



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PREPARAÇÃO DE SÍLICAS ORGANOFUNCIONALIZADAS
PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia*

André Leonardo Patrício Silva



João Pessoa, PB- Brasil
Setembro/2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PREPARAÇÃO DE SÍLICAS ORGANOFUNCIONALIZADAS PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia*

*André Leonardo Patrício Silva

Dissertação apresentada como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Química, área
de concentração inorgânica pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador (a): Maria Gardênnia da Fonseca

*Bolsista CNPq

João Pessoa – PB – Brasil
Setembro/2012

S586p *Silva, André Leonardo Patrício.*

Preparação de sílicas organofuncionalizadas para imobilização da lipase de Burkholderia cepacia / André Leonardo Patrício Silva.-
- João Pessoa, 2012.

107f.

Orientadora: Maria Gardênnia da Fonseca

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Química. 2. Sílica gel organofuncionalizada. 3.
Burkholderia cepacia lipase. 4. Imobilização.

Dedicatória

Ao meu pai (*in memoriam*) e a minha família e minha esposa Aline

Agradecimentos

Aos professores Luiza Arakaki e Tomaz Arakaki o despertar e incentivo na realização deste trabalho, além do apoio incomensurável.

A minha orientadora Maria Gardênnia a oportunidade, confiança e apoio na realização deste projeto de dissertação.

Ao professor Cláudio Ailroldi, Ramon e Vaeudo o encaminhamento das caracterizações no instituto de Química da Unicamp.

Aos professores José Geraldo, Juliana Alves e Flávio Honorato as valiosas contribuições ao trabalho.

Aos meus amigos e amigas da vida acadêmica e fora dela que sempre me serviram de inspiração na esfera pessoal e profissional.

A minha família a educação e apoio irrestrito às minhas aspirações.

A minha esposa o companheirismo em todas as fases boas e difíceis da minha vida.

Ao CNPq a bolsa de estudo.

Finalmente, a todos os meus mestres educadores que fizeram parte da minha trajetória escolar e acadêmica, direta ou indiretamente, pois seus esforços e paixão dedicados à educação sempre me serviram de inspiração e suporte a minha visão de mundo e as minhas aspirações profissionais.

Muito obrigado!

Epígrafe

A idéia

*De onde ela vem?! De que matéria bruta
Vem essa luz que sobre as nebulosas
Cai de incógnitas criptas misteriosas
Como as estalactites numa gruta?!
Vem da psicogenética e alta luta
Do feixe de moléculas nervosas,
Que, em desintegrações maravilhosas,
Delibera, e depois, quer e executa!*

*Vem do encéfalo absconso que a constringe,
Chega em seguida às cordas do laringe,
Tísica, tênue, mínima, raquílica ...*

*Quebra a força centrípeta que a amarra,
Mas, de repente, e quase morta, esbarra
No mulambo da língua paralítica.*

(Augusto dos Anjos)

Título: Preparação de sílicas organofuncionalizadas para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*

Autor: André Leonardo Patrício Silva

Orientador: Maria Gardênnia da Fonseca

A obtenção de lipases imobilizadas estáveis é um dos maiores desafios para a biotecnologia moderna que envolve o emprego destas enzimas em processos biocatalisados. A aplicação comercial desses biocatalisadores depende de métodos eficientes de imobilização e da utilização de um suporte apropriado para assegurar estabilidade às enzimas. Nessa direção, o escopo do presente trabalho envolveu a preparação de suportes quimicamente modificados a partir da sílica gel. As sílicas organofuncionalizadas foram preparadas por silanização pela rota heterogênea, utilizando os compostos 3-aminopropiltrimetoxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano originando os sólidos denominados Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Cl, respectivamente. Os sólidos Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Cl reagiram subsequentemente com cloreto cianúrico e o com o espaçador 1,6 diamino-hexano, seguido do ataque covalente do cloreto cianúrico resultando nas matrizes Sil-propil-N-CC e Sil-propil-Hex-CC. A sílica gel e os sólidos modificados foram caracterizados pelas técnicas de termogravimetria, medidas de adsorção/dessorção de nitrogênio, análises elementar de CHN, ressonância magnética nuclear de Si²⁹ e C¹³ e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os suportes modificados foram utilizados na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*, sendo que o desempenho catalítico e estabilidade dos derivados enzimáticos imobilizados foram investigados em reações de hidrólise do éster palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) em cinco ciclos reacionais consecutivos. Os resultados das preparações dos suportes mostraram o ancoramento da molécula triazínica nas superfícies silanizadas. No material Sil-propil-N-CC foi observado um aumento do teor de nitrogênio obtido da análise elementar, que correspondeu a 1,82% de N referente à introdução do grupo amino e 3,08% de N após a reação com o composto triazínico. No caso do material Sil-propil-Cl, observou-se um aumento na porcentagem de nitrogênio do suporte contendo espaçador (2,13% N) e após a reação com o cloreto cianúrico (3,6% N). Os testes de atividade hidrolítica e estabilidade das lipases imobilizadas mostraram 2910, 3000 e 3430 U/g, respectivamente para os suportes contendo aminopropil e o anel triazínico, cloropropil e o espaçador e a superfície com espaçador e o anel triazínico. Nos ensaios catalíticos foi observada uma maior tendência de perda de estabilidade na ausência do espaçador. Os resultados obtidos mostraram que as reações de modificação química da superfície da sílica possibilitaram o ancoramento covalente do cloreto cianúrico e a presença de um espaçador possibilitou maior atividade e estabilidade aos biocatalisadores imobilizados.

Palavras chave. Sílica gel organofuncionalizada. *Burkholderia cepacia* lipase. Imobilização.

Title: Preparation of organofunctionalized silicas for the immobilization of the *Burkholderia cepacia* lipase

Author: André Leonardo Patrício Silva

Supervisor: Maria Gardênnia da Fonseca

The preparation of stable immobilized lipases is one of the great challenges for modern biotechnology that involves the use of these enzymes in biocatalyzed processes. The commercial application of these biocatalysts depends of an efficient immobilization and the appropriate use of supports to ensure stability to enzymes. This work focused on the study of the preparation of chemically modified supports derived from silica gel. The organofunctionalized silicas were prepared by silylation through of the heterogeneous route using the compounds 3-aminopropyl- and 3-chloropropyl trimethoxysilane resulting in the solids named Sil-propil-NH₂ and Sil-propil-Cl, respectively. The solids Sil-propil-NH₂ and Sil-propil-Cl reacted subsequently with the cyanuric chloride and 1,6 diaminehexane as spacer, followed by covalent attack of cyanuric chloride resulting in the matrices Sil-propil-N-CC and Sil-propil-Hex-CC. Silica gel and the modified solid were characterized measures of adsorption / desorption of nitrogen, CHN elemental analysis, thermogravimetry (TG), Si²⁹ and C¹³ NMR and FTIR spectroscopy. The modified support were used in the immobilization of the *Burkholderia cepacia* lipase, and the catalytic performance and stability of the immobilized enzyme derivatives were investigated in the hydrolysis reaction of p-nitrophenylpalmitate (pNPP) in five consecutive reaction cycles. The results of the preparation of matrices showed the anchoring of the triazine molecule onto silanized surface. For material Sil-propil-N-CC was observed the increasing of the nitrogen content as indicated CNH elemental analysis, that corresponded to 1.82% of N due the introduction of amino group and 3.08% of N after the reaction of the triazine molecule. For the material Sil-propil-Cl, it was observed the increasing in the nitrogen percentage for the support with spacer (2.13% of N) and after the reaction with cyanuric chloride (3.6% of N). The tests of catalytic activity operational stability of the immobilized enzymes onto supports were 2910, 3000 e 3430 U/g, respectively, for supports with aminopropyl and triazine molecule, chloropropyl with the spacer and for the surface with spacer and triazine molecule. For catalytic test were observed a higher tendency for loss of stability for support without spacer. The obtained results showed that the chemical modification reactions of silica gel enabled the covalent anchoring of the cyanuric chloride and the use of spacer resulted in higher catalytic activity and stability for the immobilized bio catalysts.

Key words. Organofunctionalized sílica gel. *Burkholderia cepacia* lipase. Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral para reação catalisada por lipases não-específicas	25
Figura 2 - Esquema geral para reações catalisadas por lipases 1,3 específicas	26
Figura 3 - Representação da estrutura secundária do entrelaçado α/β hidrolase de uma lipase. A tríade catalítica é indicada por pontos pretos	27
Figura 4 - Esquema geral de reações catalisadas por lipases. R^1 , R^2 , R^3 representam cadeias carbônicas genéricas	29
Figura 5 - Mecanismo catalítico realizado por lípases	30
Figura 6 - Tipos de imobilização de enzimas	35
Figura 7 - Representação esquemática de interações eletrostáticas entre enzima e suporte carregados	37
Figura 8 - Esquema de mudança conformacional de lipase e sua imobilização em uma superfície hidrofóbica	38
Figura 9 - Representação esquemática do ataque covalente de lipase em um suporte quimicamente ativado contendo um espaçador. Um grupo amino da enzima pode atacar um grupo reativo no suporte ativado	39
Figura 10 - Representação esquemática da preparação de superfícies hidrofóbicas a base de sílica contendo grupos (a) octil e (b) fenil pendentes através de processo sol gel	45
Figura 11 - Representação esquemática de preparações de suportes ativados via processo sol gel para aplicação na imobilização covalente de lípases	46
Figura 12 - Representação esquemática de reações de funcionalização por <i>grafting</i> com organosilanos trifuncionais em superfície de sílica	47
Figura 13 - Funcionalização com organosilano epoxi (a) pelo método <i>grafting</i> (enxerto) de uma superfície de suporte hidroxilada, seguido de um ataque (b) multipontual da enzima	48
Figura 14 - Ativação de suporte por enxerto para imobilização de enzima	49
Figura 15 - Representação esquemática de estruturas de sílica (a) unidade tetraédrica, (b) estrutura regular ordenada e (c) estrutura amorfa	50
Figura 16 - Representação esquemática da formação de grupos $\equiv\text{Si-OH}$ na superfície de sílica gel, sendo (a) polimerização por condensação e (b) re-hidroxilação por tratamento em meio aquoso	52
Figura 17 - Tipos de grupos silanóis presentes na superfície de sílica gel	52
Figura 18 - Tipos de reações que podem ocorrer na superfície da sílica gel. Substituição eletrofílica (S_{Ei}), substituição nucleofílica (S_{Ni}), adição eletrofílica (Ad_E) e adição nucleofílica (Ad_N)	55
Figura 19 - Reação de substituição eletrofílica (S_{Ei}) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com formação de um estado de transição quase cíclico. Onde, $X = \text{Cl, OR, NR}_2$; $R =$ grupo alquil e $Y =$ metal, exemplo Si	56
Figura 20 - Representação da eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície da sílica gel	58
Figura 21 - Processos de desidroxilação e re-hidroxilação na superfície da sílica gel	59
Figura 22 - Estrutura molecular do cloreto cianúrico	69

Figura 23 - Curvas termogravimétricas dos materiais (a) Sílica gel, (b) Sil-propil-NH ₂ e (c) Sil-propil-N-CC	87
Figura 24 - Curvas TG e DTG dos materiais obtidos na reação de organofuncionalização. Sendo, Sil-propil-Cl (a), Sil-propil-hex (b) e Sil-propil-hex-CC (c)	88
Figura 25 - Espectros na região do infravermelho dos materiais (a) sílica gel (b) Sil-propil-NH ₂ e (c) Sil-propil-N-CC	91
Figura 26 - Grupos silanóis e siloxanos presentes na estrutura da sílica	92
Figura 27 - Espécies tipo T ⁿ que podem estar presentes na superfície de sílica gel silanizada	93
Figura 28 - Espectro de RMN CP/MAS ²⁹ Si para a sílica silanizada com cloropropiltrimetoxissilano (Sil-propil-Cl)	93
Figura 29 - Espectro de RMN CP/MAS de ¹³ C da sílica silanizada com 3-cloropropiltrimetoxissilano (Sil-propil-Cl)	94
Figura 30 - Espectros de RMN de ¹³ C para os sólidos Sil-propil-hex (a) e Sil-propil-hex-CC (b)	95
Figura 31 - Progresso da reação de imobilização da lipase de <i>Burkholderia Cepacia</i> em função do tempo de contato com o suporte funcionalizado Sil-N-CC (150 mg de massa seca, ~25°C, pH 7,5)	96
Figura 32 - Ensaio de hidrólise do p-NPP com a sílica pura e suas formas funcionalizadas. A atividade foi expressa em U/g de suporte	98
Figura 33 - Efeito da estabilidade operacional sobre a atividade residual de hidrólise do p-NPP das lipases imobilizadas nos materiais Sil-propil-N-CC, Sil-propil-hex e Sil-propil-hex-CC . As enzimas imobilizadas foram reutilizadas depois de lavadas com tampão fostato (0,67 M e pH 7.5) após cada ciclo de reação	99
Figura 34 - Efeito do tempo de estocagem sobre a atividade residual de hidrólise do p-NPP das lipases imobilizadas nos materiais Sil-propil-N-CC, Sil-propil-hex e Sil-propil-hex-CC . As enzimas imobilizadas foram armazenadas por 30 dias a 4-8 °C e reutilizadas depois de lavadas com tampão fostato (0,67 M e pH 7.5) após cada ciclo de reação	101

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Reação de substituição eletrofílica (S_E) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com clorosilanos 56
- Esquema 2** - Reação de adição eletrofílica (Ad_E) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com moléculas de etileno imina 57
- Esquema 3** - Resumo esquemático da reação de silanização da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano 67
- Esquema 4** - Resumo esquemático da reação de silanização da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxissilano 68
- Esquema 5** - Resumo esquemático da reação de funcionalização da Sil-propil-Cl com 1,6-diaminohexano 69
- Esquema 6** - Resumo esquemático da reação de funcionalização de ancoramento do cloreto cianúrico nos materiais Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Hex 70
- Esquema 7** - Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase nos materiais Sil-propil-N-CC, Sil-propil-Hex e Sil-propil-Hex-CC. A atividade da enzima (4000 U/g do suporte) disponível no meio de imobilização foi baseada na atividade da BC lipase (30.000 U/g de proteína) dada pelo fabricante (Aldrich) 71
- Esquema 8** - Reação de hidrólise do p-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase 74
- Esquema 9** - Sequência de reações de modificação química da sílica gel. As superfícies obtidas foram chamadas (a) **Sil-propil-NH₂, Sil-propil-N-CC, Sil-propil-Cl, Sil-propil-Hex e Sil-propil-Hex-CC**. O valor de **n** representa o número de grupos alcoxi que reagiram com os grupos silanóis levando a formação de moléculas de água 83

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Dados de análise elementar de carbono e nitrogênio dos materiais organofuncionalizados	84
Tabela 2 - Ensaio de imobilização de Lipase de <i>Burkholderia Cepacia</i> no suporte funcionalizado Sil-propil-N-CC em diferentes tempos de contato	86
Tabela 3 - Atividade de hidrólise da lipase imobilizada em Sil-propil-N-CC	96
Tabela 4. Atividade de hidrólise da lipase imobilizada em Sil-propil-N-CC	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

kDa	KiloDalton
p-NPP	palmitato de p-nitrofenila
p-NP	p-nitrofenilpalmitato
CC	Cloreto cianúrico
Sil-propil-Cl	Sílica modificada com agente sililante 3-cloropropil-trimetoxissilano
Sil-propil-NH₂	Sílica modificada com agente sililante 3-aminopropil-trimetoxissilano
Sil-propil-N-CC	Material Sil-propil-NH ₂ funcionalizado com cloreto cianúrico
Sil-propil-hex	Material Sil-propil-Cl funcionalizado com 1,6-diaminohexano
Sil-propil-hex-CC	Material Sil-propil-hex funcionalizado com cloreto cianúrico

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	17
1 Introdução	17
1.1 Objetivos Gerais e Específicos	20
Referências	21
Capítulo 2 – Fundamentação Teórica	23
2 Fundamentação Teórica	23
2.1 Lipases	23
2.1.1 Fontes e Propriedades	23
2.1.2 Seletividades das Enzimas	24
2.1.3 Aspectos Estruturais	26
2.1.4 Mecanismo de ativação interfacial	27
2.1.5 Reações biocatalisadas por lipases e mecanismo catalítico	29
2.1.6 Aplicações biotecnológicas	31
2.1.6.1 Alimentos	31
2.1.6.2 Fármacos e química fina	32
2.1.6.3 Biodiesel	33
2.1.7 Imobilização: um breve histórico	33
2.1.8 Métodos de imobilização	34
2.1.8.1 Adsorção física e iônica	36
2.1.8.2 Ligação covalente	38
2.1.8.3 Entrapment (aprisionamento) e Encapsulamento	40
2.1.8.4 Crosslinking	41
2.1.9 Natureza do suporte	42
2.1.9.1 Ativação de suportes	42
2.1.9.2 Ativação por processo sol gel	43
2.1.9.3 Ativação por enxerto (<i>grafting</i>)	46
2.2 Sílica gel: aspectos gerais	49
2.2.1 Propriedades da superfície de sílica gel	51
2.2.2 Natureza da superfície	52
2.2.3 Reatividade da superfície	53
2.2.4 Mecanismo de reações na superfície	54
2.2.5 Concentração e acessibilidade de silanóis	57
2.2.6 Sílica gel modificada para imobilização de lipases	59
Referências	61
Capítulo 3 – Parte Experimental	68
3 Materiais e métodos	68
3.1 Reagentes e solventes	68
3.2 Preparação das sílicas organofuncionalizadas	69
3.2.1 Determinação do índice de funcionalização da sílica gel	69
3.2.2 Reação da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxisilano	70
3.2.3 Reação da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxisilano	71
3.2.5 Reação de funcionalização com cloreto cianúrico	72
3.2.6 Ensaios de imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	73
3.3 Técnicas de caracterização física e química dos materiais	74
3.3.1 Análise de área superficial	75

3.3.2Análise elementar de C, H e N	75
3.3.3Termogravimetria	75
3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	75
3.3.5 Espectroscopia de RMN ²⁹ Si e ¹³ C	76
3.3.6 Espectroscopia UV-Vis	76
3.3.6.1 Determinação da concentração de proteína	76
3.3.6.2Determinação da atividade Enzimática	77
3.3.6.3 Estabilidade operacional	78
3.3.6.4 Estabilidade de armazenamento	79
Referências	80
Capítulo 4 –Resultados e Discussões	83
4 Resultados e Discussões	83
4.1 Caracterizaçãodas superfícies organofuncionalizadas	83
4.1.1 Análise elementar	83
4.1.2 Análise Termogravimétrica	87
4.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	90
4.1.4 Ressonância magnética nuclear de ²⁹ Si	92
4.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C	94
4.2 Ensaio de imobilização da BC lipase	95
4.2.1 Influência do tempo de imobilização da enzima	96
4.3 Determinação da atividade enzimática e estabilidade operacional	98
4.4 Estabilidade de armazenamento	101
Referências	103
Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas	105
Conclusões	106
Perspectivas do trabalho	107

A decorative border resembling a scroll, with a black outline and grey shaded areas at the top and bottom corners, framing the text.

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

O emprego de enzimas em biocatálise e biotransformações tem despertado grande interesse à comunidade científica e aos setores industriais, devido ao potencial de aplicação destes catalisadores biológicos em processos biotecnológicos, seja na forma de células íntegras de animais, vegetais e microrganismos, ou de enzimas isoladas de tais fontes.

A expansão da biocatálise no Brasil é estrategicamente favorável para o desenvolvimento de processos biotecnológicos. Como relatam Bon et al. (2008, p. 464), o uso de tecnologia enzimática permite conciliar o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e com a preservação ambiental, que é uma questão fundamental para a sustentabilidade das atividades produtivas e contribui para uma forte representatividade brasileira no cenário internacional.

Com efeito, a crescente aceitação do uso de biocatalisadores na área de biotecnologia representa um reflexo, principalmente, dos avanços conquistados em biocatálise e impulsionados pela evolução de áreas como a biologia molecular, engenharia de proteínas e síntese orgânica (BON et al. p. 456; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Dentre as enzimas de grande importância industrial, as lipases têm demonstrado enorme potencial em biocatálise, apresentando um amplo espectro de aplicações industriais, especialmente, no setor de alimentos e bebidas, farmacêutico, couro, detergentes e biocombustíveis (VILLENEUVE, 2000; GUPTA, 2012).

A participação das lipases no mercado mundial de enzimas cresce significativamente, e estima-se que no futuro as lipases serão tão importantes comercialmente quanto às peptidases, que hoje em dia respondem por 25 a 45% das vendas de enzimas industriais. Já a demanda mundial de lipases tem sido projetada para um crescimento anual da ordem de 7,9%, sendo os Estados Unidos, Europa e Japão os principais consumidores (BON et al. 2008).

Notadamente, o enorme potencial biotecnológico das lipases está associado à sua estabilidade em solventes orgânicos, como mostra Klibanov (2001), à sua natureza quimio-, régio- e enantiosseletiva, além do fato de que podem ser obtidas

de diversas fontes microbianas, vegetais e animais, sendo que as fontes microbianas são preferíveis, uma vez que elas possuem maior versatilidade, facilidade na manipulação ambiental e genética além de elevado rendimento na conversão de substrato em produto (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Além disso, somam-se aí, o fato de que reações biocatalisadas possibilitam o uso de tecnologias mais limpas, pois geram menos resíduos e diminuem o custo energético.

Apesar dos aspectos favoráveis supramencionados, o custo relativamente alto das lipases ainda representa um entrave para muitas aplicações. Uma estratégia que vem sendo alvo de muitas pesquisas e já se apresenta como uma realidade com grande potencial econômico é a utilização de biocatalisadores suportados (TUFVESSON et al. 2011). Lipases imobilizadas podem atuar como biocatalisadores suportados, assumindo um caráter heterogêneo e, por isso, se tornam facilmente separáveis e reutilizáveis em vários processos reacionais, sem que haja perda significativa de atividade catalítica (SHARMA, 2001; KNEŽEVIĆ, 2004).

Existem diversos métodos desenvolvidos e aplicados à imobilização de biocatalisadores, porém não há um método universal para todas as enzimas. Com efeito, ao se adotar uma estratégia de imobilização torna-se necessário levar em conta outros parâmetros que estão relacionados à topografia do suporte, às propriedades da enzima, às condições de imobilização, à simplicidade e custo do procedimento de imobilização, à nocividade dos reagentes às enzimas, de modo que, ao final, o processo de imobilização resulte em um biocatalisador imobilizado com boa retenção da atividade biológica e elevada estabilidade operacional (VILLENEUVE, 2000; MENDES, 2011).

Neste contexto, as pesquisas mais recentes enfocam o desenvolvimento de biocatalisadores suportados mais robustos, que apresentem maior estabilidade, elevado potencial de conversão e reaproveitamento. Além disso, o biocatalisador imobilizado deve apresentar uma boa relação custo/benefício a fim de tornar o processo enzimático menos oneroso (CAO et al. 2003; HANEFELD et al. 2009; BREN, et al. 2012).

Nessa direção, torna-se mister a busca por materiais que ofereçam maior potencial para imobilização dos biocatalisadores, bem como a otimização de

parâmetros que permitam a aplicabilidade de enzimas imobilizadas em processos biocatalíticos.

1.1 Objetivos gerais e específicos

Diante da problemática relacionada ao desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados, o escopo do presente trabalho envolve a preparação de diferentes suportes à base de sílica gel organofuncionalizados para imobilização de uma lipase microbiana comercial obtida de *Burkholderia cepacia*.

Desse modo, os objetivos específicos do presente trabalho constituem-se em:

- Silanizar a superfície de sílica gel com o agente sililante 3-cloropropiltrimetoxisilano e 3-aminopropiltrimetoxisilano, utilizando o processo heterogêneo de síntese;
- Modificar quimicamente a superfície silanizada da sílica gel com espaçador 1,6 diamino-hexano;
- Imobilizar o cloreto cianúrico nas sílicas organofuncionalizadas;
- Caracterizar os materiais orgnofuncionalizados, através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{29}Si , análise elementar de C, H, N, medidas de adsorção/dessorção de nitrogênio e termogravimetria;
- Imobilizar a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* na superfície das sílicas organofuncionalizadas;
- Avaliar a atividade enzimática, estabilidade operacional e de armazenamento da enzima imobilizada, frente a reação de hidrólise de éster de p-nitrofenol.

Referências

- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia**. Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BREM, J. et al., Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. **Process Biochemistry**, v. 47 p. 119–126, 2012.
- CAO, L.; LANGENY, L. V.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14:p. 387–394, 2003.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: [s.n.], 2010. 13 p.
- JAEGER, K; DJIKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three dimensional structures and Biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315–51, 1999.
- KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555–569, 2012.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**. v. 409, p. 241-246, 2001.
- KNEŽEVIĆ, Z. D.; ŠILER-MARINKOVIĆ S. S.; MOJOVIĆ L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. **APTEFF**, v. 35, p. 151-164, 2004.
- MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109–115, 2011.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.
- TUFVESSON, P. et al. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 200–205, 2011.
- U. HANEFELD, L. GARDOSI, E. MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 453–468, 2009.
- VILLENEUVE, P. et al. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.



Capítulo 2

***Fundamentação
teórica***

2 Fundamentação Teórica

2.1 Lipases

As lipases são catalisadores biológicos pertencentes à classe das enzimas hidrolases e têm como nome sistemático triacilglicerol acilhidrolase (E.C 3.1.1.3) (KAPOOR; GUPTA, 2012). As lipases são definidas por sua capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicéris de longa cadeia acila com a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos, atuando numa interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. Porém, em baixas concentrações de água, as lipases podem catalisar a síntese e a transesterificação de ésteres (ANGKAWIDJAJA; KANAYA, 2006). Embora o termo “cadeia longa” não esteja estritamente definido, é considerado para lipases um comprimento de cadeia acila com número maior ou igual a 10 átomos de carbono, sendo o triacilglicerol seu substrato padrão (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.1.1 Fontes e propriedades

As lipases são enzimas de grande importância fisiológica na metabolização de lipídeos, e possuem considerável potencial industrial em diversos setores da economia (SHARMA et al. 2001). Podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos, mas a maioria das lipases usadas em aplicações biotecnológicas é de origem microbiana, extraídas de fungos e bactérias, devido à enorme versatilidade desses microrganismos e maior estabilidade das lipases obtidas (ARPIGNY; JAEGER, 1999; KAPOOR; GUPTA, 2012). Além disso, as enzimas produzidas de fontes microbianas permitem maior facilidade na manipulação, rapidez e controle das condições de cultivo, acarretando um custo mais baixo, enquanto o custo do isolamento para lipases obtidas de fontes animais e plantas é bem mais oneroso (BON et al. 2008; DALLA-VECCHIA et al. 2004).

Há uma diversidade de lipases que vem sendo produzidas por cultura submersa ou métodos de fermentação no estado sólido usando várias espécies de microrganismos, tais como as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Mucor javanicus*, leveduras como *Candida rugosa*, *Candida Antarctica*, *Mucor miehei*, *Tulopsis* sp, e lipases bacterianas como as

Burkholderia cepacia, *Burkholderia glumae* e *Pseudomonas fluorescens* (DALLA-VECCHIA et al. 2004).

Grandes avanços na tecnologia de DNA recombinante e engenharia de proteínas têm permitido reduzir o custo das enzimas, aumentando a produção de lipases em grande escala e com propriedades geneticamente melhoradas (VILLENEUVE et al. 2000). Como consequência, várias indústrias como a Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras, têm colocado no mercado lipases com melhores propriedades catalíticas e com preços relativamente mais acessíveis (CASTRO et al. 2004).

Muitas das propriedades das lipases podem variar de acordo com o gênero e espécie, o que torna difícil o estabelecimento de uma padronização nas metodologias. Como relata Castro et al. (2004), conforme a fonte, as lipases podem possuir massa molecular que varia entre 20 e 75 kDa, pH ótimo de atividade numa faixa de 4 a 9 e atuar numa temperatura que pode chegar até 70°C. Contudo, a maioria das lipases microbianas mostram atividade ótima entre pH 7-9 e temperatura ótima entre 30-40°C (BORNSCHEUER et al. 2002).

2.1.2 Seletividade das lipases

Uma das vantagens mais importantes das enzimas e que as diferenciam de catalisadores químicos é sua capacidade de catalisar reações com elevada especificidade ao substrato. As lipases são enzimas que exibem propriedades quimio-, régio- e enantiosseletivas, cuja especificidade é controlada pelas propriedades da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato, sendo o triacilglicerol seu substrato padrão (GUPTA, R.; GUPTA, N., RATHI, 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Nesse contexto, a quimioseletividade, a regioespecificidade e a estereoseletividade de muitas lipases permitem que essas enzimas catalisem uma ampla variedade de reações orgânicas com mínimo de subprodutos, baixo custo de tratamento operacional e condições brandas de temperatura e pressão (GUPTA, R.; GUPTA, N., RATHI, 2004; VILLENEUVE et al. 2000).

Com relação à **quimiosseletividade**, essa propriedade consiste na reação preferencial de uma molécula reagente para um grupo funcional na presença de outros grupos funcionais (KAPOOR; GUPTA, 2012). Em reações com lipases, a enzima atua em grupo funcional específico, de modo que outros grupos funcionais são

preservados. Em síntese orgânica, por exemplo, tal propriedade permite evitar etapas de proteção e desproteção em reações altamente quimiosseletivas (LI; YAO; ZONG, 2008).

A **enantioseletividade** é uma propriedade que se refere à habilidade das enzimas distinguírem entre dois enantiômeros. A quiralidade intrínseca das enzimas permite que algumas reações biocatalisadas produzam compostos opticamente ativos. Com efeito, as lipases estereosseletivas exibem enantiopreferência em reações enantiosseletivas, o que possibilita sua aplicação em resolução cinética de misturas racêmicas (KAPOOR; GUPTA, 2012; JAEGER; EGGERT, 2002).

As lipases também são **regioseletivas**, isto é, possuem especificidade com relação à posição do grupo funcional da molécula no substrato. De acordo com Gupta e Kapoor (2012), tomando como base a especificidade ao substrato, as lipases podem ser classificadas em três categorias: *lipases não-específicas*, *lipases 1,3 específicas* e *lipases ácido-graxo específicas*.

As lipases não-específicas catalisam reações de hidrólise de triacilgliceróis randomicamente, o que leva a remoção de ácidos graxos dos triglicerídeos de qualquer posição. Desse modo, ocorre a completa quebra do triglicerídeo em ácidos graxos e glicerol com a formação de diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários da mistura reacional, mas esses últimos são rapidamente hidrolisados (KAPOOR; GUPTA, 2012). A Figura 1 mostra a hidrólise de um triacilglicerol não-específica.

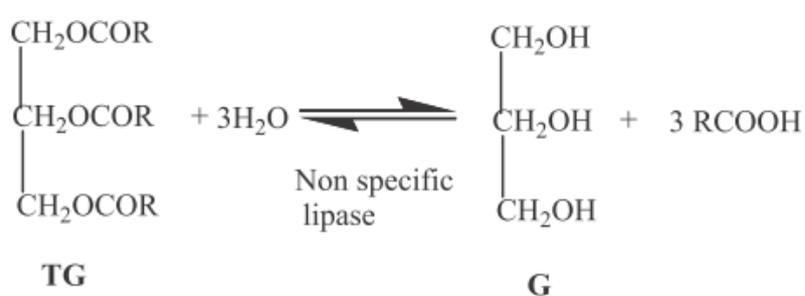


Figura 1 - Esquema geral para reação catalisada por lipases não-específicas.

As lipases 1,3 específicas hidrolisam apenas ligações éster primárias de triglicerídeos, atuando nas posições 1 e 3 de átomos de carbono do glicerídeo, liberando ácidos graxos livres, 1,2-(2,3)diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis (GUPTA, R. GUPTA, N.; RATHI, 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012). A Figura 2 ilustra reações catalisadas por lipases 1,3 específicas.

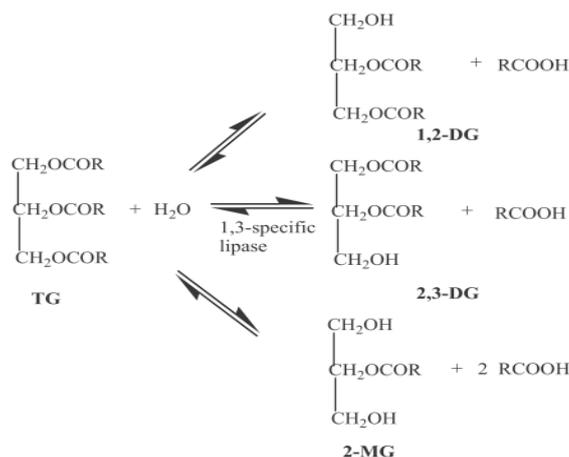


Figura 2 - Esquema geral para reações catalisadas por lipases 1,3 específicas.

Um terceiro grupo envolve lipases que exibem especificidade ao tipo de ácido graxo. Conforme reporta Kapoor e Gupta (2012), algumas lipases têm preferência por atuar em ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas entre os carbonos 9 e 10 do triglicerídeo, como por exemplo a lipase de *Aspergillus flavus* mostrou preferência pronunciada para a tricaprina do que trioleína. Lipase de *Candida rugosa* e *R. miehei* exibe forte preferência para o ácido oléico em comparação ao ácido eládico. Em contraste, a lipase A de *Candida antarctica* mostrou maior preferência para o ácido eládico do que para o ácido oléico.

2.1.3 Aspectos estruturais

As enzimas hidrolíticas possuem uma arquitetura comum em sua estrutura que corresponde a um padrão de dobramento alfa/beta hidrolase. Tal padrão de dobramento consiste em uma folha β central constituída de diferentes fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$), tendo a fita $\beta 2$ antiparalela e as fitas paralelas ($\beta 3$ - $\beta 8$) estão conectadas com seis α hélices que envolvem ambos os lados da fita β central. A curvatura das folhas- β pode diferir dependendo das enzimas, assim como as posições espaciais das α -hélices topologicamente equivalentes (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

O sítio ativo de enzimas com padrão de dobramento α/β hidrolase é formado por três resíduos catalíticos, sendo constituído de um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou aspartato), posicionado após a cadeia $\beta 5$, um resíduo catalítico ácido (aspartato ou glutamato) quase sempre posicionado após a cadeia $\beta 7$ e um resíduo de

histidina altamente conservado, localizado após a última cadeia β . Essa ordem é sempre obedecida para enzima com esse padrão de dobramento. Para outras enzimas que contém uma tríade catalítica a ordem observada difere das proteínas com padrão α/β hidrolase (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NARDINI e DIJKSTRA, 1999).

No caso das lipases, Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999) afirmam que as estruturas de lipases bacterianas conhecidas até agora seguem o padrão α/β hidrolase com algumas variações, sendo que as lipases de *B. glumae*, *B. cepacia* e *C. viscosum* possuem seis cadeias beta paralelas em uma folha beta central do dobramento α/β hidrolase, enquanto a *P. fluorescens* contém sete fitas paralelas ao longo da folha β central que se estende de $\beta 2$ a $\beta 8$ (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Já o nucleófilo tem sido sempre um resíduo de serina que está localizado no carbono terminal (C-terminal) da fita $\beta 5$ em um pentapeptídeo altamente conservado Gly-X-Ser- X-Gly (JAEGER; EGGERT, 2002; NARDINI; DIJKSTRA, 1999), como pode ser visto na Figura 3.

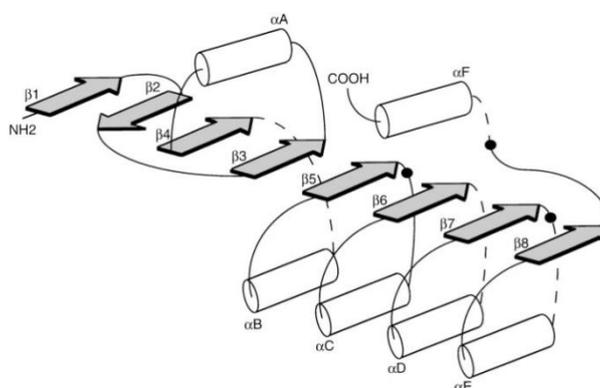


Figura 3. Representação da estrutura secundária do entrelaçado α/β hidrolase de uma lipase. A tríade catalítica é indicada por pontos pretos. Fonte: (NARDINI e DIJKSTRA, 1999)

2.1.4 Mecanismo de ativação interfacial

Para lipases de diferentes origens a atividade enzimática é consideravelmente aumentada na presença de interface água-lipídeo. Tal característica foi primeiramente registrada por Sarda e Desnuelle (1958) quando estudaram a atividade de uma lipase pancreática e observaram que a enzima expressava atividade catalítica com maior eficiência, mediante uma superfície bidimensional de micelas (SARDA; DESNULLE, 1958 apud JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Com base nisso, esses pesquisadores sugeriram que a adsorção da lipase numa interface orgânico-

aquosa induz uma ativação interfacial da enzima e essa ativação estaria associada às mudanças conformacionais da enzima (BON et al. 2008; VERGER, 1997).

De acordo com o mecanismo de ativação interfacial, na ausência de uma interface água-lipídeo, o sítio ativo estaria recoberto por uma “tampa” hidrofóbica que deixaria o sítio inacessível ao substrato. Estudos cristalográficos mostraram que muitas lipases apresentavam o sítio recoberto, o que sugeria um estado inativo prevalecente em solução. Assim, com o sítio recoberto, a enzima necessitaria de um rearranjo conformacional ou de posição da “tampa” para permitir o acesso do substrato ao sítio ativo, o que de fato foi efetivamente verificado para muitas lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Nesse sentido, para várias lipases a orientação na interface é crucial para a expressão da atividade catalítica. Dessa forma, algumas lipases têm como característica comum o fato de que a área em torno do sítio catalítico tem um caráter hidrofóbico, sendo justamente esta face que se direciona a camada lipídica da interface. Embora não se tenha dados estruturais diretos que mostrem a interação das lipases com lipídeos da interface, dados biofísicos têm indicado que as etapas iniciais do processo catalítico com lipases envolvem a adsorção na interface água-lipídeo (REIS et al. 2009; BON et al. 2008).

Com base em estudos cristalográficos, quando se comparou as condições de cristalização usadas e as estruturas obtidas para uma diversidade de lipases, alguns pesquisadores sugeriram que as conformações observadas das enzimas são dependentes das condições em solução (SCHRAG et al. 1997; BON et al. 2008). Schrag et al. (1997) reportaram que algumas lipases mostram conformação fechada em condições aquosas e uma conformação aberta em solventes orgânicos. Por exemplo, a lipase de *Candida rugosa*, quando cristalizada em duas diferentes condições, mostrou um sítio recoberto ou um sítio exposto ao solvente, sendo que mecanismo semelhante foi observado para a lipase *Rhizomucor miehei*.

Já Trodler et al. (2009), realizaram um estudo de simulação por dinâmica molecular com a lipase de *Burkholderia cepacia*, em tolueno e em água, e demonstraram que as transições conformacionais foram dependentes do solvente. Por exemplo, em simulações com a lipase com “tampa” fechada em água não foram observadas transições conformacionais, enquanto em três simulações independentes com a lipase “fechada” em tolueno observaram uma abertura gradual da “tampa” durante os primeiros 10-15 nanosegundos.

A idéia do fenômeno da ativação interfacial foi, por um bom tempo, empregada para distinguir enzimas lipases de esterases. Contudo, foi descoberto que nem todas as lipases são passíveis à ativação interfacial. Por exemplo, as cutinases e lipase *B. subtilis* carecem de uma “tampa” que cobre o sítio ativo na ausência de uma interface água-lipídeo (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; SCHRAG et al. 1997). Com isso, a caracterização de lipases com base no conceito de ativação interfacial foi substituída para a definição de que lipases são carboxilesterases com competência para catalisar a hidrólise de alcilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; VERGER, 1997).

2.1.5 Reações biocatalisadas por lipases e mecanismo catalítico

Tendo em vista a capacidade que as lipases têm de atuar numa interface orgânico-aquosa, bem como suas propriedades quimio-, régio- e enantioseletivas, essas enzimas catalisam uma ampla variedade reações com elevada eficiência e estabilidade. Desse modo, as lipases podem catalisar reações de hidrólise de éster, esterificação direta envolvendo um ácido graxo e um álcool, bem como reações de transesterificação, que devem ocorrer em baixas concentrações de água (AKOH et al. 2007). A Figura 4 ilustra várias reações que podem ser catalisadas por lipases.

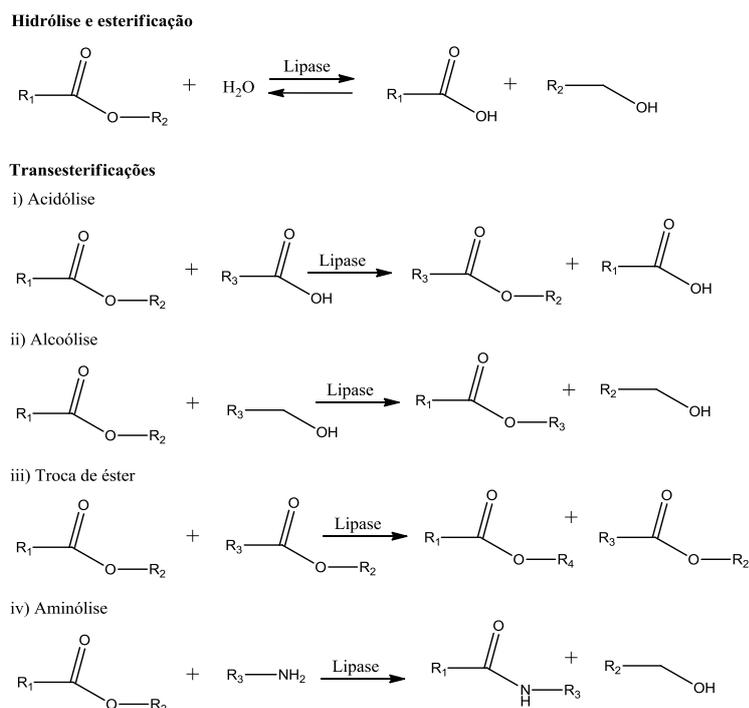


Figura 4 - Esquema geral de reações catalisadas por lipases. R^1 , R^2 , R^3 representam cadeias carbônicas genéricas (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Conforme mencionado em seções anteriores (ver 2.1), as lipases são enzimas que atuam em ligações éster carboxílicos presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. O sítio catalítico dessas enzimas, formado pela tríade dos aminoácidos Ser-His-Asp/Glu, é similar ao observado para serina proteases, por conseguinte, o mecanismo catalítico de reações catalisadas pelas lipases pode ser pensado para seguir o mesmo caminho das serina proteases. Neste contexto, tem sido reportado que a hidrólise de substratos catalisados por lipases ocorre em duas etapas, como ilustrado na Figura 5. (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; REIS et al. 2009).

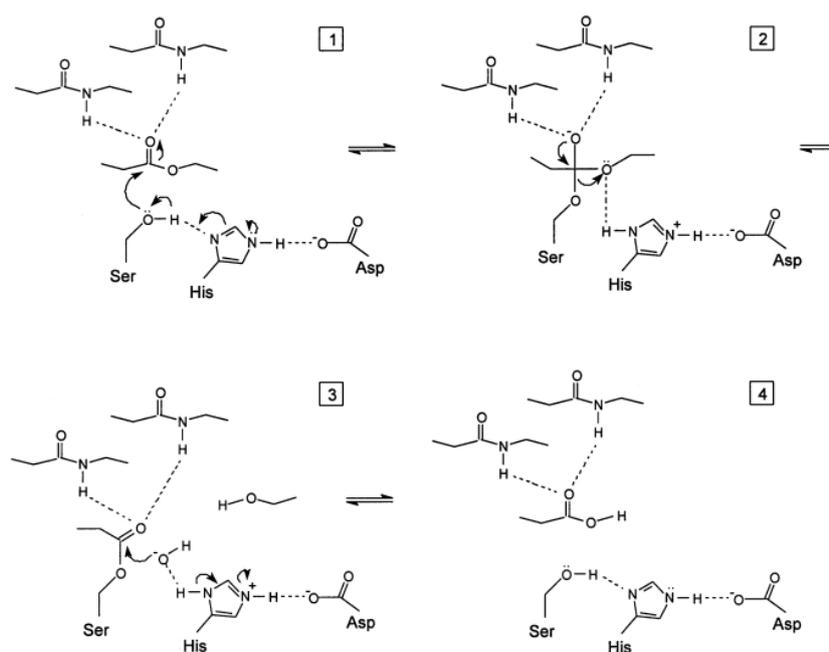


Figura 5 – Mecanismo catalítico realizado por lipases. (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

De acordo com Jaeger, Dijkstra e Reetz. (1999) e Reis et al. (2009), a reação catalítica inicia-se com o aumento da nucleofilicidade do átomo de oxigênio da hidroxila de um resíduo catalítico de serina, através de uma desprotonação auxiliada pelos resíduos de histidina e do ácido catalítico. Esse evento é seguido pelo ataque ao carbono carbonílico da ligação éster, levando a formação de um intermediário tetraédrico acil-enzima, o qual é caracterizado por uma carga negativa no átomo de oxigênio que é estabilizada por ligações de hidrogênio através de interações com grupos amino de dois peptídeos e pelo anel imidazol de um resíduo de histidina. A transferência de próton é facilitada pelo ácido catalítico que orienta precisamente o anel imidazol da histidina e neutraliza parcialmente a carga que nela foi gerada.

Após a transferência de um próton para o átomo de oxigênio na ligação suscetível do intermediário tetraédrico, a ligação é clivada e ocorre a liberação de uma molécula de álcool. Assim, inicia-se a etapa de desacilação do resíduo serínico, que é controlada pela eletronegatividade das moléculas que preenchem a interface. Nesse estágio, uma molécula de água pode promover a hidrólise da enzima acilada através de um ataque covalente, resultando na liberação do produto e a regeneração do sítio catalítico (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; REIS et al. 2009).

2.1.6 Aplicações biotecnológicas

A maior parte das aplicações biotecnológicas de lipases utiliza fontes microbianas, que se mostram como excelentes alternativas para as sínteses químicas clássicas e amplia consideravelmente as possibilidades de aplicações comerciais. Nessa direção, o enorme potencial biocatalítico das lipases tem atraído diversos setores industriais, como na área de fármacos, biodiesel, alimentos e bebidas, agroquímica, indústria de papel, além de serem aplicadas como biossensores, e na formulação de detergentes e cosméticos (GHANDI, 1997; JAEGER; EGGERT, 2002; REIS et al. 2009; SHARMA et al. 2004;).

2.1.6.1 Alimentos

A modificação de óleos e gorduras catalisada por lipases exerce um papel muito importante na indústria de alimentos, visto que a seletividade dessas enzimas pode proporcionar a formação de produtos com valores nutricionais e sensoriais especificamente desejados. Neste sentido, conforme relata Sharma et al. (2004), a posição de ácidos graxos no esqueleto do glicerol, o comprimento da cadeia do ácido graxo e o grau de insaturação são aspectos que merecem a atenção na determinação das propriedades físicas de um triglicerídeo relacionadas ao desenvolvimento de aroma e sabores.

Como afirmam Rodrigues e Fernando-Lafuente (2010), a modificação de alimentos sob ação de lipases apresenta várias vantagens: a especificidade e seletividade de lipases podem produzir óleos com uma composição desejada, bem como reduzir a formação de produtos secundários. Nesse contexto, esses mesmos autores têm mostrado que lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores na modificação de

óleos e gorduras para obtenção de alimentos com propriedades nutricionais alteradas, por exemplo, na modificação de ácidos graxos polinsaturados, resultando na produção de alimentos com baixa caloria.

As lipases também podem ser usadas na síntese de monoglicerídeos como a monolaurina, ésteres de açúcar e amino-ésteres, que encontram aplicações como agentes emulsionantes de alimentos. Além disso, as lipases também têm sido aplicadas para hidrolisar a gordura de leite, de modo a conferir aos produtos lácteos, particularmente queijos, sabores e aromas desejados (GHANDI et al. 1997; RODRIGUES; FERNANDO-LAFUENTE, 2010).

2.1.6.2 Fármacos e química fina

A natureza enantiosseletiva e regioseletiva de lipases permite que essas enzimas sejam aplicadas em reações altamente estereosseletivas, de modo que muitos compostos opticamente puros que podem atuar como fármacos ou intermediários quirais são obtidos por essa via catalítica. Isso explica o grande interesse das indústrias farmacêuticas e de química fina por processos que utilizam lipases.

Com efeito, lipases que exibem elevada enantiosseletividade têm sido amplamente empregadas em resolução de racematos e na remoção seletiva de certos compostos, visando à obtenção de ésteres, ácidos e alcoóis opticamente puros (CASTRO et al. 2004).

Gotor-Fernandez et al. (2006) reportam que a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) é uma das enzimas mais eficientes na resolução de alcoóis e aminas, possibilitando a preparação de uma grande variedade de compostos opticamente ativos. Além disso, segundo esses autores, a resolução de aminas primárias via CAL-B é uma das melhores estratégias para a obtenção do composto enantiomérico puro, devido à simplicidade e alta estereosseletividade do processo.

Outra enzima que tem grande aplicação em reações enantiosseletivas é a lipase de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*). Tal lipase é comumente utilizado como biocatalisador em resolução cinética de alcoóis secundários quirais (HELGUEIRA et al. 2010; SCHULZ; PLEISS; SCHMID, 2000). Recentemente, Li et al. (2012) reportou a resolução do RS-2-nitro-1-feniletanol por transesterificação enantiosseletiva usando a lipase PS de *Burkholderia cepacia* e mostrou que a enzima exibiu excelente enantiosseletividade para o composto enantiopuro (R)-2-nitroalcool.

2.1.6.3 Biodiesel

Dado que lipases têm habilidade para catalisar reações de transesterificação, gerando produtos mais puros e em condições mais brandas, a rota enzimática visando à produção de biodiesel vem ganhando relevância mais recentemente e tem sido objeto de vários estudos (NOUREDDINI et al. 2005; BALAT, M.; BALAT, H. 2008).

Dentre as grandes vantagens que a rota enzimática oferece têm-se o menor consumo de energia, pois as reações podem ser realizadas em condições de temperatura e pressão mais baixas; os produtos gerados na transesterificação têm maior grau de pureza, uma vez que evita a formação de sabões, o que acontece quando se usa uma rota alcalina; além de usar de condições operacionais mais simples que minimizam as inúmeras etapas de separação e purificação ocorridas por outras rotas de transesterificação (AKOH et al. 2007).

Por outro lado, algumas desvantagens da rota enzimática incluem o alto custo das enzimas, inativação da lipase quando se usa metanol como acceptor de grupo acila, além do fato de que as reações são lentas (AKOH et al. 2007; DU et al. 2004).

Diante desse contexto, uma enorme variedade de lipases e óleos vegetais, como o óleo de girassol, óleo de soja, óleo de mamona, entre outros, bem como diferentes aceptores de grupos acila têm sido testados em reações de transesterificação via rota enzimática para obtenção do biodiesel (AL-ZUHAIR, 2008; MOREIRA et al. 2007).

2.1.7 Imobilização: um breve histórico

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. Contudo, somente décadas depois, o tema sobre enzima imobilizada foi tomado a sério para fins catalíticos, que culminou com o desenvolvimento de um processo para a produção de L-aminoácidos a partir de misturas racêmicas, em que foi usada a enzima L-aminoacilase imobilizada em DEAE-Sephadex (BON et al. 2008).

Dada a importância de processos industriais com enzimas imobilizadas, houve um crescente interesse da comunidade científica e industrial com o desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados mais robustos, que apresentem propriedades elevadas e capacidade de reutilização. Nessa direção, organizou-se, em 1971, a primeira Conferência de Engenharia Enzimática, realizada em Henniker, EUA. Em tal conferência ficou estabelecida uma definição para o termo enzima imobilizada ou biocatalisador imobilizado, o qual foi empregado para denotar um biocatalisador fisicamente confinado ou localizado numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, com a capacidade de ser repetida e continuamente utilizado (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

2.1.8 Métodos de imobilização

De maneira geral, os métodos utilizados para imobilizar lipases podem envolver tanto processos físicos quanto químicos, e podem ser por adsorção ou sem a ocorrência de ligações a um suporte. O processo de adsorção implica no ataque da enzima em um suporte sólido, que pode ocorrer por interações covalentes e não-covalentes (MATEO et al. 2007; VILLENUEVE et al. 2000). Para estes casos, Reis et al. (2009) reportam que as principais contribuições para a diminuição da energia livre de Gibbs, e por conseguinte, adsorção de proteínas estão relacionadas à desidratação hidrofóbica, mudanças estruturais, interações eletrostáticas, interações de van der Waals e ligações específicas.

Outros métodos que podem ser empregados se referem à imobilização por confinamento, captura ou microencapsulamento de enzimas sem a ocorrência de ligações físicas e/ou químicas na superfície de um suporte sólido. Nesta situação, as enzimas podem ser apenas retidas em uma membrana semipermeável ou encapsuladas em um gel polimérico e sofrer uma delimitação por uma “barreira física”, que impede a sua dessorção para o meio externo, mas não restringe a sua mobilidade dentro do

sistema. Desse modo, as enzimas são protegidas e ficam menos susceptíveis às mudanças estruturais (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al. 2012; VILLENUEVE et al. 2000).

Não obstante, uma combinação de diferentes métodos de imobilização, como a adsorção em um suporte seguida de um posterior aprisionamento em uma matriz por método sol-gel, podem ser utilizados com sucesso (KNEŽEVIĆ et al. 2004).

Assim, os diferentes métodos de imobilização de enzimas têm sido classificados de acordo com a natureza da interação enzima-suporte, mas ainda conforme a não utilização de um suporte (Figura 6). A saber, podem ser divididos em:

- Adsorção física e/ou iônica (forças não-covalentes)
- Ligação covalente (Adsorção química)
- Ligações cruzadas (cross-linking)
- Encapsulamento (aprisionamento sol-gel)
- Entrapment (confinamento em membranas)

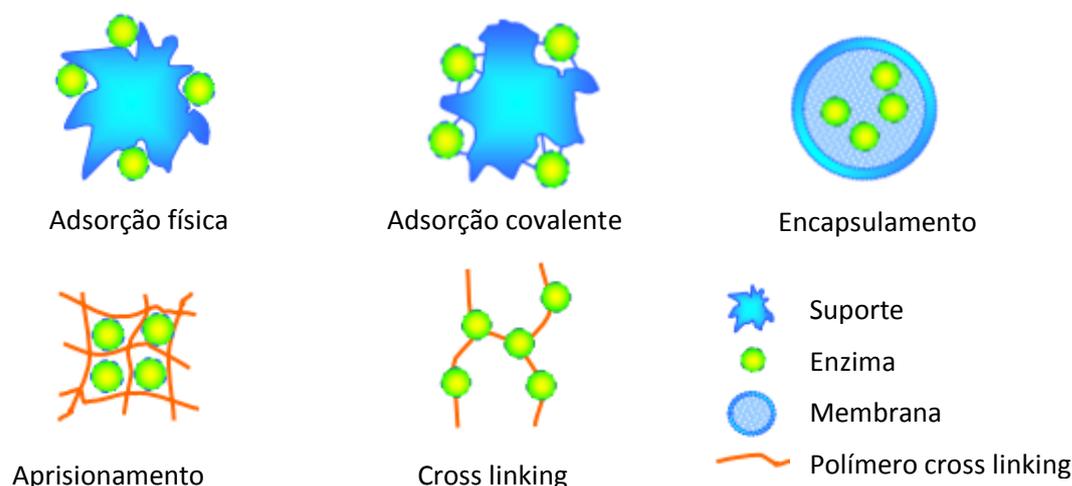


Figura 6. Tipos de imobilização de enzimas. Figura adaptada: (SALLEH et al. 2006).

Cabe ressaltar que não há um método universal de imobilização, cujo procedimento se aplique eficazmente para qualquer sistema enzimático. Logo, não há uma regra que prediga a magnitude da atividade e estabilidade de uma enzima após o processo de imobilização (VILLENUEVE et al. 2000; HANEFELD et al. 2009). Hanefeld et al. (2009) também assinalam que a abordagem para o processo de imobilização envolve tipicamente procedimentos de tentativa e erro, até que um sistema

satisfatório tenha sido desenvolvido. Nesse estágio, deve-se levar em conta, especialmente, a estabilidade alcançada após o processo de imobilização.

2.1.8.1 Adsorção física e iônica

A adsorção física de enzimas em um suporte é um dos métodos mais comuns de imobilização, por envolver procedimentos bastante simples e ser menos dispendioso. Basicamente, a enzima é imobilizada em um suporte sólido através de baixas energias de ligação. Isto é, o ataque de enzimas no suporte sólido pode ocorrer por interações fracas, como forças van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas (forças entrópicas), mas também pode ocorrer adsorção iônica via interações eletrostáticas (MENDES et al. 2011; VILLENEUVE, 2000).

Uma das grandes vantagens da adsorção física é que este método é menos prejudicial à inativação catalítica da enzima, uma vez que os biocatalisadores ao serem imobilizados não sofrem alterações significativas em sua estrutura tridimensional que leve a sua desnaturação. Além disso, os materiais suportes podem ser facilmente regenerados após a desnaturação natural das enzimas. A principal desvantagem deste método se deve a uma consequência inevitável de perda por dessorção, resultante das fracas interações que enzimas estabelecem com os suportes. Para a adsorção iônica essa desvantagem é menos pronunciada devido à formação de ligações íon-íon mais efetivas com o suporte. Contudo, durante o processo de lavagem ou mesmo após as operações catalíticas pode ocorrer dessorção das enzimas e, por conseguinte, há uma diminuição da atividade catalítica.

Vários parâmetros são determinantes para o sucesso e eficiência da adsorção física, como o tamanho da enzima a ser adsorvida, a área específica do material suporte, suas propriedades morfológicas, sua química de superfície e o pH do meio de imobilização (VILLENEUVE et al. 2000). Para este método, frequentemente são utilizados suportes porosos uma vez que a enzima pode ser adsorvida tanto na superfície quanto no interior dos poros.

O método de imobilização de enzimas por adsorção iônica é baseado nas interações eletrostáticas atrativas entre cargas residuais de aminoácidos da enzima e cargas opostas presentes na superfície do material suporte (RABE; VERDES; SEEGER, 2011; TALBERT; GODDARD, 2012). Disto resulta que as interações eletrostáticas

favoráveis à imobilização serão fortemente dependentes do pH do meio reacional, do ponto isoelétrico da enzima, bem como da distribuição de cargas na superfície do suporte. Por exemplo, as lipases possuem aminoácidos com grupos positivamente carregados nos resíduos de lisina e arginina, e grupos negativamente carregados em resíduos de ácido aspártico ou ácido glutâmico (TALBERT; GODDARD, 2012). Desse modo, o pH do meio determinará o estado eletrostático das moléculas de enzima, de maneira que influenciará favorável ou desfavoravelmente a adsorção por adsorção iônica.

Quando o pH é igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, o número de cargas positivas e negativas são iguais e a molécula de enzima passa a ter uma carga líquida neutra. Em condições abaixo do ponto isoelétrico ($\text{pH} < \text{pI}$) as proteínas são positivamente carregadas, enquanto em pH acima do ponto isoelétrico ($\text{pH} > \text{pI}$) as moléculas de proteína estão negativamente carregadas. Logo, as interações eletrostáticas serão favoráveis quando as repulsões enzima-enzima e enzima-suporte na interface forem mínimas, sendo que geralmente a capacidade máxima de adsorção é observada próximo ao ponto isoelétrico da enzima (KNEŽEVIĆ et al. 2004; RABE; VERDES; SEEGER, 2011). A Figura 7 mostra um esquema de interação eletrostática entre uma molécula de enzima e um material suporte com diferentes distribuições de cargas na superfície.

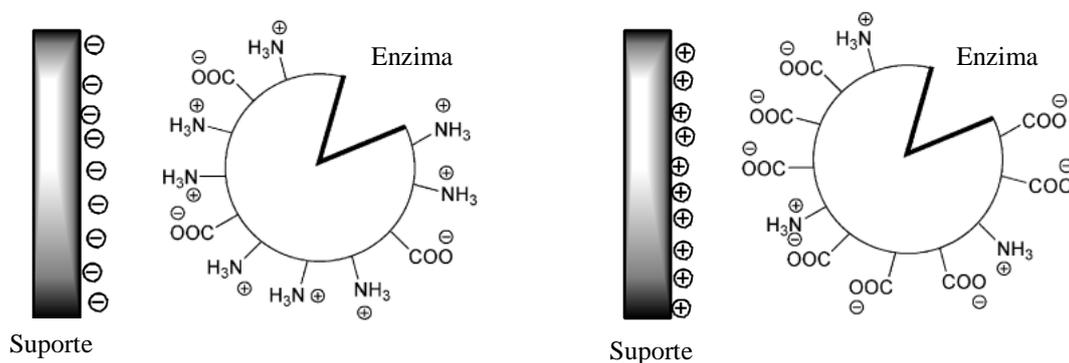


Figura 7. Representação esquemática de interações eletrostáticas entre enzima e suporte carregados. Figura adaptada: (RABE; VERDES; SEEGER, 2011).

Considerando o método de imobilização de enzimas por interações hidrofóbicas e van der Waals, a adsorção poderá ser favorecida com suportes hidrofóbicos. Logo, forças de van der Waals e mudanças entrópicas são responsáveis por assegurar certa estabilidade nas interações das enzimas com esses materiais, desde

que ambos tenham uma larga área superficial lipofílica (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Vários autores têm reportado que a maioria das lipases tem uma conformação aberta quando sofre ativação interfacial. Desse modo, quando imobilizadas em suportes hidrofóbicos é presumível que as lipases assumam uma conformação ativa (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MATEO et al. 2007). Hanefeld et al. (2009) também aponta que a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos pode ser pensada como uma forma de simulação do mecanismo de ativação interfacial, mas enfatiza que não há provas dessa afirmação, embora alguns resultados experimentais demonstrem que essas enzimas são mais ativas em condições hidrofóbicas.

Uma representação esquemática da mudança conformacional de uma lipase e sua ligação em suporte hidrofóbico é apresentada na Figura 8.

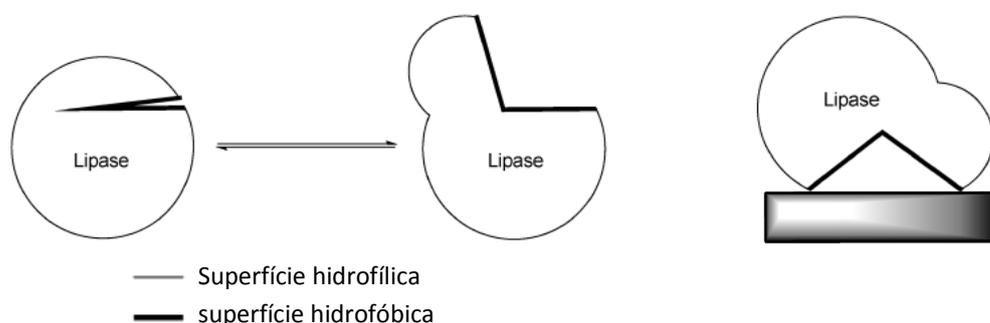


Figura 8. Esquema de mudança conformacional de lipase e sua imobilização em uma superfície hidrofóbica. (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Quando uma enzima é imobilizada em uma superfície hidrofóbica, apenas interações de van der Waals estão envolvidas na ligação. Contudo, uma vez que as forças de van der Waals são muito fracas, a verdadeira força motriz por trás da imobilização é de outra natureza. Acontece que, durante o processo de imobilização, uma molécula de enzima pode deslocar um grande número de moléculas de água tanto do suporte quanto de sua própria superfície, resultando em um ganho de entropia. Dessa forma, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos poderá ocorrer devido há mudanças provocadas no microambiente da enzima e da interface através de um ganho de entropia, que passará a ser a força motriz que governa as interações entre enzima e o suporte (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Porém, a estratégia de imobilização por forças não-covalentes e não-iônicas possui a desvantagem de envolver energias de ligação mais fracas do que a imobilização por interações eletrostáticas, o que dificulta a estabilidade da enzima imobilizada.

2.1.8.2 Ligação covalente

A **imobilização covalente** de lipases baseia-se em promover um ataque químico da enzima através de seus grupos nucleofílicos na superfície de um suporte apropriadamente ativado (IDRIS; BUKHARI, 2012; WONG; KHAN; MICKLEFIELD, 2009). Grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos das enzimas, por exemplo, $-NH_2$ de lisina e arginina, CO_2H de ácido aspártico ou glutâmico e SH de cisteína, podem interagir covalentemente com grupos funcionais presentes na superfície de suportes ativadas com grupos funcionais reativos (IDRIS; BUKHARI, 2012).

Apesar de alguns grupos funcionais de aminoácidos poderem interagir quimicamente com a superfície do suporte, os grupos amino das cadeias laterais de resíduos de lisina são mais comumente envolvidos neste tipo de reação, pois são mais frequentes na superfície de proteínas, além de ser bastante reativos (BRADY; JORDAAN, 2009).

Assim, no método covalente a presença de grupos reativos na superfície do suporte favorece a formação de uma ligação mais efetiva com a enzima, de modo que o biocatalisador imobilizado pode se tornar mais estável, química e termicamente, além de permitir o uso repetido em novos processos catalíticos (MENDES et al. 2011). Por outro lado, durante o processo de imobilização covalente da enzima, em muitos casos, ocorre uma diminuição da atividade enzimática devido às modificações conformacionais no centro ativo da biomolécula, pois não há controle sobre a orientação apropriada da enzima no decorrer da imobilização (BAYRAMOGLU et al. 2011). A Figura 9 ilustra, esquematicamente, uma enzima imobilizada covalentemente na superfície de um suporte quimicamente ativados.

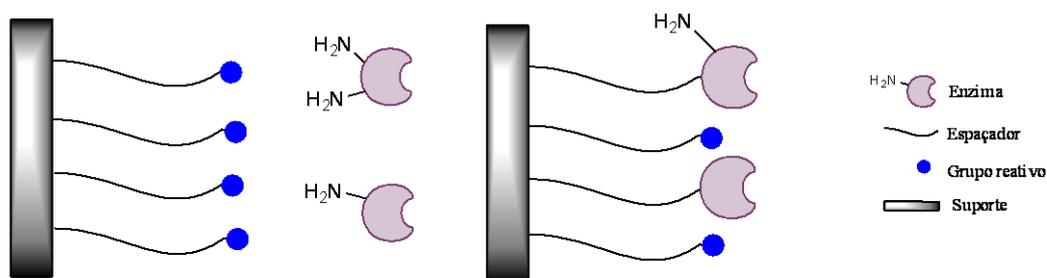


Figura 9. Representação esquemática do ataque covalente de lipase em um suporte quimicamente ativado contendo um espaçador. Um grupo amino da enzima pode atacar um grupo reativo no suporte ativado.

Para Knežević et al. (2004) a imobilização covalente de lipases na superfícies de suportes sólidos é mais vantajosa do que outros métodos porque minimiza consideravelmente as restrições difusionais ao substrato ou produto. Além disso, a imobilização covalente oferece a vantagem de proporcionar maior estabilidade e prevenir possíveis perdas de atividade enzimática por dessorção das enzimas.

2.1.8.3 Entrapment (aprisionamento) e Encapsulamento

O método de **entrapment** (aprisionamento) é definido como uma retenção física de enzimas na rede tridimensional de um polímero insolúvel, e normalmente envolve a sintetização *in situ* de uma matriz porosa em torno dos biocatalisadores (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Para Sheldon (2007), a diferença entre método entrapment e a ligação em um suporte, muitas vezes, não é suficientemente clara. Contudo, esse pesquisador afirma que o método entrapment requer a síntese de uma rede polimérica na presença da enzima. Geralmente, neste tipo de procedimento de imobilização, a biomolécula é primeiramente suspensa em uma solução monomérica, e depois segue um processo de polimerização que mantém a enzima confinada e protegida de possíveis efeitos deletérios do ambiente externo (BRADY; JORDAAN, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A principal vantagem deste método é que ele praticamente não induz a alterações conformacionais na enzima, prevenindo-a da inativação catalítica durante a imobilização e ou no processo de catálise. No entanto, esse método possui a desvantagem de ocasionar limitações de transferência de massa e comprometer o

desempenho catalítico elevado da enzima imobilizada (BRADY; JORDAAN, 2009; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012;).

Já o método de imobilização por **encapsulamento** está associado à inclusão de biocatalisadores em membranas semipermeáveis, que impõe uma barreira física às enzimas, mas não restringe sua mobilidade no núcleo das membranas (BRADY; JORDAAN, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Uma forte característica desse método é que diferentes enzimas podem ser imobilizadas simultaneamente via processo sol-gel. Similarmente ao método entrapment, a enzima é protegida do ambiente externo, e como está apenas fisicamente retida, a biomolécula é menos susceptível a modificações do centro ativo. Porém, apesar do método do encapsulamento ser simples e robusto para imobilizar lipases, também possui a desvantagem de ser passível a sofrer sérias limitações de transferência de massa (BRADY; JORDAAN, 2009; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

2.1.8.4 Crosslinking

No processo **crosslinking**, também chamado de auto-imobilização, as enzimas formam ligações covalentes cruzadas entre si através de reagentes bifuncionais. Nesse caso, não se utiliza suporte para imobilização, pois reações efetivas com grupos funcionais da enzima podem ocorrer por intermédio de grupos nucleofílicos de moléculas bifuncionais, tais como dialdeídos, diaminas ativadas com carbodiimida, diisocianatos, entre outros, sendo que o glutaraldeído é mais comumente utilizado como agente crosslinking (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES 2012; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

A principal desvantagem deste método é a possibilidade de perda de atividade devido a distorções da conformação ativa da enzima e alterações químicas no sítio catalítico durante o crosslinking (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

2.1.9 Natureza do suporte

Considerando que a principal idéia em imobilizar uma enzima consiste em obter um biocatalisador insolúvel, ativo, estável e reutilizável, a escolha de um suporte ideal torna-se um desafio crucial na área de desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados.

Com efeito, quando se quer estabelecer um protocolo de imobilização de lipases, por ligação em suportes sólidos, um dos principais parâmetros a ser considerado diz respeito ao conhecimento e manipulação da natureza química do suporte. Isso se deve ao fato de que a estrutura física e composição química do material suporte podem influenciar a capacidade de adsorção e a retenção das propriedades catalíticas da enzima, afetando a atividade e a estabilidade do biocatalisador imobilizado (TALBERT; GODDARD, 2012). Logo, o sucesso da imobilização também depende, fundamentalmente, do tipo de suporte utilizado.

Há uma enorme variedade de suportes naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, hidrofóbicos ou hidrofílicos e também híbridos orgânico-inorgânicos sintéticos que podem ser empregados para a imobilização de lipases. Inicialmente, os materiais mais utilizados na imobilização foram inorgânicos, como sílica, alumina e terra diatomácea, sendo que mais recentemente outros materiais vêm sendo bastante aplicados, por exemplo, biopolímeros como quitosana e celulose, resinas de troca iônica/hidrofílicas, argilas modificadas, silicatos mesoporosos e materiais híbridos nanoestruturados, filmes poliméricos, polímeros hidrofóbicos, nanopartículas magnéticas, entre outros (KAMEL et al. 2011; SALIS et al. 2009; VILLENUEVE et al. 2000).

Segundo Cardoso, Moraes e Cass (2009), o suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica. Outros autores também chamam a atenção para a relevância dos aspectos morfológicos e a química de superfície, tais como a área superficial, a forma, a distribuição e tamanho de poros, caráter hidrofóbico/hidrofílico da superfície, presença de cargas superficiais, estabilidade química, e composição da superfície dos materiais (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; TALBERT; GODDARD, 2012; VILLENUEVE et al. 2000).

Contudo, particularmente, para que os sistemas de biocatalisadores imobilizados tenham potencial de aplicação industrial, não basta apenas que sejam ativos e estáveis, mas que também sejam de baixo custo e possam ser repetidamente utilizados (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

2.1.9.1 Ativação de suportes

As propriedades de superfície de um material suporte podem ser apropriadamente manipuladas para propiciar maior eficiência na imobilização de

lipases, e conseqüentemente, favorecer a formação de um biocatalisador imobilizado cataliticamente ativo e estável (TALBERT; GODDARD, 2012). Porém, as características morfológicas e topográficas variam de material para material, e geralmente afetam a orientação da enzima na superfície, influenciando na estabilidade da enzima, na velocidade da reação e/ou na seletividade do processo catalítico (SALLEH et al. 2006; TALBERT; GODDARD, 2012).

Com efeito, se por um lado um suporte cuidadosamente selecionado com base em suas características químicas, mecânicas e morfológicas pode manter ou reforçar as propriedades biológicas da enzima, após o processo de imobilização, por outro uma escolha inadequada ou um tratamento mal empregado em um suporte pode acarretar sérias adversidades ao sistema enzimático (BON et al. 2008). Nessa direção, a ativação ou modificação de suporte para imobilização de uma enzima, como a lipase, pode ser direcionada de acordo com o tipo de material suporte e conforme a natureza da interação responsável pela imobilização e aplicação. Assim, os suportes selecionados podem ser ativados visando uma imobilização química ou física da enzima lipase.

2.1.9.2 Ativação por processo sol gel

Uma das principais rotas para obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos, que podem ser utilizados na imobilização lipases, é o processo sol gel. Basicamente, o processo sol-gel de síntese envolve a formação de uma rede polimérica inorgânica por reações de gelificação em temperaturas brandas (ALFAYA; KUBOTA, 2002). Nesse tipo de reação, ocorre a transição de um líquido para um sólido, sendo que os reagentes precursores da rede inorgânica são geralmente alcóxidos de silício, ou metais como alumínio, titânio e zircônio, que se encontram inicialmente dissolvidos na fase líquida. Durante o processo de gelificação, há formação do estado sol, caracterizado pela presença de oligômeros que levam a formação de cadeias de dimensões coloidais e partículas dispersas. O processo evolui para um estado gel, resultando na constituição de uma rede tridimensional entrelaçada e macroscopicamente observável (BENVENUTTI et al. 2009).

A obtenção de materiais orgânico-inorgânicos via processo sol gel é mais amplamente estudada e tecnologicamente aplicada utilizando alcóxidos de silício como precursores da rede inorgânica e organoalcoxissilanos para compor a fase orgânica. Durante a etapa de gelificação e utilizando apenas o precursor inorgânico do tipo

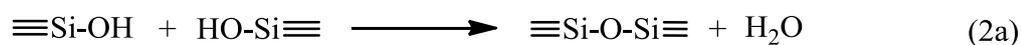
ortossilicato de tetra-alquila (formação de sílica pura), a química do processo sol gel será descrita por duas reações principais: (i) hidrólise (Eq. 1) e (ii) condensação (Eq. 2a e 2b) (BENVENUTTI et al. 2009).

(i) Hidrólise



Nesse processo, ocorre a hidrólise do precursor inorgânico, por exemplo, grupos alcóxidos de silício são hidrolisados, resultando na formação de grupos silanóis (Si-OH) e álcool (R = grupo metil, etil);

(ii) Condensação



ou



Esta etapa do processo envolve a policondensação do grupo silanóis, em que há inicialmente a formação do estado sol, sendo que a continuação da reação transita para o estado gel, que confere um enrijecimento na estrutura tridimensional do polímero inorgânico. As Equações 1 e 2 se referem à obtenção de sílica pura, onde se utiliza apenas o precursor inorgânico no processo de gelificação.

Como observa Benvenuti et al. (2009), materiais híbridos orgânico-inorgânicos a base de sílica serão obtidos via sol gel a partir da adição de um componente orgânico no meio de reação, aumentando a complexidade do processo, que ainda pode ser bem controlado, uma vez que o precursor inorgânico apresenta uma cinética lenta nas reações de gelificação.

Nesse caso, um híbrido orgânico-inorgânico pode ser obtido utilizando organossilanos polimerizáveis do tipo $\text{R}'_{4-x}\text{Si}(\text{OR})_x$ como precursores do componente orgânico, em que um grupo orgânico está ligado ao átomo de silício formando uma ligação Si-C hidroliticamente estável, devido à baixa acidez de Lewis do silício (ALFAYA; KUBOTA, 2002, BENVENUTTI et al. 2009). Desse modo, moléculas do tipo $\text{R}'_{4-x}\text{Si}(\text{OR})_x$ ou $\text{YR}'_{4-x}\text{Si}(\text{OR})_x$, em que x é geralmente um grupo

metoxi ou etoxi e R' representa uma cadeia orgânica contendo ou não um grupo funcional Y (-NH₂, Cl, I, epóxi, SH), podem ser incorporadas na matriz inorgânica, formando uma classe de híbridos cujo componente orgânico é covalentemente ancorado na superfície da fase inorgânica (ALFAYA; KUBOTA, 2002, BENVENUTTI et al. 2009).

Uma forma de preparar tais materiais a base de sílica, funcionalizados via processo sol gel, envolve a reação de tetraetilortosilicato (TEOS) com organosilanos do tipo YR'_{4-x}Si(OR)_x (EL-NAHHAL; EL-ASHGAR, 2007). Nesse tipo de reação, o TEOS é utilizado como precursor da rede inorgânica, enquanto organosilanos formam fases quimicamente ligadas na superfície da sílica. Geralmente, a reação é realizada em meio alcoólico, na presença de um catalisador ácido ou básico, em que os processos de hidrólise e policondensação ocorrem simultaneamente. As características finais do material híbrido são influenciadas pelo pH e tipo de catalisador utilizado, temperatura de gelificação, razão entre a quantidade do componente inorgânico e orgânico utilizado na síntese, entre outros (BENVENUTTI et al. 2009).

Utilizando o processo sol gel, suportes hidrofóbicos podem ser preparados a partir de organosilanos contendo em sua cadeia orgânica grupos hidrofóbicos alifáticos do tipo octil, octadecil, ou aromáticos do tipo fenil, entre outros. Esses materiais geram superfícies largamente hidrofóbicas no suporte que podem interagir com moléculas de lipases formando uma monocamada de enzimas estabilizadas por forças entrópicas. A Figura 10 ilustra tipos de suportes hidrofobicamente ativados com grupos alquila ou arila.

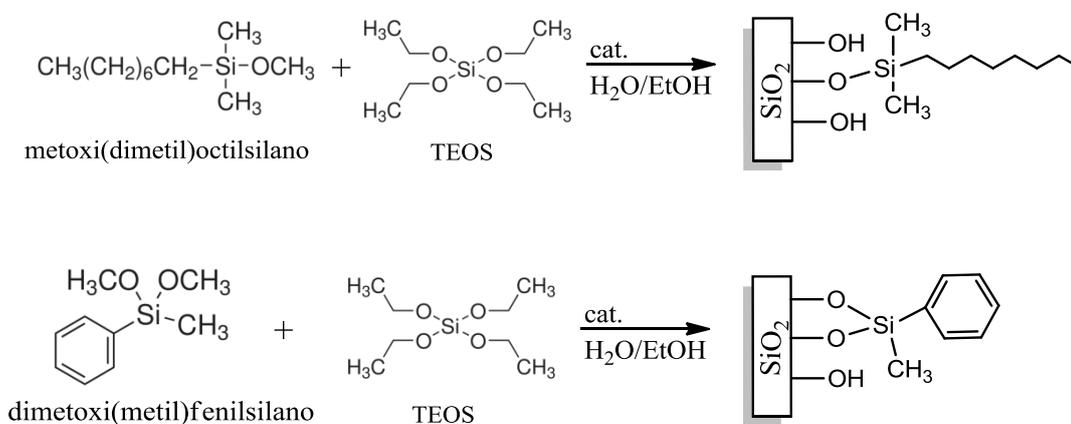


Figura 10. Representação esquemática da preparação de superfícies hidrofóbicas a base de sílica contendo grupos (a) octil e (b) fenil pendentés através de processo sol gel.

O uso desse tipo de suporte é preferível para criar uma interface hidrofóbica, onde algumas lipases podem simular um mecanismo de ativação interfacial (DENG et al. 2004).

Da mesma forma, utilizando o processo sol gel, sílicas organofuncionalizadas podem ser preparadas visando à imobilização covalente de lipases. Nesse caso, é bastante recomendável o uso de organosilanos contendo grupos do tipo γ -cloropropil, γ -glicidoxi, γ -aminopropil, entre outros, que podem se ligar diretamente às lipases. Alternativamente, os organosilanos podem reagir com moléculas de interesse, como o glutaraldeído, formando um novo agente sililante, que numa etapa subsequente sofre uma co-polimerização com TEOS, resultado em polisiloxisano funcionalizado contendo grupos funcionais específicos para formar ligações covalentes com os grupos residuais das enzimas.

Geralmente, agentes sililantes do tipo 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, mercaptopropiltrimetoxissilano ou 3-aminopropiltrimetoxissilano são utilizados na reação com TEOS através de uma policondensação hidrolítica, resultando em um material suporte contendo uma fase orgânica pendente com grupo funcional reativo (EL-NAHHAL; EL-ASHGAR, 2007). A Figura 11 mostra um esquema de preparações de suportes ativados via processo sol gel contendo grupos funcionais reativos.

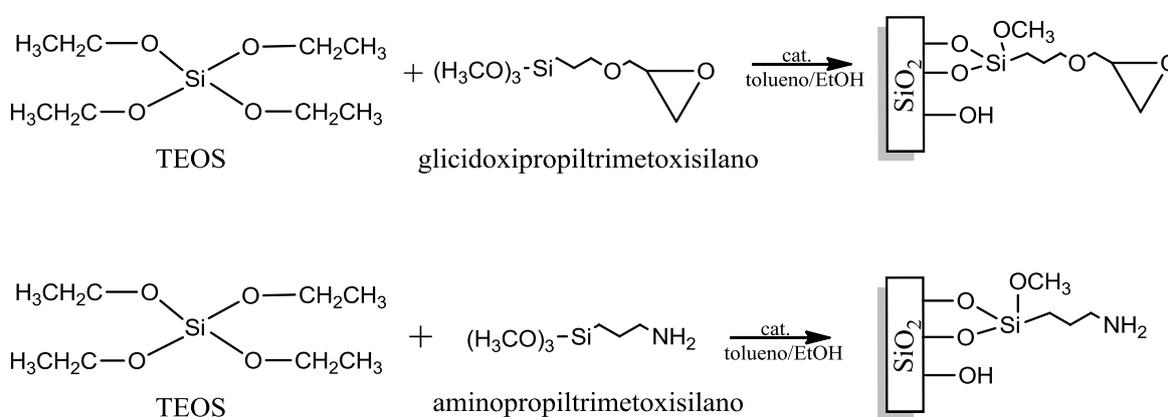


Figura 11. Representação esquemática de preparações de suportes ativados via processo sol gel para aplicação na imobilização covalente de lipases.

2.1.9.3 Ativação por enxerto (*grafting*)

Diferentemente do processo sol gel, a funcionalização no método *grafting* (ou enxerto) é realizada através da reação com a superfície de uma matriz pré-formada, levando a formação de fases orgânicas quimicamente ligadas e homogeneamente dispersas na superfície. O material pré-fabricado e/ou natural não modificado deve ser submetido em reações de funcionalização, em que é explorada a reatividade de sua superfície frente aos grupos reativos das moléculas de interesse

Com efeito, no caso de materiais com superfícies hidroxiladas, como alumina, carvão ativo, sílica e silicatos mesoporosos, celulose, e argilominerais, por exemplo, a reatividade será controlada pela densidade de grupos silanóis superficiais disponíveis, além dos aspectos morfológicos e topográficos da superfície do material suporte, bem como da natureza da molécula reagente (SUTRA et al. 1999).

A principal vantagem da funcionalização por enxerto está relacionada à boa reprodutibilidade dos derivados obtidos em relação àqueles preparados via processo sol gel. Contudo, o grau de funcionalização por enxerto geralmente é bem mais baixo comparado à funcionalização pelo método sol gel. Isso se deve ao fato de que a formação de fases organofuncionalizadas na matriz inorgânica, durante o processo de policondensação hidrolítica, é independente da disponibilidade de silanóis superficiais. Por outro lado, na organofuncionalização por enxerto, o grau de recobrimento com as moléculas orgânicas incorporadas ao suporte é dependente da disponibilidade de silanóis reativos, que é função do tratamento térmico dado à superfície da matriz inorgânica que contém esses grupos silanóis (ZHURAVLEV, 2000).

Tal como no método sol gel, na preparação de materiais a base de sílica e silicatos organicamente modificados pelo método *grafting*, utilizam-se comumente moléculas do tipo agente sililante para promover reações de silanização na superfície dos suportes. Porém, antes deste procedimento, muitas vezes é necessária uma etapa de pré-tratamento que envolve a eliminação de pequenas impurezas orgânicas e/ou minerais, como também a desidratação da superfície por eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas, mediante aquecimento e vácuo (ARAKAKI et al. 2004).

Assim, depois de pré-tratado, o material suporte segue para etapa de silanização com organosilanos, a qual ocorre através da reação entre grupos reativos do

tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcoxissilanos mono, bi ou trifuncionais e os silanóis superficiais da matriz inorgânica. O material resultante contém cadeias orgânicas covalentemente pendentes no suporte através de ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-R}$, sendo hidrolíticas e termicamente estáveis, em que R representa uma cadeia orgânica contendo um grupo funcional específico. A Figura 12 ilustra alguns exemplos de organofuncionalização por *grafting*, em materiais a base de sílica, através de reações de silanização com organosilanos trifuncionais.

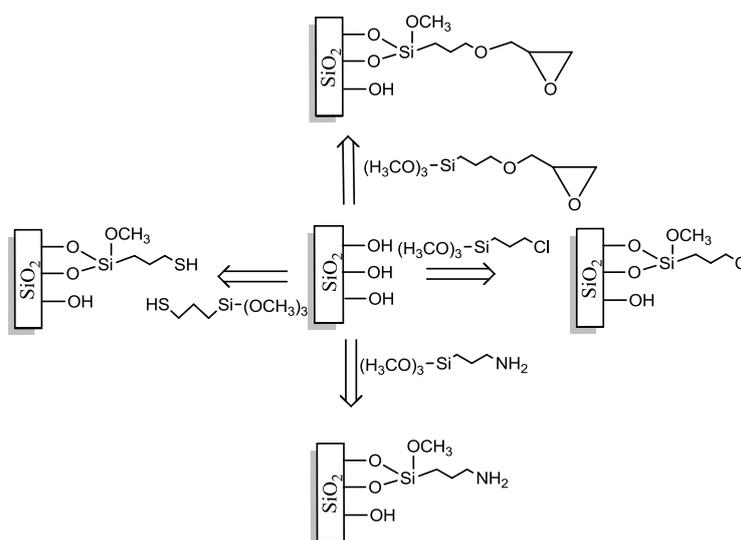


Figura 12. Representação esquemática de reações de funcionalização por *grafting* com organosilanos trifuncionais em superfície de sílica.

A preparação de superfícies organicamente modificadas por enxerto é muito atrativa quando se pretende imobilizar lipases a partir de um suporte natural e abundante, ou sinteticamente pré-formado, comercialmente disponível e relativamente barato. Desde que tais materiais sejam resistentes mecanicamente e ao ataque microbiológico, porém passíveis de manipulações químicas de interesse à imobilização de lipases, a ativação por enxerto torna-se uma excelente estratégia para imobilizar física ou quimicamente os biocatalisadores, tornando possível a formação de sistemas enzimáticos cataliticamente estáveis.

Nessa direção, Sørensen et al. (2010), utilizando sílicas mesoporosas organofuncionalizadas por *grafting*, demonstrou que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em superfície hidrofobicamente ativada apresentou maior atividade específica em relação ao suporte hidrofílico e atribuiu o melhor desempenho

do material hidrofóbico à ativação interfacial da enzima quando imobilizada na superfície hidrofóbica.

Suportes ativados com grupos oxirano (anel epóxi) têm sido muito utilizados para imobilização covalente de lipases através de ligações multipontuais com grupos reativos superficiais das enzimas (TORRES-SALAS et al. 2011). Esse tipo de sistema é capaz de fornecer ligações muito efetivas com as biomoléculas, uma vez que os grupos epóxi podem reagir com diferentes grupos nucleofílicos da proteína (-NH₂, -OH, -SH), especialmente com grupos amino superficiais, gerando biocatalisadores imobilizados muito estáveis e robustos (MATEO et al. 2003). A Figura 13 ilustra um esquema de preparação de um suporte ativado com grupos epóxi por reações de enxerto e o subsequente ataque covalente de uma enzima.

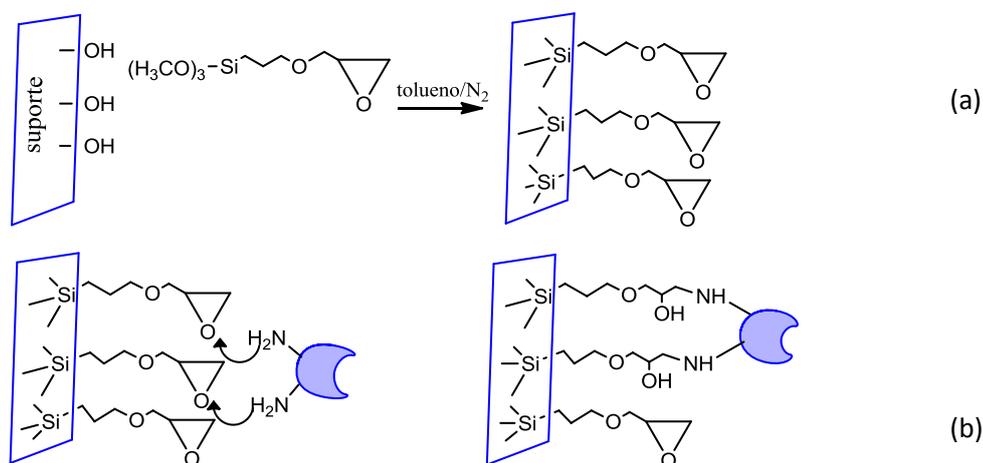


Figura 13. Funcionalização com organosilano epoxi (a) pelo método *grafting* (enxerto) de uma superfície de suporte hidroxilada, seguido de um ataque (b) multipontual da enzima.

Alternativamente, é possível introduzir espaçadores, como o glutaraldeído, através de reações de enxerto, os quais vão atuar como reagentes de acoplamento para imobilizar enzimas covalentemente. Nesses casos, primeiramente a superfície do material suporte pode ser funcionalizada com um agente modificador que reage com a superfície do material, e em seguida um grupo funcional incorporado com o agente modificador pode se ligar com um agente de acoplamento, sendo este último reativo frente às enzimas, como mostra a Figura 14.

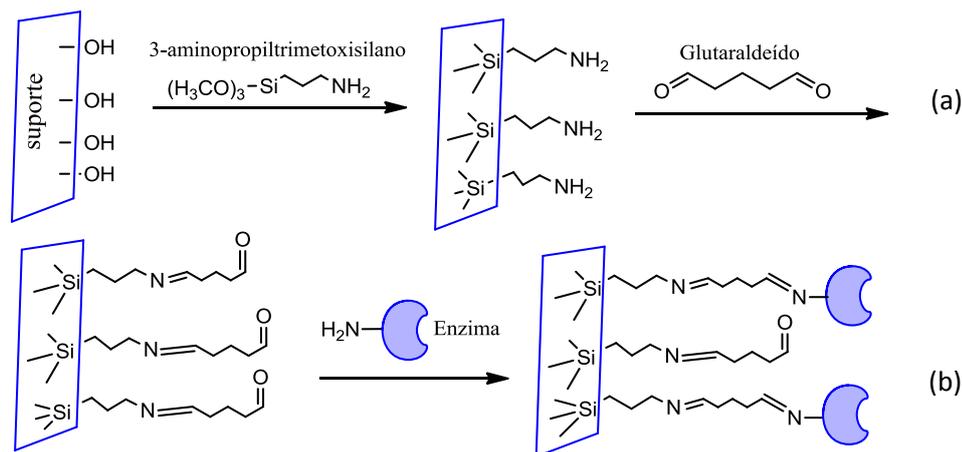


Figura 14. Ativação de suporte por enxerto para imobilização de enzima. Na reação (a) ocorre o ancoramento do agente modificador aminosilano, seguido da funcionalização com agente de acoplamento bifuncional (glutaraldeído). Em (b) ocorre o ataque covalente da enzima.

Esse procedimento de enxerto com espaçadores é uma forma eficiente de ativar um suporte para imobilizar lipases, uma vez que, além de permitir a interação com enzimas através de ligações covalentes, também minimiza possíveis efeitos estéricos e/ou outras interações indesejáveis com o suporte (G. OZYILMAZ, 2009; GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

2.2 Sílica gel: aspectos gerais

A sílica é um dos materiais inorgânicos mais estudados e aplicados como adsorvente para uma ampla variedade de espécies químicas, seja na pré-concentração de metais pesados, na adsorção de corantes e pesticidas, na captura de CO_2 , ou ainda na imobilização de biomoléculas (WANG et al. 2012; SAMANTA et al. 2012; QU et al. 2011; PRADO; AIROLDI, 2002)

Possuindo fórmula geral SiO_2 , a sílica ocorre em uma variedade de formas, podendo ser natural ou sintética, cristalina ou amorfa, com propriedades físicas e químicas ligeiramente diferenciadas. Estruturalmente, a sílica é um polímero inorgânico constituído de unidades tetraédricas de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ que formam uma rede tridimensional rígida, na qual quatro átomos de oxigênio estão nos vértices de um tetraedro regular com um átomo de silício na cavidade central. A não periodicidade ou irregularidade estrutural da sílica é resultante do empacotamento randômico dessas unidades $(\text{SiO}_4)^{4-}$, que lhe confere um aspecto amorfo (ADAM; APPATURI; IQBAL,

2012; BERGNA; ROBERTS, 2006). Desse modo, o polimorfismo da sílica é baseado nas diferentes ligações de suas unidades tetraédricas, como mostra a Figura 15.

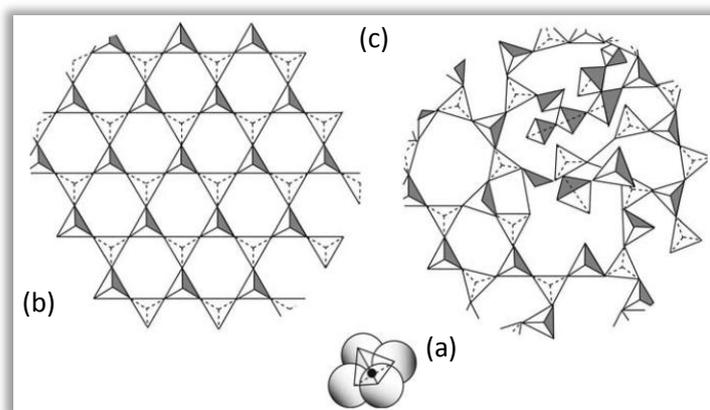


Figura 15. Representação esquemática de estruturas de sílica (a) unidade tetraédrica, (b) estrutura regular ordenada e (c) estrutura amorfa. Fonte: BERGNA; ROBERTS, 2006.

O polímero inorgânico sílica gel é uma variedade de sílica, sendo um sólido amorfo sintético, que pode ser preparado por diferentes métodos (YIN et al. 2011; CHRISTY; EGEBERG, 2005). Atualmente, a sílica gel tem sido obtida com alto grau de pureza cromatográfica, a partir da hidrólise e condensação de alcoxissilanos via por processo sol gel (ver seção 2.7.1.1, cap. 2). Sendo um material de baixo custo, facilmente disponível, com elevada estabilidade mecânica, resistência a ataque microbiano, morfologia porosa e elevada área superficial, a sílica gel se apresenta com enorme potencial para a preparação de novos adsorventes, despertando grande interesse à comunidade científica e industrial. (YIN et al. 2011; QU et al. 2011; CHRISTY, 2011).

A sílica gel tem grande utilidade como suporte, principalmente, quando se pretende imobilizar moléculas organofuncionais através de reações na superfície. Disso resulta que é possível alterar as propriedades físico-químicas da superfície da sílica gel e obter suportes quimicamente modificados com uma grande variedade de moléculas contendo grupos funcionais reativos frente a moléculas de interesse.

Assim, a importância do desenvolvimento de novos materiais quimicamente modificados, a base de sílica gel, se reflete nos inúmeros estudos e esforços recentes dedicados às aplicações nas mais diversas áreas da química, tais como a cromatografia, a fabricação de sensores eletroquímicos, biosensores, fotocatalise,

catálise química e biocatálise, luminescência, entre outros (ABBASI, 2012; ADAM; APPATURI; IQBAL, 2012; BORISOV; LEHNER; KLIMANT, 2011; BUSZEWSKI et al. 2012; COSTA, et al. 2011; JAROENWORALUCK et al. 2012; LOSEV et al. 2009; ZHANG et al. 2012).

2.2.1 Propriedades da superfície de sílica gel

Como polímero inorgânico amorfo, a sílica gel é constituída de grupos siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), em sua maioria na estrutura interna, e grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) distribuídos na superfície (YIN et al. 2011; MANU; HARESH; BAJAJ, 2010). Ademais, ainda é possível encontrar silanóis internos, localizados no esqueleto estrutural e/ou em ultramicroporos da sílica (diâmetro de poro < 1 nm) e pequena quantidade de grupos siloxanos na superfície (ZHURAVLEV; POTAPOV, 2006).

As propriedades de superfície da sílica gel são fortemente dependentes dos grupos silanóis, que são considerados fortes sítios de adsorção. A presença desses grupos na superfície da sílica foi primeiramente reportada por Kiselev em 1936, o qual sugeriu que as moléculas de água liberadas durante a calcinação de sílica gel, excetuando àquelas moléculas fisicamente adsorvidas, eram provenientes de grupos OH quimicamente ligados à superfície da sílica (KISELEV, 1936 apud CHRISTY, 2011; ZHURAVLEV, 2000).

De acordo com Zhuravlev e Potapov (2006), há dois processos principais que levam a formação dos grupos silanóis por reações termodinamicamente favoráveis: (i) polimerização por condensação e (ii) re-hidroxilação (Figura 16).

- (i) Durante a síntese da sílica gel, via processo sol-gel, uma solução supersaturada de ácido ortosilícico se transforma em ácido polisilícico através da polimerização/policondensação dos grupos Si(OH)_4 , gerando como produto final um xerogel com grupos (O-H) retidos na superfície.
- (ii) Grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) também podem ser formados através de reações de re-hidroxilação que envolve o tratamento, em meio aquoso, de uma sílica termicamente desidroxilada até aproximadamente $400\text{ }^\circ\text{C}$.

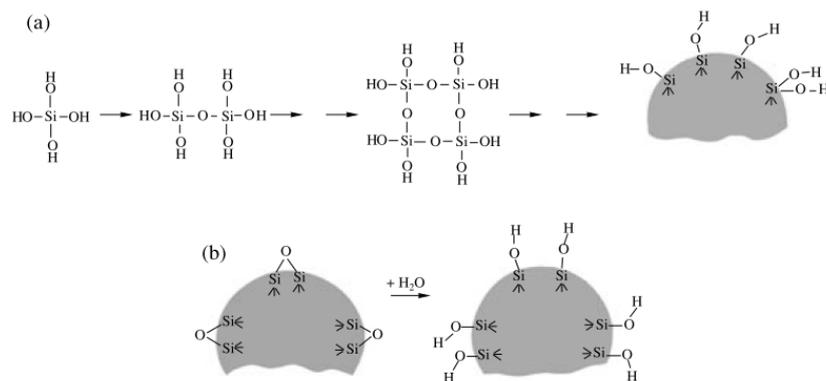


Figura 16. Representação esquemática da formação de grupos $\equiv\text{Si-OH}$ na superfície de sílica gel, sendo (a) polimerização por condensação e (b) re-hidroxição por tratamento em meio aquoso. Fonte: ZHURAVLEV; POTAPOV (2006).

2.2.2 Natureza da superfície

Quanto à natureza, os grupos silanóis podem ser simples ($\equiv\text{SiOH}$) ou geminais ($=\text{Si(OH)}_2$), os quais podem ser subdivididos em três tipos, a saber, silanóis simples livres (ou isolados), silanóis geminais e silanóis vicinais. Os silanóis simples, também conhecidos como silanóis livres ou isolados, possuem os grupos OH localizados a uma distância suficientemente longe de grupos (OH) superficiais vizinhos, de modo a não permitir a formação de ligações de hidrogênio entre eles. (ZHURAVLEV; POTAPOV, 2006; ZHURAVLEV, 2000)

Com relação aos silanóis geminais, também conhecidos como silanodíois, sua existência foi postulada por Pery e Hensley, mas só foi confirmada após o surgimento da espectroscopia RMN de ^{29}Si com CP MAS, no estado sólido. Para estes silanóis, dois grupos OH estão ligados ao átomo de silício e podem estar suficientemente próximos para formar ligações de hidrogênio entre eles. Já os silanóis vicinais são aqueles que possuem grupos OH formando ligações de hidrogênio entre espécies $\equiv\text{Si-OH}$ ou $=\text{Si(OH)}_2$ adjacentes, ou entre suas combinações que formam ligações de hidrogênio devido à proximidade entre os silanóis (EL-NAHHAL; EL-ASHGAR, 2007; ZHURAVLEV; POTAPOV, 2006). Diferentes tipos de grupos silanóis podem ser representados de acordo com a Figura 17.

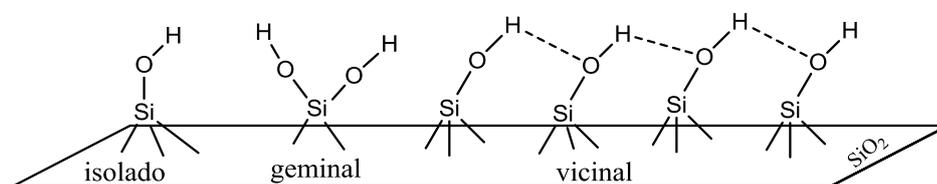


Figura 17. Tipos de grupos silanóis presentes na superfície de sílica gel.

2.2.3 Reatividade da superfície

Quanto à reatividade da superfície da sílica gel, esta é fortemente dependente da natureza, distribuição, concentração e acessibilidade dos grupos silanóis superficiais (GALLAS et. al. 2009). Uma vez que a estrutura da sílica gel amorfa é altamente desordenada, então é de se esperar uma distribuição irregular no arranjo dos grupos hidroxilas e, portanto, a superfície pode ser coberta por diferentes tipos de grupos silanóis em diferentes orientações (BERGNA; ROBERTS, 2006)

Todos os silanóis conferem um caráter hidrofílico à superfície da sílica e contribuem para a relativa acidez de Brønsted. No grupo silanol ($\equiv\text{Si-OH}$), as interações $d_{\pi}\text{-p}_{\pi}$ fazem com que a densidade eletrônica fique deslocalizada da ligação O-H para as vizinhanças da ligação $\equiv\text{Si-O}$, o que aumenta a nucleofilicidade do oxigênio doador. Desse modo, a presença do dipolo na ligação hidrogênio-oxigênio e o reforço do efeito da conjugação $(d\text{-p})_{\pi}$ nos silanóis estão associados ao comportamento ácido da superfície da sílica gel e a reatividade dos grupos silanóis (ZHURAVLEV, 2000).

Por outro lado, o reforço das interações $d_{\pi}\text{-p}_{\pi}$ nas ligações dos grupos siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), onde ambos os pares de elétrons do átomo de oxigênio estão envolvidos em interações π com orbitais d vazios do átomo de silício, diminui a nucleofilicidade do oxigênio e confere um caráter hidrofóbico a estes grupos, que ficam impedidos de formar ligações de hidrogênio (ZHURAVLEV, 2000).

Com efeito, dada a polaridade natural dos grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$), além do reforço proveniente das interações doador-aceptor $(d\text{-p})_{\pi}$ na ligação ($\equiv\text{Si-O-}$), bem como a desigual distribuição de densidade eletrônica na superfície, os diferentes sítios silanóis apresentam diferentes graus de polaridade. Por conseguinte, a reatividade de tais sítios também depende do tipo de silanol na superfície (ZHURAVLEV, 2000; NAWROCKI, 1997).

Christy e Egeberg (2005) observam que a diferença de comportamento ácido dos grupos silanóis superficiais também é devida à polaridade que surge da formação de ligações de hidrogênio com grupos silanóis das vizinhanças. Disso resulta que, a diferença de acidez nos silanóis também vai depender de quão suficientemente próximos estão os sítios $\equiv\text{Si-OH}$ para formar cadeias de silanóis com hidrogênios acoplados.

Em trabalho pioneiro, Ong et al. (1992) apud Jal, Patel e Mishra (2004) demonstraram a presença de dois tipos de silanóis na interface água/sílica, tendo

valores de pKa 4,9 e 8,5 para uma população de silanóis consistindo de 19% e 81%, respectivamente. Esses autores associaram o baixo valor de pKa (4,9) aos grupos silanóis isolados, isto é, àqueles sem nenhuma ligação de hidrogênio envolvida com os grupos vizinhos. Por outro lado, a maior parte dos grupos silanóis (81%) encontrados na superfície da sílica foram atribuídos aos silanóis vicinais, que apresentaram alto valor de pKa. Assim, os silanóis livres foram considerados mais reativos do que os silanóis vicinais, sendo explicado com base na fácil dissociação de prótons dos silanóis livres comparados aos prótons de silanóis acoplados por ligação de hidrogênio. Resultados similares foram reportados por outros autores (JAL; PATEL; MISHRA, 2004).

Nessa direção, Gillis-D'Hamers et al. (1992) apud Nawrocki (1997) investigou a heterogeneidade energética da superfície de uma sílica gel através da dessorção de piridina em temperatura programada, em que demonstrou que silanóis vicinais podem ser considerados sítios de baixa energia de adsorção (energia de dessorção, $E_d = 50-65$ kcal/mol), enquanto os silanóis isolados são considerados sítios de adsorção mais fortes (energia de dessorção, $E_d \sim 90$ kcal/mol).

Portanto, a natureza ácida dos grupos OH de silanóis é responsável pela reatividade da superfície da sílica gel, resultando em sítios ácido-base de Brønsted que atuam como centros de adsorção de moléculas capazes de interagir por ligações de hidrogênio ou por interações doador-aceptor.

2.2.4 Mecanismo de reações na superfície

Estudos experimentais e teóricos de mecanismos de reações químicas na superfície de sílica foram realizados, especialmente, por pesquisadores do Instituto de Química de Superfície, em Kiev, da Academia de Ciências da Ucrânia (BERGNA; ROBERTS, 2006; TERTYKH, 2006; CHUIKO, 1990). Esses estudos mostraram que a reatividade química da superfície da sílica, frente a diferentes compostos orgânicos ou inorgânicos, pode envolver mecanismos de substituição e adição eletrofílicas ou nucleofílicas (GUN'KO et al. 1993; GORLOV, 1993). A Figura 18 ilustra os possíveis tipos de reações heterolíticas na superfície de sílica.

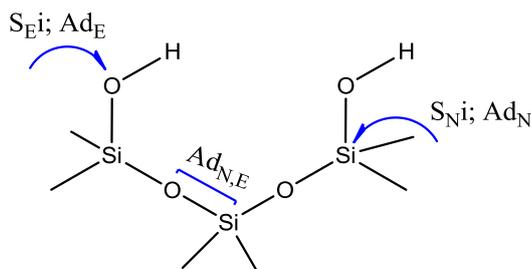


Figura 18. Tipos de reações que podem ocorrer na superfície da sílica gel. Substituição eletrofílica (S_{Ei}), substituição nucleofílica (S_{Ni}), adição eletrofílica (Ad_E) e adição nucleofílica (Ad_N).

As reações de decomposição heterolítica devem ocorrer nos grupos siloxanos através de mecanismos de adição eletrofílica (Ad_E) ou nucleofílica (Ad_N). Porém, também podem ocorrer reações adição eletrofílica e nucleofílica nos grupos silanóis. Reações de substituição nucleofílica (S_{Ni}) devem ocorrer em átomos de silício dos silanóis com substituição de grupos hidroxilas, enquanto reações de substituição eletrofílica (S_{Ei}) ocorrem nos grupos silanóis com deslocamento de prótons (BERGNA; ROBERTS, 2006; GORLOV, 1993).

Embora se possa explorar a reatividade da sílica através dos grupos siloxanos, o principal caminho de modificação química de sua superfície é através da reação direta com grupos silanóis.

Na interação com grupos silanóis, no caso de reações de substituição eletrofílica, o ataque do reagente eletrofílico ocorre no átomo de oxigênio do grupo silanol com o deslocamento de prótons (mecanismo S_{Ei}), como pode ser ilustrado na Eq. 3.



De acordo com Tertykh (2006), nesse tipo de reação um íon H⁺ é substituído por um grupo eletrofílico Y⁺ em um estado de transição dito quase cíclico (Fig. 19), em que o ataque do eletrófilo é improvável por trás, mas pode ocorrer de modo frontal ou lateral. Nesse sentido, é importante considerar a natureza do reagente eletrofílico e as propriedades dos grupos substituintes.

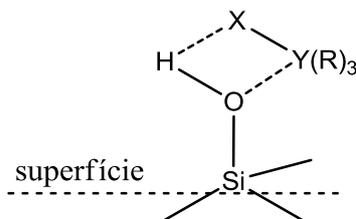
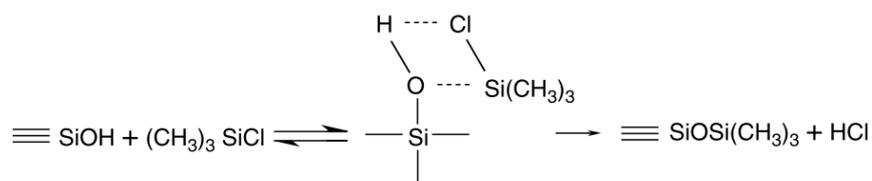


Figura 19. Reação de substituição eletrofílica (S_{Ei}) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com formação de um estado de transição quase cíclico. Onde, $X = Cl, OR, NR_2$; $R =$ grupo alquil e $Y =$ metal, exemplo Si.

Exemplos desse mecanismo de reação podem proceder mediante interações dos sítios silanóis com moléculas do tipo organoclorosilanos, organoalcóxissilanos, organosilazanos, entre outras, como mostra o Esquema 1.



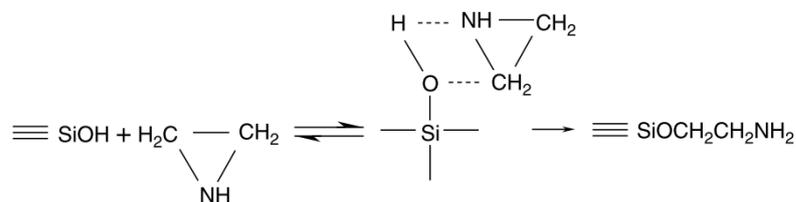
Esquema 1. Reação de substituição eletrofílica (S_E) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com clorosilanos.

Considerando o mecanismo de substituição eletrofílica de próton na superfície da sílica mediante reações dos silanóis com compostos organosilício, Tertykh (2006) afirma que as propriedades próton-aceptora do substituinte no átomo de silício do reagente eletrofílico são de grande importância, uma vez que essas propriedades caracterizam o grau de assistência nucleofílica do grupo abandonador. Nesse contexto, foi sugerido que a atividade de reagentes modificadores do tipo organosilício segue a seguinte ordem de reatividade frente ao silanóis: organosilazanos > organoalcóxissilanos > organoclorosilanos (TERTYKH, 2006).

Em reações de substituição nucleofílica envolvendo os grupos silanóis da sílica, um grupo nucleofílico (X^-) com um α -átomo elétron-doador forma uma ligação doador-aceptor tipo ($Si \leftarrow X_\alpha$), resultando também em um estado de transição quase-cíclico que leva a substituição de um grupo hidroxila do silanol (BERGNA; ROBERTS, 2006; TERTYKH, 2006). Um esquema representativo é ilustrado pela Eq. 4.



Nos grupos $\equiv\text{Si-O-H}$ também podem ocorrer processos de adição eletrofílica (Ad_E), como por exemplo, quando reagem com moléculas do tipo isocianatos ou etileno imina (Esquema 2).



Esquema 2. Reação de adição eletrofílica (Ad_E) através da interação de grupos silanóis na superfície da sílica com moléculas de etileno imina.

2.2.5 Concentração e acessibilidade de silanóis

Os grupos silanóis são os principais sítios reativos da sílica e devido à importância desses sítios para a química de superfície da sílica gel, vários estudos foram dedicados à determinação da concentração dos silanóis, seja por métodos físicos ou químicos (BERGNA; ROBERTS, 2006; JAL; MISHRA, 2004). A concentração de silanóis tem sido medida por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectroscopia na região do infravermelho (IR) e também por técnicas termogravimétricas (TG) (JAL; MISHRA, 2004).

Estudos teóricos realizados por De Boer e Vleeskens (1958), considerando um plano octaédrico de uma β -cristobalita, mostraram que a superfície da sílica teria uma concentração de 4,5 silanol/ nm^2 (De BOER; VLEESKENS, 1958 apud CHRISTY; EGEBERG, 2005). Farias e Airoidi (1998) determinaram a densidade de grupos silanóis por técnica termogravimétrica e obtiveram uma concentração na faixa de 4,3-6,7 OH/ nm^2 . Mais recentemente, Buszewski et al. (2012) utilizaram medidas calorimétricas com base no calor de imersão de hexano e metanol em diferentes tipos de sílica, e demonstram que a concentração média de silanóis acessíveis ($7,51 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) foi similar aos reportados na literatura que apresenta uma média típica para sílica gel em torno de $7,43 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

Não obstante, Zhuravlev (2000) realizou um estudo comparativo com mais de 100 diferentes tipos de sílica, em que se determinou sistematicamente a densidade de grupos OH da superfície, através do método de troca isotópica de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, e demonstrou que o valor de 4,6 OH/ nm^2 (ou aproximadamente 5OH/ nm^2) é

função da temperatura de tratamento, independentemente do tipo de sílica. Esse valor é considerado por Zhuravlev e utilizado por muitos pesquisadores como sendo uma constante físico-química para uma superfície de sílica completamente hidroxilada. Contudo atualmente é aceito que o número estimado de grupos OH acessíveis na superfície da sílica está entre 4,0 e 5,0 OH/nm² (JAL; MISHRA, 2004; ZHURAVLEV; POTAPOV, 2006; ZHURAVLEV, 2000).

Outro parâmetro importante que influencia na reatividade da superfície da sílica gel está relacionado à disponibilidade dos grupos silanóis superficiais. Dado que os diferentes grupos silanóis podem interagir com as moléculas de água por ligações de hidrogênio, a superfície da sílica tende a formar policamadas dessas moléculas fisissorvidas. Com base nisso, vários autores reportam que uma etapa de ativação, mediante aquecimento e/ou vácuo da superfície da sílica em temperatura apropriada, é necessária a fim de eliminar as moléculas de água fisicamente adsorvidas e deixar o maior número de grupos silanóis livres para reagir (ZHURAVLEV, 2000; ARAKAKI et al., 2004), como pode ser visto de forma ilustrativa na Figura 20.

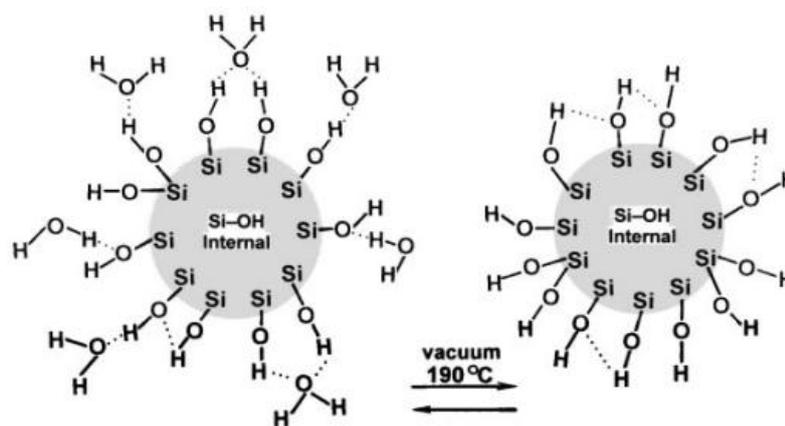


Figura 20. Representação da eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície da sílica gel. Fonte: Zhuravlev, 2000.

Um aspecto muito importante que deve ser levado em conta durante o processo de ativação da superfície da sílica gel, envolve o grau de temperatura de tratamento. Embora seja difícil estabelecer uma temperatura crítica que determina onde termina o processo de remoção de moléculas de água fisicamente adsorvidas (desidratação) e quando inicia o processo de remoção de grupos hidroxilas superficiais (desidroxilação), muitos trabalhos tem afirmado que a temperatura de ativação deve ser

abaixo de 200 °C, pois acima desta inicia-se um processo de condensação de grupos silanóis, que em certas condições ocorre de modo irreversível (ZHURAVLEV, 2000).

Em temperaturas muito acima de 400 °C e sem silanóis vicinais na superfície, as ligações siloxanos se tornam bastante estáveis e o processo de re-hidroxição se converte praticamente irreversível. Tais processos de desidroxilação e re-hidroxição podem ser ilustrados de acordo com a Figura 21.

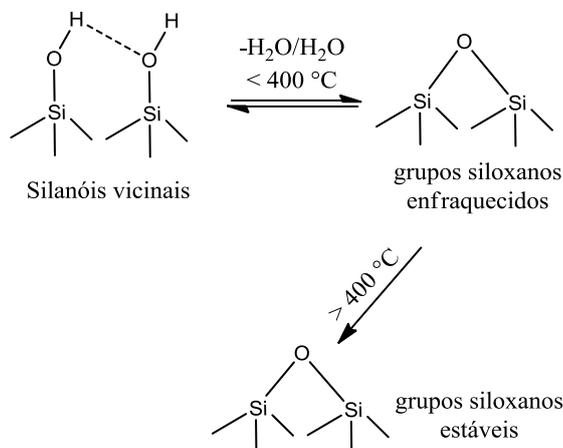


Figura 21. Processos de desidroxilação e re-hidroxição na superfície da sílica gel.

2.2.6 Sílica gel modificada para imobilização de lipases

A imobilização covalente de lipases em materiais insolúveis é uma estratégia interessante para se obter biocatalisadores heterogeneizados estáveis. Vários materiais têm sido amplamente investigados para imobilização de lipases pelo método covalente, sejam a partir de matrizes inorgânicas, orgânicas ou materiais híbridos orgânico-inorgânicos. De maneira geral, esses materiais são funcionalizados com moléculas reativas antes de submetidos em contato com os biocatalisadores. (MENDES, 2011)

Como regra geral, Hanefeld, Gardossi e Magner (2009) sustentam que a imobilização covalente deve ser preferível quando se trabalha em meio aquoso e existem fatores desnaturantes. Isso pode ser explicado com base no fato de que a imobilização covalente reduz a flexibilidade conformacional da enzima, bem como suas vibrações térmicas, prevenindo-a de uma possível desnaturação no meio catalítico. Contudo, o ataque covalente de lipases em suportes quimicamente ativados produz derivados enzimáticos imobilizados que podem ser aplicados em qualquer meio,

diferentemente das lipases fisicamente adsorvidas, que são mais estáveis em meio orgânico, pois são bastante sensíveis a lixiviações em meio aquoso (MENDES, 2011).

Assim, a preparação de materiais para fins de imobilização covalente envolve, essencialmente, a incorporação de moléculas contendo grupos funcionais reativos quimicamente ligados na superfície interna e/ou externa dos suportes. Nesse sentido, a busca de novos materiais tem impulsionado o desenvolvimento de vários suportes quimicamente modificados através de reações de organofuncionalização, via processo sol gel, ou modificação pós-síntese (BREM, 2012).

Nessa direção, a sílica gel se mostra como um material com características interessantes para imobilizar lipases. A modificação química deste tipo de material permite a incorporação de espaçadores que pode levar a redução de interações indesejáveis entre a enzima e o suporte (OZYILMAZ, G. 2009).

Yang et al. (2010) aplicaram uma preparação de lipase imobilizada em sílica gel modificada com gluraldeído e observaram que os biocatalisadores imobilizados mostraram alta eficiência enantioseletiva frente a um álcool racêmico. Recentemente, um estudo realizado por Ozyilmaz (2009) mostrou que a imobilização de uma lipase de *Candida rugosa* em sílica gel modificada com espaçadores mostrou alta eficiência catalítica e estabilidade na hidrólise de ésteres de p-nitrofenol. O desempenho catalítico destas preparações de lipase resultou em derivados enzimáticos com grande potencial de reutilização.

Desse modo, estudos mais recentes têm dado ênfase em desenvolver novos suportes a base de sílica para melhorar a estabilidade química e catalítica das lipases (SERRA et al. 2010; TORRES-SALAS et al. 2011).

Referências

- ABBASI, M. One-pot synthesis of thia-Michael products from thio acids, epoxides, and electron-deficient alkenes promoted by a silica gel/Et₃N combined catalyst. **Tetrahedron Letters**. v.53, p. 3683–3685, 2012.
- ADAM, F.; APPATURI, J. N.; IQBAL, A. The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress. **Catalysis Today**, v. 190, p. 2–14, 2012.
- AKOH, C. C.; CHANG, S; LEE, G; SHAW, J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **J. Agric. Food Chem**, v.55, p. 8995–9005, 2007.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo sol gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**. v. 25, p. 835-841, 2002
- AL-ZUHAIR, S. Enzymatic Production of Bio-Diesel from Waste Cooking Oil Using Lipase. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 2, p. 84-88, 2008
- ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 63, p. 2804–2817. 2006.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J.**, v. 343, p. 177–183, 1999.
- ARAKAKI et al. Thioglycolic acid grafted onto silica gel and its properties in relation to extracting cations from ethanolic solution determined by calorimetric technique. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 273, p. 211–217, 2004.
- BALAT, M.; BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**. p. 4, 2008.
- BAYRAMOĞLU, G. et al. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 372–378, 2011.
- BERGNA, H. E.; ROBERTS, W. O. COLLOIDAL SILICA Fundamentals and Applications. By Taylor & Francis Group, LLC. 2006.
- BENVENUTTI, E. V.; et al. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1926-1933, 2009.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia**. Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BORISOV, S. M.; LEHNER, P.; KLIMANT, I. Novel optical trace oxygen sensors based on platinum(II) and palladium(II) complexes with 5,10,15,20-meso-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)- porphyrin covalently immobilized on silica-gel particles. **Analytica Chimica Acta**. v. 690, p. 108–115, 2011.

BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 358-366, 2009.

BORNSCHEUER, U. T. et al. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, 2002.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnol Lett.**, v. 31, p. 1639–1650, 2009.

BREM, J. et al. Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. **Process Biochemistry** 47, 119–126, 2012.

BUSZEWSKI, B. et al. Determination of accessible silanol groups on silica gel surfaces using microcalorimetric measurements. **Journal of Chromatography**. v. 1232, p. 43–46, 2012.

BUXBAUM, E. **Biophysical Chemistry of Proteins**. An Introduction to Laboratory Methods: Springer, New York. 2011. p. 82.

CARDOSO, C. L.; MORAES M. C.; CASS, E. Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quim. Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHRISTY, A. A. Effect of Hydrothermal Treatment on Adsorption Properties of Silica Gel. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 50, p. 5543–5549, 2011.

CHRISTY, A. A.; EGEBERG, P. K. Quantitative determination of surface silanol groups in silicagel by deuterium exchange combined with infrared spectroscopy and chemometrics. **Analyst**, v. 130, p. 738–744, 2005.

COELHO, A. C. V. et al. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas – uma revisão. **Quim. Nova**, vol. 30, n. 5, p. 1282-1294, 2007.

COSTA, D. A. et al. Direct Quantification of Cu^{2+} in Cachaca Using a Solid Paraffin-Based Carbon Paste Electrode Chemically Modified with 2-Aminothiazole-Silica-Gel. **Int. J. Electroch. science**. v. 6, n. 12, p. 6410-6423, 2011.

CHUIKO, A. A. Chemistry of sílica surface and mechanisms of chemical reactions. 1990.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

- DENG, H. et al. Adsorption and Activity of *Candida rugosa* Lipase on Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers. **Langmuir** 20, p. 10168-10173, 2004.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; J. ZENG. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125–129, 2004.
- EL-NAHHAL, I. M.; EL-ASHGAR, N. M. A review on polysiloxane-immobilized ligand systems: Synthesis, characterization and applications. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 692, p. 2861–2886, 2007.
- FARIAS, R. F.; AIROLDI, C. **J. Thermal Anal.** v. 53, p. 751, 1998.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M., SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase, **Biotechnology Adv.**, 2012.
- GALLAS, J. et al. Quantification of Water and Silanol Species on Various Silicas by Coupling IR Spectroscopy and in-Situ Thermogravimetry. **Langmuir**, v. 25, p. 5825–5834, 2009.
- GANDHI, N. N. Applications of Lipase. **JAACS**, v. 74, p. 621–634, 1997.
- GODDARD, J.M.; HOTCHKISS, J.H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Prog. Polym. Sci.** v. 32 p. 698–725, 2007.
- GORLOV, Y. I. Stereochemistry of transition states and mechanisms of chemical reaction on silica surface. **Reacr. Kiner. Caral. Lerr.** v. 50, p. 6 , 1993.
- GOTOR-FERNANDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Adv. Synth. Catal.**, v. 348, p. 797 – 812, 2006.
- GUN'KO, V. M. et al. Interactions of Chlorosilanes with a Silica Surface Catalyzed by Amines **Langmuir**, v. 9, p. 716-722, 1993.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p.763–781, 2004.
- HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, p. 38, p. 453–468, 2009.
- HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in Mesoporous Silicates. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 47, p. 8582 – 8594, 2008.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 550–563, 2012.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three dimensional structures and Biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315–51, 1999.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.

JAL, P.K.; PATEL, S.; MISHRA, B.K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, v. 62, p.1005–1028, 2004.

JAROENWORALUCK, A. et al. Nanocomposite $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ gel for UV absorption. **Chemical Engineering Journal**. v. 181–182, p. 45–55, 2012.

KAMEL, G. et al. Adsorption of *Candida rugosa* lipase at water-polymer interface: The case of poly(DL) lactide. **Surface Science**, v. 605, p. 2017–2024, 2011.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157–176, 2000.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555–569, 2012.

KARTALA, F.; KILINÇA, A.; TIMURA, S. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. v. 87, p. 715-722, 2010.

KHATTABI, M.; GELDER, P.; BITTERA, W.; TOMMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 329–338, 2003.

KIM, K. K. et al. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, p. 173–185, 1997.

KNEŽEVIĆ, Z. D.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S.; MOJOVIĆ, L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. **APTEFF**, 35, 1-280, 2004.

LI, G.; YAO, D.; ZONG, M. Lipase-catalyzed synthesis of biodegradable copolymer containing malic acid units in solvent-free system. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 1123–1129, 2008.

LI, N.; HU, S.; FENG, G. Resolution of 2-nitroalcohols by *Burkholderia Cepacia* lipase-catalyzed enantioselective acylation. **Biotechnol Lett**, v. 34, p. 153–158, 2012.

- LIMA, V. M. G. et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53–61, 2004.
- MANU, V.; MODY, H. M.; BAJAJ, H. C. Effect of Thermal Treatment of Silica Gels on Their Amino Functionalization and Subsequent Adsorption Properties for Cu²⁺ from Aqueous Solution of Copper Sulfate. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 49, p. 8184–8191, 2010.
- MATEO, C. et al., Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 772-777, 2003.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40. p. 1451–1463, 2007.
- MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109–115, 2011.
- MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3689–3694, 2007.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 732–737, 1999.
- NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 38, p. 1109-1115, 1916.
- NAWROCKI, J. The silanol group and its role in liquid chromatography **Journal of Chromatography A**, v. 779, p. 29-71, 1997.
- NOUREDDINI, H. et al. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications**, p. 769-777, 2005.
- OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica **gel Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56 p. 231–236, 2009.
- PADILHA, G. S., et al. Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization, **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 55, p. 7-19, 2012.
- PRADO, A. G. S.; AIROLDI, C. A toxicity decrease on soil microbiota by applying the pesticide picloram anchored onto silica gel. **Green Chemistry**, v. 4, p. 288–291, 2002.

QU, R. et al. Adsorption Kinetics and Isotherms of Ag(I) and Hg(II) onto Silica Gel with Functional Groups of Hydroxyl- or Amino-Terminated Polyamines. **J. Chem. Eng. Data.**, v. 56, p. 1982–1990, 2011.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, p. 87–106, 2011.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 147–148, p. 237–250, 2009

RIGHETTI, P. G. Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 491–499, 2004.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15–32, 2010.

SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. **New lipases and proteases**. Nova Science Publishers, 2006.

SALIS, A. et al. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 262–26, 2009.

SAMANTA, A. Post-Combustion CO₂ Capture Using Solid Sorbents: A Review. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 51, p. 1438–1463, 2012.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489–511, 2012.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods.**, v. 52, p. 1 – 18, 2003.

SCHRAG J. D. et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187–202, 1997.

SCHULZ, T.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. **Protein Science**, v. 9, p. 1053–1062, 2000.

SERRA, E. et al. A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 132, p. 487–493, 2010.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SÖRENSEN, M. H. et al. Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, p. 359–365, 2010.

SUTRA, P. et al. ^{29}Si and ^{13}C MAS-NMR characterization of surface modification of micelle-templated silicas during the grafting of organic moieties and end-capping. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 158, p. 21–27, 1999.

TALBERT, J. N.; GODDART, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8–19, 2012.

TERTYKH, V. A. Chemical Characterization of Silica Powders and Fibers: Application to Surface Modification Procedures. 2006.

TORRES-SALAS, P. Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports. **Adv. Mater.**, v. 23, p. 5275–5282, 2011.

TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. **BMC Structural Biology**. v. 9, 2009.

VERGER, R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. **Trends in biotechnology**. v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. et al. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

YANG, G. et al. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 78 p. 351–356, 2010.

YIN, P. et al. Synthesis of functionalized silica gel with poly(diethylenetriamine bis(methylene phosphonic acid)) and its adsorption properties of transition metal ions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, P. 168– 175, 2011.

WANG, K. et al., Efficient CO₂ capture on low-cost silica gel modified by polyethyleneimine. **Journal of Natural Gas Chemistry**. v. 21, p. 319–323, 2012.

WONG, L. S.; KHAN, F.; MICKLEFIELD, J. Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. **Chem. Rev.** 2009, 109, 4025–4053.

ZHANG, T. et al. Potentiometric detection of silver (I) ion based on carbon paste electrode modified with diazo-thiophenol-functionalized nanoporous silica gel. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 1179–1183, 2012.

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model A: **Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 173, p. 1–38, 2000.

ZHURAVLEV, L. T.; POTAPOV, V. V. Density of Silanol Groups on the Surface of Silica Precipitated from a Hydrothermal Solution. **Russian Journal of Physical Chemistry**, v. 80, p. 1119–1128, 2006.

A decorative border resembling a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side. The scroll is outlined in black, and the corners are filled with a light gray color.

Capítulo 3

Experimental

3 Materiais e métodos

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho, os métodos de preparação das sílicas organofuncionalizadas e das enzimas imobilizadas, bem como as técnicas de caracterização empregadas aos materiais obtidos estão descritas nas próximas seções.

3.1 Reagentes e solventes

Sílica gel comercial Kiesegel 60 da Across foi utilizada como material de partida para a preparação de suportes quimicamente modificados. Suas propriedades texturais foram medidas no analisador de área superficial e de porosidade Micrometrics ASAP 2020, com base no método de adsorção-dessorção de nitrogênio.

No processo de modificação química da sílica gel foram empregados o agente sililante 3-cloropropiltrimetoxisilano 97% (Aldrich), a diamina alifática 1,6-diaminohexano (Aldrich), 3-aminopropiltrimetoxisilano 97% (Aldrich), além de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (cloreto cianúrico) da (Sigma-Aldrich), que foi empregado como agente de acoplamento para a enzima. Foram utilizados como solvente, tolueno, xileno, acetona, 1,4 dioxano, todos P.A. adquiridos da Vetec.

A enzima utilizada na imobilização foi a lipase PS de *Burkholderia cepacia*, obtida da Aldrich (≥ 30.000 U/g, pH 7.0, 50 °C, pH ótimo e temperatura ótima, respectivamente). Os tampões utilizados na preparação das soluções enzimáticas foram o hidrogenofosfato de potássio e o diidrogenofosfato de sódio, ambos da Vetec. Para a determinação da concentração das enzimas foram usados Biuret protein assay reagent da Amresco, Folin – Ciocalteu' Phenol Reagent (Aldrich), Albumina de Soro Bovino (BSA) da Sigma que foi usada como padrão para determinação de proteínas, além de água deionizada como solvente para diluição das enzimas.

Na etapa de atividade hidrolítica foram utilizados o éster p-nitrofenilpalmitato (**p-NPP**), goma arábica e dioxalato de sódio, todos da Aldrich, além de soluções tampão e isopropanol (Vetec). O p-nitrofenol (p-NP) da Vetec foi utilizado como padrão na construção da curva de calibração para a determinação da atividade enzimática.

3.2 Preparação das sílicas organofuncionalizadas

As sílicas quimicamente modificadas foram preparadas pelo método de enxerto utilizando uma rota heterogênea de síntese. Para tanto, foi necessário aplicar uma etapa de tratamento e ativação da sílica gel comercial antes das reações de modificação, no intuito de eliminar possíveis impurezas orgânicas e inorgânicas, bem como remover moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície da sílica.

A etapa de tratamento consistiu em lavar uma massa de 60,0 g da sílica comercial com uma solução de ácido clorídrico $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$, sendo esta suspensão agitada por 6 h. Após esse período, a mistura permaneceu em repouso por 12 h e depois o sólido obtido foi lavado várias vezes com água deionizada até o pH da solução ficar neutro. Depois de tratada, a sílica gel comercial foi submetida em uma etapa de ativação dos grupos silanóis superficiais através de aquecimento em $120 \text{ }^\circ\text{C}$ sob vácuo por 12 h.

3.2.1 Determinação do índice de funcionalização da sílica gel

O índice de funcionalização da superfície da sílica gel pode ser estimado com base na quantidade de grupos silanóis disponíveis na superfície, considerando o valor teórico $5,0 \text{ OH/nm}^2$ como uma constante físico-química, conforme o modelo de Zhuravlev (ZHURAVLEV, 2000). Então, a relação entre a constante de Zhuravlev e a concentração teórica de silanóis (α_{SiOH} , $\mu\text{mol/m}^2$) pode ser calculada da seguinte forma:

$$5 \text{ OH} \leftrightarrow 1 \text{ nm}^2 \leftrightarrow 10^{-18} \text{ m}^2$$

$$1 \text{ m}^2 \leftrightarrow 5 \times 10^{18} \text{ grupos OH}$$

Sendo,

$$6,02 \times 10^{23} \text{ grupos OH} \leftrightarrow 1 \text{ mol grupos OH}$$

$$5 \times 10^{18} \text{ grupos OH} \rightarrow \alpha \text{ mol}$$

Portanto, α_{SiOH} , ($\mu\text{mol/m}^2$) = **8,3 $\mu\text{mol/m}^2$** de grupos OH

Desse modo, a concentração total teórica de silanóis (α_{SiOH} , $\mu\text{mol/m}^2$) disponível na superfície da sílica é dada em torno de **8,3 $\mu\text{mol/m}^2$** . Esse valor pode ser usado para estimar a concentração de silanóis da sílica gel comercial disponível para reagir após a etapa de ativação, como mostra a Eq. 5.

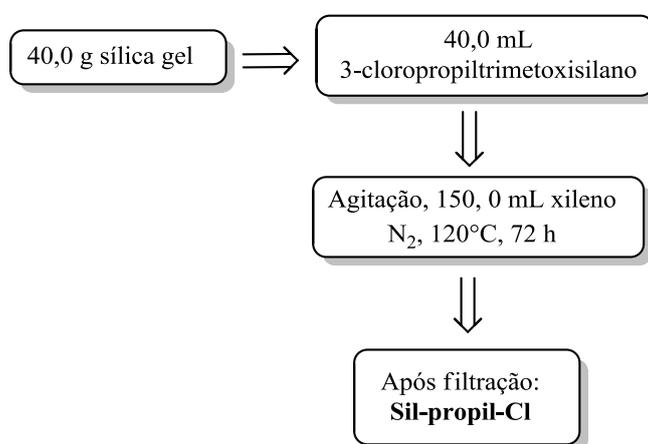
$$\text{Conc}_{\text{OH}^-} (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ sílica gel}) = \alpha_{\text{SiOH}} (\mu\text{mol/m}^2) \times S_{\text{BET}} (\text{m}^2 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

Em que, $\text{Conc}_{\text{OH}^-}$ é a concentração de silanóis disponíveis para reagir na superfície da sílica comercial, S_{BET} é a área superficial específica da sílica gel obtida pelo método de B.E.T e α_{SiOH} representa a concentração teórica de grupos silanóis.

Assim, utilizando a Eq. 5, a concentração de grupos silanóis disponíveis na superfície da sílica gel para reagir com os agentes sililantes foi estimada em **2,7 mmol OH/g** de sílica.

3.2.2 Reação da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano

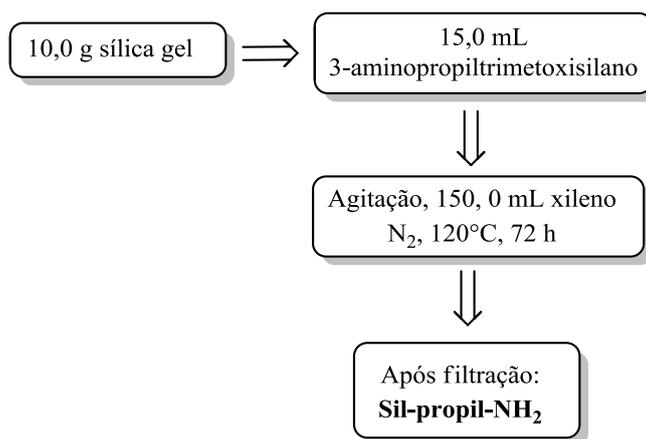
A primeira reação de modificação química da superfície da sílica gel consistiu em incorporar o agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano através de uma silanização. Para tanto, 40,0 g da sílica gel comercial foram suspensas em 150,0 cm³ de xileno, seguida da adição de 40,0 cm³ (219,0 mmol) com o auxílio de uma seringa. A mistura reacional foi mecanicamente agitada sob atmosfera de N₂ e aquecida em 120°C durante 72 h. Após esse período e depois do resfriamento em temperatura ambiente, o sólido foi filtrado a vácuo e lavado com o solvente da reação para retirar o excesso de silano que não reagiu seguido da lavagem com etanol e acetona, respectivamente. O material obtido foi chamado **Sil-propil-Cl** e armazenado em dessecador antes de ser utilizado em reações subsequentes. O Esquema 3 mostra um resumo da etapa de silanização com o 3-cloropropiltrimetoxissilano.



Esquema 3. Resumo esquemático da reação de silanização da sílica gel com agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano.

3.2.3 Reação da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxissilano

A reação da sílica gel com aminopropiltrimetoxissilano foi realizada com 10,0 gramas da matriz inorgânica que foi suspensa em 150,0 mL de tolueno, seguida da adição de 15,0 mL (86,0 mmol) do organossilano contendo o grupo funcional amino. O sistema reacional foi mantido sob agitação e refluxo do solvente em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 72 h. O sólido obtido (**Sil-propil-NH₂**) foi lavado com o solvente e etanol, nesta ordem. O Esquema 4 mostra um resumo da etapa de silanização com aminopropitrimetoxissilano.



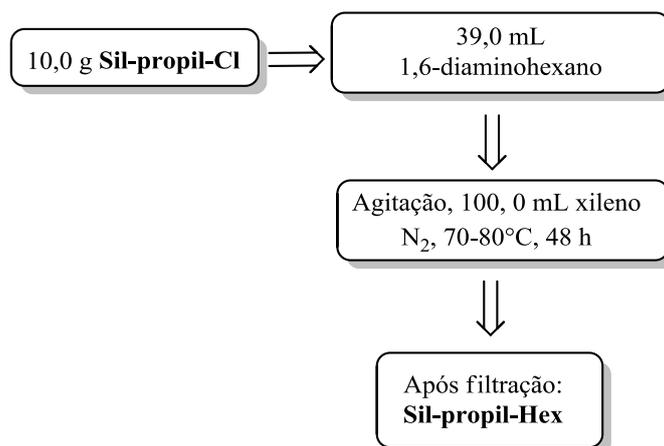
Esquema 4. Resumo esquemático da reação de silanização da sílica gel com agente sililante 3-aminopropiltrimetoxissilano.

3.2.4 Reação de funcionalização com 1,6 diaminohexano

Uma vez obtida a sílica gel silanizada com o agente modificador, a etapa subsequente de reação consistiu em funcionalizar o material **Sil-propil-Cl** com hexildiamina, que foi utilizada como espaçador reativo em reações de substituição nucleofílica com o grupo funcional ancorado na Sil-propil-Cl.

Nesta reação, 10,0 g da Sil-propil-Cl foram suspensas em 100,0 cm³ de xileno e a esta suspensão foi adicionado 39,0 mL (299,16 mmol) de 1,6 diaminohexano. O sistema reacional foi mecanicamente agitado em velocidade constante e mantido em refluxo sob atmosfera de nitrogênio por 48 h a 70-80 °C. Após esse período e depois do resfriamento, em temperatura ambiente, o material resultante foi filtrado a vácuo e lavado com o solvente da reação para remover o excesso das moléculas que não reagiram, sendo depois foi lavado com etanol e acetona. O sólido obtido foi denominado **Sil-propil-Hex**, sendo armazenado em dessecador antes de ser

utilizado. O Esquema 5 ilustra o resumo da reação de funcionalização com a 1,6-hexildiamina.



Esquema 5. Resumo esquemático da reação de funcionalização da Sil-propil-Cl com 1,6-diaminohexano.

3.2.5 Reação de funcionalização com cloreto cianúrico

O 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, também chamado cloreto cianúrico é um composto heterocíclico aromático pertencente à família das s-triazinas. Esse composto tem uma estrutura simétrica que é constituída por um anel de seis membros com três átomos de carbono e três átomos de nitrogênio intercalados, em que cada átomo de carbono está ligado a um átomo de cloro muito reativo, como pode ser visto na Fig. 22.

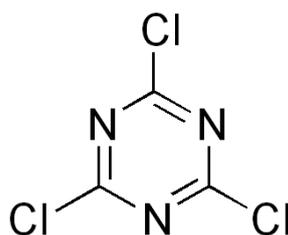
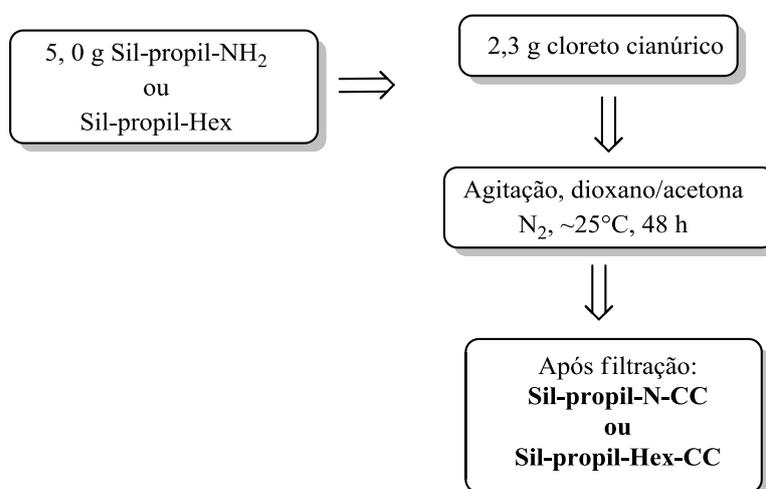


Figura 22. Estrutura molecular do cloreto cianúrico

Dado que os átomos de carbono do anel triazínico estão ligados covalentemente aos átomos de cloro e que esses halogênios possuem elevada eletronegatividade, há um deslocamento da densidade eletrônica do anel em sentido aos átomos de cloro. Conseqüentemente, isso implica uma deficiência eletrônica ao anel triazínico, de modo que os átomos de carbono adquirem carga parcial positiva, conferindo maior caráter eletrofílico ao anel. Tendo em vista sua elevada reatividade,

cloreto cianúrico foi utilizado como agente de acoplamento para ativar a superfície da sílica frente às moléculas de enzima.

Para funcionalizar os materiais Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Hex com o cloreto cianúrico foi empregado 5,0 g dos sólidos em suspensão com 2,3 g da molécula triazínica dissolvida em uma mistura de 1,4-dioxano/acetona 4:1. A suspensão foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e mecanicamente agitada por 12 h em temperatura ambiente (~25 °C). Após esse período, os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com o solvente de reação, em seguida foram submetidos à secagem em linha de vácuo por 12 h e depois armazenados em dessecador, antes de serem utilizados na imobilização da enzima. As superfícies obtidas foram chamadas Sil-propil-N-CC e Sil-propil-Hex-CC, para a reação do cloreto cianúrico com os materiais Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Hex, respectivamente. O Esquema 6 ilustra o resumo da reação de funcionalização com o cloreto cianúrico.



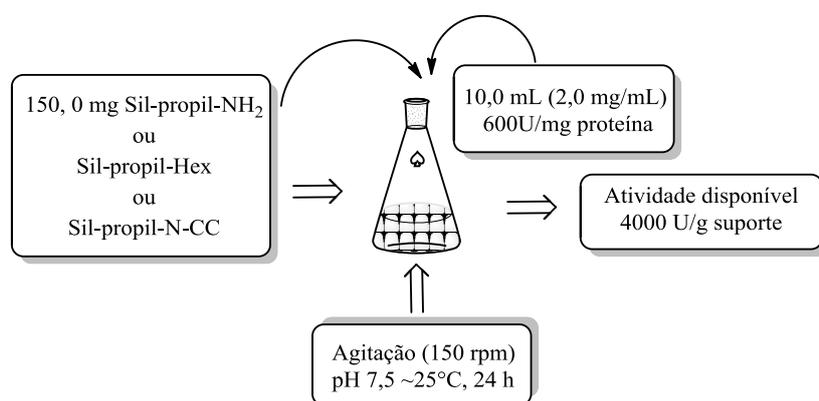
Esquema 6. Resumo esquemático da reação de funcionalização de ancoramento do cloreto cianúrico nos materiais Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-Hex.

3.2.6 Ensaio de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC lipase)

A enzima lipolítica de *Burkholderia cepacia* (BC lipase) foi utilizada para reagir pelo método da imobilização covalente com a superfície das sílicas quimicamente modificadas. Nesse processo, investigou-se a quantidade de proteína imobilizada por grama de suporte.

Inicialmente, preparou-se uma solução tampão fosfato de sódio e potássio (KH₂PO₄/Na₂HPO₄·2H₂O pH 7,5). As soluções enzimáticas (~2,0 mg mL⁻¹)

foram preparadas a partir da dissolução da lipase em tampão fosfato. Em seguida, para cada ensaio, uma alíquota de 10,0 mL da solução enzimática foi suspensa em frascos erlenmeyer contendo 150,0 mg das superfícies funcionalizadas Sil-propil-N-CC, Sil-propil-Hex ou Sil-propil-Hex-CC, sendo a mistura reacional mecanicamente agitada por 24 h em temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Após a reação, a mistura foi filtrada e os sólidos obtidos foram lavados com solução tampão de imobilização e armazenados em refrigerador a 4°C . As soluções sobrenadantes foram usadas para se determinar a concentração de proteínas remanescentes após a reação de imobilização e comparada com a solução estoque da enzima, através do método de Lowry (ZAIA, 2004). O Esquema 7 ilustra o resumo dos ensaios de imobilização da BC lipase nos materiais funcionalizados.



Esquema 7. Resumo esquemático da reação de imobilização da BC lipase nos materiais Sil-propil-N-CC, Sil-propil-Hex e Sil-propil-Hex-CC. A atividade da enzima (4000 U/g do suporte) disponível no meio de imobilização foi baseada na atividade da BC lipase (30.000 U/g de proteína) dada pelo fabricante (Aldrich).

3.3 Técnicas de caracterização física e química dos materiais

Amostras de sílica gel comercial pura e suas formas modificadas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de RMN de ^{29}Si e ^{13}C , análise termogravimétrica, análise elementar e análise de área superficial. As enzimas imobilizadas foram caracterizadas quanto à atividade catalítica na hidrólise de p-NPP por espectrofotometria no UV-VIS.

3.3.1 Análise de adsorção de nitrogênio

As medidas de área superficial, volume e tamanho médio dos poros das amostras de sílica pura e foram feitas no analisador de área superficial e de

porosidade Micrometrics ASAP 2020, e foram baseadas no método de adsorção-desorção de nitrogênio. As medidas de área superficial específica foram determinadas conforme o método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938); O modelo de Barrett, Joyner e Halenda (BJH) foi utilizado para calcular o volume e tamanho médio dos poros das amostras (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951). Os valores obtidos foram calculados com base na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diferentes pressões em temperatura constante.

3.3.2 Análise elementar de C, H e N

As análises das amostras de sílicas organicamente modificadas foram realizadas em analisador Fisons Instruments Elemental Analyzer, Model EA-1110 CHNS-O, em que foram investigadas quanto ao teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

3.3.3 Termogravimetria

Os termogramas obtidos foram para a sílica gel pura e suas formas organofuncionalizadas. As análises termogravimétricas foram realizadas no aparelho TA instruments, sob atmosfera de argônio, sendo a massa de amostra empregada aproximadamente 20 mg e a faixa de temperatura variou entre 25°C e 900°C.

3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos para a sílica gel pura e suas formas quimicamente modificadas Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-N-CC. As amostras foram preparadas em almofariz de ágata utilizando pastilhas de KBr numa proporção KBr:amostra aproximadamente 10:1. As análises foram realizadas no espectrofotômetro Shimadzu e os espectros foram analisados na região entre 4000-400 cm⁻¹.

3.3.5 Espectroscopia de RMN ²⁹Si e ¹³C

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ²⁹Si e ¹³C das sílicas organofuncionalizadas neste trabalho foram obtidos através do espectrômetro de RMN

Bruker 600 MHz, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação de ângulo mágico CP-MAS. As análises foram realizadas empregando uma frequência de 75,47 MHz para carbono e 59,63 MHz para silício.

3.3.6 Espectroscopia UV-Vis

A técnica espectrofotométrica na região UV-Vis foi utilizada para monitorar os ensaios catalíticos da BC lipase na forma livre e imobilizada e, desse modo, investigar suas propriedades bioquímicas e cinéticas. Além disso, foram utilizados métodos espectrofotométricos na região UV-Vis para determinar a concentração das enzimas livres e adsorvidas nos suportes, bem como avaliar a estabilidade das preparações enzimáticas.

Todos os experimentos foram realizados no espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. Foram obtidas curvas analíticas, em que foi utilizado a BSA como padrão para a determinação de proteínas em 660 nm (POMORY, 2008) e o p-nitrofenol como padrão para a determinação da atividade enzimática em 410 nm (GUPTA, N.; RATHI; GUPTA, R., 2002).

3.3.6.1 Determinação da concentração de proteína

A quantidade de proteína presente nas soluções sobrenadantes (após imobilização) e nas soluções com as enzimas lixiviadas (após lavagem do suporte) foi determinada espectrofotometricamente por absorção de acordo com o método de Lowry (LINDEBOOM; WANASUNDARA, 2007; POMORY, 2008). A absorbância das amostras contendo as enzimas foi medida em 660 nm contra um branco da solução tampão de imobilização (pH 7,5).

A quantidade de proteína ligada ao suporte foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína introduzida no meio de imobilização e a quantidade de proteína presente nas soluções filtradas e de lavagem do suporte. Assim, massa de proteína retida por grama de suporte foi calculada pela equação 6.

$$p = \frac{C_i V_i - (C_s V_s + C_l V_l)}{m_s} \quad (6)$$

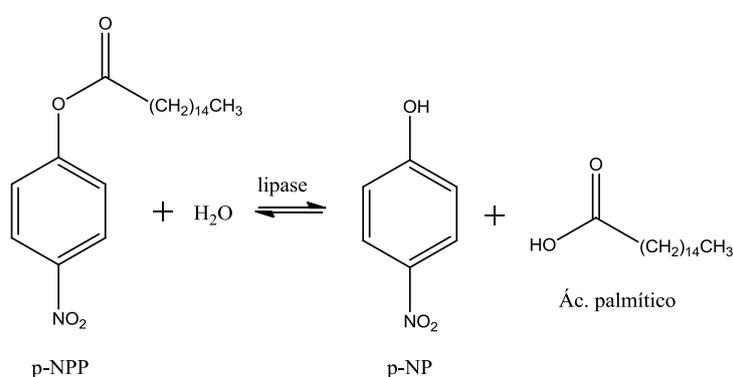
Nesta equação, **p** representa a quantidade de proteína ligada (mg/g suporte), **C_i** é a concentração inicial de proteína (mg/mL), **C_s** é a concentração de proteína (mg/mL) presente nas soluções filtradas, **C_l** (mg/mL) é a concentração de proteínas lixiviadas, **V_i**

(mL) é o volume de proteína introduzido no meio, V_s (mL) é o volume da solução sobrenadante e V_l é o volume (mL) da solução de lavagem do suporte. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e o cálculo representa uma média dos dados experimentais.

3.3.6.2 Determinação da atividade Enzimática

A atividade enzimática das amostras de lipase livre e imobilizada foi determinada espectrofotometricamente utilizando o método reportado por Winkler e Stuckmann (1979). O procedimento consistiu em provocar a hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP, massa molecular = 377,5 g/mol) na presença da enzima da livre (2,00 mg mL⁻¹) ou imobilizada.

Inicialmente, preparou-se uma emulsão contendo 207,0 mg de dioxalato de sódio e 100,0 mg de goma arábica que foram dissolvidos em 90,0 mL de tampão fosfato pH 8,0. Em 9,0 mL desta mistura, adicionou-se lentamente, gota a gota, 1,0 mL do substrato p-NPP dissolvido em isopropanol (3,0 mg/mL). Então, 0,3 mL da lipase livre ou 30 mg da lipase imobilizada foi adicionada em 2,7 da mistura contendo o substrato. Os sistemas reacionais foram incubados em tubos de ensaio que permaneceram em um banho pré-aquecido em 37°C durante 15 minutos. A reação libera o composto amarelo p-nitrofenol (**p-NP**) que apresenta absorvância em 410 nm (GUPTA, N.; RATHI; GUPTA, R., 2002). A hidrólise do p-NPP catalisada pela lipase está representada no esquema 8.



Esquema 8. Reação de hidrólise do p-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.

As amostras foram medidas contra um branco contendo o substrato nas mesmas condições reacionais sem a enzima. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a equação 7, sendo utilizado o coeficiente de extinção molar (ϵ

= $13,5 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) obtido na curva de calibração do p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (**U**) foi definida como a quantidade de enzima que libera $1.0 \text{ } \mu\text{mol}$ min^{-1} de pNP, nas condições do ensaio. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e o cálculo representa uma média dos dados experimentais.

$$U_{(\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot(\text{mL ou g}))} = A \frac{FD}{\varepsilon \cdot L \cdot t} \quad (7)$$

Em que,

A = absorvância obtida em 410 nm.

ε = coeficiente de absorvidade molar do p-NP

L = volume de lipase livre ou massa da lipase imobilizada

t = tempo de reação (em min.)

A retenção da atividade enzimática em termos percentuais foi calculada de acordo com a equação 8.

$$\%U_r = (U_{\text{exp}} \times 100)/U_i \quad (8)$$

Em que, U_r é a atividade recuperada, U_{exp} é atividade observada nos derivados imobilizados e U_i é atividade disponível para imobilização.

3.3.6.3 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional foi avaliada em termos de recuperação da atividade de hidrólise frente ao substrato **p-NPP**, após experimentos de bateladas consecutivos. Nesse estudo foram utilizados todos os derivados enzimáticos obtidos na etapa de imobilização da enzima. Os biocatalisadores imobilizados foram submetidos a cinco ciclos consecutivos reacionais nas mesmas condições reportadas para o ensaio de atividade hidrolítica do substrato. Após cada ciclo de reação, as amostras foram lavadas com isopropanol e seguidas para lavagem com tampão fosfato de imobilização antes de serem analisadas espectrofotometricamente.

3.3.6.4 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de estocagem foi estudada para avaliar o tempo de vida útil dos biocatalisadores imobilizados através da determinação da atividade enzimática residual nas condições reacionais estabelecidas no item 4.3.6.2. Os derivados imobilizados foram armazenados por 30 dias em freezer a 4°C sem uso de solvente. Após esse período de armazenamento, as enzimas imobilizadas foram submetidas em reações de hidrólise do p-NPP por cinco bateladas consecutivas. A cada intervalo de reação, os derivados enzimáticos foram lavados com 5,0 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5) por três vezes e novamente submetidos à verificação da atividade de hidrólise do p-NPP.

Referências

BABONNEAU, F. Solid-state nuclear magnetic resonance: A valuable tool to explore organic-inorganic interfaces in silica-based hybrid materials. **C. R. Chimie**, v. 13, p. 58–68, 2010.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALEND, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms **J. Am. Chem. Soc.**, v.73, n.1, p. 373–380, 1951.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers **J. Am. Chem. Soc.**, v. 60, p. 309, 1938.

ERP, T. S.; MARTENS, J. A. A standardization for BET fitting of adsorption isotherms. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.145, p. 188–193, 2011.

FADEEVA, V. P.; TIKHOVA, V. D.; NIKULICHEVA, O. N. Elemental Analysis of Organic Compounds with the Use of Automated CHNS Analyzers. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 11, p. 1094–1106, 2008.

GABBOTT, P. Principles and Applications of Thermal Analysis. Blackwell Publishing Ltd. 2008.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98–99, 2002.

LINDEBOOM, N.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Interference of phenolic compounds in Brassica napus, Brassica rapa, and Sinapis alba seed extracts with the Lowry protein assay, **Food Chem.** v. 104, p. 30–38, 2007.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**, Fourth Edition. 2009

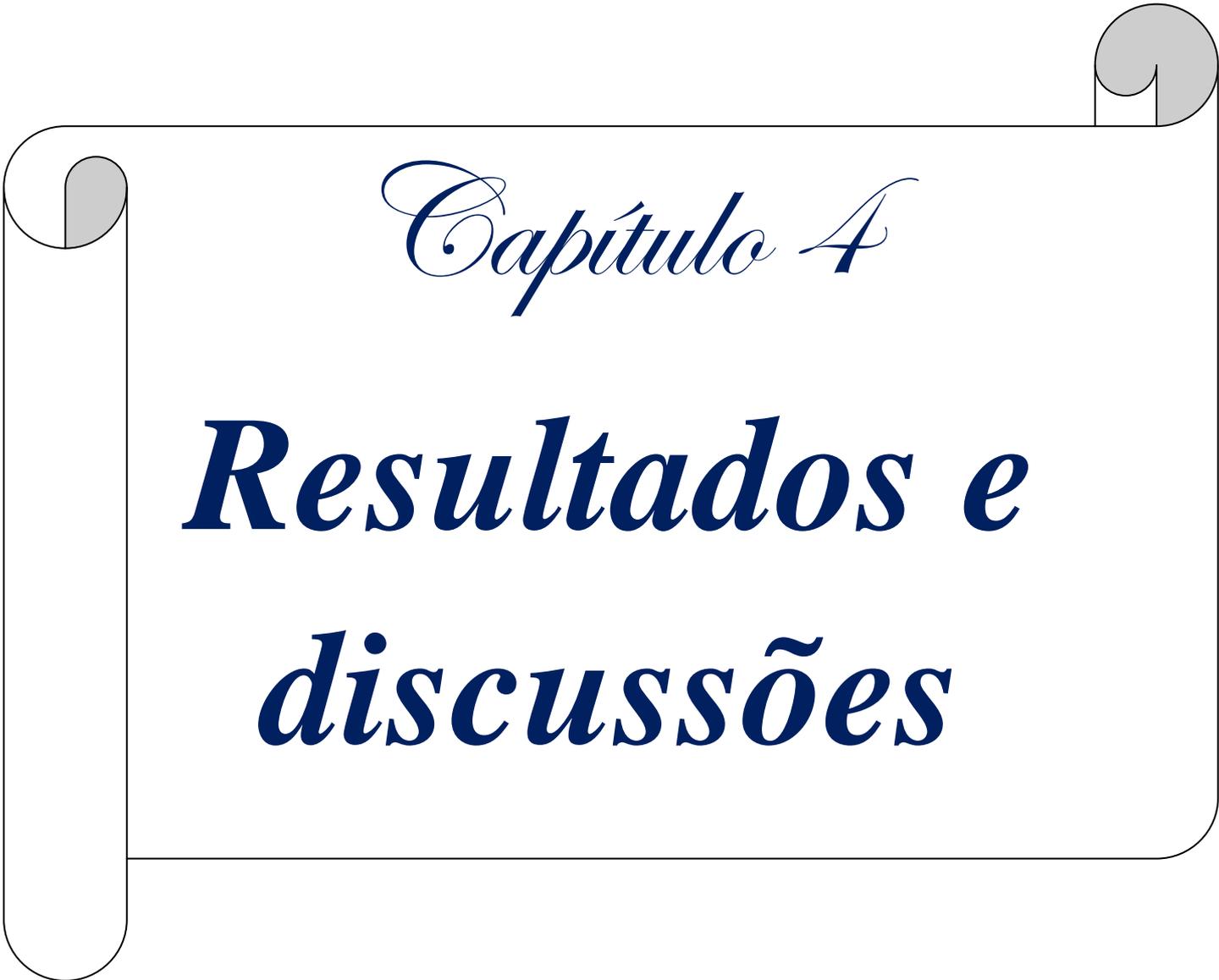
POMORY, C. M. Color development time of the Lowry protein assay. **Anal. Biochem**, v. 378, p. 216–217, 2008.

VEEMAN, W. S. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. **Geoderma**, v.80, p. 225-242, 1997.

WALKER, J. M. **The Protein Protocols Handbook**. 2 edição, humana press, p. 4, 2002.

WINKLER, K. U.; STUCKMANN, M. **Journal of Bacteriology**, v.138, p. 663-670, 1979.

ZAIA et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

A decorative border resembling a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side. The scroll is outlined in black and has a light gray shadow effect on its top and left edges.

Capítulo 4

***Resultados e
discussões***

4 Resultados e Discussões

Os resultados serão apresentados e discutidos conforme a sequência apresentada na parte experimental.

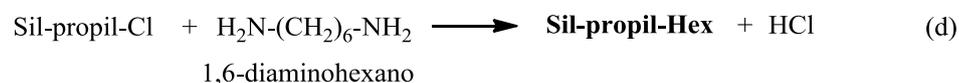
4.1 Caracterização das superfícies organofuncionalizadas

Os materiais obtidos durante o processo de modificação química da superfície da sílica foram analisados quanto à caracterização por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, análise termogravimétrica, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de RMN dos núcleos de ^{13}C e ^{29}Si .

4.1.1 Medidas de adsorção de nitrogênio e análise elementar

As propriedades texturais Sílica gel comercial foram medidas no analisador de área superficial e de porosidade Micrometrics ASAP 2020, com base no método de adsorção-dessorção de nitrogênio. Este material apresentou volume de poro **0,707 cm³/g** com área superficial específica **S_{BET} 323 m²/g** e diâmetro médio de poro **87,58 Å**.

As reações de organofuncionalização da sílica gel foram realizadas no sentido de obter superfícies ativas para a imobilização de enzimas. O esquema 9 mostra uma sequência de reações que representam a preparação dos materiais **Sil-propil-NH₂**, **Sil-propil-N-CC**, **Sil-propil-Cl**, **Sil-propil-Hex** e **Sil-propil-Hex-CC**, os quais foram analisados quanto ao percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente em suas composições.



Esquema 9. Sequência de reações de modificação química da sílica gel. As superfícies obtidas foram chamadas (a) **Sil-propil-NH₂**, **Sil-propil-N-CC**, **Sil-propil-Cl**, **Sil-propil-Hex** e **Sil-propil-Hex-CC**. O valor de **n** representa o número de grupos alcoxi que reagiram com os grupos silanóis levando a formação de moléculas de água.

Os dados obtidos da análise elementar de C, N e H estão apresentados na **tabela 1** e foram utilizadas para confirmar a modificação química da superfície da sílica gel e estimar a quantidade de grupos orgânicos incorporados nos materiais funcionalizados.

Tabela 1. Dados de análise elementar de carbono e nitrogênio dos materiais organofuncionalizados.

Superfície	%C	%H	%N	C (mmolg ⁻¹)	N (mmolg ⁻¹)	C/N (calc.)	C/N (Exp.)
Sil-cloropropil	4,81	0,11	-	4,01	-	-	-
Sil-propil-Hex	8,10	1,84	2,13	6,75	1,52	5,0	4,44
Sil-propil-Hex-CC	8,41	1,59	3,60	7,01	2,57	2,6	2,73
Sil-propil-NH₂	5,21	1,61	1,82	4,34	1,30	4,0	3,34
Sil-propil-N-CC	5,72	1,52	3,08	4,76	2,20	1,8	2,20

Como mostra a Tabela 1, a reação de modificação com o agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano resultou em **4,81%** de carbono incorporado na superfície da sílica gel. Considerando que a molécula de agente sililante é um reagente trifuncional (três grupos reativos no alcoxissilano), e a reação ocorreu em meio anidro, além disso, por razões estéricas, a reação de condensação com os grupos silanóis se dá predominantemente de forma mono e bifuncional, então a quantidade de grupos cloropropil imobilizados foi estimada utilizando a seguinte equação:

$$n_f = \frac{P_c}{MC \cdot 100 \cdot n_c} \quad (9)$$

Onde, **P_c** é porcentagem de carbono obtida na análise elementar, **MC** é a massa atômica do carbono e **n_c** representa ao número de átomos de carbono presentes no ligante

ancorado na superfície. Assim, a quantidade de grupos cloropropil ancorados foi estimada em **1,00 mmol** por grama de sílica. Nesse caso, foi assumido que existe uma única estrutura orgânica na superfície da sílica e ao menos um grupo metoxi não reagiu com os grupos silanóis. Não obstante, cabe ressaltar que a estimativa dos grupos cloropropil ancorados foi baseada apenas na porcentagem de carbono. Com efeito, torna-se inerente a possibilidade de erro no cálculo mais preciso da quantidade de silano enxertada. Por outro lado, os resultados obtidos na funcionalização com o cloropropiltrimetoxisilano neste trabalho estão compatíveis com valores reportados na literatura (QIU et al. 2007).

Usando a porcentagem de carbono obtida com o material Sil-propil-Cl e a área superficial específica da sílica gel ($323 \text{ m}^2/\text{g}$) obtida pelo método B.E.T., foi possível estimar o índice de funcionalização (densidade de cobertura) após a reação com o agente sililante, usando a Eq. 9 de Berendsen-De Galan (BUSZEWSKI et al. 2012).

$$\chi \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{m}^2} \right) = \frac{P_c}{12 \cdot 100n_c - P_c(M - n_r)S_{BET}} \quad (10)$$

Na Eq. 9, χ representa o índice de funcionalização em $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, P_c é a porcentagem de carbono na sílica silanizada, n_c é o número de átomos de carbono do grupo cloropropil ancorado, 12 é a massa atômica do átomo de carbono, M é massa molecular do agente sililante imobilizado, S_{BET} é área superficial específica da sílica gel não modificada, que foi calculada a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio, e n_r é o número de grupos reativos da molécula de alcoxissilano, que no caso da cloropropiltrimetoxisilano n_r é 3.

O valor obtido para o índice de funcionalização na superfície da Sil-propil-Cl correspondeu a **3,9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$** , sendo que isso representa uma densidade de cobertura correspondente a 47% do valor teórico ($8,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Como é conhecido da literatura (BUSZEWSKI et al. 2012), é praticamente impossível alcançar uma densidade de enxerto estimado pelo valor teórico, devido, principalmente, às razões estéricas que impedem a funcionalização completa de todos os grupos silanóis superficiais. A Tab. 2 mostra os resultados obtidos com a reação de enxerto comparados aos da literatura (AULER et al. 2005; BUSZEWSKI et al. 2012; HICKS et al. 2006; LAZGHAB; SALEH; GUIGON, 2010; QIU et al. 2007).

Tabela 2. Índice de funcionalização de sílicas modificadas com silanos.

Sílicas silanizadas	* χ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)	Grau de cobertura
Sil-propil-Cl	3,9	47%
Sil-propil-NH ₂	4,0	48,5%
QIU et al. (2007)	3,05	36,7%
AULER et al. (2005)	5,6	67%
HICKS et al. (2006)	1,7-5,0	20-60%

* Valor teórico estimado ($4,9-5 \text{ OH}/\text{nm}^2 \rightarrow 8,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$). Fonte: ZHURAVLEV, 2000.

A reação de funcionalização do sólido Sil-propil-Cl com 1,6 diamino-hexano foi confirmada pela porcentagem de nitrogênio obtida que mostrou 2,13% de ancoramento de nitrogênio. Na reação subsequente com a molécula do cloreto cianúrico, observou-se um aumento do teor de carbono e nitrogênio nesse material, sendo que a diferença no teor de nitrogênio permitiu determinar a quantidade de cloreto cianúrico incorporado no novo material Sil-propil-hex-CC, cujo valor foi estimado para 0,35 mmol/g. Esses resultados sugerem que as reações com a molécula de cloreto cianúrico foi bem sucedida, mas indicam que nem todos os grupos amino ancorados na superfície modificada com a diamina reagiram com a molécula triazínica, o que é razoavelmente previsível devido às dificuldades causadas por impedimentos estéricos.

Os materiais obtidos das reações de modificação química de superfície da sílica com o organosilano aminopropil, seguido pelo ataque do cloreto cianúrico também foram analisados quanto ao teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes em suas composições (Tab. 2).

Na primeira etapa de reação, a funcionalização da matriz inorgânica ocorreu pelo ancoramento covalente do organosilano na superfície da sílica e mostrou que **1,3 mmol** por grama de nitrogênio foram incorporados, sugerindo assim, a efetividade da reação e, por conseguinte, a introdução de grupos aminopropil na matriz inorgânica. Numa etapa subsequente, o material obtido chamado Sil-propil-NH₂ contendo os grupos amino permitiram o ataque nucleofílico através da reação com os átomos de cloro do composto triazínico, resultando no material Sil-propil-N-CC. Assim, a efetividade desta reação foi evidenciada pelo aumento do teor de nitrogênio em comparação ao material Sil-propil-NH₂.

A partir dos dados da análise de carbono e nitrogênio foi possível estimar a razão molar experimental C/N que expressa, de forma aproximada, a razão entre o número de átomos de carbono por átomos de nitrogênio de cadeias orgânicas pendentes na matriz inorgânica. Os valores obtidos para todos os materiais modificados

mostraram boa concordância quando se leva em conta que alguns grupos metoxilas dos agentes sililantes utilizados na primeira etapa de modificação da sílica não reagiram com os silanóis, resultando em fases orgânicas quimicamente ligadas com distribuição heterogênea de cadeias imobilizadas.

4.1.2 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas (TG) podem fornecer algumas informações importantes a cerca da modificação química da superfície da matriz inorgânica, bem como da estabilidade térmica dos materiais modificados. Os resultados da análise térmica obtidos para a sílica gel pura e as formas modificadas Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-N-CC estão representados pela Fig 23.

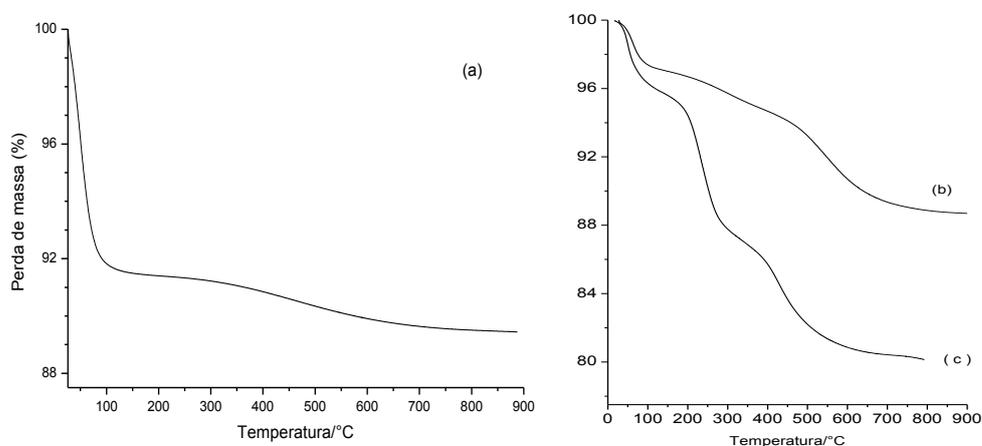


Figura 23. Curvas termogravimétricas dos materiais (a) Sílica gel, (b) Sil-propil-NH₂ e (c) Sil-propil-N-CC.

A curva obtida para a sílica gel pura mostra apenas uma etapa de perda de massa, até aproximadamente 150 °C, que se refere à eliminação de moléculas de água adsorvidas na superfície do material (ARAKAKI et al. 2004; QIU et al. 2007). Essa perda correspondeu à aproximadamente 10% de moléculas de água removidas. Para os materiais Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-N-CC, foi possível observar uma menor perda de água em comparação à matriz inorgânica, sugerindo alguma hidrofobicidade presente nestes materiais. Para a Sil-propil-NH₂, se pode observar outra etapa de perda de massa (acima de ~ 300°C), que deve estar associada à decomposição progressiva da molécula do silano ancorada. Finalmente, a curva da Sil-propil-N-CC mostrou perda

progressiva de massa numa faixa de temperatura maior, que deve ser devido à presença de maior cadeia carbônica pendente em sua superfície.

Assim, para temperaturas acima de 300 °C, as perdas de massa no material Sil-propil-N-CC podem ser atribuídas à decomposição simultânea da molécula do silano e do cloreto cianúrico ancorados na superfície do suporte. Estes resultados reforçam a efetividade das reações de modificação química da matriz inorgânica.

Análises termogravimétricas também foram realizadas para os materiais **Sil-propil-Cl (a)**, **Sil-propil-Hex (b)**, e **Sil-propil-Hex-CC (c)**. As curvas são mostradas na Fig. 24.

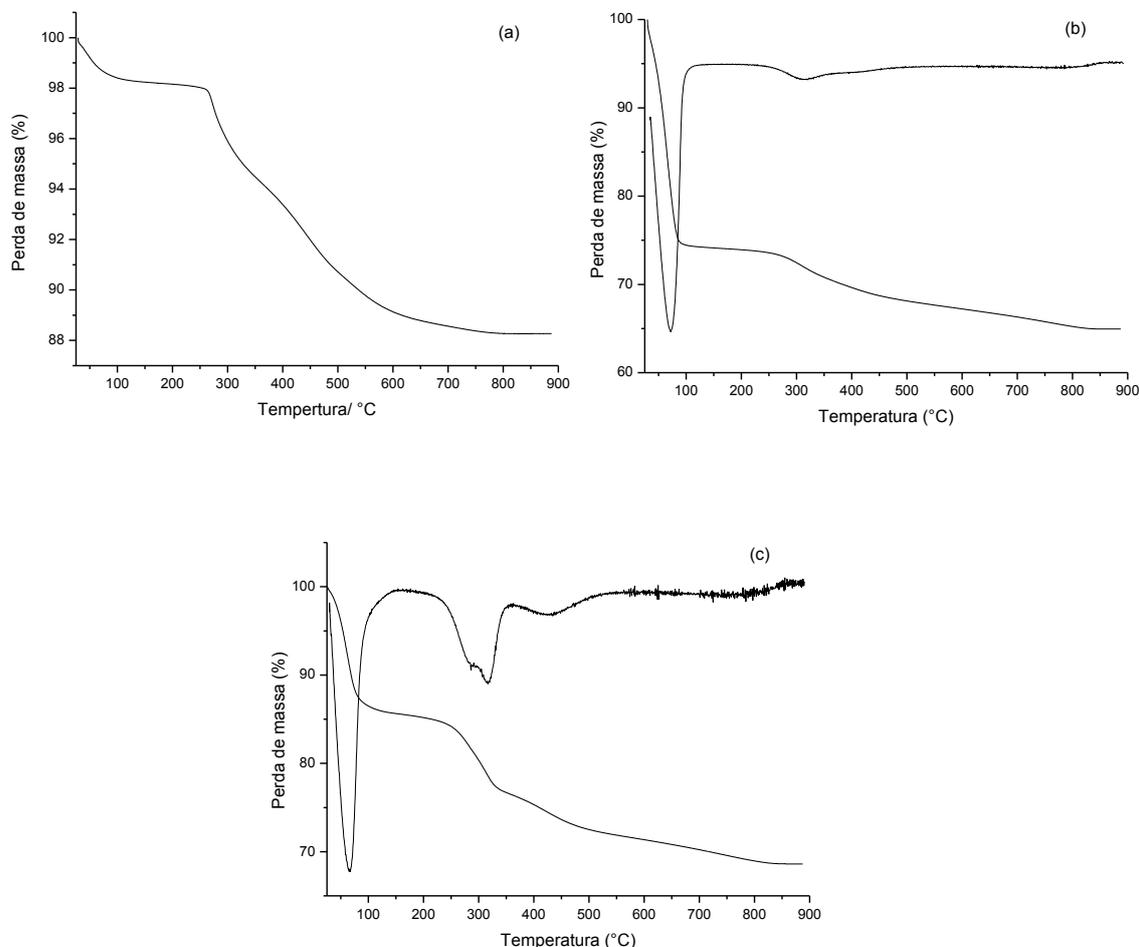


Figura 24. Curvas TG e DTG dos materiais obtidos na reação de organofuncionalização. Sendo, Sil-propil-Cl (a), Sil-propil-hex (b) e Sil-propil-hex-CC (c).

As porcentagens de massa perdida foram determinadas de acordo com a equação 11.

$$\%w = \frac{W_{T_i} - W_{T_f}}{W_{T_i}} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde, T_i é a temperatura inicial de perda, T_f é a temperatura final de perda e $\%w$ é a porcentagem de perda de massa no intervalo T_i - T_f .

Para o material obtido da reação com o agente sililante cloropropiltrimetoxisilano observou-se uma primeira perda de massa que corresponde à aproximadamente 2%, e que pode ser associada à remoção de moléculas de água fisicamente adsorvidas neste material, sendo uma perda mássica de água bem menor do que a sílica gel pura. É conhecido que para as sílicas não modificadas a perda de massa deve ser atribuída exclusivamente à remoção de moléculas de água adsorvidas, bem como à condensação de grupos silanóis acima de 250°C (QIU et al. 2007). Alguns autores estimam a perda de massa em materiais organofuncionalizados no intervalo de temperatura de 200-600°C (AULER et al. 2005; QIU et al. 2007). Porém, foi possível observar que os materiais obtidos nesse estudo apresentaram resíduos de perda de grupos orgânicos ligados à superfície entre 600°C e 800°C. Desse modo, a termod decomposição dos sólidos funcionalizados foi avaliada na faixa de 200°C a 800°C.

Na sílica funcionalizada com grupos cloropropil, a termod decomposição foi observada acima de aproximadamente 250-270°C até próximo a 800°C. Embora neste intervalo estejam incluídas perdas referentes à condensação de grupos silanóis, as maiores perdas devem ser atribuídas a termod decomposição da cadeia do agente sililante imobilizado na superfície da sílica, pois a perda de água de condensação foi estimada para a sílica não modificada em aproximadamente 1,8%, sendo este valor descontado da perda total para a Sil-propil-Cl (9,7%). O início de uma nova etapa de perda de massa, no intervalo de temperatura acima, indica a formação de fases orgânicas quimicamente ligadas e revela a estabilidade térmica da cadeia propila nesta faixa de temperatura.

A partir do material Sil-propil-Cl foram realizadas reações com a diamina 1,6 diaminohexano. As curvas TG e DTG obtidas da análise termogravimétrica resultantes da funcionalização mostraram um aumento progressivo de perda de massa, cujos maiores percentuais podem ser relacionados à decomposição simultânea da cadeia propila do silano e da diamina imobilizada. A porcentagem de perda obtida foi 10,6 %.

Já a curva obtida do material modificado com o cloreto cianúrico mostrou etapas adicionais de perda de massa, cujas porcentagens de perda foi 17,0%. Esse resultado sugere a incorporação da molécula triazínica na superfície Sil-propil-Hex.

4.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos para os materiais Sílica gel ativada, Sil-propil-NH₂ e Sil-propil-N-CC e estão representados pela Fig. 25. O espectro da sílica gel apresenta as bandas típicas do polímero inorgânico sílica gel. Na região de 3500 cm⁻¹ se observa uma banda larga atribuída à frequência de estiramento O-H e em 1650 cm⁻¹ observa-se um pico de deformação (δ O-H), sendo ambos relacionados às moléculas de água fisicamente adsorvidas. O espectro também mostra, na região de baixa energia, uma banda larga entre 1100-1000 cm⁻¹ atribuída às vibrações de estiramento Si-O e Si-O-Si, características do esqueleto inorgânico da sílica (KHDARY; GHANEM 2012)

Para o material Sil-propil-NH₂ são observadas as mesmas bandas características da Sílica gel, indicando a manutenção da integridade estrutural da matriz inorgânica. Contudo, também se observa a diminuição da intensidade da absorção em torno de 3500 cm⁻¹ (ν O-H), e ainda a presença de um ombro fraco na região de 2830 cm⁻¹ que pode ser atribuído ao estiramento C-H (ZHANG et al. 2009). Essas evidências sugerem a funcionalização da sílica gel com o agente sililante 3-aminopropiltrimetoxissilano. Com relação ao material Sil-propil-N-CC, foram observados os mesmos picos e bandas de absorção da Sil-propil-NH₂, além de disso, novas bandas surgiram entre 1750 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹, que podem ser atribuídas às vibrações de estiramento do anel triazínico do cloreto cianúrico (KUZNIARSKA-BIERNACKA et al. 2005) A presença destas bandas de absorção sugere que houve modificação química em Sil-propil-NH₂ pelo ancoramento do composto triazínico em sua superfície, resultando no material Sil-propil-N-CC

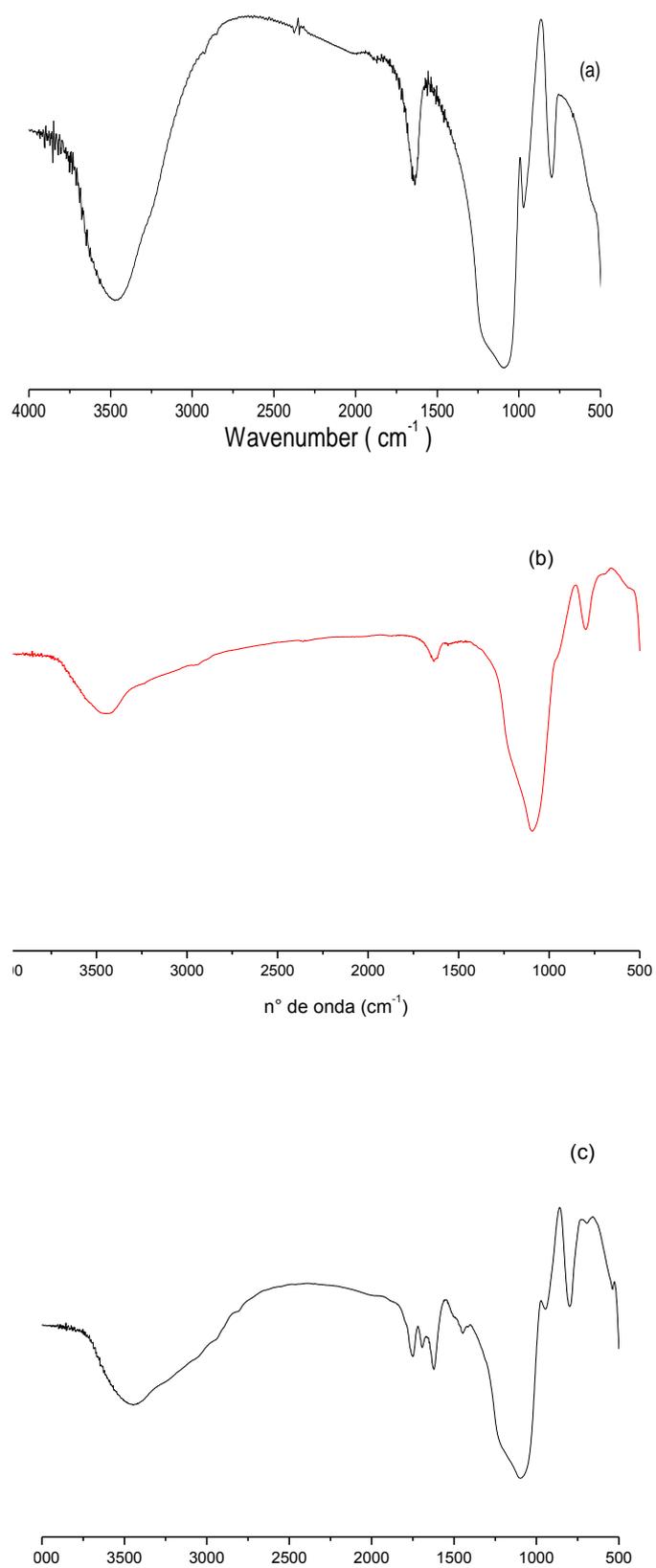


Figura 25. Espectros na região do infravermelho dos materiais (a) sílica gel (b) Sil-propil-NH₂ e (c) Sil-NH-CC.

4.1.4 Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si

A modificação química da superfície da sílica gel pode ser rigorosamente comprovada por análise de Ressonância Magnética Nuclear, que fornece informações estruturais dos grupos funcionais pendentes na matriz inorgânica, bem como a natureza da interação com a superfície.

A técnica de RMN CP/MAS de ^{29}Si e ^{13}C foi utilizada para identificar a presença de espécies quimicamente ligadas na superfície da sílica gel através das reações com o organosilano cloropropil, bem como para as reações subsequentes com as diaminas alifáticas e para o ataque covalente do cloreto cianúrico.

As espécies presentes na superfície da sílica podem ser detectadas usando a terminologia Q^n e T^n , onde Q^n fornece informações sobre a natureza dos grupos silanóis presentes na superfície da sílica e T^n indica o número espécies que formam ligações com a sílica por reações entre organosilanos e silanóis ou entre organosilanos. O termo n nas espécies Q indica o número de grupos siloxanos ligados ao átomo de Si da sílica, enquanto nas espécies T indica o número de ligações siloxanos formadas após a reação com alcoxissilanos (AULER et al. 2005; KOVALCHUK et al. 2006).

A Figura 26 e 27 mostram os tipos de espécies Q e T que podem ser detectados na superfície da sílica gel pura (espécie Q) e modificada com organosilanos (Q e T) por RMN ^{29}Si (AULER et al. 2005; KOVALCHUK et al. 2006):

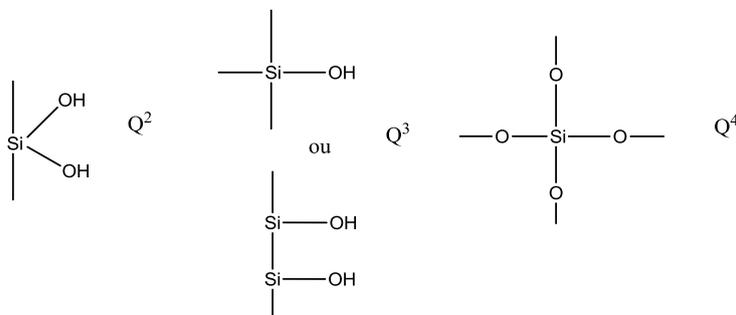


Figura 26. Grupos silanóis e siloxanos presentes na estrutura da sílica.

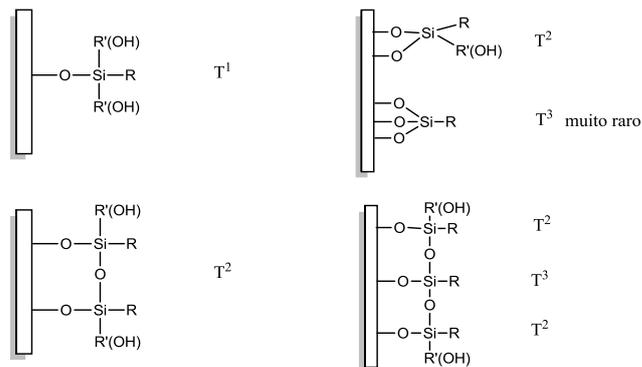


Figura 27. Espécies tipo Tⁿ que podem estar presentes na superfície de sílica gel silanizada.

O espectro de RMN de ²⁹Si foi obtido para a sílica gel modificada com o agente sililante cloropropiltrimetoxissilano em meio anidro (Fig. 28).

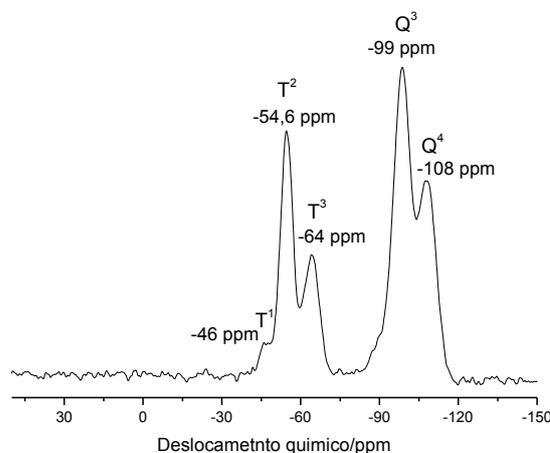


Figura 28. Espectro de RMN CP/MAS ²⁹Si para a sílica silanizada com cloropropiltrimetoxissilano (Sil-propil-Cl).

O deslocamento químico de sítios silanóis geram picos nos espectro de RMN de ²⁹Si em torno de -90 ppm, -100 ppm e 110 ppm que são associados aos sítios Q² (geminal), Q³ (isolado) e Q⁴ (siloxano), respectivamente (KOVALCHUK et al. 2006). No espectro da Sil-propil-Cl foram observados os picos em -99 ppm e -108 ppm que podem ser atribuídos à presença dos grupos silanóis (Q³) e (Q⁴) na superfície do sólido. A ausência de espécies Q² no espectro de RMN ²⁹Si da sílica silanizada pode ser um forte indício de que a reação de modificação com o silano ocorreu majoritariamente de forma bidentada (ou bifuncional). A evidência experimental mais contundente para essa afirmação pode ser obtida considerando a presença de espécies T no espectro.

O ambiente químico de espécies **T** correspondente à interação com alcoxisilanos geram sinais em torno de -46 (-43) ppm (T^1), -55 (-53) ppm (T^2), -62 (-66) ppm (T^3), como mostram (KOVALCHUK et al. 2006). O espectro da Sil-propil-Cl mostrou os picos -46 ppm, -54,6 ppm e -64 ppm e estes podem ser atribuídos às espécies T^1 , T^2 e T^3 , respectivamente. Assim, a presença dos diferentes tipos de espécies **T** no espectro de RMN ^{29}Si indica diferentes formas de ligação entre o organosilano e a superfície da sílica gel, ou ainda a possibilidade de ligações cruzadas entre silanos devido a presença de espécies T^3 . Contudo, a maior intensidade observada no espectro para a espécie T^2 confirma que a interação da superfície da sílica com o cloropropiltrimetoxissilano ocorreu majoritariamente de forma bifuncional.

4.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A Figura 29 mostra o espectro de RMN de ^{13}C para a sílica modificada com o cloropropiltrimetoxissilano.

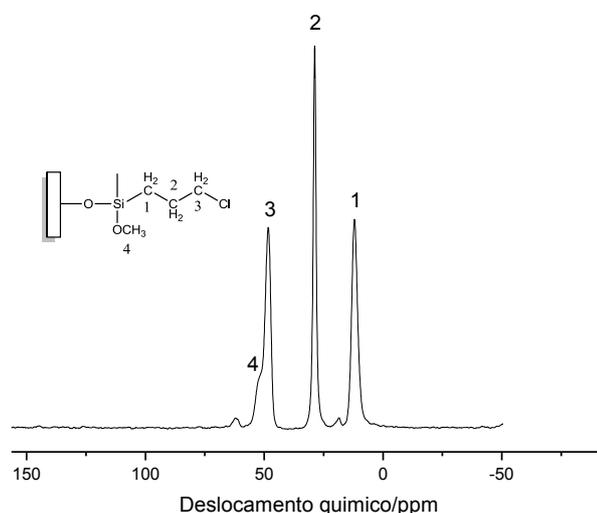


Figura 29. Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C da sílica silanizada com 3-cloropropiltrimetoxissilano (Sil-propil-Cl).

Para a superfície Sil-propil-Cl foram observados os sinais 12 ppm, 29 ppm e 48 ppm que correspondem a cadeia propila imobilizada na superfície da sílica (AULER et al. 2005). A presença de um sinal de fraca intensidade (pequeno ombro) em 53 ppm pode ser atribuído aos grupos metoxilas remanescentes, significando que nem todos os grupos alcoxi reativos do organosilano reagiram com os grupos silanóis da superfície da sílica gel.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos para os materiais modificados com 1,6 diamino-hexano (Sil-propil-hex) e após a reação com o cloreto cianúrico (Sil-propil-hex-CC) (Figura 30).

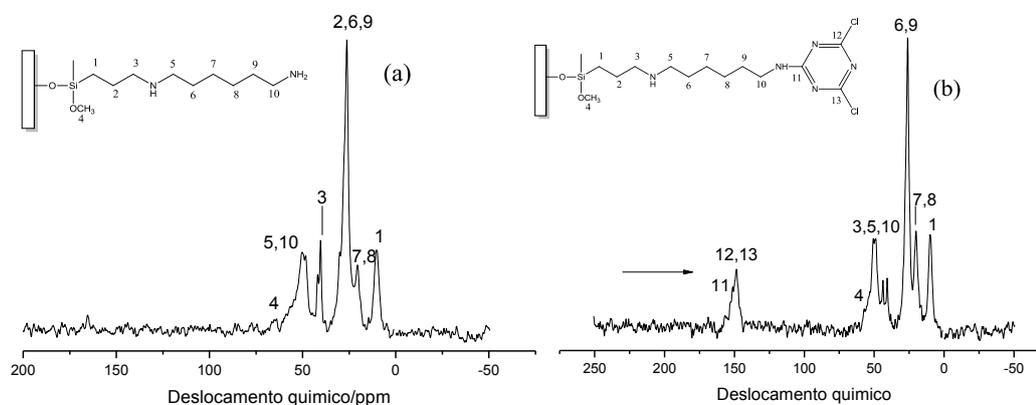


Figura 30. Espectros de RMN de ^{13}C para os sólidos Sil-propil-hex (a) e Sil-propil-hex-CC (b).

A incorporação da diamina nas reações de funcionalização foi confirmada pela presença de novos picos relativos aos deslocamentos químicos observados em 21 ppm, 40 ppm e 49 ppm. Já a reação com o cloreto cianúrico, após a imobilização da diamina, gerou os picos 148 ppm e 157 ppm, os quais foram atribuídos à presença de carbono com dupla ligação devido à imobilização com o cloreto cianúrico. Assim, os resultados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C confirmam a efetividade das reações de organofuncionalização da sílica gel e ilustram as prováveis estruturas pendentes na matriz inorgânica.

4.2 Ensaio de imobilização da BC lipase

Os ensaios de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foram realizados com os materiais, Sil-propil-N-CC, Sil-propil-hex e Sil-propil-hex-CC.

4.2.1 Influência do tempo de imobilização da enzima

A cinética de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* quanto à carga da enzima imobilizada em função do tempo de contato com o suporte foi

investigada. Para tanto, estudou-se o processo de imobilização nos seguintes períodos: 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h e 24 h de reação apenas para o material Sil-propil-N-CC, pois o melhor tempo obtido foi utilizado para imobilizar a BC lipase nos materiais Sil-propil-hex e Sil-propil-hex-CC. Os resultados estão representados pela Fig. 31 e listados na Tab. 2.

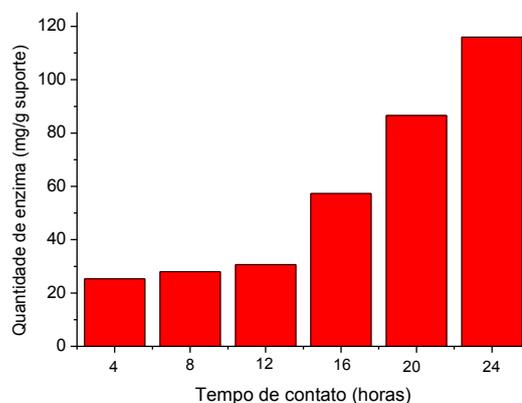


Figura 31. Progresso da reação de imobilização da lipase de *Burkholderia Cepacia* em função do tempo de contato com o suporte funcionalizado Sil-N-CC (150 mg de massa seca, 298 K, pH 7.2).

Tabela 2. Ensaio de imobilização de Lipase de *Burkholderia Cepacia* no suporte funcionalizado Sil-NH-CC em diferentes tempos de contato.

*suporte	Tempo de imobilização (horas)	**Quantidade de enzima (mg/g suporte)
Sil-Lip1	4	25,3
Sil-Lip2	8	28,0
Sil-Lip3	12	30,7
Sil-Lip4	16	57,3
Sil-Lip5	20	86,6
Sil-Lip6	24	116,0

*Suportes foram chamados Sil-Lip para as lipases imobilizadas no material Sil-propil-N-CC.

Quantidade de enzima imobilizada por grama de suporte. A carga oferecida para imobilização foi **133 mg g⁻¹ suporte.

Os ensaios de imobilização mostram a ocorrência de um aumento progressivo na retenção de proteína por grama de suporte em função do período de imobilização, sendo que o maior valor obtido (116,0 mg/g) foi para 24 h de reação. Durante esse período, cerca de 116,0 mg de proteína por grama de suporte foi imobilizada, refletindo a necessidade de um longo tempo de contato para uma imobilização eficiente da enzima neste suporte. Bayramoğlu al. (2011) também reportaram uma maior eficiência de imobilização quando o tempo de contato foi de 24 h.

Com efeito, os dados obtidos sugerem que em períodos mais curtos de contato pode haver predominância de interações fracas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio ou mesmo interações eletrostáticas, devido a presença de grupos amino protonados remanescentes na superfície do suporte. Nesse caso, o suporte pode admitir uma cinética de adsorção física mais rápida com os grupos superficiais das enzimas (MATEO et al. 2003). Isso foi confirmado pela ocorrência de dessorção das enzimas quando os sistemas imobilizados foram submetidos à lixiviação com a solução tampão de imobilização.

As concentrações das enzimas presentes nas soluções de lavagem foram determinadas e subtraídas da concentração inicial da enzima disponível para a imobilização, conforme a equação mencionada no item **4.3.6.1**. Foi verificado que o aumento do tempo de interação provavelmente favoreceu a formação de ligações mais efetivas entre os grupamentos químicos do suporte e os grupos reativos da superfície da enzima, uma vez que a quantidade de enzima imobilizada aumentou significativamente. Tais resultados podem ser atribuídos à ativação do suporte com o cloreto cianúrico, pois a molécula triazínica ancorada no suporte possui átomos de cloro muito reativos que podem promover um ataque covalente do anel triazínico aos grupos funcionais dos aminoácidos residuais da cadeia lateral da enzima (TRAN; BALKUS, Jr. 2011).

Com base nos resultados obtidos na avaliação do melhor tempo de contato para imobilizar a BC lipase, utilizou-se o tempo de 24 h para imobilizar a enzima nos sólidos Sil-propil-hex e Sil-propil-hex-CC. Para estes sistemas, empregando as mesmas condições de ensaio de imobilização, foram obtidos **120 mg/g** e **100,0 mg/g** de suporte respectivamente para a lipase imobilizada em Sil-propil-Hex-CC e Sil-propil-Hex.

4.3 Determinação da atividade enzimática e estabilidade operacional

Uma forma rápida e eficiente de determinar a atividade catalítica de uma lipase pode ser realizada por espectrofotometria no UV/VIS através de medidas da taxa de conversão de um cromóforo formado numa reação catalisada pela enzima. É conhecido que a reação de hidrólise de um éster de p-nitrofenila pode ser catalisada pela lipase e, conseqüentemente, levar a formação do p-nitrofenol, o qual em meio alcalino está em equilíbrio com o íon p-nitrofenolato e pode ser determinado espectrofotometricamente por medidas de absorbância em 410 nm (GUPTA, N.; GUPTA, R.; RATHI, 2002). Não obstante, o substrato p-NPP é bastante sensível à hidrólise, e, por isso, foi necessário avaliar a influência que a sílica gel pura e suas formas modificadas causariam na hidrólise do substrato, de modo a mascarar o efeito catalítico dos biocatalisadores mobilizados.

Dessa forma, a matriz inorgânica pura e suas formas funcionalizadas foram testadas na reação de hidrólise do p-NPP, conforme as condições reportadas no item 4.3.6.2. Os resultados obtidos nesta etapa estão apresentados na Figura 32.

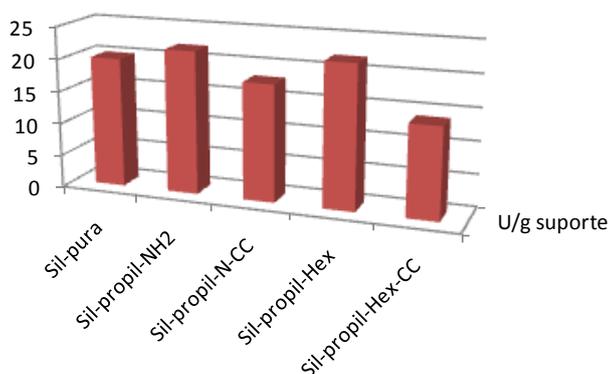


Figura 32. Ensaio de hidrólise do p-NPP com a sílica pura e suas formas funcionalizadas. A atividade foi expressa em U/g de suporte.

Os resultados obtidos nos testes de hidrólise do p-NPP com os suportes sem as lipases mostraram atividade desprezível comparado à lipase imobilizada no material Sil-propil-N-CC (2910 U/g), cujos valores foram inferiores a 25 U/g de suporte, indicando que os suportes sem a enzima não exerceram competência catalítica significativa para mascarar a atividade catalítica dos biocatalisadores imobilizados.

Por outro lado, os resultados obtidos da reação de hidrólise catalisada pela lipase de *Burkholderia Cepacia* imobilizada nos materiais Sil-propil-N-CC, Sil-

propil-hex e Sil-propil-hex-CC hidrólise foram superiores a **2900 U/g**, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Atividade de hidrólise da lipase imobilizada em Sil-propil-N-CC

suporte	Quantidade de enzima (mg/g suporte)	*Atividade ($\mu\text{mol}/\text{min g}^{-1}$)
Sil-propil-N-CC	116,0	2910
Sil-propil-Hex	100,0	3100
Sil-propil-Hex-CC	120,0	3330

* A atividade da BC lipase disponível para imobilização foi **3990 U g⁻¹ de suporte** (dada pelo fabricante: 30 000 U/g de proteína). A atividade verificada para a BC lipase livre foi **3900 U/g de proteína**.

As lipases imobilizadas nestes materiais foram logo avaliadas quanto a sua estabilidade operacional, no sentido de se verificar sua competência catalítica em termos de potencial de reciclagem. Os resultados obtidos estão apresentados na Fig. 33.

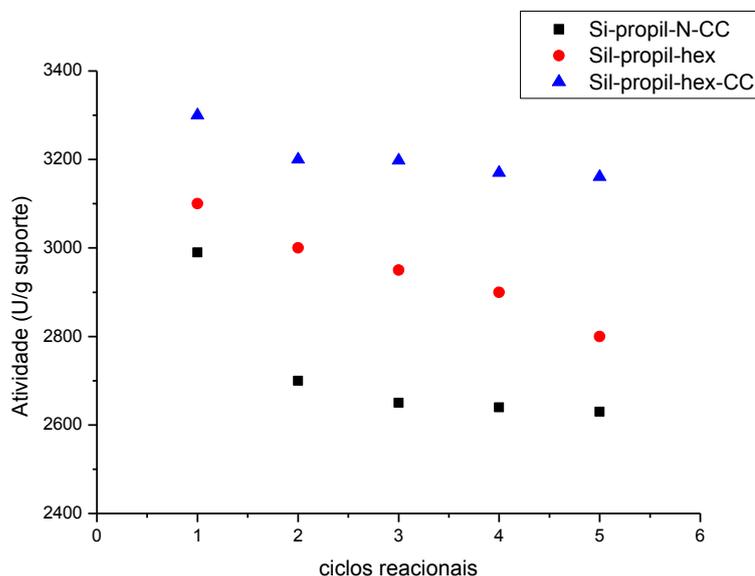


Figura 33. Efeito da estabilidade operacional sobre a atividade residual de hidrólise do p-NPP das lipases imobilizadas nos materiais **Sil-propil-N-CC**, **Sil-propil-hex** e **Sil-propil-hex-CC**. As enzimas imobilizadas foram reutilizadas depois de lavadas com tampão fostato (0,67 M e pH 7,5) após cada ciclo de reação.

Nestes experimentos foi observado que a atividade das lipases imobilizadas foi sempre menor do que a da enzima livre (3900 U/g de proteína). Esses resultados são compatíveis aos obtidos na literatura, onde se verifica que quase sempre

há perda de atividade após o processo de imobilização (BAYRAMOĞLU et al. 2011). O comportamento de uma enzima em um meio heterogêneo pode ser diferente daquele apresentado em sistemas homogêneos, mesmo que não haja influência de restrições difusionais.

Nesse sentido, torna-se razoável considerar que as moléculas de enzima são imobilizadas randomicamente, e isso pode ocasionar uma falta de homogeneidade na orientação das enzimas, o que resultaria em uma heterogeneidade dos derivados imobilizados. Tal fato é reforçado pela natureza química dos aminoácidos da superfície das enzimas, uma vez que os grupamentos químicos dos resíduos de aminoácidos próximos ao centro ativo podem reagir com a superfície ativa do suporte.

Dessa forma, torna-se possível que algumas moléculas das enzimas imobilizadas estejam com orientações desfavoráveis, ou até mesmo desnaturadas na superfície do suporte devido às modificações conformacionais do sítio ativo durante o processo de imobilização. Essas peculiaridades implicam em menor retenção de atividade enzimática, mesmo que os sistemas imobilizados apresentem alta carga de enzima imobilizada.

Contudo, o efeito da imobilização sobre a estabilidade operacional das lipases pode compensar a perda de atividade, pois a enzima pode permanecer mais estavelmente ligada ao suporte. Pode ser visto na Fig 33 que todas as lipases apresentaram perda de atividade após cada ciclo reacional, sendo que a enzima imobilizada no material Sil-propil-hex-CC demonstrou ser mais estável em relação aos outros sistemas imobilizados, além de manter maior atividade de hidrólise nas condições do ensaio. Uma perda mínima de atividade enzimática é uma situação esperada, pois a cada ciclo de reação as enzimas imobilizadas podem sofrer dessorção depois de submetidas à lavagem com a solução de imobilização, o que resulta em menor retenção da atividade enzimática.

Tendo em vista que a tendência de perda de atividade foi menos pronunciada para o sistema Sil-propil-hex-CC, podemos sugerir que neste sistema as moléculas de enzimas formaram ligações mais efetivas com a superfície ativa do suporte. Isso pode ser devido ao fato de que o ataque covalente da enzima é favorecido no material contendo o espaçador, pois a presença de um espaçador na superfície do suporte pode ser capaz de minimizar interações não favoráveis com sítios específicos, o que assegura maior flexibilidade da enzima durante o processo catalítico.

4.4 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de armazenamento permite determinar a vida útil de uma enzima imobilizada, considerando um período de estocagem a que ela é submetida. Nesse trabalho, as enzimas imobilizadas foram estocadas por 30 dias, e completado este período, os sistemas foram submetidos em reações de hidrólise de p-NPP por cinco ciclos reacionais consecutivos. Os resultados estão apresentação na Fig. 34.

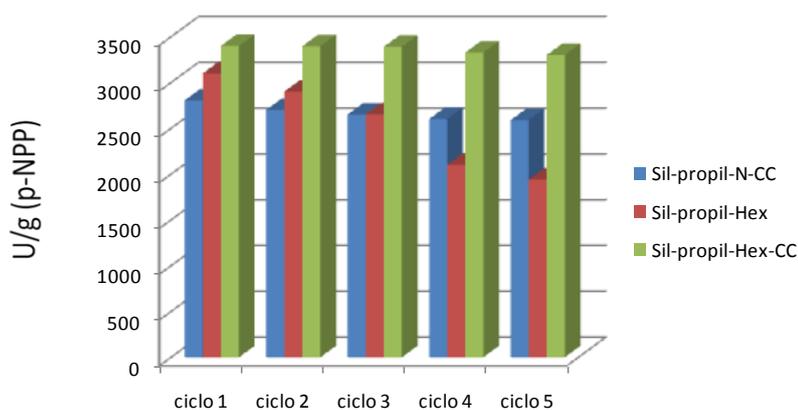


Figura 34. Efeito do tempo de estocagem sobre a atividade residual de hidrólise do p-NPP das lipases imobilizadas nos materiais **Sil-propil-N-CC**, **Sil-propil-hex** e **Sil-propil-hex-CC**. As enzimas imobilizadas foram armazenadas por 30 dias a 4-8 °C e reutilizadas depois de lavadas com tampão fostato (0,67 M e pH 7,5) após cada ciclo de reação.

Após os ensaios de hidrólise, as lipases imobilizadas apresentaram elevadas taxas de retenção da atividade enzimática durante o primeiro ciclo reacional. Contudo, após sucessivas bateladas os derivados enzimáticos demonstraram uma tendência de perda da atividade, sendo observado que, após o último ciclo reacional houve uma perda de atividade correspondente a 2,9% U, 37% U e 7,3% U para os derivados enzimáticos imobilizados Sil-propil-Hex-CC, Sil-propil-Hex e Sil-propil-N-CC, respectivamente. Com efeito, uma menor perda de atividade foi observada para o derivado enzimático **Sil-propil-hex-CC** que mostrou ser mais estável do que os demais sistemas. Isso pode ser explicado com base no fato de que o espaçador 1,6 diamino hexano foi capaz de proporcionar uma estabilidade adicional neste sistema mantendo a enzima mais flexível durante o processo catalítico.

Assim, os resultados podem expressar que as condições de armazenamento das lipases imobilizadas favoreceram a manutenção da atividade

biológica das enzimas e, portanto, essa estabilidade pode estar associada à formação de ligações efetivas entre os grupos reativos das moléculas de enzima e a superfície do suporte, conforme sugerido para os resultados de estabilidade operacional.

Referências

- AULER, L. M. L. A. New stationary phase for anion-exchange chromatography **Journal of Chromatography A**, v.1073, p. 147–153, 2005.
- ARAKAKI et al. Thioglycolic acid grafted onto silica gel and its properties in relation to extracting cations from ethanolic solution determined by calorimetric technique. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 273, p. 211–217, 2004.
- BAYRAMOĞLU, G. et al. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 372–378, 2011.
- BUSZEWSKI, et al. Determination of accessible silanol groups on silica gel surfaces using microcalorimetric measurements. **Journal of Chromatography A**, v.1232, p.43–46, 2012.
- HICKS et al. Spacing and Site Isolation of Amine Groups in 3-Aminopropyl-Grafted Silica Materials: The Role of Protecting Groups. **Chem. Mater.**, v. 18, p. 5022-5032, 2006.
- KHDARY, N. H.; GHANEM, M. A. Metal–organic–silica nanocomposites: copper, silver nanoparticles–ethylenediamine–silica gel and their CO₂ adsorption behavior **J. Mater. Chem.**, v. 22, p. 12032, 2012.
- KOVALCHUK, T. Preparation, structure and thermal stability of onium- and amino-functionalized silicas for the use as catalysts supports **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, p. 214–229, 2006.
- KUZINIARSKA-BIERNACKA, et al. Organo-Laponites as Novel Mesoporous Supports for Manganese(III) salen Catalysts. **Langmuir**, v. 21, p. 10825-10834, 2005.
- MATEO, C. et al. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4 p. 772-777, 2003.
- LAZGHAB, M.; SALEH, K.; GUIGON, P. Functionalisation of porous silica powders in a fluidised-bed reactor with glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) and aminopropyltriethoxysilane (APTES). **Chemical engineering research and design**, v. 88, p. 686-692, 2010.
- GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**. v. 311, p. 98–99, 2002
- QIU et al. Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1163 p. 63–69, 2007.
- TRAN, D. N.; BALKUS, K J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. **ACS Catal.**, v.1, p. 956–968, 2011.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners on the right. The scroll is outlined in black and has a light gray shadow on the left side.

Capítulo 5

Conclusões

Conclusões

Na etapa de silanização foi possível obter cerca de 1,00 mmol/g de grupos cloropropil e 1,3 mmol/g de grupos aminopropil ancorados na superfície da sílica gel, o que confirmou a efetividade das reações com os agentes modificadores. Tais resultados permitiram obter a incorporação de grupos funcionais que promoveram o ancoramento do cloreto cianúrico no suporte. A efetividade das reações com o cloreto cianúrico foi confirmada por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e técnicas de RMN de ^{29}Si e ^{13}C .

Os materiais modificados com o cloreto cianúrico mostraram uma superfície ativa para imobilizar a BC lipase, de modo que foi demonstrada alta afinidade desta enzima pelos suportes. Os estudos de adsorção demonstraram que o tempo de contato de 24 h se mostrou mais eficiente para imobilização no suporte Sil-propil-NH₂ apresentado uma carga máxima de enzima imobilizada em 116 mg/g suporte.

No que se refere aos testes de estabilidade, o derivado enzimático **Sil-propil-hex-CC** demonstrou maior potencial de recuperação e reutilização nos ciclos catalíticos, mostrando assim, a influência positiva do espaçador na estabilidade do biocatalisador imobilizado.

Assim, a ativação dos suportes com cloreto cianúrico mostrou-se eficiente para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* nas condições empregadas neste trabalho, tendo demonstrado competência catalítica para a hidrólise do éster p-nitrofenilpalmitato.

Perspectivas do trabalho

Como perspectiva do trabalho pretende-se testar os sólidos obtidos neste estudo em novos ensaios de imobilização onde serão avaliados o efeito do pH de imobilização, a força iônica, bem como a relação enzima/suporte. Além disso, os suportes investigados nesse estudo serão utilizados na imobilização de outras enzimas lipolíticas, como a *Candida rugosa* lipase e a *Aspergillus niger* lipase.

No que se refere à competência catalítica, os biocatalisadores obtidos neste estudo serão avaliados quanto à cinética enzimática através do modelo de Michaelis-Menten, bem como serão testados nos ensaios catalíticos em substratos que permitam a síntese de ésteres e/ou a transesterificação enzimática.