



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES POROSOS DE SÍLICA E SUPORTES HÍBRIDOS
DE SÍLICA/QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM CATÁLISE ENZIMÁTICA

NATÁLIA CARMINATTI RICARDI

Porto Alegre, julho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ

NATÁLIA CARMINATTI RICARDI

DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES POROSOS DE SÍLICA E SUPORTES HÍBRIDOS
DE SÍLICA/QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM CATÁLISE ENZIMÁTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa

Orientadora

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Co-Orientador

Porto Alegre, julho de 2016.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pela aluna Natália Carminatti Ricardi, exceto nas colaborações as quais estão citadas na sessão de agradecimentos, no período de agosto de 2014 a julho de 2016, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob Orientação da Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa e do Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues



Prof. Dr. José Ribeiro Gregório



Prof. Dr. Irene Teresinha Santos Garcia



Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa



Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz



Natália Carminatti Ricardi

“Happiness is only real when shared”

(Alexander Supertramp)

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a sua realização. Em especial, dedico à minha mãe Marli T. C. Ricardi e ao meu pai Jorge Ricardi, por todo carinho, dedicação e apoio durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dr^a. Tania Maria Haas Costa, pela dedicação, disposição, ensinamentos e contribuição ao longo de minha formação acadêmica desde a iniciação científica. Obrigada pela atenção que me dedicou, sempre com entusiasmo e motivação.

Ao meu co-orientador professor Dr. Plinho Francisco Hertz, por ter me acolhido no grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Edilson V. Benvenuti, pela disponibilidade, ensinamentos e contribuição para o desfecho do trabalho.

À professora Dr^a. Eliana Weber de Menezes, por sua dedicação, interesse e orientações fundamentais para a condução deste trabalho.

À professora Dr^a. Leliz Ticona Arenas, pelos ensinamentos e orientação durante o período de estágio de docência.

Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia, pelo acolhimento e simpatia, em especial à Jéssie e Camila, pela disponibilidade e ajuda no trabalho.

Aos meus amigos ‘super’ malas Douglas e Carlos, pelos momentos de alegria falando bobagem e sem ter o que fazer! Obrigada pela amizade, por todas as risadas e pelas conversas sem fim.

Aos colegas do Laboratório de Sólidos e Superfícies, Monique, Anike, Luana, Billy, Carol, Dhjulia, Marina, Dani, Fran, Andressa, Júlia, Cezar e Thiago, pelos momentos de distração e alegria ao longo dos cinco anos que faço parte desse grupo.

Aos meus primos Felipe e Jéssica, pelas conversas, risadas e, principalmente, por desenharem maravilhosamente bem.

À minha prima Júlia, pela companhia nas idas ao vale, mesmo dormindo durante quase todas as viagens ou discutindo sobre astrologia.

À ‘Dinda’ Dani, por sempre estar presente e constantemente me estimular a seguir a carreira acadêmica.

Agradeço, em especial, aos meus pais Marli T. Carminatti Ricardi e Jorge Ricardi, por todo amor, dedicação e incentivo que sempre me deram. Obrigada por tudo que já me proporcionaram!

À UFRGS pela estrutura utilizada no desenvolvimento deste trabalho e à Capes pela bolsa outorgada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	6
2.1. OBJETIVO GERAL.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES.....	8
3.1.1. Hidrólise da Lactose.....	9
3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	12
3.2.1. Encapsulamento.....	13
3.2.2. <i>Crosslinking</i>	14
3.2.3. Adsorção	14
3.2.4. Ligação Covalente	15
3.3. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	16
3.3.1. Suportes Orgânicos.....	17
3.3.2. Suportes Inorgânicos	19
3.4. MÉTODO SOL-GEL.....	20
3.4.1. Híbridos a Base de Sílica	22
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	26
4.1. REAGENTES UTILIZADOS.....	26
4.2. SÍNTESE DOS MATERIAIS	26
4.2.1. Síntese dos Materiais Híbridos a Base de Sílica e Quitosana	26
4.2.1.1. Híbrido Sílica-Quitosana 10%	26
4.2.1.2. Híbrido Sílica-Quitosana 20%	27
4.2.2. Síntese da Matriz de Sílica	28
4.2.2.1. Modificação da Superfície da Matriz de Sílica.....	28

4.2.3.	Modificação das Superfícies com Glutaraldeído	28
4.2.4.	Imobilização da Enzima β -galactosidase	29
4.3.	TESTES BIOCATALÍTICOS	29
4.3.1.	Atividade Enzimática.....	29
4.3.2.	Determinação dos Parâmetros de Imobilização	30
4.3.3.	Estabilidade Térmica.....	31
4.3.4.	Atividade Enzimática em Diferentes Faixas de pH(s).....	31
4.3.5.	Estabilidade Operacional da β -galactosidase imobilizada	31
4.4.	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
4.4.1.	Análise Elementar C, H e N.....	33
4.4.2.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	33
4.4.3.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)	34
4.4.4.	Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	34
4.4.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL.....	36
5.1.1.	Análise Elementar C, H e N.....	36
5.1.2.	Análise Termogravimétrica.....	37
5.1.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
5.1.4.	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	44
5.1.5.	Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	45
5.2.	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS SUPORTES PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	53
5.2.1.	Ensaio de Atividade Enzimática	53
5.2.2.	Avaliação da Estabilidade Térmica e da Atividade da Enzima β - galactosidase em Diferentes pH(s).....	54
5.2.3.	Estabilidade Operacional na Hidrólise da Lactose	58
6.	CONCLUSÕES	61

7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da α -lactose e da β -lactose	9
Figura 2. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase.....	11
Figura 3. Representação dos diferentes métodos de imobilização de enzimas (adaptado das referências 55 e 56).	13
Figura 4. Representação das estruturas da quitina e quitosana.	18
Figura 5. Representação de classes de materiais híbridos ²⁷	23
Figura 6. Representação da reação de hidrólise do o-NPG.....	29
Figura 7. Fotografia do sistema contendo o reator utilizado no experimento.....	32
Figura 8. Reactores utilizados no experimento: a esquerda reator contendo a enzima imobilizada no suporte SiQT10 e a direita a enzima imobilizada no suporte SiO ₂	32
Figura 9. Curvas termogravimétricas da matriz SiO ₂ antes e após as modificações.	37
Figura 10. Curvas termogravimétricas da matriz SiQT10 antes e após as modificações.	38
Figura 11. Curvas termogravimétricas da matriz SiQT20 antes e após as modificações.	38
Figura 12. Micrografias obtidas por MEV das amostras (a) SiO ₂ , (b) SiQT10, (c) SiQT10glut e (d) SiQT10enz com ampliação de 500X.....	41
Figura 13. Micrografias obtidas por MEV das amostras (a) SiO ₂ , (b) SiQT10, (c) SiQT10glut e (d) SiQT10enz.....	42
Figura 14. Espectros na região do infravermelho obtidos na temperatura ambiente das amostras SiO ₂ , SiQT10, SiQT20.....	44
Figura 15. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiO ₂ , SiQT10 e SiQT20.	45
Figura 16. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiO ₂ antes e após modificações.....	47
Figura 17. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT10 antes e após modificações.....	48

Figura 18. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT20 antes e após modificações.	49
Figura 19. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT10 antes e após calcinação.....	51
Figura 20. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT20 antes e após calcinação.....	52
Figura 21. Influência do pH na atividade hidrolítica da β-galactosidase a 37 °C.....	55
Figura 22. Estabilidade térmica à temperatura de 40 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.	56
Figura 23. Estabilidade térmica à temperatura de 50 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.	56
Figura 24. Estabilidade térmica à temperatura de 60 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.	57
Figura 25. Estabilidade térmica à temperatura de 70 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.	57
Figura 26. Estabilidade operacional em uso contínuo da enzima imobilizada, em reator de leito fixo, a 37 °C e pH 7,0.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Análise elementar do híbrido sílica-quitosana (SiQT10 e SiQT20).	36
Tabela II. Perdas de massa percentual das matrizes SiO ₂ , SiQT10, SiQT20 e suas modificações.	39
Tabela III. Determinação do teor orgânico nas matrizes híbridas SiQT10 e SiQT20.	40
Tabela IV. Porcentagem em massa dos principais elementos presentes na amostra.	43
Tabela V. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiO ₂ , SiQT10 e SiQT20..	46
Tabela VI. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiO ₂ , SiQT10 e SiQT20 antes e após as modificações	50
Tabela VII. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiQT10 e SiQT20 antes e após calcinação.....	53
Tabela VIII. Comparação entre os parâmetros de imobilização da β-galactosidase nos diferentes suportes a base de sílica (SiQT10enz, SiQT20enz e SiO ₂ enz).....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
CLEAs	Ligação cruzada de agregados de enzimas (do inglês <i>crosslinked enzyme aggregates</i>)
EC	Do inglês <i>Enzyme Commission</i>
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (do inglês <i>energy dispersive spectroscopy</i>)
FT-IR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de fourier
g	Gravidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
<i>o</i> -NPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosideo
pH	Potencial hidrogeniônico
QT	Quitosana

SiQT	Híbrido sílica-quitosana
TEOS	Ortossilicato de tetraetila
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>thermogravimetry analysis</i>)

RESUMO

Em biocatálise, tem crescido o uso de enzimas imobilizadas em função das diferentes vantagens observadas pelo uso desta técnica, quando comparada ao uso de enzimas livres. O bom desempenho de enzimas imobilizadas está diretamente relacionado ao tipo de suporte usado no processo de imobilização. Neste sentido, é de fundamental importância a busca por novos suportes que aliem qualidades mecânicas, biocompatibilidade e que, ao mesmo tempo, consigam melhorar as características da enzima a ser imobilizada. No presente trabalho foram desenvolvidos materiais híbridos a base de sílica, contendo diferentes proporções de quitosana, 10 e 20%, e um material a base de sílica que foi organofuncionalizado com APTMS. A enzima escolhida como modelo foi a β -galactosidase devido a sua aplicação na indústria de alimentos. A fim de proceder à imobilização covalente da enzima, foi realizada a ativação dos suportes com glutaraldeído. Os três materiais, com e sem enzima imobilizada, foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar C, H, N e termogravimétrica, comprovando a incorporação da quitosana. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ mostraram que os materiais são mesoporosos e que a enzima não está bloqueando os poros. Por outro lado, a microscopia eletrônica de varredura indicou que a quitosana está dispersa em regiões micrométricas na sílica. O desempenho dos materiais imobilizados como biocatalisadores foi testado para a reação de hidrólise da lactose. Quanto aos parâmetros de imobilização, foi observado um maior rendimento de imobilização na matriz de sílica. No entanto, a enzima imobilizada nas matrizes híbridas com 10 e 20% de quitosana apresentou maiores valores de eficiência, respectivamente 62 e 47%, enquanto que para a sílica pura a eficiência foi de 37%. Tanto enzima livre quanto a imobilizada nos diferentes suportes apresentaram uma tendência semelhante à perda de atividade relativa quando submetidas a tratamento térmico. Além disso, a imobilização da enzima não apresentou melhorias na amplitude dos valores de atividade relativa em diferentes pH(s). A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise da lactose utilizando um reator de leito fixo, no qual, tanto o imobilizado enzimático em suporte de sílica pura quanto o do material híbrido, permaneceram com aproximadamente 100% de atividade por um período de uso contínuo de 200 horas. Sendo assim, o suporte híbrido proposto proporcionou a manutenção da atividade catalítica da enzima imobilizada, tornando-se uma alternativa viável e interessante para a aplicação na indústria de alimentos, uma vez que a presença de quitosana agrega outras características além da estabilidade mecânica própria da sílica.

ABSTRACT

In biocatalysis, the use of immobilized enzymes has grown, in terms of different advantages observed by the use of this technique as compared to the use of free enzymes. The good performance of immobilized enzymes is directly related to the type of support used in the immobilization process. In this sense, the search for new supports which combine mechanical properties, biocompatibility and, at the same time, are able to improve the characteristics of the enzyme to be immobilized is of fundamental importance. In this work were developed sílica-based hybrid materials, containing different ratios of chitosan, 10 and 20% and a silica based material which was organofunctionalized with APTMS. The enzyme chosen as a model was β -galactosidase due to its application in the food industry. In order to carry out the covalent immobilization of the enzyme, the supports were activated with glutaraldehyde. The three materials, with and without the immobilized enzyme, were characterized by infrared spectroscopy, elemental and thermogravimetric analysis, proving the incorporation of chitosan. Nitrogen adsorption and desorption isotherms showed that the materials are mesoporous and that the enzyme is not blocking the pores. On the other hand scanning electron microscopy indicated that chitosan is dispersed in micrometric regions in silica. The performance of the immobilized materials as biocatalysts was tested for lactose hydrolysis reaction. As for immobilization parameters, it was observed a higher immobilization yield in the silica matrix. However, the immobilized enzyme in the hybrid matrices showed higher efficiency, respectively 62 and 47% for the hybrid with 10 and 20% of chitosan, whereas for pure silica the efficiency was 37%. Both free and immobilized enzymes showed a similar trend in losing relative activity when subjected to heat treatment. Furthermore, the enzyme immobilization showed no improvement in amplitude value of the relative activity at different pH(s). The operational stability of the immobilized enzyme was evaluated by the lactose hydrolysis using a fixed bed reactor in which both the immobilized enzyme on pure silica support as on the hybrid material remained with approximately 100% activity for a period of continuous use of 200 hours. Therefore, the proposed hybrid support provided the maintenance of the catalytic activity of the immobilized enzyme, making it a viable and interesting alternative for application in the food industry, since the presence of chitosan aggregates characteristics other than the own mechanic stability of the silica.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos é crescente a busca por metodologias alternativas em processos industriais, não apenas eficientes e seguras, como também ambientalmente corretas e provenientes de recursos renováveis. Uma estratégia promissora para atingir esses objetivos é a utilização de enzimas, a qual vem se popularizando cada vez mais com o surgimento de novos métodos e produtos^{1,2}. As enzimas atuam como catalisadores em reações químicas, apresentando diversas características que tornam seu uso vantajoso quando comparado a catalisadores químicos convencionais. Seu elevado grau de especificidade permite a discriminação não só entre reações, mas entre grupos, ligações e isômeros ópticos, permitindo sua aplicação na catálise seletiva^{3,4}. Tais propriedades garantem um produto final sem a produção de subprodutos indesejáveis além de operar geralmente em condições moderadas de temperatura, pressão e pH, apresentando velocidades de reação na ordem das obtidas por catalisadores químicos em condições extremas, contribuindo para a economia de energia e redução de custos.

Geralmente, as enzimas são utilizadas na sua forma livre, impedindo sua recuperação e reutilização, o que explica seu elevado valor comercial. A minimização dos custos com enzimas e o aprimoramento de suas características, como uma maior estabilidade frente a condições adversas de operação, podem ser alcançadas com técnicas de imobilização, que têm como consequência o reaproveitamento desses biocatalisadores sem contaminação do produto final^{5,6}. Além disso, a utilização de enzimas imobilizadas em suportes sólidos permite o desenvolvimento de sistemas de operação contínua, expandindo assim o potencial de aplicação da tecnologia enzimática em processos industriais.

Dentre as estratégias de imobilização, a ligação covalente de enzimas sobre superfícies funcionalizadas de suportes sólidos vem sendo amplamente investigada, uma vez que a atividade e estabilidade da enzima imobilizada se relacionam diretamente com as propriedades do suporte, tais como tamanho de poro, estabilidade química e capacidade de ligação com a enzima^{7,8}. Mesmo assim, ainda é necessário o desenvolvimento de novos suportes e protocolos de imobilização que mantenham a atividade catalítica da enzima e apresentem baixo custo e potencial para aplicações comerciais diretas⁶.

Entre os diversos materiais utilizados como suportes para imobilização de enzimas, a quitosana é considerada adequada devido às suas propriedades, como não tóxico, biocompatível e biodegradável, além de apresentar grupos funcionais reativos disponíveis para reações diretas

com enzimas e para funcionalização⁹⁻¹¹. A imobilização é realizada com a utilização de um reagente bifuncional, como o glutaraldeído, no qual seus grupos funcionais (-CHO) reagem simultaneamente com os sítios de ligação da quitosana (-NH₂) e o grupo amino terminal da enzima. Porém seu desempenho pode ser melhorado para aplicação em reatores e processos contínuos onde, devido as suas propriedades texturais e mecânicas, pode ser observada a compactação e fragmentação dos suportes.

Suportes a base de sílica também têm sido utilizados para imobilização de enzimas devido a sua excelente biocompatibilidade, rigidez, estabilidade mecânica e operacional e não toxicidade. A modificação da superfície desses materiais por meio de grupos funcionais, como o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), proporciona a possibilidade de alteração das propriedades superficiais, mantendo a resistência mecânica da matriz. É possível encontrar na literatura suportes baseados nesses materiais, relatando a utilização em biocatálise de matrizes sílica na imobilização covalente de enzimas em superfícies funcionalizadas¹²⁻¹⁴, na adsorção de enzimas em superfícies¹⁵⁻¹⁷ e no encapsulamento de enzimas^{18,19}.

Uma alternativa é a incorporação de material orgânico nas matrizes de sílica, permitindo a formação de materiais híbridos organo-inorgânicos com melhores propriedades mecânicas e controle de porosidade²⁰. Polímeros como a quitosana são capazes de formar híbridos com a sílica, apresentando uma microestrutura altamente porosa acompanhada dos grupos (-NH₂) presentes nas moléculas de quitosana, fornecendo, assim, um ambiente hidrofílico compatível com as biomoléculas e demonstrando ser um suporte adequado para a imobilização de enzimas, diminuindo etapas de funcionalização. Na literatura, a maior parte dos trabalhos relacionados à utilização de híbridos a base de sílica e quitosana na imobilização de enzimas se referem a fabricação de biosensores^{21,22}. Para a aplicação em biocatálise, matrizes de sílica são agregadas a esferas de quitosana²³⁻²⁵, não ocorrendo uma grande variedade de trabalhos que abordem a síntese desses materiais híbridos com dispersão do material orgânico a nível molecular^{20,26}.

O método sol-gel de síntese, baseado em reações de hidrólise e condensação de precursores moleculares, é uma excelente estratégia para a preparação dessas matrizes. Esse método oferece a oportunidade de planejamento das características físico-químicas dos materiais obtidos a partir do estabelecimento das condições de síntese, o que permite a obtenção de materiais híbridos com morfologia e textura desejadas. A utilização de precursores organossilanos, como o ortossilicato de tetraetila (TEOS), permite um maior controle dos processos químicos envolvidos durante as reações de policondensação, sendo possível interferir no sistema de modo a arquitetar as propriedades finais dos materiais como tamanho e forma de

partículas, volume e distribuição de tamanho de poros e área superficial específica²⁷. Além disso, o método sol-gel de síntese apresenta como característica o fato de suas reações serem processadas a baixas temperaturas, permitindo a inserção de biomoléculas como enzimas e proteínas em sua matriz sólida. Sendo assim, esse método tem se mostrado interessante para o desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas e outros biomateriais.

A indústria alimentícia pode se beneficiar em diversos aspectos com a expansão da tecnologia enzimática devido à investigação de novas estratégias relacionadas com o desenvolvimento de processos de estabilização enzimáticas mais eficientes. Uma aplicação importante é na indústria de laticínios, tendo como exemplo a catálise da reação de hidrólise da lactose. Essa molécula apresenta características indesejáveis para a indústria de laticínios, como a tendência a adsorver odores e sabores e causar a cristalização de laticínios. Além disso, ela causa elevada contaminação no ambiente pelos resíduos de soro de queijo. A lactose também causa distúrbios na saúde em pessoas que sofrem intolerância a esse carboidrato. Esses problemas podem ser resolvidos através hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase, a qual pode ser produzida por diversos microorganismos²⁸. Quando a enzima é usada na sua forma livre, ela fica incorporada ao produto final, impedindo sua reutilização e causando o aumento dos custos do processo. Atualmente, vem sendo estudada a imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes suportes²⁹⁻³¹ de modo a melhorar sua estabilidade ao longo dos processos a que é aplicada.

Nessa perspectiva, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um material híbrido organo-inorgânico, a base de sílica/quitosana obtido pelo método sol-gel, para ser aplicado como suporte para a imobilização da enzima β -galactosidase. É esperado que, aliada às propriedades mecânicas da sílica, a presença de quitosana traga benefícios para a enzima imobilizada, melhorando sua estabilidade térmica e atividade em uma faixa maior de pH. Adicionalmente, para fins comparativos, foi obtida uma sílica organofuncionalizada com APTMS, a qual também foi utilizada como suporte para a imobilização da enzima β -galactosidase. Ambos materiais foram devidamente caracterizados e seu desempenho na reação de hidrólise da lactose avaliado em reações em batelada e em sistema contínuo.

Objetivo



2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de novos materiais porosos a base de sílica contendo quitosana, que apresentem características apropriadas para serem utilizados como suportes para imobilização de enzimas e aplicação em catálise enzimática.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho incluem:

- Síntese de sílicas porosas com tamanho de poros controlado, utilizando o método sol-gel.
- Síntese de materiais híbridos a base de sílica e quitosana.
- Caracterização estrutural, morfológica e textural dos materiais sintetizados.
- Imobilização da enzima β -galactosidase nos suportes para utilização em batelada e em reator contínuo.
- Avaliação da atividade enzimática nos diferentes suportes.
- Determinação da estabilidade operacional da enzima imobilizada.

*Revisão da
Literatura*



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em reações bioquímicas aumentando a velocidade das reações por meio da diminuição da energia livre de ativação, sem afetar os aspectos termodinâmicos das reações e sem serem consumidas^{32,33}. As enzimas são capazes de catalisar substratos similares, mas normalmente apresentam maior especificidade para apenas uma das reações. Tal especificidade, bem como a velocidade da reação catalisada, tem como origem a sequência única de aminoácidos específicos que formam a estrutura tridimensional da enzima, contendo um centro ativo e algumas vezes um grupo não proteico denominado grupo prostético (cofator ou coenzima)³⁴.

Em decorrência da constante e crescente busca por metodologias verdes e sustentáveis para a fabricação de produtos químicos, a biocatálise vem se apresentando como uma opção interessante por operar em condições suaves de reação, normalmente em pH fisiológico e em temperaturas e pressões moderadas^{1,35}. De modo geral, a utilização de enzimas como biocatalisadores dispensa a necessidade de proteção ou ativação de grupos funcionais, proporcionando vias sintéticas mais curtas, que geram menos resíduos e, por consequência, são ambientalmente e economicamente mais atrativas do que a utilização de catalisadores químicos tradicionais, muitas vezes tóxicos e contendo metais pesados³⁵.

Nos últimos anos, a introdução de compostos ativos enantiomericamente puros se tornou um processo estabelecido na indústria de química fina, principalmente a farmacêutica. O emprego de biocatalisadores se torna atraente para a síntese de moléculas opticamente ativas e de maior valor agregado, como consequência da inserção inteligente de quiralidade em moléculas, resultado da alta atividade das enzimas, bem como sua quimio-, regio- e estereosseletividade³⁵⁻³⁷. Assim, o emprego desses catalisadores naturais se mostra vantajoso e contribui para tornar os processos industriais mais econômicos, eficientes e favoráveis ao meio ambiente^{1,2}.

A maior disponibilidade de biocatalisadores no mercado combinado com os novos avanços da tecnologia enzimática contribuiu para o desenvolvimento de novas áreas de aplicação da biocatálise, promovendo um crescente interesse nesse tópico. O desejo por desenvolver novas vias para ter acesso a novas moléculas interessantes exigirá o progresso da

pesquisa em biotecnologia, permitindo a utilização de matérias-primas mais baratas e o preparo de uma grande variedade de moléculas complexas, sendo fatores importantes para uma inovação industrial^{2,37}.

Nesse contexto, a perspectiva biotecnológica vem se mostrando como uma opção interessante para a exploração de diversos tipos de reação. Como consequência, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores da indústria, incluindo o de química fina, farmacêutico, alimentício, cosméticos, têxtil, papel e celulose, dentre outras aplicações³⁸.

3.1.1. Hidrólise da Lactose

As enzimas são altamente utilizadas em vários setores da indústria de alimentos por serem apropriadas para diferentes fins. Dentre esses, a indústria de laticínios apresenta novas e importantes aplicações. Um exemplo importante dessas aplicações é a reação de hidrólise da lactose, presente no soro de leite, em glicose e galactose. A lactose é o principal carboidrato do leite, está presente em quase todos os mamíferos e é formada nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue. Os nutrientes utilizados para a síntese do leite têm origem direta nos alimentos ingeridos e podem ser retirados das reservas corporais. A concentração de lactose no leite dos mamíferos é entre 2% e 10%, sendo que no leite humano é de aproximadamente 7%³⁹.

A lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose) é um dissacarídeo que compreende uma molécula de glicose ligada a uma molécula de galactose. É apresentada em diferentes estados dependentes da temperaturas, podendo se manifestar nas formas anoméricas α e β , que são responsáveis pelas diferentes propriedades físicas desse açúcar³⁹ (Figura 1).

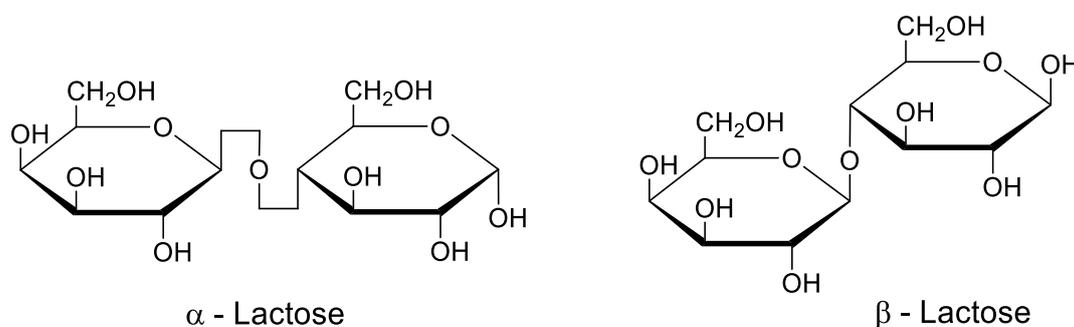


Figura 1. Estrutura molecular da α -lactose e da β -lactose

A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) de atividade da enzima β -galactosidase no aparelho digestivo. Isso é consequência de uma deficiência congênita desta enzima no organismo ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade e causa sintomas como diarreia, fortes dores abdominais e inchaços^{40,41}. A hidrólise da lactose do leite para consumo in natura ou para utilização em alimentos pode minimizar esse problema de saúde.

Outro propósito da hidrólise da lactose é a prevenção de sua cristalização em diversos produtos lácteos, como doce de leite, leite condensado, misturas para sorvetes e iogurtes, melhorando características organolépticas destes alimentos, como cor e sabor. Além disso, a hidrólise desse açúcar aumenta a facilidade de corte e da cremosidade das misturas para sorvete, diminui o tempo de maturação de algumas especialidades de queijos e produz oligossacarídeos^{41,42}.

A indústria de laticínios é uma potencial poluidora, não só em termos de volume de efluente que está sendo produzido, mas em termo de suas características. Esses efluentes de laticínios apresentam uma elevada demanda biológica e química de oxigênio e, quando descarregados sem nenhum tratamento prévio, poluem severamente reservas de água e perturbam todo o ecossistema. O soro de leite, principal subproduto da indústria de laticínios, retém a maior quantidade de nutrientes do leite integral original, incluindo as proteínas e a maior parte da lactose, vitaminas solúveis em água, minerais e gorduras. Sua decomposição é tóxica para o meio ambiente, sequestrando oxigênio de rios e promovendo o crescimento de algas e bactérias, resultando em condições anaeróbicas que conduzem a destruição da vida aquática sobre grandes áreas. Devido a isso, a eliminação do soro do leite ou a reutilização de biomoléculas presentes em sua composição tem sido uma preocupação. Uma alternativa bastante útil para isso é a hidrólise da lactose presente no soro de leite em glicose e galactose. Com isso, os produtos hidrolisados podem ser utilizados para o desenvolvimento de aditivos de animais e dieta humana e os monossacarídeos formados podem, por exemplo, ser convertidos em bioetanol após tratamento adequado⁴³.

A hidrólise da lactose pode ser realizada por dois métodos, através da hidrólise enzimática ou pela hidrólise ácida. A hidrólise utilizando a enzima solúvel é preferida em relação à ácida, pois permite condições mais suaves de pH e temperatura e não causa sabores ruins, odores e mudança na coloração. Além disso, o método utilizando ácido pode causar a desnaturação da proteína que pode estar presente na solução de lactose e produzir subprodutos

indesejados. A hidrólise da lactose em glicose e galactose é catalisada por uma enzima chamada β -galactosidase⁴³.

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23)⁴⁴, também chamada de lactase ou β -D-galactoside galactohidrolase, é bastante utilizada na indústria alimentícia para a preparação de leite hidrolisado. Essa enzima pertence à classe das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc), dando origem a uma mistura de glicose e galactose⁴¹ (Figura 2). Além disso, a β -galactosidase é utilizada para a produção de galactooligossacarídeos a partir da conversão catalítica da lactose⁴⁵.

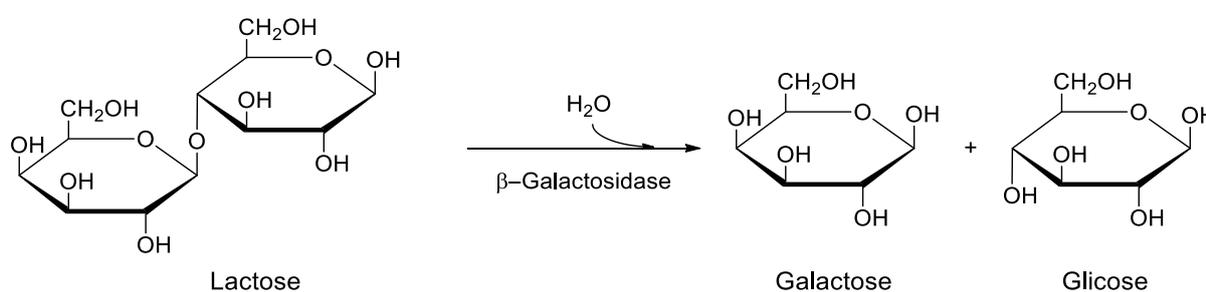


Figura 2. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase

As β -galactosidases ocorrem amplamente na natureza e podem ser isoladas a partir de plantas – amêndoas, pêssego, damasco, maçã –, em órgãos animais – como intestino, cérebro, testículos, placenta e micro-organismos, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras^{46,47}. Para aplicações comerciais, as fontes preferidas são isoladas a partir de microorganismos, fungos e leveduras. As diferentes β -galactosidases apresentam propriedades catalíticas que dependem de sua origem e são diretamente influenciadas pelas condições operacionais, como o pH, a presença de íons e a temperatura do meio reacional⁴⁸.

A enzima utilizada nesse trabalho é uma preparação líquida e purificada derivada da levedura *Kluyveromyces lactis*, de nome comercial MAXILACT® LX-5000, fabricada pela empresa DSM Food Specialties France, importada pela Global Food, São Paulo, Brasil. Se encontra como um líquido viscoso de coloração castanho escuro, devendo ser armazenada em temperaturas entre 4 e 8°C. Por ser um composto extraído de uma levedura láctea, as condições ótimas para sua atividade são semelhantes às naturais do leite, isto é, pH 6,6 – 6,8 e temperatura de 35 – 40°C. A atividade e estabilidade dessa enzima é melhorada pela presença de magnésio,

manganês e potássio. Concentrações de fosfato de até 10^{-2} M têm efeito positivo na estabilidade, pois promovem a formação de ligações de cálcio, o qual exerce forte efeito inibidor⁴⁹.

Basicamente, existem dois diferentes métodos para a utilização da β -galactosidase na hidrólise da lactose. A enzima solúvel é utilizada para o processo em batelada, enquanto o sistema imobilizado permite, além da utilização em batelada, uma operação contínua. Além disso, a enzima imobilizada oferece vantagens quando comparada com a enzima livre, como uma maior facilidade de recuperação na mistura reacional, não contaminação do produto pela enzima (especialmente na indústria alimentícia) e maior estabilidade operacional e térmica⁴³. Sendo assim, para aplicações em escalas industriais, em que são necessárias grandes quantidades de biocatalisador, os protocolos de imobilização de enzimas se tornam interessantes, devendo ser simples e fazer o uso de matérias relativamente baratas como suporte⁵⁰. À vista disso, podem ser encontrados na literatura diversos relatos da utilização da enzima β -galactosidase imobilizada em suportes, sendo que os mais comumente utilizados são os a base de sílica^{29,30}, os quais envolvem a funcionalização das matrizes com organosilanos, e os a base de quitosana⁹⁻¹¹ ou outros polímeros³¹.

3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O termo “imobilização de enzimas” abrange uma ampla gama de processos laboratoriais e industriais destinados a reter ou fixar uma enzima totalmente ativa em um suporte sólido insolúvel^{8,51}. Apesar de todas as vantagens em relação a utilização de enzimas, sua aplicação industrial é, muitas vezes, dificultada pela falta de estabilidade operacional a longo prazo e dificuldade de recuperação e reutilização da enzima. Estes inconvenientes podem, geralmente, ser superados pela imobilização de enzimas^{5,6,52}. Além de uma manipulação mais conveniente da enzima, essa técnica permite uma separação fácil do produto, minimizando a sua contaminação por proteínas. Além disso, a imobilização permite uma eficiente recuperação e reutilização da enzima, sendo possível sua utilização em reatores, e a realização de processos em operação contínua^{6,53}. Geralmente, a utilização de enzimas suportadas promove um aumento em sua especificidade e seletividade, além de melhorar sua estabilidade operacional, utilizando valores mais amplos de pH, em temperaturas mais elevadas e em solventes orgânicos^{8,53}.

As propriedades das enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades tanto da enzima quanto do material do suporte. As interações entre esses dois componentes fornece

um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas⁵⁴. O bom desempenho da enzima imobilizada depende em grande parte da escolha do suporte. Suas propriedades físicas, químicas e morfológicas devem ser avaliadas. O suporte deve ser quimicamente resistente frente as condições de ativação, durante a imobilização e nas condições em que se processa a reação. Além disso, sua resistência mecânica deve permitir o uso de filtração, centrifugação e agitação, operações requeridas em muitos processos. Outro fator avaliado na otimização de um tipo de suporte para uma aplicação específica deve ser a natureza catalítica da enzima e o tipo de reator utilizado⁵³.

Basicamente, os métodos de imobilização de enzimas estão divididos nas categorias: encapsulamento, *crosslinking*, adsorção e ligação covalente (Figura 3).

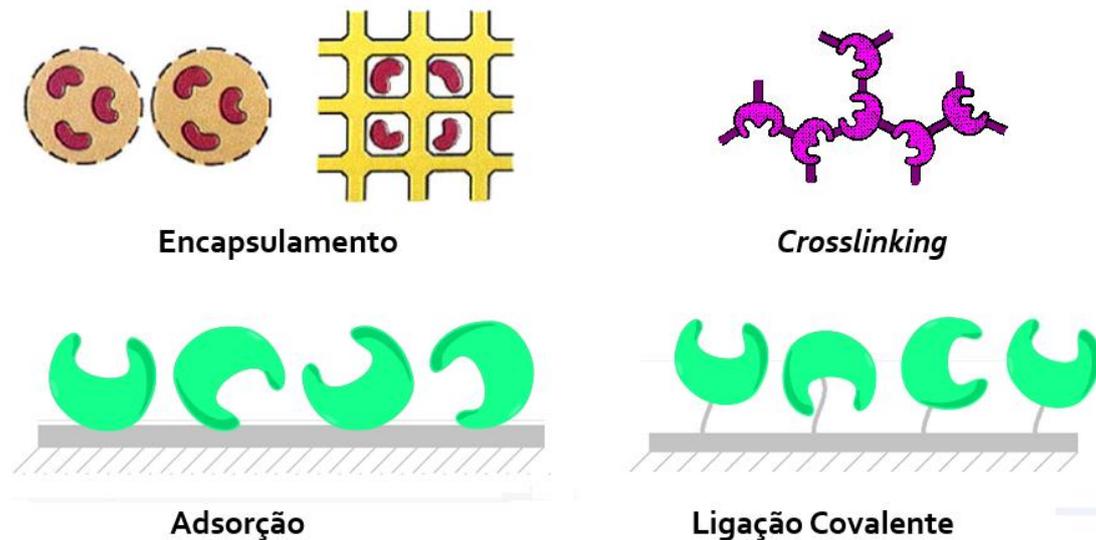


Figura 3. Representação dos diferentes métodos de imobilização de enzimas (adaptado das referências 55 e 56).

3.2.1. Encapsulamento

O método de imobilização por encapsulamento não envolve a ligação química entre o suporte e a enzima, não ocorrendo sua modificação química. Essa técnica se dá pela inclusão de uma enzima na rede tridimensional de uma matriz polimérica insolúvel na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas^{5,8}. A preparação desse tipo de suporte pode ser

realizada pela formação de uma estrutura porosa na presença da enzima ou pela sua retenção por uma membrana porosa⁵³.

A principal vantagem do encapsulamento de enzimas inclui sua grande área superficial específica para contato entre substrato e enzima e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas. Como desvantagens se tem a possibilidade de inativação da enzima durante o processo de imobilização, a possibilidade de lixiviação da enzima do interior do suporte e as barreiras difusionais⁵³.

3.2.2. Crosslinking

A imobilização de enzimas por *crosslinking* (também chamada de ligação cruzada de agregados de enzimas (CLEAs) ou entrecruzamento) se dá pela formação de ligações covalentes entre moléculas de proteínas utilizando reagentes bifuncionais, evitando a utilização de um suporte. A natureza covalente da interação reflete no aumento da estabilidade operacional e na minimização de perdas de massa por lixiviação. Por outro lado, a modificação química da superfície da enzima pode diminuir a atividade enzimática devido a possível obstrução dos sítios ativos, além de apresentar uma baixa resistência mecânica^{5,8}.

3.2.3. Adsorção

A imobilização de enzimas por adsorção física em suportes é um método bastante utilizado e simplificado. São forças intermoleculares fracas de Van der Waals que irão assegurar a fixação da enzima na superfície do material transportados. As propriedades da enzima podem ser manipuladas pela variação das condições de imobilização^{5,8,35}.

A vantagem dessa técnica é que não existe a necessidade de modificação química da enzima e não requer a funcionalização do suporte. Uma desvantagem significativa desse método é que a enzima tende a lixiviar do suporte, quando utilizado em meios aquosos ou quando alterados parâmetros operacionais, como pH, temperatura e força iônica, o que sugere a aplicação de enzimas fisicamente adsorvidas principalmente em ambientes hidrofóbicos³. Outra limitação desse método é a possibilidade de outras proteínas ou substâncias também

estarem adsorvidas na superfície do suporte, fazendo com que seja afetada a atividade catalítica desse sistema.

3.2.4. Ligação Covalente

A imobilização de enzimas por ligação covalente lidera as outras abordagens em relação à força de suas interações, evitando, assim, a lixiviação da proteína em meios aquosos e minimizando a contaminação do produto. Em geral, a imobilização covalente deve ser preferida quando se trabalha em soluções aquosas e quando existem fatores de desnaturação de proteína. Devido ao fato de ocorrer a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte, a flexibilidade conformacional é reduzida, impedindo a desnaturação da proteína. Apesar disso, a má orientação do sítio ativo pode afetar a interação entre a enzima e substrato, afetando a atividade catalítica^{3,8}.

Em geral, as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em qualquer meio, ao contrário das enzimas adsorvidas em suportes, que geralmente são aplicadas em solventes orgânicos ou em reagentes hidrofóbicos para evitar a lixiviação. Uma desvantagem da ligação covalente é que a enzima é quimicamente modificada e quando se torna irreversivelmente inativa, tanto enzima quanto o suporte são inutilizados^{5,8,35}.

A escolha do suporte correto para a imobilização por ligação covalente irá afetar a viabilidade para aplicações industriais, portanto deve satisfazer alguns requisitos importantes⁸:

- O suporte deve ser capaz de carregar uma quantidade significativa de enzima por unidade de massa. Para tal, a porosidade deve permanecer dentro de uma escala adequada, de modo que não cause uma queda significativa na área superficial específica.
- A hidrofobicidade da superfície deve ser minimizada, uma vez que favorece a adsorção de proteína não desejada e sua posterior desnaturação. De modo geral, o suporte deve apresentar o microambiente ideal para melhorar as características catalíticas das enzimas imobilizadas.
- A funcionalização e ativação da superfície do suporte devem apresentar grupos funcionais com o mínimo de impedimento estérico, para não haver perda de atividade catalítica pela obstrução do sítio ativo da enzima.

- Após a imobilização, o suporte deve ser totalmente inerte às condições operacionais, não interferindo com a reação desejada. Além disso, o suporte escolhido deve ser ambientalmente inofensivo e relativamente barato, minimizando o impacto econômico do processo.
- A resistência térmica e mecânica também são fatores importantes, pois permite que a enzima imobilizada seja utilizada em diferentes condições operacionais em reatores.

3.3. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

As propriedades da enzima imobilizada são governadas pelas características particulares tanto do material de suporte quanto da enzima e das condições de uso da biomolécula suportada^{4,5,57}. A interação entre ambos concede propriedades cinéticas que podem ser determinantes para a sua aplicação prática. Desse modo, a retenção da estrutura conformacional e a atividade específica da enzima são desejáveis quando a imobilização é realizada, sem que a enzima perca sua função quando entra em contato com a superfície de suporte⁵⁷. Assim, um suporte criteriosamente escolhido pode melhorar significativamente o desempenho operacional do sistema^{4,58}.

Quanto a sua morfologia, os suportes sólidos podem ser classificados em porosos e não-porosos^{6,56}.

- **Materiais porosos:** os suportes porosos apresentam como grande vantagem sua elevada área superficial específica disponível para imobilização de enzimas. Entretanto, é importante avaliar o diâmetro de poros, de modo que sejam suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. Como inconveniente, a utilização de suportes porosos apresenta problemas relacionados a limitação difusional. Ainda assim, o confinamento das enzimas no interior dos poros lhes conferem uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional^{8,56}.
- **Materiais não-porosos:** geralmente materiais com essa morfologia apresentam uma área superficial específica baixa, o que limita a área de imobilização. Apesar disso, esses materiais possuem a vantagem de as moléculas se acomodarem apenas na superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato, não apresentando

dificuldades difusionais. Para aumentar a superfície, podem ser utilizadas partículas finas, mas surgem dificuldades quando se utiliza sistemas contínuos, já que não suportam altas pressões sem compactar, nem em leitos fluidizados devido limitação pela velocidade de fluxo^{8,56}.

Quanto a sua composição química, os suportes sólidos podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos^{5,35}.

3.3.1. Suportes Orgânicos

Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, são uma classe de materiais amplamente empregados na imobilização de enzimas e podem ser classificados em naturais ou sintéticos⁵⁹. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal⁵⁹. Como exemplos encontram-se o poliestireno, os poliácridatos, os polivinílicos, o náilon, entre outros.⁵³.

Os materiais naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e podem ser facilmente degradados, não causando danos ao meio ambiente. Como exemplos podem ser citados os polissacarídeos (celulose, quitina, quitosana, amido, entre outros) e as proteínas (colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda, entre outras)^{5,35,53}.

Dentre os diferentes suportes orgânicos naturais empregados na imobilização de enzimas se destaca a quitosana¹⁰ devido a suas diferentes configurações geométricas que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização⁵⁹.

A quitosana é um biopolímero proveniente da desacetilação da quitina (Figura 4), um dos polímeros mais abundantes na natureza ao lado da celulose. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As principais fontes são carapaças de crustáceos – como caranguejo, lagosta, siri, camarão –, resíduos da indústria pesqueira e a sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado. A quitosana possui uma estrutura molecular semelhante à da celulose, diferenciando-se apenas nos grupos funcionais: grupos hidroxilas (–OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença está na presença de grupos amino (–NH₂) na sua estrutura. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico,

com a protonação do grupo amino gerando o íon NH_3^+ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais^{4,26,59}.

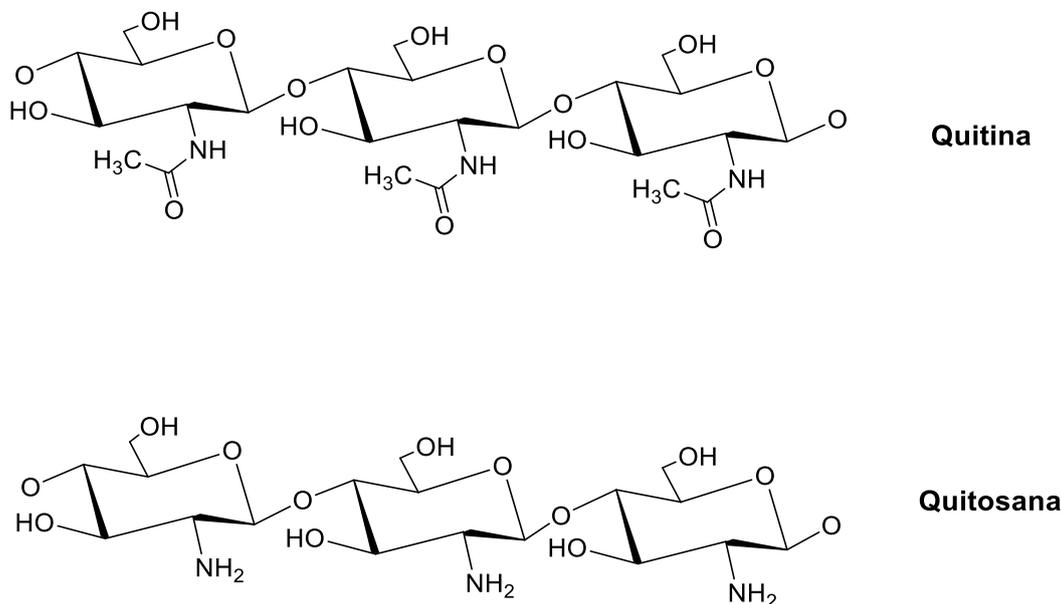


Figura 4. Representação das estruturas da quitina e quitosana.

A possibilidade de se obter diferentes configurações de quitosana – como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras, no processo de desacetilação da quitina aliado à presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, tornam a quitosana um suporte ideal para o processo de imobilização de enzimas⁴. Muitos trabalhos já abordaram a utilização da quitosana como suporte para imobilização de enzimas⁹⁻¹¹, mostrando resultados satisfatórios para aplicação em biocatálise.

Klein et al. (2013)¹¹ imobilizaram a enzima β -galactosidase em quitosana ativada com glutaraldeído. O catalisador foi utilizado em um reator de leito fixo para a hidrólise da lactose e síntese de galactooligosacarídeos. Além disso, foi testado seu pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e estabilidade operacional. A imobilização da enzima em quitosana promoveu a melhoria na amplitude de pH e temperatura de operação, além de melhorar a estabilidade térmica da enzima na presença de lactose. O catalisador também se mostrou estável quando utilizado em reator, mantendo sua atividade relativa ao longo período de ensaio.

3.3.2. Suportes Inorgânicos

Os materiais inorgânicos são os mais apropriados para a utilização industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque de microrganismos. São matérias de fácil regeneração por pirólise, e apresentam boa rigidez da matriz, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressões, temperatura e pH^{8,53}. Como exemplos de suportes inorgânicos utilizados se destacam os materiais a base de sílica e os a base de outros óxidos. Uma característica que distingue esses suportes dos orgânicos são a rigidez e porosidade. Mesmo que seja possível a obtenção de materiais orgânicos com controle de porosidade, estes são muito sensíveis a pressão e pH. Em contrapartida, a dureza típica dos suportes inorgânicos assegura a invariância de diâmetro de poro, o que garante a forma ao suporte. Comercialmente estão disponíveis suportes inorgânicos com variados diâmetro de poros. No entanto, os mais promissores são os suportes mesoporosos, com poros que variam entre 2 e 50 nm e elevada área superficial específica, pois permitem cargas mais elevadas de proteínas durante a imobilização^{5,8}.

Entre os muitos suportes inorgânicos utilizados para imobilização de enzimas, as sílicas vêm atraindo bastante atenção e podem ser propostas com diferentes parâmetros morfológicos e estruturas porosas⁶⁰. A sílica é um material sólido de fórmula química SiO₂ encontrada nas formas cristalina ou amorfa, onde cada uma destas apresenta propriedades físico-químicas intrínsecas a sua estrutura e superfície. Na maioria dos polimorfos cristalinos, um átomo de silício está ligado a quatro átomos de oxigênio e cada um dos oxigênios está ligado a dois átomos de silício, formando tetraedros regulares de SiO₄ com vértices partilhados. Portanto, consiste em uma rede infinita de pontes de siloxanos (Si–O–Si) e por grupos silanóis (Si–OH), resultado da condensação incompleta durante a polimerização^{8,61}. Assim, a superfície de uma sílica pura é composta por regiões de ligações siloxano interrompidas por sítios expondo grupos silanol, que são responsáveis pelas propriedades hidrofílicas de sílica, uma vez que podem interagir com grupos polares ou moléculas através de interações de ligações de hidrogênio. A alta flexibilidade do ângulo de Si-O-Si é a razão por trás do grande número de materiais a base de sílica, desde densas estruturas cristalinas e amorfas (quartzo e vidro) até sistemas porosos (aerogéis), microporosos (zeólitas) e materiais mesoporosos⁶¹.

Normalmente, um suporte para imobilização de enzimas deve ser quimicamente inerte, de outro modo pode reagir com água ou substratos. No entanto, um suporte ideal deve ser reativo suficiente para ser quimicamente modificado e permitir a imobilização de proteínas⁸.

Uma característica interessante das matrizes de sílica é a possibilidade de modificação de sua superfície. Os grupos silanóis superficiais podem ser modificados pela inserção de grupos funcionais, possibilitando sua posterior reação com proteínas^{8,53,61}. Essa funcionalização pode ser realizada por reações de enxerto (ou *grafting*) e consiste no ataque nucleofílico de um grupo silanol do suporte ao átomo de silício do organosilano. Nos suportes a base de sílica, surgem novas ligações de siloxanos ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{R}$), unindo a matriz e o silano, enquanto são eliminados etanol ou metanol^{8,62}.

Levando em conta suas propriedades, os suportes a base de sílica apresentam uma vasta gama de possibilidades para a imobilização. Na literatura são encontrados trabalhos descrevendo a utilização da sílica como suporte para a adsorção de enzimas na sua superfície¹⁵⁻¹⁷, como abordado por Zhang et al. (2013)¹⁵ para a utilização de nanopartículas magnéticas para a adsorção da enzima α -amilase, para o encapsulamento de enzimas^{18,19}, conforme relatado por Vila-Real et al. (2011)¹⁹ para o encapsulamento das enzimas α -ramnosidase e β -glucosidase em matrizes de sílica contendo diferentes líquidos iônicos e para a imobilização covalente de enzimas em superfícies funcionalizadas¹²⁻¹⁴, como abordado por Matte et al. (2012)¹³ na imobilização da enzima ciclodextrina glicosiltransferase covalentemente na superfície de uma matriz de sílica organofuncionalizada com APTMS.

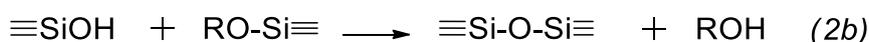
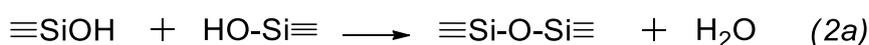
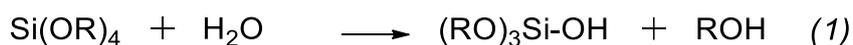
Em suma, é da estrutura da sílica que provém propriedades como estabilidade térmica e resistência mecânica, além da possibilidade de modificação da superfície com grupos funcionais. Isso permite que esses materiais sejam bastante utilizados como uma matriz inerte e estável com elevado potencial para aplicação na imobilização de enzimas^{63,64}. À vista disso, uma forma de controlar as propriedades da sílica é através do método sol-gel de síntese, o qual permite a obtenção de materiais com área superficial específica e porosidade controladas^{27,65}.

3.4. MÉTODO SOL-GEL

O interesse no processamento de materiais cerâmicos e vítreos pelo método sol-gel se iniciou em Ebelmen e Graham em seus estudos sobre sílica gel⁶⁶. Em 1846, Ebelmen^{67,68} foi o primeiro a reportar a formação de um material vítreo transparente como resultado da hidrólise lenta do ortosilicato de tetraetila (TEOS) em condições ácidas^{66,69}. Em 1864, Graham⁷⁰ propôs o termo “sol-gel” (solução-gelificação), após seu estudo sobre sílica.

O método sol-gel é uma técnica amplamente utilizada em ciências de materiais devido a possibilidade de sintetizar materiais híbridos organo-inorgânicos altamente dispersos. As combinações das redes inorgânicas e orgânicas a um nível molecular facilitam a concepção de novos materiais com propriedades interessantes para diversas aplicações⁷¹. Além disso é um método livre de resíduos para a produção de polímeros híbridos de forma ecologicamente correta⁷².

O processo sol-gel aplicado na preparação dos materiais parte dos precursores moleculares e, via reações de hidrólise e condensação que ocorrem em solução, é formada uma rede polimérica. O precursor (alcóxido de silício ou sais inorgânicos) é primeiramente hidrolisado para produzir grupos silanóis reativos (Equação 1). Após, duas moléculas parcialmente hidrolisados podem se ligar numa reação de policondensação para formar uma rede reticulada sólida tridimensional de ligação siloxano [Si-O-Si] (Equação 2a e 2b)^{27,72}. As reações químicas estão representadas pelas equações abaixo:



Durante a etapa de condensação, as reações de policondensação levam a formação de um estado sol, que se caracteriza por apresentar oligômeros que formarão cadeias de dimensões coloidais e partículas primárias dispersas. A evolução desse processo forma o estado gel, apresentando conectividade entre as unidades de dimensões coloidais e originam uma rede tridimensional entrelaçada macroscopicamente observável²⁷.

O processo sol-gel é relativamente complexo e envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, etc. Tais variáveis determinam as características finais dos materiais obtidos, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto⁷³.

Como as reações de gelificação de alcóxidos de silício são bastante lentas, geralmente é necessário a utilização de catalisadores. A natureza do catalisador – ácido ou básico – influencia fortemente a cinética de reação bem como a estrutura final do gel^{27,74}.

Quando a hidrólise corre em meio ácido de Bronsted, a reação é processada pelo ataque do ácido ao oxigênio ligado ao silício (Si–OH ou Si–OR), possibilitando sua saída e facilitando o ataque nucleofílico de grupos H₂O ao silício. Nesse caso, o ataque ácido se dará preferencialmente ao oxigênio do alcóxido, que é mais abundante nas extremidades dos oligômeros, resultando em cadeias que se unem para formar géis poliméricos. Após secagem, o gel resulta em uma matriz compacta com baixo volume de poros, com tamanho geralmente menor que 2 nm de diâmetro, chamados microporos²⁷.

Quando a reação de policondensação é realizada em meio básico, inicialmente ocorre o ataque nucleofílico ao silício pelo OH⁻. O ataque irá ocorrer no silício mais ácido (Si–O–Si), que é também o mais reticulado, levando a formação de cadeias mais ramificadas e o gel tende a crescer de maneira esférica. Após a secagem, o gel resulta em uma matriz com maior porosidade que o gel polimérico, com largas frações de poros entre 2 e 50 nm de diâmetro, chamados mesoporos²⁷.

Outro catalisador bastante empregado é o ânion fluoreto e tem se mostrado como o catalisador mais eficiente para o processo de policondensação de híbridos à base de sílica. Apesar de não ser completamente compreendido o mecanismo de reação, acredita-se que, devido ao fluoreto ser um ânion muito pequeno e se difundir facilmente no sistema, o processo se inicia através de um ataque nucleofílico ao silício, coordenando-se a ele e promovendo as reações subsequentes. Os materiais obtidos com a utilização de fluoreto apresentam maior volume de poros, menor tamanho de partícula e maior área superficial²⁷.

Um parâmetro importante de síntese é a razão entre a quantidade de precursores orgânico e inorgânicos utilizados na síntese. O aumento da razão desses componentes provoca a elevação no teor orgânico do material final até atingir uma saturação, influenciando nas características morfológicas e texturais. Materiais híbridos com menor teor orgânico apresentam maior porosidade, maior área superficial específica e maior estabilidade térmica do componente orgânico²⁷.

3.4.1. Híbridos a Base de Sílica

Híbridos organo-inorgânicos são os materiais compostos por fases orgânicas e inorgânicas intimamente distribuídas em nível nanométrico ou molecular. Esses materiais são de grande interesse para aplicações comerciais, devido as suas propriedades mecânicas,

térmicas, ópticas, biológicas e hidrofílicas, que combinam a estabilidade térmica e química dos materiais cerâmicos, com a processabilidade e flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos^{71,75,76}.

Os materiais híbridos podem ser classificados de acordo com a natureza das interações existentes entre as fases orgânica (●) e inorgânica (□) (Figura 5). Os híbridos de classe I se referem a materiais que não contêm ligações químicas entre as fases orgânicas e inorgânicas, apenas interações fracas como ligação de hidrogênio, ligação de Van der Waals ou fracas forças eletrostáticas. Já os híbridos de classe II se referem a materiais nos quais uma parte dos componentes orgânicos e inorgânicos são ligados uns aos outros por fortes ligações químicas, tais como ligações iônicas ou covalentes^{27,71}.

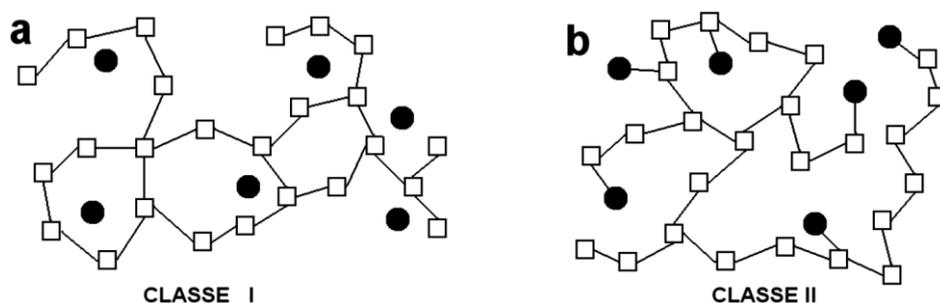


Figura 5. Representação de classes de materiais híbridos²⁷.

O processo de preparação de materiais híbridos a base de sílica envolve, além do precursor inorgânico, a adição de precursores moleculares do componente orgânico. Nesse contexto, a preparação dos híbridos de classe I envolve a adição de precursores moleculares orgânicos não polimerizáveis ou polímeros orgânicos que são solúveis ao meio no qual se obtém sílica pura, mas que não participam diretamente das reações de policondensação. Os híbridos de classe II utilizam, como precursores do componente orgânico, organossilanos polimerizáveis que apresentam um grupo orgânico ligado diretamente ao silício, em ligação Si–O não hidrolisável, como por exemplo $(RO)_3\text{--Si--R}'$, $(RO)_2\text{--Si--R}'_2$, $RO\text{--Si--R}'_3$, onde R é um grupo orgânico que pode conter diferentes grupos funcionais de interesse para serem incorporados através de ligação química à estrutura do híbrido. Esses materiais mostram uma maior estabilidade térmica do componente orgânico quando comparados aos híbridos de classe I^{27,71}.

Nessa perspectiva, a síntese de novos materiais híbridos orgânicos e inorgânicos se torna uma maneira eficaz de incorporar grupos funcionais na matriz de sílica. Desse modo, a dispersão em nível molecular de grupos orgânicos na rede de sílica durante o sol-gel, incorporam uma quantidade maior de material orgânico na matriz, além de melhorar propriedades mecânicas e controle da porosidade. Polímeros como a quitosana são capazes de formar híbridos com a sílica, apresentando uma microestrutura altamente porosa acompanhada dos grupos ($-NH_2$) presentes nas moléculas de quitosana fornecendo, assim, um ambiente hidrofílico compatível com as biomoléculas e demonstrando ser um suporte adequado para a imobilização de enzimas^{20,77}.

Na atualidade, grande parte das abordagens sobre a utilização de materiais híbridos a base de sílica e quitosana na imobilização de enzimas se refere predominantemente a fabricação de biosensores eletroquímicos^{21,22}. Usualmente, partículas de sílica gel são incorporadas à esferas de quitosana²³⁻²⁵ e aplicadas como biocatalisadores, não ocorrendo muitos relatos sobre a síntese de materiais híbridos preparados pelo método sol-gel^{20,26}.

Silva et al. (2011)²⁰ reportaram a obtenção de um híbrido a base de sílica e quitosana pelo método sol-gel, o qual apresentou uma estrutura macromolecular com partículas inorgânicas dispersas em escala nanométrica na matriz orgânica onde estão ligadas covalentemente. A superfície desse material foi modificada com epícloridrina possibilitando a imobilização da enzima lipase. Foi estudada a influência do pH, temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica. Em comparação com a enzima utilizada na forma livre, o processo de imobilização se demonstrou favorável e apresentou maior estabilidade frente a alguns parâmetros.

Embora sejam descritos na literatura alguns exemplos de materiais híbridos a base de sílica e quitosana, são encontrados poucos exemplos de aplicação de materiais híbridos obtidos pelo método sol-gel são utilizados para imobilização de enzimas. Deste modo, ainda é necessário explorar o desenvolvimento dessa classe de materiais, que podem obtidos com características planejadas para aplicação em catálise enzimática.

*Procedimento
Experimental*



4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES UTILIZADOS

Na realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: ortosilicato de tetraetila TEOS (Sigma-Aldrich, 98%), quitosana de baixa massa molecular 75-85% desacetilada (Sigma-Aldrich), etanol 99,9% (Merck), ácido clorídrico HCl (Merck, 37%), ácido fluorídrico HF (Sigma-Aldrich, 40%), ácido acético glacial (Merck), 3-aminopropiltrimetoxisilano APTMS (Sigma-Aldrich, 97%), glutaraldeído (solução aquosa 25% Sigma-Aldrich), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo *o*-NPG (Sigma-Aldrich), preparação comercial líquida de β -galactosidase do microorganismo *Kluyveromyces lactis* MAXILACT® LX-5000 (DSM Food Specialties), D(+)-lactose (Dinâmica), Glucose Liquicolor (In Vitro Diagnóstica).

4.2. SÍNTESE DOS MATERIAIS

4.2.1. Síntese dos Materiais Híbridos a Base de Sílica e Quitosana

A síntese dos materiais híbridos foi realizada pelo método sol-gel. Foram preparados dois materiais com diferentes proporções em massa de sílica e quitosana (10 e 20%).

4.2.1.1. Híbrido Sílica-Quitosana 10%

A preparação do material foi realizada em duas etapas:

Etapa 1: dissolução da quitosana

Inicialmente, 0,13 g de quitosana são dissolvidos em 1,3 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido acético glacial. Após total dissolução foram adicionados 5,0 mL de etanol. Essa solução permaneceu sob agitação até homogeneização.

Etapa 2: hidrólise do precursor inorgânico

A hidrólise do precursor inorgânico ocorreu pela adição de 5,0 mL de TEOS em um béquer contendo 5,0 mL de etanol. Após foram adicionados 0,3 mL de água destilada e 0,05 mL de HCl. Esta solução permaneceu sob agitação magnética durante 1 hora sendo, então, vertida lentamente sobre a primeira solução, permanecendo sob agitação. Posteriormente, a esta mistura foram adicionadas 10 gotas de HF. O sistema permaneceu em repouso, a temperatura ambiente, até a formação do gel. Após 15 dias, o xerogel obtido foi triturado até que passasse por uma peneira padrão série Tyler de 35 mesh e lavado com água destilada e etanol, sendo posteriormente seco a vácuo a temperatura de 90 °C por 2 horas. Este material foi denominado SiQT10.

4.2.1.2. Híbrido Sílica-Quitosana 20%

A preparação do material foi realizada em duas etapas:

Etapa 1: dissolução da quitosana

Inicialmente, 0,13 g de quitosana são dissolvidos em 1,3 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido acético glacial. Após total dissolução foram adicionados 5,0 mL de etanol. Essa solução permaneceu sob agitação até homogeneização.

Etapa 2: hidrólise do precursor inorgânico

A hidrólise do precursor inorgânico ocorreu pela adição de 2,5 mL de TEOS em um béquer contendo 2,5 mL de etanol. Após foram adicionados 0,1 mL de água destilada e 0,05 mL de HCl. Esta solução permaneceu sob agitação magnética durante 1 hora sendo, então, vertida lentamente sobre a primeira solução, permanecendo sob agitação. Posteriormente, a esta mistura foram adicionadas 10 gotas de HF. O sistema permaneceu em repouso, a temperatura ambiente, até a formação do gel. Após 15 dias, o xerogel obtido foi triturado até que passasse por uma peneira padrão série Tyler de 35 mesh e lavado com água destilada e etanol, sendo posteriormente seco a vácuo a temperatura de 90 °C por 2 horas. Este material foi denominado SiQT20.

4.2.2. Síntese da Matriz de Sílica

A síntese da matriz de sílica foi realizada pelo método sol-gel. Inicialmente, 5,0 mL de TEOS foram adicionados em um béquer contendo 5,0 mL de etanol, após foram adicionados 0,3 mL de água destilada e 0,05 mL de HCl. Esta solução permaneceu sob agitação magnética durante 1 hora sendo, então, vertida lentamente sobre uma solução contendo 1,4 mL de água destilada, 0,8 mL de ácido acético glacial e 5,0 mL de etanol, permanecendo sob agitação. Posteriormente, a esta mistura foram adicionadas 10 gotas de HF. O sistema permaneceu em repouso, a temperatura ambiente, até a formação do gel. Após 15 dias, o xerogel obtido foi triturado até que passasse por uma peneira padrão série Tyler de 35 mesh e lavado com água destilada e etanol, sendo posteriormente seco a vácuo a temperatura de 90 °C por 2 horas.

4.2.2.1. Modificação da Superfície da Matriz de Sílica

A superfície da matriz de sílica foi modificada com 3-aminopropiltrimetoxissilano por reação de enxerto. Previamente, o material foi ativado em linha de vácuo, a 140 °C por 4 horas. A reação foi realizada utilizando 1 mmol de APTMS para cada 1 g de SiO₂. O material previamente ativado foi transferido para um balão contendo APTMS solubilizado em tolueno. O sistema permaneceu sob refluxo, em atmosfera inerte e com agitação mecânica a 65 °C durante 18 horas. Posteriormente, o material foi lavado com porções de tolueno, etanol, água destilada e éter e secos a vácuo a temperatura de 90 °C por 2 horas. Este material foi denominado SiO₂APTMS.

4.2.3. Modificação das Superfícies com Glutaraldeído

Para a modificação das superfícies dos materiais sintetizados 0,8 g de SiQT10, SiQT20 e SiO₂APTMS foram adicionados a 40 mL de uma solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Os sistemas permaneceram em contato com a solução de glutaraldeído durante 3 horas sob constante agitação. Após, os materiais foram exaustivamente lavados com água destilada e tampão fosfato e secos a vácuo por 2 horas. Os materiais foram denominados SiQT10glut, SiQT20glut e SiO₂glut.

4.2.4. Imobilização da Enzima β -galactosidase

Para a imobilização da enzima nos suportes¹⁰, foi preparada uma solução enzimática em tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 contendo MgCl₂ 1,5 mmol.L⁻¹, sendo que a carga de imobilização foi de 10 mg.g⁻¹. Assim, para 0,010 g de cada suporte (SiQT10glut, SiQT20glut e SiO₂glut) foi adicionado 1,0 mL da solução enzimática. Os materiais permaneceram em contato com essa solução durante 18 horas sob constante agitação a temperatura ambiente. Após a imobilização, os biocatalisadores foram lavados com uma solução de NaCl 1,0 mol.L⁻¹ e etilenoglicol 30% v/v, a fim de eliminar as enzimas não ligadas covalentemente. Posteriormente, os materiais foram lavados por 3 vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 contendo MgCl₂ 1,5 mmol.L⁻¹ e centrifugados a 5500.g durante 1 minuto para separar a enzima e sobrenadante. As alíquotas dos sobrenadantes de cada lavagem foram recolhidas para posterior quantificação da atividade enzimática. Os materiais foram denominados SiQT10enz, SiQT20enz e SiO₂enz.

4.3. TESTES BIOCATALÍTICOS

4.3.1. Atividade Enzimática

A atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada foi determinada medindo a liberação de *o*-nitrofenol, a partir do *o*-NPG¹⁰. A liberação de *o*-nitrofenol é medida espectrofotometricamente a 415 nm. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 μ mol de *o*-NPG, para *o*-nitrofenol por minuto, sob condições padrão de ensaio (Figura 6).

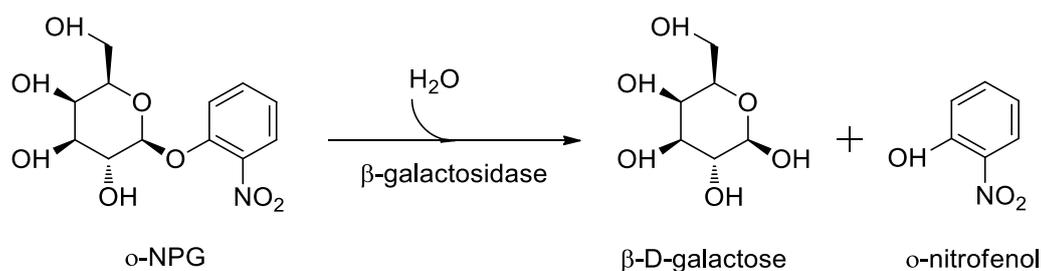


Figura 6. Representação da reação de hidrólise do *o*-NPG.

Inicialmente é realizada a análise da atividade hidrolítica da solução enzimática inicial, oferecida na etapa de imobilização da enzima nos suportes, onde são obtidos os valores para atividade aplicada. Essa análise é baseada na reação de hidrólise do *o*-NPG 30 mmol.L⁻¹ a 37 °C. Para tal, foi utilizado um volume de ensaio de 0,5 mL, contendo 270 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1,5 mmol.L⁻¹, 180 µL de *o*-NPG e 50 µL da solução enzimática. Após 2 minutos a reação é parada pela adição de 1,5 mL de tampão carbonato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 10,0. Utilizando o mesmo procedimento, após a imobilização da enzima são realizadas as análises das alíquotas retiradas das soluções resultantes das lavagens com tampão, NaCl e etilenoglicol, conforme descrito no item 4.2.4..

Para a análise da atividade hidrolítica da enzima imobilizada, 0,010 g de catalisador são misturados a 1,62 mL de tampão fosfato pH 7,0 contendo MgCl₂ 1,5 mmol.L⁻¹, sob agitação constante. A essa mistura são adicionados 1,08 mL de *o*-NPG 30 mmol.L⁻¹ e, após 30 segundos, a reação é parada pela adição de 9,0 mL de tampão carbonato de sódio pH 10,0.

Os resultados de atividade hidrolítica obtidos nesses testes, são utilizados para a determinação dos parâmetros de imobilização, conforme será descrito no item abaixo.

4.3.2. Determinação dos Parâmetros de Imobilização

Os parâmetros de imobilização, rendimento, eficiência e atividade recuperada, descritos nas equações (1,2 e 3), são calculados pela diferença entre a atividade aplicada a atividade encontrada nas frações de sobrenadante e lavagens e aquela quantificada no suporte após todas as lavagens. O rendimento de imobilização avalia quanto da atividade inicial da enzima aplicada ficou efetivamente imobilizada no suporte. A eficiência de imobilização avalia quanto desta atividade que foi imobilizada ficou realmente ativa (observada). Enquanto o outro termo utilizado para descrever o efeito da imobilização, que é a atividade recuperada, relaciona a atividade da enzima imobilizada (observada) com a atividade inicial da enzima aplicada. Esses parâmetros são calculados de acordo com as equações abaixo⁵:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{atividade enzima imobilizada}}{\text{atividade aplicada}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade enzima imobilizada}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = \frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade aplicada}} \times 100 \quad (3)$$

4.3.3. Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima livre e imobilizada¹¹ foi avaliada incubando os biocatalisadores em recipientes contendo tampão de atividade em um banho de água controlado termostaticamente a 40, 50, 60 e 70 °C. Em intervalos definidos, as amostras foram removidas do banho e resfriadas para interromper a reação de inativação térmica. As atividades residuais foram determinadas através da hidrólise do *o*-NPG, como descrito no item 4.3.1..

4.3.4. Atividade Enzimática em Diferentes Faixas de pH(s)

A estabilidade da enzima em diferentes pHs foi avaliada para a enzima solúvel e imobilizada¹¹. O procedimento se deu pela hidrólise do *o*-NPG a 37 °C, conforme descrito no item 4.3.1., utilizando tampão nos pH(s) 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0.

4.3.5. Estabilidade Operacional da β -galactosidase imobilizada

A estabilidade operacional da enzima β -galactosidase imobilizada nos suportes SiQT10enz e SiO₂enz foi determinada pela hidrólise da lactose utilizando um reator de leito fixo (Figuras 7 e 8). O reator consistiu de uma coluna de vidro com camisa de água, cada uma contendo 1,5 g do biocatalisador. O fluxo de substrato foi controlado por bomba peristáltica em 0,3 mL.min⁻¹. A coluna de leito fixo (15,0 cm x 1,0 cm) possui uma entrada na parte inferior e saída na parte superior, ambas equipadas com um disco de vidro sinterizado para reter as partículas de suporte dentro da coluna. A camisa de água na parte externa permitiu a circulação de líquido, mantendo o sistema na temperatura de 37 °C.

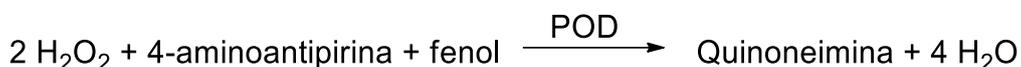
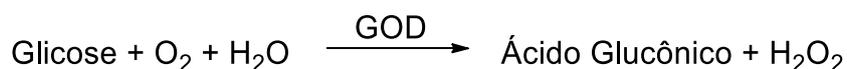


Figura 7. Fotografia do sistema contendo o reator utilizado no experimento.



Figura 8. Reatores utilizados no experimento: a esquerda reator contendo a enzima imobilizada no suporte SiQT10 e a direita a enzima imobilizada no suporte SiO₂.

Após tempos pré-determinados, uma alíquota de 10,0 µL de solução hidrolisada foi retirada e a quantidade de produto formado (glicose) foi determinada pelo método GOD-PAP (método enzimático colorimétrico sem desproteinização). O ensaio foi realizado pela mistura de 10,0 µL do produto com 1,0 mL do reagente. Após o tempo de reação, é feita a leitura espectrofotométrica a 505 nm. A glicose é determinada após a oxidação enzimática na presença de glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio formado reage sob catálise da peroxidase com fenol e 4-aminoantipirina originando a quinoneimina, reagente cromógeno vermelho-violeta, conforme reações abaixo.



4.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.4.1. Análise Elementar C, H e N

A análise elementar para quantificação dos grupos orgânicos presentes na matriz híbrida de sílica e quitosana foi realizada no equipamento CHN Perkim Elmer M CHNS/O Analyzer, modelo 2400.

4.4.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas dos materiais foram realizadas utilizando o equipamento Shimadzu Instrument modelo TGA-50 sob fluxo de argônio com velocidade de 50 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, partindo da temperatura ambiente até 800 °C.

4.4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

Os materiais SiQT10, SiQT20 e SiO₂ foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho utilizando uma cela de quartzo que permite a obtenção de espectros de amostras após tratamento térmico sob vácuo, evitando exposição ao ar. Discos dos materiais com 2,5 cm e massa de aproximadamente 100 mg foram preparados e acomodados dentro da cela. As amostras foram aquecidas até 140 °C sob vácuo (10⁻² torr) por 2 horas. Os espectros foram obtidos utilizando o equipamento equipamento Shimadzu FTIR, Prestigie 21, com resolução de 4 cm⁻¹ e 100 varreduras cumulativas.

4.4.4. Isotermas de Adsorção e Dessorção de N₂

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram obtidas utilizando o equipamento Tristar II Krypton 3020 Micromeritics, na temperatura do nitrogênio líquido (77 K). A curvas de distribuição de tamanho de poros dos materiais foi obtida pela aplicação do método BJH (Barret, Joyner e Halenda)⁷⁸. A área superficial específica dos materiais foi obtida utilizando o método BET (Brunauer, Emmett e Teller)⁷⁹.

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras do material híbrido antes e após as modificações com glutaraldeído e imobilização da enzima foram investigadas através de imagens obtidas com um microscópio eletrônico de varredura. Os materiais foram dispersos sem recobrimento em uma fita condutora dupla-face em um suporte de alumínio. O equipamento utilizado foi um Zeiss EVO MA10. Foi feita análise elementar por espectroscopia de raios X por dispersão em energia de algumas amostras.

*Resultados e
Discussões*

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

Foram preparados dois materiais híbridos chamados de SiQT10 e SiQT20, ao quais foram planejados para apresentar 10 e 20%, respectivamente, de quitosana em sua composição. As matrizes híbridas foram sintetizadas pelo método sol-gel conforme foi descrito no capítulo anterior e modificadas com glutaraldeído e com a enzima β -galactosidase. Esses materiais foram caracterizados e tiveram seu desempenho avaliado como biocatalisador para a reação de hidrólise da lactose. Adicionalmente, foi preparada uma matriz de sílica sem a adição de quitosana, chamada SiO₂, a qual foi modificada sequencialmente com APTMS, glutaraldeído e a enzima β -galactosidase. O planejamento desse material teve como o objetivo a comparação de sua eficiência catalítica com a da enzima imobilizada nos suportes híbridos. Os resultados das caracterizações estão apresentados na sequência deste trabalho.

5.1.1. Análise Elementar C, H e N

Na Tabela I são apresentados os resultados da análise elementar das amostras do híbrido a base de sílica e quitosana (SiQT10 e SiQT20).

Tabela I. Análise elementar do híbrido sílica-quitosana (SiQT10 e SiQT20).

Amostra	% C	% H	% N	Total
SiQT10	2,39	0,83	0,38	3,60
SiQT20	4,21	0,97	0,75	5,93

Através dos resultados apresentados na tabela I, é possível quantificar a proporção de quitosana incorporada ao híbrido. Foi incorporado 3,60% de quitosana no SiQT10 e 5,93% no SiQT20. A amostra SiQT20 apresentou proporcionalmente uma maior quantidade de quitosana incorporada na sua estrutura. Mesmo que tenham sido adicionados nas sínteses 10 e 20% de

quitosana, a quantidade realmente incorporada no material é menor, conforme já observado em outros trabalhos⁸⁰.

5.1.2. Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas das matrizes SiO₂, SiQT10 e SiQT20, antes e após as modificações na superfície e a imobilização da enzima β-galactosidase, são mostradas nas Figuras 9, 10 e 11. As análises foram realizadas sob fluxo de argônio e utilizando taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹, entre temperatura ambiente até 850 °C.

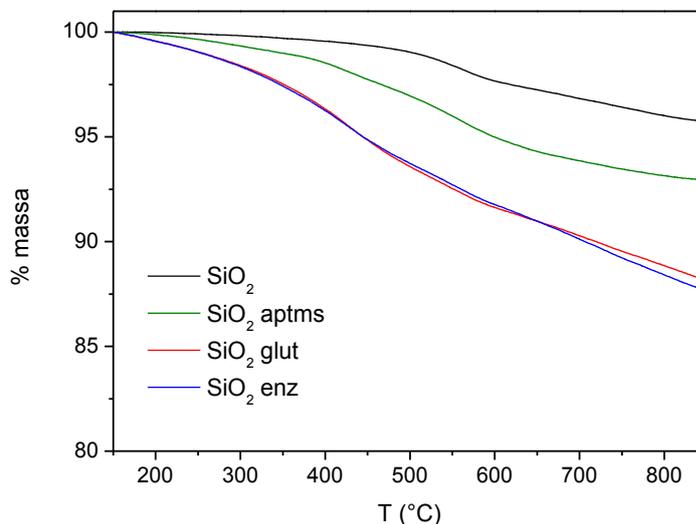


Figura 9. Curvas termogravimétricas da matriz SiO₂ antes e após as modificações.

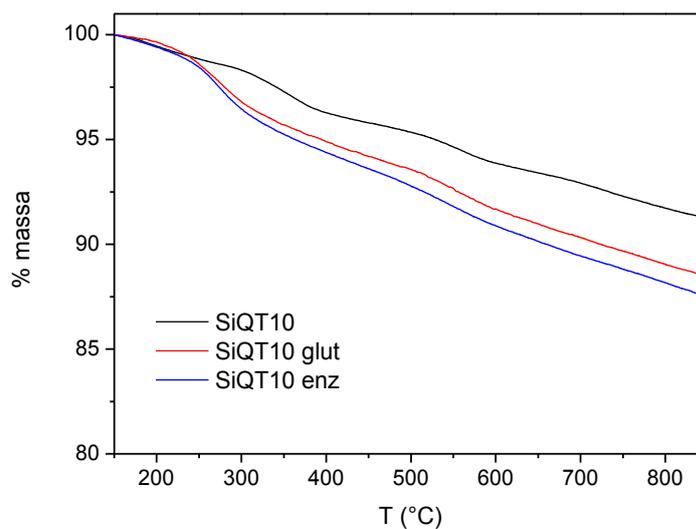


Figura 10. Curvas termogravimétricas da matriz SiQT10 antes e após as modificações.

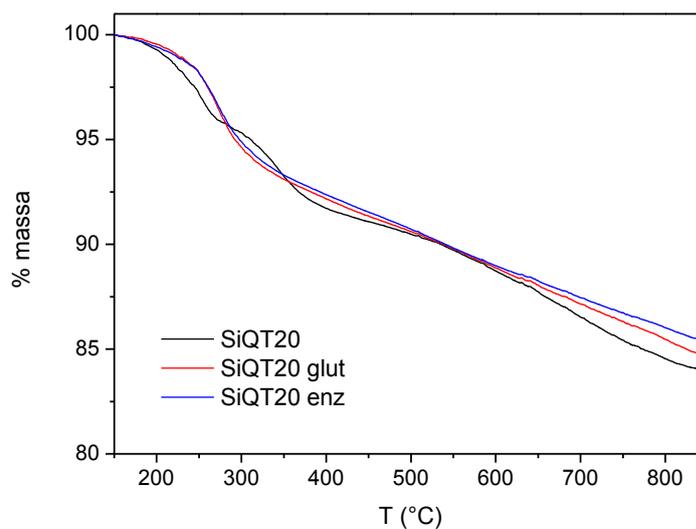


Figura 11. Curvas termogravimétricas da matriz SiQT20 antes e após as modificações.

Pela análise dos termogramas foram observadas regiões distintas de perdas de massa. A perda até 150 °C é atribuída a dessorção de água da superfície dos materiais. A perda entre 150 e 650 °C pode ser atribuída à desidroxilação dos silanóis da sílica⁸¹ bem como à dessorção e decomposição da matéria orgânica, provenientes da quitosana, da funcionalização das matrizes com APTMS, do glutaraldeído e da enzima imobilizada.

Na Tabela II é mostrada a quantificação em porcentagem da perda de massa orgânica na faixa de 0 a 850 °C.

Tabela II. Perdas de massa percentual das matrizes SiO₂, SiQT10, SiQT20 e suas modificações.

Amostra	0-150 °C (%)	150-650 °C (%)	650-850 °C (%)
SiO₂	2,18	2,68	1,21
SiO₂ aptms	0,85	5,64	1,13
SiO₂ glut	5,94	8,44	2,00
SiO₂ enz	8,51	8,21	2,35
SiQT10	4,19	6,29	1,60
SiQT10 glut	1,86	8,83	1,90
SiQT10 enz	12,37	8,57	1,73
SiQT20	3,13	11,83	3,62
SiQT20 glut	2,87	11,58	3,30
SiQT20 enz	3,09	11,32	2,80

Pela Tabela II podem ser observados os valores de perda de massa nas faixas entre temperatura ambiente - 150 °C, 150 - 650 °C e 650 – 850 °C. As análises são realizadas em fluxo de argônio contendo oxigênio atmosférico, o que provoca decomposição da matéria orgânica, oxidação parcial na forma de CO₂ e formação de carbono amorfo. Devido a isso pode ocorrer, acima de 650 °C, além da decomposição das hidroxilas, a decomposição desse carbono amorfo residual. Para comparação dos teores de material orgânico incorporado nas matrizes, será utilizada a faixa de temperatura entre 150 e 650 °C. Nessa faixa de temperatura, foi observada uma menor incorporação de material orgânico na amostra SiQT10 em relação a SiQT20. Além disso é observada para a amostra SiQT10 uma maior perda de material orgânico

nas matrizes modificadas com glutaraldeído, indicando a sua incorporação ao suporte. Na matriz SiO₂, também é verificado que a perda de massa aumenta com a sequência das modificações nas matrizes com APTMS, glutaraldeído e enzima devido ao aumento de grupos orgânicos incorporados nos materiais. Para as amostras SiO₂ e SiQT10 foi observado que proporcionalmente houve uma grande quantidade de glutaraldeído incorporado nas matrizes após as modificações, porém após a imobilização da enzima não causou maiores perdas de massa, se repetindo em outras análises termogravimétricas realizadas com os mesmos materiais. Essa tendência pode ser interpretada como um provável desprendimento de parte do glutaraldeído durante o processo de imobilização da enzima nas matrizes. Para a amostra SiQT20 não foi observado aumento na perda de massa após a modificação com glutaraldeído e imobilização da enzima. Posto que o TGA é uma técnica bastante sensível e se utiliza de quantidades de amostra muito pequenas, esse comportamento pode ser justificado pela possibilidade dessas amostras serem menos homogêneas, uma vez que a síntese da matriz foi realizada utilizando menor volume de um dos precursores, dificultando a homogeneidade do material.

Os dados da tabela anterior foram utilizados para estimar o conteúdo orgânico correspondente ao total de quitosana presente nas matrizes dos híbridos. Para isso, foi realizada a diferença entre os valores de perda de massa encontrados para os materiais híbridos (SiQT10 e SiQT20) pelo valor encontrado para a matriz de sílica (SiO₂). Os valores correspondentes estão relacionados na Tabela III.

Tabela III. Determinação do teor orgânico nas matrizes híbridas SiQT10 e SiQT20.

Amostra	Análise Termogravimétrica	Análise Elementar
SiQT10	3,61	3,60
SiQT20	9,15	5,93

Embora não tenha sido incorporada a quantidade planejada de material orgânico nas matrizes híbridas (10 e 20%), pelas análises termogravimétrica e elementar é possível comprovar que a quitosana está presente nessas matrizes. Além disso, conforme os valores

relacionados na Tabela III, a fração de material orgânico nos materiais é proporcional ao aumento de quitosana adicionada nas matrizes.

5.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos materiais SiO_2 , SiQT10 , SiQT10glut e SiQT10enz pode ser avaliada pelas imagens de elétrons secundários (Figura 12 a e b) e elétrons retroespalhados (Figura 12 c e d), obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas abaixo.

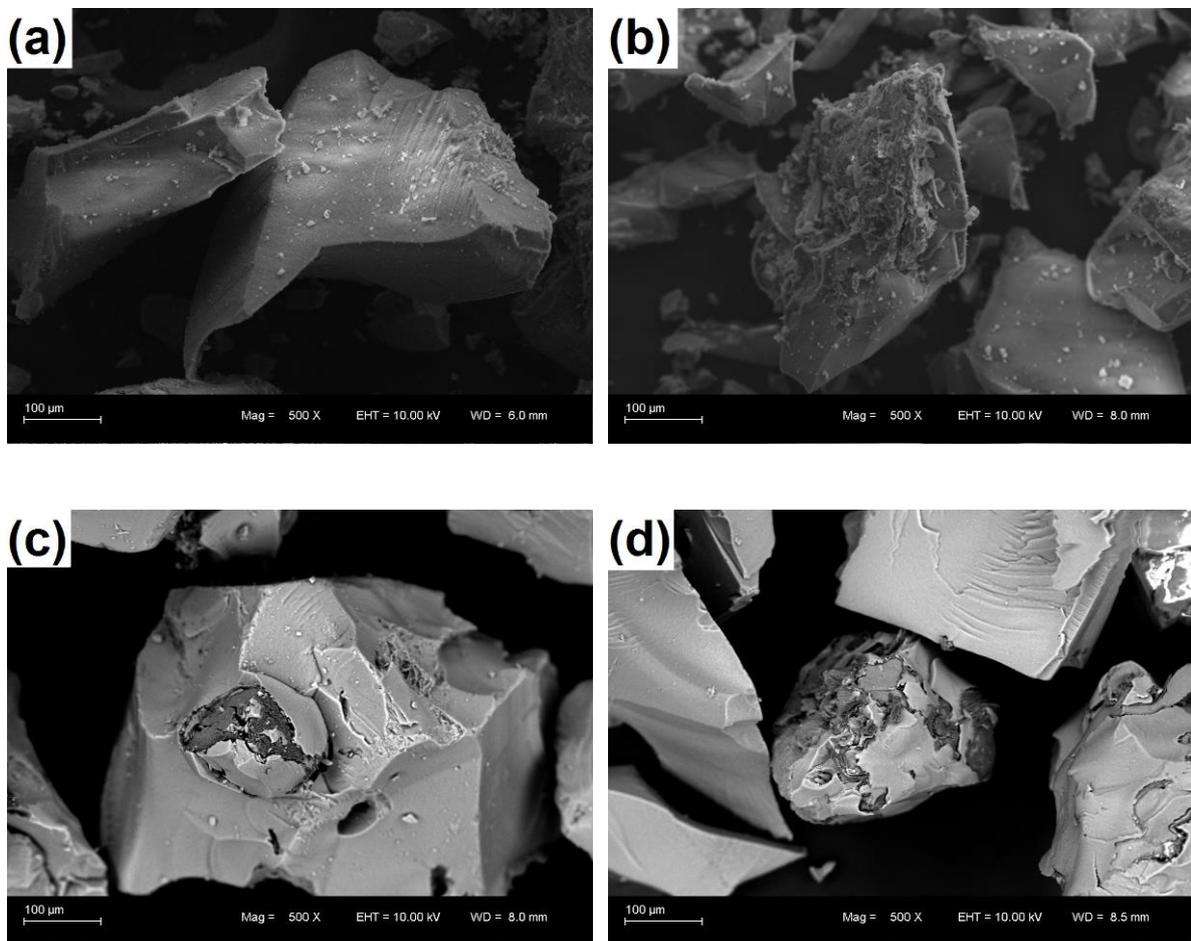


Figura 12. Micrografias obtidas por MEV das amostras (a) SiO_2 , (b) SiQT10 , (c) SiQT10glut e (d) SiQT10enz com ampliação de 500X.

Na micrografia obtida para a amostra SiO_2 (Figura 12 a), é observada uma morfologia característica de partículas micrométricas de sílica obtidas pelo método sol-gel e na Figura 12b

observa-se uma formação com morfologia diferente sobre algumas partículas de sílica que pode ser atribuída a presença da quitosana. As imagens de elétrons retroespalhados obtidas para o material híbrido estão na Figura 12 c e d, nesse tipo de imagem as substâncias formadas por elementos leves (C,N,O), aparecem mais escuras devido ao baixo poder de retroespalhamento desses átomos. Portanto se deduz que a parte mais escura corresponde a quitosana, e a parte mais clara corresponde à sílica, devido ao maior poder de retroespalhamento do silício. Observa-se também que a quitosana está dispersa em domínios micrométricos na matriz de sílica.

Na Figura 13 abaixo são apresentadas as imagens de microscopia de elétrons retroespalhados e os resultados de análise elemental de espectroscopia de raios X por dispersão em energia das amostras SiO_2 , SiQT10, SiQT10glut e SiQT10enz.

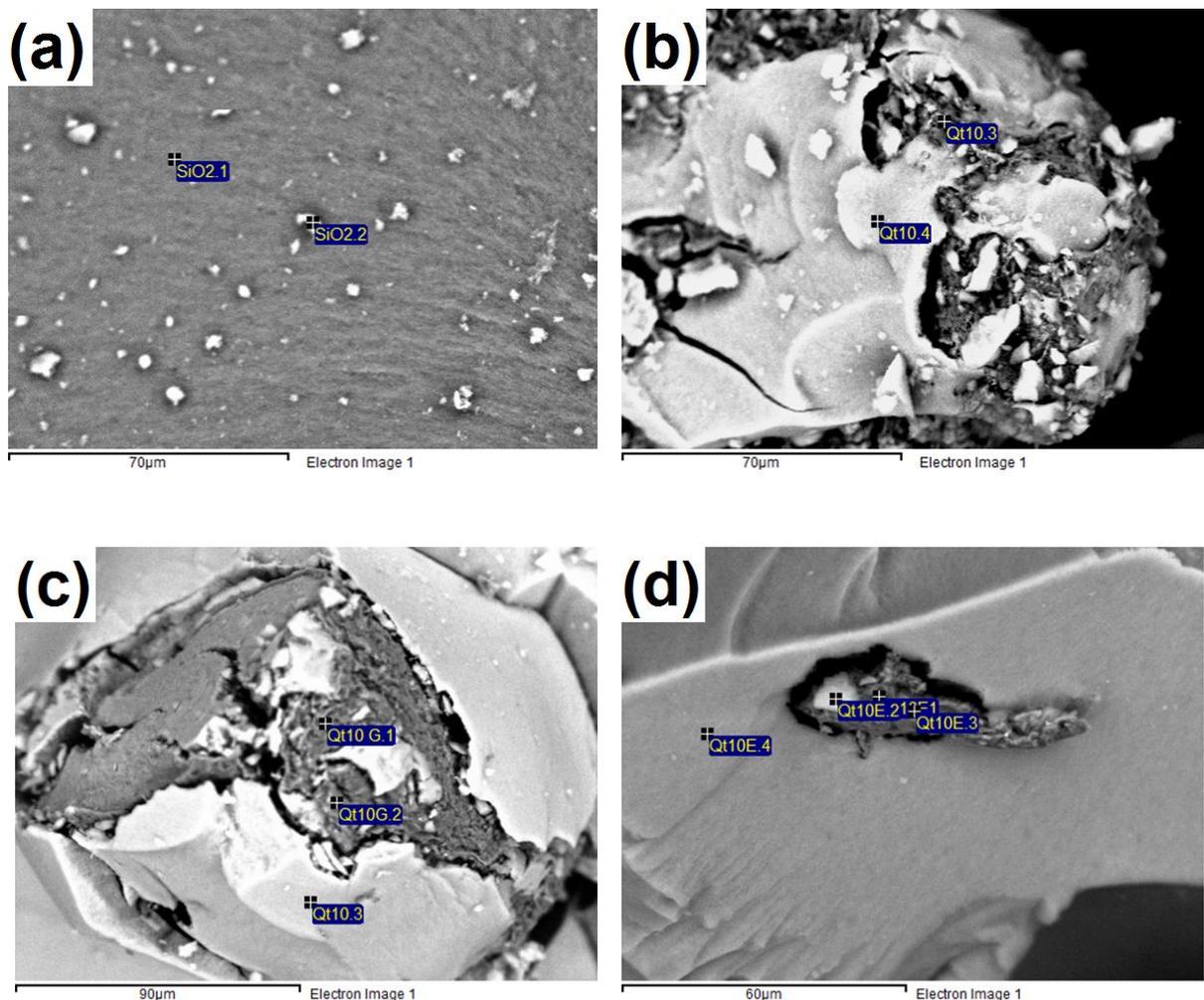


Figura 13. Micrografias obtidas por MEV das amostras (a) SiO_2 , (b) SiQT10, (c) SiQT10glut e (d) SiQT10enz.

Tabela IV. Porcentagem em massa dos principais elementos presentes na amostra.

Amostra	% C	% N	% O	% Si
SiO ₂ - 1	1,12	-	56,95	36,65
SiO ₂ - 2	0,92	-	56,97	37,31
SiQT10 - 3	40,18	9,58	20,84	8,52
SiQT10 - 4	4,34	0,22	18,24	76,65
SiQT10glut - 1	60,31	6,50	19,12	9,53
SiQT10glut - 2	56,67	10,09	23,51	2,73
SiQT10glut - 3	4,23	0,25	20,73	74,21
SiQT10enz - 1	19,57	1,86	46,96	24,62
SiQT10enz - 2	49,06	8,36	30,40	5,41
SiQT10enz - 3	33,99	5,48	34,15	10,63
SiQT10enz - 4	0,91	0,50	45,58	50,56

Na Tabela IV são apresentadas as porcentagens em massa dos principais elementos presentes nas amostras. Na amostra contendo apenas sílica (Figura 13 a), os dois pontos analisados (SiO₂ 1 e SiO₂ 2) apresentam a mesma porcentagem de silício em sua composição. Nas amostras contendo quitosana, indicadas no ponto mais escuro da Figura 13 b por SiQT10 3, é observada a presença de nitrogênio e maior quantidade de carbono em relação ao ponto SiQT10 4, localizado numa região mais clara da figura, que corresponderia a apenas sílica. Esse comportamento também é observado nas amostras SiQT10glut (Figura 13 c) e SiQT10enz (Figura 13 d), onde os pontos analisados nas áreas mais escuras correspondem a quitosana, glutaraldeído e enzima, apresentando maiores porcentagens de carbono e nitrogênio, e os pontos analisados nas áreas mais claras correspondem a regiões contendo apenas sílica, apresentando maiores porcentagens de silício e menores de nitrogênio e carbono.

5.1.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 14 mostra os espectros na região do infravermelho, obtidos na temperatura ambiente, de algumas amostras previamente tratadas a 200 °C, sob vácuo.

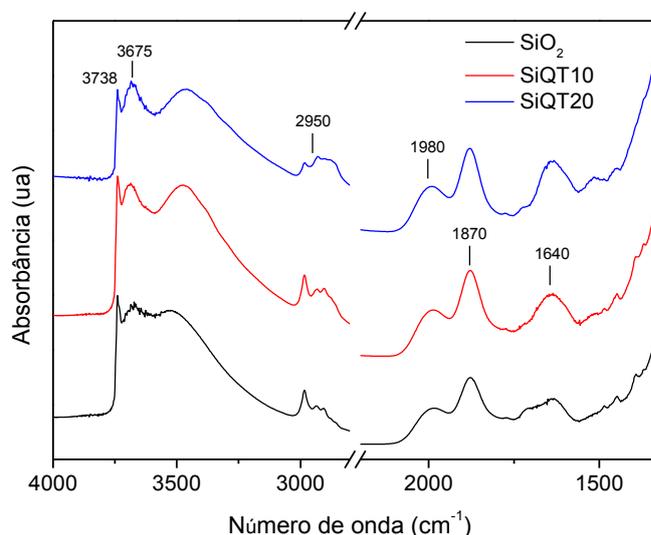


Figura 14. Espectros na região do infravermelho obtidos na temperatura ambiente das amostras SiO₂, SiQT10, SiQT20.

Os espectros apresentados na Figura 14 são típicos de sílica. As bandas em 1640, 1870 e 1980 cm⁻¹ correspondem aos *overtones* de sílica⁸¹. Em 3738 cm⁻¹ é observada uma banda definida, indicando a presença de grupos silanóis livres enquanto que em 3675 cm⁻¹ é observada uma banda mais larga, correspondente ao silanol formado em ponte ou interagindo com outras espécies adsorvidas na superfície^{82,83}. As bandas entre 2980 e 2850 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento C-H, apresentando um pequeno aumento na área com a incorporação da quitosana no material⁸⁴. A banda larga acima de 3500 cm⁻¹ corresponde a absorção de estiramento O-H do grupo silanol (-SiOH). Para os materiais SiQT10 e SiQT20 é observado um desvio dessa banda para menores números de onda, que pode ser atribuído à presença de grupos -NH₂ da quitosana. A análise por espectroscopia na região do infravermelho dos materiais híbridos SiQT10 e SiQT20 revelou a incorporação da quitosana na matriz de sílica, porém não confirmou se houve ligação química entre os dois componentes⁸⁰.

5.1.5. Isotermas de Adsorção e Dessorção de N₂

As propriedades texturais dos materiais foram investigadas através de isotermas de adsorção e dessorção de N₂, obtidas na temperatura de ebulição do nitrogênio líquido (77 K). A Figura 15 mostra as isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poros obtidas pelo método BJH para as três matrizes sintetizadas (SiO₂, SiQT10 e SiQT20).

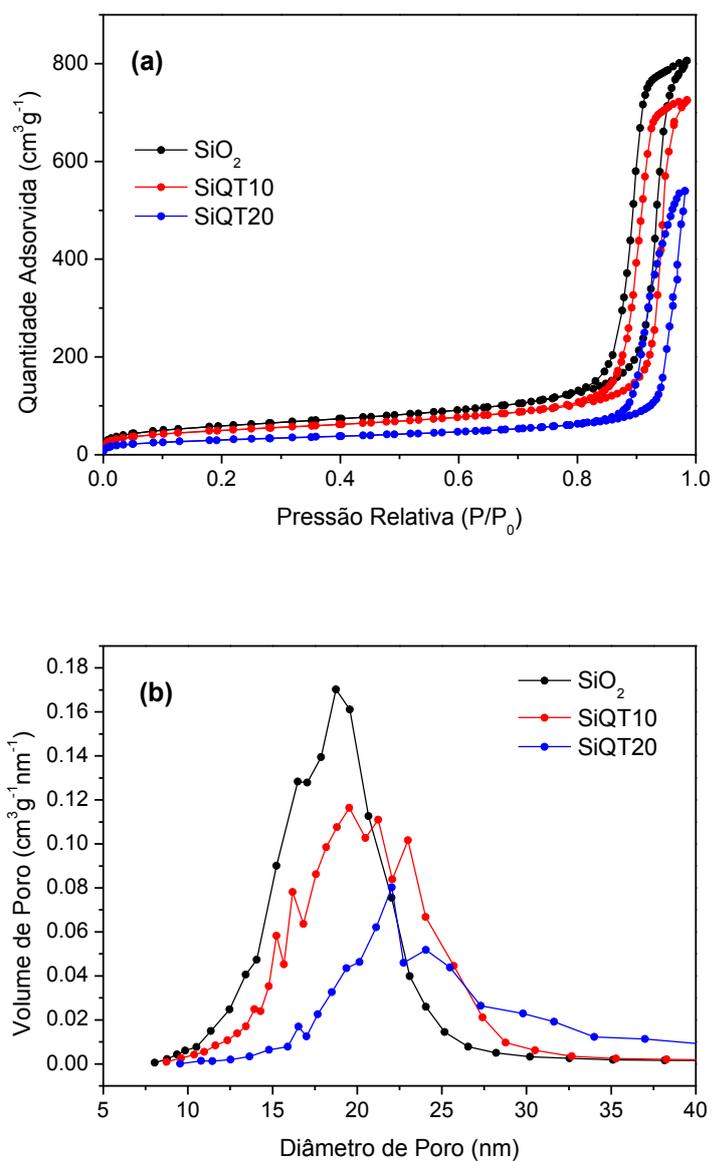


Figura 15. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiO₂, SiQT10 e SiQT20.

As isotermas das matrizes apresentadas na Figura 15a são classificadas como tipo IV⁸⁵, características de materiais mesoporosos, pois adsorvem em altas pressões relativas de N₂ indicando a presença de poros maiores para serem preenchidos com N₂. A isoterma da matriz híbrida SiQT20 mostra adsorção do N₂ em pressões relativas mais altas quando comparadas às outras matrizes, indicativo da presença de poros com tamanhos maiores. Além disso, é observado que para os materiais SiO₂ e SiQT10, sintetizados com a mesma proporção do componente inorgânico, a adição de quitosana implicou uma redução no volume de N₂ adsorvido por grama de material e a diminuição da área superficial específica das matrizes, de 206 m².g⁻¹ para 174 m².g⁻¹, bem como para o volume de poros, de 1,25 cm³.g⁻¹ para 1,11 cm³.g⁻¹. A redução de área superficial específica observada para o material SiQT20 pode ser atribuída à diferença na proporção de material inorgânico utilizado na síntese. As curvas de distribuição de tamanho de poros (Figura 15b) das matrizes SiO₂, SIQT10 e SiQT20, obtidas pelo método BJH, indicam um perfil de distribuição de poros semelhantes. Todas as amostras se mostraram mesoporosas com uma distribuição de poros com máximos em 18, 20 e 22 nm, respectivamente. Os resultados de área superficial específica (A_{BET}) e volume de poros (V_P) das amostras das amostras detalhados na Tabela V.

Tabela V. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiO₂, SiQT10 e SiQT20.

Amostra	A_{BET} (± 10 m².g⁻¹)	V_P (± 0,05 cm³.g⁻¹)
SiO₂	206	1,25
SiQT10	174	1,11
SiQT20	107	0,83

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poros obtidas pelo método BJH da matriz SiO₂ antes e após as modificações estão mostradas na Figura 16.

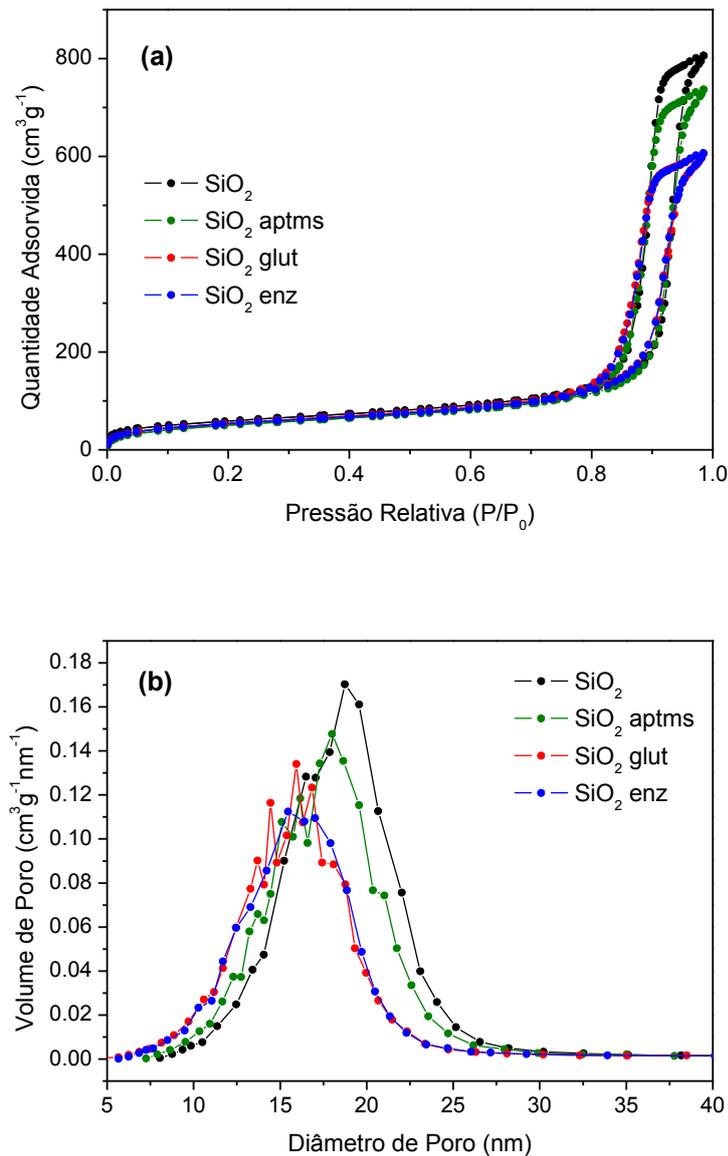


Figura 16. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiO_2 antes e após modificações.

Nas isotermas da matriz SiO_2 apresentadas na figura 16a, é observada a diminuição da quantidade de N_2 líquido adsorvida após as modificações com APTMS, provocando a diminuição do volume de poros de $1,25 \text{ cm}^3 \cdot g^{-1}$ para $1,13 \text{ cm}^3 \cdot g^{-1}$. Esse comportamento também é observado quando a matriz SiO_2 APTMS é modificada com glutaraldeído, onde o volume de poros diminui para $0,92 \text{ cm}^3 \cdot g^{-1}$. A área superficial específica da matriz SiO_2 diminui de $206 \text{ m}^2 \cdot g^{-1}$ para $184 \text{ m}^2 \cdot g^{-1}$ após a modificação com APTMS e se mantém constante dentro do erro experimental após a modificação com glutaraldeído e com a enzima. Nas curvas de distribuição

de tamanho de poros (Figura 16b) é observado o fechamento de poros de maiores diâmetros após a modificação com APTMS e glutaraldeído. A modificação da matriz SiO₂glut com a enzima β -galactosidase não produz alterações significativas nas curvas de distribuição de tamanho de poros nem nas isotermas, indicando que a enzima não está causando o fechamento dos poros.

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e a distribuição de tamanho de poros das matrizes SiQT10 e SiQT20 antes e após as modificações são mostradas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

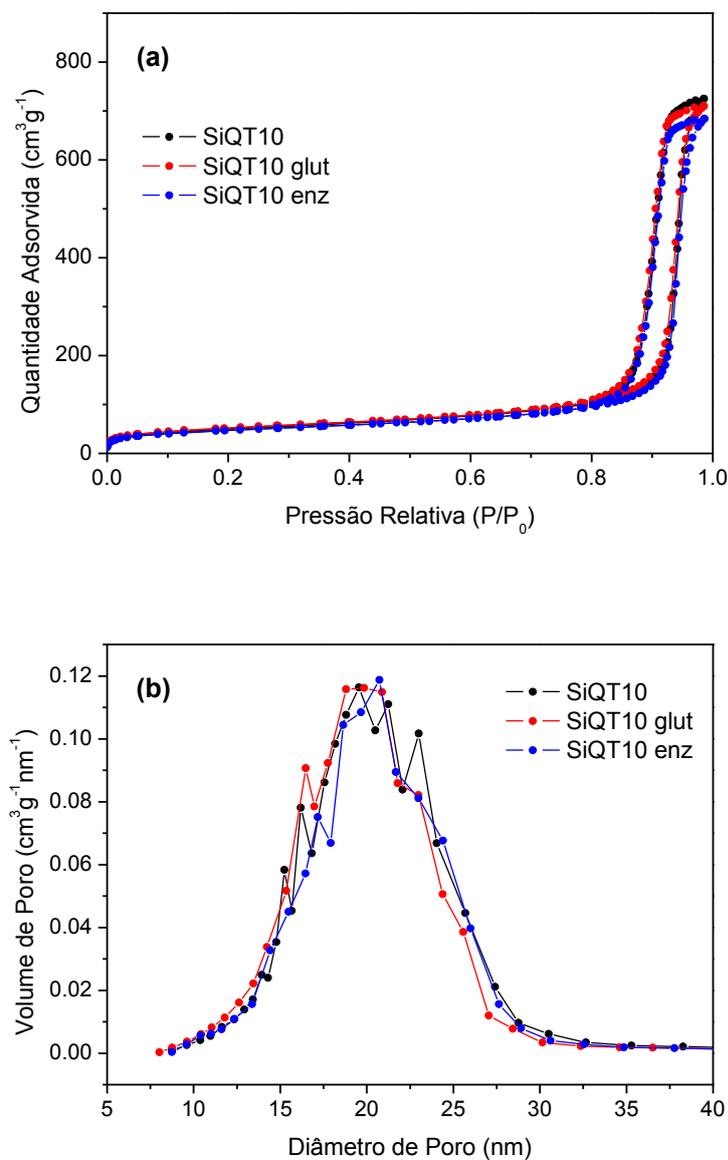


Figura 17. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT10 antes e após modificações.

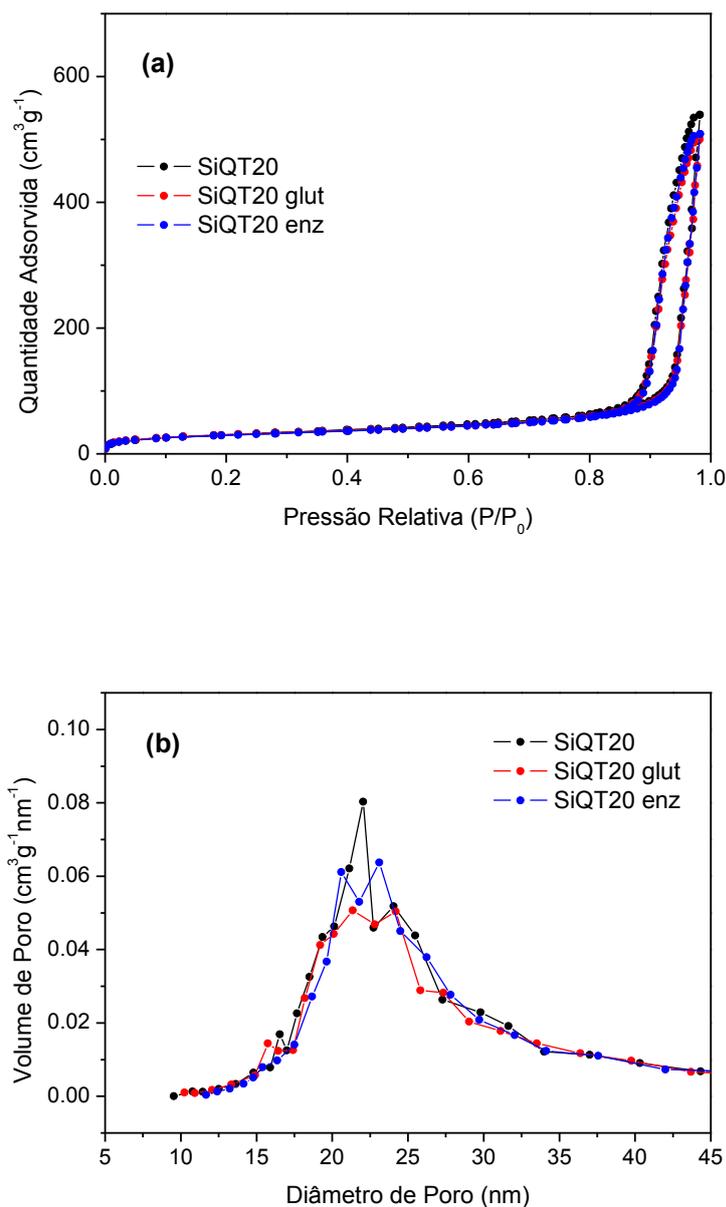


Figura 18. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT20 antes e após modificações.

As isothermas e curvas de distribuição de tamanhos de poros das amostras SiQT10 e SiQT20 (Figuras 17 e 18) apresentaram comportamento similar após as modificações com glutaraldeído e a imobilização da enzima, não sendo verificado variações significativas na superfície. As áreas superficiais específicas de 174 m².g⁻¹ e 107 m².g⁻¹, bem como o volume de poros de 1,11 cm³.g⁻¹ e 0,83 cm³.g⁻¹ das matrizes SiQT10 e SiQT20, respectivamente, permaneceram praticamente inalterados após as modificações. Esses resultados podem ser

explicados pelo fato de o glutaraldeído e enzima não reagirem com a matriz de sílica, que é o componente responsável pela existência dos poros. Como sílica e quitosana estão presentes em fases micrométricas separadas, conforme observado pela análise de MEV, a reação do glutaraldeído ocorre apenas com a quitosana, que é a parte não porosa do material. Os resultados de área superficial específica (A_{BET}) e volume de poros (V_P) das amostras das amostras antes e após as modificações na superfície e imobilização da enzima estão detalhados na Tabela VI.

Tabela VI. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiO₂, SiQT10 e SiQT20 antes e após as modificações

Amostra	A_{BET} ($\pm 10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	V_P ($\pm 0,05 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
SiO₂	206	1,25
SiO₂ aptms	184	1,13
SiO₂ glut	194	0,92
SiO₂ enz	190	0,92
SiQT10	174	1,11
SiQT10 glut	180	1,09
SiQT10 enz	163	1,05
SiQT20	107	0,83
SiQT20 glut	104	0,77
SiQT20 enz	102	0,79

Com a finalidade de compreender a estrutura do material híbrido proposto, as matrizes SiQT10 e SiQT20 foram calcinadas a 450 °C por 1 hora em atmosfera ambiente de modo a eliminar toda matéria orgânica e proporcionar ou não a formação de poros. As isotermas e as curvas de distribuição de tamanhos de poros estão mostradas nas Figuras 19 e 20.

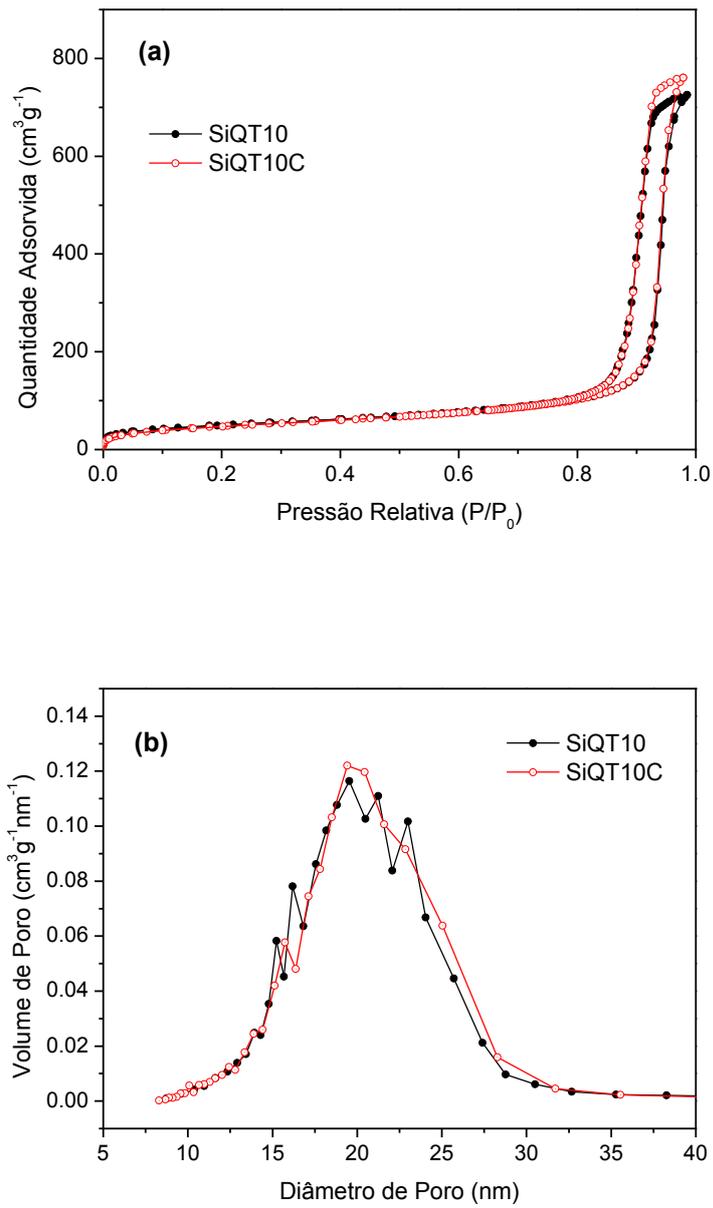


Figura 19. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT10 antes e após calcinação.

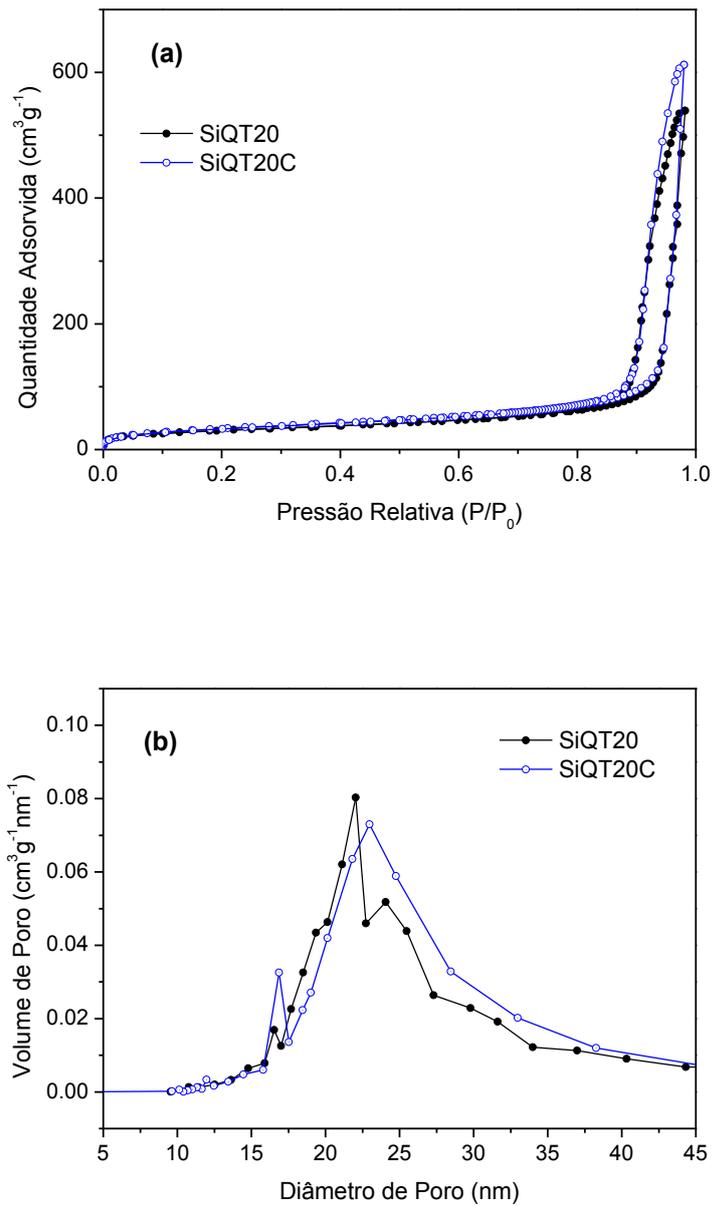


Figura 20. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SiQT20 antes e após calcinação.

As isothermas de adsorção e dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poros não apresentaram variações após a calcinação das amostras, o mesmo foi observado para os valores de área superficial específica e volume de poros, apresentados na Tabela VII. Com os resultados é possível observar que a eliminação da quitosana não está gerando mesoporos no material, indicando que este componente não está disperso em nível nanométrico na matriz de sílica.

Tabela VII. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiQT10 e SiQT20 antes e após calcinação.

Amostra	A _{BET} (± 10 m ² .g ⁻¹)	V _P (± 0,05 cm ³ .g ⁻¹)
SiQT10	174	1,11
SiQT10 C	171	1,17
SiQT20	107	0,83
SiQT20 C	120	0,94

5.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS SUPORTES PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

5.2.1. Ensaio de Atividade Enzimática

Conforme proposto, foram preparados três diferentes materiais os quais foram utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Como modelo foi escolhida a enzima β-galactosidase. Na Tabela VIII são apresentadas os parâmetros relativos ao processo de imobilização.

Tabela VIII. Comparação entre os parâmetros de imobilização da β-galactosidase nos diferentes suportes a base de sílica (SiQT10enz, SiQT20enz e SiO₂enz)

Amostra	Atividade (U/g)	Atividade Recuperada (%)	Rendimento (%)	Eficiência (%)
SiQT10enz	851	33	53	62
SiQT20enz	686	26	54	47
SiO ₂ enz	736	36	97	37

A enzima imobilizada na sílica organofuncionalizada apresentou maiores valores de rendimento de imobilização (97%), porém apresentou baixa eficiência (37%) indicando que grande parte da enzima imobilizada perdeu atividade, enquanto que os dois suportes contendo quitosana apresentaram uma maior eficiência em reter a enzima funcional. As atividades recuperadas da enzima imobilizada nos suportes SiQT10enz (33%) e SiO₂enz (36%) apresentaram aproximadamente os mesmos valores os quais foram superiores à imobilizada no suporte SiQT20enz (26%). Além disso, a enzima imobilizada no suporte contendo 10% de quitosana apresentou os maiores valores de eficiência (62%) e, também, uma maior atividade final por grama de suporte (851 U), demonstrando que o suporte híbrido (sílica/quitosana), nesta proporção, apresenta um bom potencial como suporte para imobilização de enzimas.

Esse comportamento vai ao encontro dos resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que a quitosana se encontra dispersa em nível micrométrico e em parte oclusa, sendo que apenas a área referente à quitosana está disponível para interação com a enzima uma vez que a sílica presente nesse material não forma ligações com a enzima. Isso justifica os resultados de maior rendimento de imobilização obtidos para o suporte de sílica organofuncionalizada em relação aos suportes híbridos. Em contrapartida a enzima imobilizada na quitosana se mostrou mais ativa, mesmo apresentando menores valores de rendimento de imobilização. Esse fato pode ser explicado pela distância existente entre as regiões micrométricas de quitosana, os quais deixaram a enzima imobilizada nos suportes híbridos mais acessível ao substrato do que quando imobilizada no suporte de sílica organofuncionalizada. Quando uma maior quantidade de enzima é imobilizada no suporte, muitas vezes não apresentam atividade devido ao seu sítio ativo não estar disponível para a reação com substratos.

5.2.2. Avaliação da Estabilidade Térmica e da Atividade da Enzima β -galactosidase em Diferentes pH(s)

Embora a temperatura e o pH ótimo para a atividade β -galactosidase já sejam conhecidos, a imobilização da enzima pode provocar variações nestes parâmetros. Em particular, a quitosana, usada como suporte de imobilização, tem apresentado modificações significativas principalmente ampliando a faixa de pH de ação e proporcionando aumento de

estabilidade térmica^{10,11,86-88}. Assim, primeiramente, foi avaliada a influência do pH na atividade hidrolítica dos biocatalisadores.

O efeito do pH sobre a atividade relativa da enzima β -galactosidase livre e imobilizada nos suportes SiQT10enz, SiQT20enz e SiO₂enz foi avaliado para a faixa de pH entre 5,5 e 8,0 e os resultados estão apresentados na Figura 21.

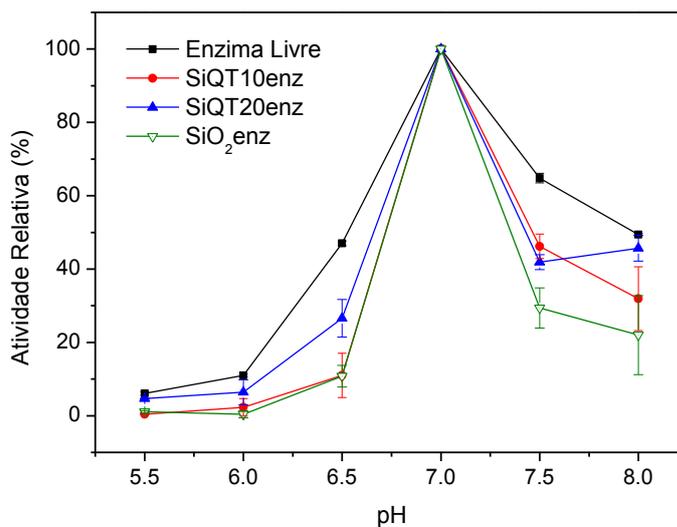


Figura 21. Influência do pH na atividade hidrolítica da β -galactosidase a 37 °C.

Como pode ser observado, nem a imobilização nem a adição de quitosana no suporte proporcionaram melhorias na amplitude dos valores de atividade relativa. A atividade, tanto para a enzima solúvel quanto para a imobilizada nos suportes apresentou um máximo valor em pH 7,0. Para a faixa de pH estudada, a enzima livre apresentou uma amplitude um pouco maior para as atividades relativas em relação à enzima imobilizada nos diferentes suportes. Assim, a adição de quitosana à matriz de sílica não proporcionou as mesmas alterações observadas quando este polímero é utilizado isoladamente^{10,11,86-88}, ficando a atividade da β -galactosidase imobilizada com características semelhantes àsquelas da enzima utilizada na sua forma livre.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica da β -galactosidase livre e imobilizada nos diferentes suportes foi avaliado para as temperaturas 40, 50 60 e 70 °C. Os resultados desse estudo estão representados nos gráficos de atividade relativa em função do tempo, apresentados nas Figuras 22, 23, 24 e 25 abaixo.

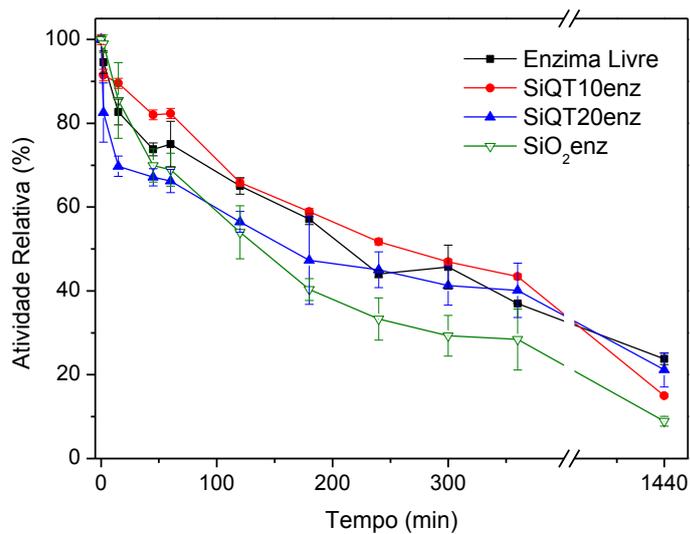


Figura 22. Estabilidade térmica à temperatura de 40 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.

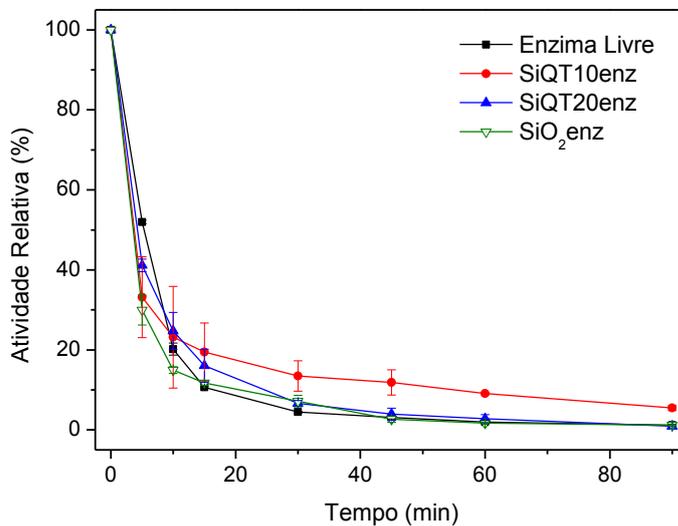


Figura 23. Estabilidade térmica à temperatura de 50 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.

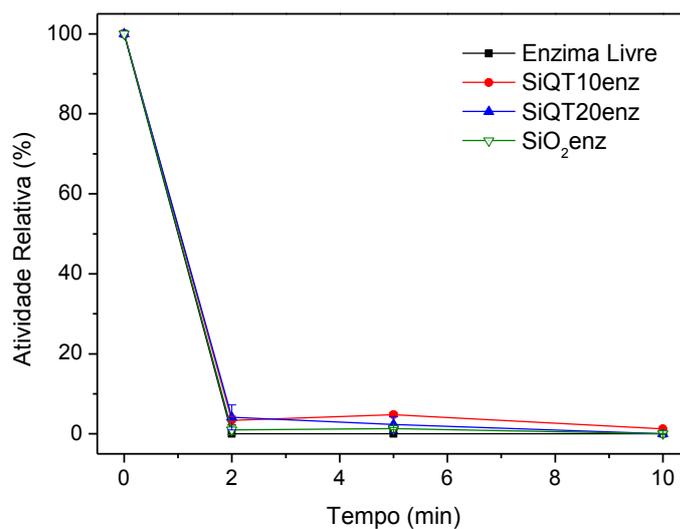


Figura 24. Estabilidade térmica à temperatura de 60 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.

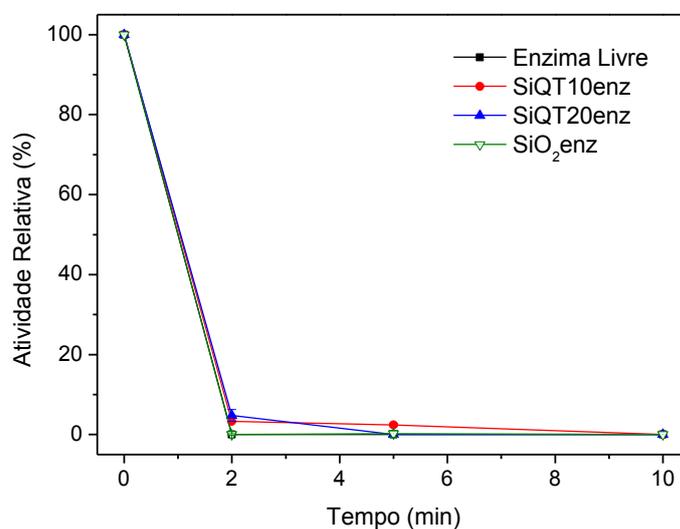


Figura 25. Estabilidade térmica à temperatura de 70 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada.

Nas temperaturas de 70 e 60 °C (Figuras 24 e 25), pode-se observar uma tendência comum à perda total de atividade relativa da enzima nos primeiros instantes de aquecimento.

Para a temperatura de 50 °C (Figura 23), a enzima imobilizada no suporte contendo 10% de quitosana (SiQT10enz) apresentou uma tendência a retenção da atividade enzimática levemente maior ao longo do tempo, ainda apresentando 7% de atividade após 90 minutos, enquanto os outros biocatalisadores perderam totalmente sua atividade em 45 minutos. Embora represente apenas uma tendência, estes resultados revelam a necessidade de mais estudos a fim de se verificar se o material híbrido pode acrescentar estabilidade térmica ao catalisador. Quando utilizada a temperatura de 40 °C (Figura 22), a enzima imobilizada no suporte SiQT10enz apresentou um decaimento da atividade relativa ao longo do tempo mais sutil quando comparado aos outros biocatalisadores. Ao final de 24 horas, de incubação, tanto a enzima livre quanto a imobilizada apresentaram uma atividade relativa de 20%. Neste caso, o fato da enzima livre apresentar estabilidade térmica semelhante a imobilizada, significa que o processo de imobilização realizado para os três materiais foi adequado, sem, no entanto, alterar as características básicas da enzima. Novamente, há que se ressaltar que os suportes com o material híbrido e com a sílica não foram capazes de atribuir modificações capazes de aumentar a estabilidade térmica do biocatalisador, como já foi observado por outros autores ^{10,11,86-88}, quando a quitosana pura foi usada como suporte.

5.2.3. Estabilidade Operacional na Hidrólise da Lactose

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise da lactose utilizando um reator de leito fixo. Por apresentar melhores resultados de atividade final por grama de suporte e de eficiência, a enzima imobilizada no material híbrido contendo 10% de quitosana foi escolhida para essa etapa. Seu desempenho foi comparado com o da enzima suportada na matriz de sílica. A Figura 26 abaixo apresenta os resultados de atividade relativa em função do tempo de funcionamento do reator.

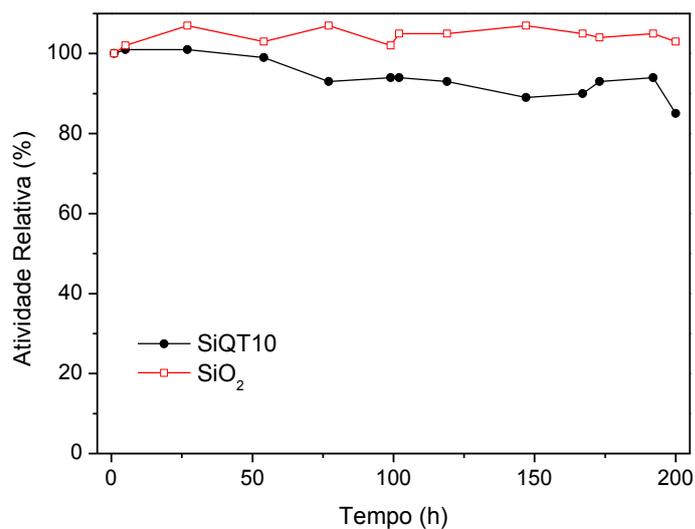


Figura 26. Estabilidade operacional em uso contínuo da enzima imobilizada, em reator de leito fixo, a 37 °C e pH 7,0.

Pode ser observado que, embora haja uma leve tendência de redução da atividade enzimática para o derivado híbrido, ambos os biocatalisadores mantiveram sua atividade hidrolítica próximo a 100% após 200 horas de funcionamento contínuo do reator. A taxa de conversão de lactose em glicose galactose foi de 14%. Esse valor pode ser melhorado, alcançando até mesmo 100% de hidrólise, pela otimização de parâmetros como o aumento do tempo de residência do substrato no reator, o qual pode ser obtido pela diminuição do fluxo de substrato ou pela utilização de uma quantidade maior de biocatalisador na coluna.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidos dois materiais híbridos a base de sílica e quitosana, sintetizados pelo método sol gel, planejadas para apresentarem 10 e 20% do componente orgânico em sua composição. As matrizes híbridas (SiQT10 e SiQT20) foram modificadas com glutaraldeído e utilizadas para imobilização da enzima β -galactosidase. Adicionalmente, com propósito comparativo, foi preparada uma matriz de sílica sem a adição de quitosana, a qual foi modificada sequencialmente com APTMS, glutaraldeído e enzima β -galactosidase. Esses materiais foram caracterizados e foram avaliados seus desempenhos como biocatalisadores para a reação hidrólise da lactose.

A incorporação de quitosana na matriz de sílica foi evidenciada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão em energia onde foi observada a presença da quitosana dispersa em nível micrométrico na sílica. A quantidade de quitosana incorporada nos materiais híbridos foi avaliada por análise elementar C, H e N e por análise termogravimétrica, indicando que o teor de quitosana aumenta com a quantidade adicionada na síntese. As curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiO₂, SIQT10 e SiQT20 mostraram a obtenção de materiais mesoporosos, com máximos em torno de 20 nm. A imobilização da enzima nos suportes, não acarretou o fechamento dos poros.

O desempenho da enzima imobilizada foi avaliado para os diferentes suportes preparados. A enzima imobilizada no suporte SiQT10 apresentou melhores valores de eficiência e maior atividade final por grama de suporte. A enzima imobilizada na sílica apresentou maiores valores de rendimento de imobilização, porém apresentou menor eficiência em relação à enzima imobilizada no suporte híbrido. Em relação à estabilidade térmica, foi observada uma tendência comum à perda total de atividade relativa ao longo do tempo em todas as temperaturas estudadas, tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada. Para a faixa de pH estudada, a enzima livre apresentou uma amplitude um pouco maior para as atividades relativas. A estabilidade operacional da enzima imobilizada em SiO₂ e SiQT10 foi avaliada pela hidrólise da lactose utilizando um reator de leito fixo. Ambos os biocatalisadores mantiveram sua atividade hidrolítica próximo a 100% após as 200 horas de funcionamento contínuo do reator.

Os resultados indicam que, mesmo que a incorporação de quitosana nos suportes tenha ocorrido em nível micrométrico e não tenha promovido uma melhoria satisfatória na estabilidade da enzima imobilizada em relação a sua forma livre, apenas mantendo o mesmo

comportamento, o suporte proposto conseguiu manter a atividade catalítica da enzima imobilizada, se apresentando tão eficiente quanto à enzima suportada na sílica. Desse modo, embora sem alterações significativas nos parâmetros catalíticos da β -galactosidase, o desenvolvimento do suporte híbrido pôde incorporar ao derivado enzimático as características já conhecidas da sílica, como sua resistência mecânica, e as características positivas da quitosana, em particular a atividade antimicrobiana, tornando este suporte uma alternativa viável e interessante para aplicação na indústria de alimentos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Ativar o suporte híbrido com 3-aminopropiltrimetóxisilano e posteriormente com glutaraldeído visando aumentar os pontos de ligação com a enzima e, conseqüentemente, o rendimento de imobilização.
- Incorporar a quitosana em nível nanométrico na matriz de sílica.
- Estudo da cinética enzimática.
- Otimizar a quantidade de enzima utilizada para a imobilização nos suportes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Clouthierzab, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605.
- (2) Wohlgenuth, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.
- (3) Hanefeld, U.; Gardossib, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453–468.
- (4) Krajewska, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126–139.
- (5) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (6) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (7) Rana, M.; Kumari, A.; Chauhan, G. S.; Chauhan, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *66*, 46–51.
- (8) Zucca, P.; Sanjust, E. *Molecules* **2014**, *19*, 14139–14194.
- (9) Biró, E.; Németh, A. S.; Sisak, C.; Feczko, T.; Gyenis, J. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70*, 1240–1246.
- (10) Klein, M. P.; Nunes, M. R.; Rodrigues, R. C.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Hertz, P. F.; Ninow, J. L. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2456–2464.
- (11) Klein, M. P.; Fallavena, L. P.; Schöffner, J. D. N.; Ayub, M. A. Z.; Rodrigues, R. C.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 465–470.
- (12) Li, Y.; Wang, X. Y.; Jiang, X. P.; Ye, J. J.; Zhang, Y. W.; Zhang, X. Y. *J. Nanoparticle Res.* **2015**, 1–12.
- (13) Matte, C. R.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Schöffner, J. da N.; Ayub, M. A. Z.; Hertz, P. F. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *78*, 51–56.
- (14) Silva, A. L. P.; Nascimento, R. G.; Arakaki, L. N. H.; Arakaki, T.; Espínola, J. G. P.; Fonseca, M. G. *J. Non. Cryst. Solids* **2013**, *376*, 139–144.
- (15) Zhang, Q.; Han, X.; Tang, B. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9924–9931.
- (16) Zheng, M.; Mao, L.; Huang, F.; Xiang, X.; Deng, Q.; Feng, Y. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 43074–43080.
- (17) Ling, D.; Gao, L.; Wang, J.; Shokouhimehr, M.; Liu, J.; Yu, Y.; Hackett, M. J.; So, P. K.; Zheng, B.; Yao, Z.; Xia, J.; Hyeon, T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 7916–7921.

- (18) Hellner, G.; Boros, Z.; Tomin, A.; Poppe, L. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2481–2491.
- (19) Vila-Real, H.; Alfaia, A. J.; Rosa, J. N.; Gois, P. M. P.; Rosa, M. E.; Calado, A. R. T.; Ribeiro, M. H. *J. Biotechnol.* **2011**, *152*, 147–158.
- (20) Silva, G. S.; Oliveira, P. C.; Giordani, D. S.; Castro, H. F. De. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1407–1417.
- (21) Kang, X.; Mai, Z.; Zou, X.; Cai, P.; Mo, J. *Talanta* **2008**, *74*, 879–886.
- (22) Peng, H.; Huang, Z.; Zheng, Y.; Chen, W.; Liu, A.; Lin, X. *J. Solid State Electrochem.* **2014**, *18*, 1941–1949.
- (23) Thirumavalavan, W. Y. M.; Lee, J. *J Membr. Biol* **2014**, *247*, 549–559.
- (24) Zhao, H.; Cui, Q.; Shah, V.; Xu, J.; Wang, T. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *126*, 18–23.
- (25) Piñuel, L.; Mazzaferro, L. S.; Breccia, J. D. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 2330–2335.
- (26) Simões, A. S.; Mori, R. Y.; Faria, R.; Castro, H. F. De; Mendes, A. A. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 33–38.
- (27) Benvenuti, E. V; Moro, C. C.; Gallas, M. R. *Quim. Nov.* **2009**, *32*, 1926–1933.
- (28) Whitehurst, R. J.; Law, B. A. *Enzymes in Food Technology*; 1 ed.; Sheffield Academic Press, 2002.
- (29) Song, Y. S.; Suh, Y. J.; Park, C.; Kim, S. W. *Korean J. Chem. Eng.* **2013**, *30*, 160–165.
- (30) Mariotti, M. P.; Yamanaka, H.; Araujo, A. R.; Trevisan, H. C. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2008**, *51*, 1233–1240.
- (31) Braga, A. R. C.; Silva, M. F.; Oliveira, J. V; Treichel, H.; Kalil, S. J. *Quim. Nov.* **2014**, *37*, 796–803.
- (32) Campbell, M. K. *Bioquímica*; 3 Ed.; Artmed Editora: Porto Alegre, 2000.
- (33) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*; 5 ed.; Artmed Editora: Porto Alegre, 2011.
- (34) Lieberman, M. A.; Marks, A.; Peet, A. *Marks' Basic Medical Biochemistry*; 4 Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2012.
- (35) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- (36) Illanes, A.; Cauerhff, A.; Wilson, L.; Castro, G. R. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 48–

57.

- (37) Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187–193.
- (38) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1–12.
- (39) Haase, G.; Jelen, P.; Ga, M. G. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 685–694.
- (40) Lomer, M. C. E.; Parkes, G. C.; Sanderson, J. D. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27*, 93–103.
- (41) Santiago, P. a.; Marquez, L. D. S.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2004**, *24*, 567–572.
- (42) Harju, M.; Kallioinen, H.; Tossavainen, O. *Int. Dairy J.* **2012**, *22*, 104–109.
- (43) Das, B.; Prasad, A.; Bhattacharjee, S.; Chakraborty, S. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *121*, 244–252.
- (44) IUBMB Enzyme Nomenclature <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/23.html> (acesado em 23 de abril de 2016).
- (45) Gosling, A.; Stevens, G. W.; Barber, A. R.; Kentish, S. E.; Gras, S. L. *Food Chem.* **2010**, *121*, 307–318.
- (46) Ansari, S. A.; Satar, R.; Chibber, S.; Khan, M. J. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *97*, 258–263.
- (47) Grosová, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. *Czech J. Food Sci.* **2008**, *26*, 1–14.
- (48) Mlichová, Z.; Rosenberg, M. *J. Food Nutr. Res.* **2006**, *45*, 47–54.
- (49) DSM Food Specialities. Maxilact® A lactase de levedura láctea – aplicações em leite e soro., 2009, 6 p.
- (50) Husain, Q.; Ahmed, S.; Alam, F.; Azam, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 37–43.
- (51) Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M. *Engenharia Enzimática*; Ed. Lidel, 2003.
- (52) Bolivar, J. M.; Eisl, I.; Nidetzky, B. *Catal. Today* **2016**, *259*, 66–80.
- (53) Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*; Interciência: Rio de Janeiro, 2008.
- (54) Tischer, W.; Kasche, V. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 326–335.

- (55) Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R. *J Chem Biol* **2013**, *6*, 185–205.
- (56) Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. D. G.; Soldi, V. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623–630.
- (57) Talbert, J. N.; Goddard, J. M. *Col Surf B* **2012**, *93*, 8–19.
- (58) Zhang, Y.; Ge, J.; Liu, Z. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 4503–4513.
- (59) Mendes, A. A.; De Oliveira, P. C.; De Castro, H. F.; Giordano, R. D. L. C. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 831–840.
- (60) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
- (61) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Ugliengo, P. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4216–4313.
- (62) Acres, R. G.; Ellis, A. V.; Alvino, J.; Lenahan, C. E.; Khodakov, D. A.; Metha, G. F.; Andersson, G. G. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 6289–6297.
- (63) Livage, J.; Coradin, T.; Roux, C. *J. Phys. Condens. Matter* **2001**, *673*, 673–691.
- (64) Coradin, T.; Allouche, J.; Boissiere, M.; Livage, J. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 219–230.
- (65) Carvalho, N. B.; Lima, Á. S.; Soares, C. M. F. *Quím. Nov.* **2015**, *38*, 399–409.
- (66) Hench, L. L.; West, J. K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33–72.
- (67) Ebelmen, M. *C. R. Acad. Sci.* **1847**, *25*, 854.
- (68) Ebelmen, M. *Ann. Chim. Phys.* **1846**, *16*, 129–166.
- (69) Dimitriev, Y.; Ivanova, Y.; Iordanova, R. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* **2008**, *43*, 181–192.
- (70) Graham, T. *J. Chem. Soc.* **1864**, *17*, 318–327.
- (71) Owens, G. J.; Singh, R. K.; Foroutan, F.; Alqaysi, M.; Han, C.; Mahapatra, C.; Kim, H. *Prog. Mater. Sci.* **2016**, *77*, 1–79.
- (72) Zhu, T.; Row, K. H. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1294.
- (73) José, N. M.; Prado, L. A. S. de A. *Quim. Nov.* **2005**, *28*, 281–288.
- (74) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M.; Pais, A. R. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6592–6620.
- (75) Cong, H.; Yu, S. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 71–80.
- (76) Portier, J.; Choy, J.; Subramanian, M. A. *Int. J. Inorg. Mater.* **2001**, *3*, 581–592.

- (77) Miao, Y.; Tan, S. N. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *437*, 87–93.
- (78) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380.
- (79) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- (80) Ramos, J. V. H.; Morawski, F. D. M.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenutti, E. V.; De Menezes, E. W.; Arenas, L. T. *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, *217*, 109–118.
- (81) Costa, T. M. H.; Gallas, M. R.; Benvenutti, E. V.; Jornada, J. A. H. *J. Non. Cryst. Solids* **1997**, *220*, 195–201.
- (82) Läufer, S. *J. Mol. Struct.* **1980**, *60*, 409–414.
- (83) McDonald, R. S. *J. Phys. Chem.* **1958**, *62*, 1168–1178.
- (84) Lee, E. J.; Shin, D. S.; Kim, H. E.; Kim, H. W.; Koh, Y. H.; Jang, J. H. *Biomaterials* **2009**, *30*, 743–750.
- (85) Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*; 2^a ed.; London, 1982.
- (86) Lorenzoni, A. S. G.; Aydos, L. F.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103*, 193–197.
- (87) Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190.
- (88) Schöffner, J. D. N.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1311–1316.