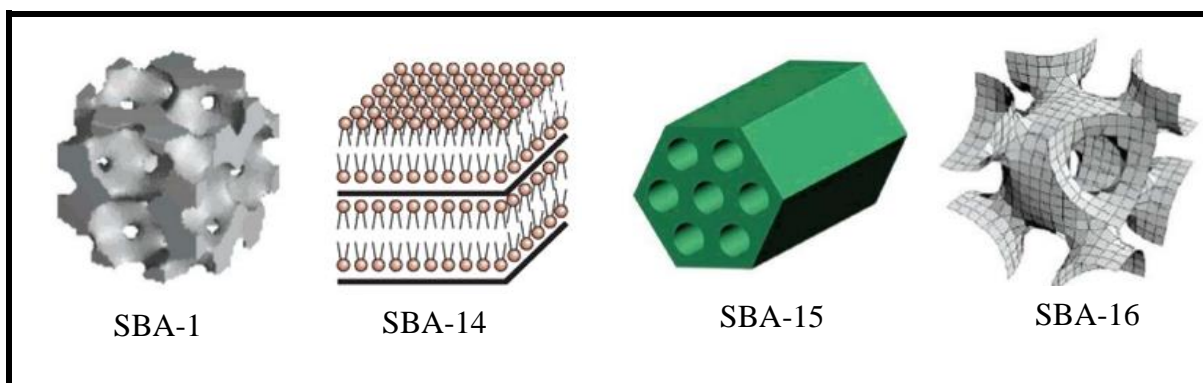
Fonte: AUTORA, 2016.

Tendo como objetivo principal deste trabalho a imobilização de biomoléculas no interior de sólidos, uma pesquisa sistemática foi realizada em torno das peneiras moleculares, de modo a escolher aquela que fornecesse um melhor resultado de imobilização. Após um longo estudo, o material mesoporoso SBA-15 foi escolhido, sendo, este sólido, explicado com maiores detalhes no tópico seguinte.

### **3.2 Material Mesoporoso SBA-15**

A partir da descoberta dos materiais mesoporosos da família M41S, novos sólidos mesoporosos foram sintetizados, expandindo significativamente seus potenciais de aplicação nos mais diversos campos. Em 1998, um novo material mesoporoso com estrutura hexagonal altamente ordenada foi desenvolvido na Universidade de Santa Bárbara, nos Estados Unidos, e denominado SBA (*Santa Barbara Amorphous*) (ZHAO et al., 1998). Uma extensa variedade de materiais SBA's foi reportada na literatura, entre eles SBA-1 (cúbico), SBA-14 (lamelar), SBA-15 (hexagonal) e SBA-16 (cúbico de corpo centrado), Figura 2.

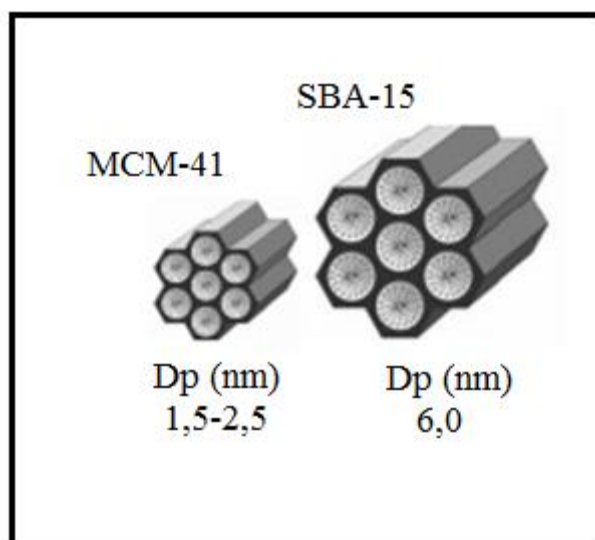
**Figura 2 – Desenho ilustrativo das estruturas do grupo de materiais mesoporosos pertencentes à família SBA.**



Fonte: MARAKATTI, 2013; BECK, et al., 1992.

SBA-15 é uma nova classe de silicato mesoporoso que foi sintetizado primeiramente por Stuck, Margolese e Huo (1998). Essa sílica mesoporosa possui uma rede hexagonal de mesoporos de aproximadamente 6,0 nm de diâmetro e elevada área superficial, em torno de 800 m<sup>2</sup>/g (ZHOLOBENKO et al., 2008). Esse material apresenta elevada estabilidade térmica e hidrotérmica quando comparado aos materiais pertencentes à família M41S, devido a maior espessura das paredes de seus poros, Figura 3.

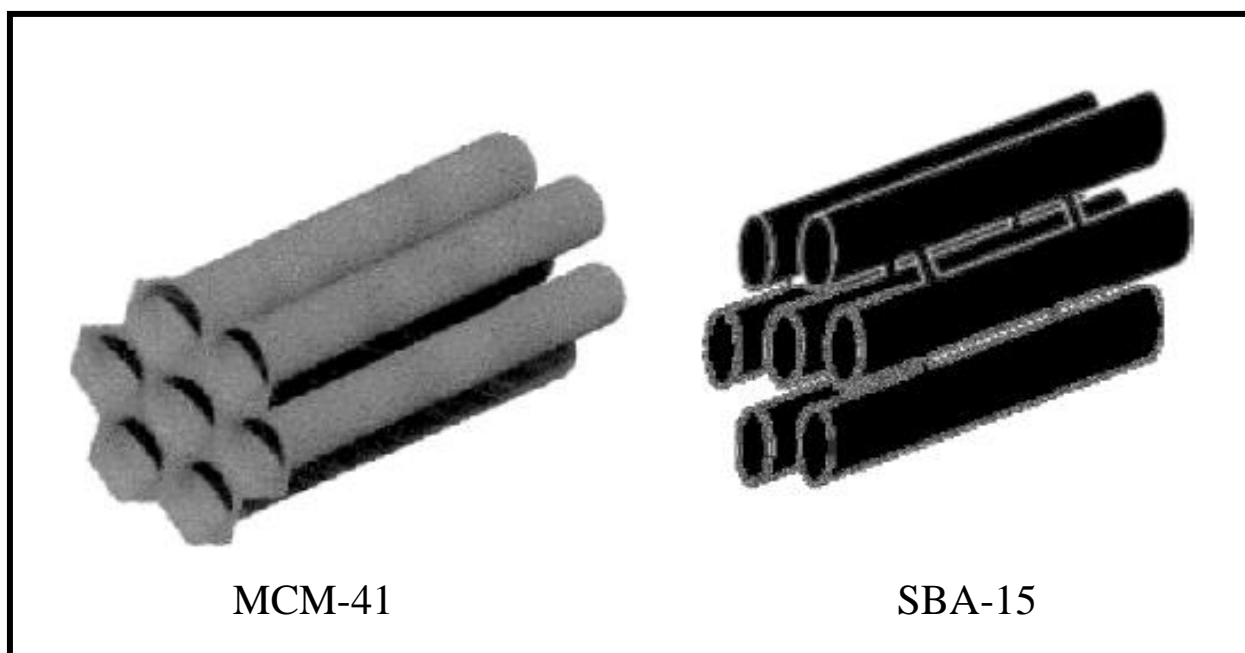
**Figura 3 – Esquema ilustrativo da espessura dos poros do MCM-41 e SBA-15.**



Fonte: ZHOLOBENKO et al., 2008.

A principal diferença entre a família M41S e a SBA é em relação a rota específica utilizada na síntese para a obtenção desses materiais mesoporosos. Para obter os materiais da família M41S, deve-se utilizar a rota básica, ou seja, uma base como agente mineralizante. Já para obter um material mesoporoso da família SBA, faz-se uso da rota ácida, ou seja, um ácido como agente mineralizante. De qualquer forma, existem semelhanças entre os dois grupos de materiais, onde a SBA-1 se assemelha ao material MCM-48 com um arranjo cúbico e a SBA-15 se assemelha a estrutura hexagonal do material MCM-41. No entanto, a diferença entre a SBA-15 e a MCM-41 é que a primeira apresenta microcanais que servem de comunicação entre os mesoporos, Figura 4. Com isso, pode-se dizer que diferente do MCM-41, o SBA-15 pode possuir além dos mesoporos primários, mesoporos secundários e microporos não ordenados entre suas paredes (SENA, 2012).

**Figura 4 – Presença de microcanais na estrutura do SBA-15.**



Fonte: SENA, 2012.

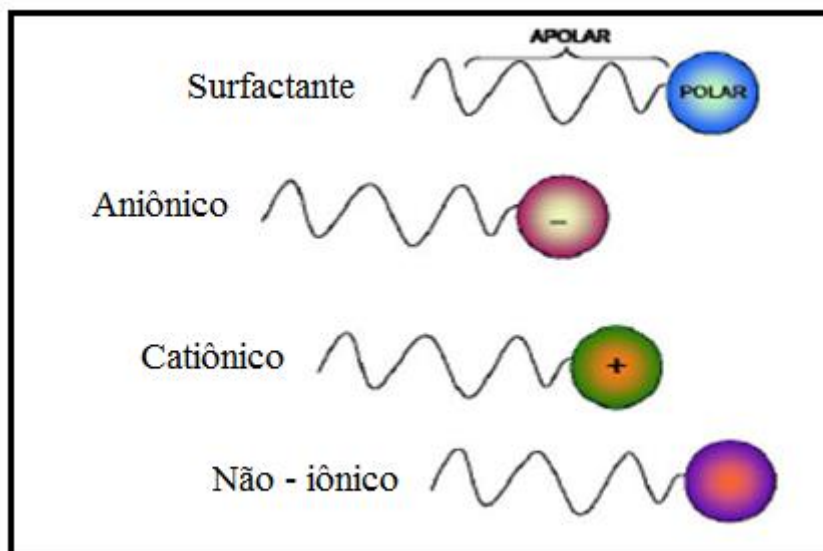
Basicamente, para a síntese de um material mesoporo, tanto da família M41S quanto da família SBA, é necessário uma fonte de sílica e um agente direcionador.

A fonte de sílica serve como unidade de construção das paredes do material mesoporoso, podendo destacar: sílica pirolisada (Aerosil), tetraetilortossilicato (TEOS), silicato de sódio, silicato de tetrametilamônio e a sílica coloidal (CRUZ, 2010).

O agente direcionador ou surfactante é uma molécula orgânica que possui em sua estrutura uma extremidade polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). De acordo com a

parte hidrofílica, os surfactantes podem ser classificados como: aniônicos, catiônicos, anfóteros e não iônicos (PEREIRA, 2010), Figura 5.

**Figura 5 - Tipos de surfactantes.**



Fonte: Adaptado de SENA, 2012.

Os surfactantes *aniônicos* são compostos orgânicos que durante sua dissociação em água formam um ânion com um radical de hidrocarbonetos de cadeia longa. Os surfactantes *catiônicos* são compostos orgânicos que formam cátions em solução aquosa. Os *anfóteros* são substâncias que dependendo do pH da solução e da sua estrutura, podem se comportar tanto como surfactantes aniônicos (altos valores de pH), catiônicos (baixos valores de pH) ou espécies neutras. Os surfactantes *não-iônicos* são substâncias que não formam íons em solução aquosa.

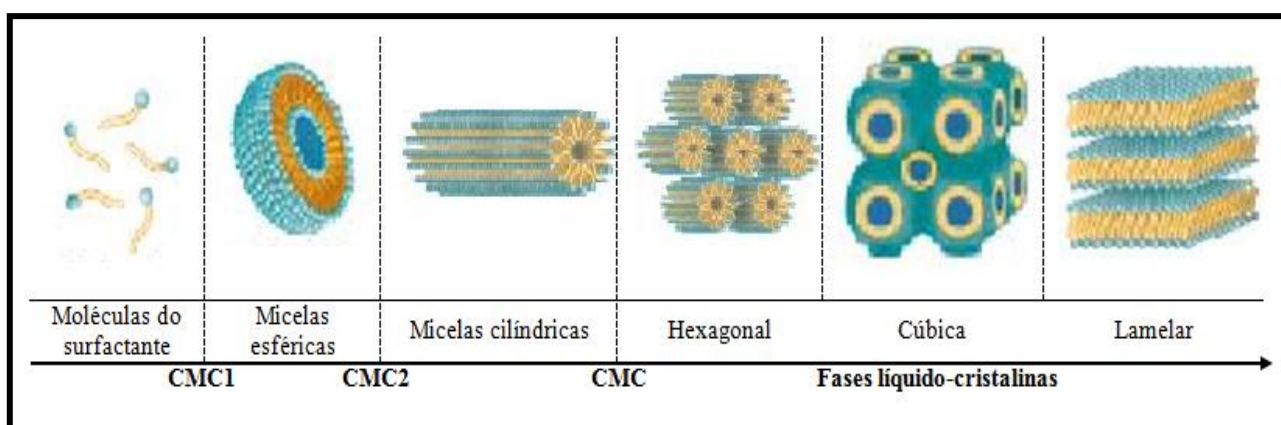
A estrutura de uma molécula de surfactante também pode ser chamada de anfifílica, onde essas moléculas anfifílicas se auto-organizam em uma variedade de estruturas. O surfactante em solução aquosa assume a disposição mais favorável à sua característica bifuncional, agrupando-se de modo que as caudas hidrofóbicas se direcionam para o centro e as extremidades hidrofílicas para a superfície, formando estruturas denominadas micelas.

Micelas são agregados moleculares possuindo ambas as regiões estruturais, hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de uma certa concentração micelar crítica (CMC), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais. Esses agregados coloidais podem apresentar diferentes microestruturas: esférica, cilíndrica, hexagonal, cúbica e lamelar.

Para um sistema binário surfactante-água as moléculas de surfactante atuam como componentes ativos cuja estruturação varia, principalmente, em função da sua concentração. Para valores de baixa concentração, as moléculas de surfactantes encontram-se sob a forma monomérica, ou seja, isoladas. À medida que a concentração aumenta, as moléculas de surfactante tendem a formar agregados de maiores dimensões, as micelas, que correspondem a configurações de energia mínima e permitem diminuir a entropia do sistema. A primeira concentração micelar crítica, CMC1, é definida como a concentração mínima para a qual é observada a formação de micelas esféricas enquanto que a segunda concentração micelar crítica, CMC2, traduz o valor de concentração mínimo para a transformação de micelas esféricas em micelas cilíndricas. Novamente, um aumento progressivo da concentração de surfactante, conduz à conversão das fases isotrópicas anteriormente referidas em fases de cristal líquido com estrutura hexagonal, cúbica ou lamelar, Figura 6 (CHEN et al., 1999; CHOI; YANG, 2003; GALACHO, 2005; XU et al., 2007).

Essas diferentes estruturas que as moléculas de surfactante apresentam não dependem só da concentração, mas também de diferentes parâmetros tais como: comprimento da cadeia hidrofóbica e hidrofílica, pH, temperatura, resistência iônica, etc. Variações nesses parâmetros causam modificações na formação da micela (CHOI; YANG, 2003; SOUSA, 2006).

**Figura 6 - Agregados micelares.**

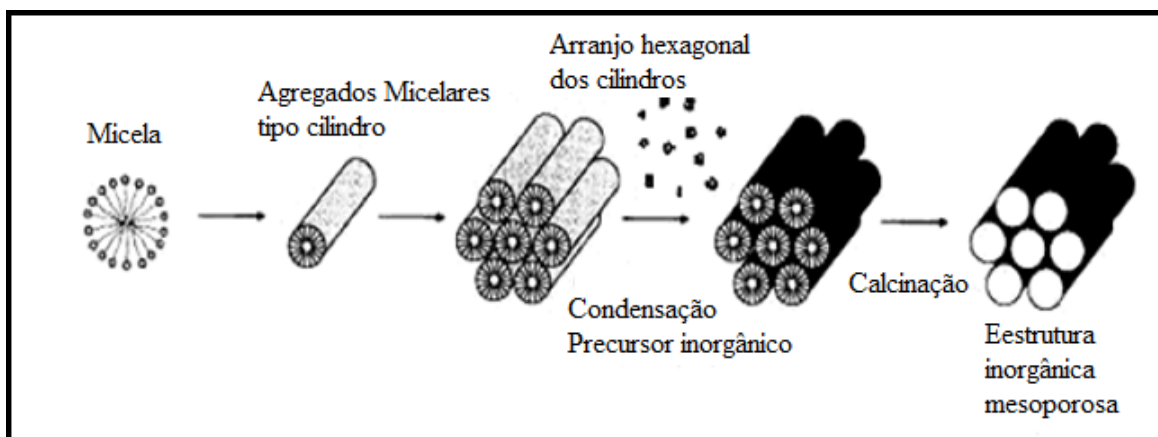


Fonte: SOUSA, 2006.

Muitos modelos foram usados para explicar a formação de materiais mesoporosos e fornecer um fundamento lógico para as várias rotas de síntese existentes. Uma teoria bastante aceita é a qual propõe que os materiais mesoporosos são preparados através do processo sol-gel (CHEN et al., 1999; CHOI; YANG, 2003), com um diferencial que é a utilização dos

surfactantes. Quando as micelas são formadas, ocorre a condensação do precursor inorgânico para formação da estrutura mesoporosa. Em seguida, o direcionador é removido através da calcinação, obtendo os poros no interior do sólido mesoporoso, Figura 7.

**Figura 7 – Esquema da formação da estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura.**



Fonte: RAMAN; ANDERSON; BRINKER, 1996.

Os materiais mesoporos da família SBA são sintetizados em condições fortemente ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) utilizando copolímeros em bloco como agentes direcionadores de estrutura. Os copolímeros em bloco são formados pela combinação de dois ou mais blocos de polímeros unindo cabeça à cauda por interações covalentes (GIDO et al., 1993). Eles possuem uma tendência de se auto-organizar quando dissolvidos em um solvente seletivo, que é um bom solvente para apenas um dos blocos. Dessa forma, micelas de copolímeros em blocos são agregados que possuem propriedades semelhantes às das micelas formadas por surfactantes de baixa massa molar (RAMAN; ANDERSON; BRINKER, 1996).

Em geral, as micelas esféricas de copolímeros em blocos são maiores do que aquelas dos surfactantes de baixa massa molar. Para copolímeros triblocos (por exemplo, EO-PO-EO, onde EO é o óxido de etileno e PO é o óxido de propileno) entre 40 e 50 °C, as micelas esféricas contêm entre 15 e 60 moléculas por agregado, com raio hidrodinâmico na escala de 6 a 10 nm (ALEXANDRIDIS; HATTON, 1995; LOH, 2002). De maneira semelhante aos outros surfactantes, a altas concentrações e temperaturas, são conhecidos outros arranjos para esses copolímeros em blocos. Esses arranjos podem variar de cilíndricos a cúbicos ou hexagonais, lamelares ou outras estruturas (LOH, 2002).

A agregação dos copolímeros pode ser conduzida por mudanças na concentração e temperatura. Com relação ao primeiro passo de agregação, de monômeros a micelas, a

concentração na qual micelas começam a aparecer é de maneira semelhante aos surfactantes comuns. De modo similar, a temperatura na qual micelas são formadas (para uma dada concentração de polímeros) é chamada de temperatura micelar crítica (TMC). Em comparação a outros surfactantes, os copolímeros em bloco têm a peculiaridade de sua CMC e sua atividade superficial depender mais fortemente da temperatura do que aqueles da classe de surfactantes comuns (WANKA; HOFFMANN; ULBRICHT, 1994). As CMC's dos copolímeros em blocos podem variar de diversas ordens de magnitude dentro de uma pequena faixa de temperatura.

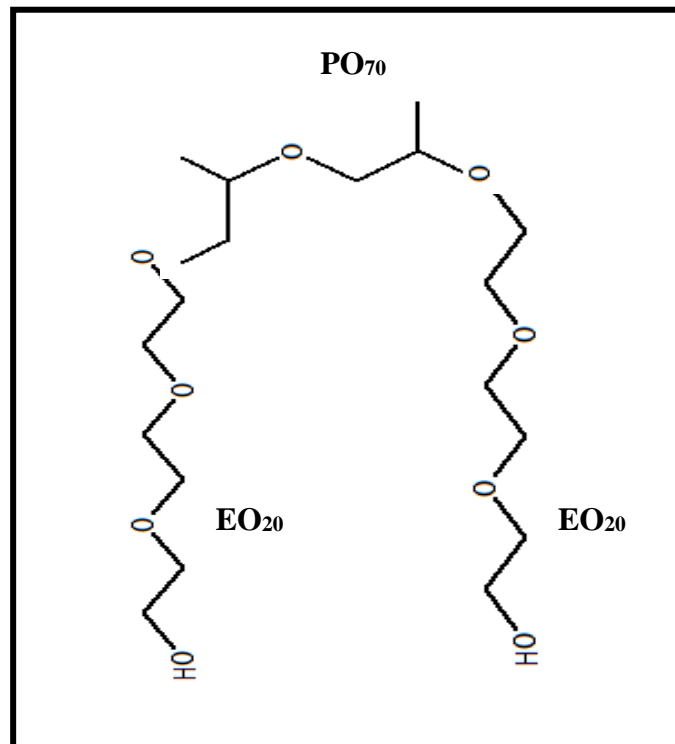
O material mesoporoso SBA-15 é sintetizado a partir do Pluronic P123, como agente surfactante. O Pluronic P123 é formado por um bloco central de poli (óxido de propileno) - PPO - e blocos laterais de poli (óxido de etileno) - PEO -, com fórmula molecular  $PEO_{20}PPO_{70}PEO_{20}$  e massa molar igual a 5800 g/mol. A representação da fórmula estrutural do Pluronic P123 pode ser vista na Figura 8.

Recentemente, a influência da temperatura de envelhecimento na porosidade do SBA-15 foi investigada por Sousa e Sousa (2006). Os autores observaram que temperaturas mais elevadas ( $>100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) conduziam a materiais com diâmetros de poros maiores, paredes de poros mais finas e ausência de microporos. Os autores explicam a ocorrência dessa porosidade como sendo resultado das características do surfactante Pluronic P123 utilizado na síntese do SBA-15.

Galarneau et al. (2003) explicaram a causa da ocorrência de microporos na estrutura do SBA-15 com detalhes. De acordo com os autores, em temperaturas em torno de 35 e 60  $^{\circ}\text{C}$ , interações entre as cadeias PEO das micelas conduzem à formação de microporos, conforme esquema apresentado na Figura 9. Quando a temperatura de síntese é aumentada, a cadeia PEO é parcialmente desidratada, causando alterações nas propriedades da mesofase. A desidratação parcial das moléculas de PEO diminui as interações entre as micelas (que ocorrem por meio das cadeias de PEO), ou seja, as cadeias de PEO aproximam-se das cadeias de PPO da mesma micela, com uma conseqüente diminuição da microporosidade e do aumento no diâmetro dos poros.

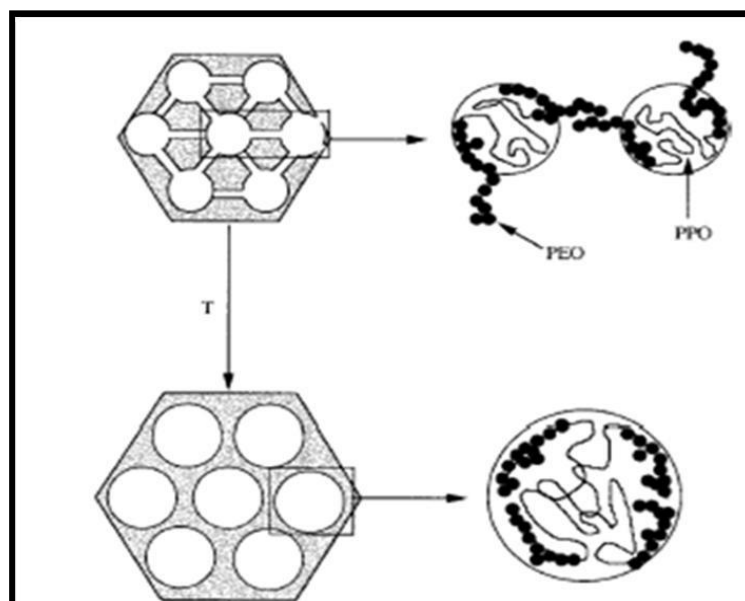


**Figura 8 - Representação da fórmula estrutural do Pluronic P123.**



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2006.

**Figura 9 - Representação esquemática da ocorrência de microporos na estrutura do SBA-15.**



Fonte: GALARNEAU et. al., 2003.

É importante mencionar que apesar de grande parte dos mecanismos apresentados na literatura serem baseados em evidências experimentais, nenhum deles fornece uma resposta definitiva sobre a formação do material mesoporoso SBA-15, uma vez que os sistemas são complicados, pois envolvem espécies complexas e processos de equilíbrio, difusão, nucleação e crescimento. Além disto, tais processos podem ser sensíveis a fatores como temperatura, pH, tempo de reação e concentração, bem como as limitações inerentes a cada técnica experimental. No entanto, alguns autores arriscaram certas teorias que tendem a explicar a formação desses materiais.

Flodstrom et al. (2004), realizou um estudo com medidas de espalhamento e difração de raios X em baixos ângulos usando radiação síncrotron para explicar o mecanismo de formação do SBA-15. Segundo os autores, o modelamento do espalhamento difuso e dos padrões de difração obtidos resultou em uma descrição detalhada dos diferentes estágios de reação, quais sejam: (a) hidrólise do alcóxido; (b) adsorção das espécies de silicato hidrolizadas nas micelas esféricas do Pluronic P123; (c) aglomeração em flocos do híbrido de sílica pouco hidrolizada e micelas; (d) alongamento das micelas e formação paralela de domínios exibindo ordenamento hexagonal e (e) crescimento dos domínios.

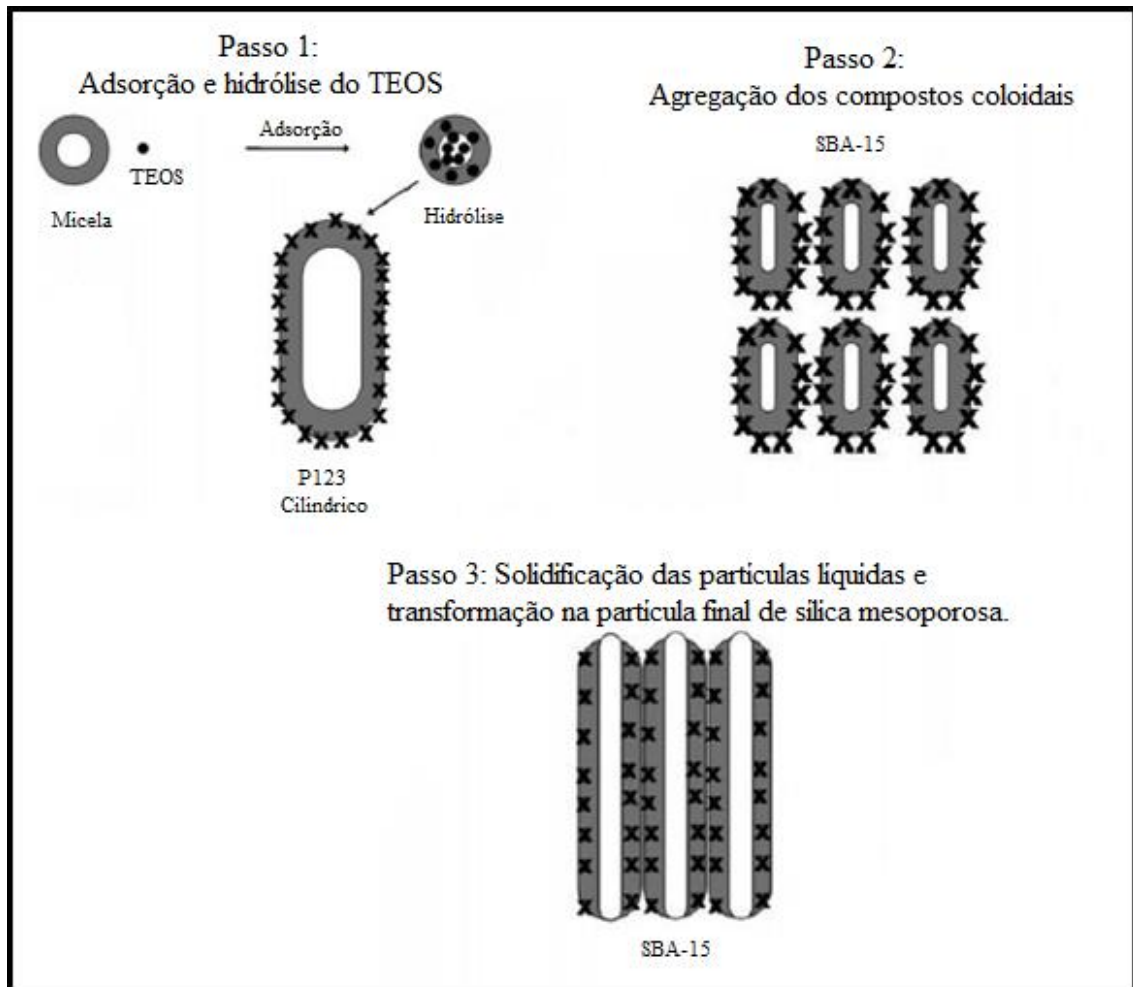
Já Mesa, Sierra e Guth (2008), afirmaram que três passos podem descrever a formação do SBA-15 em meio aquoso, conforme esquematizado na Figura 10.

O Passo 1 refere-se ao revestimento de sílica na superfície das micelas de surfactante; o Passo 2 trata-se da formação de micropartículas líquidas por agregação e fusão dos compostos de colóides (micelas revestidas de sílica) e o Passo 3 é onde ocorre a solidificação das partículas líquidas e transformação na estrutura final de sílica mesoporosa.

Em outras palavras, as unidades monoméricas de sílica, geralmente tetraetilortossilicato (TEOS), usado como precursor, são adsorvidas nas micelas esféricas do surfactante onde sofrem hidrólise. A natureza hidrofílica das espécies silicosas resultantes, favorece a sua migração sobre a superfície das micelas onde começam a policondensar. Isto tem duas conseqüências: o aumento no tamanho das micelas e uma mudança na forma, transformando-se, especialmente sob 70°C, de esférica para cilíndricas com a adição da sílica. A uma dada temperatura, os compostos de colóides irão se agregar e fundir e com o passar do tempo, o número de ligações entre os compostos de colóides agregados aumentam (a taxa de policondensação aumenta com a temperatura e a acidez) e transformam as partículas de líquidos em partículas sólidas. As características finais estruturais e morfológicas do sólido são fortemente dependentes dos parâmetros que definem a mistura de reação durante esse período e sua duração. Em geral, há uma melhoria do arranjo estrutural com o tempo. As características

dos sólidos resultantes dependerão da velocidade de sedimentação (função do tamanho das partículas) e da sua viscosidade (função do grau de policondensação).

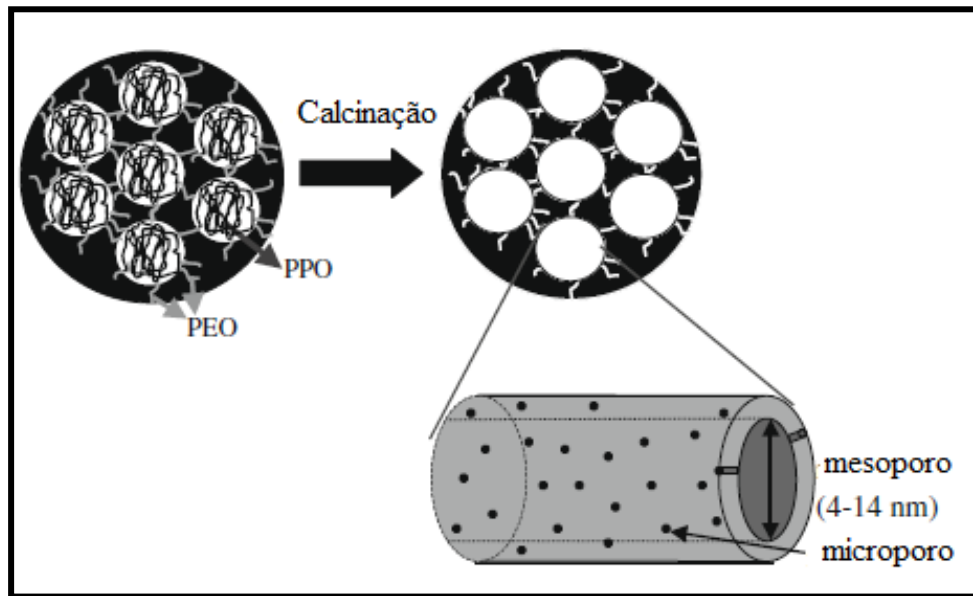
**Figura 10 - Representação esquemática da formação da sílica mesoporosa SBA-15 segundo Mesa, Sierra e Guth (2008).**



Fonte: Adaptado de MESA; SIERRA; GUTH (2008).

Uma etapa importante no processo de síntese consiste na calcinação. A forma e a curvatura dos poros se dão após a decomposição térmica do copolímero P123 realizada na etapa de calcinação do material. Os microporos nas paredes dos mesoporos do SBA-15 são originados após a decomposição da parte óxido de polietileno (PEO) do copolímero enquanto a mesoporosidade é formada pela decomposição da parte óxido polipropileno (PPO), Figura 11 (SENA, 2012).

**Figura 11 - Esquema representativo da estrutura de SBA-15 antes e após a calcinação.**



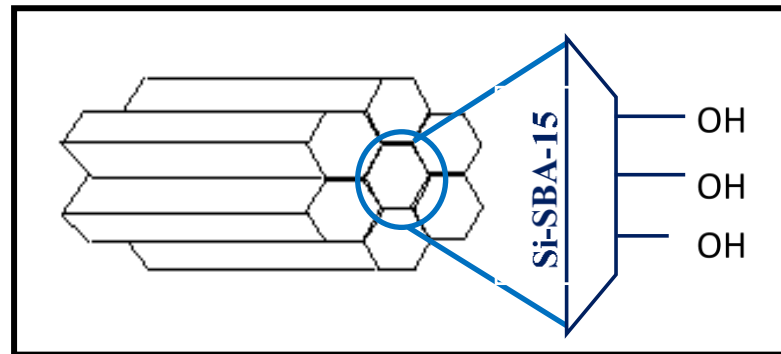
Fonte: SENA, 2012.

### **3.3 Modificação de Superfícies – Funcionalização**

Uma característica relevante do SBA-15 é a presença de uma grande quantidade de grupos silanóis livres ( $\equiv\text{Si-OH}$ ), presentes nas paredes dos poros (MUÑOZ et al., 2003), Figura 12. Aliadas às propriedades estruturais e texturais que o SBA-15 apresenta, ainda é possível funcionalizar sua superfície, tornando o material mais eficiente e seletivo como adsorvente. Dessa forma, uma das grandes vantagens que a sílica mesoporosa proporciona é a versatilidade em adsorver compostos específicos, devido à essa possibilidade de adsorção em sua superfície de diferentes grupos ligantes.

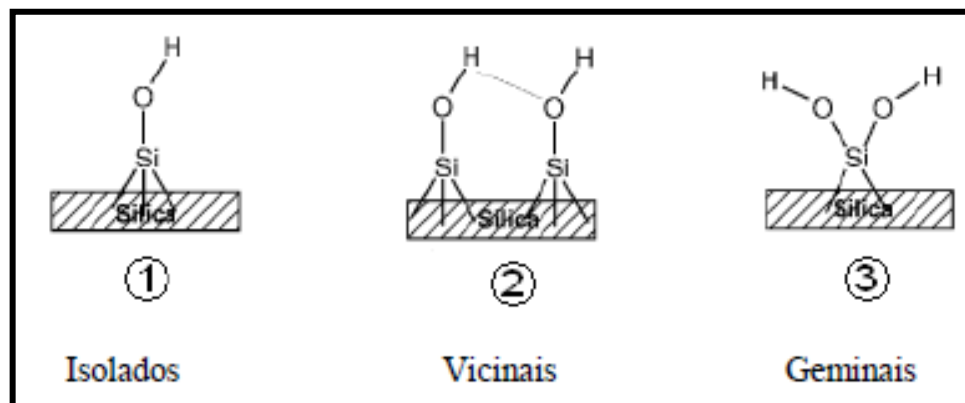
A sílica, em geral, é constituída por unidades tetraédricas  $\text{SiO}_4$  distribuídas aleatoriamente e unidas por pontes de siloxanos ( $\text{Si-O-Si}$ ) em seu interior e com grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ) dispersos, cobrindo toda a superfície, os quais podem ser modificados por diversas reações. Dependendo das posições dos grupos silanóis, eles são denominados isolados, vicinais ou geminais, Figura 13, (XUE; SHI, 2004).

**Figura 12 – Presença de grupos silanóis livres na superfície do SBA-15.**



Fonte: Adaptado de SEVIMLI; YILMAZ, 2012.

**Figura 13 - Disposição dos grupos silanóis na sílica.**



Fonte: XUE; SHI, 2004.

A presença de água na superfície da sílica dificulta a adsorção de reagentes químicos e, conseqüentemente, a imobilização dos mesmos na superfície. Além das moléculas de água ligadas aos grupos silanóis por ligações de hidrogênio, existem moléculas de água ligadas por ligações coordenadas entre o par de elétrons livres do oxigênio e os orbitais “d” vazios do silício, sendo assim, mais fortemente ligadas à superfície (ANDREOTTI, 1989). As moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio à superfície, podem ser removidas por ativação térmica entre 100 e 150 °C, sob vácuo, desta forma os grupos silanóis tornam-se disponíveis para reagir. Além disso, a água deve ser eliminada da superfície para prevenir a hidrólise e polimerização do agente silanizante (NISHIMURA; ASAKURA; IWASAWA, 1986; BOLIS et al., 1991; CIOLA, 1998).

Os grupos silanóis são provenientes da condensação do ácido silícico durante o processo de preparação da sílica gel e concedem característica polar à sílica, sendo responsáveis pela sua capacidade adsortiva. Através da modificação química da superfície da sílica, obtêm-se compostos de maior versatilidade e com propriedades mais refinadas, (relacionada às espécies ligadas à superfície e suas propriedades específicas), com a vantagem do aumento da estabilidade do mesmo em relação à perda por lixiviação (HOFFMANN et al., 2006).

A funcionalização pode utilizar agentes silanos, em que os grupos silanóis da superfície formam uma ligação covalente com esses agentes. O termo sililação refere-se à fixação no suporte de um composto contendo um grupo silano, obtendo assim, compostos silanos organofuncionalizados (VIEIRA; SIMONI; AIROLDI, 1997).

A fórmula geral dos grupos silanos consiste de  $R-(CH_2)_n-Si-X_3$  em que R é o grupo organofuncional,  $(CH_2)_n$  é o grupo de ligação, Si é o átomo de silício e o  $X_3$  corresponde ao grupo passível de sofrer hidrólise. Esse grupo normalmente consiste de grupo alquil, aciloxi, halogênios ou amina (GELEST, 2010).

Em um processo de modificação superficial, o agente funcionalizante de interesse deve apresentar uma efetiva ligação na superfície, de tal maneira que se a matriz estiver envolvida em uma sequência de reações, após atingir a etapa final nesta sequência, a estrutura da matriz deverá permanecer inalterada. Portanto, cuidados especiais devem ser tomados na escolha dos tipos de materiais para que se efetue a funcionalização de forma efetiva. Na maioria das vezes, os métodos utilizados são uma combinação de um ou mais modos de ligação, visando à fixação do substrato na superfície, os quais, basicamente, podem ser descritos como: ligação covalente, em que ocorre um compartilhamento de elétrons entre os átomos, ocorrendo uma atração mútua entre esses, formando uma ligação forte; adsorção, ou seja, a adesão de moléculas de um fluido a uma superfície sólida; e policondensação, em que os monômeros sofrem polimerização devido à existência das reações de condensação (VIEIRA; SIMONI; AIROLDI, 1997).

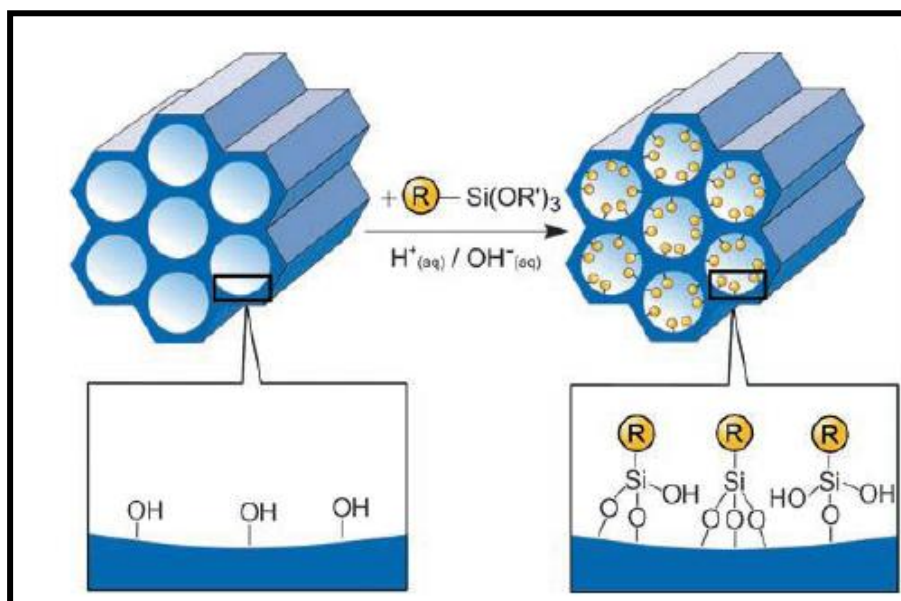
Para a obtenção dos materiais funcionalizados destacam-se dois métodos: a funcionalização pós-síntese da sílica, conhecido também como método do enxerto, e funcionalização pelo método de co-condensação (SEVIMLI; YILMAZ, 2012).

O enxerto refere-se à subsequente modificação da superfície interior da mesoestrutura da sílica com grupos orgânicos. Esse processo ocorre primariamente pela reação do organosilano do tipo  $(R'O)_3SiR$ , com grupos silanóis livres na superfície dos poros, Figura 14.

Em princípio, a funcionalização com uma variedade de grupos orgânicos pode ser realizada desta maneira variando apenas o grupo R. Este método possui a vantagem de reter a mesoestrutura inicial da sílica, considerando que o revestimento das paredes é acompanhado

pela redução da porosidade do material híbrido. Se os organosilanos reagem preferencialmente nas entradas dos poros durante o estágio inicial do processo de síntese, a difusão das moléculas mais afastadas para o centro dos poros pode ser prejudicada, podendo resultar em uma distribuição não homogênea e um baixo grau de ocupação. Em casos extremos, isso pode gerar também a completa obstrução do poro (LIMA, 2010).

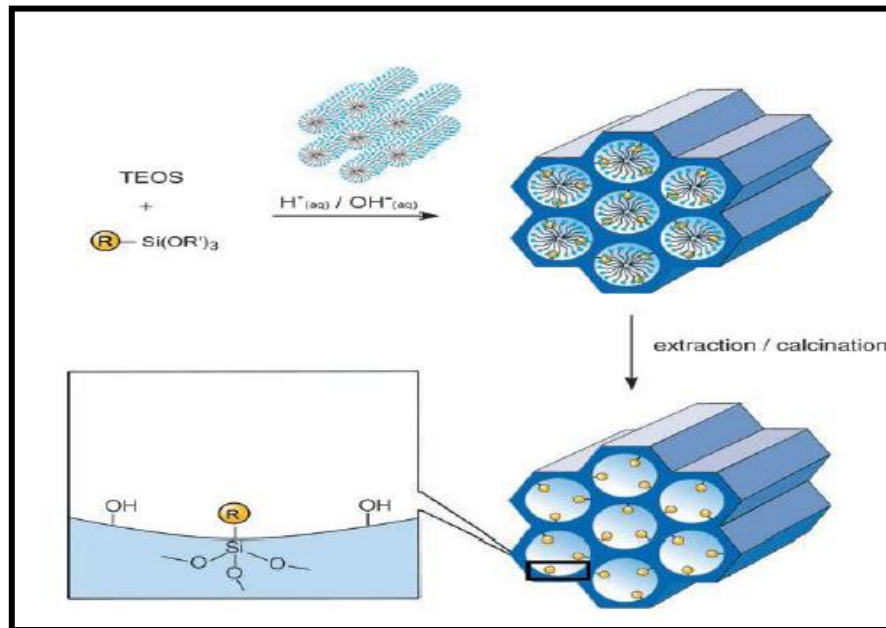
**Figura 14 - Funcionalização pós-síntese para organosilanos terminais do tipo  $(R'O)_3SiR$ , onde R= grupos funcionais orgânicos.**



Fonte: HOFFMANN et al., 2006.

Também é possível preparar mesoestruturas de sílica pela co-condensação de tetraalcoxilano  $[(RO)_4Si]$  (TEOS ou TMOS) com extremidade de triaalcóxiorganosilano do tipo  $(R'O)_3SiR$  em presença do agente direcionador de estrutura com grupos orgânicos ancorados covalentemente na parede dos poros, Figura 15. Desde que os grupos funcionais orgânicos são componentes diretos da matriz de sílica, bloqueio de poros não é um problema neste método. Além disso, as unidades orgânicas são bem mais homogêneas distribuídas (HOFFMANN et al., 2006).

**Figura 15 - Método de co-condensação para funcionalização de sílica mesoporosas, onde R= grupos funcionais orgânicos.**



Fonte: HOFFMANN et al., 2006.

De qualquer modo, a co-condensação também possui desvantagens: em geral, o grau de ordem da mesoestrutura é reduzido com o aumento da concentração do  $(R'O)_3SiR$  na mistura da reação, que basicamente gera produtos desordenados. Conseqüentemente, o teor de grupos funcionais orgânicos nesse método normalmente não ultrapassa 40%. Além disso, há uma fração de grupos orgânicos que são incorporados dentro das paredes de sílica. Essas observações podem ser explicadas pelo fato de que um incremento da proporção de  $(R'O)_3SiR$  na reação favorece uma reação de condensação homogênea. Além disso, um aumento na carga de grupos orgânicos incorporados pode levar a uma redução do diâmetro do poro, volume de poro e área superficial. Esse método também limita o meio utilizado para a remoção do surfactante de dentro da estrutura, pois a calcinação que é comumente usada, também remove os grupos funcionais orgânicos além dos surfactantes (HOFFMANN et al., 2006).

É importante mencionar, também, que o tipo de solvente utilizado no processo de funcionalização pode influenciar de forma significativa o processo. Isso é devido às prováveis interações que podem ocorrer entre a matriz, o solvente e o agente funcionalizante. Dessa forma, é importante ter-se o cuidado na escolha do mesmo, levando em consideração para tanto os parâmetros de solubilidade do solvente e o caráter polar tanto da superfície a ser modificada, quanto do agente funcionalizante (HATA et al., 1999).



Com isso, desde que os vários tipos de materiais mesoporosos ordenados foram sintetizados na presença de surfactantes iônicos, neutros e não iônicos, a funcionalização ou modificação desses materiais tem desempenhado um papel importante em vários aspectos tecnológicos, tais como: melhoria da estabilidade térmica/hidrotérmica, imobilização de moléculas orgânicas, desenvolvimento de novos catalisadores e adsorventes e nanotecnologia. Portanto, vários estudos têm sido direcionados para conferir especificidade química aos sólidos mesoporosos por meio da introdução de moléculas orgânicas. Esses materiais podem ser preparados e modificados com uma grande variedade de combinações de moléculas, diversificando as propriedades do material. A maior versatilidade introduzida, associada às suas novas propriedades, apresenta um grande potencial de aplicações, tais como catálise, imobilização de enzimas, adsorção de metais pesados, confecção de sistemas de liberação controlada de drogas, entre outras (BLANCH; CLARK, 1997; LIU et al., 2003; XUE; SHI, 2004; LUECHINGER; PRINS; PIRNGRUBER, 2005; SEVIMLI; YILMAZ, 2012).

### **3.4 Enzimas**

Enzimas são moléculas quimicamente grandes, reativas com grupos iônicos, hidrofílicos e hidrofóbicos. São grupos de substâncias orgânicas de natureza geralmente protéica, com atividade intracelular ou extracelular que tem funções catalisadoras. A capacidade catalítica das enzimas torna-se adequada para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou alimentar, e uma vantagem é que catalisam sob condições ambientais. As enzimas convertem uma substância chamada substrato para outra chamada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. A velocidade de reação catalisada por uma enzima é aumentada devido à redução de energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. Uma enzima é uma proteína que catalisa ou acelera uma reação biológica. Pode, portanto, ser definida como um biocatalisador, cuja natureza protéica determina algumas propriedades, tais como: especificidade de substrato, dependência da temperatura e pH (CHIBATA, 1978; BOBBIO; BOBBIO, 1995; FABER, 2011).

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de transformação que são capazes de catalisar. De acordo com esse critério, a União Internacional de Bioquímica as dividiu em seis classes, conforme apresentado na Tabela 3 (BLANCH; CLARK, 1997).

**Tabela 3 – Classificação das enzimas.**

<i>Classe</i>	<i>Tipo de Reaçãocatalisada</i>	<i>Exemplos</i>
1. Oxidorredutases	Reações de redução e oxidação por transferência de hidrogênio, oxigênio e/ou elétrons entre moléculas	Desidrogenases, oxidases, oxigenases, peroxidases
2. Transferases	Transferência de determinados grupos orgânicos, tais como amino, acetil, fosforil, glicosil, de determinado doador a um acceptor	Aminoácido transaminases
3. Hidrolases	Clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e outras ligações	Lipases, acilases, nitrilases, amidases, proteases
4. Liases	Clivagem por eliminação (formação de dupla ligação) ou adição a duplas ligações	Aldolases, oxinitrilases, hidroxinitrilalases
5. Isomerases	Catalisam reações de isomerização e racemização	Racemases, glicose isomerase
6. Ligases	Catalisam a junção covalente de duas moléculas à custa de ATP	Sintetases, glicina ligase

Fonte: BLANCH; CLARK, 1997.

Segundo Mariotti (2000), as enzimas são interessantes para diversos fins, pois são produtos naturais biológicos, apresentam um alto grau de especificidade, apresentam mecanismo de “*turnover*” (reutilização), barateando o processo, são altamente eficientes, aceleram a velocidade das reações de 10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> vezes, são econômicas, reduzem a energia de ativação necessária à reação e não são tóxicas.

As enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (DIXON; WEBB, 1979; GALVÃO, 2004).

*Estabilidade:* a capacidade catalítica de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por forças de interação. Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionalidade biológica. Assim, a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

*Atividade:* É dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas. A atividade enzimática pode ser medida com a enzima pura, e em condições tais que permitam que a velocidade da reação seja máxima, o que significa que o

substrato deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda a enzima esteja transformada em um complexo ativado.

*Especificidade:* A especificidade enzimática consiste na capacidade da enzima ser seletiva a ligações, substratos ou grupos de substratos. Se baseia nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional.

Na indústria para a obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial, são empregados catalisadores químicos que são poucos versáteis, exigem altas temperaturas para que a reação atinja razoável velocidade e possuem baixa especificidade, oferecendo assim produtos de composição química mista que requerem uma etapa posterior de purificação. As principais vantagens do uso de enzimas como catalisadores nestas reações são a redução do custo final do processo devido ao consumo menor de energia, redução na formação de subprodutos indesejáveis (elevada especificidade que resulta em maior rendimento do processo), obtenção de produtos biodegradáveis e redução da quantidade de resíduos (KRAJEWSKA, 2004).

Nos processos biológicos, as enzimas são preferíveis a catalisadores químicos, pois são mais seletivos, resulta em um produto mais limpo e tem um maior rendimento, Tabela 4 (MOFFAT et al., 1994).

Neste contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma opção interessante para a exploração de enzimas em diversos tipos de reações. As enzimas utilizadas nos setores industriais são na sua grande maioria produzidas por microorganismos. Estudos acerca da tecnologia enzimática iniciaram durante a década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então, os processos enzimáticos têm sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biosensores, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos entre outras aplicações.

**Tabela 4 - Comparação entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos.**

<i>Características</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Catalisadores Químicos</i>
Especificidade ao substrato	Alta	Baixa
Natureza da estrutura	Complexa	Simples
Sensibilidade à temperatura	Alta	Baixa
Condições de reação	Suaves	Drásticas
Custo de obtenção	Alto	Moderado
Consumo de energia	Baixo	Alto
Formação de subprodutos	Baixa	Alta
Separação catalisador/produto	Difícil e cara*	Simples
Atividade em temperatura ambiente	Alta	Baixa
Presença de cofatores	Sim	Não
Estabilidade	Baixa*	Alta
Energia de ativação	Baixa	Alta
Velocidade de reação	Alta	Baixa

\* enzimas solúveis. Enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas e apresentam alta estabilidade.  
Fonte: ZANIN; MORAES, 2004.

A utilização de enzimas como catalisadores para processos industriais de grande escala é limitado pelo seu alto custo de estabilização em relação ao armazenamento. Durante a utilização, a estabilidade diminui devido a alterações no pH, temperatura, atrito, pressão osmótica e um efeito cumulativo de todos esses fatores em função da duração da sua utilização (ALEKSANYAN; MARKOSYAN, 1986). Enzimas imobilizadas podem ser economicamente vantajosas, o que ocorre quando a imobilização promove um aumento significativo na estabilidade da enzima pela possibilidade de sua reutilização (HERNAIZ; CROUT, 2000).

#### 3.4.1 Invertase

Uma das enzimas com aplicabilidade industrial é a  $\beta$ -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26), conhecida como invertase. É encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae* (sua principal fonte), invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos. A principal fonte de invertase industrial são as leveduras, onde 80% das enzimas são extracelulares e os 20% restantes são intracelulares. Algumas propriedades da invertase

extracelular e intracelular estão apresentadas na Tabela 5 (GÁSCON; NEUMANN; LAMPEN, 1981).

**Tabela 5 - Propriedades da Invertase.**

<i>Propriedades</i>	<i>Invertase</i>	
	<i>Extracelular</i>	<i>Intracelular</i>
Massa molecular (kDa)	270	135
Carboidrato (%)	50	3
Atividade específica (U/mg de proteína)	2700	2900
K <sub>m</sub> [mM] (sacarose)	26	25
pH- estabilidade	3,0 – 7,5	6,0 – 9,0
pH ótimo – atividade	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5

U = micromol sacarose hidrolisado por minuto.

Fonte: GÁSCON; NEUMANN; LAMPEN, 1981.

Invertase de levedura geralmente apresenta uma faixa de estabilidade ao pH que varia de 3,5 a 5,5, podendo ser utilizadas a 65-70 °C se a solução de sacarose for concentrada. Invertase imobilizada pode ser utilizada para a inversão da sacarose em larga escala, com rendimento de 80% quando uma solução a 50% é introduzida em um reator contendo 1 L da enzima imobilizada, com fluxo de 6 L/h, a 40 °C (UHLIG, 1998).

A invertase tem sido estudada principalmente em sua forma imobilizada, diante das vantagens apresentadas pelo método em relação a sua forma solúvel. A invertase imobilizada pode ser usada em biosensores de sacarose, muito importante para indústrias de alimentos e bebidas. A adição de invertase ao suco de fruta promove aumento de teores de glicose e frutose. A hidrólise da sacarose a 40 °C reduz custos de produção quando se utiliza invertase imobilizada, devido à reutilização deste biocatalisador e o uso de um processo contínuo (TOMOTANI; VITOLLO, 2007).

#### 3.4.2 Imobilização de enzimas

Biocatalisadores, enzimas ou células, têm sido amplamente utilizadas em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos, esforços intensivos têm sido empreendidos não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. Apesar destes esforços intensivos, amplamente documentados na forma de publicações técnicas e registros de patentes, poucos processos baseados em técnicas de

imobilização, seja de enzimas ou de células, foram implementados em escala industrial (CANILHA; CARVALHO, 2006).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

A imobilização é um processo que pode ser definido como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (TAMPION; TAMPION, 1988). A imobilização pode ser definida também como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). O uso em processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do biocatalisador são as principais vantagens propiciadas pela imobilização (CANILHA; CARVALHO, 2006).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a utilização de processo contínuo (CANILHA; CARVALHO, 2006).

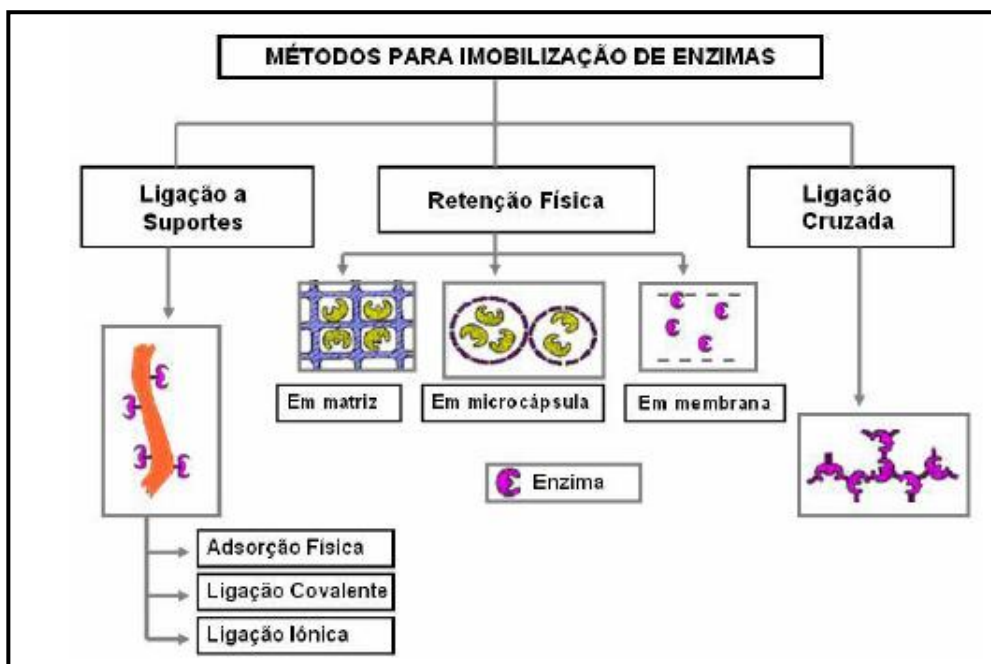
As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens sobre as enzimas livres (BERGAMASCO et al., 2000; AKGOL et al., 2001; GURSEL et al., 2003), tais como:

- Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por serem facilmente controlados;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparada ao uso de enzimas livres;
- Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- Em alguns casos a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;
- Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

As principais desvantagens da imobilização são: a possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização e os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada (BERGAMASCO et al., 2000).

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no aprisionamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (CANTARELLI, 1989), conforme pode ser verificado na Figura 16.

**Figura 16 - Métodos para imobilização de enzimas.**



Fonte: CANTARELLI, 1989.

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em relação à temperatura e a solventes orgânicos (ALEKSANYAN; MARKOSYAN, 1986). Dentre os métodos de imobilização de enzima existentes, as imobilizações por adsorção física e ligação covalente são as mais utilizadas.

### 3.4.2.1 Imobilização por adsorção física

O método de adsorção física é considerado o método de imobilização mais simples e baseia-se na adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, por meio de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Este

método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima, porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização (CHIBATA, 1978).

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e após um tempo de contato, é feita a separação do suporte imobilizado da solução em que ele se encontra, por centrifugação ou filtração. A atividade da enzima imobilizada aumenta com a concentração da enzima, aproximando a um valor de saturação a altas concentrações de enzimas. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica, concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para uma máxima adsorção e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima. A maior desvantagem desse método é a ligação fraca entre enzima-suporte e a preocupação com as condições de temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente estar ou não em condições ótimas para não haver dessorção da enzima durante sua utilização (GURSEL et al., 2003).

#### 3.4.2.2 Imobilização por ligações covalentes

Imobilização de enzimas por ligação covalente é o método mais interessante para a indústria (ARROYO, 1998). Este método de imobilização consiste na retenção da enzima na superfície do suporte pela formação de ligações covalentes. As moléculas de enzima se ligam ao suporte através de certos grupos funcionais, tais como amino, carboxila, hidroxila, e grupos sulfidrilos. Muitas vezes, é aconselhável realizar a imobilização na presença do seu substrato ou um inibidor competitivo com o objetivo de proteger os sítios ativos (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

A seleção das condições para imobilização por ligação covalente é mais difícil do que em outros métodos de ligação enzima-suporte. Para alcançar eficiente ligação à funcionalidade do suporte e da enzima, deve-se fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Os grupos funcionais do suporte são geralmente ativados utilizando reagentes químicos, tais como, brometo de cianogênio, carbodiimida e glutaraldeído (GURSEL et al., 2003).

As condições de reação requeridas para a formação dessas ligações geralmente não são brandas. Em alguns casos, a ligação altera a estrutura conformacional da enzima e o centro ativo da mesma, resultando em diminuição da atividade e mudança de especificidade de substrato. Por outro lado, como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, e assim pode influir na alta resistência a temperaturas, a agentes



desnaturantes e a solventes orgânicos em geral. A extensão disso depende das condições do sistema, da natureza da enzima e do tipo de suporte (CHIBATA, 1978; GURSEL et al., 2003).

A grande variedade de processos covalentes de imobilização e de matrizes com grupos químicos capazes de participarem diretamente ou serem ativados para formar as ligações, faz desse método uma aplicação quase geral. A maior dificuldade é o conhecimento da estrutura da enzima, o que dificulta o estabelecimento de uma regra geral para a imobilização. Dentre os 20 aminoácidos encontrados na estrutura protéica da enzima, os mais reativos para a formação da ligação covalente com o suporte são lisina, cisteína, tirosina e histidina (ARROYO, 1998).

A maioria dos grupos reativos utilizados para imobilização de proteínas (glutaraldeído, brometo de cianogênio, etc.) são capazes de promover ligações enzima-suporte estáveis, proporcionando que a enzima se fixe ao suporte sob condições de imobilização brandas. O elevado grau de reatividade desses grupos os torna muito instáveis a valores de pH alcalino, em que a reatividade dos resíduos pode ser mais adequada para a reação. Desta forma, as enzimas devem ser principalmente imobilizadas através do grupo amino terminal quando se utiliza esses suportes a valores de pH neutros (MATEO et al., 2005).

### 3.4.3 Suportes para imobilização

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas em função dos princípios de imobilização. O desenvolvimento de novos suportes para a imobilização de biocatalisadores, juntamente com as técnicas elaboradas especificamente para a imobilização nestes suportes, tem sido objeto de intenso estudo nos últimos anos. Estima-se que estes novos suportes e técnicas possam contribuir para a implementação de novos processos em escala industrial.

Como exemplos, podem ser citados o uso de membranas catalíticas biofuncionais contendo arranjos enzimáticos imobilizados através de sítios específicos (BUTTERFIELD et al., 2001), o uso de Eupergit C como um suporte de imobilização para enzimas de interesse industrial (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000) e o uso de criogéis de poli-vinil-álcool como matrizes para a imobilização de células (MESSING, 1978).

Os materiais mais utilizados como suporte deveriam idealmente ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, resultar em baixo custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala, não apresentar toxicidade às células, apresentar alta capacidade de retenção e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional (NAGASHIMA, 1984; PRADELLA, 2001).

Vários suportes, naturais ou sintéticos, têm sido utilizados para a imobilização de enzimas. Embora se saiba que não existe um suporte universal, existem características primordiais a serem observados para a escolha de um suporte, baseados em diferentes propriedades que afetam o processo de produção (MESSING, 1978; GALVÃO, 2004; CAO, 2005), como:

- *Área de superfície e porosidade:* é desejável ter materiais com alta área superficial ( $>100 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) para cargas de enzima altas e alta porosidade para promover o acesso da enzima ao substrato. Os poros  $>30 \text{ nm}$  são ideais para a difusão da enzima durante o processo de imobilização;
- *Grupos funcionais na superfície:* a quantidade de enzima que se une à matriz de um suporte depende da densidade de carga de grupos funcionais na superfície e sua distribuição. A escolha dos grupos funcionais, também afeta o rendimento e a estabilidade do material;
- *Estabilidade mecânica e química:* para prevenir a perda de enzimas, a integridade do suporte deve ser mantida e deve ser resistente a degradações químicas que possam ocorrer durante o processo;
- *Tamanho e forma:* é ideal ter partículas de tamanho uniforme, preferencialmente esferas para facilitar os propósitos de modelagem;
- *Resistência microbiana:* uma das principais preocupações de qualquer sistema de enzimas imobilizadas é a presença de micro-organismos. A durabilidade do suporte é afetada pela resistência à degradação microbiana;
- *Natureza hidrofóbica e hidrofílica:* a compatibilidade do suporte com a fase líquida é importante para assegurar a troca do substrato e do produto na matriz. Também pode determinar o tempo de vida do complexo enzima-suporte a partir da adsorção ou de ligações não específicas.

Os materiais utilizados como suportes podem ser porosos (sílica e alumina), não porosos (vidro e nylon) ou apresentar estrutura de gel (géis de agarose). Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protege a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas elimina o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido. Quanto aos géis, estes são utilizados nos casos em que a grade formada seja de tamanho suficiente de modo a reter a proteína sem ocasionar restrições difusionais (GALVÃO, 2004).

Os suportes porosos são mais adequados para o uso em reatores industriais, por permitirem acomodação de alta carga de enzimas. Eles podem apresentar uma distribuição controlada de poros uniformes ou não. Com a distribuição de poros aleatória, somente uma fração destes estará disponível para acomodar as enzimas. Suportes com distribuição controlada de poros são totalmente disponíveis para a imobilização, com um amplo intervalo de diâmetros de poros (COUTINHO FILHO; RIBEIRO; MAUGERI FILHO, 2005).

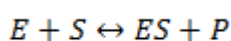
O material do suporte deve ser efetivamente inerte, conter um grande número de sítios para a imobilização da enzima e impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação. A possibilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser considerada na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada. Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados) (ZANIN; MORAES, 2004).

Para o uso industrial, os suportes inorgânicos são mais adequados por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque de micro-organismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas são obtidas com matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos em suportes orgânicos (ROSEVEAR; KENNEDY; CABRAL, 1987).

#### 3.4.4 Cinética enzimática

O estudo da velocidade das reações enzimáticas ou cinética enzimática envolve informações indiretas sobre o mecanismo de ação catalítica, especificidade das enzimas, fatores que afetam a velocidade das reações e a determinação quantitativa de seus efeitos. Apesar de catalisarem uma grande variedade de reações por diferentes mecanismos, as enzimas podem ser analisadas quanto as suas velocidades para quantificar as suas eficiências.

Quando o substrato [S] se liga ao sítio ativo de uma enzima [E], um *complexo enzima-substrato* [ES] é formado em processo rápido e reversível antes da formação do produto [P]. Após um breve tempo, o produto se dissocia da enzima conforme o mecanismo abaixo (DIXON; WEBB, 1979; ARROYO, 1998; UHLIG, 1998).



Em 1913, o químico Michaelis e sua aluna Menten descreveram a relação quantitativa entre a velocidade de reação enzimática e a concentração do substrato, conhecida como *Cinética de Michaelis-Menten*. Segundo Michaelis e Menten (1913), as reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade de reação ( $v_0$ ) não indica uma resposta linear face ao aumento de substrato, Figura 17.

À medida em que se aumenta a concentração de substrato no meio, a velocidade da reação tende a aumentar até a saturação da enzima, atingindo a velocidade máxima de reação,  $V_{máx}$ . Na velocidade máxima, todos os centros ativos estão ocupados (saturados) com substrato, ou seja, não existe enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo [ES] é igual à concentração de enzima, Figura 18.

De acordo com Michaelis-Menten, é possível saber se uma enzima tem afinidade pelo substrato através do cálculo da constante  $K_m$ , também conhecida como *constante Michaelis-Menten*. O  $K_m$  é equivalente a concentração de substrato necessária para atingir a metade da velocidade máxima da reação ( $V_{máx}$ ) e demonstra a força de ligação de um substrato a uma enzima. Valores baixos de  $K_m$  refletem uma grande afinidade da enzima pelo substrato, possibilitando obter taxas elevadas de reação, mesmo com baixas concentrações de substrato (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

**Figura 17 – Gráfico que relaciona velocidade da reação com a concentração de substrato.**

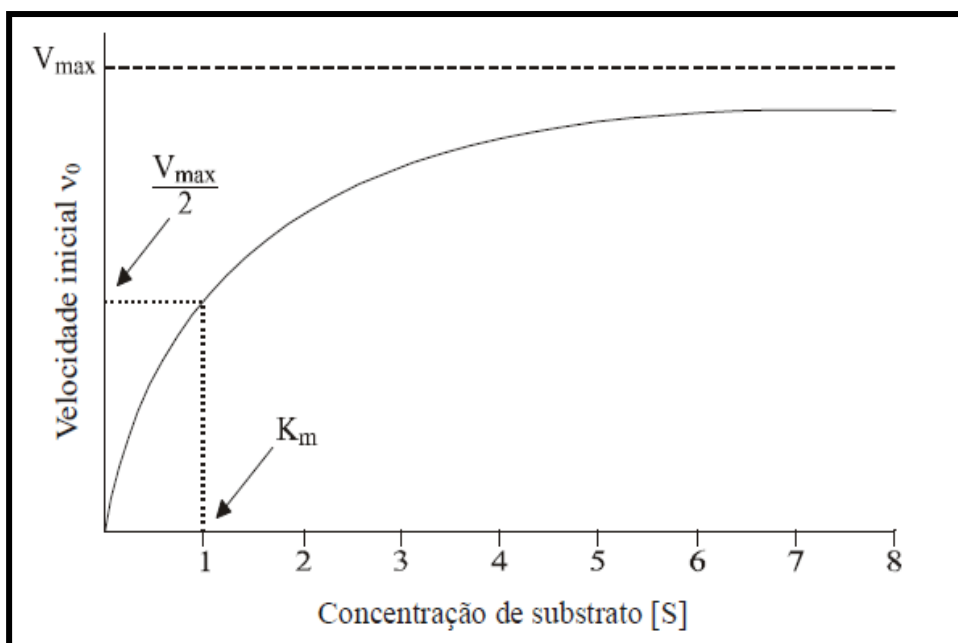
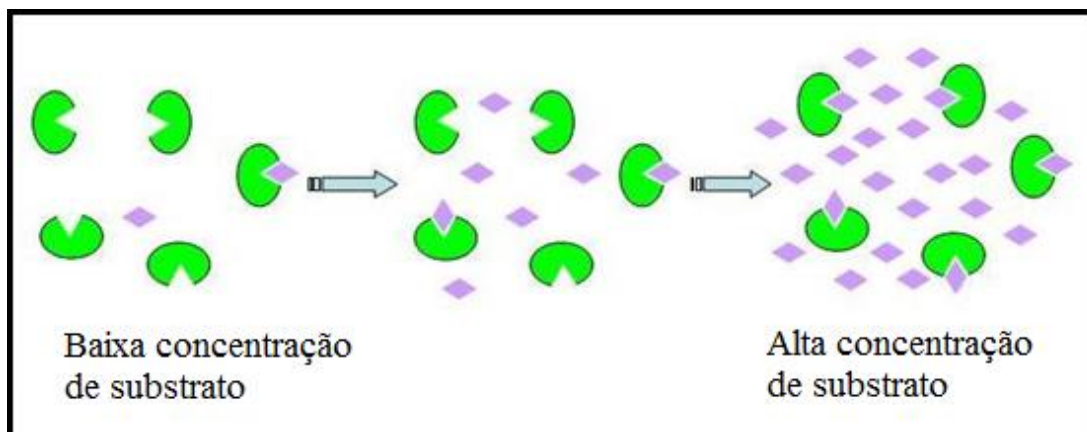


Figura 18 – Complexo enzima-substrato.



Fonte: SANTOS, 2010.

Além da  $V_{máx}$  e  $K_m$ , outra constante catalítica de importância é a  $K_{cat}$ , também conhecida como número de reciclagem ou *turnover number*. O  $K_{cat}$  representa o número de moléculas de substrato convertidas em produto por segundo por molécula de enzima (ou por mol de sítio ativo nas enzimas oligoméricas) sob condições de saturação. Em outras palavras, o  $K_{cat}$  indica o número máximo de moléculas convertidas em produto por segundo por cada sítio ativo. Em estudos de enzimas imobilizadas em suportes, essa constante é bastante utilizada de modo a determinar a eficiência catalítica do biocatalisador.

A relação entre a eficiência catalítica da enzima,  $K_{cat}$ , com a sua afinidade pelo substrato,  $K_m$ , fornece a chamada constante de especificidade,  $K_{cat}/K_m$ . A relação  $K_{cat}/K_m$  é, em geral, o melhor parâmetro cinético para comparações de eficiência catalítica entre diferentes enzimas. Valores baixos da relação indicam pouca afinidade da enzima pelo substrato (MICHAELIS; MENTEN, 1913; MOTTA, 2011).

Dessa forma, de modo a avaliar qual suporte possui uma melhor ligação com a enzima invertase, foram calculados os valores dessas constantes ( $K_m$ ,  $K_{cat}$  e  $K_{cat}/K_m$ ), podendo assim, comparar os resultados e determinar qual o melhor biocatalisador obtido nesse trabalho.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo é sintetizar o material mesoporoso SBA-15 visando sua utilização para a imobilização de biomoléculas. Esta imobilização foi realizada através da introdução de moléculas contendo grupos funcionais orgânicos capazes de conferir propriedades hidrofóbicas a superfície, permitindo a ancoragem de biomoléculas, afim de avaliar qual suporte tem melhor afinidade com a enzima em estudo.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Preparação da matriz mesoporosa SBA-15 à base de sílica utilizando TEOS e copolímero tri bloco, P123, como surfactante (direcionador estrutural);
- Modificação da superfície destes materiais pela introdução de funcionalidades orgânicas: trimetoxifenilsilano (TMOS), viniltrimetoxisilano (VMOS) e  $\gamma$ -aminopropiltrimetoxisilano (APTES), por processo pós-síntese;
- Caracterização dos materiais sintetizados através de espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), análise térmica (TG/DTG), adsorção de nitrogênio (BET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Imobilização por ligação covalente da enzima invertase sobre as matrizes silicosas mesoporosas contendo funcionalidades orgânicas;
- Avaliação da atividade biocatalítica da enzima imobilizada sobre as matrizes silicosas mesoporosas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

### 5.1 Síntese do material mesoporoso SBA-15

#### 5.1.1 Reagentes necessários

- *Direcionador*: Pluronic P123 (Sigma-Aldrich);
- *Agente mineralizante*: Ácido clorídrico (HCl) 37%;
- *Fonte de sílica*: Tetraetilortossilicato (TEOS) Sigma-Aldrich 98%.

#### 5.1.2 Procedimento

O material mesoporoso SBA-15 foi preparado de acordo com a metodologia proposta por Zhao et al., (1998), usando o surfactante poli[(etileno glicol)-co-poli(propileno glicol)-co-poli(etileno glicol)] – Pluronic P123 ( $MM = 5800 \text{ g.mol}^{-1}$ ) como agente direcionador de estrutura.

Em um recipiente cilíndrico de politetrafluoretileno (Teflon), de aproximadamente 500 mL de volume, iniciou-se a preparação do SBA-15 com 4,0 g de Pluronic P123 em 130 mL de água destilada e em meio ácido (19,3mL HCl 37%). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura constante de 40 °C em banho-maria até a completa dissolução do surfactante. A esta solução foi adicionado 9,4 mL de tetraetilortossilicato (TEOS, Sigma-Adrich) sob agitação. Logo após a adição do TEOS, o recipiente de teflon foi fechado e mantido a 40 °C em banho-maria por 24 horas. A mistura final foi aquecida por mais 24 horas em estufa (Modelo 400-2, Ethik Technology) a 100 °C. Após o tratamento térmico (envelhecimento), a mistura foi filtrada e o material obtido na forma de pó fino e branco foi secado à vácuo a 60 °C. Para remoção do surfactante, o material foi calcinado sob fluxo de ar numa temperatura de 550 °C durante 6 horas com uma taxa de aquecimento de 2 °C/min.

Segundo Figueiredo e Melo (2011), o rendimento em sólidos de uma síntese pode ser calculado por meio da equação 1:

$$R = \frac{m_{\text{Sólido Obtido}}}{m_{\text{Sólido Teórico}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$m_{\text{Sólido Obtido}}$  = massa de material sólido seco recuperado por filtração após a síntese;

$m_{\text{Sólido Teórico}}$  = soma das massas teórica dos materiais pesados presentes no gel;

## 5.2 Funcionalização da superfície do SBA-15 com agentes silanos

### 5.2.1 Reagentes necessários

- *Agentes Silanos*: Trimetoxifenilsilano, TMOS; Viniltrimetoxisilano – VMOS,  $\gamma$ -aminopropiltriethoxisilano – APTES;
- Tolueno;
- SBA-15 calcinado.

### 5.2.2 Procedimento

As moléculas contendo grupos silanos utilizadas nesse trabalho foram selecionadas de forma que diferentes radicais orgânicos fossem ligados ao átomo de silício central. Com base nisso, espera-se variações na interação destes compostos com a superfície do SBA-15. Outro fator decisivo na escolha dessas moléculas foi a escassez de trabalhos publicados empregando esses compostos como modificadores de superfície.

Dentre as técnicas existentes de modificação de superfície, o método pós-síntese foi o escolhido por não promover modificações significativas nas partículas de SBA-15 (CIESLA; SCHUTH, 1999). O processo consistiu da reação entre o SBA-15 calcinado e os agentes modificadores.

O SBA-15 foi modificado superficialmente através do ancoramento de cadeias de hidrocarbonetos na superfície. O processo consistiu da reação entre o SBA-15 calcinado e 3(três) diferentes alcoxisilanos: TMOS, VMOS e APTES, conforme mostrado na Tabela 6.



**Tabela 6 - Fórmulas moleculares e estruturais e peso molecular dos grupos silanos.**

<i>Alcoxisilano</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Fórmula Estrutural</i>	<i>Peso Molecular (g/mol)</i>
Trimetoxifenilsilano	$C_9H_{14}O_3Si$	$C_6H_5Si(OCH_3)_3$	198,29
Viniltrimetoxisilano	$C_5H_{12}O_3Si$	$H_2C=CHSi(OCH_3)_3$	148,23
$\gamma$ – aminopropiltriethoxisilano	$C_9H_{23}NO_3Si$	$H_2N(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$	179,29

Fonte: AUTORA, 2016.

Antes de iniciar a etapa de modificação da superfície do sólido mesoporoso, deve-se realizar um estudo bastante criterioso de modo a escolher o melhor solvente a ser utilizado e a quantidade de agentes funcionalizantes necessária para cobrir toda a área do material sintetizado. Baseado em estudos da literatura, o solvente escolhido nessa fase foi o tolueno devido ao favorecimento da ligação desses agentes com a superfície do suporte. A quantidade de agentes funcionalizantes a ser pesada foi determinada a partir de cálculos baseados na área superficial específica do suporte SBA-15, de modo a formar uma monocamada do agente de modificação sobre a superfície desse material, conforme demonstrado no Apêndice A.

O processo de modificação foi iniciado pela dissolução de 7,47 mmoles dos agentes modificadores em uma suspensão formada pela adição de 1 g de SBA-15 em 50 mL de tolueno. Em seguida, o sistema foi aquecido a 70 °C por 24 h a 80 rpm em um agitador orbital. Passado as 24 h, a mistura foi filtrada e o material obtido foi secado à vácuo a 60 °C.

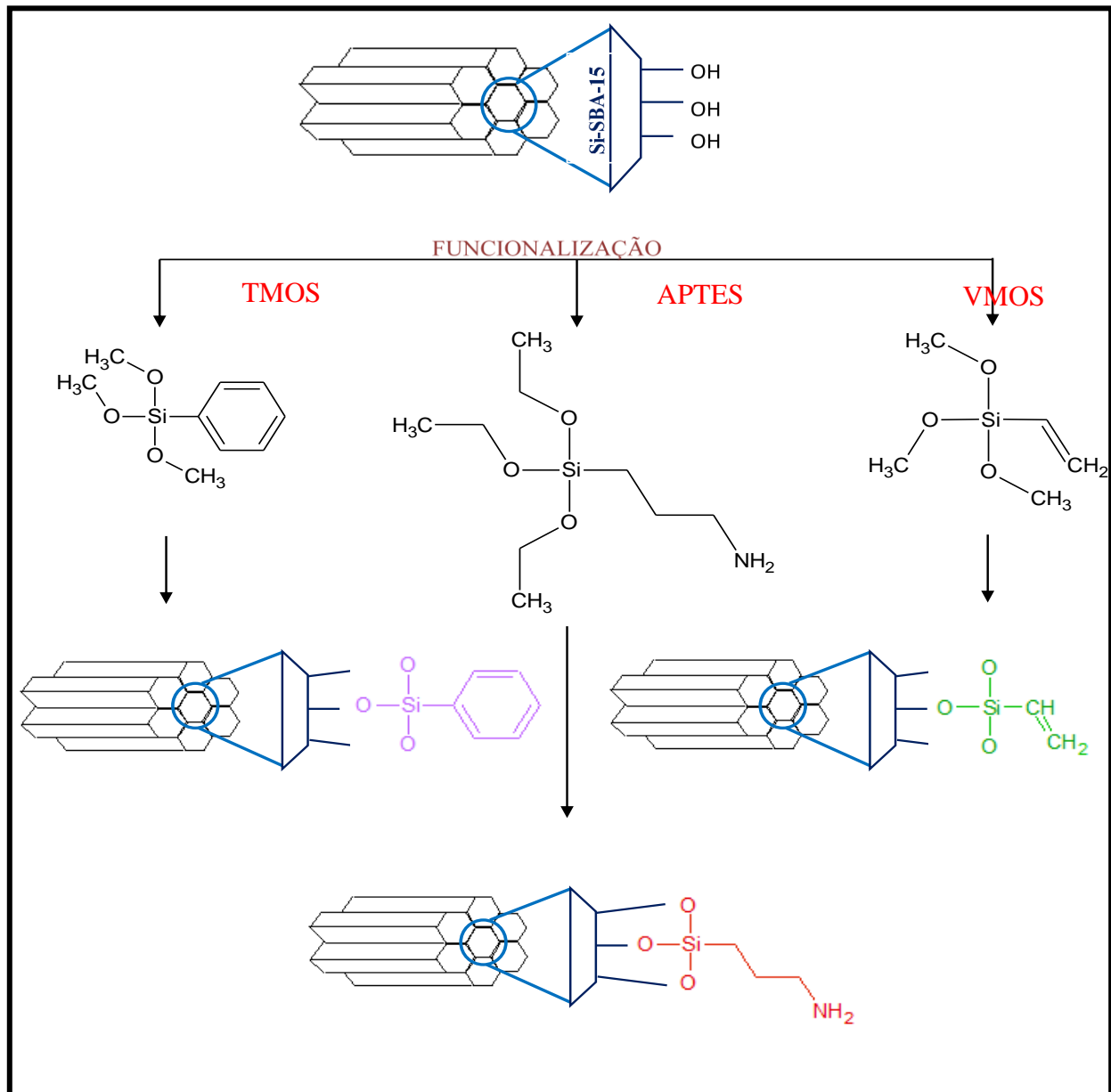
O processo de modificação do SBA-15 com os diferentes agentes silanos é mostrado esquematicamente na Figura 19.

### 5.3 Caracterização dos Materiais

Os catalisadores com as superfícies funcionalizadas foram caracterizados através das seguintes técnicas:

- Análise Térmica (TG/DTG);
- Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Adsorção de  $N_2$  (método de BET) e,
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

**Figura 19 - Esquema de modificação do SBA-15 com os diferentes agentes silanos.**



Fonte: Adaptado de SEVIMLI; YILMAZ, 2012.

### 5.3.1 Análise Térmica (TG/DTG)

Na análise térmica ou termogravimetria a variação da massa da amostra (perda ou ganho de massa) é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura.

As mudanças de massa da amostra são monitoradas através de uma termobalança que permite a pesagem contínua da amostra em função da temperatura, à proporção que a mesma está sendo aquecida ou resfriada (GIOLITO; IONASHIRO, 1988). Os resultados são apresentados em formas de curvas termogravimétricas, nas quais se observa a modificação de massa em função da temperatura ou do tempo.

A curva termogravimétrica derivada (DTG) é a primeira derivada da curva TG. Na DTG a variação da massa em relação ao tempo,  $dm/dt$ , é medida como uma função do tempo, ou ainda a variação de massa com a temperatura,  $dm/dT$ , é registrada como uma função da temperatura (MOURA, 2001).

Na curva DTG são obtidos picos cujas áreas são proporcionais à variação de massa total da amostra. A curva DTG traz as mesmas informações que a TG, porém é possível separar reações sobrepostas. Pode-se então obter as temperaturas correspondentes ao início e ao final da reação com maior exatidão e também calcular a variação de massa no caso de sobreposição de reações (VOGEL, 1984).

A análise térmica foi utilizada, neste trabalho, para verificar o comportamento térmico do SBA-15 antes e depois do processo de modificação. O equipamento utilizado para estas medidas foi a termobalança Shimadzu DTG 60H, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min desde a temperatura ambiente até 900 °C, sob atmosfera dinâmica de ar sintético com vazão de 50 mL/min. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de platina de 70 µL e massa de aproximadamente 14 mg.

### 5.3.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

É uma das técnicas mais comuns de caracterização existentes onde permite caracterizar uma larga faixa de compostos inorgânicos e orgânicos. A técnica se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico.

As análises de FTIR foram realizadas num espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige-21, onde os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio na faixa de 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas de KBr como agente dispersante para a preparação da amostra. As pastilhas foram obtidas pela razão KBr/SBA-15=167, homogeneizadas em um almofariz.

### 5.3.3 Adsorção de Nitrogênio (BET)

A adsorção pode ser enunciada, de maneira bastante simplificada, como um processo na qual uma substância gasosa, líquida ou sólida fica presa à superfície de um sólido (SKOOG et al., 2008). De uma forma mais específica, pode caracterizar a adsorção como a variação da concentração de uma substância em uma interface, sendo que o espaço de interface é uma medida arbitrária da região limite entre duas substâncias não-miscíveis. Quando a concentração de uma substância aumenta em uma interface, ocorre o que se denomina de adsorção positiva; quando a concentração desta substância diminui na região de interface, tem-se uma adsorção negativa. Porém, costuma-se tratar o fenômeno de adsorção apenas nos casos de adsorção positiva (NETZ; ORTEGA, 2002). A substância que sofre o aumento de concentração sobre a superfície da fase condensada é chamada de *adsorbato*. Já a fase condensada, na superfície da qual ocorre o processo, é chamada de *adsorvente*.

A técnica de adsorção de nitrogênio analisa as propriedades texturais dos materiais, área superficial, volume, tamanho, distribuição e geometria do poro. Essa técnica também revela a medida da área superficial que está relacionada com a micro, meso e macroporosidade.

Um dos métodos mais comuns de determinação da área específica de um sólido se baseia na determinação da quantidade necessária de um adsorbato para formar uma monocamada sobre a superfície a ser medida. Os adsorvatos normalmente utilizados para esse fim são o nitrogênio e o argônio (SKOOG et al., 2008).

As isotermas de adsorção de nitrogênio foram obtidas em um equipamento ASAP 2020 (Accelerated Surface Area and Porosimetry System) da Micromeritics. Esse equipamento possui dois sistemas de vácuos independentes: um para preparação da amostra e outro para análise. Este equipamento permite que uma amostra seja tratada e outra analisada simultaneamente. Com isso, a análise de BET foi dividida em duas etapas: a primeira etapa chamada de tratamento da amostra (desgaseificação) e a etapa posterior referente à análise da amostra.

A desgaseificação da amostra é o processo a qual a amostra é limpa antes da análise ser realizada, sendo então aquecida e colocada sob vácuo. Essa etapa é importante, pois a maioria dos materiais sólidos absorvem umidade e outros contaminantes quando expostos à atmosfera e sendo analisados sem o devido tratamento podem fornecer dados não confiáveis e danificação do equipamento. A etapa de desgaseificação consistiu em submeter a amostra a 350 °C sob vácuo abaixo de  $10^{-3}$  mmHg durante 9 h.

Finalizada essa etapa, as amostras foram analisadas de modo a obter dados importantes, como: área superficial, diâmetro e volume do poro.

#### 5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi examinada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV, da marca Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan. As amostras foram previamente submetidas a um processo de metalização com alvo de ouro durante 6 min a uma corrente de 10 mA. Para esse processo, foi utilizado o metalizador da Sanyu Electron, modelo Quick Coater SC-701.

### 5.4 Enzima

A enzima utilizada neste trabalho foi a invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26, Grau VII, código I4504, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), fornecido pela Sigma Aldrich, cuja atividade enzimática declarada no rótulo pelo fabricante era de 46 U/mg de sólido, sendo U definido como 1  $\mu$ mol de sacarose hidrolisada por minuto a pH 4,5 e 55 °C. Essa enzima foi escolhida por possuir diâmetro (3,5 nm) e massa molecular (135.000 Da) adequados para ser incorporado no interior dos poros do sólido mesoporoso (SANTOS, 2010).

### 5.5 Imobilização do Biocatalisador

#### 5.5.1 Ativação do suporte

Antes de realizar a imobilização da enzima nas amostras de SBA-15 modificadas pelos agentes silanos, é necessária a ativação da superfície com um reagente que atua como um agente reticulante. Esta etapa é fundamental para se promover ligações enzima-suporte estáveis permitindo uma maior fixação da enzima sobre a superfície do suporte nestas condições brandas

de imobilização. O reagente utilizado nesse trabalho para essa finalidade foi o glutaraldeído, cuja principal função é estabelecer uma ligação entre a enzima e os agentes modificadores da superfície.

O processo de ativação da amostra com glutaraldeído foi realizado empregando o seguinte procedimento: i) dispersão de 0,1 g dos suportes modificados em 10 mL da solução de glutaraldeído 1 %; ii) agitação a 100 rpm em um agitador orbital por 45 min; iii) recuperação da fase sólida por filtração.

O mecanismo de reação entre o glutaraldeído e os agentes funcionalizantes pode ser visto no Apêndice B.

### 5.5.2 Imobilização da enzima

O método de imobilização enzimática utilizado neste trabalho foi o de ligação covalente, utilizando o glutaraldeído como agente reticulante, onde essa imobilização consistiu das seguintes etapas: i) dispersão dos suportes previamente ativado com glutaraldeído em 10 mL de solução aquosa, contendo diferentes concentrações de enzimas (0,10, 0,25 e 0,5 g/L); ii) agitação a 90 rpm em um agitador orbital por 24 h; iii) recuperação do biocatalisador por filtração; iv) armazenamento das amostras em tampão fosfato de sódio pH 5,3 (MARQUEZ et al., 2008).

## 5.6 Unidade experimental

A unidade experimental foi montada no Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos – LTBA no Centro de Tecnologia, onde foram realizados os experimentos com a enzima imobilizada.

### 5.6.1 Determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais

A atividade enzimática pode ser avaliada através de vários modos, como por exemplo, com base na atividade molar, ou seja, o número de moles de substrato transformado por mole de enzima por unidade de tempo, ou até por unidade enzimática, que é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromole de substrato num minuto, a 25 °C, nas condições ótimas de pH e concentração de substrato. Assim, pode-se obter gráficos de concentração de substrato em função do tempo, nos quais se conclui que existe uma dependência linear entre a

velocidade inicial de uma reação enzimática e a concentração de enzima na reação (SANTOS, 2010).

A atividade da enzima invertase na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método das taxas iniciais através da hidrólise da sacarose. Para isto, foi utilizado um reator batelada (tipo cesta) com volume útil de 200 mL, agitado magneticamente, e equipado com uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostático para controle rigoroso da temperatura de reação. Nos testes reacionais, as partículas do biocatalisador contendo a enzima imobilizada foram carregadas no reator dentro de uma cesta perfurada de aço inox (100 mesh), permitindo o contato da fase sólida com o meio reacional líquido contendo o substrato dissolvido. A cesta foi utilizada, de forma a permitir a retirada de amostras do meio reacional isentas da fase sólida. O reator batelada foi projetado com 8,2 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro interno e a cesta de aço inox 6,2 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro, Figura 20.

A hidrólise da sacarose foi realizada nas condições ótimas encontradas por Marquez et al. (2008), que avaliou a influência da temperatura, pH e concentração de sacarose na atividade da enzima imobilizada, o qual encontrou as seguintes condições que maximizaram a atividade enzimática:

- Temperatura ótima de hidrólise da sacarose:  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- pH da solução de sacarose: 4,9 (tampão acetato  $10^{-1}$  M);
- Concentração de sacarose no meio:  $50 \text{ g L}^{-1}$ .

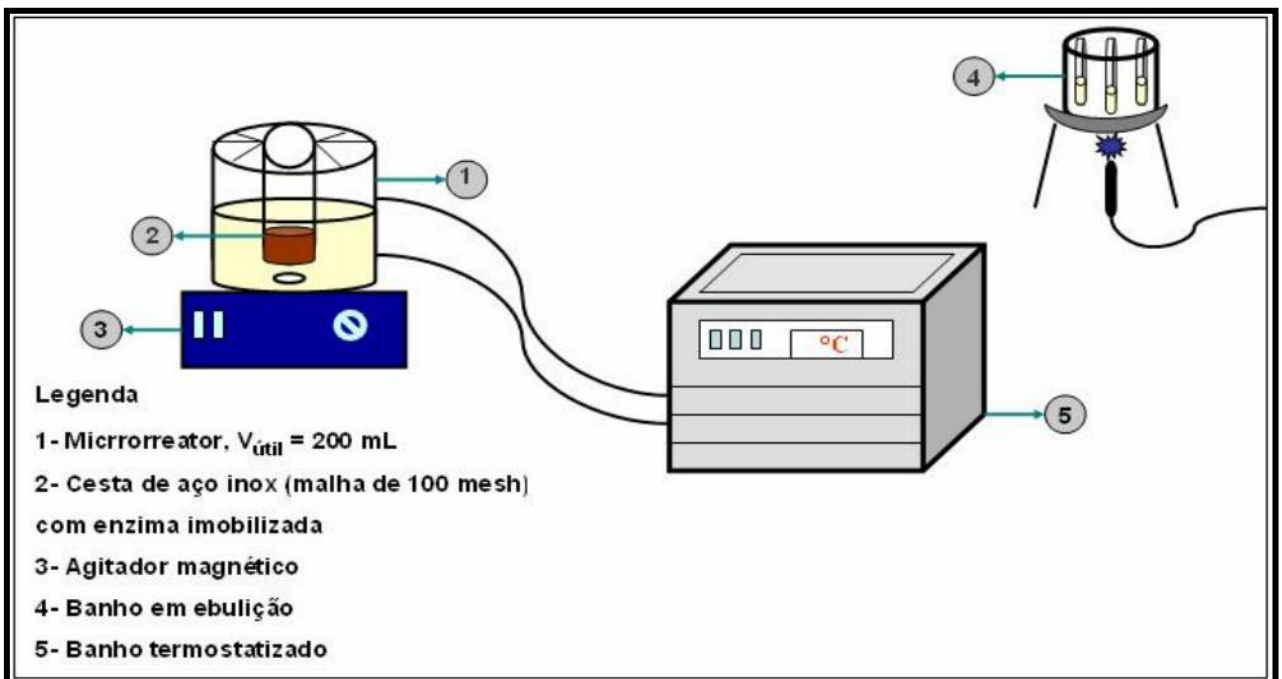
Inicialmente, foi colocada no reator a solução de sacarose em tampão fosfato de sódio, seguido de aquecimento para temperatura de  $40^\circ\text{C}$ . A cesta de aço inox contendo a amostra a ser avaliada foi introduzida no reator, dando início a reação. A quantidade de glicose formada foi determinada a partir da retirada de alíquotas (1 mL da solução de sacarose) em intervalos regulares de três em três minutos. As alíquotas das amostras coletadas do reator foram tratadas a  $100^\circ\text{C}$  para completa inativação de moléculas de invertase resultantes de possível lixiviação. Esse procedimento garante a interrupção da reação de hidrólise catalisada pela enzima livre no meio. A quantificação da glicose formada no reator foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO et al., 2004). A representação esquemática da unidade experimental utilizada para realizar a hidrólise da sacarose por invertase imobilizada está apresentada na Figura 21.

**Figura 20 - Reator tipo cesta.**



Fonte: AUTORA, 2016.

**Figura 21 - Representação esquemática da unidade experimental utilizada nas reações de hidrólise.**



Fonte: MARQUEZ et al., (2008).



Após as amostras entrarem em contato com o banho em ebulição para completa inativação das enzimas, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 510 nm, zerando o aparelho com o branco. Com os valores das absorbâncias, foi possível calcular o valor da concentração de glicose, através da fórmula fornecida pelo kit glicose oxidase utilizado nesse trabalho, conforme descrito no Apêndice C, e construir um gráfico de concentração de glicose *versus* tempo, a fim de determinar a atividade dos biocatalisadores, já que essa é dada com base nas inclinações das retas das curvas construídas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata para uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Como já dito, a atividade enzimática refere-se a massa de glicose produzida por volume do meio reacional por unidade de tempo, portanto, sua unidade é  $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}\cdot\text{min}$ . É comum referir-se à atividade enzimática como atividade enzimática específica ( $A_{\text{espec.}}$ ), sendo esta calculada através da relação entre a atividade enzimática por massa de proteína no meio ( $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{g}_{\text{proteína}}$ ) (DIXON; WEBB, 1979; KRAJEWSKA, 2004; ZANIN; MORAES, 2004).

#### 5.6.2 Determinação da concentração de proteína

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Esse método consiste em dissolver 50 mg de azul brilhante de Coomassie G (Sigma) em 25 mL de etanol, sob agitação constante. Em seguida, são adicionados, 50 mL de ácido fosfórico 85 % e 500 mL de água destilada. A solução deve ser mantida com agitação por 1 hora seguida de filtração.

Antes de determinar a quantidade de proteína das amostras, é necessário construir uma curva de calibração que serve como base para os cálculos da quantificação de proteína, conforme Apêndice D. A curva utilizada foi a curva padrão com diferentes concentrações de albumina do soro bovino (BSA) em presença de solução corante. Essa curva foi construída utilizando soluções de BSA na faixa de 0,02 g/L a 0,10 g/L. Os pontos da curva foram determinados fazendo-se uso de misturas contendo alíquotas de 0,5 mL das soluções de BSA e de 5 mL da solução corante. Após 10 minutos de contato, procede-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, tomando-se como zero a absorbância de uma amostra contendo 0,5 mL de água e 5 mL da solução corante.

A concentração de proteína das amostras foi facilmente encontrada substituindo os valores da absorbância na equação da reta da curva de albumina.

### 5.6.3 Rendimento de imobilização

A partir dos valores de atividade enzimática, foi possível determinar a quantidade percentual de enzima imobilizada no suporte (rendimento de imobilização), utilizando a seguinte equação (HERMANOVÁ et al., 2015):

$$R(\%) = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$R(\%)$  = Rendimento de imobilização;

$A_i$  = Atividade enzimática da enzima livre (solução enzimática);

$A_f$  = Atividade enzimática da enzima imobilizada.

### 5.6.4 Estudo da afinidade da enzima invertase com os suportes sintetizados

Na avaliação da afinidade da enzima invertase imobilizada sob os suportes sintetizados, foi adotada uma abordagem alternativa que utiliza o modelo clássico de Michaelis–Menten (Equação 3).

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação 3})$$

O valor do parâmetro  $K_m$  indica a concentração de substrato  $[S]$  necessária para obter uma velocidade inicial ( $v_0$ ) que é a metade da velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) (MOTTA, 2011).

Os resultados experimentais de atividade enzimática versus concentração de enzima na solução de imobilização foram ajustados ao modelo Michaelis-Menten com o auxílio do software Statistic® 11.0, empregando o método numérico de Levenberg-Marquardt (MORÉ, 1977) para se determinar os valores de  $V_{máx}$  e  $K_m$  de cada biocatalisador.

A eficiência catalítica da enzima foi determinada pela constante catalítica,  $K_{cat}$ , através da Equação 4 (MOTTA, 2011).

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_{total}} \quad (\text{Equação 4})$$

A partir dos valores de  $K_{cat}$  e  $K_m$  foi possível avaliar qual suporte apresentou maior interação com a enzima invertase, indicando qual o melhor agente de modificação para o tratamento do SBA-15.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão do estudo do processo de síntese e modificação da superfície da peneira molecular SBA-15, e em seguida, o resultado das atividades enzimáticas dos materiais.

### **6.1 Síntese do Material Mesoporoso SBA-15**

Com os valores da massa de material obtida após a filtração e a massa de sólidos teórica, foi possível calcular o rendimento de sólidos da síntese do material mesoporoso SBA-15. Para essa síntese, a massa de sólido teórica encontrada foi de 8,39 g, enquanto que a massa de sólido obtida foi de 8,15 g. Assim, de acordo com a equação 1, tem-se que a síntese do material mesoporoso acarretou em um rendimento de 97%, sendo esse valor suficiente para se confiar na estabilidade do material sintetizado.

### **6.2 Caracterização dos Materiais**

#### **6.2.1 Análise Térmica**

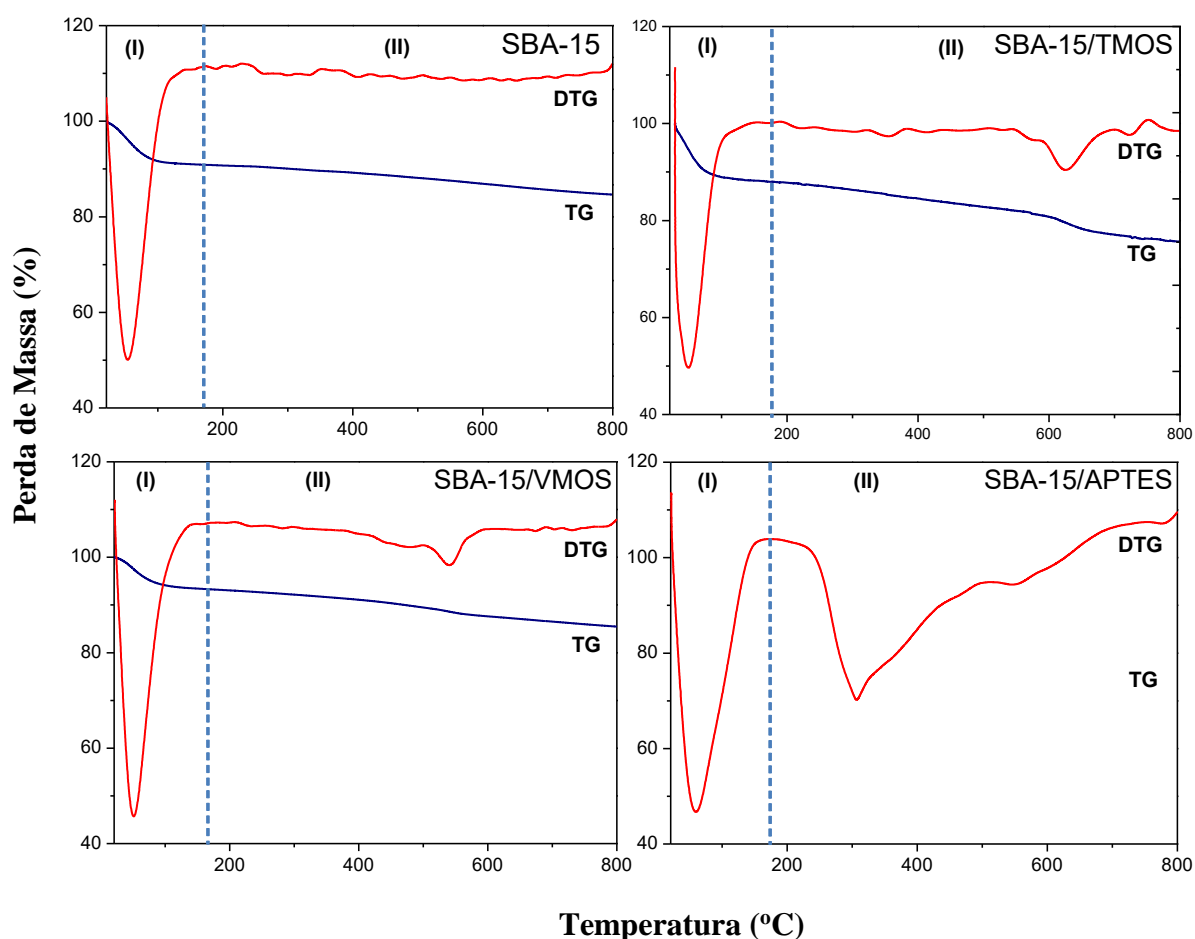
As análises termogravimétricas (TG/DTG) foram realizadas para quantificar a perda de massa de cada amostra referente à remoção do direcionador orgânico.

A Figura 22 apresenta as curvas termogravimétricas de TG e DTG das amostras de SBA-15 calcinada e com suas superfícies modificadas pelos agentes silanos. De acordo com a curva de TG da amostra de SBA-15 calcinada, é possível perceber uma perda de massa de aproximadamente 6,2 % entre 25 e 170 °C (Região I). De acordo com a literatura, esse evento é atribuído a dessorção de água fisicamente adsorvida na superfície ou na parede do sólido poroso (KRUK; JARONIEC, 2000). Diferentemente das outras amostras, nenhum outro evento térmico é observado, o que pode ser explicado pela eliminação de todo material orgânico durante a calcinação.

Nas amostras modificadas observa-se, também, um evento de perda de massa entre 25 e 150 °C referente à dessorção da água. Além disso, foi observado um segundo evento de perda de massa entre 171 e 800 °C (Região II) associada à remoção dos compostos orgânicos depositados na superfície da SBA-15.

A partir da Figura 22, é possível perceber que a dessorção dos agentes silanos ocorre na faixa de 300 a 600 °C, ou seja, bem superior às temperaturas de ebulição dos compostos em sua forma pura (123, 217 e 233 °C, para o VMOS, TMOS e APTES, respectivamente). Essa mudança na temperatura de volatilização/evaporação é um indicativo da força de interação entre o silano e o suporte, sendo uma evidência que comprova a ancoragem das moléculas de agentes modificadores na superfície do SBA-15.

**Figura 22 - Curvas de TG e DTG das amostras de SBA-15 calcinada e com suas superfícies modificadas pelos agentes silanos.**



De modo a quantificar as moléculas ancoradas na superfície do SBA-15, foi realizado um cálculo que relaciona as perdas de massa na Região II com a geometria do grupo silano de cada agente modificador.

Inicialmente, foi calculado a perda de massa total ( $P_t$ ), caracterizada pela relação entre a perda de massa na Região II ( $P_{m_{Região II}}$ ) e a massa final a 800 °C, e, em seguida, essa perda

de massa total foi dividida pelo peso molecular do grupo silano ( $PM_{silano}$ ), conforme demonstrado nas equações 5 e 6.

$$P_t = \frac{Pm_{Região II}}{m_{final}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$n^0 \text{ moléculas ancoradas} = \frac{P_t}{PM_{silano}} \quad (\text{Equação 6})$$

A Tabela 7 apresenta os valores das perdas de massa, bem como da quantidade de moléculas ancoradas na superfície do material mesoporoso SBA-15.

**Tabela 7 - Quantidade de moléculas ancoradas na superfície do material SBA-15.**

<i>Material</i>	<i>Pm<sub>Região II</sub></i> (mg)	<i>m<sub>final</sub></i> (mg)	<i>P<sub>t</sub></i> (%)	<i>PM<sub>silano</sub></i> (g/ mol)	<i>Qnt. Moléculas</i> <i>ancoradas (mmol/g<sub>SBA-15</sub>)</i>
SBA-15/TMOS	0,45	2,72	6,86	77	2,15
SBA-15/VMOS	0,64	6,98	5,31	27	3,37
SBA-15/APTES	2,00	10,26	14,39	58	3,36

Sendo a perda de massa e o tamanho do grupo silano do APTES quase o dobro do VMOS, já era esperado que o número de moléculas ancoradas fosse equivalente, tendo esse valor comprovado pelo cálculo apresentado na Tabela 7.

O material SBA-15/TMOS apresentou um menor número de moléculas ancoradas na superfície do SBA-15, fato que pode ser explicado pela geometria do grupo fenil, que, por seu volume, sugere uma maior dificuldade das moléculas em acessar a superfície do material.

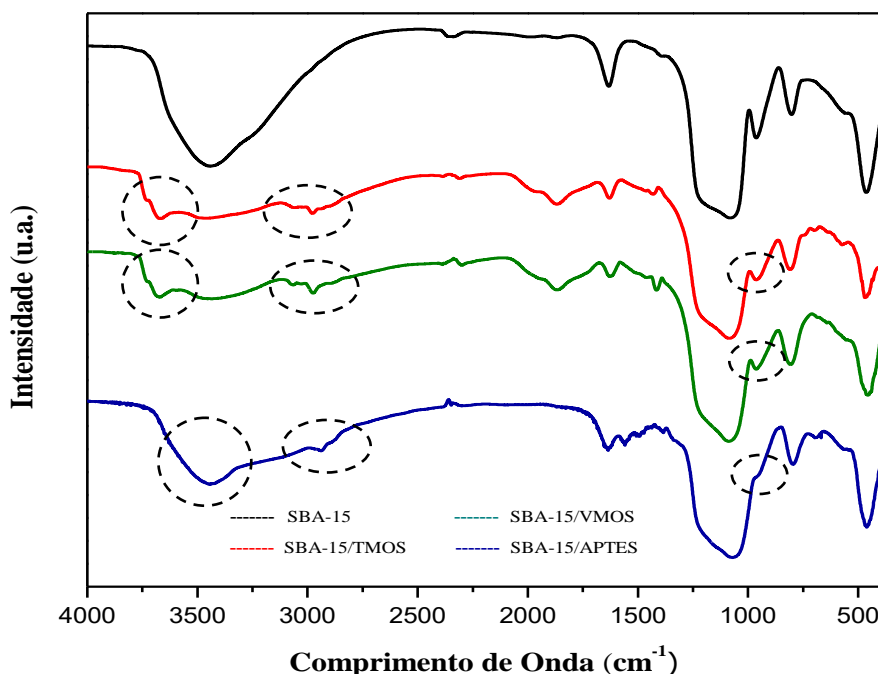
## 6.2.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Com a espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi possível identificar as principais bandas de absorção das amostras, conforme indicado na Figura 23.

Para a amostra de SBA-15 sem modificação, o espectro de infravermelho apresenta bandas de absorção referentes às vibrações fundamentais da rede de sílica em torno de 460, 810, 960, 1080-1200, 1640, 3100-3700  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda em 460 e entre 1080-1200  $\text{cm}^{-1}$  é relativa ao estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente, das ligações Si-O-Si do  $\text{SiO}_4$ . As bandas em torno de 810  $\text{cm}^{-1}$  e 960  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas aos grupos Si-O e Si-OH, nesta ordem. A banda na região de 1640  $\text{cm}^{-1}$  é devido a presença de água na estrutura da sílica e a banda larga na região de 3100 - 3700  $\text{cm}^{-1}$ , relaciona-se ao grupo hidroxila da água e ao modo de vibração de deformação axial de -OH do grupo Si-OH (LUECHINGER; PRINS; PIRNGRUBER, 2005).

**Figura 23 - Espectros de FTIR do SBA-15 não modificado e modificados.**



No caso das amostras com suas superfícies modificadas, percebe-se a presença de bandas adicionais atribuídas aos grupos orgânicos das moléculas ancoradas e ao consumo de grupos hidroxilas existentes na superfície do SBA-15.

De acordo com a literatura, a presença de bandas em torno de 2972-2854  $\text{cm}^{-1}$  é referente aos modos de vibrações de estiramentos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de hidrocarbonetos alifáticos presentes em TMOS, de grupos  $\text{CH}_2$  presentes em VMOS e os grupos  $\text{NH}_2$  do APTES (FOSCHIERA; PIZZOLATO; BENVENUTTI, 2001).

É possível perceber uma redução da intensidade da banda em 960 e 3100-3700  $\text{cm}^{-1}$  atribuída aos grupos silanóis existentes na estrutura do material, indicando que ocorreu uma diminuição na concentração dos grupos hidroxilas, sendo, portanto, um indício do ancoramento dos grupos funcionalizantes na superfície das amostras.

Com o auxílio do software Origin<sup>®</sup>9.4, foi possível realizar o cálculo das densidades óticas das bandas Si-OH (960  $\text{cm}^{-1}$ ) e OH (3100-3700  $\text{cm}^{-1}$ ), com o intuito de determinar a percentagem de redução dessas bandas em relação às do material SBA-15 sem modificação, estando seus valores apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8 – Cálculo das densidades óticas das bandas.**

<i>Material</i>	<i>A<sub>Si-OH</sub></i> *	<i>%Redução<sub>Si-OH</sub></i>	<i>A<sub>OH</sub></i> *	<i>%Redução<sub>OH</sub></i>
SBA-15	72,04		837,82	
SBA-15/TMOS	42,91	40,4	544,58	35,0
SBA-15/VMOS	28,12	61,0	296,22	64,6
SBA-15/APTES	22,60	68,6	212,16	74,7

\*Área das bandas em  $\text{m}^2$ .

Através dos dados calculados na Tabela 8, é possível perceber que o material APTES apresentou uma redução de cerca de 68% para a banda Si-OH e 74% para a banda OH em relação a área do SBA-15 não modificado, o que significa dizer que uma maior quantidade de moléculas foi incorporada na superfície do material, fornecendo um resultado mais satisfatório quando comparado com os outros agentes funcionalizantes.

Pode-se dizer, então, que a eficiência da funcionalização das amostras é dada na seguinte ordem: SBA-15/APTES > SBA-15/VMOS > SBA-15/TMOS.

Em concordância com o resultado de TG, a análise de FTIR também indicou que o grupamento amino possui uma maior afinidade com o suporte utilizado, o qual pode ser explicado pela maior preferência de adsorção desse grupo na superfície da sílica. Estudos de FTIR mostram que aminas primárias interagem mais fortemente com a superfície da sílica por meio de ligações de hidrogênio ou via formação de par de íons complexos  $\text{Si} - \text{O}^- \dots \text{NH}_3^+ - \text{R}$  (ROCHESTER; YONG, 1980). Os grupamentos que conseguem se ligar através de ligação de



hidrogênio reagem mais rapidamente com a hidroxila existente na superfície do SBA-15 do que os que não conseguem fazer essa ligação, como é o caso do TMOS e VMOS (FRYXELL et al., 1996).

### 6.2.3 Adsorção de nitrogênio

Os resultados das propriedades texturais determinados a partir das medidas de adsorção de N<sub>2</sub> estão apresentados na Tabela 9. Nesta tabela estão listados os valores das áreas superficiais (S), volumes de poros (V) e diâmetro de poros (D) calculados por diferentes métodos das amostras de SBA-15 modificadas e não modificada.

**Tabela 9 - Adsorção de N<sub>2</sub> das amostras sintetizadas.**

<i>Amostra</i>	<i>S (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</i>				<i>V (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</i>			<i>D<sub>A</sub></i>	<i>D<sub>BJH</sub></i>
	<b>S<sub>BET</sub></b>	<b>S<sub>BJH</sub></b>	<b>S<sub>Ex</sub></b>	<b>S<sub>Micro</sub></b>	<b>V<sub>t</sub></b>	<b>V<sub>BJH</sub></b>	<b>V<sub>Micro</sub></b>	<i>(nm)</i>	<i>(nm)</i>
SBA-15	816	746	682	134	1,02	1,04	0,07	5,4	5,8
SBA-15/TMOS	717	732	650	95	0,94	0,99	0,02	5,0	5,4
SBA-15/VMOS	704	696	609	67	0,89	0,94	0,03	5,2	5,4
SBA-15/APTES	362	371	331	31	0,49	0,54	0,01	5,0	5,5

S<sub>BET</sub>: área pelo método BET; S<sub>BJH</sub>: área no ramo da dessorção; S<sub>Ex</sub>: área externa; S<sub>Micro</sub>: área dos microporos; V<sub>t</sub>: volume total dos poros; V<sub>BJH</sub>: volume dos poros na dessorção; V<sub>Micro</sub>: volume de microporos; D<sub>A</sub>: média do diâmetro de poros; D<sub>BJH</sub>: diâmetro dos poros na dessorção.

Como esperado, a introdução dos grupos orgânicos conduz a uma diminuição da área superficial, volume de poro e diâmetro de poro, indicando o ancoramento de espécies orgânicas na superfície da sílica (VALLET-REGÍ et al., 2004; SONG; HIDAJAT; KAWI, 2005; YANG et al., 2005).

A área superficial e o volume de poros dos microporos (S<sub>Micro</sub> e V<sub>Micro</sub>, respectivamente) diminuem nitidamente para todos os agentes funcionalizantes em relação ao material SBA-15 sem modificação. No entanto, para os agentes TMOS e VMOS, a área superficial e o volume de poros dos mesoporos (S<sub>BJH</sub> e V<sub>BJH</sub>, respectivamente), permanecem quase invariáveis com a introdução de grupos orgânicos no SBA-15. Esse resultado indica que os grupos orgânicos fenil

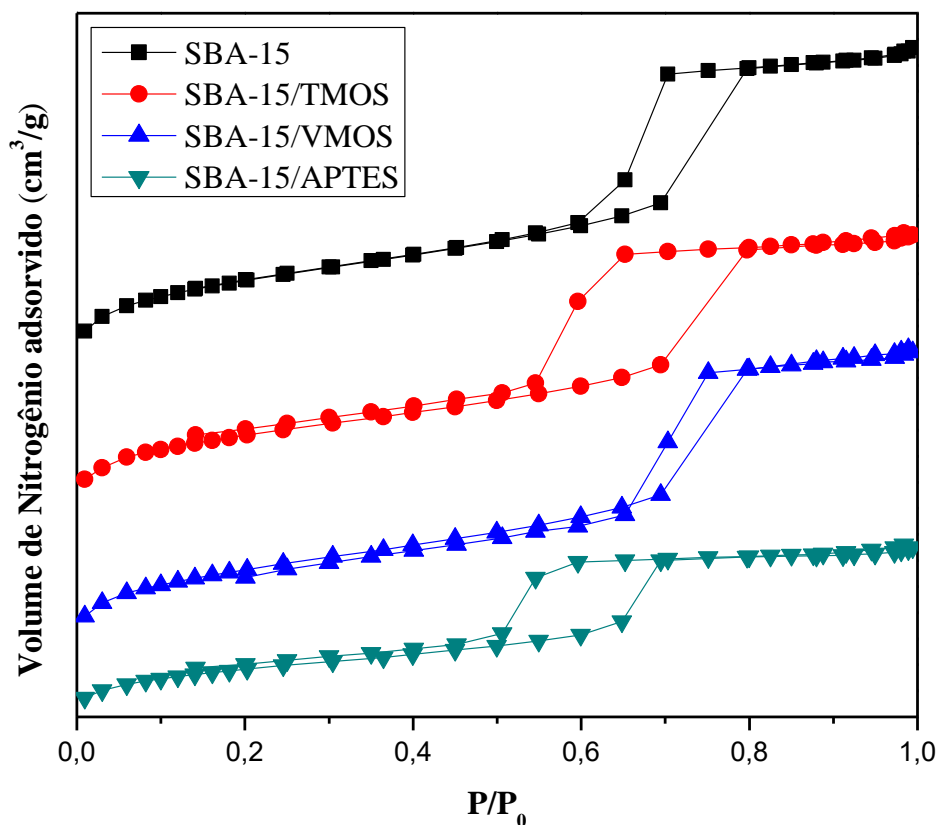
e vinil presentes no TMOS e VMOS, respectivamente, possuem uma tendência a serem ancorados nos microporos dessas sílicas (YANG et al., 2005).

Contudo, o resultado obtido para o APTES mostrou uma diminuição de cerca de 55 % da área superficial dos mesoporos ( $S_{BET}$ ) e 77% da área superficial dos microporos ( $S_{Micro}$ ) em relação ao material sem modificação. Essas reduções indicam que o grupo aminopropil possui uma maior tendência de se ligar no interior dos canais microporosos, bem como o TMOS e VMOS, no entanto, esse grupo orgânico também possui facilidade de incorporação no interior dos canais mesoporosos da sílica, aumentando, assim, a quantidade de moléculas ancoradas em sua superfície (LUAN et al., 2005).

Outra maneira de explicar essa significativa redução da área do APTES pode ser devido a presença do grupo amino na molécula do silanol que pode causar outro ponto de interação com a superfície, aumentando a cobertura sobre o suporte. Essa cobertura pode acarretar em um bloqueio dos poros, e conseqüentemente, na diminuição da área superficial.

As isotermas de adsorção das amostras modificadas e não modificada, mostradas na Figura 24, indicam que a forma da isoterma de adsorção não é afetada pela incorporação superficial de alcóxissilanos.

**Figura 24 - Isotermas de adsorção para amostras de SBA-15 não modificada e modificadas.**



Nota-se que em todos os casos as isotermas são do tipo IV, características de materiais mesoporosos, de acordo com a classificação BDDT (Braunauer, Deming e Teller), e exibem histerese do tipo H1, conforme classificação da IUPAC (1985). Estas características são relacionadas aos materiais com poros de seção transversal constante (cilíndrico ou hexagonal, por exemplo). As inflexões em torno de  $P/P_0$  entre 0,5 a 0,8 confirmam esta característica estrutural de poros.

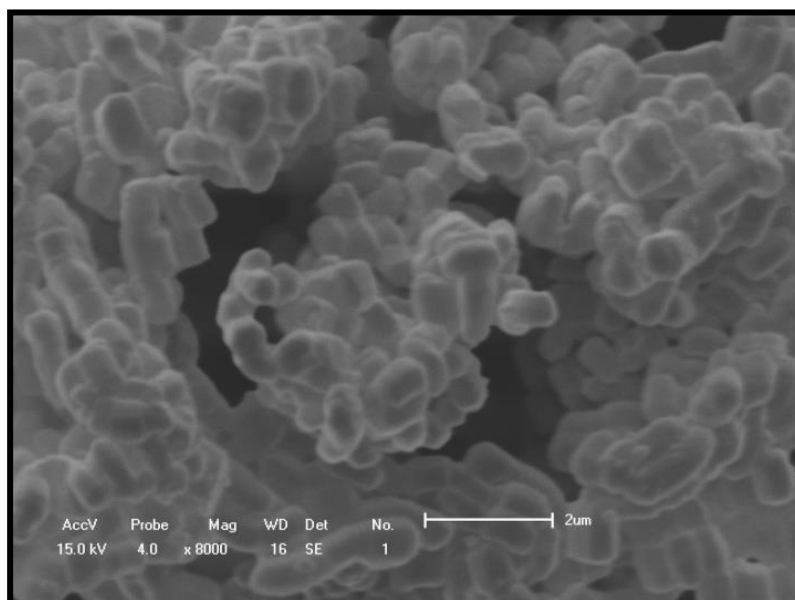
Conclui-se através dessas isotermas que as histereses das amostras modificadas sofreram uma redução em altura, mas preservaram as características estruturais (inorgânicas) da matriz mesoporosa mesmo após a modificação superficial. No entanto, o volume total de  $N_2$  adsorvido decresce para todas as pressões relativas, fornecendo um indício da diminuição do tamanho e volume de mesoporosos, e conseqüentemente, indicando a presença dos agentes modificadores nos poros da sílica.

A redução do volume dos poros e das áreas superficiais das amostras modificadas pode ser explicada pelo uso do tolueno na etapa de modificação de superfície. Esse comportamento pode indicar que as amostras modificadas com tolueno apresentam uma quantidade maior dos grupos funcionalizantes na sua superfície devido ao caráter apolar do tolueno que favorece a solubilização desses agentes.

#### 6.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura para o material SBA-15 não modificado está apresentada na Figura 25.

**Figura 25 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura do material SBA-15 não modificado.**



É possível observar uma morfologia macroscópica do tipo vermicular que consiste de muitos agregados tipo corda, em concordância com a literatura (MONNIER et al., 1993).

A Figura 26 apresenta as imagens do material SBA-15 modificado com os diferentes agentes silanos e com as enzimas imobilizadas em suas superfícies.

As imagens obtidas pelo MEV mostram que a modificação da superfície do material com os agentes silanos não modifica a morfologia macroscópica do SBA-15 (Figuras 26a, 26c e 26e).

No entanto, para os biocatalisadores modificados com TMOS e VMOS, é evidente notar que há uma alteração significativa na estrutura quando a invertase é imobilizada sobre esses suportes. É possível observar que a introdução da enzima fez com que o SBA-15 se aglomerasse formando um filme que cobriu todo o suporte (Figuras 26b e 26d). Esse resultado sugere que o filme formado pode não ter deixado livre o acesso do substrato ao interior do suporte, impossibilitando a fixação das enzimas.

A micrografia obtida para o biocatalisador modificado com o agente APTES, mostra que a morfologia do suporte não sofre influência significativa após a imobilização, permitindo assim que a enzima tenha acesso ao interior do SBA - 15 resultando em uma maior ancoragem de moléculas na superfície interna do suporte.

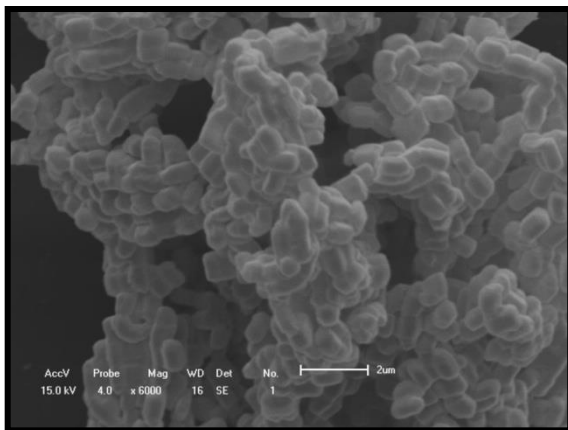
### 6.3 Imobilização Enzimática

As atividades enzimáticas das enzimas imobilizadas em cada agente funcionalizante foram determinadas através das reações de hidrólise, conforme item 5.6.1. Com os valores das absorvâncias obtidos ao final de cada reação, foi possível determinar a concentração de glicose existente em cada amostra e também na solução enzimática, através da Equação 7, fornecida pelo kit GLUCOX 500 utilizado nesse trabalho e descrito no Apêndice C.

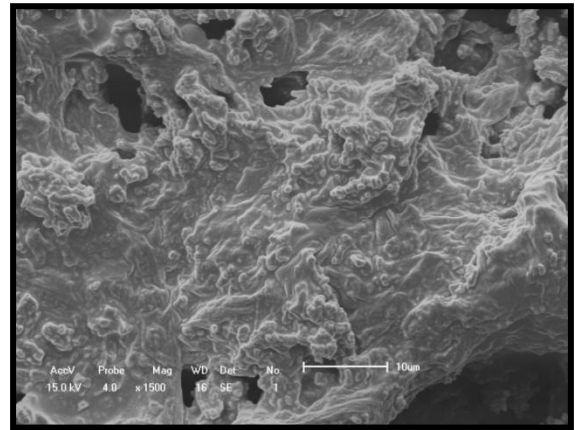
$$Glicose(mg/mL) = \frac{AbsorbânciaAmostra}{AbsorbânciaPadrão} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

**Figura 26 - Micrografias das amostras: a) SBA-15 modificado com TMOS, b) invertase immobilizada no suporte SBA-15/TMOS, c) SBA-15 modificado com VMOS, d) invertase immobilizada no suporte SBA-15/VMOS, e) SBA-15 modificado com APTES, f) invertase immobilizada no suporte SBA-15/APTES.**

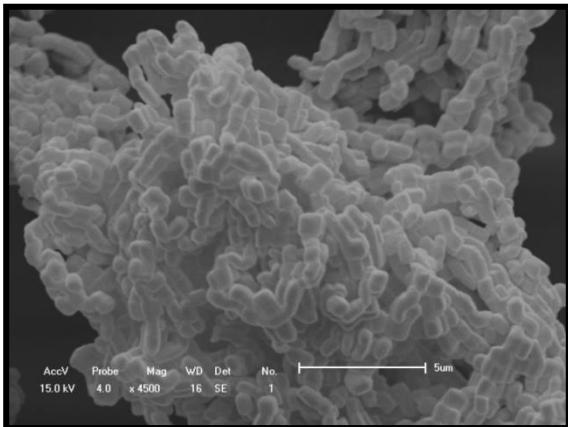
a)



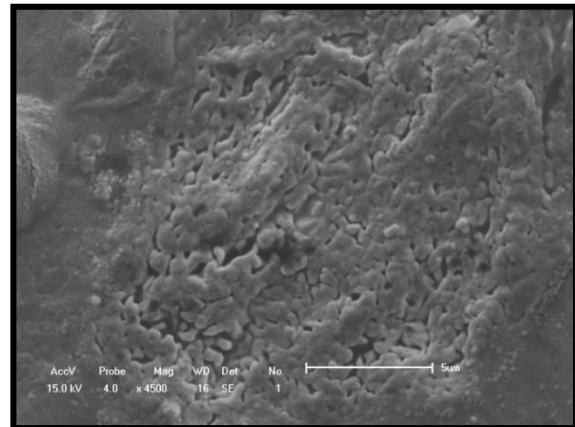
b)



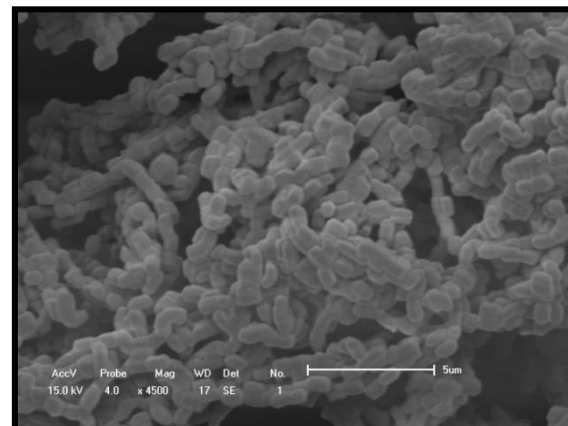
c)



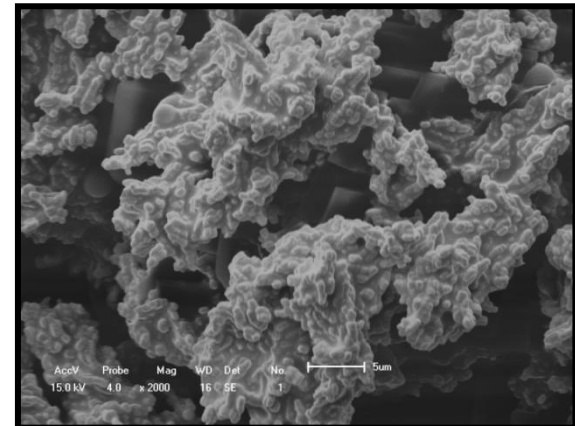
d)



e)



f)



A Tabela 10 apresenta os valores das concentrações de glicose (g/L), calculados com o auxílio da equação 7, para os suportes imobilizados durante os primeiros 15 min de reação.

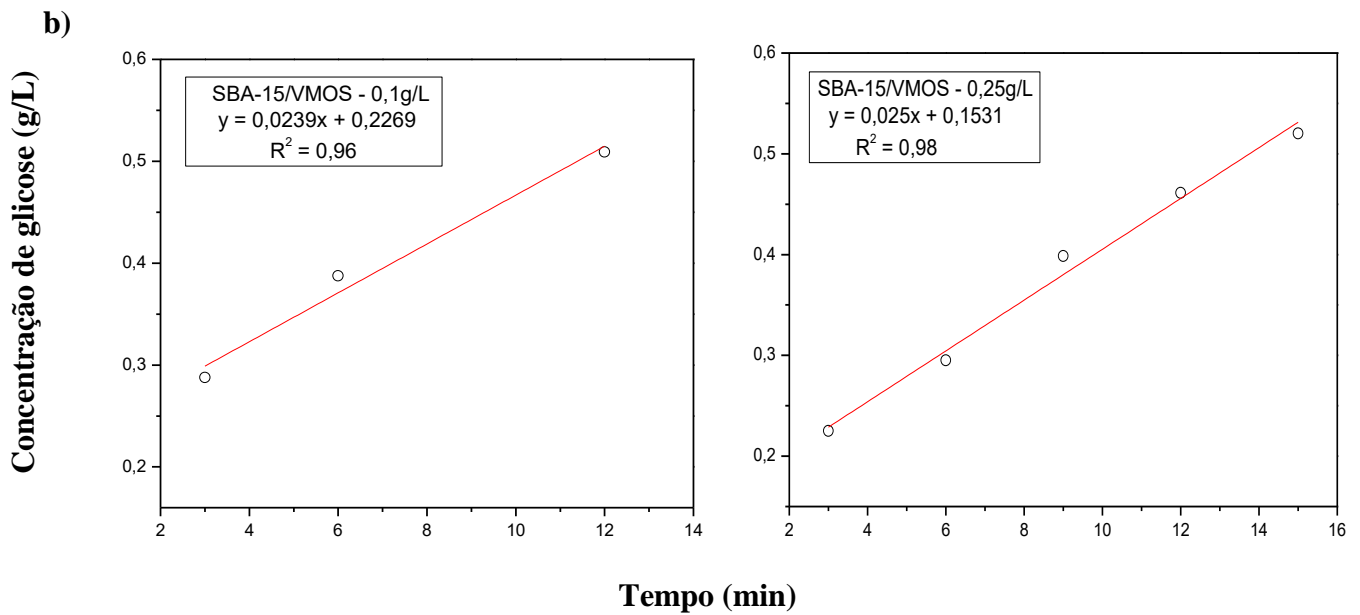
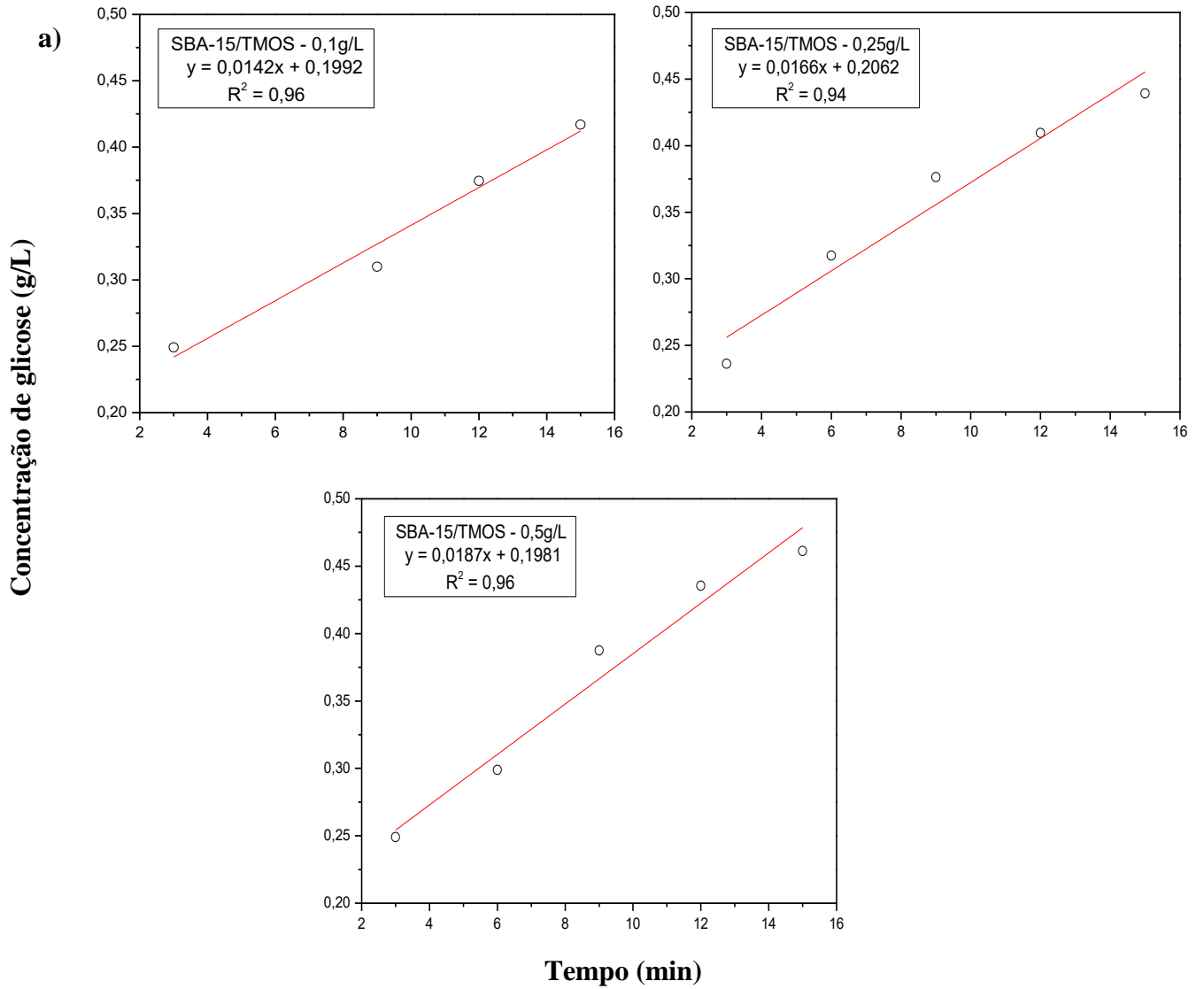
**Tabela 10 – Valores de concentração de glicose calculados para cada suporte imobilizado.**

<i>Amostras</i> \ <i>Tempos</i>	<i>3 min</i>	<i>6 min</i>	<i>9 min</i>	<i>12 min</i>	<i>15 min</i>
TMOS-0,1g/L	0,2491	0,2287	0,3099	0,3745	0,4169
TMOS-0,25g/L	0,2362	0,3173	0,3764	0,4096	0,4391
TMOS-0,5g/L	0,2491	0,2989	0,3874	0,4354	0,4612
VMOS-0,1g/L	0,2878	0,38745	0,3240	0,50923	0,4698
VMOS-0,25g/L	0,2251	0,2952	0,3985	0,4612	0,5203
VMOS-0,5g/L	0,2402	0,1734	0,2362	0,4446	0,5369
APTES-0,1g/L	0,6255	0,8097	1,2122	1,4428	1,9022
APTES-0,25g/L	0,4243	0,95387	1,1679	1,6133	2,2649
APTES-0,5g/L	1,0627	1,4631	1,9243	2,5553	3,4059

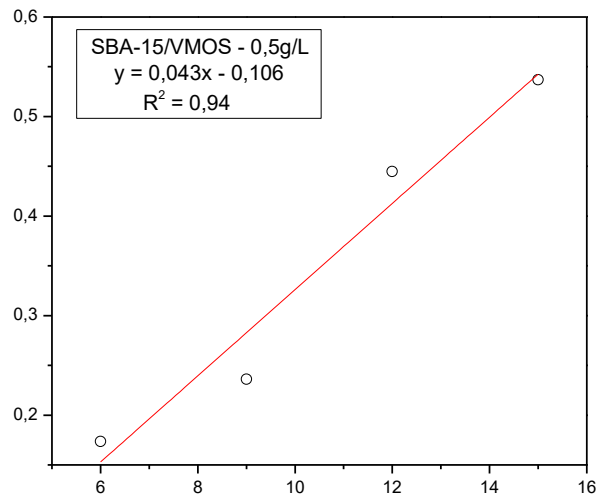
Com os valores de concentração de glicose calculados, foi possível construir os gráficos de concentração de glicose (g/L) *versus* tempo (min), para determinação da atividade enzimática, já que essa atividade é conseguida pelo valor do coeficiente angular obtido a partir da inclinação da reta, Figura 27.

Assim, foi possível construir um gráfico que apresenta a variação da atividade em função da concentração enzimática para a enzima na forma livre e nas formas imobilizadas, conforme a Figura 28.

**Figura 27 – Gráfico da concentração de glicose versus tempo para cada agente funcionalizante a diferentes concentrações enzimáticas: a) TMOS, b) VMOS, c) APTES.**

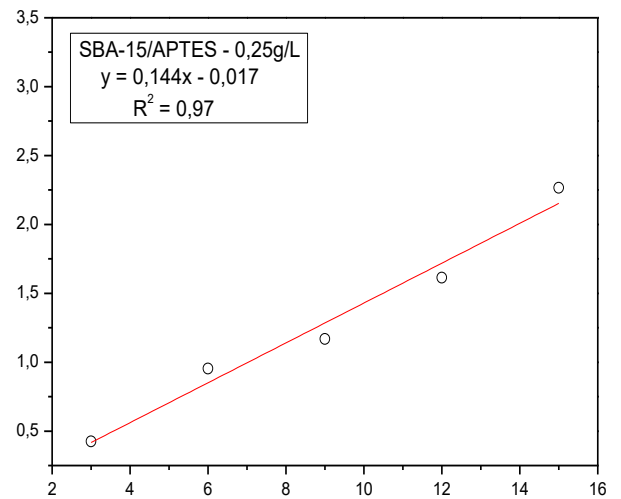
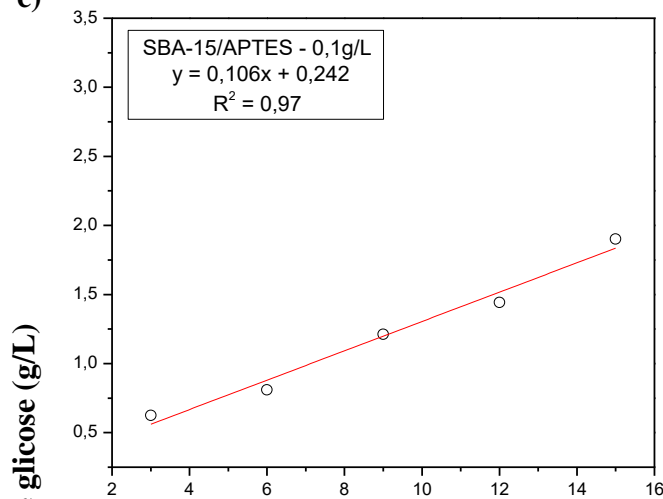


Concentração de glicose (g/L)

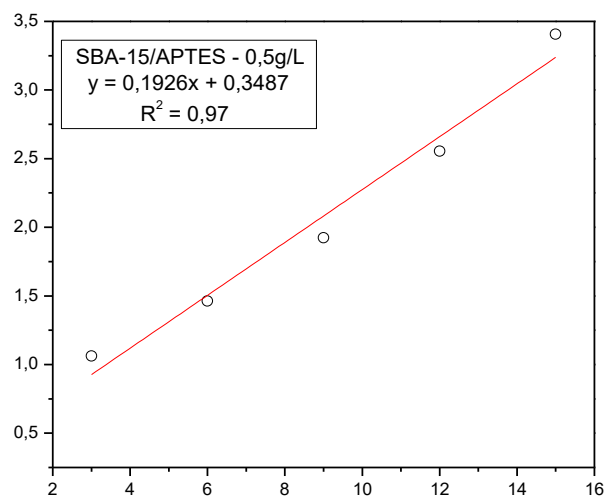


Tempo (min)

c)



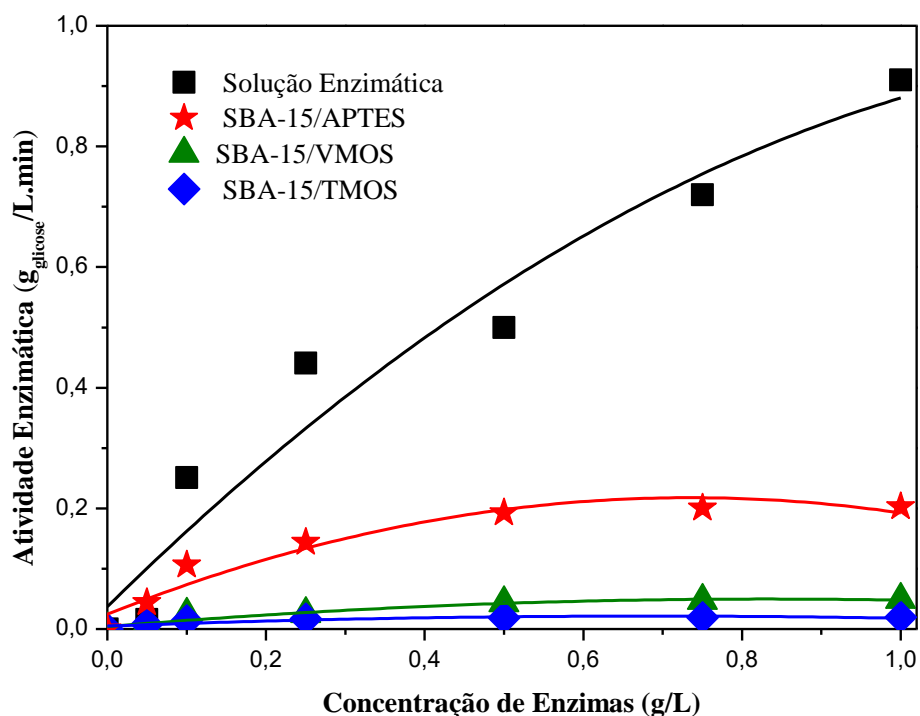
Concentração de glicose (g/L)



Tempo (min)



**Figura 28 - Variação da atividade enzimática em função da concentração de enzima.**



Como era esperado, o biocatalisador livre apresentou uma atividade enzimática maior do que os diferentes biocatalisadores imobilizados testados.

O modelo de Michaelis-Menten nos fornece a informação a respeito da concentração de enzima ideal a ser utilizada no suporte, antes que ocorra a saturação. Os resultados obtidos revelam que a utilização dos agentes modificadores TMOS e VMOS implicou em uma grande redução da velocidade máxima quando a concentração enzimática tende para infinito ( $V_{max}$ ), indicando que a utilização desses modificadores para uma posterior imobilização enzimática tende a fornecer baixos resultados de imobilização.

Análogo aos resultados obtidos na caracterização, o agente APTES foi o que forneceu um melhor resultado. Pode-se dizer que para a enzima na sua forma imobilizada no suporte modificado com APTES não é necessário a utilização de concentrações enzimáticas acima de 0,4 g/L, visto que a velocidade inicial tende a estabilizar quando são empregadas soluções enzimáticas mais concentradas, devido à saturação da superfície do substrato. Levando em consideração o alto custo das enzimas, esse resultado tende a ser bastante promissor ao ponto de vista comercial, pois permite a obtenção de um alto rendimento de imobilização a baixas concentrações de enzimas.

Com o auxílio do software Statistic® 11.0 e do método numérico de Levenberg-Marquardt (GAVIN, 2016), foram obtidos os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  para o SBA-15 não modificado e modificados. Utilizando a equação 4 descrita no item 5.6.4, foram calculados os valores de  $K_{cat}$  para cada suporte, sendo esses resultados mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11 - Valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $K_{cat}$  para os biocatalisadores.**

<i>Material</i>	$V_{max}^a$	$K_m^b$	$K_{cat}^c$	$K_{cat}/K_m$
SBA-15	0,67	0,15	1,33	
SBA-15/TMOS	0,02	0,44	0,004	0,009
SBA-15/VMOS	0,05	0,27	0,11	0,41
SBA-15/APTES	0,34	0,14	0,48	3,43

<sup>a</sup>g<sub>glicose</sub>/L.min; <sup>b</sup> g/L; <sup>c</sup>g<sub>sacarose</sub>/min

Como já explanado, o valor da  $V_{max}$  significa o valor onde todos os centros ativos estão saturados com substrato, ou seja, não existe enzima livre para se ligar a mais substrato. Pode-se dizer que, em baixas velocidades, 0,02 e 0,05 g<sub>glicose</sub>/L.min, para o TMOS e VMOS, respectivamente, os centros ativos já estão todos ocupados, o que nos permite afirmar que esses agentes funcionalizantes não fornecem uma boa ligação enzima-suporte, acarretando em uma baixa eficiência de imobilização. O resultado obtido com o suporte modificado APTES mostrou que os sítios ativos das enzimas saturam-se a uma velocidade bem superior quando comparado aos outros modificadores, 0,34 g<sub>glicose</sub>/L.min, possibilitando uma maior ancoragem de moléculas.

De acordo com Michaelis-Menten (1913), baixos valores da constante  $K_m$  refletem em uma grande afinidade da enzima pelo substrato. Analisando a Tabela 11, percebe-se que o suporte modificado com o agente APTES, apresentou, mais uma vez, um melhor resultado quando comparado aos outros agentes funcionalizantes. É importante ressaltar que o resultado obtido com o cálculo de  $K_m$  foi de acordo com resultado obtido no gráfico de atividade *versus* concentração enzimática, apresentado na Figura 28. Analisando os dados para a construção desse gráfico, sugeriu que não é necessária a utilização de concentrações enzimáticas acima de 0,4 g/L para o agente APTES, tendo essa suposição confirmada com o valor encontrado para  $K_m$  que mostrou uma grande afinidade enzima-suporte a 0,14 g/L.

O valor da  $k_{cat}$  representa o número de moléculas de substrato convertidas em produto por minuto. O suporte modificado com o agente APTES apresentou um resultado bem superior e, conseqüentemente, mais satisfatório com relação aos outros agentes. Esse suporte conseguiu converter cerca de 0,48 g<sub>sacarose</sub>/min em glicose, seguidos de 0,11 g<sub>sacarose</sub>/min, convertido pelo agente VMOS. Pode-se afirmar que uma maior conversão de substrato em produto se dá pela maior quantidade de enzimas para fazer essa tarefa, ou seja, existe uma maior quantidade de enzima imobilizada na superfície do suporte APTES.

De modo a determinar a afinidade entre a enzima invertase com o suporte sintetizado, foi realizado o cálculo da constante de especificidade,  $K_{cat}/K_m$ . Segundo essa constante, valores baixos da relação entre a eficiência catalítica da enzima,  $K_{cat}$ , com a sua afinidade pelo substrato,  $K_m$ , indicam pouca afinidade da enzima pelo substrato. Como esperado, o resultado obtido através dessa constante indicou que a enzima invertase possui uma melhor eficiência quando imobilizada em suportes modificados com APTES.

Com o intuito de verificar a eficiência do processo de imobilização bem como o seu rendimento, foram dosadas a quantidade de proteína total e calculada a atividade enzimática por grama de proteína (atividade específica), estando os resultados apresentados na Tabela 12.

Com os dados da Tabela 12, verifica-se a proximidade dos valores de eficiência de imobilização para os três modificadores, contudo os resultados de atividade catalítica obtida pela enzima imobilizada no suporte modificado com o agente APTES foram bem superiores, resultando em elevados rendimentos de imobilização, que variam de 50,1 a 84,5 para as concentrações da solução enzimática de 0,5 e 0,1 g/L, respectivamente.

Este resultado indica que mais da metade da atividade catalítica da enzima livre foi mantida após o processo de imobilização, mostrando que o procedimento adotado foi adequado, visto que não alterou significativamente a eficiência do biocatalisador quando comparado com os resultados obtidos pelos outros agentes modificadores testados.

Estes resultados vão de acordo com o resultado previsto pelo modelo de Michaelis-Menten que para a enzima livre ajustou um  $V_{max}$  de 0,67 g<sub>glicose</sub>/L.min e para o biocatalisador imobilizado com o agente modificador APTES um  $V_{max}$  de 0,34 g<sub>glicose</sub>/L.min, ou seja, uma redução de aproximadamente 50% da atividade máxima obtida pela enzima na sua forma livre.

Outro fato relevante, é que o valor encontrado na Tabela abaixo vai de encontro ao resultado obtido na Tabela 11, o qual foi dito que a enzima invertase possui uma grande afinidade ao suporte modificado com APTES a uma concentração de 0,14 g/L, tendo essa afirmação comprovada através do cálculo do rendimento de imobilização, onde o maior rendimento (84,5%) foi obtido quando se utilizou 0,1 g/L de enzima invertase.

**Tabela 12 - Valores obtidos pelo método das taxas iniciais para os biocatalisadores.**

<i>Amostras</i>	$A_{enz}^a$	$Q_p^b$	$A_{esp}^c$	$Ef.^d$	$Re^e$
Sol. Enzimática 0,1g/L	0,2510	0,0005	502,00		
Sol. Enzimática 0,25g/L	0,4410	0,0010	412,15		
Sol. Enzimática 0,5g/L	0,5000	0,0020	250,00		
SBA-15/TMOS - 0,1g/L	0,0142	0,000210	67,619	42	13,5
SBA-15/TMOS - 0,25g/L	0,0166	0,000620	26,774	58	6,5
SBA-15/TMOS - 0,5g/L	0,0187	0,001220	15,328	61	6,1
SBA-15/VMOS - 0,1g/L	0,0239	0,000240	99,583	48	19,8
SBA-15/VMOS - 0,25g/L	0,0250	0,000600	41,667	56	10,1
SBA-15/VMOS - 0,5 g/L	0,0430	0,001260	34,127	63	13,6
SBA-15/APTES - 0,1g/L	0,1060	0,000250	424,000	50	84,5
SBA-15/APTES - 0,25g/L	0,1440	0,000700	205,714	65	49,9
SBA-15/APTES - 0,5g/L	0,1926	0,001540	125,065	77	50,1

<sup>a</sup>Atividade Enzimática (g<sub>glicose</sub>/L.min); <sup>b</sup>Quantidade de Proteína (g); <sup>c</sup>Atividade Específica (g<sub>glicose</sub>/L.min.g<sub>proteína</sub>);

<sup>d</sup>Eficiência de imobilização em relação a proteína (%); <sup>e</sup>Rendimento de imobilização (%).

A baixa atividade dos biocatalisadores modificados com TMOS e VMOS vai de encontro ao resultado obtido na análise de MEV, o qual indica que a existência do filme obtido na superfície do suporte impossibilitou a ancoragem das enzimas.

Com isso, conclui-se que os biocatalisadores imobilizados com o agente APTES foram os que apresentaram resultados mais satisfatórios. Isso pode ser explicado pela ligação mais forte existente no grupo amino presente no modificador com o grupo aldeído existente no glutaraldeído, o que facilita a interação suporte-glutaraldeído-enzima.

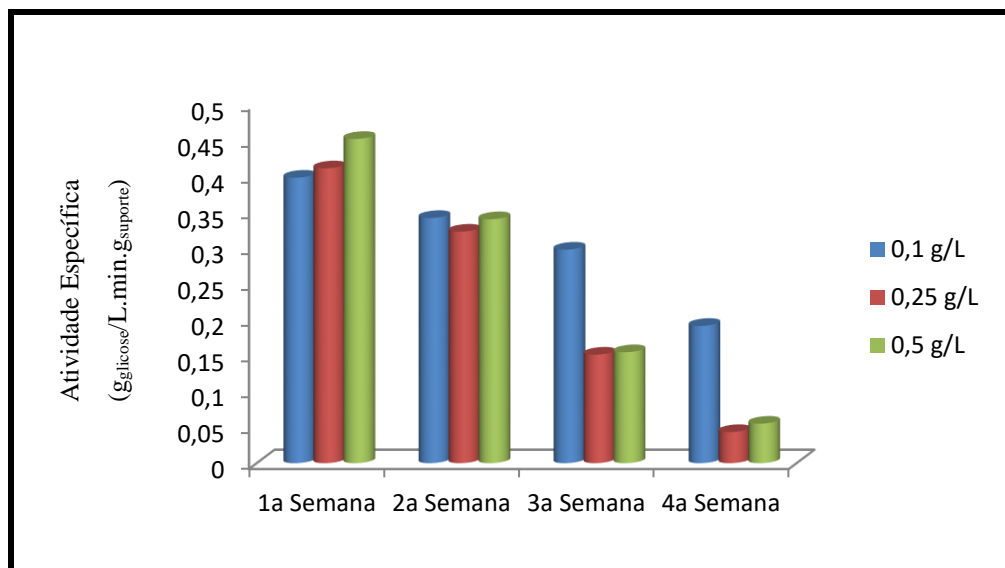
#### **6.4 Estocagem do biocatalisador imobilizado com o agente APTES**

Com base nos resultados obtidos pela imobilização, foi realizado um teste de estocagem com o biocatalisador imobilizado com APTES de modo a verificar a capacidade de estabilidade desse suporte. Esse experimento foi realizado durante o período de 1 mês onde, semanalmente, foi medida a atividade enzimática da solução a partir do método das taxas iniciais. Com isso,

foram realizadas 4 hidrólises referentes a primeira, segunda, terceira e quarta semana, respectivamente.

A partir desses resultados, foi possível construir um gráfico da atividade específica *versus* o tempo, Figura 29.

**Figura 29 – Estudo da estocagem do biocatalisador imobilizado com agente APTES.**



Com os dados do gráfico acima, foi possível calcular a perda de atividade a cada semana em relação a atividade inicial (atividade na primeira semana, ou seja, primeira hidrólise), Tabela 13. O resultado obtido mostra que o biocatalisador imobilizado com 0,1 g/L de solução enzimática, apresentou uma menor perda da atividade ao passar do tempo, indicando ser o mais estável quando comparado com os biocatalisadores imobilizados a 0,25 e 0,5 g/L. Esse resultado vai de acordo com o resultado de  $V_{max}$  obtido para o APTES, onde mostrou que valores de concentração enzimática acima de 0,34 g/L ocorre a saturação da enzima e, conseqüentemente, diminuição da atividade enzimática.

Com base nesse resultado, pode-se concluir que o biocatalisador imobilizado com agente APTES usando 0,1 g/L de solução enzimática foi o que se mostrou mais satisfatório para usos posteriores, sendo também, o que apresentou um maior rendimento de imobilização.

**Tabela 13 – Valores da perda de atividade obtidos para o biocatalisador imobilizado com agente APTES a diferentes concentrações enzimáticas.**

	<i>0,1 g/L</i>		<i>0,25 g/L</i>		<i>0,5 g/L</i>	
	<i>A</i> específica	<i>P</i> atividade	<i>A</i> específica	<i>P</i> atividade	<i>A</i> específica	<i>P</i> atividade
1ª Semana	0,398		0,4110		0,4519	
2ª Semana	0,342	15	0,3230	22	0,3403	25
3ª Semana	0,298	26	0,1520	63	0,1554	66
4ª Semana	0,192	52	0,0436	90	0,0553	88

*A*específica (g glicose/L.min.gsuporte); *P*atividade (%).

## 7 CONCLUSÃO

A superfície do material mesoporoso SBA-15 foi modificada pela introdução de três agentes silanos, TMOS, VMOS e APTES, com o objetivo de estudar qual o melhor suporte a ser utilizado na imobilização da enzima invertase. Os agentes modificadores utilizados provaram que a superfície do material pode ser facilmente alterada pela incorporação de grupos silanos, no entanto, a força dessa interação e, por conseguinte, o grau de lixiviação observado sob condições de reação, depende fortemente da natureza dos grupos funcionais ligados na superfície do material.

Os resultados de TG, FTIR, adsorção de N<sub>2</sub> e MEV mostraram que o agente modificador APTES foi o que apresentou uma melhor interação com a superfície do SBA-15. Esse resultado pode ser explicado pela facilidade de adsorção do grupo amino, devido a formação de uma ligação de hidrogênio entre o N do grupo e o H presente na hidroxila da superfície do suporte, que faz com que o grupamento amino reaja mais rapidamente que os demais grupos funcionais presentes no TMOS e VMOS. A eficiência da funcionalização das amostras pode ser dada na seguinte ordem: SBA-15/APTES > SBA-15/VMOS > SBA-15/TMOS.

O baixo resultado encontrado para o TMOS pode ser explicado pelo volume do grupo fenil que dificultou a ancoragem desse grupo na superfície do SBA-15 e, por consequência, o acesso aos sítios ativos da enzima.

Os resultados obtidos na etapa de imobilização corroboram com os resultados obtidos em todas as técnicas de caracterização. O agente APTES se mostrou o mais favorável a ser utilizado para uma posterior imobilização enzimática, atingindo um rendimento de imobilização de 84%, devendo ser destacado que esse valor foi obtido quando se utilizou uma baixa concentração de enzima (0,1 g/L). Com base nesses resultados, é de fácil percepção que o biocatalisador obtido nesse trabalho poderá ser utilizado em diversos fins, onde a obtenção de resultados satisfatórios é bastante provável.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F.C., GONSALVES, A.A., ARAÚJO, C.R.M., SOARES, N.A., GOULART, M.O.F. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215-1223, 2011.
- AKGOL, S.; KACAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol micropheres. **Food Chemistry**, v. 74, p. 281-288, 2001.
- ALEKSANYAN, E. R.; MARKOSYAN S. Microbial  $\beta$ -fructofuranosidase (survey). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.22, p.133-45, 1986.
- ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T.A. Poly (ethylene oxide) – poly (propylene oxide) – poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, p. 1-46, 1995.
- AMORIM, R. V. S.; MELO, E.S.; CARNEIRO M.G.; LEDINGHAM, G.M.; TAKAKI, C. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p.35-39, 2012.
- ANDREOTTI, I.S. **Sílica fel funcionalizada com piperazina – propriedades de adsorção de íons metálicos em meio etanólico**, Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Campinas, Campinas, SP, 1989.
- AQUARONE E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W., LIMA, U.A. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: Edgard Blücher. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, 2001. p. 387-418.
- ARROYO, M. Inmobilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, p. 23-29, 1998.
- AZEVEDO, A.C., Mineralogia de Sólidos, In: Introdução à química e mineralogia de solos. 2002. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Curso On Line). Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/1095155/resumo-conceitos-pedologicos/6>. Acessado em 20 de abril de 2016.
- BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of



calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 33-41, 2004.

BECK, J.S.; VARTULI, J.C.; ROTH, W.J.; LEONOWICZ, M.E.; KRESGE, C.T.; SCHMITT, K.D.; CHU, C.T-W.; OLSON, D.H.; SHEPPARD, E.W.; McCULLEN, S.B.; HIGGINS, J.B; SCHLENKERT, J.L. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates, **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10834-10843, 1992.

BENVINDO, F.S. **Síntese e Caracterização de Peneiras Moleculares do Tipo SAPO-34 e MeAPSO-34**, Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F.J.; MORAES., F.; ZANIN, G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, v.17, p. 4-7, 2000.

BHANGE, P.; SRIDEVI, N.; , BHANGE, D.S.; PRABHUNE, A.; RAMASWAMY, V. Immobilization of bile salt hydrolase enzyme on mesoporous SBA-15 for co-precipitation of cholesterol, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 218-224, 2015.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: Marcel Dekker. **Biochemical Engineering**. New York, 1997. p. 716.

BOBBIO F.O.; BOBBIO P.A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995.

BOLIS, V.; FURBINI, B.; MARCHESE, L.; MARTRA, G.; COSTA, D. Hydrophilic and hydrophobic sites on dehydrated crystalline and amorphous sílicas. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, p. 497-505, 1991.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BUTTERFIELD, D.A; BHATTACHARYA, D; DAUNERT, S; BACHAS, L. Catalytic biofunctional membranes containing site-specialcally immobilized enzyme arrays: a review. **Journal of Membrane Science**, v.181, p.29-37, 2001.

CANILHA L.; CARVALHO W. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX, p. 48-57, 2006.

CANTARELLI C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, v.3, p. 3-20, 1989.

CAO. L. **Carrier-bound immobilized enzymes, principles, applications and design**. The Netherlands, p. 531, 2005.

CHEN, L.Y.; PING, Z.; CHAH, G.K.; SIMON, G.A. A comparison of post-synthesis alumination and sol gel synthesis of MCM-41 with high framework aluminum content. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, p. 231-242, 1999.

CHIBATA I. **Immobilized Enzymes: Research and Development**. New York: Kodonsha-Tokyo, 1978.

CHOI, D.G.; YANG, S.M. Effect of two step sol gel reaction on the mesoporous silica structure, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 127-132, 2003.

CIESLA, U.; SCHUTH, F. Ordered porous solids: recent advances and prospects, **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, p. 131-149, 1999.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1998.

CORCORAN E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: Wiseman. **Topics in Enzyme and fermentation biotechnonology**. England, p. 12-50, 1985.

COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO, E. J.; MAUGERI FILHO, F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife, PE, **Anais do simpósio nacional de fermentação**, 2005.

CRUZ, F.T. **Efeito das condições de preparação da [CTA<sup>+</sup>]-SiMCM-41 na atividade da transesterificação**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2010.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3. ed. London, 1979.

DOADRIO, A. L.; SOUSA, E.M.B.; DOADRIO, J.C.; PÉREZ – PARIENTE, J.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGÍ M., Mesoporous SBA-15 hplc evaluation for controlled gentamicin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 125-132, 2004.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus Níger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p.525-528, 2010.

FABER K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. Berlin, 2011.

FIGUEIREDO, L.M.; MELO, M. N. Síntese de pseudoboemitas obtidas pelo processo sol-gel e tratadas com octadecilamina e sua incorporação em polimerização *in situ* para a obtenção de nanocompósitos. In: VII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2011.

FLODSTROM, K.; TEIXEIRA, C.V.; AMENITSCH, H.; ALFREDSSON, V.; LINDÉN, M. In situ synchrotron small-angle X-ray scattering/X-ray diffraction study of the formation of SBA-15 mesoporous silica. **Langmuir**, v. 20, p. 4885-4891, 2004.

FOSCHIERA J.L.; PIZZOLATO J.L.; BENVENUTTI, E.V. FTIR thermal analysis on organofunctionalized sílica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 159-164, 2001.

FRYXELL, G.E.; RIEKE, P.C.; WOOD, L.L.; ENGELHARD, M.H.; WILLIFORD, R.E.; GRAFF, G.L.; CAMPBELL, A.A.; WIACEK, R.J.; LEE, L.; HALVERSON, A. Nucleophilic Displacements in Mixed Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 12, p. 5064-5075, 1996.

GALACHO, P. C. G. P. **Materiais com estrutura mesoporosa ordenada contendo titânio:Preparação, Caracterização, Estudos de Adsorção e Propriedades Catalíticas**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Évora, Évora, Portugal, 2005.

GALARNEAU, A.; CAMBON, H.; DI RENZO, F.; RYOO, R.; CHOI R.; FAJULA F. Microporosity and connections between pores in SBA-15 mesostructured silicas as a function of the temperature of synthesis. **New Journal of Chemistry**, v. 27, p. 73-79, 2003.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes**, Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 3, p. 33-38, 1981.

GAVA, A.J. **Enzimas na tecnologia de alimentos**. In: Princípios de tecnologia de alimentos, São Paulo, 2007.

GAVIN, H.P. The Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting problems, Department of civil and environmental engineering, Duke University, 2016. Disponível em: <http://people.duke.edu/~hpgavin/ce281/lm.pdf>. Acessado em 18 de maio de 2016.

GELEST, I.N.C. Silane Coupling Agentes – Connecting Across Boundaries., Literature, 2010. Disponível em <http://www.gelest.com/literature.asp>, Acessado em 18 de abril de 2016.

GIDO, S.P.; SCHWARK, D.W.; THOMAS, E.L.; GONÇALVES, M.C. Observation of a non-constant mean curvature interface in an ABC triblock copolymer. **Macromolecules**, v. 26, p. 2636-2640, 1993.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica. **Cerâmica**, v. 34, p. 163-164, 1988.

GURSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 57, p. 57-65, 2003.

HATA, H.; SAEKI, S.; KIMURA, T.; SUGAHARA, Y.; KURODA, K. Adsorption of Taxol into Ordered Mesoporous Silicas with Various Pore Diameters. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 1110-1119, 1999.

HERMANOVÁ, S.; ZAREVÚCKÁ, M.; BOUSA, D.; PUMERA, M.; SOFER, Z. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. **Nanoscale**, v. 7, p. 5852-5858, 2015.

HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and an  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus Oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 26–32, 2000.

HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J.; FROBA, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 3216-3251, 2006.

HUMPHREY, H.P.; YIUN, P.A.; WRIGHT A.; NIGEL, P. Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 15, p. 81–92, 2014.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Electronic version. STP, 1972. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>. Acessado em: 12 de abril de 2016.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Electronic version. STP, 1985. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>. Acessado em: 20 de abril de 2016.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v.10, p.157-176, 2000.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLIEVIC, Z.; PRODANOVIC, R.. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 269-278, 2013.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 126-139, 2004.

KRESGE, L. C.T.; ROTH, M.E.; VARTULI, W.J.; BECK, J.C. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p.710-712, 1992.

KRUK, M.; JARONIEC M. Characterization of the porous structure of SBA-15. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 1961-1968, 2000.

LIMA, J.D.F. **Obtenção de sílicas mesoporosas SBA-15 e SBA-16 com poros grandes**. Trabalho de conclusão de curso (TCC em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

LIU, Z.; DONG, Z.; HAN, B.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; HOU, Z.; HE, J.; JIANG, T. Preparation of mesoporous MCM-41/poly(acrylic acid) composites using supercritical CO<sub>2</sub> as a solvent. **Journal of Materials Chemistry**, v.13, p. 1373-1377, 2003.

LOH, W. Block copolymers micelles. In: Webster. **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**, 2002, p. 802-813.

LUAN, Z.; FOURNIER, J. A.; WOOTEN, J. A.; MISER, D. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified mesoporous SBA-15 silica molecular sieves. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 83, p. 150-158, 2005.

LUAN, Z.; HARTMANN, M.; ZHAO, D.; ZHOU, W.; KEVAN, L. Alumination and ion exchange of mesoporous SBA-15 molecular sieves. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 1621-1627, 1999.

LUECHINGER M.; PRINS R.; PIRNGRUBER G. D. Functionalization of sílica surfaces with mixtures of 3-aminopropyl and methyl groups. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 85, p. 111-118, 2005.

MARAKATTI, V.S. Mesoporous Materials – Synthesis and Applications, 2013. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/VijayMarakatti/mesoporous-materials>. Acessado em 12 de abril de 2016.

MARIOTTI, M. P. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de  $\beta$ -galactosidase imobilizada**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2000.

MARQUEZ, L.D.S.; CABRAL, B.V.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 86-92, 2008.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIEIRA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GQUISAN J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 456-462, 2005.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, F.; HEIZIR F.; GIORDANO, R. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, p.245-251, 2013.

MESA, M.; SIERRA, L.; GUTH, J. L. Contribution to the study of the formation mechanism of mesoporous SBA-15 and SBA-16 type silica particles in aqueous acid solutions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.112, p.338–350, 2008.

MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems. In: Weithgler. **Advances in biochemical engineering**, 1978, p. 10.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. Kinetics of invertase action. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MOFFAT, G.; WILLIAMS, R.; WEBB, C.; STIRLING, R. Selective separations in environmental and industrial processes using magnetic Carrier technology. **Minerals**, v.7, p. 1039-1056, 1994.

MONNIER, A.; SCHUTH, F.; HUO, Q.; KUMAR, D.; MARGOLESE, D.; MAXWELL, R.S.; STUCKY, G.D.; KRISHNAMURTY, M.; PETROFF, P.; FIROUZI, A.; JANICKE, M.; CHMELKA, B.F. Cooperative formation of inorganic-organic interfaces in the synthesis of silicate mesostructures. **Science**, v. 261, p. 1299-1303, 1993.

MORÉ J.J. The Levenberg–Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. **Lecture Notes in Math**, v.1, p. 105–116, 1977.

MOTTA V. T. Enzimas. In: MedBook. **Bioquímica básica**, Rio de Janeiro, p. 68-101, 2011.

MOURA, A.M.A. **Estudo de pré-formulação de forma sólida oral contendo aminofilina**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2001.

MUÑOZ, B.; RÁMILA, A.; PÉREZ-PARIENTE, J.; DÍAZ, I.; VALLET-REGÍ, M. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. **Chemistry of materials**, v. 15, p. 500-503, 2003.

NAGASHIMA, M. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.49-58, 1984.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, p. 1109-1115, 1916.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química - Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2002.

NISHIMURA, M.; ASAKURA, K.; IWASAWA, Y. New inorganic oxide attached Nb catalysts active for propene metathesis, **Chemistry Letters**, v. 15, p. 1457-1460, 1986.

PALOMO, J.M.; SEGURA R.L.; FERNANDEZ-LORENTE G.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GUISÁN J.M. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 704-707, 2007.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 201, p. 16, 2010.

PEREIRA, F.A. **Síntese, caracterização e avaliação catalítica do alumínio silicato mesoestruturado Al-MCM-41 na transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

PEREIRA, R.M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lípases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. Trabalho de conclusão de curso (TCC em Química), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

PRADELLA, J.G.C., Reatores com células imobilizadas. In: Edgard Blucher. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, 2001, p. 355-372.

RAMAN, N.K.; ANDERSON, M.T.; BRINKER, C.J. Template-based approaches to the preparation of amorphous, nanoporous. **Chemistry of materials**, v. 8, p. 1682-1701, 1996.

ROCHESTER, C.H.; YONG, G.H. Infrared study of sílica immersed in 2,2,4-trimethylpentane + toluene+propionitrile mixtures. **Journal of the Chemical Society**, v. 76, p. 1466-1475, 1980.

ROSEVEAR, A. Immobilized Biocatalysts: a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology B – Biotechnology**, v. 34, p. 127-150, 1984.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized enzymes and cells**, p. 203-209, 1987.



SANTOS, A.F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

SENA, F.C. **Síntese de peneira molecular mesoporosa Al-SBA-15 por diferentes rotas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

SEVIMLI, F.; YILMAZ, A. Surface functionalization of SBA-15 particles for amoxicillin delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 158, p. 281–291, 2012.

SIMÕES, A. S.; MORI, R.Y., FARIA, R.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Desempenho da matriz híbrida  $\text{SiO}_2$ -quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p.33-38, 2010.

SING, K.S.W.; EVERETT, D.H.; HAUL, R.A.W.; MORCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, p. 603-619, 1985.

SKOOG, F.; WEST, C.; HOLLER, M.; CROUCH, H. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Editora Thomson, 2008.

SONG, S.W.; HIDAJAT, K.; KAWI, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. **Langmuir**, v. 21, p. 9568-9575, 2005.

SOUSA, A. **Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas para liberação controlada de drogas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

SOUSA, A.; SOUSA, E.M.B. Influence of synthesis temperature on the structural characteristics of mesoporous silica. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 3451-3456, 2006.

STUCK, G.D.; MARGOLESE, D.I.; HUO, Q. Surfactant control of phases in the synthesis of mesoporous silica-based materials. **Chemistry of Materials**, v. 8, p. 1147-1160, 1998.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. Immobilized cells: principles and applications. **Cambridge University Press**. p. 257, 1988.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1325-1331, 2007.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York, p. 454, 1998.

VALLET-REGÍ, M.; DOADRIO, J.C.; DOADRIO, A.L.; IZQUIERDO-BARBA, I.; PEREZ-PARIENTE, J. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. **Solid State Ionics**, v. 172, p. 435-439, 2004.

VIEIRA, E.F.S.; SIMONI, J.A.; AIROLDI, C. Interaction of cations with SH-modified silica gel: thermochemical study through calorimetric titration and direct extent of reaction determination. **Journal of Materials Chemistry**, v.7, p.2249-2252, 1997.

VOGEL, A. **Química Orgânica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos S.A., 1984.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. **Macromolecules**, v. 27, p. 4145-4159, 1994.

XU, R.; PANG, W., YU, J.; HUO, Q.; CHEN, J. **Chemistry of Zeolites and Related Porous Materials: Synthesis and Structure**, 2007.

XUE, J.M.; SHI, M. Mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v.98, p. 209-217, 2004.

YANG, L.M.; WANG, Y.J.; LUO, G.S.; DAÍ, Y.Y. Functionalization of SBA-15 mesoporous silica with thiol or sulfonic acid groups under the crystallization conditions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, p. 275-282, 2005.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: Said/Pietro. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 2004, p. 35-85.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B.F.; STUCKY, G.D. Synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 6024-6036, 1998.

ZHOLOBENKO V.L.; KHODAKOV, A.Y.; IMPEROR-CLERC, M.; DURAND, D.; GRILLO, I. Initial stages of SBA-15 synthesis: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 142, p. 67-74, 2008.

## APÊNDICE

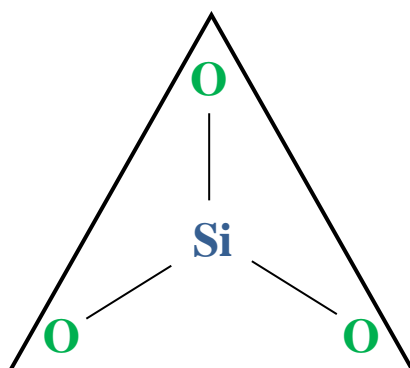
### APÊNDICE A

Quando o mineral está se formando, os ânions tendem a se agrupar em torno dos cátions, até atingirem o equilíbrio eletrostático. O Silício ( $\text{Si}^{+4}$ ), por exemplo, torna-se mais estável quando ligado a quatro átomos de Oxigênio ( $\text{O}^{-2}$ ), dizendo-se, assim, que o silício coordena 4 Oxigênios. O número de íons que um elemento qualquer coordena é chamado de número de coordenação, e este número é função do tamanho relativo dos íons, entre o íon coordenante (Silício) e o íon coordenado (Oxigênio).

A base de cálculo para determinar a quantidade de agente funcionalizante a ser utilizada na modificação da superfície do SBA-15 foi realizada considerando a distribuição dos átomos na ligação entre o SBA-15 e os agentes funcionalizantes. O átomo de silício presente na superfície do SBA-15 se liga, em uma extremidade, ao grupo reativo do agente funcionalizante e na outra extremidade aos oxigênios presentes na superfície do material mesoporoso, como pode ser visto na Figura 19. Com isso, apenas 3 átomos de oxigênio estão ligados ao átomo de silício central, já que o outro átomo de oxigênio, da quarta ligação, está ligado ao agente reativo do modificador.

Assim, de modo a facilitar os cálculos, foi considerado que os átomos de oxigênio estão arranjados ao redor do átomo de silício semelhantemente a forma de um triângulo equilátero, Figura 30. A área do triângulo foi calculada levando em consideração os raios iônicos do oxigênio ( $R_{\text{O}_2} = 0,140 \text{ nm}$ ) e do silício ( $R_{\text{Si}} = 0,042 \text{ nm}$ ) (AZEVEDO, 2002).

**Figura 30 – Distribuição dos átomos de oxigênio ao redor do átomo de silício.**



Fonte: AUTORA, 2016.

$$\text{Lado do triângulo} = (4 \times R_{\text{O}_2}) + (2 \times R_{\text{Si}})$$

$$\text{Lado do triângulo} = (4 \times 0,140) + (2 \times 0,042)$$

$$\text{Lado do triângulo} = 0,644 \text{ nm}$$

Substituindo o lado do triângulo na fórmula da área de um triângulo equilátero, afim de determinar a área da molécula de SiO<sub>3</sub>, tem-se:

$$A_{\text{Molécula}} = \sqrt{3} \frac{l^2}{4} \therefore A_{\text{Molécula}} = 1,79 \times 10^{-19} \text{ m}^2$$

Antes de se calcular o número de moles do agente funcionalizante para formar uma monocamada na superfície do SBA-15, é necessário calcular o número de moléculas capazes de formar essa monocamada por grama de sólido.

$$\text{Número de moléculas/g}_{\text{sólido}} = \frac{A_{\text{Material}}}{A_{\text{Molécula}}}$$

Sendo:  $A_{\text{Material}}$  = Valor da área superficial obtido na análise de adsorção de nitrogênio (m<sup>2</sup>/g) para o SBA-15, Tabela 9.

Logo:

$$\text{Número de moléculas/g}_{\text{sólido}} = 4,5 \times 10^{21} \text{ moléculas/g}$$

Levando em consideração o número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$ ) de modo a determinar o número de moles dos agentes funcionalizantes, faz-se:

$$\text{Número de moles dos agentes funcional./g}_{\text{sólido}} = \frac{\text{Número de moléculas}}{\text{Número de Avogadro}}$$

$$\text{Número de moles dos agentes funcional./g}_{\text{sólido}} = 7,47 \times 10^{-3} \text{ mol/g}_{\text{SBA-15}}$$

Com o auxílio da Tabela 6, onde estão presentes os pesos moleculares de cada modificador, foi possível calcular a quantidade de agentes funcionalizantes necessários para formar uma monocamada no material mesoporoso SBA-15, Tabela 14.

**Tabela 14 – Quantidade de agente funcionalizante utilizada na etapa de modificação.**

<i>Agente Funcionalizante</i>	<i>Massa pesada (g)</i>
TMOS	1,481
VMOS	1,107
APTES	1,340

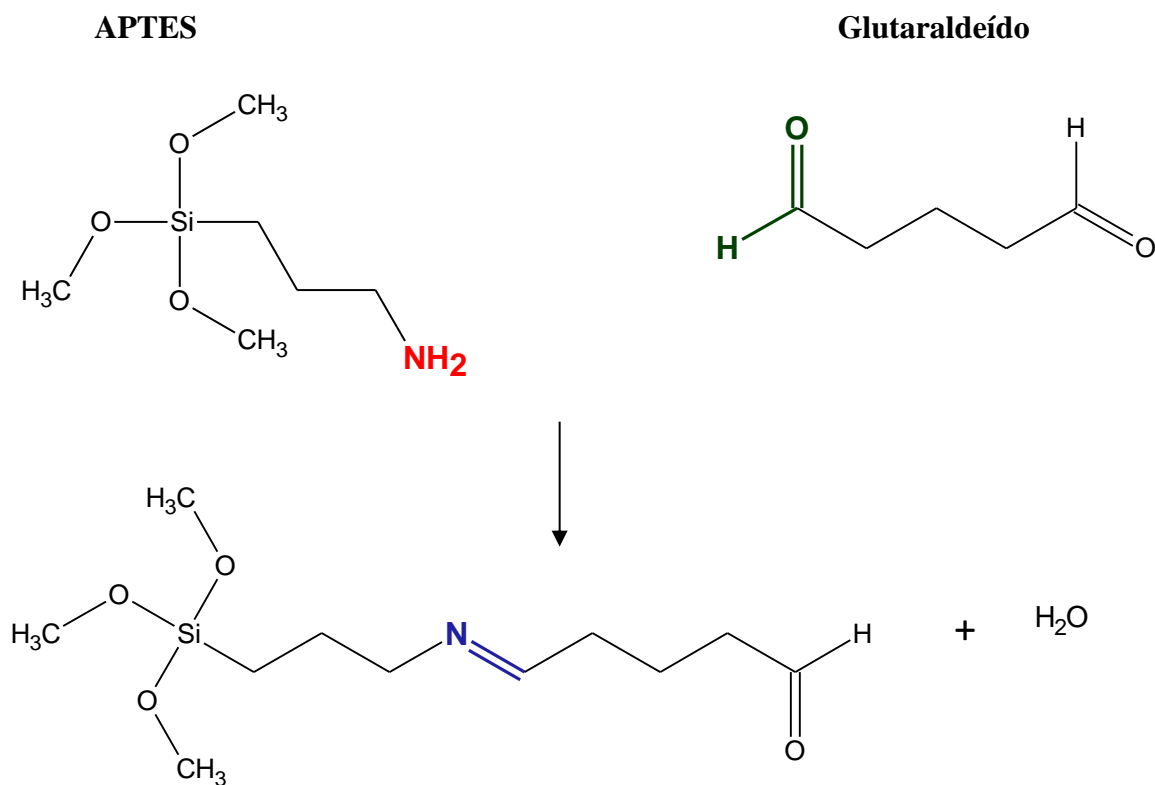
Fonte: AUTORA, 2016.

## APÊNDICE B

Os mecanismos de reação entre o glutaraldeído e os agentes funcionalizantes podem ser escritos da seguinte forma:

### 1. Reação entre o glutaraldeído e o APTES

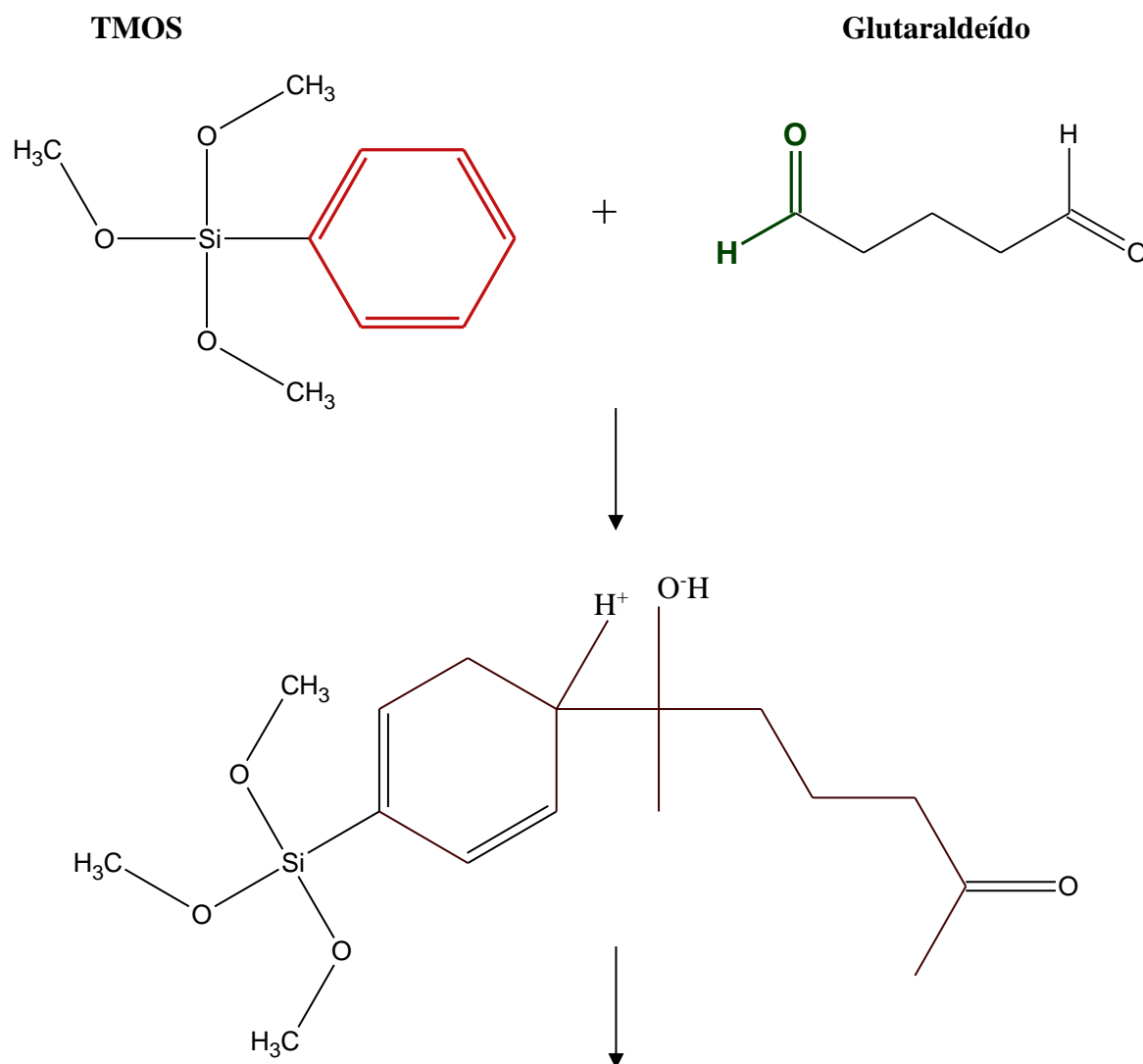
A ligação entre o glutaraldeído e o APTES ocorre com a reação entre o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) presente no APTES com o aldeído (H-C=O) existente no glutaraldeído (ABREU et al., 2011).

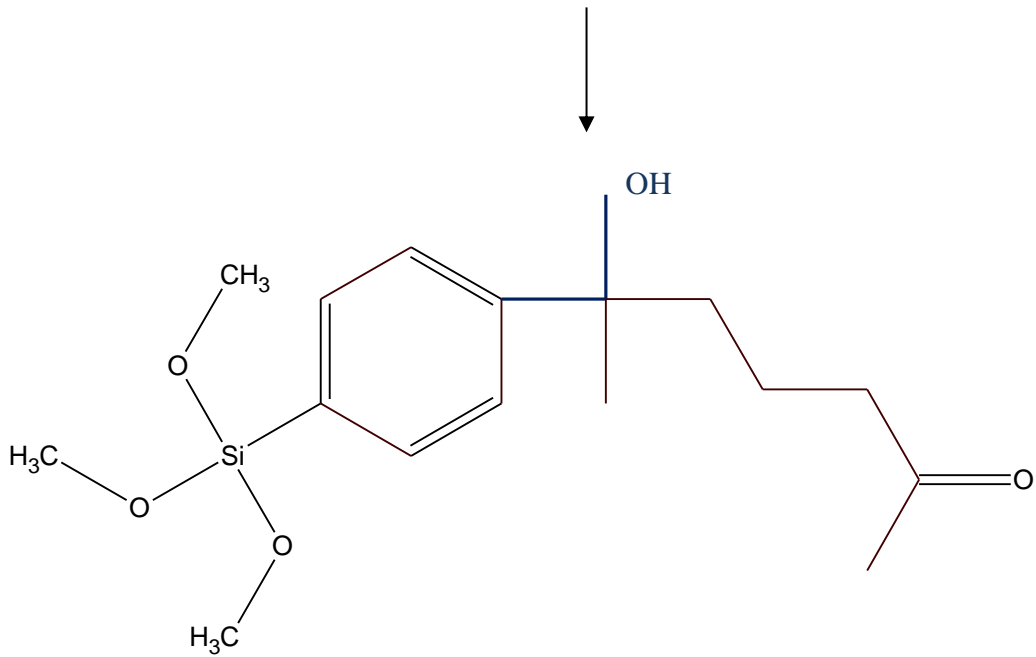


## 2. Reação entre o glutaraldeído e o TMOS e VMOS

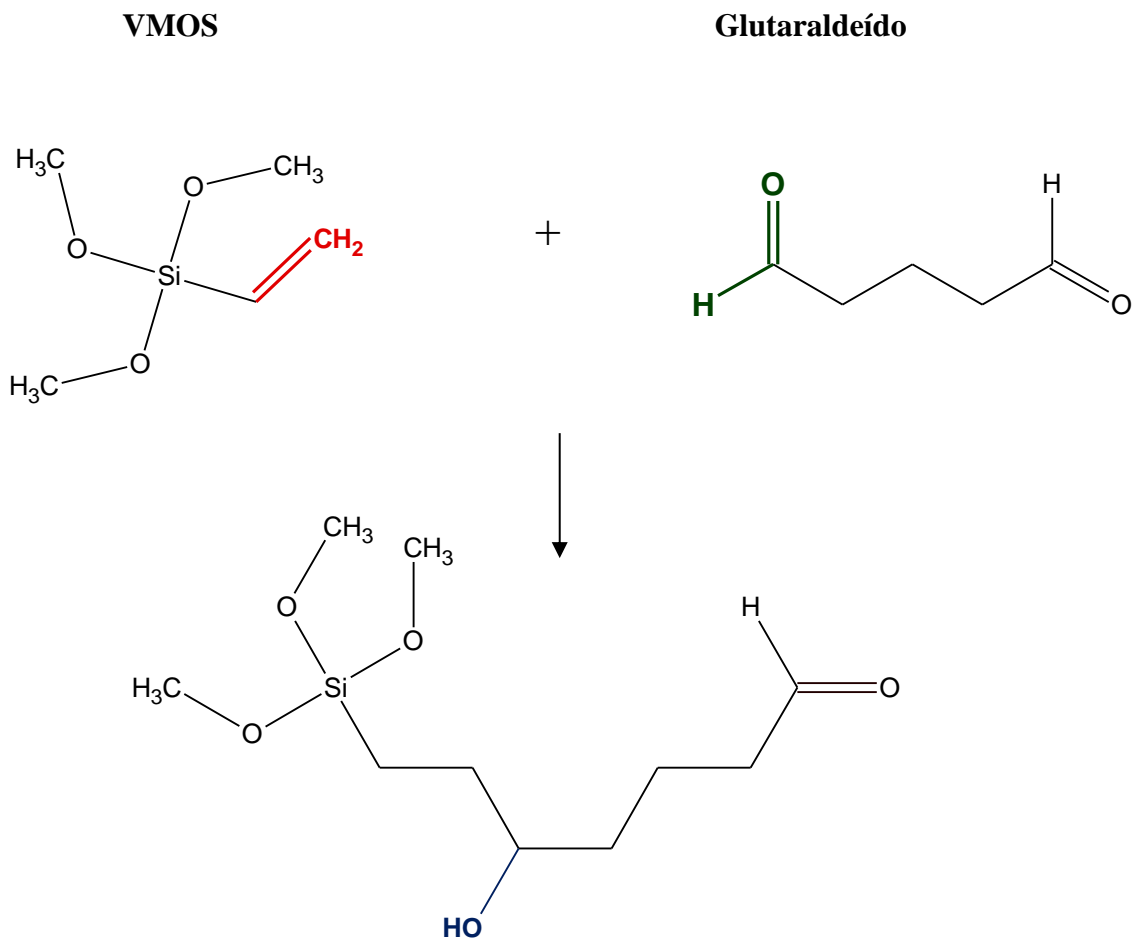
A reação entre o glutaraldeído e os agentes funcionalizantes TMOS e VMOS, não é algo tão simples de ser explicado. Porém, após uma busca na literatura algumas hipóteses foram adotadas e descritas abaixo.

Na reação entre o glutaraldeído e o TMOS, sugere-se que o grupamento fenil presente no TMOS reage com o carbono do aldeído presente no glutaraldeído fazendo com que ele perca a dupla ligação e o oxigênio fique carregado negativamente. Em seguida, o oxigênio reagirá com o próton  $H^+$  fazendo com que a dupla ligação se restabeleça, como demonstrado abaixo.





Já para o VMOS, acredita-se que a reação ocorra quando o carbono presente na dupla ligação do grupo vinil, reaja com o carbono do aldeído presente no glutaraldeído. O hidrogênio presente no carbono da dupla ligação reage com o oxigênio, resultando no OH.



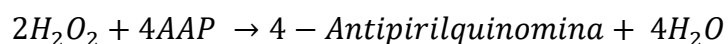
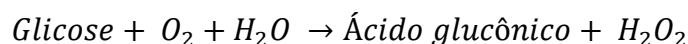


## APÊNDICE C

### DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

As concentrações de glicose obtidas nas reações de hidrólise, conforme item 5.6.1, foram determinadas fazendo-se uso do kit GLUCOX 500. Trata-se de um método enzimático colorimétrico, onde se usa uma enzima específica para glicose: glicose oxidase.

Ao adicionar-se glicose em uma solução tampão de fosfatos em pH 7,4, contendo glicose oxidase, peroxidase, 4-Aminoantipirina (4-AAP) e p-hidroxibenzoato, processam-se as seguintes reações:



O produto formado pela oxidação de 4-Aminoantipirina (4- Antipirilquinomina) é de coloração avermelhada e sua intensidade, diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro com absorção máxima de 510 nm.

O kit é composto por dois reagentes:

*Reagente A:* Tampão/enzimas – Cada frasco contém, sob forma de pó, tampão fosfato e a enzima glicose-oxidase.

*Reagente B:* Solução padrão – Solução aquosa contendo 100 mg/dl de glicose.

De acordo com o kit, para ler a absorbância das amostras deve-se colocá-las em contato com o chamado Reagente Cor. Esse reagente é preparado transferindo todo o conteúdo do *Reagente A* para um balão volumétrico de 250 mL e completando seu volume com água destilada. Feito isso, as absorbâncias das amostras são lidas misturando 20 µL das amostras com 2,0 mL do Reagente Cor. A quantidade de solução padrão usado nos testes foi de 20 µL, sugerido pelo kit de glicose oxidase.

Com os valores da absorbância, foi possível determinar a concentração de glicose existente em cada amostra e, em seguida, construir um gráfico de concentração de glicose *versus* tempo, a fim de determinar as atividades enzimáticas com base na inclinação da reta.

## APÊNDICE D

A curva utilizada como base de cálculo para a determinação de proteína dos biocatalisador imobilizado está representada abaixo. A partir desta curva e dos valores de absorbância encontrado para cada amostra, foi possível determinar a quantidade de proteína, expostas na Tabela 11.

**Figura 31 – Curva padrão de albumina (BSA).**

