



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



Tese de Doutorado

Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes porosos de óxidos mistos de sílica/titânia contendo quitosana

NATÁLIA CARMINATTI RICARDI

Porto Alegre, outubro de 2021.

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

NATÁLIA CARMINATTI RICARDI

Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes porosos de óxidos mistos de sílica/titânia contendo quitosana

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutora em Química

Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa
Orientadora

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Co-orientador

Porto Alegre, outubro de 2021.

A presente tese foi realizada inteiramente pela aluna Natália Carminatti Ricardi, exceto nas colaborações as quais estão citadas na sessão de agradecimentos, no período de novembro de 2016 a setembro de 2021, 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 tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Química pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Carla Roberta Matte

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Profa. Dra. Jacqueline Arguello da Silva

Profa. Dra. Nadya Pesce da Silveira

“Choose Life”

(Mark Renton)

*Dedico esse trabalho,
com todo meu amor e gratidão,
aos meus pais, Marli e Jorge.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marli e Jorge, por todo amor, carinho, dedicação e suporte que sempre me proporcionaram. *Mãe*, você é meu maior exemplo de força e determinação. Muito obrigada por tudo!

À professora Tania Maria Haas Costa, minha orientadora, por toda atenção e contribuição ao longo de toda minha formação acadêmica na universidade, desde a iniciação científica. Agradeço, principalmente, à sua conduta como orientadora, sempre paciente e compreensiva, durante os dez anos que fui sua aluna. Muito obrigada por toda dedicação, sempre com entusiasmo e motivação. Tenho grande admiração e inspiração por ti, tanto como pessoa quanto professora.

Ao professor Plinho Francisco Hertz, meu co-orientador, pelo ótimo acolhimento no grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia. Muito obrigada pela dedicação e conhecimento construído ao longo da minha pós-graduação, foram anos proveitoso de muito aprendizado.

À professora Leliz Arenas, pela dedicação, interesse, entusiasmo e orientações fundamentais para a condução desse trabalho.

Ao professor Edilson Benvenuti, pelos ensinamentos e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Eliana de Menezes, pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar.

À professora Ruth Hinrichs pela colaboração na análise de EDS e pelas importantes discussões.

À amiga Monique, por sempre escutar com (talvez não) paciência meus anseios e pelos inúmeros conselhos. Agradeço por todas as confirmações de leitura e traduções já feitas e que ainda estão por vir.

Aos amigos Carlos e Douglas, por cada risada e momento de alegria vivido, pois *we are a mess we are failures and we love it!*.

Ao amigo Eli, pelo acolhimento no Laboratório de Enzimologia, disponibilidade e contribuições no trabalho. Agradeço pelas madrugadas de ginástica e *clavados*, onde nos descobrimos ótimos comentaristas esportivos e de reality.

À *Dinda Dani*, pelo incentivo e apoio que sempre me ofereceu. Obrigada por me acompanhar em cada momento da minha vida.

Aos primos Felipe, Gabriela e Jéssica, aviso que os dias de nuvem de armazenamento de arquivos estão chegando ao fim. Obrigada pelas conversas e risadas diárias já que *somos só mais alguém querendo encontrar a nossa própria estrada pra trilhar, e não é fácil viver assim*.

Aos colegas do Laboratório de Sólidos e Superfície, pelos momentos de descontração e alegria. Guardarei a rotina desses dez anos no laboratório com imenso carinho.

À UFRGS pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho e à Capes e ao CNPq pela bolsa de doutorado outorgada.

Agradeço, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e desenvolvimento deste trabalho

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

Artigo Publicado

N. C. Ricardi, L. T. Arenas, E. V. Benvenuti, R. Hinrichs, E. E. E. Flores, P. F. Hertz, T. M. H. Costa. High performance biocatalyst based on β -D-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. *Food Chemistry*, **2021**, 359, 129890.

Trabalhos publicados em eventos científicos internacionais

N. C. Ricardi, L. T. Arenas; E. V. Benvenuti, E. E. E. Flores, P. F. Hertz, T. M. H. Costa. Sol-Gel Method as a Tool for Preparing Porous Mixed Oxides for β -D-Galactosidase Immobilization. In: 7th ISGS Online Summer School on Hybrid Materials: From Basics to Cutting Edge Applications, 2020. Livro de Resumos, 2020.

N. C. Ricardi, L. T. Arenas; E. V. Benvenuti, E. E. E. Flores, P. F. Hertz, T. M. H. Costa. Silica/titania based material for enzyme immobilization. In: XVIII Brazilian MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú. Livro de Resumos, 2019.

N. C. Ricardi, E. W. Menezes, E. V. Benvenuti; J. N. Schoffer, C. R. Hackenhaar, P. F. Hertz, T. M. H. Costa. Silica/Chitosan Material For Enzyme Immobilization. In: XVI Brazilian MRS Meeting, 2017, Gramado. Livro de Resumos, 2017.

T. M. H. Costa, **N. C. Ricardi**, E. W. Menezes, P. F. Hertz, J. N. Schoffer, C. R. Hackenhaar, E. V. Benvenuti. Development of an Efficient Hybrid Silica/Chitosan Support for Enzyme Immobilization. In: 19th International Sol Gel Conference, 2017, Liege. Livro de Resumos, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	5
2.1.	OBJETIVO GERAL	5
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3.	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1.	BIOCATALISADORES	6
3.2.	LACTOSE.....	7
3.2.1.	β -D-Galactosidase	10
3.3.	Imobilização de enzimas	13
3.3.1.	Imobilização por Aprisionamento	15
3.3.2.	Reticulação de Enzimas	16
3.3.3.	Adsorção Física.....	16
3.3.4.	Ligação covalente	17
3.4.	SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	18
3.4.1.	QUITOSANA	19
3.4.2.	AGENTES DE ATIVAÇÃO	22
3.4.2.1.	Glutaraldeído	22
3.4.2.2.	Genipina	23
3.4.3.	ÓXIDOS INORGÂNICOS.....	25
3.4.3.1.	Método Sol-Gel de Síntese.....	27
3.4.4.	ÓXIDOS MISTOS RECOBERTOS COM QUITOSANA	31
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.1.	REAGENTES UTILIZADOS.....	33
4.2.	PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS	33

4.2.1.	Síntese da matriz de sílica/titânia.....	33
4.2.2.	Recobrimento do material com quitosana	34
4.2.3.	Ativação do suporte com glutaraldeído	35
4.2.4.	Ativação do suporte com genipina.....	35
4.2.5.	Imobilização da enzima β -D-galactosidase	35
4.3.	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL DESENVOLVIDO	36
4.3.1.	Análise termogravimétrica (TGA).....	36
4.3.2.	Análise elementar	36
4.3.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
4.3.4.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	37
4.3.5.	Espectroscopia na região do infravermelho.....	37
4.3.6.	Difração de raios X	37
4.4.	TESTES BIOCATALÍTICOS	38
4.4.1.	Teste de atividade enzimática	38
4.4.2.	Determinação dos parâmetros cinéticos	39
4.4.3.	Estabilidade em diferentes pH(s).....	40
4.4.4.	Estabilidade térmica.....	40
4.4.5.	Estabilidade de armazenamento.....	40
4.4.6.	Estabilidade operacional	41
4.4.7.	Análise estatística	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	43
5.1.1.	Análise Termogravimétrica	43
5.1.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura	47
5.1.3.	Análise elementar	49

5.1.4.	Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	50
5.1.5.	Espectroscopia na região do infravermelho	55
5.1.6.	Difratograma de raios X	57
5.2.	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOCATALISADORES	58
5.2.1.	Ensaio de atividade enzimática	58
5.2.2.	Determinação dos parâmetros cinéticos	60
5.2.3.	Efeito do pH na atividade enzimática	61
5.2.4.	Avaliação da estabilidade térmica	62
5.2.5.	Estabilidade de armazenamento.....	65
5.2.6.	Estabilidade operacional	66
6.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química da lactose (forma β).	8
Figura 2. Reação de hidrólise de lactose catalisada pela enzima β -D-galactosidase.....	8
Figura 3. Esquema do mecanismo de retenção da β -D-galactosidase, adaptado de Lu et al. (2020).	11
Figura 4. Representação dos métodos de imobilização de enzimas.....	15
Figura 5. Representação das estruturas químicas da quitina e quitosana, adaptado de Bakshi et al. (2020).	20
Figura 6. Representação da estrutura química do glutaraldeído.	22
Figura 7. Representação das estruturas do geniposídeo e da genipina.....	23
Figura 8. Esquema das propostas de reações da genipina com grupamentos aminos, adaptado de Butler et al. (2003).	24
Figura 9. Representação da estrutura da sílica, adaptado de Benvenuti et al. (2009).....	26
Figura 10. Representação da estrutura sugerida para a ligação química entre a matriz inorgânica e a quitosana, adaptado de El Kadib & Bousmina (2012).....	32
Figura 11. Reação de hidrólise do <i>o</i> -NPG	38
Figura 12. Fotografias do sistema contendo o reator utilizado no experimento, contendo o biocatalisador SiTi-QT15enz.	42
Figura 13. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT5 antes e após as modificações.	44
Figura 14. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT10 antes e após as modificações.	44

Figura 15. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT15 antes e após as modificações.	45
Figura 16. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi, SiTienz e SiTi-QT15gen-enz.	45
Figura 17. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi (a) ampliada 50000× e (b) ampliada 5000×.	48
Figura 18. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi-QT5 (a) ampliada 50000× e (b) ampliada 5000×.	48
Figura 19. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi-QT15 (a) ampliada 50000× e (b) ampliada 5000×.	49
Figura 20. Imagem de MEV com regiões utilizadas para análise elementar e seu respectivo espectro.	50
Figura 21. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10, SiTi-QT15 e SiTienz.	50
Figura 22. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT5glut e SiTi-QT5enz.	52
Figura 23. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT10, SiTi-QT10glut e SiTi-QT10enz.	52
Figura 24. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15enz.	53
Figura 25. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15gen e SiTi-QT15gen-enz.	54
Figura 26. Espectros na região do infravermelho das amostras SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15enz.	56
Figura 27. Difratoograma de raios X dos suportes SiTi e SiTi-QT15.	57
Figura 28. Gráfico de Lineweaver-Burk e linha de regressão linear da β-D-galactosidase livre e imobilizada.	61

Figura 29. Influência do pH na atividade hidrolítica da β -D-galactosidase a 37 °C.	62
Figura 30. Estabilidade térmica à temperatura de 40 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.	63
Figura 31. Estabilidade térmica à temperatura de 50 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.	63
Figura 32. Estabilidade térmica à temperatura de 60 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.	64
Figura 33. Estabilidade térmica à temperatura de 70 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.	64
Figura 34. Estabilidade de armazenamento da β -D-galactosidase livre e imobilizada.	66
Figura 35. Estabilidade operacional da enzima imobilizada, em reator em batelada, a 37 °C e pH 7,0.	67
Figura 36. Estabilidade operacional em uso contínuo da enzima imobilizada, em reator de leito fixo, a 37 °C e pH 7,0.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perdas de massa percentual das matrizes SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 e suas modificações.....	46
Tabela 2. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15.....	51
Tabela 3. Área superficial específica e volume de poros matrizes antes e após as modificações	53
Tabela 4. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15gen e SiTi-QT15gen-enz.....	55
Tabela 5. Parâmetros de imobilização da β -D-galactosidase nos diferentes suportes.....	58
Tabela 6. Parâmetros cinéticos da β -D-galactosidase livre e imobilizada.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A _{BET}	Área superficial específica
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
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
GOS	Galactooligossacarídeos
K _M	Constante de Michaelis-Menten
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
<i>o</i> -NPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
pH	Potencial hidrogeniônico
QT	Quitosana

TEOS	Ortossilicato de tetraetila
TIPOT	Tetraisopropóxido de titânio
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>thermogravimetry analysis</i>)
V_{\max}	Velocidade máxima da reação
V_P	Volume de poros

RESUMO

A biocatálise é uma estratégia ambientalmente sustentável na busca por metodologias alternativas e provenientes de recursos renováveis no âmbito dos processos industriais. Usualmente, as enzimas são aplicadas livres em solução, o que dificulta sua recuperação e reutilização. As técnicas de imobilização de enzimas podem superar essas desvantagens, e melhorar a estabilidade do biocatalisador em condições operacionais e de armazenamento, sendo de grande importância o desenvolvimento de suportes biocompatíveis e com propriedades mecânicas adequadas. No presente trabalho, foram desenvolvidos materiais à base de óxidos mistos de sílica/titânia obtidos pelo método sol-gel, com tamanho de poro adequado para serem aplicados como suportes para a imobilização da enzima β -D-galactosidase. Esses materiais foram recobertos com soluções contendo 5, 10 e 15% de quitosana em massa, e modificados com os agentes reticuladores, glutaraldeído ou genipina, proporcionando a ligação covalente da enzima. Para efeito de comparação, um material à base de sílica/titânia, não recoberto com quitosana e sem o uso de agentes de reticulação também foi usado como suporte para β -D-galactosidase. Os materiais preparados foram devidamente caracterizados morfológica e texturalmente. Por análise termogravimétrica, pode ser evidenciada a incorporação dos componentes orgânicos nas matrizes e a imobilização da enzima. As curvas de distribuição de diâmetro de poros das matrizes sintetizadas apresentaram máximos em torno de 30 nm, diâmetro adequado para manter a atividade enzimática. Os biocatalisadores foram aplicados em testes de atividade enzimática para avaliação dos parâmetros de imobilização, estabilidade térmica e pH ótimo de operação. Além disso, foi investigada sua estabilidade operacional através da reação de hidrólise da lactose em sistemas em batelada, retendo aproximadamente 90% da atividade catalítica inicial após 15 ciclos, e em reator de fluxo contínuo, mantendo a atividade relativa próxima a 100% após 14 dias de operação. Os biocatalisadores preparados permitiram a combinação das características positivas dos componentes utilizados, demonstrando ser uma excelente alternativa para aplicação na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Sílica/titânia, quitosana, biocatalisador, imobilização de enzimas, hidrólise da lactose.

ABSTRACT

Biocatalysis is an environmentally sustainable strategy in the search for alternative methodologies and derived from renewable resources within the scope of industrial processes. Usually, enzymes are applied free in solution, which makes their recovery and reuse difficult. Enzyme immobilization techniques can overcome these drawbacks and improve the stability of the biocatalyst under operational and storage conditions, being of great importance the development of biocompatible supports with adequate mechanical properties. The present work describes the development of materials based on mixed oxides of silica/titania, obtained by the sol-gel method, with adequate pore size to be applied as supports for β -D-galactosidase immobilization. These materials were coated with solutions containing 5, 10 and 15 wt% chitosan, and modified with the crosslinking agents, glutaraldehyde or genipin, to provide the covalent binding of the enzyme, evaluating its influence on the activity and stability of the biocatalysts. For comparison purposes, a silica/titania based material, not coated with chitosan and without the use of crosslinking agents, was also used as a support for β -D-galactosidase. The prepared materials were properly characterized morphologically and texturally. Thermogravimetric analysis showed the incorporation of organic components in the matrices and the immobilization of the enzyme. The pore diameter distribution curves of the synthesized matrices showed maximums around 30 nm, an adequate diameter to immobilize enzymes. The biocatalysts were applied in enzymatic hydrolytic activity tests to evaluate the immobilization parameters, thermal stability and optimal pH. Furthermore, its operational stability was investigated through the lactose hydrolysis reaction in batch system, retaining approximately 90% of the initial catalytic activity after 15 cycles, and continuous flow reactor systems, maintaining the relative activity close to 100% after 14 days of operation. The prepared biocatalysts allowed the combination of the positive characteristics of the components used, proving to be an excellent alternative for application in the food industry.

Keywords: Silica/titania, chitosan, biocatalyst, enzyme immobilization, lactose hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

A busca por metodologias alternativas que sejam ambientalmente sustentáveis e provenientes de recursos renováveis é de grande interesse em processos industriais. A utilização de enzimas em substituição aos catalisadores inorgânicos é uma estratégia promissora para atingir esses objetivos¹⁻³. As vantagens de utilizar enzimas como biocatalisadores vão desde a sua elevada atividade, especificidade e seletividade até sua capacidade de operar em condições brandas de temperatura, pressão e pH^{4,5}.

As enzimas são comumente utilizadas na sua forma livre, impedindo que sejam separadas do meio reacional e reutilizadas. Uma alternativa frente a essa condição é a imobilização de enzimas em suportes sólidos, que tem como consequência a recuperação do biocatalisador permitindo sua reutilização sem contaminação do produto obtido. O processo de imobilização de enzimas poderá proporcionar ao biocatalisador melhor desempenho frente à condições adversas de operação, apresentado maior estabilidade térmica e operacional⁶⁻⁸. Além disso, imobilização de enzimas em suportes sólidos possibilitará sua utilização em sistemas de operação contínua, permitindo a aplicação do biocatalisador em processos industriais^{9,10}.

O bom desempenho do biocatalisador é influenciado de forma direta tanto pelas propriedades da enzima e as condições do processo catalítico quanto pelo método de imobilização escolhido e das propriedades do suporte utilizado para a imobilização das enzimas¹¹. A contribuição entre as propriedades físico-químicas e mecânicas do suporte e as propriedades bioquímicas da enzima influencia diretamente os parâmetros de imobilização obtidos, como rendimento e eficiência, bem como a estabilidade do biocatalisador^{6,12,13}. As formas de imobilizar enzimas podem ser divididas quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima ao suporte, a qual pode estar ligada em um suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz. Assim, os métodos de imobilização estão classificados nas categorias aprisionamento, encapsulamento, *crosslinking*, adsorção física e ligação covalente¹. Dentre essas estratégias, a preferível para utilização em soluções é a ligação covalente, formada por ligações químicas entre as cadeias laterais de aminoácidos das enzimas à superfície funcionalizada de suportes orgânicos e inorgânicos. Esse método apresenta como principal benefício o potencial de aumentar a vida útil do catalisador devido à maior estabilidade da ligação, aumentando a atividade operacional da enzima imobilizada e evitando a lixiviação da proteína no meio. Entretanto, esse método pode levar a redução da

atividade catalítica da enzima imobilizada devido ao enrijecimento da estrutura tridimensional da proteína, levando a modificações estruturais. Ainda, pode ocorrer redução da mobilidade molecular e orientação não adequada do sítio ativo da enzima imobilizada, impedindo a interação entre enzima e substrato, afetando a atividade catalítica¹⁴⁻¹⁶. Nesse sentido, os suportes escolhidos tem a função de proteger a enzima contra condições adversas de reação e, assim, manter sua atividade catalítica, sem provocar efeitos negativos na estrutura da enzima. Os grupos funcionais do suporte e da enzima devem ser compatíveis, permitindo sua efetiva imobilização. Estudos ainda são necessários para minimizar os problemas envolvendo as enzimas imobilizadas e otimizar sua atividade catalítica, ampliando suas possibilidades de aplicação^{12,13}.

Cada vez mais processos industriais beneficiam-se da implementação de biocatalisadores, sendo aplicados em vários campos incluindo a indústria alimentícia, a produção de cosméticos, em medicamentos e como ferramenta de pesquisa e desenvolvimento¹⁷⁻¹⁹. Uma aplicação interessante de enzimas como biocatalisadores é na indústria de laticínios, atuando na reação de hidrólise da lactose. Tal composto apresenta características indesejáveis para a indústria de laticínios, devido à sua cristalização, resultando em produtos com textura arenosa. Além disso, a lactose está associada à contaminação do ambiente pelos resíduos de soro na indústria de queijos, devido sua alta demanda bioquímica e química de oxigênio¹⁴. A lactose também provoca distúrbios na saúde de grande parte da população adulta mundial, que sofrem de intolerância à esse carboidrato. Esses problemas podem ser contornados através da reação de hidrólise da lactose pela enzima β -D-galactosidase^{14,20}.

A enzima β -D-galactosidase (E.C.3.2.1.23)²¹ pertence à classe das hidrolases e pode ser produzida por diversos micro-organismos²². É responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1 – 4Glc), produzindo glicose e galactose. Além de produzir produtos com concentração reduzida de lactose, essa enzima é utilizada no preparo de produtos de trans-galactosilação ou galactooligossacarídeos (GOS), usado como aditivos alimentares prebióticos²³⁻²⁵. Normalmente, a enzima β -D-galactosidase é usada na forma livre, permanecendo incorporada ao produto final e impedindo sua reutilização. Atualmente, sua imobilização em suportes sólidos vem sendo estudada, buscando a melhoria de sua estabilidade ao longo dos processos e a redução de custos, já que pode ser reutilizada e aplicada em processos contínuos²⁶⁻²⁸. Suportes à base de sílica funcionalizada foram

utilizados para a imobilização da enzima β -D-galactosidase e aplicados na produção de galactooligosacarídeos (GOS)^{28,29}.

Uma grande variedade de materiais podem ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas, podendo envolver materiais orgânicos, inorgânicos, híbridos ou compósitos³⁰. Dentre os materiais orgânicos, a quitosana vem apresentando grande destaque como suporte para a imobilização de enzimas. Considerada um material de baixo custo, não tóxico, biocompatível e ambientalmente sustentável, é um biopolímero proveniente do processo de desacetilação da quitina, presente em crustáceos. A quitosana apresenta em sua estrutura molecular os grupos funcionais hidroxila ($-\text{OH}$) e amino ($-\text{NH}_2$), permitindo a reação direta com enzimas^{31,32}. Muitos trabalhos já abordaram a utilização de quitosana na forma de esferas³³⁻³⁵ através da reticulação por glutaraldeído, apresentando resultados interessantes para aplicação em biocatálise, como ampliação da estabilidade térmica e da faixa de pH de ação da enzima. No entanto, as esferas de quitosana apresentam estabilidade mecânica relativamente baixa, levando à compactação e fragmentação dos suportes quando aplicados em reatores e processos contínuos, sendo necessário o desenvolvimento de novos protocolos para melhorar as propriedades desse material como suporte, visando sua aplicação na indústria³⁶.

Outra classe de materiais com interesse para imobilização de enzimas são os óxidos inorgânicos, como sílica, titânia e óxidos mistos de sílica/titânia^{37,38}, devido suas características como não toxicidade e biocompatibilidade. Suas propriedades físicas como elevada resistência mecânica e estabilidade térmica, aliada à sua alta área superficial e estrutura porosa tornam os óxidos inorgânicos materiais adequados para atuarem em operações industriais. Uma maneira de planejar as características físico-químicas dos materiais desejados é através do método sol-gel de síntese, baseado em reações de hidrólise e condensação de precursores moleculares, como os alcóxidos de silício ou titânio. Pelo controle das condições experimentais de síntese, como precursores utilizados, catalisadores, solventes e temperatura, é possível controlar as propriedades texturais e morfológicas, obtendo-se materiais com elevada área superficial específica e volume de poros controlado^{39,40}. A presença de grupos hidroxila ($-\text{OH}$) na superfície dos óxidos inorgânicos permite a sua modificação pela inserção de grupos funcionais por reações de enxerto, possibilitando a posterior reação com biomoléculas^{12,16}. A titânia, em particular, possui sítios ácidos de Lewis em sua superfície, permitindo a interação com espécies que possuam grupos

básicos, como o NH₂ das biomoléculas permitindo a adsorção de espécies (como quitosana e enzimas) no suporte sem a necessidade de funcionalização³².

Em alguns casos, para a efetiva ligação covalente da enzima ao suporte é necessária a ativação do suporte utilizando um reagente bifuncional. Um reagente amplamente utilizado é o glutaraldeído, o qual possui grupos funcionais (-CHO) nas suas extremidades que reagem de forma simultânea com os sítios de ligação presente na quitosana (-NH₂) e com o grupo amino terminal da enzima^{16,41}. Embora o glutaraldeído seja o reagente reticulador tradicionalmente utilizado em reações de imobilização de enzimas, sua toxicidade é uma preocupação para aplicações na indústria alimentícia. A genipina, por sua vez, é um reticulador de origem natural, não tóxica e biocompatível que vem sendo considerada uma substituta de menor citotoxicidade para o glutaraldeído⁴². Estudos relataram a melhoria das propriedades mecânicas de esferas de quitosana quando ativada com genipina em relação à ativação com glutaraldeído⁴³⁻⁴⁵.

Na literatura existem poucos relatos de trabalhos abordando a utilização de materiais à base de titânia contendo quitosana para a imobilização de enzimas, sendo sua maioria utilizada na fabricação de biossensores eletroquímicos^{37,46}. Não foram reportados materiais à base de óxidos mistos de sílica/titânia contendo quitosana para aplicação em biocatálise enzimática. Dessa forma, o estudo desse sistema se torna uma alternativa interessante para o desenvolvimento de suportes para a imobilização da enzima β -D-galactosidase com aplicação na reação de hidrólise da lactose.

Nessa perspectiva, este trabalho descreve o desenvolvimento de materiais à base de óxidos mistos de sílica/titânia, obtidos pelo método sol-gel, para serem aplicados como suportes para a imobilização da enzima β -D-galactosidase. Os materiais foram recobertos com diferentes proporções de quitosana com a finalidade de incorporar grupos funcionais e trazer benefícios à enzima imobilizada, melhorando sua atividade e estabilidade. Para proporcionar a imobilização covalente da enzima foram utilizados como agentes reticuladores o glutaraldeído e a genipina, sendo avaliada sua influência na atividade e estabilidade dos biocatalisadores. A caracterização morfológica e textural dos materiais obtidos foi devidamente realizada. Os biocatalisadores preparados foram aplicados à reação de hidrólise da lactose por testes de parâmetros de imobilização, temperatura, pH e estabilidade operacional em sistemas em batelada e contínuo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos materiais porosos a base de sílica e/ou óxido de titânio contendo quitosana, que apresentem características químicas e morfológicas apropriadas para utilização como suportes para imobilização de enzimas visando sua aplicação em biocatálise.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar materiais contendo óxidos porosos de sílica e titânia utilizando o método sol-gel.
- Funcionalizar os suportes com quitosana via reação de enxerto.
- Funcionalizar os suportes com glutaraldeído e genipina via reação de enxerto.
- Estudar efeito do glutaraldeído e genipina na imobilização da enzima β -D-galactosidase.
- Caracterizar a morfologia, textura e estrutura dos materiais sintetizados.
- Imobilizar a enzima modelo β -D-galactosidase nos suportes e avaliar seu desempenho como biocatalisador.
- Avaliar a estabilidade dos biocatalisadores sintetizados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. BIOCATALISADORES

A partir de reflexões ocorridas nos últimos anos, que aumentaram a conscientização sobre a exigência de proteção ambiental, as chamadas tecnologias verdes e ambientalmente sustentáveis ganharam grande atenção no cenário mundial. A mudança de paradigma deixa de lado os conceitos tradicionais de eficiência baseados no rendimento químico e dá valor à otimização do uso de matérias-primas, eliminação de resíduos e não utilização de substâncias tóxicas. A química verde busca soluções para equilibrar o uso de recursos naturais, crescimento econômico e proteção ambiental, desenvolvendo novos processos e compostos seguros tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente.^{25,42,47}

A biocatálise é um exemplo de abordagem da química verde, baseada na utilização de enzimas naturais ou modificadas em substituição a catalisadores não biológicos. Uma ampla gama de enzimas estão disponíveis, com propriedades potencialmente interessantes e ajustáveis a um processo pré-determinado. Além de sua elevada atividade catalítica, a ampla aplicação da biocatálise pode ser justificada pelo seu benefício ambiental, já que são catalisadores derivados de recursos renováveis, biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos^{11,47,48}.

A utilização de enzimas remonta a centenas de anos, antes mesmo de sua descoberta, para a produção de pão, queijo, cerveja e vinho. Estão no centro de diversos processos bioquímicos, catalisando reações de degradação de moléculas dos nutrientes, que conservam e transformam energia química ou que constroem macromoléculas biológicas partindo de precursores elementares. Com exceção de algumas classes de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas conhecidas são proteínas que atuam como catalisadores em reações bioquímicas, ou seja, aumentam a velocidade das reações pela redução da energia livre de ativação, não afetando os aspectos termodinâmicos e não sendo consumidas. Em alguns casos, há a necessidade de um componente químico não proteico, denominado cofator, ou uma molécula orgânica complexa, denominada coenzima, para que possam exercer sua atividade catalítica⁴⁹.

As enzimas possuem um conjunto de propriedades particulares comparável à de poucos catalisadores não biológicos. Além de apresentar extraordinário poder catalítico,

geralmente maior que catalisadores sintéticos ou inorgânicos, possuem elevado grau de especificidade para seus respectivos substratos, aceleram reações químicas e operam em soluções aquosas em condições brandas de pH e temperatura. A elevada especificidade das enzimas, capaz de distinguir estruturas muito semelhantes, pode ser explicada pela sequência específica de aminoácidos que compõem a estrutura tridimensional da enzima, contendo um sítio ativo onde ocorrem as reações^{49,50}.

Em súpula, a biocatálise pode oferecer muitos aspectos positivos no contexto da química verde. Além de suas reações serem realizadas em condições amenas, em pH fisiológico, temperatura e pressão ambiente, utiliza como catalisador uma enzima, biodegradável e proveniente de fontes ambientalmente sustentáveis. Além disso, a utilização de enzimas como catalisadores possibilitam reações com quimio-, regio- e estereosseletividade sem a necessidade de etapas de ativação, proteção e desproteção de grupos funcionais exigidas nas sínteses tradicionais, levando a processos com custos reduzidos e com menos resíduos^{11,50}. Nessa perspectiva, a biocatálise substituiu processos químicos tradicionais em diversas áreas da indústria, incluindo a farmacêutica, cosmética, têxtil, papel e celulose, química fina e alimentícia, em especial a indústria de laticínios².

3.2. LACTOSE

Os carboidratos são as biomoléculas encontradas de forma mais abundante na Terra. São substâncias importantes para a dieta de seres vivos, já que sua oxidação é a principal via de produção de energia em células não fotossintéticas. Os carboidratos são compostos por poli-hidrialdeídos ou poli-hidroxicetonas, seus poli-condensados e derivados. Existem três classes de carboidratos, divididas de acordo com sua estrutura: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos⁴⁹.

A lactose, quimicamente denominada β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose e abreviada Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc, é um dissacarídeo constituído pelos açúcares D-galactose e D-glicose. Em solução aquosa, a lactose pode se manifestar em diferentes formas anoméricas (α e β), estados físico-químicos dependentes da temperatura. Na Figura 1 a seguir está representada a estrutura química da lactose na forma β ⁵¹⁻⁵³.

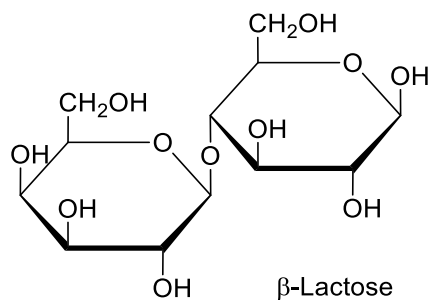


Figura 1. Representação da estrutura química da lactose (forma β).

Por centenas de anos o leite era considerado como constituído apenas por coalhada, gordura e soro. Os primeiros relatos sobre a existência da lactose foram em 1633 com Bartoletus em sua publicação sobre o isolamento de um “sal essencial do soro” e, em 1688, com Etmüller em sua publicação sobre o processo de evaporação e purificação da lactose por recristalização. Nos anos seguintes, a lactose passou a ser considerada uma mercadoria comercial e novos estudos foram desenvolvidos envolvendo sua estrutura química e compreensão das características e utilização desse açúcar para biotransformação em diferentes monossacarídeos ou derivados de elevado valor agregado^{51,54}.

De maneira análoga à outros açúcares, a hidrólise da lactose em seus componentes monossacarídeos (glicose e galactose) ocorre no lúmen intestinal. A enzima responsável pela sua hidrólise é denominada lactase ou β -D-galactosidase e está presente como uma glicoproteína integral na membrana das microvilosidades das células epiteliais⁵³. Na Figura 2 está representada a reação de hidrólise enzimática da lactose catalisada pela enzima β -D-galactosidase.

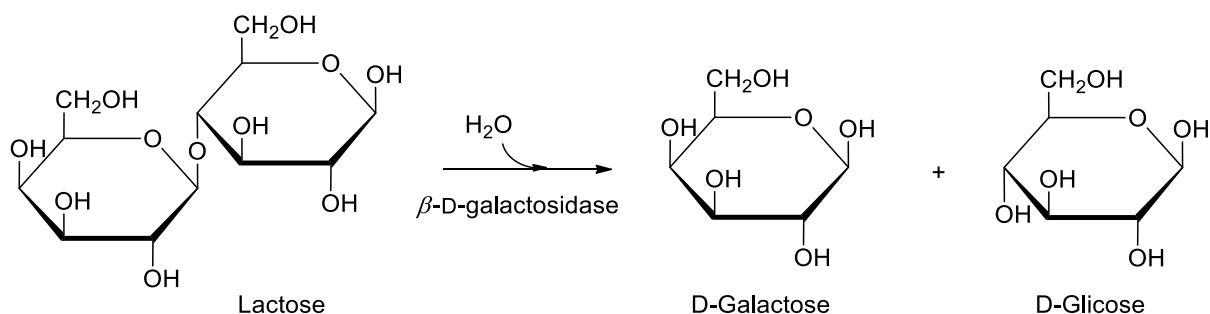


Figura 2. Reação de hidrólise de lactose catalisada pela enzima β -D-galactosidase.

A lactose é um dos carboidratos mais conhecidos em razão de sua notoriedade e presença no leite da maioria dos mamíferos com concentração aproximada entre 2 e 10%. Em leite bovino a concentração de lactose apresenta valor médio de 4,8% enquanto em humanos esse valor é de aproximadamente 7%. Sua biossíntese ocorre nas glândulas mamárias, pela transferência de uma galactose para uma molécula aceptora de glicose em uma reação catalisada pela enzima galactosil transferase^{51,53}.

A maioria dos mamíferos, em especial os seres humanos, apresentam alta atividade da enzima β -D-galactosidase nos estágios iniciais de suas vidas, quando o leite é seu único ou principal nutriente. Ao longo dos anos, pode ocorrer a redução progressiva na produção da enzima β -D-galactosidase em humanos. Como consequência disso, a lactose não pode ser digerida no intestino delgado, passando diretamente para o intestino grosso. Ali, o aumento da concentração osmótica da lactose dissolvida se contrapõe à absorção de água pelo intestino para a corrente sanguínea, levando à sintomas gastrointestinais. Ainda, ocorre a fermentação da lactose por bactérias intestinais, produzindo grandes volumes de CO₂, levando a inchaço cólicas e gases. O distúrbio digestivo causado pela deficiência na produção da enzima β -D-galactosidase pelo organismo é denominado intolerância à lactose^{49,53,55}.

É estimado que cerca de 70% da população mundial apresentam intolerância à lactose, sendo que algumas populações étnicas são mais afetadas do que outras. No Brasil, esse número é de aproximadamente 57% da população^{55,56}. Para atender as necessidades dos consumidores com intolerância à lactose, foi promovida a produção de produtos sem lactose ou com baixo teor de lactose. Esses produtos apresentam um grande e crescente apelo à saúde, fornecendo os nutrientes essenciais presentes no leite para os consumidores intolerantes à lactose²⁰. Os produtos lácteos com baixo teor de lactose podem ser preparados pela utilização de nano e ultrafiltros, que removem aproximadamente 40% da lactose ou pela hidrólise com adição da enzima β -D-galactosidase. É esperada uma expansão da indústria de laticínios, com a produção de novos produtos e o alcance de novos consumidores^{20,53}.

Outra finalidade de hidrolisar a lactose de produtos lácteos é a prevenção da cristalização de produtos como doce de leite, leite condensado, sorvete e iogurtes, melhorando suas características organolépticas. Um dos defeitos de textura mais ocorrentes em produtos lácteos, principalmente em sorvete e especialidades de queijos é o arenoso e pode ser evitado pela hidrólise desse açúcar^{51,57}.

As indústrias de processamentos de alimentos, em especial fábricas de laticínios, geram grandes volumes de resíduos líquidos que apresentam características distintas

conforme o produto obtido (iogurte, leite, manteiga, sorvete, queijo). Dentre os principais efluentes, os resíduos de soro de queijo, porção líquida produzida durante a fabricação do queijo ou durante o processo de coagulação da caseína do leite, tem chamado grande atenção. Para cada quilograma de queijo produzido são liberados cerca de 10 litros de soro e é estimada que sua produção mundial total de é de aproximadamente 190 milhões de toneladas ao ano. A lactose é o principal soluto do soro de queijo, presente em concentração aproximada de 5%. Uma parte do soro pode ser recuperada e reutilizada em aplicações alimentícias ou em rações animais. Entretanto, esse efluente provoca graves problemas ambientais em razão do seu grande volume de produção e alto conteúdo orgânico. Devido à elevada demanda biológica e química de oxigênio do soro de queijo, sua eliminação inadequada e sem tratamento, além de elevada toxicidade, pode causar eutrofização e crescimento de bactérias, resultando em condições anaeróbicas no meio ambiente^{58,59}. Uma alternativa para esse problema é a hidrólise da lactose presente no soro do queijo, que serve como substrato para o preparo de produtos com elevado valor agregado, como prebióticos, ração animais, bioplásticos, entre outros⁵⁸.

Em alternativa a hidrólise enzimática da lactose, a rota química utiliza condições extremamente ácidas (pH 1,5) e elevadas temperaturas (150°C), mas apresenta aplicação industrial limitada. A hidrólise da lactose utilizando a enzima β -D-galactosidase é preferida em aplicações na indústria alimentícia, pois opera em condições brandas de pH e temperatura e não causa variações no sabor, odor e coloração dos alimentos⁵¹.

3.2.1. β -D-Galactosidase

A β -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23)²¹, também referida como β -D-galactoside galactohidrolase ou lactase, é uma enzima pertencente à classe das hidrolases e possui ampla aplicação na indústria de processamento de alimentos. Essa enzima é responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -D-galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4Glc), liberando glicose e galactose^{22,23}.

De acordo com o banco de dados CAZy⁶⁰, as β -D-galactosidases são classificadas, com base na similaridade de sequência, na família glicosil hidrolase (GH) 1, 2,35, 42, 59 e 147, e pertencem à superfamília Clan-A com estrutura de barril (α/β)₈. Na Figura 3 é apresentada uma proposta de mecanismo de retenção da β -D-galactosidase elaborado por Lu et al.⁶¹

utilizando lactose como substrato, no qual o produto mantém a mesma configuração anomérica do substrato inicial.

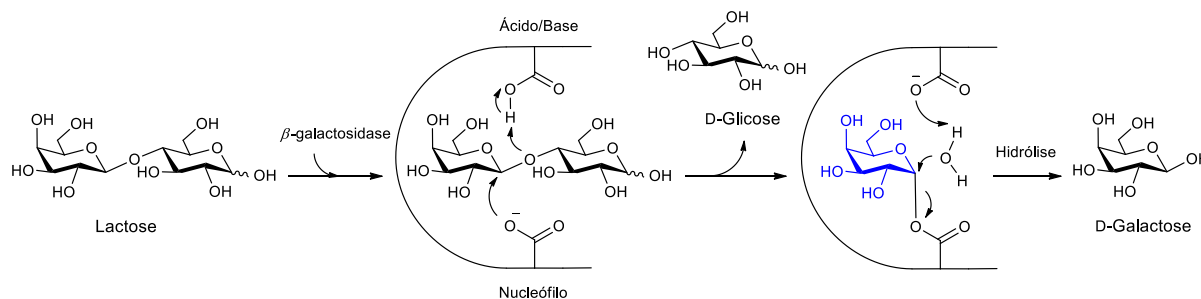


Figura 3. Esquema do mecanismo de retenção da β -D-galactosidase, adaptado de Lu et al. (2020).

O processo catalítico da β -D-galactosidase segue um mecanismo de deslocamento duplo e apresenta dois resíduos de ácido (glutâmico ou aspártico) onde um desempenha o papel de catalisador ácido/básico e outro o papel de nucleófilo. Na etapa inicial denominada galactosilação, o resíduo de nucleófilo ataca o substrato no centro anomérico, enquanto o resíduo ácido/base atua como ácido e facilita a eliminação do grupo de saída. Quando o substrato utilizado é a lactose, é formado um intermediário covalente galactosil-enzima e a molécula de glicose é liberada. Na etapa seguinte, denominada desgalactosilação, o resíduo ácido/base atua como base e ativa a molécula aceptora, a qual ataca o intermediário galactozil-enzima no centro anomérico, produzindo o produto com retenção da configuração anomérica do substrato. Quando a molécula aceptora for água, ocorre a hidrólise e a molécula de galactose é liberada do intermediário enzimático. Quando a molécula aceptora forem açúcares, ocorre a transglicosilação e os resíduos de galactosil são transferidos do intermediário enzimático para os açúcares, formando galactosídeos. A estrutura e especificidade do substrato pode variar de acordo com a fonte da β -D-galactosidase utilizada⁶¹.

Recentemente, estruturas dimensionais de enzimas foram obtidas por técnicas de cristalografia de raios X e microscopia crioeletrônica, caracterizações importantes para compreender as estruturas e funções enzimáticas⁶². Pavel et al. inferiram a extensão espacial da β -D-galactosidase de *Kluyveromices lactis* a partir da estrutura cristalina do tetrâmero (PDB: 3OBA). Foi estimado que o tetrâmero pode estar contido em uma caixa de dimensões

15,1 nm × 17,1 nm × 10,7 nm, o dímero em dimensões 11,9 nm × 15,6 nm × 7,2 nm e o monômero em dimensões 7,2 nm × 11,7 nm × 6,3 nm⁶².

As β -D-galactosidases são amplamente distribuídas na natureza e apresentam origem microbiana, vegetal e animal. As fontes microbianas, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresentam maior produtividade. Em plantas pode ser encontrada principalmente em amêndoas, pêssegos, maçãs e damascos. As fontes de β -D-galactosidase mais utilizadas em escala comercial e industrial são *Aspergillus* sp. e *Kluyveromyces* sp.^{22,23}. De forma geral, a escolha adequada das fontes depende das condições de reação exigidas. Enquanto as β -D-galactosidases isoladas de bactérias atuam em pH ótimo entre 2,5 e 5,4 e são utilizadas para hidrólise do soro de queijo ácido, as β -D-galactosidases isoladas de leveduras apresentam atividade máxima em pH entre 6,0 e 7,0 e são mais adequadas para a hidrólise de leite e soro de queijo doce²².

A enzima β -D-galactosidase possui como aplicação principal, além da produção de produtos lácteos com baixo teor de lactose, o preparo de produtos galactosilados^{23,63}. Os galactooligossacarídeos (GOS) são definidos compostos prebióticos derivados da lactose, produzidos durante sua hidrólise em reações secundárias de transgalactosilação enzimática pela enzima β -D-galactosidase. Se outrora consideravam os GOS um subproduto indesejado da hidrólise da lactose, nos dias atuais novas pesquisas buscam sua utilização direta do leite ou subprodutos do soro para sua síntese com alto valor agregado. Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que promovem a atividade de populações microbianas no cólon, proporcionando benefícios à saúde^{64,65}. Além disso, devido aos GOS apresentam estrutura semelhante aos oligossacarídeos do leite humano, responsáveis pelo efeito prebiótico do leite materno, são amplamente utilizados em fórmulas infantis, uma vez que a presença de GOS no leite humano podem influenciar o crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal de recém nascidos e lactantes e os leites de origem bovina possuem quantidades reduzidas de oligossacarídeos^{64,66}.

No desenvolvimento desse trabalho, foi utilizada a enzima comercial MAXILACT® LX-5000, obtida pela empresa DSM Food Specialties France, importada pela Global Food, São Paulo, Brasil. Esse preparado enzimático contém a β -D-galactosidase purificada, isolada de uma cepa especial da levedura láctea *Saccharomyces (Kluyveromyces) marxianus* var *lactis*. Esse preparado é encontrado como um líquido viscoso de coloração castanho escuro e deve ser armazenado em temperaturas entre 4 e 8°C. Por se tratar de um composto extraído de

uma levedura láctea, a enzima possui condições ótimas para atividade semelhantes ao pH e temperatura naturais do leite, ou seja, pH entre 6,6 e 6,8 e temperatura entre 35 e 40 °C⁶⁷.

A enzima β -D-galactosidase pode ser utilizada na sua forma solúvel para a produção em escala industrial de leite hidrolisado. No entanto, essa aplicação é limitada devido aos elevados custos das enzimas, uma vez que é difícil sua recuperação e reutilização. Uma alternativa vantajosa para a preparação em larga escala de leite com baixo teor de lactose é através da utilização de preparações enzimáticas de β -D-galactosidase imobilizadas em reatores contínuos. O processo de imobilização enzimática irá oferecer vantagens como a possibilidade de reutilização eficiente da enzima, operação contínua e minimização da contaminação do produto. Ainda, a imobilização mostrou melhorar a estabilidade em condições de armazenagem e operação da β -D-galactosidase^{23,66,68}.

González-Delgado et al.²⁸ utilizaram suportes de sílica mesoporosa, modificadas com glioxil, com diferentes estruturas e distribuição de tamanho de poros na imobilização da enzima β -D-galactosidase de *Aspergillus aculeatus* e testaram na produção de GOS a partir da lactose. Os biocatalisadores preparados com a sílica de poros maiores apresentou aumento da atividade da enzima em termos de produção de GOS em relação à enzima na forma livre sob mesmas condições de reação. Ainda, os biocatalisadores apresentaram capacidade de reutilização altamente eficiente em três ciclos de reação de 24 horas a 50 °C, com inativação da enzima minimizada.

3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A catálise enzimática tem sido amplamente aplicada em diversas áreas, como na síntese de produtos farmacêuticos, química fina, produção de biocombustíveis, processamento de alimentos, entre outros. Os biocatalisadores apresentam propriedades vantajosas, incluindo elevada atividade catalítica, seletividade, estabilidade, biodegradabilidade e operar em condições amenas. No entanto, o emprego de enzimas em processos industriais é dificultado pela baixa estabilidade operacional e difícil recuperação e reutilização da enzima. Essas desvantagens podem ser superadas utilizando técnicas de imobilização enzimática^{13,15,69}.

A utilização de enzima imobilizada foi relatada pela primeira vez em 1916 por Nelson & Griffin⁷⁰, onde observaram que a adsorção de invertase em carvão não afetava

negativamente sua atividade catalítica e possibilitava seu reuso. A utilização comercial desses sistemas apresentou os primeiros relatos nos anos 1960s⁷¹.

Dentre os diversos pretextos para imobilizar uma enzima, a fácil e eficiente recuperação do biocatalisador após a reação e sua pronta reutilização em múltiplos ciclos de catálise ou em reatores de fluxo contínuo são fatores importantes. Através da imobilização é possível manusear mais adequadamente a enzima, permitindo sua fácil separação do produto e minimizando ou eliminando a contaminação do produto tanto por proteínas quanto pelo próprio catalisador^{13,16}. Além disso, as propriedades das enzimas são geralmente aprimoradas após a imobilização. Os benefícios incluem o aumento na especificidade, seletividade, estabilidade em armazenamento e estabilidade operacional em solventes orgânicos e em condições distintas de pH e temperatura^{15,16,69}.

O desempenho otimizado da enzima possibilita sua utilização em escala industrial. A maior estabilidade e possibilidade de reutilização do catalisador refletem em maior produtividade e, por consequência, na redução dos custos do processo. Assim, com o desenvolvimento comercial, as aplicações em larga escala das enzimas continuarão a expandir para áreas de aplicação ainda não exploradas, tanto para a produção de produtos químicos quanto para consumo^{13,72}.

A busca pelo desempenho operacional ideal de um biocatalisador é uma tarefa constante. Uma vez que cada enzima apresenta propriedades diferentes, não é possível estipular um método abrangente para a imobilização da enzima. As propriedades físico-químicas do suporte utilizado devem ser adequadas e compatíveis com as propriedades bioquímicas da enzima utilizada. Essa interação deverá fornecer à enzima imobilizada propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. Da mesma forma, o método de imobilização escolhido, deve ser adequado, também, à aplicação desejada e ao microambiente em que será utilizado^{13,16,69}.

Na Figura 4 estão representados os métodos de imobilização de enzimas já propostos e mais comumente utilizados incluem o aprisionamento, reticulação, adsorção física e ligação covalente^{15,16,69}.

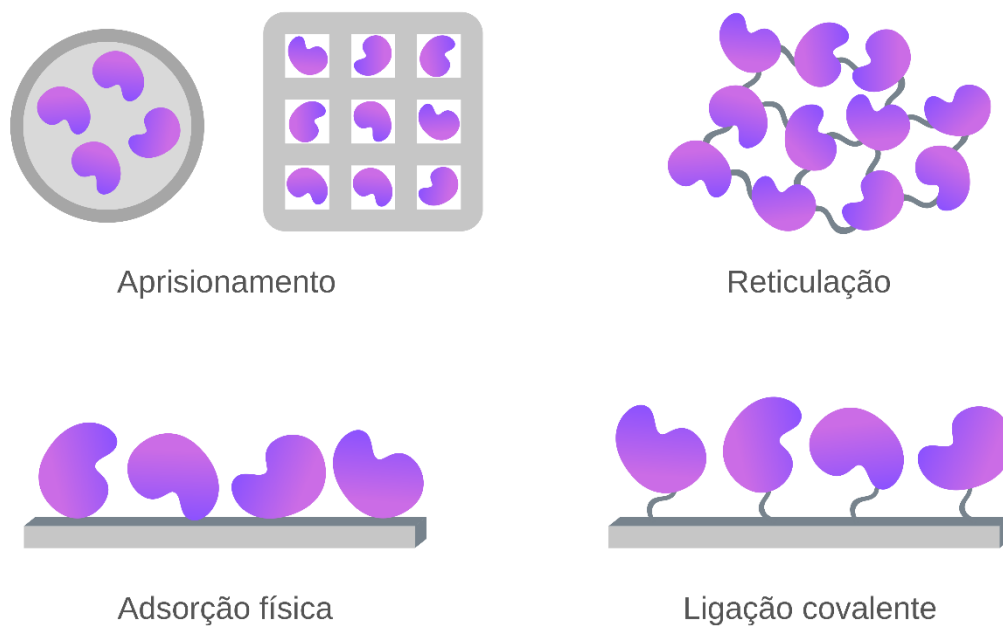


Figura 4. Representação dos métodos de imobilização de enzimas.

3.3.1. Imobilização por Aprisionamento

O aprisionamento (ou encapsulamento) é um método apropriado de imobilização em que enzimas são ocluídas em estruturas poliméricas ou inorgânicas. Nessa técnica de imobilização não estão envolvidas ligações químicas entre suporte e proteína, a qual permanece apenas incluída em uma rede tridimensional do suporte, dificultando sua difusão para fora do carreador. Diversas matrizes são comumente utilizadas para aprisionamento de enzimas, como as a base de quitosana, alginato, sílica mesoporosa, colágeno, poliuretano, entre outros.^{15,16,73}

Como não são formadas ligações químicas entre as enzimas e as matrizes de suporte, as conformações das enzimas são geralmente mantidas, garantindo aos biocatalisadores altas atividades catalíticas. Entretanto, podem ocorrer problemas de transferência de massa envolvendo substratos e produtos, altas barreiras de difusão impedem que substratos macromoleculares atravessem a rede polimérica, sendo uma grande desvantagem dessa técnica^{13,15,16}.

3.3.2. Reticulação de Enzimas

A imobilização de enzimas por reticulação, também denominada *crosslinking* (CLEs), ligação cruzada de agregados de enzimas (CLEAs) ou entrecruzamento, envolvem a formação de ligações covalentes entre as moléculas de proteínas pela utilização de reagentes bifuncionais. Na maioria das aplicações, essa técnica não utiliza um suporte, apenas as enzimas reticuladas entre si. Para tal, os reagentes bifuncionais comumente utilizados são o glutaraldeído, isocianato e genipina^{13,15,16}. Através dessa técnica de imobilização, as enzimas são imobilizadas entre si melhorando sua estabilidade operacional e possibilitando sua reutilização. Entretanto, as enzimas podem perder suas atividades catalíticas durante o processo de reticulação devido à possibilidade de ocorrer modificações químicas na superfície da proteína. Além disso, as taxas de difusão de substrato e produto podem ser prejudicadas^{13,15,16}.

3.3.3. Adsorção Física

A adsorção física em um suporte, ou no seu canal poroso, é considerado um processo simples, reversível e conveniente para a imobilização de enzimas, permitindo tanto o reaproveitamento do biocatalisador quanto do substrato. A adsorção de proteínas na superfície de suportes sólidos depende de interações intermoleculares fracas de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas. Nesse método de imobilização, os suportes habitualmente empregados são materiais porosos com elevadas áreas superficiais, além de resinas catiônicas e de troca iônica, carvão ativado, sílica gel, alumina, cerâmica, fibras e espumas^{9,15,73}.

Nessa técnica de imobilização, não são necessárias funcionalizações na superfície do suporte com agentes adicionais nem modificações químicas na enzima. A eficiência da imobilização irá depender das condições físico-químicas do meio reacional, como pH e força iônica, e dos suportes utilizados, como tamanho e formato dos poros, além de suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Além disso, as condições de imobilização pouco modificam as estruturas das enzimas, preservando suas atividades catalíticas iniciais. No entanto, na adsorção física as interações necessárias para manter a enzima fixa ao suporte sob condições adversas de operações são geralmente fracas e reversíveis. As forças de ligação são suscetíveis às alterações nos parâmetros operacionais, como pH, temperatura e força iônica,

resultando na baixa estabilidade das enzimas imobilizadas, levando à sua lixiviação do suporte e contaminação da solução de substrato^{13,15,16,73}.

3.3.4. Ligação covalente

A ligação covalente é apontada como um método convencional e eficaz para a imobilização de enzimas. Nessa técnica, ligações covalentes são formadas por meio de ligações químicas entre a superfície funcionalizada do suporte e aminoácidos da cadeia lateral de enzimas, como lisina, cisteína ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico. Os grupos funcionais expostos nas superfícies dos suportes e que são favoráveis à formação de ligações covalentes incluem grupos amino, ácido carboxílico, fenol, imidazol, indolil, tiol, entre outros. A imobilização covalente de enzimas geralmente é um processo irreversível, evitando, portanto, a reutilização do suporte quando a enzima imobilizada perdeu sua atividade^{15,73}.

Um dos principais benefícios obtidos com a imobilização covalente é o potencial para melhorar a vida útil do catalisador devido à estabilidade da ligação e consequente diminuição da lixiviação da enzima do suporte. Um efeito disso é o aumento aparente da estabilidade operacional da enzima imobilizada (em solventes orgânicos, meios aquosos, pH, força iônica, temperatura), além de apresentar modulação positiva da especificidade, seletividade e diminuição da inibição, com minimização da contaminação do produto pela lixiviação^{9,15,16}.

No entanto, a imobilização de proteínas por ligação covalente pode apresentar menor atividade catalítica quando comparada com enzimas na sua forma livre devido às limitações nas transições conformacionais pelo enrijecimento da estrutura tridimensional da proteína, principalmente com ligações multipontuais^{16,73}. Dessa forma, podem ocorrer tanto modificações estruturais nas proteínas imobilizadas quanto a simples orientação ruim do sítio ativo durante a imobilização, afetando a interação adequada entre enzima e substrato e, conseqüentemente, diminuição na atividade catalítica^{15,16}.

As superfícies geralmente utilizadas para a imobilização covalente de enzimas incluem materiais nanoporosos, nanopartículas, nanofibras, agarose, superfícies de vidro, sílica, quitosana, entre outros. Entretanto, para ocorrer a imobilização covalente geralmente é necessária a ativação do suporte. A ativação com glutaraldeído é o método mais comumente utilizado para a imobilização de enzimas em matrizes funcionalizadas com grupo amino. Todas etapas de funcionalização e ativação do suporte devem ser adequadamente projetadas

para evitar as desvantagens do método de imobilização mencionadas e proporcionar o aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima^{15,16}.

3.4. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As reações enzimáticas são geralmente constituídas pelas etapas de difusão do substrato em direção ao sítio ativo, formação do estado de transição para possibilitar a catálise e liberação do produto do sítio ativo. Nesse sentido, a atividade catalítica da enzima será influenciada pelas interações entre a enzima e os substratos utilizados e produtos obtidos nessas etapas⁶⁹. No caso das enzimas imobilizadas, os suportes também podem interagir com enzimas, substratos, produtos e meios de reação, levando a alterações na atividade enzimática. Assim, o desempenho do biocatalisador será condicionado pelas propriedades bioquímicas da enzima utilizada, pelas propriedades químicas e mecânicas do suporte utilizado e pelas condições reacionais^{13,69}.

Uma vez que o desenvolvimento de novos catalisadores tem como objetivo o aprimoramento da atividade catalítica e estabilidade operacional da enzima imobilizada, o planejamento e síntese do suporte é uma etapa fundamental desse processo. De forma análoga, um processo de imobilização sem uma planificação adequada pode resultar na diminuição da atividade enzimática. Assim, todas as etapas devem ser adequadamente planejadas para a obtenção de um biocatalisador com desempenho aprimorado^{16,69,74}.

Uma grande variedade de materiais pode ser utilizada na imobilização de biomoléculas. A escolha adequada do suporte para determinada enzima deve cumprir alguns critérios para sua aplicação ser viável. O suporte deve apresentar custo relativamente baixo, com elevada disponibilidade e inofensivo ao meio ambiente, minimizando o impacto econômico do processo. Os parâmetros físico-químicos, como área superficial, tamanho de partícula, estrutura de poros e funcionalização da superfície, são fatores a serem considerados para o planejamento do suporte e devem ser adequados à enzima utilizada, pois refletem tanto na capacidade de carregamento do suporte quanto no microambiente proporcionado à enzima imobilizada. Além disso, o suporte deve apresentar elevada resistência térmica, mecânica e química, permitindo que a enzima imobilizada seja utilizada em múltiplas condições operacionais, resistindo à abrasão e pressão (quando utilizada em reatores) e resistindo à aplicações em valores de pH longe da neutralidade^{16,74}.

Além das técnicas utilizadas, os materiais escolhidos como suporte são de grande importância para o processo de imobilização. De modo geral, os suportes sólidos utilizados para imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com sua composição química em orgânicos e inorgânicos. Os materiais orgânicos empregados em técnicas de imobilização de enzimas incluem polímeros naturais ou sintéticos, como quitina, quitosana, celulose e alginato, e exibem diferentes formas físicas e estruturas químicas. Os polímeros naturais são materiais ambientalmente sustentáveis, biodegradáveis e de baixo custo, propriedades vantajosas para sua utilização na imobilização de enzimas^{74,75}.

Os materiais inorgânicos são interessantes para utilização como suportes para imobilização de enzimas devido suas propriedades como elevada resistência mecânica, estabilidade térmica e elevada resistência a solventes orgânicos e pH. Os compostos dessa classe mais comumente utilizados incluem materiais à base de sílica, titânia ou à base de outros óxidos. Apresentam elevada resistência microbiana, não sendo substratos para nenhum tipo de crescimento bacteriano ou fúngico. Ainda, os materiais inorgânicos podem ser obtidos com porosidade controlada e elevada área superficial, característica importante para materiais que atuem como suportes para imobilização de espécies^{16,74}.

3.4.1. QUITOSANA

O Instituto Nacional de Saúde Americano (*American National Institute of Health*) define biomaterial como:

Qualquer substância ou combinação de substâncias, exceto drogas, de origem sintética ou natural, que pode ser usada por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo (Binyamin et al., 2006, p. 276)⁷⁶.

Os polímeros naturais são um importante grupo de biomateriais e recebem muita atenção devido a suas vantagens em diversas aplicações que exijam biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, além de estarem disponíveis em recursos alimentares, agrícolas ou marinhos renováveis. Devido à essas propriedades, os polissacarídeos naturais (amido, celulose, quitina, alginato, entre outros) são agentes atraentes para diversas aplicações biomédicas, de engenharias, alimentícias e veículos de entrega de

medicamentos⁷⁷. Dentro dessa perspectiva, é observado um elevado número de publicações científicas relatando a importância da quitina e quitosana como biomateriais naturais.

A quitina (Figura 5) é o segundo polissacarídeo mais proeminente disponível na natureza depois da celulose. É um biopolímero formado por unidades de N-acetil-D-glicosamina, proveniente especialmente da parede celular de fungos e do exoesqueleto de crustáceos como camarões e caranguejos. Sua principal fonte comercial são os resíduos da indústria pesqueira, os quais são muitas vezes desperdiçados pela indústria alimentícia⁷⁷⁻⁷⁹. O derivado mais importante da quitina é a quitosana (Figura 5). Esse polissacarídeo é obtido pelo processo de desacetilação química ou enzimática da quitina e é composto por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina distribuídas aleatoriamente de acordo com o grau de desacetilação^{79,80}.

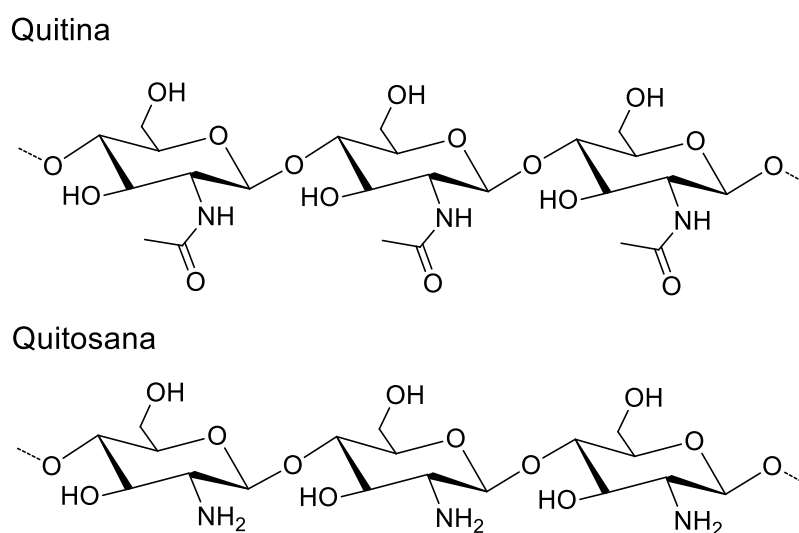


Figura 5. Representação das estruturas químicas da quitina e quitosana, adaptado de Bakshi et al. (2020).

A quitosana é um biomaterial versátil, ambientalmente sustentável, com elevada disponibilidade e de custo relativamente baixo. Devido suas propriedades químicas e biológicas distintas, que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e seguros para seres humanos, a quitosana apresenta potencial aplicação em áreas diversificadas. Tais funcionalidades permitem o emprego da quitosana na indústria de alimentos, indústria de celulose e papel, produtos farmacêuticos, cosméticos, medicina, biotecnologia, ciências dos materiais, tratamento de água, agricultura entre outros^{31,77,79}.

Em biotecnologia, a quitosana pode ser aplicada como suporte para imobilização de enzimas em virtude de sua estrutura contendo múltiplos grupos funcionais (amino e hidroxila), conferindo estabilidade ao suporte e facilitando a ligação entre a quitosana e a enzima^{77,79}. Além disso, esse polímero pode ser manipulado em diferentes configurações geométricas, sendo utilizada na forma de esferas, microesferas, pós, fibras, membranas, géis, entre outras formas, permitindo o preparo de uma grande variedade de biomoléculas com aprimoramento da estabilidade^{31,32}. O preparo de géis de quitosana ocorre devido a quitosana dissolver-se espontaneamente em soluções diluídas de ácidos orgânicos, como os ácidos fórmico, acético e tartárico, formando soluções viscosas que precipitam em pH básico, formando partículas insolúveis em água na forma desejada^{31,77}.

Urrutia et al.⁸¹ avaliaram a utilização de uma metodologia para imobilização de enzimas em quitosana, a qual foi desenvolvida pela manipulação das funcionalidades desse polímero com grupos amino e aldeído. Nesse sistema, a enzima (β -D-galactosidase de *A. oryzae*) foi adsorvida nos grupos amino da quitosana e, após funcionalização com grupos aldeído, a enzima foi covalentemente ligada ao suporte. Para comparação, foi preparado um suporte à base de agarose para imobilização da β -galactosidase. O biocatalisador contendo quitosana apresentou atividade catalítica mais elevada quando comparado com um biocatalisador à base de agarose. Quando aplicados na síntese de galactooligosacarídeos em reator em batelada, o biocatalisador contendo quitosana apresentou melhor desempenho e, após três lotes sequenciais, a enzima imobilizada nos suportes apresentou produtividade específica 4,7 e 4,0 vezes superior à obtida com a enzima livre. Dessa forma, essa estratégia concedeu maior atividade específica e estabilidade térmica ao sistema, mostrando a importância da adequação do suporte com a enzima imobilizada e da versatilidade e desempenho da quitosana como suporte para imobilização de enzimas.

Duarte et al.⁸² estudaram a imobilização da enzima β -D-galactosidase de *B. circulans* em macroesferas de quitosana e aplicaram na síntese de lactosucrose. A estabilidade desse sistema foi avaliada e a imobilização da enzima levou a um aumento na amplitude da atividade relativa em função do pH e um aumento de 260 vezes na estabilidade térmica quando comparado com a enzima utilizada na forma livre. Dessa forma, a quitosana pôde ser vantajosamente utilizada na imobilização da β -D-galactosidase, apresentando melhorias na estabilidade térmica e operacional.

Embora biocatalisadores a base de quitosana ofereçam a enzima melhorias em sua atividade e estabilidade em temperatura e pH, esses suportes são relativamente frágeis e

apresentam estabilidade mecânica limitada. Tensões mecânicas podem levar à compactação e fragmentação das partículas de quitosana, prejudicando seu armazenamento, transporte e aplicação em reatores de fluxo contínuo³². Visando a aplicação industrial de suportes à base de quitosana, é necessário o desenvolvimento de novos protocolos de síntese que aprimorem as propriedades mecânicas desse material.

3.4.2. AGENTES DE ATIVAÇÃO

De modo geral, os suportes não são apropriados para reagir diretamente com as proteínas, apenas os que apresentam, por exemplo, grupo funcional epóxi ou aldeído em sua superfície. Dessa forma, é necessária a ativação do suporte com reagentes multifuncionais específicos, como glutaraldeído, glicoxal, epícloridrina ou genipina, permitindo a ligação covalente do suporte com os grupos funcionais das proteínas^{16,79}.

3.4.2.1. Glutaraldeído

O glutaraldeído (Figura 6) é um reagente bifuncional, popularmente utilizado como agente reticulador de proteínas ou para sua imobilização covalente em suportes. A imobilização ocorre pela reação simultânea dos grupos funcionais aldeído (-CHO) do glutaraldeído com os sítios de ligação amino (-NH₂) da quitosana, ou outros grupos funcionais ativados da superfície do suporte, e os grupos amino (-NH₂) terminais da enzima. Como essa reação ocorre entre um aldeído bifuncional e moléculas contendo grupo amino, é formada uma base de Schiff entre o glutaraldeído e o suporte¹⁶.

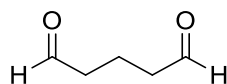


Figura 6. Representação da estrutura química do glutaraldeído.

A utilização do glutaraldeído como agente ativador do suporte apresenta como vantagem a inserção de uma molécula espaçadora entre suporte e enzima, reduzindo efeitos

de impedimento estérico. Além disso, soluções comerciais de glutaraldeído apresentam custo relativamente baixo e o protocolo de síntese é consideravelmente simples, o que explica a grande utilização desse reagente em métodos para imobilização de enzimas.¹⁶ No entanto, o glutaraldeído apresenta uma elevada citotoxicidade, o que pode dificultar ou impedir sua utilização em aplicações farmacêuticas, biomédicas e em alimentos.³² Nesse sentido, é crescente o interesse em novas técnicas e reagentes de reticulação mais seguros e com propriedades aprimoradas, com destaque para genipina.

3.4.2.2. Genipina

A genipina (Figura 7) é o produto da hidrólise do geniposídeo, um reagente iridoide que pode ser obtido dos frutos de *Genipa americana L.*, planta nativa de regiões tropicais das Américas cujo fruto jenipapo é utilizado por tribos indígenas como corante corporal, e de *Gardenia jasminoides Ellis*, popular erva chinesa.

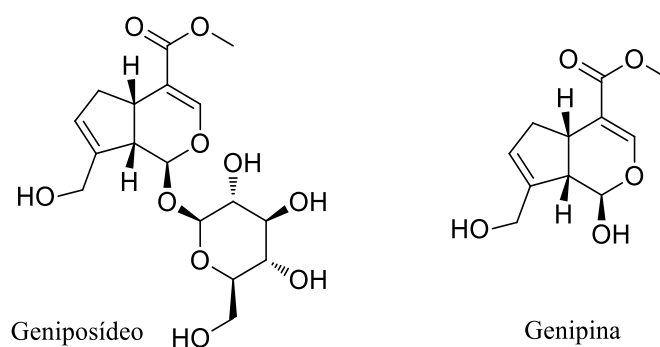
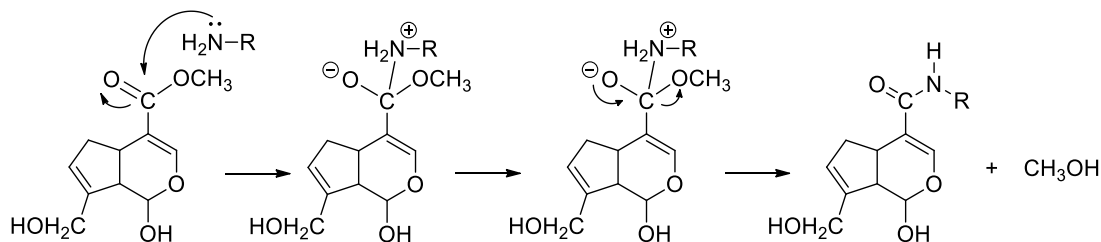


Figura 7. Representação das estruturas do geniposídeo e da genipina.

A natureza não tóxica da genipina a torna um material eficiente para aplicações biológicas e biomédicas. Dentre essas aplicações estão o preparo de corantes azuis na indústria de alimentos e a utilização como reagente de reticulação para fixação biológica de tecidos⁸³. Além disso, trabalhos demonstraram várias ações farmacológicas da genipina, como propriedades anti-inflamatórias^{84,85}, antidiabéticas⁸⁶, antioxidantes, antitrombóticas⁸⁷ e proteção de atividades neurotróficas⁸⁸.

A genipina pode reagir espontaneamente com grupos amina primários de aminoácidos, peptídeos ou proteínas. Essa reação é muito útil para diversas aplicações biológicas devido a biodegradabilidade e baixa toxicidade da genipina, tornando-a um excelente reagente reticulante^{89,90}. Butler et al. (2003)⁹¹ descreveram a formação de reticulação entre genipina e biopolímeros contendo grupamentos amina primário em duas propostas de reação (Figura 8).

Reação 1



Reação 2

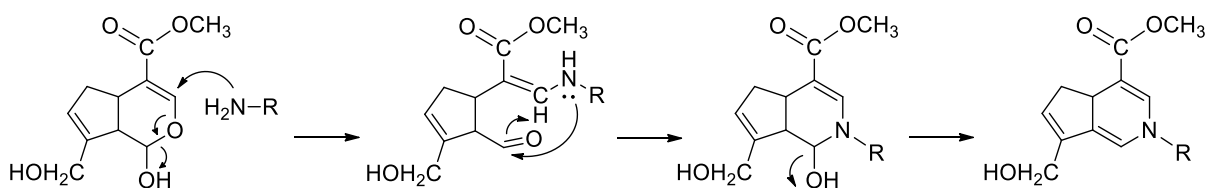


Figura 8. Esquema das propostas de reações da genipina com grupamentos aminos, adaptado de Butler et al. (2003).

A Reação 1 ocorre através de um ataque nucleofílico no C-11 da genipina, ocorrendo uma substituição de um grupo éster da genipina por uma amida secundária e liberando um composto metílico. A Reação 2 inicia com um ataque nucleofílico ao C-3 da genipina pelo grupo amina primário, formando um grupo amina intermediário pela abertura do anel dihidropirânico da genipina. A reação segue com o ataque da amina secundária no grupamento aldeído intermediário, formando um novo composto heterocíclico^{89,91-93}.

Nesse sentido, devido sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade, a genipina surge como um novo reagente bifuncional que substitui o clássico reagente glutaraldeído em reações de reticulação. Resultados obtidos em ensaios revelaram que a genipina pode apresentar cerca de 10000 vezes menos citotoxicidade que o glutaraldeído⁹⁴. Além disso, estudos recentes revelaram que a modificação de materiais a base de quitosana com genipina

aprimorou as propriedades mecânicas da quitosana em comparação à materiais modificados com glutaraldeído⁴³⁻⁴⁵.

Liu et al.⁴⁵ estudaram a reticulação da quitosana com concentrações variadas de genipina e quitosana. Os resultados mostraram que os filmes à base de quitosana utilizando genipina como agente reticulador possuíam melhores propriedades mecânicas e cristalinidade do que os preparados utilizando glutaraldeído.

Flores et al.⁴³ estudaram o efeito sobre a variação nos parâmetros da reação entre quitosana e genipina, permitindo o preparo de suportes para a imobilização de enzimas de diferentes estruturas a partir da possibilidade de variações na forma de polimerização da genipina, alterando a conformação da rede de reticulação. Utilizando como modelo a enzima β -D-galactosidase de *A. oryzae*, o biocatalisador preparado apresentou elevada estabilidade térmica e operacional em batelada, mantendo 100% de atividade relativa durante 40 bateladas.

Klein et al.⁴⁴ avaliaram a imobilização da enzima β -D-galactosidase de *A. oryzae* em partículas de quitosana reticuladas com genipina. O biocatalisador preparado apresentou atividade superior ao preparado utilizando glutaraldeído como agente reticulador. Além disso, apresentou elevada resistência térmica, mecânica e operacional, mantendo 100% da atividade inicial após 25 ciclos de hidrólise da lactose.

3.4.3. ÓXIDOS INORGÂNICOS

Os materiais inorgânicos, com especial destaque para os compostos à base de óxidos inorgânicos, como sílica (SiO_2) e titânia (TiO_2), são considerados adequados para serem empregados como suportes para a imobilização de enzimas devido suas características como não toxicidade e biocompatibilidade. Essa classe de materiais apresenta propriedades físico-químicas maleáveis aos requisitos essenciais de materiais utilizados como suporte para imobilização de enzimas¹⁶.

Os óxidos inorgânicos apresentam propriedades de superfícies compatíveis com a imobilização de enzimas devido à presença de grupos funcionais que permitem a imobilização covalente de espécies. Suas propriedades texturais e morfológicas podem ser planejadas e ajustadas de acordo com a enzima utilizada. Materiais com diferentes tamanhos de partículas e estruturas de poros podem ser obtidos, além ser possível o controle do diâmetro de poros e a obtenção de materiais com elevada área superficial específica. Esses materiais apresentam

elevada estabilidade térmica, mecânica e química, não sofrendo mudanças químicas ou físicas em diferentes condições de operação. Ainda, os óxidos inorgânicos são resistentes à contaminação por crescimento microbiano e ao ataque de micro-organismos^{16,95}.

Entre os óxidos inorgânicos utilizados como suporte para imobilização de enzimas, a sílica apresenta propriedades químicas e físicas marcantes relacionadas à sua estrutura. O dióxido de silício (SiO_2) existe como um polímero tridimensional, onde as unidades são formadas por tetraedros regulares de SiO_4 com vértices compartilhados e toda sua estrutura é uma rede infinita onde pontes de siloxanos (Si-O-Si) são as únicas ligações existentes (Figura 9). Os tetraedros de SiO_4 são estruturas rígidas e os ângulos das ligações Si-O-Si são altamente flexíveis, o que explica os diversos polímeros conhecidos da sílica, variando de formas cristalinas altamente ordenadas, como o quartzo, a estruturas amorfas, como materiais vítreos, sistemas porosos não periódicos, sólidos mesoporosos. A partir da desidratação de preparações de sílica hidratada ou da moagem de partículas volumosas de sílica surgem as superfícies da sílica, apresentando as funções químicas silanóis (Si-OH) e siloxanos (Si-O-Si)¹⁶.

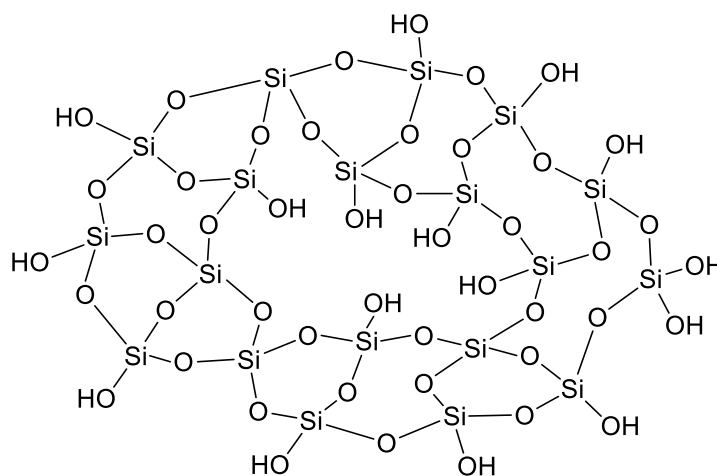


Figura 9. Representação da estrutura da sílica, adaptado de Benvenuti et al. (2009).

As interações físicas entre a superfície da sílica e as enzimas não são fortes o suficiente para manter essas moléculas ligadas ao suporte. Para possibilitar a ligação covalente da enzima ao suporte, a superfície da sílica pode ser modificada pela inserção de grupos funcionais através de reações de enxerto utilizando um organossilano, como alcóxissilanos, clorosilanos, entre outros. Essa reação consiste no ataque nucleofílico de um

grupo silanol (Si-OH) da superfície da sílica ao átomo de silício do organossilano, formando ligações de siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si-R}$)⁹⁶, onde R corresponde ao grupo orgânico.

O dióxido de titânio (TiO_2), assim como a sílica, apresenta propriedades adequadas para a utilização como suporte para imobilização de enzimas. O átomo de titânio possui volume maior do que o silício, o que explica seu maior número de coordenação ser 6 enquanto do silício ser 4. De forma análoga a sílica, a estrutura da titânia é formada por uma rede em ponte de ligações Ti-O-Ti e a superfície das partículas é caracterizada pela presença de grupos $\equiv\text{Ti-OH}$. A possibilidade de utilização da titânia como suporte para a imobilização de enzimas tem como razão suas propriedades físico-químicas, mecânicas, estabilidade térmica, fácil produção e biocompatibilidade. Além disso, a superfície da titânia é quimicamente reativa devido à presença de sítios ácidos de Lewis, possibilitando a ligação direta com espécies^{16,97}.

Outra possibilidade de material amplamente utilizado como catalisadores e suportes para a imobilização de biomoléculas é a combinação de óxidos de sílica e titânia. A interação entre os dois óxidos se dá pela formação de ligações químicas Ti-O-Si em ponte, formando uma estrutura em rede. Os óxidos mistos de sílica/titânia não só aliam as propriedades vantajosas da titânia, como ser um semicondutor e suporte catalítico ativo, e da sílica, como sua elevada estabilidade térmica e excelente resistência mecânica, mas também geram novos sítios ativos catalíticos pelo desequilíbrio de carga na ligação Ti-O-Si e às diferenças nos números de coordenação de silício e titânio^{98,99}.

Para adaptar de forma adequada o suporte à proteína, o conhecimento detalhado a respeito da enzima utilizada, ou seja, suas propriedades bioquímicas e reação que catalisa, são informações importantes¹⁰⁰. Uma maneira de planejar as características físico-químicas de materiais à base de óxidos inorgânicos utilizados como suporte, como sua estrutura de poros, área superficial e química de superfície é através do método sol-gel de síntese.

3.4.3.1. Método Sol-Gel de Síntese

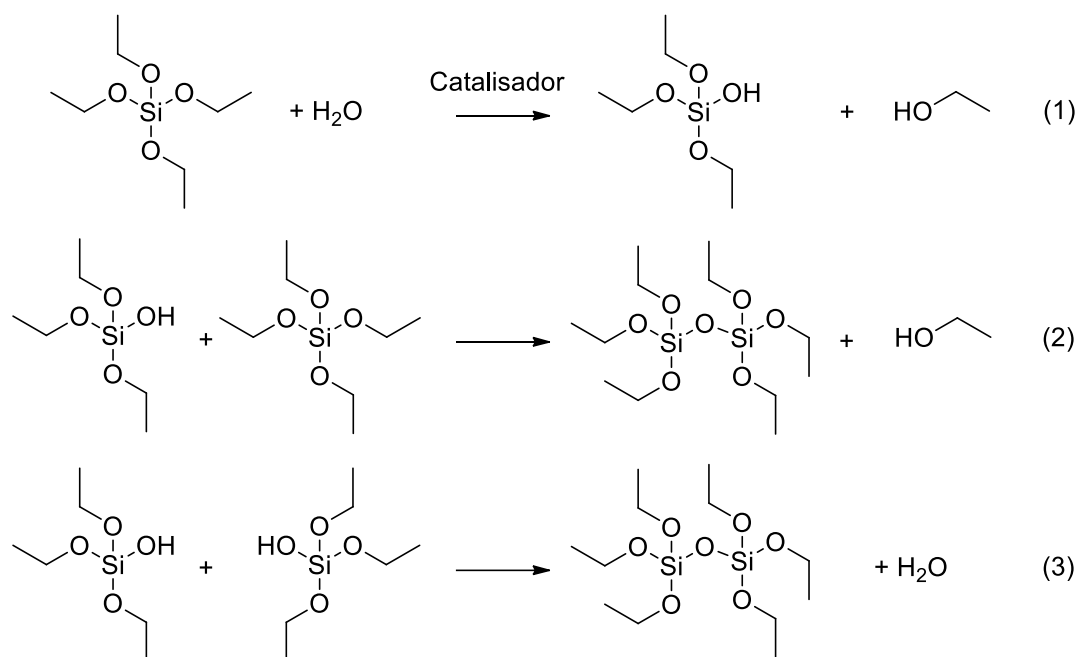
Como alternativa a reações convencionais de química do estado sólido, o método de polimerização inorgânica de gelificação em solução (*sol-gel*) surge como uma técnica capaz de produzir materiais no estado sólido a partir de um precursor quimicamente homogêneo. Pela mistura a nível molecular dos reagentes é possível produzir materiais inorgânicos

complexos, com controle da morfologia e tamanho de partículas, em baixas temperaturas e curtos tempos de síntese¹⁰¹. Materiais obtidos pelo método sol-gel apresentam funcionalidades para um elevado número de aplicações incluindo, além da síntese e análise química, liberação controlada, revestimentos, adsorção, cromatografia, biotecnologia, entre outros⁴⁰.

O termo “sol-gel” (solução-gelificação) foi reportado pela primeira vez por Graham, em 1964, durante sua pesquisa sobre sílica.¹⁰² Anteriormente, em 1864, Ebelmen já havia observado a formação de um vidro transparente como resultado da exposição à atmosfera de um silano a partir da reação entre tetraclorosilano (SiCl_4) e etanol¹⁰³.

A química sol-gel é baseada na obtenção de cerâmicas ou polímeros inorgânicos a partir da solução por meio da transformação de precursores líquidos em um sol e em uma estrutura de rede denominada gel. O sol é constituído pela dispersão de partículas coloidais (definida pela IUPAC como uma dispersão de uma fase em outra, onde a fase dispersa apresenta dimensão entre 1 e 1000 nm) estáveis em um líquido, enquanto o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal), devido alterações apropriadas de condições físico-químicas da suspensão, ou por cadeias poliméricas (gel polimérico), preparadas por soluções que irão promover as reações de polimerização^{101,104,105}.

A síntese sol-gel é baseada em reações de policondensação hidrolítica, à temperatura ambiente e sob condições controladas. Os precursores geralmente utilizados são soluções aquosas de sais inorgânicos ou de alcóxidos de silício dissolvidos em co-solventes orgânicos, uma vez que os alcoxisilanos não serem solúveis em água. No Esquema 1 a seguir estão representadas as reações simultâneas ou sequenciais de hidrólise (1), produzindo grupos silanóis reativos, e policondensação, formando uma rede reticulada tridimensional com ligações siloxano (Si-O-Si), liberando água (2) e/ou álcool (3), para o precursor ortosilicato de tetraetila (TEOS).



Esquema 1. Reações de hidrólise e condensação do ortosilicato de tetraetila.

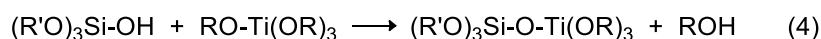
Ao longo da etapa de condensação, as reações de gelificação formam um estado sol, caracterizado por apresentar oligômeros que formam as cadeias de dimensões coloidais e partículas primárias dispersas. A evolução desse sistema leva a formação do estado gel, caracterizado pela conectividade entre as partículas coloidais, originando uma rede tridimensional macroscópica³⁹.

Devido à baixa polaridade da ligação Si-O (nos alcóxidos), o processo de gelificação é consideravelmente lento, sendo essencial a utilização de catalisadores. A escolha do catalisador é um processo importante do método sol-gel, uma vez que a hidrólise e condensação são sensíveis ao meio, é possível controlar a síntese por meio da catálise ácida ou básica. Na gelificação em meio ácido de Bronsted, ocorre o ataque do ácido ao oxigênio ligado ao silício (Si-OH ou Si-OR), favorecendo sua eliminação e posterior ataque nucleofílico ao silício (de grupos H₂O na hidrólise ou Si-OH na condensação). Assim, a utilização de catalisador ácido resulta na união de cadeias para formação de géis poliméricos, formando uma matriz compacta com poros de diâmetro menor que 2 nm e denominados microporos. Na gelificação em meio básico, ocorre o ataque nucleofílico ao silício mais ácido e reticulado (por HO⁻ para hidrólise ou Si-O⁻ para condensação). A utilização de catalisador básico resulta no crescimento do gel coloidal, formando partículas primárias esféricas com poros de diâmetro entre 2 e 50 nm e denominados mesoporos. O ânion fluoreto (na forma de

HF ou NaF) é usualmente empregado como catalisador, tanto em meio ácido quanto básico, apresentando processo de gelificação eficiente e resultando em materiais com menor tamanho de partícula, maior volume de poros e maior área superficial^{39,40}.

Outros alcóxidos metálicos, como os tetra-alcóxidos de titânio (Ti(OR)₄), podem seguir reações semelhantes às dos alcóxidos de silício. No entanto, como o titânio apresenta eletronegatividade mais baixa do que o silício, as taxas de hidrólise são substancialmente mais elevadas, levando a problemas na síntese desses materiais devido à separação das fases durante as etapas de condensação. Em consequência da elevada taxa de hidrólise, muitos alcóxidos de metais de transição reagem violentamente com água e necessitam manuseio e armazenamento especial^{98,101,105}.

Da mesma maneira, o método sol-gel pode ser utilizado para a obtenção de óxidos mistos de silício e titânio, conforme esquema 2 a seguir. Um problema associado à essa metodologia é a separação das fases devido às taxas desiguais de hidrólise entre os alcóxidos, já que alcóxidos de titânio, como por exemplo o tetraisopropóxido de titânio (TIPOT), hidrolisam em água mais rapidamente do que alcóxidos de silício, como o ortosilicato de tetraetila (TEOS). Esse problema pode ser contornado pela pré-hidrólise do TEOS antes da adição do TIPOT, além do controle do pH do meio^{98,105}.



Esquema 2 Reação para a obtenção de óxidos mistos de silício e titânio

De forma geral, o método sol-gel é bastante interessante para o preparo de materiais com estruturas distintas. Devido à cinética lenta dos alcóxidos de silício, o controle das condições experimentais de síntese, como escolha do catalisador, solvente utilizado e condições de evaporação do solvente, são importantes para arquitetar as características finais dos materiais preparados. Assim, é possível obter materiais com diferentes propriedades para variadas e promissoras áreas de aplicação^{39,40,101,104}.

3.4.4. ÓXIDOS MISTOS RECOBERTOS COM QUITOSANA

A demanda por novos materiais alternativos e tecnologias verdes trouxe realizações no campo dos materiais bioinspirados. O interesse em abordagens promissoras para a síntese de materiais a partir de fontes ambientalmente sustentáveis se tornou uma prioridade em diversas áreas. Uma excelente alternativa para aplicação como suporte para a imobilização de enzimas é a introdução de componentes orgânicos funcionalizados em matrizes inorgânicas porosas^{97,106}.

A combinação dos aditivos orgânicos e inorgânicos apresenta ao material novas propriedades interessantes e potenciais utilizações. O preparo desses materiais permite a combinação de propriedades de ambas as classes de materiais, incluindo a elevada estabilidade térmica, resistência mecânica e propriedades texturais provenientes da fração inorgânica, com a biocompatibilidade e reatividade de grupos funcionais provenientes da fração orgânica. Nesse sentido, novos materiais com tamanho e volume de poros ajustáveis, elevada área superficial e organicamente funcionalizados foram desenvolvidos^{97,106}.

Novos compostos de sílica e quitosana vem sendo desenvolvidos pelo Laboratório de Sólidos e Superfícies e pelo Laboratório de Enzimologia da UFRGS. Ricardi et al. (2018)¹⁰⁷ abordaram a preparação de um material compósito à base de sílica e quitosana, utilizado como suporte para a imobilização da enzima β -D-galactosidase de *K. Lactis*. O biocatalisador proposto apresentou resultados de atividade elevados para hidrólise da lactose e alta estabilidade operacional. Entretanto, após estudo da estrutura e morfologia do suporte proposto, foi observado que a quitosana estava dispersa em nível micrométrico na matriz de sílica, não disponibilizando todos seus grupos funcionais para ligação com a enzima, reduzindo o rendimento de imobilização. Esse trabalho possibilitou a elucidação da estrutura e morfologia dessa classe de materiais, possibilitando a otimização da síntese visando a dispersão da quitosana em nível molecular e em maior extensão na matriz e assim melhorar a atividade residual do biocatalisador.

Espécies orgânicas podem ser incorporadas em matrizes a base de óxidos mistos de sílica/titânia. Isso é possível em razão da superfície da titânia ser quimicamente reativa devido à presença de sítio ácidos de Lewis que possibilita a interação com o átomo de nitrogênio básico do grupo $-NH_2$ das biomoléculas (Figura 10). Como consequência, espécies como quitosana e enzimas podem ser adsorvidas em suportes porosos sem a necessidade de funcionalização da superfície¹⁰⁶.

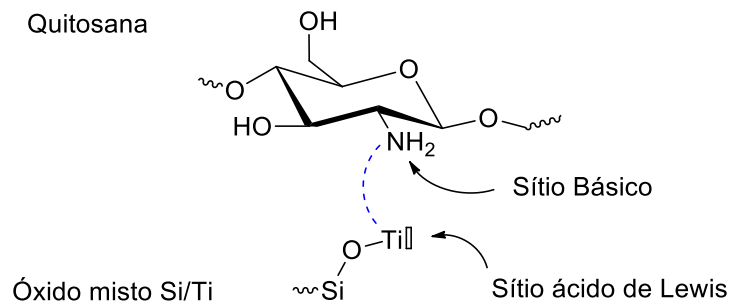


Figura 10. Representação da estrutura sugerida para a ligação química entre a matriz inorgânica e a quitosana, adaptado de El Kadib & Bousmina (2012).

A incorporação de quitosana em uma matriz de óxidos mistos de sílica/titânia é uma maneira de aprimorar as propriedades tecnológicas e biológicas do suporte. É considerado um material promissor devido à combinação das propriedades estruturais exibindo melhores características físico-químicas, mecânicas e térmicas, além da alta biocompatibilidade e grupos funcionais provenientes da quitosana. Entretanto, ainda são necessárias pesquisas para padronizar e aprimorar essa classe de material, tornando sua implementação segura para aplicações industriais^{97,106}.

Nessa perspectiva, este trabalho irá descrever o desenvolvimento de materiais à base de óxidos mistos de sílica/titânia, obtidos pelo método sol-gel, e recobertos com diferentes proporções de quitosana e aplicados como suportes para a imobilização da enzima β -D-galactosidase. Dessa forma, é fornecido um ambiente compatível com as biomoléculas, aliando as propriedades mecânicas dos óxidos inorgânicos e a biocompatibilidade da quitosana, trazendo benefícios à enzima imobilizada, buscando melhorar sua atividade e estabilidade.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES UTILIZADOS

Na realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese dos suportes: ortosilicato de tetraetila (TEOS, 98%, Sigma-Aldrich), isopropóxido de titânio (TIPO, 97%, Sigma-Aldrich), ácido clorídrico (HCl, 37%, Emsure Merck), ácido fluorídrico (HF, 40%, Sigma-Aldrich), etanol (99,9%, Emsure Merck), quitosana de baixa massa molecular (75-85% desacetilada, Sigma-Aldrich), Genipina de *Genipa americana* obtida pelo método aquoso bifásico segundo a metodologia de Bellé et al.¹⁰⁸, 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS, 97%, Sigma-Aldrich), glutaraldeído (solução aquosa 25%, Sigma-Aldrich) e hidróxido de sódio (99,5%, Dinâmica). A enzima utilizada foi a preparação comercial líquida de β -D-galactosidase do micro-organismo *Kluyveromyces lactis* MAXILACT® LX-5000 (DSM Food Specialties). Os substratos utilizados para avaliação da atividade enzimática foram: *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*-NPG, Sigma-Aldrich), fosfato de potássio monobásico anidro (99,5%, Nuclear), fosfato de potássio dibásico anidro (99,5%, Nuclear), cloreto de magnésio (99,5% Synth), carbonato de sódio (99,5% Neon), bicarbonato de sódio (99,5% Neon), cloreto de sódio (99,5%, Nuclear), etilenoglicol (99,5% Dinâmica), D(+)-lactose (Dinâmica) e kit de determinação de D-Glucose (In Vitro Diagnóstica). Os reagentes utilizados eram de grau analítico sem purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

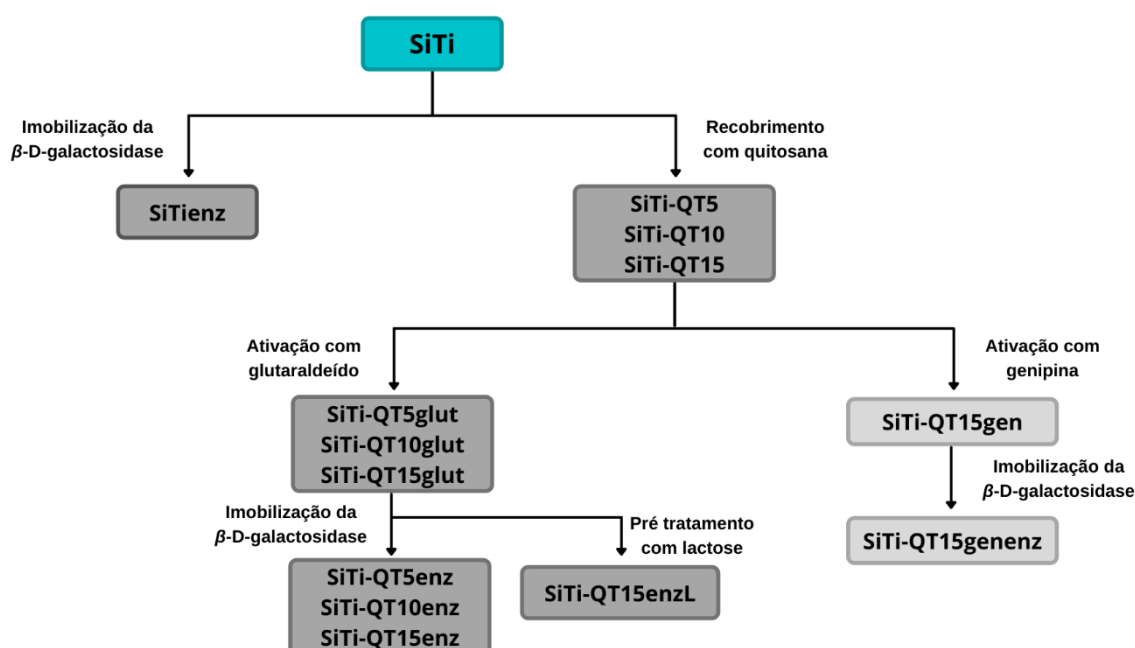
4.2. PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS

4.2.1. Síntese da matriz de sílica/titânia

A síntese dos óxidos mistos de sílica/titânia foi realizada pelo método sol gel segundo a metodologia de Laranjo et al.¹⁰⁹. O material foi planejado para apresentar 70% de sílica e 30% de titânia, utilizando como precursores alcóxidos de silício e titânio. A hidrólise do precursor se deu pela adição de 5,0 mL de TEOS em 7,0 mL de etanol, após foram adicionados 0,6 mL de água destilada e 0,2 mL de HCl (37%). Após 1 hora sob agitação magnética, foi adicionado à solução 2,0 mL de TIPO e, como catalisador, uma solução

contendo 1,5 mL de HF (40%) e 1,0 mL de HCl (37%). Para a formação do gel, o sistema permaneceu em repouso a temperatura ambiente durante 15 dias. Após esse tempo, o xerogel obtido foi triturado até que passasse por uma peneira padrão série Tyler 80 mesh, lavado com porções de água destilada e etanol e seco a vácuo a temperatura de 90 °C durante 2 horas. Esse material foi denominado SiTi.

Os biocatalisadores utilizados nesse trabalho foram preparados de acordo com as etapas apresentadas no Esquema 2 a seguir:



Esquema 3. Diagrama mostrando as etapas para preparação dos biocatalisadores.

4.2.2. Recobrimento do material com quitosana

Para a modificação da superfície da matriz de sílica/titânia, diferentes quantidades de quitosana foram imobilizadas no material por reação de enxerto de modo a conter 5, 10 e 15% de quitosana em massa na solução inicial, conforme metodologia de Laranjo et al.¹⁰⁹. Inicialmente diferentes quantidades de quitosana foram dissolvidas em 10,0 mL de água destilada e 0,3 mL de HF (40%), permanecendo sob agitação magnética até homogeneização¹⁰⁹. O pH da solução foi elevado a 6,0 pela adição de solução de NaOH 0,1

mol L⁻¹. A solução foi transferida para um balão onde foram adicionados 1,0 g do material de sílica/titânia (SiTi), permanecendo sob agitação mecânica numa rotação de 50 RPM por 24 horas. Após esse tempo, o material foi lavado com porções de água destilada e etanol e seco a vácuo durante 2 horas. Esses materiais foram denominados SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 (Esquema 3).

4.2.3. Ativação do suporte com glutaraldeído

Para a ativação da superfície, os materiais sintetizados SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 foram incubados em uma solução contendo 1,0 mmol de glutaraldeído por grama de material. O sistema permaneceu em agitação durante 3 horas. O material ativado foi lavado com diversas porções de água destilada para remoção do excesso de glutaraldeído e seco a vácuo durante 2 horas. Esses materiais foram denominados SiTi-QT5glut, SiTi-QT10glut e SiTi-QT15glut (Esquema 3).

4.2.4. Ativação do suporte com genipina

Para a ativação da superfície, o material sintetizado SiTi-QT15 foi incubado em uma solução contendo 0,5 mmol de genipina por grama de material. O sistema permaneceu em agitação magnética durante 1 hora em banho termostaticamente controlado à 60 °C. O material ativado foi lavado com porções de água destilada para remoção do excesso de genipina e seco a vácuo durante 2 horas. Esse material foi denominado SiTi-QT15gen.

4.2.5. Imobilização da enzima β -D-galactosidase

Os suportes preparados foram imobilizados em uma solução enzimática de carga 13 mg g⁻¹ de proteína em tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo MgCl₂ 1,5 mmol L⁻¹¹⁰⁷. Para cada 0,010 g de cada suporte (SiTi, SiTi-QT5glut, SiTi-QT10glut, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15gen), foi adicionado 1,0 mL da solução enzimática (22 U). Os materiais permaneceram em contato com a solução enzimática a temperatura ambiente (25 °C) sob agitação moderada durante 18 horas. Após o período de imobilização, os

biocatalisadores foram lavados com alíquotas de 1,0 mL do tampão e com solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹ e etilenoglicol 30% v/v, a fim de eliminar as enzimas não ligadas covalentemente. Para separar enzima e sobrenadante, após cada lavagem os materiais foram centrifugados a 5500.g durante 1 minuto. As alíquotas dos sobrenadantes de cada lavagem recolhidas para posterior quantificação da atividade enzimática. Esses materiais foram denominados SiTienz, SiTi-QT5enz, SiTi-QT10enz, SiTi-QT15enz e SiTi-QT15genenz.

Adicionalmente, lactose foi utilizada como pré-tratamento durante o processo de imobilização da enzima β -D-galactosidase, de forma a induzir sua imobilização com o sítio ativo exposto. Para tal, a solução enzimática adicionada a uma solução de lactose 25 mmol L⁻¹ e mantida durante 1 hora sob agitação. Após esse período, 0,010 g do suporte SiTi-QT15glut foi adicionado a 1,0 mL dessa solução, permanecendo durante 18 horas sob agitação moderada a temperatura ambiente. O processo de lavagem e recolhimento das alíquotas de sobrenadantes foi análogo ao descrito anteriormente. Esse material foi denominado SiTi-QT15enzL.

4.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL DESENVOLVIDO

4.3.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Os materiais foram caracterizados via análise termogravimétrica 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 850 °C.

4.3.2. Análise elementar

A análise elementar dos materiais foi realizada utilizando um espectrômetro de raios X por dispersão em energia conservativa (EDS) Thermo-Fisher acoplado a um microscópio modelo JEOL LV5800. Os materiais foram compactados como discos a 4,6 ton cm⁻² e metalizados com carbono para evitar o carregamento elétrico. Os teores de SiO₂ e TiO₂ foram obtidos pelo procedimento de quantificação utilizando o *software* Noran System Six, filtro *top-hat* para remoção do ruído de fundo e fator $\phi(\rho Z)$ para corrigir os efeitos da matriz.

4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos materiais foi investigada através de imagens de MEV obtidas utilizando um microscópio eletrônico com emissão de campo FEI modelo Inspect F50. Os materiais foram dispersos em uma fita condutora dupla-face em um suporte de alumínio, onde foram recobertos por uma fina camada de ouro. Foi realizada análise elementar por espectroscopia de raios X por dispersão em energia dos materiais.

4.3.4. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂

Para obtenção das isotermas de adsorção e dessorção de N₂ dos materiais foi utilizado o equipamento Tristar II Krypton 3020 Micromeritics, na temperatura do nitrogênio líquido (77 K). A curva de distribuição de tamanho de poros dos materiais foi obtida pela aplicação do método BJH (Barret, Joyner e Halenda)¹¹⁰ e a área superficial específica dos materiais foi obtida utilizando o método BET (Brunauer, Emmett e Teller)¹¹¹.

4.3.5. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho dos materiais foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 1000 FT-IR. A técnica KBr foi usada para obtenção dos espectros.

4.3.6. Difração de raios X

A análise de difração de raios X foi realizada com os materiais na forma de pó, em um difratômetro Siemens BRUKER AXS D-5000, utilizando radiação Cu-K α e operando a 40 kV/25 mA com monocromador de grafite no feixe secundário. As amostras foram analisadas a 0,05 s⁻¹ e os padrões foram obtidos na faixa de 5° a 90° 2 θ .

4.4. TESTES BIOCATALÍTICOS

4.4.1. Teste de atividade enzimática

A atividade hidrolítica tanto da enzima solúvel quanto da imobilizada foi avaliada utilizando *o*-NPG como substrato na temperatura de 37 °C. A liberação de *o*-nitrofenol a partir do *o*-NPG é medida espectrofotometricamente a 415 nm. Uma unidade (U) de β -D-galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 μ mol de *o*-NPG, para *o*-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio, a partir da curva padrão do produto da reação. Na Figura 11 a seguir está representada a reação de hidrólise do *o*-NPG.

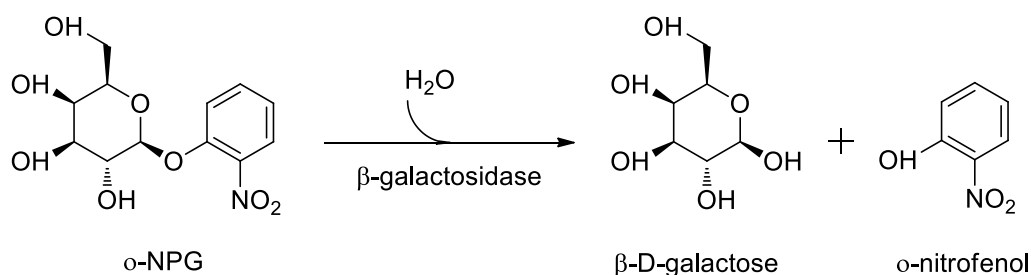


Figura 11. Reação de hidrólise do *o*-NPG

A análise da atividade hidrolítica da enzima livre, ou seja, a solução oferecida na etapa de imobilização da enzima nos suportes, foi realizada pela reação de hidrólise do *o*-NPG 30,0 mmol L⁻¹ a 37 °C. As medidas foram realizadas em um volume de ensaio de 0,5 mL contendo 270 μ L de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1,5 mmol L⁻¹, 180 μ L de *o*-NPG e 50 μ L da solução enzimática. Após 2 minutos a reação é interrompida pela adição de 1,5 mL de tampão carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 10,0. Esse mesmo procedimento foi utilizado para a determinação da atividade hidrolítica das alíquotas retiradas nas etapas de lavagens com tampão, NaCl e etilenoglicol.

A análise da atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi realizada incubando 0,010 g do biocatalisador em 1,62 mL de tampão fosfato potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂ 1,5 mmol L⁻¹. Sob agitação constante, à essa mistura foram adicionados 1,08 mL de *o*-

NPG 30 mmol L⁻¹ e, após 30 segundos, a reação foi interrompida pela adição de 9,0 mL de tampão carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 10,0.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados de atividade hidrolítica obtidos foram utilizados para calcular os parâmetros de imobilização, conforme descrito nas equações a seguir¹³:

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

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

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

A Equação 1 descreve o cálculo do rendimento de imobilização, que avalia quanto da atividade inicial da enzima aplicada permaneceu efetivamente imobilizada no suporte. A Equação 2 descreve a eficiência de imobilização, a qual avalia o quanto da atividade da enzima imobilizada permaneceu realmente ativa. A Equação 3 descreve a atividade recuperada, parâmetro utilizado para avaliar o efeito da imobilização, relacionando a atividade da enzima imobilizada com a atividade inicial da enzima aplicada¹³.

4.4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima da reação (V_{max}), da enzima livre e imobilizada (SiTi-enz e SiTi-15enz) foram determinados por um gráfico Lineweaver-Burk, usando concentrações crescentes de *o*-NPG em solução de concentração entre 5 e 50 mmol L⁻¹, em tampão fosfato de potássio pH 7,0, sob agitação constante a 37 °C. Os valores K_M e V_{max} foram obtidos a partir de um gráfico $\frac{1}{V}$ vs $\frac{1}{[S]}$, onde V é a velocidade da reação e $[S]$ é a concentração de *o*-NPG. A partir da regressão linear do

gráfico de Lineweaver-Burk, obtém-se a equação da reta $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$, a qual apresenta uma inclinação de $\frac{K_M}{V_{max}}$ e uma intersecção no eixo em $\frac{1}{V_{max}}$.

4.4.3. Estabilidade em diferentes pH(s)

A estabilidade em diferentes pH(s) foi avaliada para a enzima livre e imobilizada. O procedimento ocorreu realizando a hidrólise do *o*-NPG a 37 °C, conforme descrito no item 4.4.1., utilizando tampão fosfato potássio 0,1 mol L⁻¹ contendo MgCl₂ 1,5 mmol L⁻¹ nos pH(s) 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0.

4.4.4. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada para a enzima livre e imobilizada nos suportes. Os biocatalisadores foram incubados em recipientes contendo tampão de atividade em banho controlado termostaticamente nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C. Após intervalos de tempo definidos, as amostras eram retiradas do banho e resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação térmica. As atividades hidrolíticas residuais foram determinadas como descrito no item 4.4.1.

4.4.5. Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de armazenamento foi avaliada para os biocatalisadores SiTienz, SiTi-QT15enz em enzima livre. O ensaio ocorreu pela incubação dos biocatalisadores em uma solução tampão fosfato de potássio pH 7,0, na geladeira a 4 °C, por 35 dias. Após o período de armazenamento, os biocatalisadores foram empregados na hidrólise do *o*-NPG para determinação das atividades enzimáticas remanescentes, conforme descrito no item 4.4.1. Os testes foram realizados em duplicata, num intervalo de 7 dias.

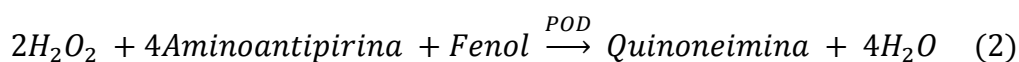
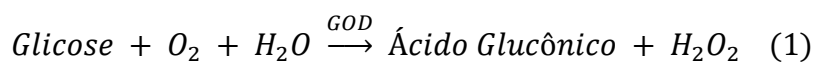
4.4.6. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos biocatalisadores foi avaliada pela reação de hidrólise da lactose em reator em batelada e em reator de fluxo contínuo com leito fixo.

a) Reator em batelada

A estabilidade operacional dos biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz foi avaliada pela reação de hidrólise da lactose em ciclos de batelada. Para realização do experimento foram incubados 10,0 mg biocatalisador em 1,0 mL de uma solução de lactose de concentração 50 g L⁻¹. A reação ocorreu em banho controlado termostaticamente a 37 °C durante 1 hora sob agitação. Após cada ciclo de hidrólise, os biocatalisadores foram filtrados, lavados com tampão e adicionados a uma nova solução de lactose para iniciar um novo ciclo de hidrólise. Uma alíquota do produto formado era recolhida para quantificação da glicose formada, determinada pelo método enzimático colorimétrico sem desproteinização (GOD-PAP).

A quantidade de glicose formada pela reação de hidrólise da lactose pelos biocatalisadores foi determinada a partir da 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 as reações representadas a seguir:



Após cada reação, uma alíquota do produto hidrolisado foi recolhida e diluída 20 vezes em solução de NaCl 0,01 mol L⁻¹. O ensaio foi realizado pela mistura de 10,0 µL do produto diluído com 1,0 mL do reagente, permanecendo durante 15 minutos a 37 °C. Após foi feita a leitura espectrofotométrica a 505 nm.

b) Reator de leito fixo

A estabilidade operacional da enzima imobilizada no suporte SiTi-QT15enz foi determinada pela hidrólise da lactose utilizando um reator de leito fixo (Figura 12). O reator consistiu de uma coluna de vidro contendo 1,0 g do biocatalisador e o substrato foi uma solução de lactose de concentração 50 g L^{-1} . O fluxo de substrato foi controlado¹¹² por bomba peristáltica em $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. A coluna de leito fixo ($5,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$) possui uma entrada na parte inferior e saída na parte superior, ambas equipadas com lã de vidro para reter as partículas de suporte dentro da coluna. A solução de lactose foi mantida na temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após tempos pré-estabelecidos, alíquotas do produto hidrolisado eram recolhidas e a formação de glicose foi analisada pelo método enzimático colorimétrico conforme descrito acima.



Figura 12. Fotografias do sistema contendo o reator utilizado no experimento, contendo o biocatalisador SiTi-QT15enz.

4.4.7. Análise estatística

Os experimentos dos testes biocatalíticos foram realizados em triplicata, utilizando três amostras independentes. A análise estatística foi conduzida usando o *software* livre Past, v. 4.03 da Oyvind Hammer. Os resultados foram expressos como “média \pm desvio padrão” (como “ $X \pm DP$ ”) obtidas pelas três determinações. A análise de variância (ANOVA) e distinção entre os valores médios dos diferentes tratamentos foi avaliada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

No presente trabalho foi preparado um óxido misto planejado para apresentar 70% de sílica e 30% de titânia (SiTi), utilizando como precursores alcóxidos de silício e de titânio. Conforme descrito anteriormente, as matrizes foram sintetizadas pelo método sol gel, foram recobertas com quitosana usando soluções de diferentes concentrações (SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15), ativadas com glutaraldeído (SiTi-QT5glut, SiTi-QT10glut e SiTi-QT15glut) ou genipina (SiTi-QT15gen) e utilizadas para a imobilização da enzima β -D-galactosidase. Os materiais preparados foram caracterizados quanto a sua morfologia, propriedades texturais e físico-químicas e seu desempenho como biocatalisador foi avaliado por testes de atividade hidrolítica enzimática para avaliação dos parâmetros de imobilização, estabilidade térmica, pH ótimo de operação e estabilidade operacional. Os dados obtidos nas caracterizações bem como os resultados de atividade biocatalítica estão apresentados na sequência deste trabalho.

5.1.1. Análise Termogravimétrica

De modo a comprovar a incorporação de material orgânico nas matrizes, foram realizadas análises termogravimétricas das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15, antes e após as modificações na superfície e a imobilização da enzima β -D-galactosidase, as quais estão apresentadas nas Figura 13, Figura 14, Figura 15 e Figura 16. As análises foram realizadas sob fluxo de argônio, com taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, entre temperatura ambiente até $850\text{ }^{\circ}\text{C}$.

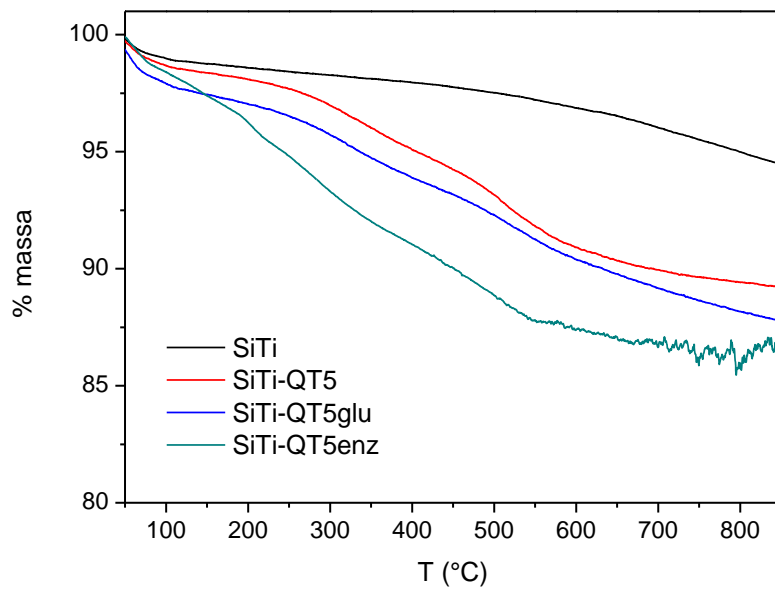


Figura 13. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT5 antes e após as modificações.

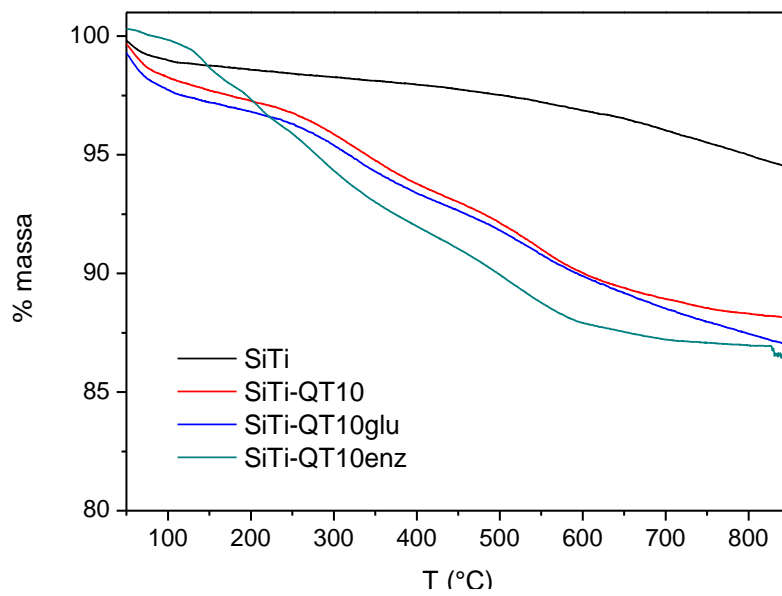


Figura 14. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT10 antes e após as modificações.

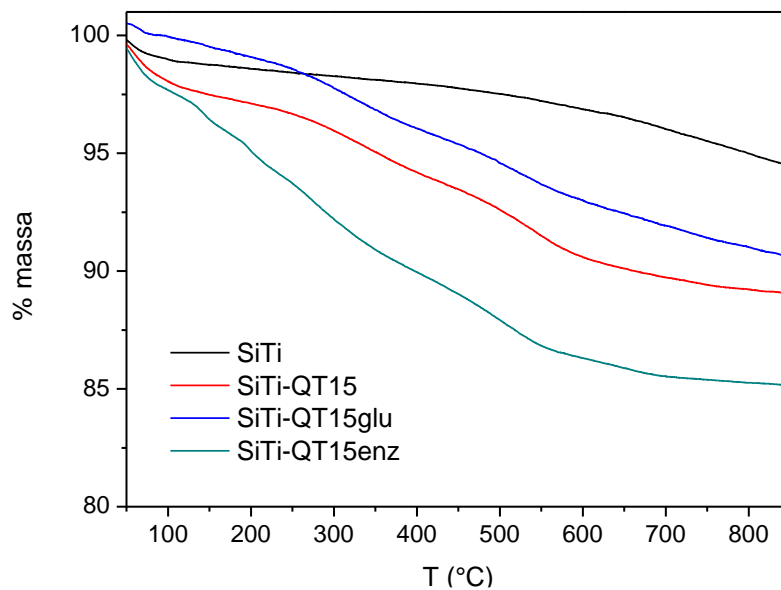


Figura 15. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi e SiTi-QT15 antes e após as modificações.

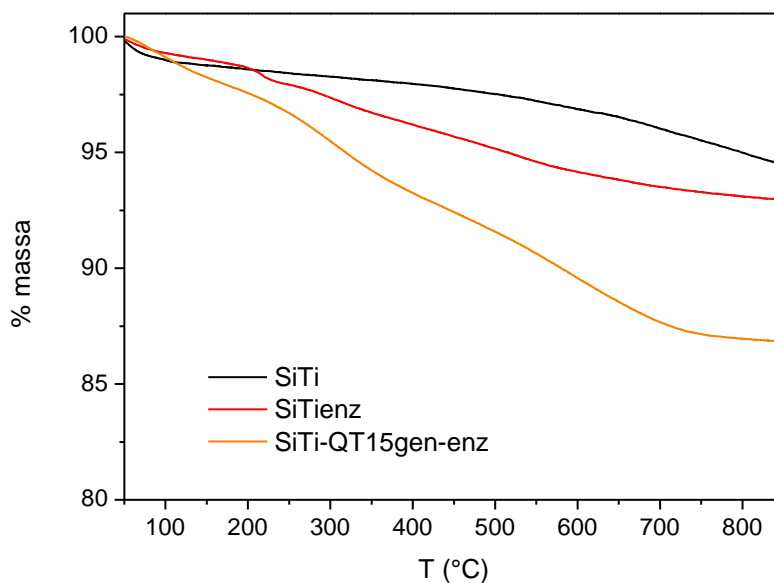


Figura 16. Curvas termogravimétricas das matrizes SiTi, SiTienz e SiTi-QT15gen-enz.

São observadas na análise de todos os termogramas duas regiões de perdas de massa. Uma região de perda de massa que ocorre até 150 °C, atribuída a dessorção de água da superfície dos materiais. A região de perda de massa entre 150 e 650 °C é atribuída à desidroxilação dos silanóis de sílica¹¹³ e à dessorção e decomposição dos compostos

orgânicos, provenientes das modificações das matrizes com quitosana, glutaraldeído e imobilização da enzima.

Para melhor interpretar os resultados dos termogramas, na Tabela 1 estão apresentadas as quantificações em porcentagem de perda de massa orgânica dos materiais, na faixa de 0 a 650 °C. Os dados da tabela foram utilizados para estimar o conteúdo orgânico correspondente ao total de material orgânico presente nas matrizes e após cada etapa das modificações realizadas. Para tal, foi realizada a diferença entre os valores de perda de massa encontrados para os materiais modificados pelo valor encontrado para a matriz de sílica/titânia (SiTi).

Tabela 1. Perdas de massa percentual das matrizes SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 e suas modificações.

Amostra	0 – 150 °C (%)	150 – 650 °C (%)	Conteúdo orgânico (%)	
			Total	Etapas
SiTi	1,24	2,22	-	-
SiTienz	0,99	5,2	2,98	2,98
SiTi-QT5	1,62	7,99	5,77	5,77
SiTi-QT5glut	1,64	8,07	5,86	0,07
SiTi-QT5enz	2,61	10,26	8,04	2,18
SiTi-QT10	1,96	8,25	6,03	6,03
SiTi-QT10glut	0,85	8,90	6,68	0,65
SiTi-QT10enz	1,31	11,12	8,90	2,22
SiTi-QT15	2,51	7,34	5,12	5,12
SiTi-QT15glut	1,63	8,21	5,99	0,87
SiTi-QT15enz	3,54	10,53	8,31	2,32
SiTi-QT15gen-enz	1,76	9,70	7,48	7,48

Conforme apresentado na Tabela 1, na faixa de temperatura de 150 a 650 °C é observada uma maior perda de material orgânico nas matrizes recobertas com quitosana (SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15) em relação à matriz sem componente orgânico em sua composição (SiTi), indicando sua incorporação nas matrizes. Comportamento análogo é observado após a sequência de modificações das matrizes com glutaraldeído e imobilização da enzima, apresentando aumento gradual na porcentagem de perda de massa devido à incorporação dos grupos orgânicos ao material.

Comparando as porcentagens de perda de massa das matrizes SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 na temperatura entre 150 e 650 °C é observada uma perda de massa semelhante de aproximadamente 5%, indicando que, embora tenha sido planejada a adição de uma quantidade superior de quitosana na síntese, a superfície do material atingiu a saturação ao adicionar 5% de quitosana.

A incorporação de glutaraldeído pode ser observada pela diferença entre a porcentagem de perda de massa dos materiais após a modificação com glutaraldeído (SiTi-QT5glut, SiTi-QT10glut e SiTi-QT15glut). Observa-se também que a quantidade de glutaraldeído adicionada foi inferior à utilizada em trabalhos anteriores¹¹⁴. Esse ativador pode sofrer auto reticulação sobre a superfície que causa fechamento dos poros prejudicando a imobilização e também a atividade da enzima. A imobilização da enzima β -D-galactosidase pode ser comprovada pela diferença entre a porcentagem de perda de massa dos materiais após a imobilização da enzima (SiTienz, SiTi-QT5enz, SiTi-QT10enz, SiTi-QT15enz e SiTi-QT15gen-enz), apresentando valores de perda de massa acima de 2%.

5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos materiais SiTi, SiTi-QT5 e SiTi-QT15 pode ser avaliada pelas imagens de elétrons secundários (Figura 17a, Figura 18a e Figura 19a, respectivamente) e elétrons retroespalhados (Figura 17b, Figura 18b e Figura 19b, respectivamente), obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas a seguir:

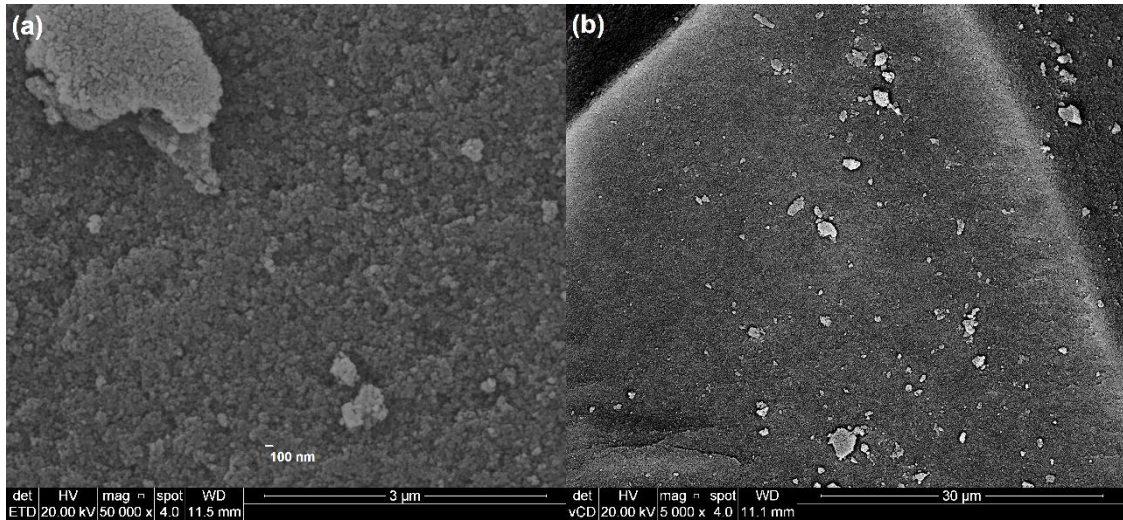


Figura 17. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi (a) ampliada 50000× e (b) ampliada 5000×.

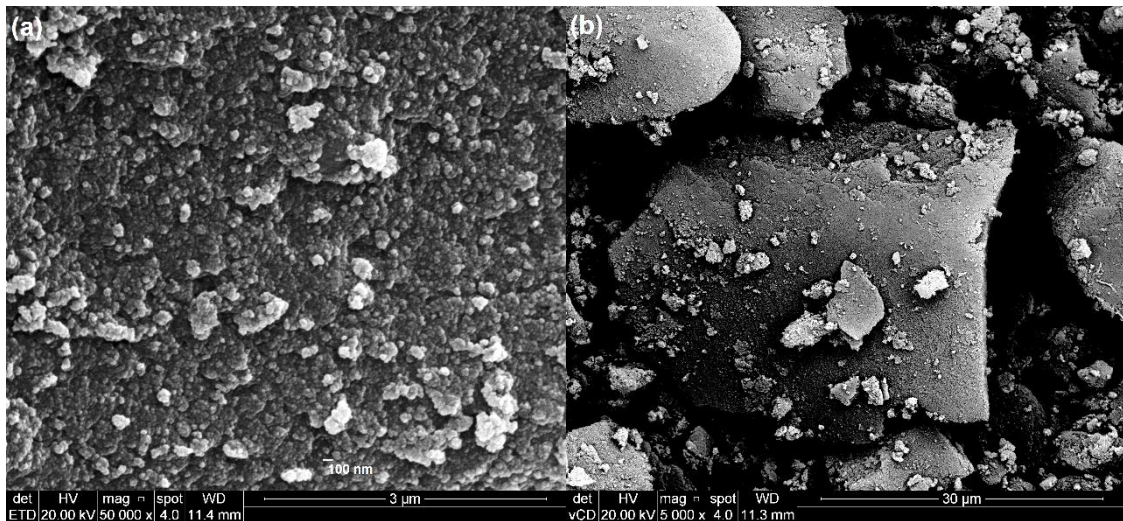


Figura 18. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi-QT5 (a) ampliada 50000× e (b) ampliada 5000×.

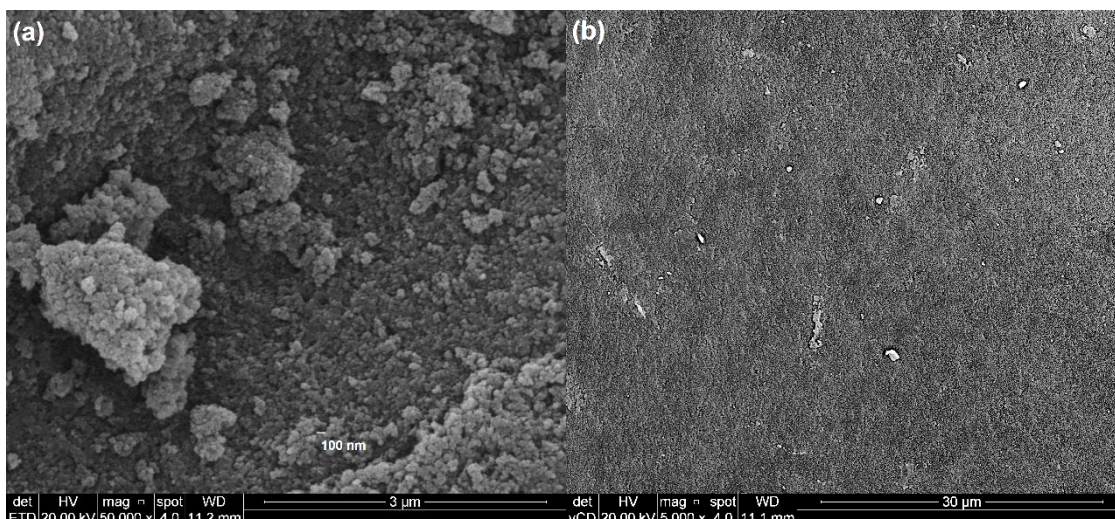


Figura 19. Micrografias obtidas por MEV da amostras SiTi-QT15 (a) ampliada 50000 \times e (b) ampliada 5000 \times .

Nas imagens de elétrons secundários obtidas por MEV (Figura 17a, Figura 18a e Figura 19a) é observado que as amostras apresentaram uma morfologia semelhante, característica de partículas micrométricas obtidas pelo método sol-gel. Conforme sinalizado nas imagens, o xerogel foi formado por aglomeração de partículas primárias de aproximadamente 100 nm. O recobrimento com quitosana não interferiu de forma significativa na morfologia do material.

As imagens de elétrons retroespalhados obtidas por MEV para os materiais estão apresentadas nas Figura 17b, Figura 18b e Figura 19b. Nessas imagens, as substâncias formadas por elementos leves (C, N e O) aparecem mais escuras devido ao baixo poder de retroespalhamento desses átomos, já as substâncias formadas por elementos mais pesados (Si e Ti) aparecem mais claras devido ao maior poder de retroespalhamento. Pelas imagens de elétrons retroespalhados não é possível distinguir os diferentes elementos presentes na amostra nem as diferentes fases dos óxidos de silício e titânio. Esse fato pode indicar que esses elementos estão bem dispersos na amostra.

5.1.3. Análise elementar

A Figura 20 a apresenta a imagem de MEV do material sílica/titânia (SiTi), que foi prensado para a realização da análise, com as respectivas áreas usadas na microanálise e seu

respectivo espectro EDS. Mediante esta análise foi possível estimar que o material apresenta 75,9% em massa de SiO₂ (± 1,4% em massa) e 24,1% em massa de TiO₂ (± 1,4% em massa). Esses valores são compatíveis com a proporção de três para um planejada para a síntese dos óxidos.

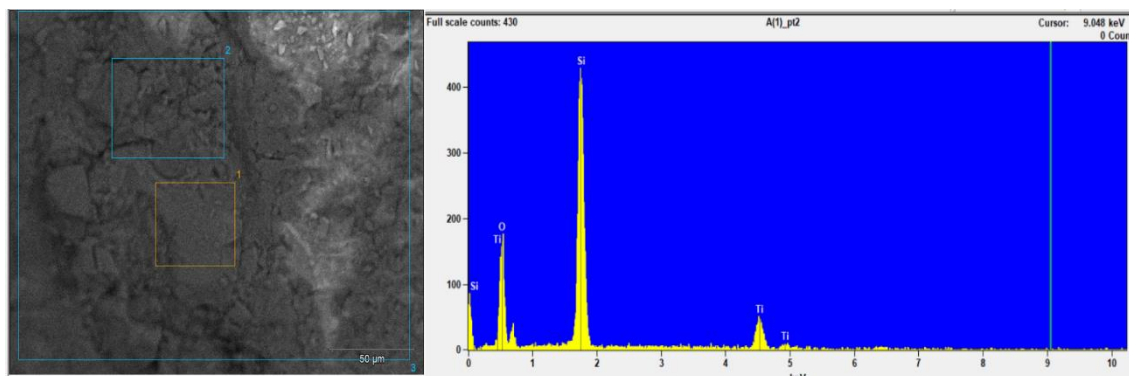


Figura 20. Imagem de MEV com regiões utilizadas para análise elemental e seu respectivo espectro.

5.1.4. Isotermas de Adsorção e Dessorção de N₂

Com a finalidade de investigar as propriedades texturais dos materiais, na Figura 21 são apresentadas as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio e as curvas de distribuição de tamanho de poros obtidas pelo método BJH para os materiais sintetizados (SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10, SiTi-QT15 e SiTienz). Os resultados de área superficial específica (A_{BET}) e volume de poros (V_P) dos materiais estão detalhados na Tabela 2.

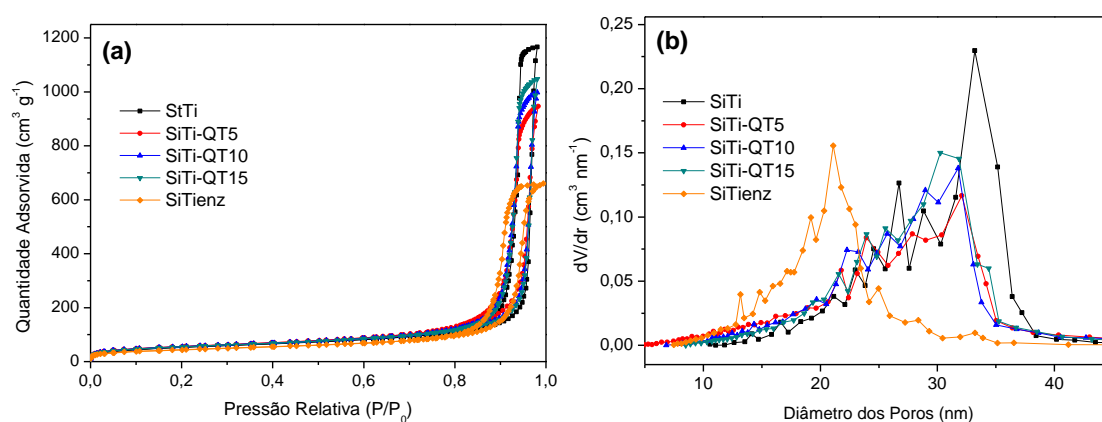


Figura 21. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10, SiTi-QT15 e SiTienz.

Tabela 2. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15.

Amostra	$A_{\text{BET}} (\pm 10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1})$	$V_{\text{P}} (\pm 0,05 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1})$
SiTi	190	1,79
SiTi-QT5	199	1,45
SiTi-QT10	197	1,53
SiTi-QT15	195	1,61

As isotermas dos materiais apresentadas na Figura 21a são classificadas segundo a IUPAC como tipo IV¹¹⁵, características de materiais mesoporosos onde a adsorção ocorre em maiores pressões, sendo observada a formação de histerese. Pelas isotermas obtidas, é observado que a modificação da matriz SiTi com as diferentes concentrações de quitosana implicou a redução no volume de N₂ adsorvido por grama de material, provocando a diminuição do volume de poros de 1,79 cm³ g⁻¹, para a matriz SiTi, para 1,45, 1,53 e 1,61 cm³ g⁻¹ para as matrizes modificadas com quitosana SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15, respectivamente. As curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15, obtidas pelo método BJH são apresentadas na Figura 21b. As curvas indicam que o material apresenta um perfil de distribuição de poros semelhante e sugerem que o recobrimento da superfície do material com quitosana provocou o fechamento dos poros de maiores diâmetros ou o seu revestimento devido ao aumento no volume de poros menores, sendo seus valores máximos em 35 nm para a matriz SiTi e 30 nm para as matrizes modificadas com quitosana. A adição de quitosana não implicou variações expressivas na área superficial específica dos materiais, se mantendo dentro do erro experimental, com valores próximos a 190 m² g⁻¹. Esses resultados, juntamente com os resultados obtidos na análise de TGA, indicam que a superfície do material atingiu a saturação quando adicionados 5% de quitosana. Comportamento semelhante foi observado por Laranjo et al. (2019)¹⁰⁹, onde um compósito de sílica/grafite, obtido pelo método sol-gel, foi modificado com quitosana em diferentes proporções em massa (5, 10 e 15%). Após análise textural desse material, foi

observado que a área superficial específica das amostras contendo 10 e 15% de quitosana se manteve constante, sugerindo a saturação de quitosana na superfície dessas matrizes em 5%.

As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e a distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 antes e após as modificações com quitosana glutaraldeído e enzima estão apresentadas nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24, respectivamente. Os resultados de área superficial específica (A_{BET}) e volume de poros (V_P) dos materiais antes e após as modificações estão especificados na Tabela 3.

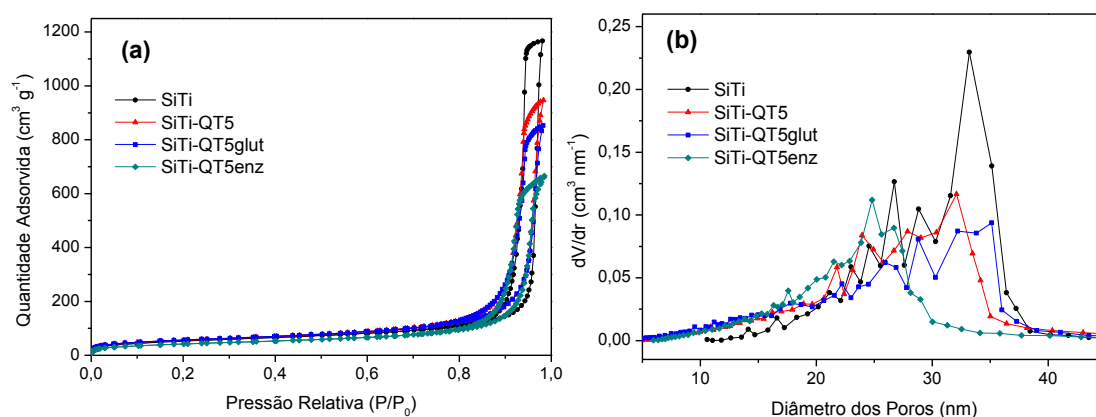


Figura 22. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT5glut e SiTi-QT5enz.

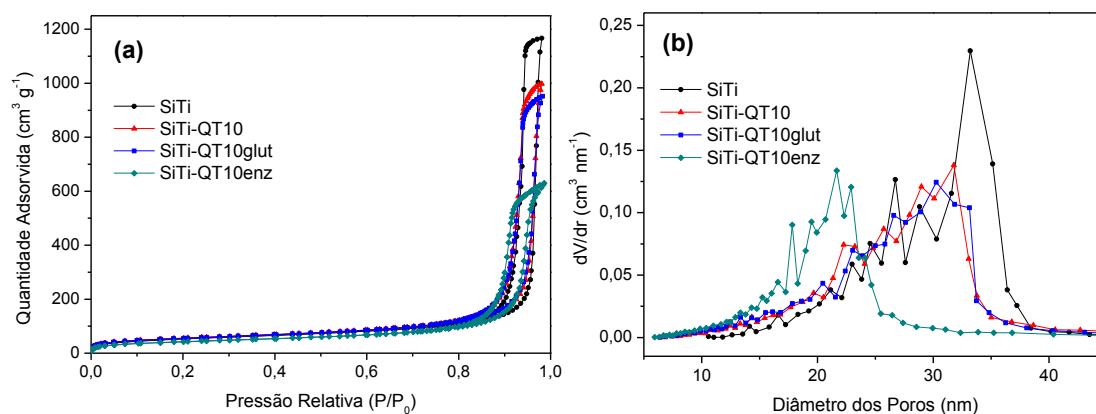


Figura 23. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT10, SiTi-QT10glut e SiTi-QT10enz.

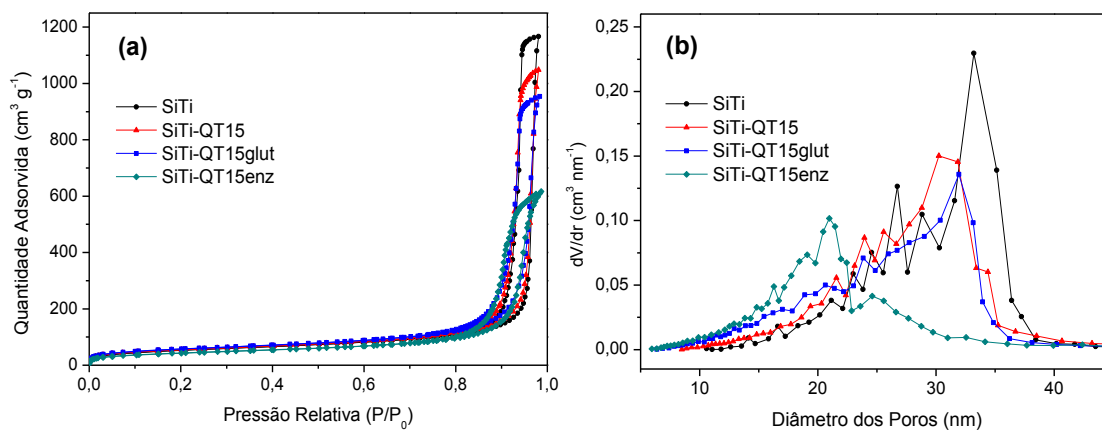


Figura 24. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15enz.

Tabela 3. Área superficial específica e volume de poros matrizes antes e após as modificações

Amostra	A _{BET} (± 10 m ² g ⁻¹)	V _P (± 0,05 cm ³ g ⁻¹)
SiTi	190	1,79
SiTienz	155	1,02
SiTi-QT5	199	1,45
SiTi-QT5glut	201	1,30
SiTi-QT5enz	149	1,02
SiTi-QT10	197	1,53
SiTi-QT10glut	195	1,46
SiTi-QT10enz	151	0,96
SiTi-QT15	195	1,61
SiTi-QT15glut	204	1,46
SiTi-QT15enz	153	0,94

Nas isotermas apresentadas nas Figura 22a, Figura 23a e Figura 24a é observada a diminuição da quantidade de N₂ líquido adsorvida após as modificações com quitosana, glutaraldeído e a imobilização da enzima, provocando diminuição dos volumes de poros, como pode ser observado pelos valores de V_P obtidos na Tabela 3. A área superficial específica da matriz SiTi, se mantém constante dentro do erro experimental após as modificações com quitosana e glutaraldeído, diminuindo de forma mais expressiva após a imobilização da enzima, indicando o bloqueio de parte dos poros do material.

Nas curvas de distribuição de tamanho de poros, apresentadas nas Figura 22b, Figura 23b e Figura 24b, é observado o fechamento de poros de maiores diâmetros conforme foram realizadas as modificações com quitosana, glutaraldeído e principalmente após a imobilização da enzima, apresentando valores máximos em aproximadamente 30 nm. O tamanho do poro apresentado pelo suporte, com e sem modificações com quitosana e glutaraldeído, foi compatível com o tamanho do tetrâmero da enzima, estimado em 15,1 nm × 17,1 nm × 10,7 nm⁶². Dessa forma, é possível a imobilização da enzima no interior dos poros, uma vez que seu tamanho médio é de aproximadamente 20 nm após as modificações.

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15gen e SiTi-QT15gen-enz, onde a genipina foi usada como ativadora, estão apresentadas na Figura 25. Os valores de área superficial específica (A_{BET}) e volume de poros (V_P) dos materiais antes e após as modificações estão descritos na Tabela 4.

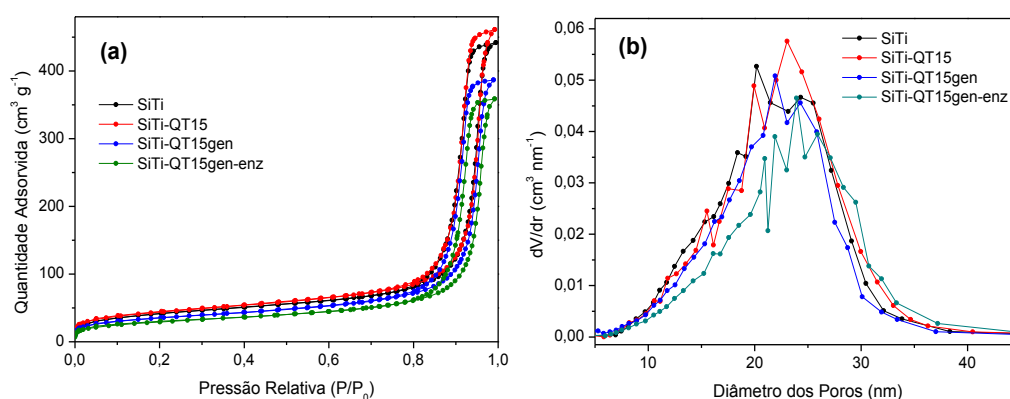


Figura 25. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15gen e SiTi-QT15gen-enz.

Tabela 4. Área superficial específica e volume de poros matrizes SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15gen e SiTi-QT15gen-enz.

Amostra	$A_{\text{BET}} (\pm 10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1})$	$V_{\text{P}} (\pm 0,05 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1})$
SiTi	147	0,65
SiTi-QT15	153	0,68
SiTi-QT15gen	123	0,57
SiTi-QT15gen-enz	103	0,53

Nas isotermas apresentadas na Figura 25a, é observada a diminuição da quantidade de N_2 líquido adsorvida após as modificações com genipina e a imobilização da enzima, diminuindo o volume de poros (V_{P}), conforme apresentado na Tabela 4. Após essa modificação também foi observada a redução da área superficial específica (A_{BET}). Não foram observadas variações expressivas nas curvas de distribuição de tamanho de poros após as modificações das matrizes com quitosana e genipina, apresentando valores máximos em aproximadamente 25 nm. Após a imobilização da enzima ocorreu uma redução no número dos poros menores. Além disso, as isotermas e curvas de distribuição de diâmetro de poros do material modificado com genipina apresentaram comportamento semelhante as apresentadas pelo material modificado com glutaraldeído no que diz respeito a diminuição da quantidade de N_2 líquido adsorvida e variações nas curvas de distribuição de tamanho de poros.

5.1.5. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho dos materiais SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15enz estão apresentados na Figura 26.

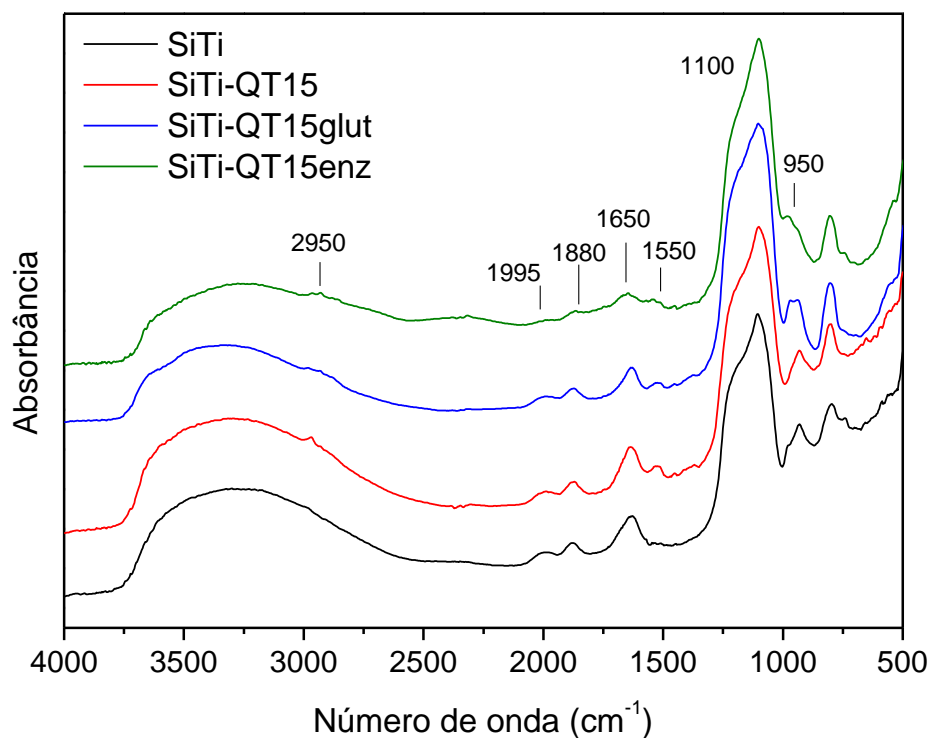


Figura 26. Espectros na região do infravermelho das amostras SiTi, SiTi-QT15, SiTi-QT15glut e SiTi-QT15enz.

Os espectros apresentados na Figura 26 são típicos de materiais à base de sílica. A banda larga em 3300 cm^{-1} corresponde à absorção do estiramento O-H do grupo silanol (-OH). A banda em 2950 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-H e apresentou um pequeno aumento após a incorporação de quitosana no material. As bandas em 1995 e 1880 cm^{-1} correspondem às vibrações de segunda ordem (overtones) de sílica¹¹³. A banda em 1650 cm^{-1} corresponde à deformação angular da água. Essa banda aparece maior no espectro da amostra SiTi-QT15enz, indicando a presença de estiramento C=O da enzima. A banda em 1550 cm^{-1} corresponde à deformação angular $-\text{NH}_2$, surgindo após a incorporação de quitosana no material. Essa banda apresentou uma diminuição de intensidade após a incorporação do glutaraldeído devido à interação dos grupos aldeído com os grupos amino da quitosana. A banda com máximo em 1100 cm^{-1} corresponde à combinação das vibrações da rede de sílica (Si-O-Si). A banda em 950 cm^{-1} na amostra SiTi corresponde ao estiramento Si-O de silício não ligado em ponte com outro silício, isto é, de Si-OH, ligações pendentes ou ligadas a grupos O-R ou vibrações de estiramento de ligações Si-O-Ti, demonstrando a conexão das fases de sílica e titânia. O ombro observado em 970 cm^{-1} é atribuído ao alongamento Ti-O do TiOH. O alargamento dessas bandas após incorporação do glutaraldeído e imobilização da

enzima indica uma interação dos grupos Ti-OH com os grupos aldeído do glutaraldeído ou grupos CO da enzima e interação de hidrogênio do dos grupos Si-OH com os grupos $-NH_2$ da enzima. A banda em 800 cm^{-1} corresponde aos tetraedros de sílica. Outras bandas que poderiam comprovar a ligação Ti-O-C e a presença de anéis glicosídicos são encontradas na região entre 1000 e 1150 cm^{-1} , mas possivelmente estão mascaradas pelas bandas de sílica, presente em mais de 70% da amostra⁹⁷.

5.1.6. Difratoograma de raios X

Os padrões de difração de raios X dos suportes SiTi e SiTi-QT15 estão apresentados na Figura 27 a seguir. No difratograma do material SiTi foi observado um pico típico de material amorfo próximo a 20° e uma cristalização incipiente da titânia na estrutura anatásio. Essas características foram mantidas após o revestimento com quitosana, como observado no difratograma do material SiTi-QT15, visto que o revestimento é muito fino e todas as modificações da superfície foram realizadas em temperatura ambiente.

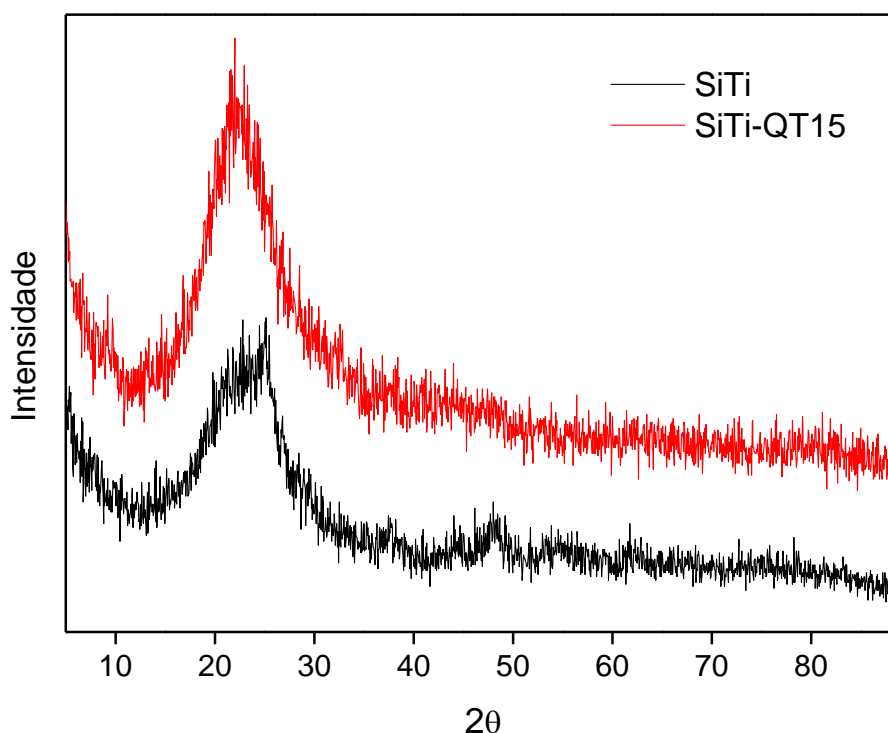


Figura 27. Difratoograma de raios X dos suportes SiTi e SiTi-QT15.

5.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOCATALISADORES

5.2.1. Ensaios de atividade enzimática

Conforme descrito previamente, os materiais preparados foram utilizados como suportes para a imobilização da enzima β -D-galactosidase e seus desempenhos como biocatalisadores foram avaliados. Em um primeiro momento, a imobilização foi realizada em suporte não funcionalizado (SiTienz), onde a enzima é imobilizada diretamente nos sítios de Lewis da titânia. Após foi imobilizada nas matrizes ativadas com glutaraldeído e recobertas com 5% de quitosana (SiTi-QT5enz), 10% de quitosana (SiTi-QT10enz) e 15% de quitosana (SiTi-QT15enz). Também, foi realizada a imobilização na presença de lactose (SiTi-QT15enzL). Posteriormente, a imobilização da enzima foi realizada no suporte contendo 15% de quitosana e modificado com genipina (SiTi-QT15gen-enz). Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros relativos ao processo de imobilização.

Tabela 5. Parâmetros de imobilização da β -D-galactosidase nos diferentes suportes.

Amostra	Atividade (U g ⁻¹)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade Recuperada (%)
SiTienz	711 (\pm 24) ^a	40 (\pm 1) ^a	53 (\pm 1) ^a	21 (\pm 2) ^a
SiTi-QT5enz	1334 (\pm 30) ^b	71 (\pm 1) ^b	76 (\pm 1) ^b	54 (\pm 2) ^b
SiTi-QT10enz	1042 (\pm 29) ^c	74 (\pm 1) ^c	65 (\pm 1) ^c	48 (\pm 2) ^c
SiTi-QT15enz	1223 (\pm 45) ^d	73 (\pm 1) ^b	74 (\pm 1) ^b	54 (\pm 2) ^b
SiTi-QT15enzL	1033 (\pm 48) ^c	66 (\pm 1) ^d	72 (\pm 1) ^b	48 (\pm 2) ^c
SiTi-QT15gen-enz	1102 (\pm 20) ^e	78(\pm 1) ^e	95 (\pm 1) ^d	73 (\pm 2) ^d

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A enzima imobilizada no suporte não funcionalizado (SiTienz) apresentou baixos valores de rendimento de imobilização (40%) e menor atividade catalítica (711 U g^{-1}) quando comparada com os outros biocatalisadores testados, indicando que grande parte da enzima oferecida não permaneceu ligada ao suporte. Ainda assim, os parâmetros de imobilização apresentados para esse biocatalisador foram bem apreciáveis, visto que a enzima está ligada diretamente ao suporte devido à presença de sítios ácidos na titânia, o que possibilita a imobilização direta da enzima sem a utilização de modificações na superfície do material com agentes de reticulação.

Os melhores parâmetros de imobilização foram encontrados quando a enzima foi imobilizada nos suportes contendo quitosana, apresentando valores de atividades de 1334 e 1223 U g^{-1} para os biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz, respectivamente. Além disso, a enzima imobilizada nesses suportes apresentou maiores valores de eficiência (76% para SiTi-QT5enz e 74% para SiTi-QT15enz) e atividade recuperada (54% para ambos) que a enzima imobilizada no suporte não funcionalizado e no suporte contendo 10% de quitosana. Trabalhos prévios^{33,34,43,81,82} relataram melhorias na estabilidade de enzimas quando imobilizadas em suportes a base de quitosana. Nesses estudos, os autores descrevem que o aumento da estabilidade da enzima imobilizada, em comparação com a enzima livre, é proporcionada pela estrutura 3D formada entre a enzima e a quitosana, formada por, além da ligação covalente no amino terminal da proteína, por fracas interações multipontos influenciadas pelo microambiente (pH do meio)^{41,116}.

A utilização de lactose como pré-tratamento durante o processo de imobilização da enzima no suporte contendo 15% de quitosana não promoveu o aumento na eficiência de imobilização como era esperado¹¹⁷. O biocatalisador SiTi-QT15enzL apresentou valores de atividade, eficiência, rendimento de imobilização e atividade recuperada semelhantes ou inferiores aos obtidos com o SiT-QT15enz. Song et al. (2010) avaliaram o pré-tratamento com lactose para a imobilização da β -D-galactosidase de *K. lactis* na superfície de sílica gel ativada com glutaraldeído. A atividade da enzima imobilizada pré-tratada foi 2,6 vezes maior do que a da enzima imobilizada sem o pré-tratamento. Consideramos que alguns ajustes na parte experimental seriam ainda necessários para melhorar os resultados dessa etapa do presente trabalho.

Conforme observado em outros trabalhos^{43,44} a imobilização de β -D-galactosidase em suportes modificados com genipina apresentou melhorias nos seus parâmetros de imobilização em relação à outros suportes testados. Entretanto, esse comportamento não foi

observado para o biocatalisador SiT-QT15gen-enz, apresentando atividade 1102 U g⁻¹, eficiência de imobilização de 95%, rendimento de imobilização de 78% e atividade recuperada de 73%. A interrupção das atividades acadêmicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em virtude das portarias com medidas restritivas para contenção da pandemia de Covid-19, dificultou a utilização de laboratórios de pesquisa e equipamentos, não sendo possível dar continuidade a essa etapa do trabalho.

5.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada (SiTi-enz e SiTi-15enz), a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima da reação (V_{max}), foram determinados por um gráfico Lineweaver-Burk, usando concentrações crescentes de *o*-NPG. A Figura 28 mostra o gráfico de Lineweaver-Burk e a linha de regressão linear da enzima livre e imobilizada (SiTi-enz e SiTi-15enz). A equação de regressão linear obtida para enzima livre foi $\frac{1}{v} = 0,0004 \frac{1}{[S]} + 0,0535$, para SiTienz foi $\frac{1}{v} = 2.10^{-5} \frac{1}{[S]} + 0,0011$ e para SiTi-QT15enz foi $\frac{1}{v} = 9.10^{-6} \frac{1}{[S]} + 0,0011$. Os valores obtidos para K_M foram 7,48 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para enzima livre, 18 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para SiTienz, e 8,18 $\mu\text{mol mL}^{-1}$, para SiTi-QT15enz. Os valores obtidos para V_{max} foram 149,52 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína para enzima livre, 181,82 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para SiTienz, e 99,63 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína para SiTi-QT15enz. O valor de V_{max} apresentou uma ligeira redução quando a enzima foi imobilizada no suporte contendo quitosana (SiTi-QT15enz) e o valor de K_M apresentou um pequeno aumento. Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros cinéticos para a β -D-galactosidase livre e imobilizada. A partir desse importante resultado é possível concluir que o biocatalisador SiTi-QT15enz apresentou afinidade enzima/substrato semelhante à enzima livre.

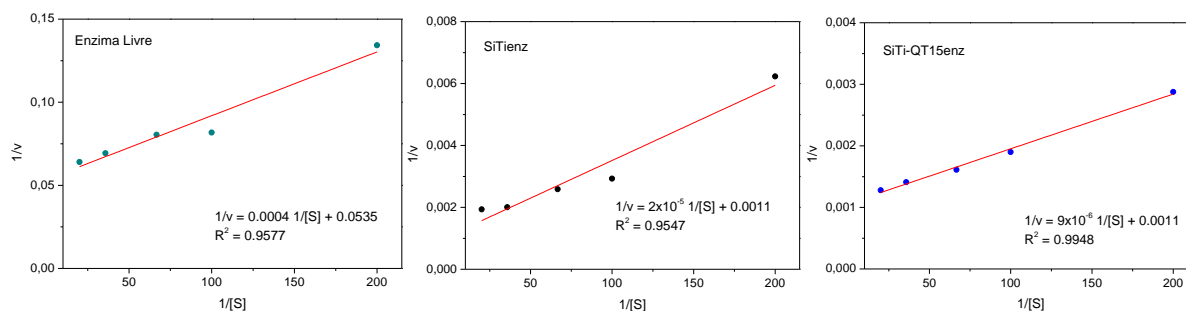


Figura 28. Gráfico de Lineweaver-Burk e linha de regressão linear da β -D-galactosidase livre e imobilizada.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da β -D-galactosidase livre e imobilizada.

Amostra	K_M ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
Enzima Livre	7,48	149,52
SiTienz	18	181,82
SiTi-QT15enz	8,18	99,63

5.2.3. Efeito do pH na atividade enzimática

Ainda que os parâmetros ótimos de temperatura e pH para a atividade da β -D-galactosidase já sejam determinados na sua forma livre, a sua utilização na forma imobilizada pode provocar variações nesses parâmetros. Trabalhos^{81,82} relatam que a β -D-galactosidase, quando imobilizada em quitosana, apresentou variações expressivas nos parâmetros de imobilização, proporcionando, principalmente, maior amplitude de pH de ação e aumento da estabilidade térmica.

O efeito do pH sobre a atividade relativa da enzima β -D-galactosidase livre e imobilizada nos suportes SiTienz, SiTi-QT5enz, SiTi-QT15enz, SiTi-QT15enzL e SiTi-QT15gen-enz foi avaliado para a faixa de pH entre 5,5 e 8,0. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29.

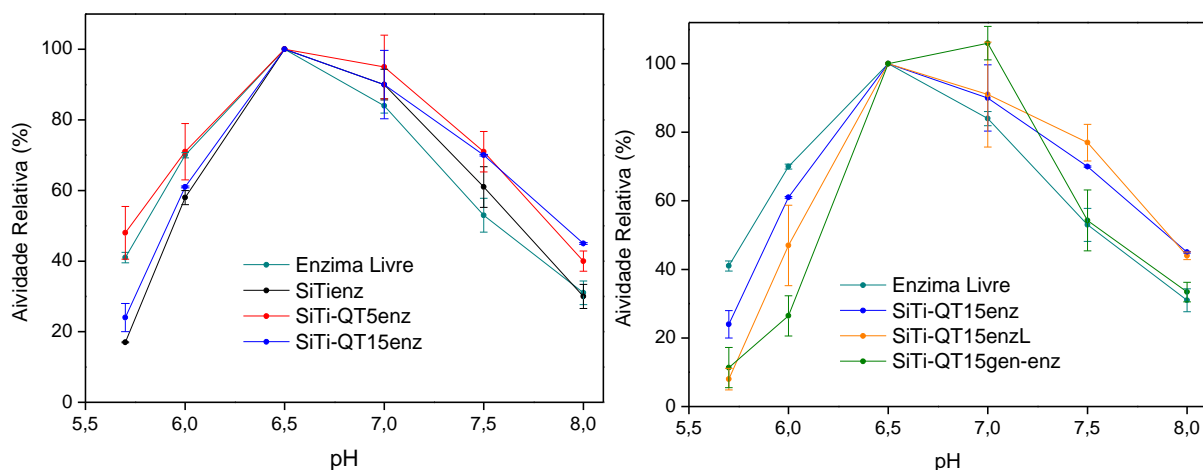


Figura 29. Influência do pH na atividade hidrolítica da β -D-galactosidase a 37 °C.

Como observado na Figura 29, a imobilização da enzima em suportes contendo quitosana proporcionou melhorias na amplitude dos valores de atividade relativa. Tanto a enzima livre quanto a enzima imobilizada nos diferentes suportes apresentou um máximo valor de atividade em pH 6,5. Para valores mais elevados de pH, a enzima livre apresentou a menor amplitude de pH em relação à enzima imobilizada nos suportes. Além disso, pode ser observado que a imobilização da enzima nos suportes contendo quitosana promoveu um aumento na estabilidade da enzima quando comparado com a imobilização da enzima diretamente no suporte não funcionalizado (SiTi). A utilização de lactose como pré-tratamento para a imobilização da enzima no suporte contendo 15% de quitosana promoveu um aumento na estabilidade em pH mais elevados, apresentando maior amplitude de atividade relativa. Desse modo, para a faixa de pH estudada, a enzima imobilizada no suporte contendo 5% de quitosana apresentou maior amplitude de atividade relativa em relação a enzima imobilizada nos outros suportes e na sua forma livre.

5.2.4. Avaliação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica da β -D-galactosidase livre e imobilizada nos suportes SiTi-QT5enz, SiTi-QT15enz e SiTi-QT15gen-enz foi avaliada para as temperaturas 40, 50, 60 e 70 °C. Os resultados obtidos nesse estudo estão apresentados em gráficos de atividade relativa em função do tempo nas Figura 30, Figura 31, Figura 32 e Figura 33, que correspondem as temperaturas 40, 50, 60 e 70 °C respectivamente.

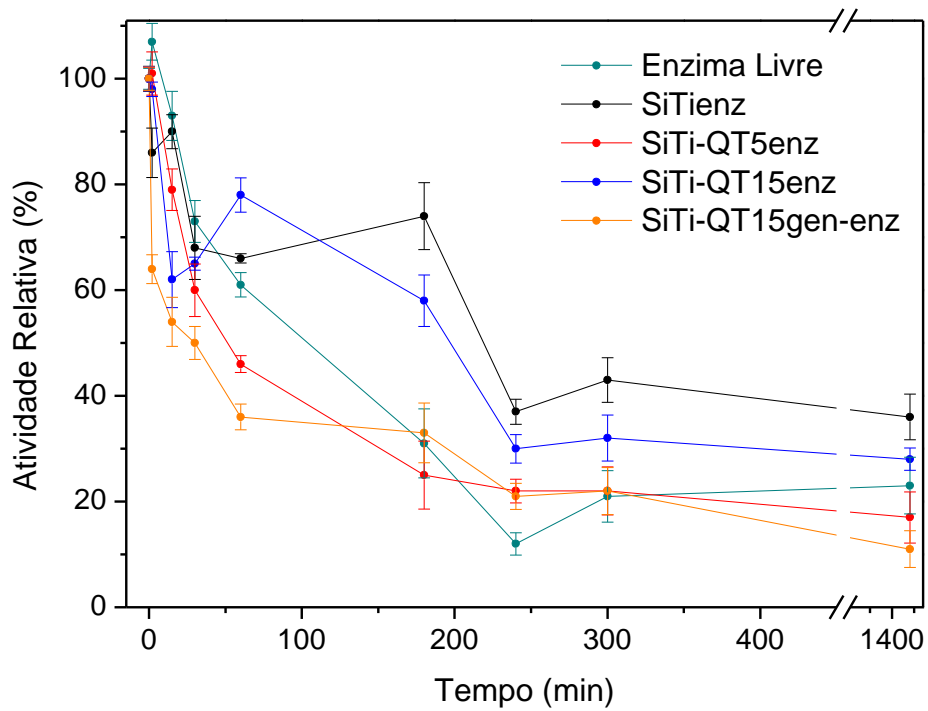


Figura 30. Estabilidade térmica à temperatura de 40 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.

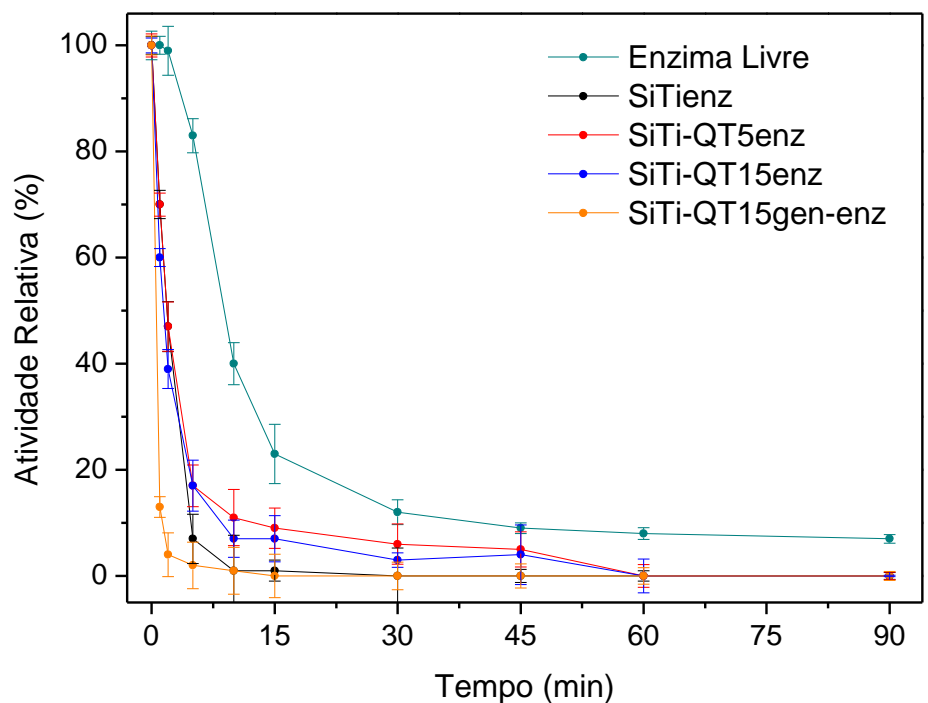


Figura 31. Estabilidade térmica à temperatura de 50 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.

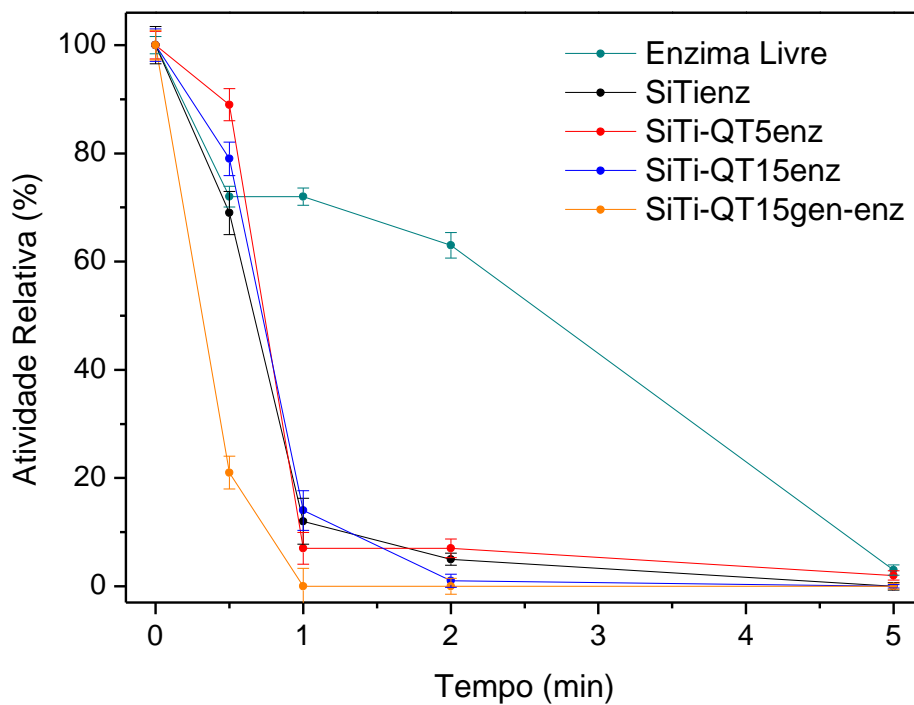


Figura 32. Estabilidade térmica à temperatura de 60 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.

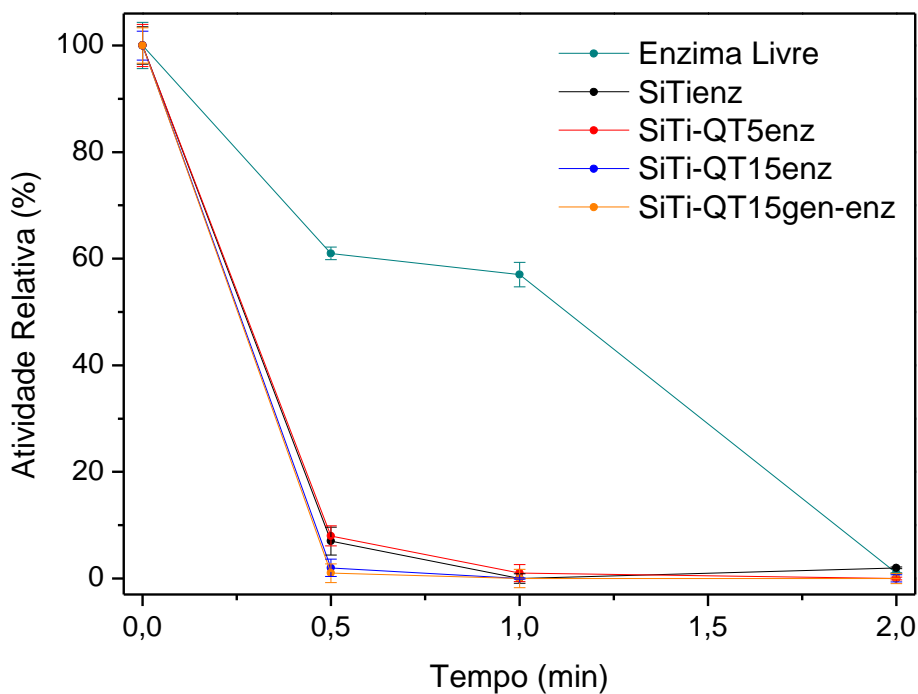


Figura 33. Estabilidade térmica à temperatura de 70 °C e pH 7,0 da enzima livre e imobilizada nos suportes.

Na temperatura de 40 °C (Figura 30) a enzima imobilizada no suporte SiTienz apresentou um menor decaimento da atividade relativa ao longo do tempo do que quando comparada com a enzima livre e imobilizada nos outros suportes. Após 24 horas de incubação na temperatura de 40 °C, a enzima imobilizada no suporte SiTienz apresentou atividade relativa de 40%, a imobilizada no suporte SiTi-QT15enz manteve 30% da atividade e a imobilizada no suporte SiTi-QT5enz e a enzima livre mantiveram 20% da atividade inicial.

Quando avaliada para a temperatura de 50 °C (Figura 31) a enzima livre apresentou maior tendência a retenção da atividade enzimática ao longo do tempo, mantendo 20% da atividade inicial após 45 minutos, enquanto a enzima imobilizada nos diferentes suportes manteve 10% de sua atividade.

Nas temperaturas de 60 e 70 °C (Figura 32 e Figura 33) é observada uma tendência comum à perda total de atividade relativa da enzima nos primeiros instantes de aquecimento quando imobilizada nos diferentes suportes. A enzima livre ainda manteve 65% de atividade relativa após 2 minutos de incubação a 60 °C e 60% após 1 minuto de incubação a 70 °C.

Apesar de que a atividade relativa da enzima imobilizada nos diferentes suportes avaliados não tenha proporcionado melhorias consideráveis de estabilidade em pHs mais ácidos e alcalinos e na estabilidade térmica, o processo de imobilização manteve as propriedades básicas da enzima, apresentado desempenho semelhante ao da enzima na forma livre. Comportamento análogo foi observado no trabalho de Ricardi et al. (2018)¹⁰⁷, onde β -D-galactosidase foi imobilizada em um suporte compósito de sílica e quitosana, mantendo consistente as propriedades em relação a pH ótimo e estabilidade térmica.

5.2.5. Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de armazenamento foi avaliada para enzima livre, SiTienz e SiTi-QT15enz, na geladeira a 4 °C, por 35 dias. A Figura 34 apresenta os resultados de atividade relativa em função do tempo de armazenamento.

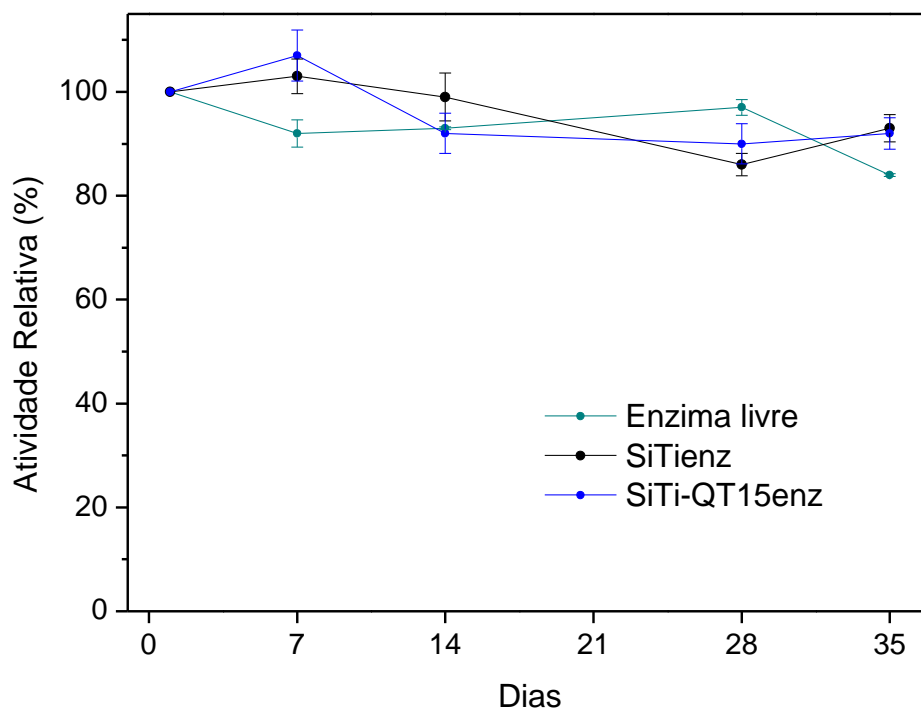


Figura 34. Estabilidade de armazenamento da β -D-galactosidase livre e imobilizada.

A atividade enzimática dos biocatalisadores foi analisada periodicamente em intervalos de 7 dias, com o objetivo de avaliar a estabilidade de armazenamento das enzimas livres e imobilizadas. Após 5 semanas de armazenamento, a atividade relativa foi mantida próxima a 90% para todos biocatalisadores analisados. Comportamento semelhante foi reportado por Bellé et al. (2018)¹⁰⁸ ao avaliar a estabilidade da β -galactosidase de *A. oryzae* e *K. lactis* imobilizada em esferas de quitosana, na geladeira a 4-7 °C, por 35 dias, mantendo atividade enzimática constante.

5.2.6. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise da lactose utilizando reator em batelada e reator de leito fixo.

a) Reator em Batelada

Para a avaliação da estabilidade operacional em reator em batelada foram escolhidos os biocatalisadores SiTienz, SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz. Os biocatalisadores contendo quitosana foram escolhidos por apresentarem resultados satisfatórios de atividade enzimática, rendimento e eficiência de imobilização e estabilidade térmica e em pH. O biocatalisador SiTienz, foi escolhido para avaliar o efeito da imobilização direta da enzima, sem a utilização de agentes reticuladores, na estabilidade operacional. A Figura 35 apresenta os resultados de atividade relativa em função dos ciclos de hidrólise da lactose.

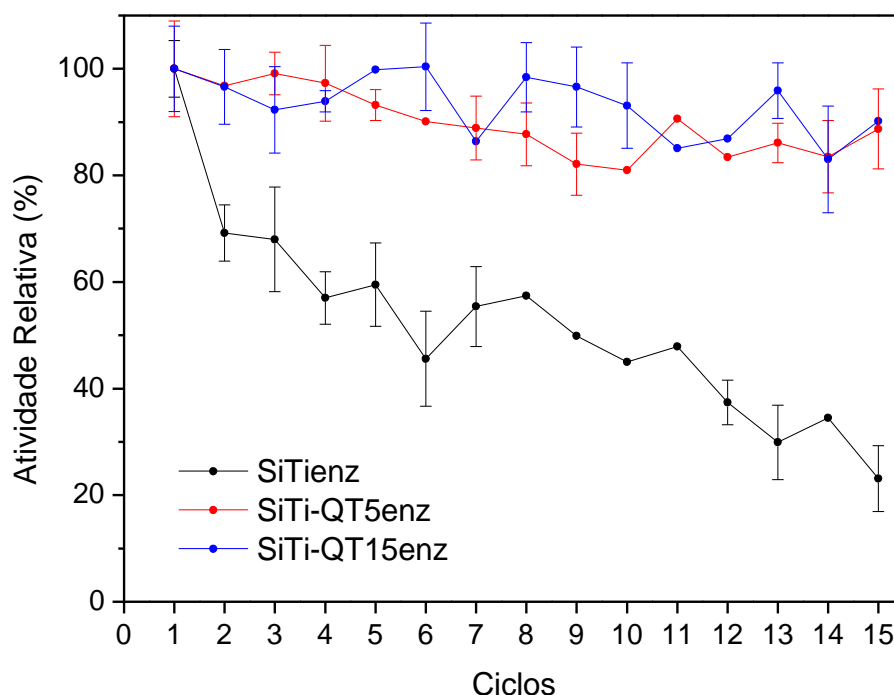


Figura 35. Estabilidade operacional da enzima imobilizada, em reator em batelada, a 37 °C e pH 7,0.

Após o primeiro ciclo, o biocatalisador SiTienz alcançou uma conversão de hidrólise da lactose de 85%, já os biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz alcançaram uma conversão de 100%. Esses valores de conversão foram considerados como 100% da atividade relativa. Como observado na Figura 35, a atividade relativa do biocatalisador SiTienz caiu para 70% após o segundo ciclo, restando apenas 23% da atividade relativa após 15 ciclos. Em contrapartida, os biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz, os quais a enzima foi imobilizada nos suportes contendo quitosana, a atividade hidrolítica relativa manteve-se próxima a 100% após 15 ciclos. A baixa estabilidade operacional do biocatalisador SiTienz

pode ser explicada pela enzima ter sido diretamente ligada no material sílica/titânia, embora parte da enzima foi ligada covalentemente nos sítios ácidos da titânia, pode também estar ligada por meio de ligações intermoleculares na sílica, podendo ocorrer sua lixiviação do suporte após cada ciclo de hidrólise, levando a perda de atividade. Quanto aos biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz, a enzima permaneceu ligada sem alteração de seu sítio ativo ao longo dos ciclos de hidrólise, não mostrando uma perda considerável de atividade relativa após todo o processo realizado de 15 ciclos.

Bellé et al. (2018)¹⁰⁸ reportaram o reuso, em reatores em batelada, da enzima β -galactosidase de *A. oryzae* e *K. lactis* imobilizada em esferas de quitosana. Após 20 ciclos de hidrólise da lactose, os biocatalisadores analisados apresentaram atividade relativa próxima a 100%. Klein et al. (2012)³⁴ reportaram o reuso, em reatores em batelada, da enzima β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em micro- e nanopartículas de quitosana. Após 50 ciclos de hidrólise da lactose, os biocatalisadores analisados apresentaram atividade relativa próxima a 100%.

b) Reator de Fluxo Contínuo

Para a avaliação da estabilidade operacional em reator de fluxo contínuo e leito fixo foi escolhido o biocatalisador SiTi-QT15enz, pois apresentou melhores tendências em seus resultados combinados de estabilidade térmica e estabilidade operacional em reator em batelada. A Figura 36 apresenta os resultados de atividade relativa em função do tempo de funcionamento do reator.

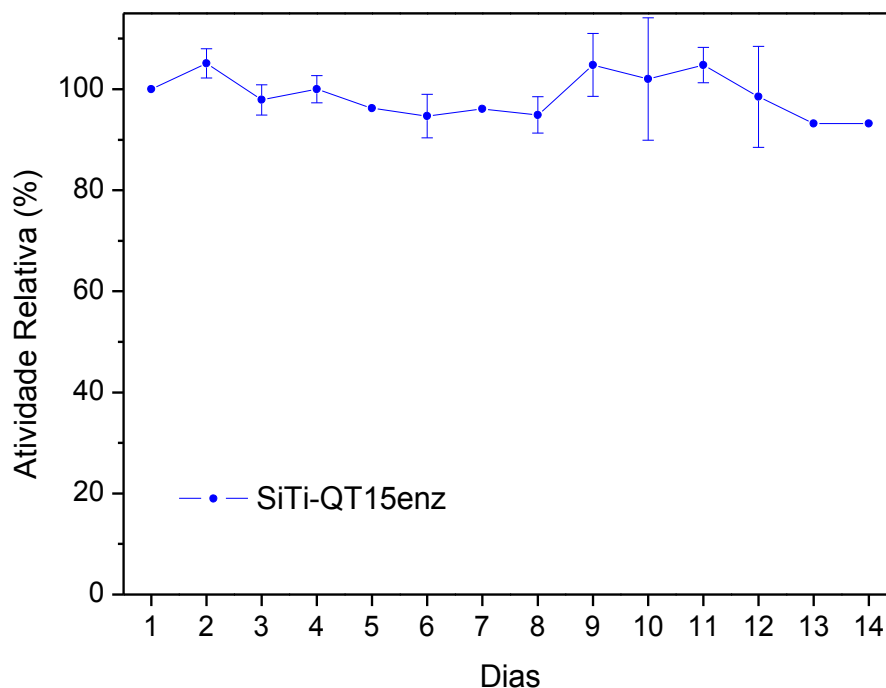


Figura 36. Estabilidade operacional em uso contínuo da enzima imobilizada, em reator de leito fixo, a 37 °C e pH 7,0.

Pode ser observado na Figura 36 que o biocatalisador SiTi-QT15enz manteve sua atividade hidrolítica próxima a 100% após os 14 dias de funcionamento contínuo do reator. A taxa de conversão hidrolítica da lactose, formando glicose e galactose, foi de 85%. Esse valor de conversão pode ser aprimorado pela otimização dos parâmetros do reator, como o aumento da coluna do reator e conseqüentemente o aumento no tempo de residência do substrato no reator. Além disso, o biocatalisador preparado pela combinação da matriz de oxido de sílica/titânia recoberto com quitosana não apresentou deformação e fragmentação nos sistemas testados, demonstrando uma elevada estabilidade operacional e viabilidade para utilização do biocatalisador em processos contínuos industriais.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos materiais à base de sílica/titânia e recobertos com diferentes quantidades planejadas de quitosana, usando-se soluções de concentração 5, 10 e 15%. As matrizes (SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15) foram ativadas com glutaraldeído ou genipina e utilizadas para a imobilização da enzima β -D-galactosidase. Os materiais sintetizados foram caracterizados e seus desempenhos como biocatalisadores foram avaliados para a reação da hidrólise da lactose.

A incorporação de quitosana na matriz SiTi foi evidenciada por análise termogravimétrica para os materiais imersos em soluções 5, 10 e 15% de quitosana, sendo que a superfície do material atingiu a saturação quando foram adicionados entre 6 e 8% de quitosana de acordo com resultados de TGA. Após as modificações da superfície do material com os grupos orgânicos glutaraldeído e a imobilização da enzima, foi observado aumento gradual na porcentagem de perda de massa e essas quantidades foram avaliadas. As curvas de distribuição de diâmetro de poros das matrizes SiTi, SiTi-QT5, SiTi-QT10 e SiTi-QT15 e de suas respectivas modificações da superfície com glutaraldeído ou genipina apresentaram máximos em torno de 30 nm e após a imobilização da enzima apresentaram máximos em torno de 20 nm, esse tamanho de poros possibilita a hidrólise enzimática. Nos materiais ativados com glutaraldeído, a imobilização da enzima provocou o fechamento parcial dos poros. Esse comportamento não foi observado nos materiais ativados com genipina.

O desempenho dos materiais sintetizados como biocatalisadores enzimáticos foi avaliado. A enzima imobilizada no material ativado contendo 5% de quitosana (SiTi-QT5enz) apresentou o maior valor de atividade 1334 U g^{-1} . A enzima imobilizada no suporte não funcionalizado (SiTienz) apresentou valores baixos de rendimento de imobilização (40%) e atividade catalítica (711 U g^{-1}), mas apreciáveis, visto que a enzima está ligada diretamente ao suporte sem a utilização de agentes de reticulação.

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em reator em batelada e em reator de leito fixo. Os biocatalisadores SiTi-QT5enz e SiTi-QT15enz quando utilizados em reator em batelada retiveram aproximadamente 90% de atividade para a hidrólise da lactose após 15 ciclos. O biocatalisador SiTienz, mesmo apresentando parâmetros de imobilização apreciáveis, reteve apenas 23% da atividade relativa após 15 ciclos. Quando a

estabilidade operacional foi avaliada em reator de leito fixo, o biocatalisador SiTi-QT15enz manteve sua atividade hidrolítica próxima a 90% após 14 dias de operação contínua do reator.

Os resultados obtidos até o momento indicam que, apesar de o recobrimento dos materiais com quitosana não tenha promovido melhorias consideráveis na estabilidade em pH e temperatura da enzima imobilizada em relação à forma livre. Ainda assim, o desenvolvimento do suporte recoberto com quitosana permitiu a combinação das características positivas dos componentes, como a elevada resistência mecânica da sílica/titânia e a biocompatibilidade da quitosana. Dessa forma, os biocatalisadores preparados são uma excelente alternativa para aplicações na indústria de alimentos uma vez que podem ser reutilizados repetidas vezes e manter sua atividade enzimática.

A interrupção das atividades acadêmicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em virtude das portarias com medidas restritivas para contenção da pandemia de Covid-19, dificultou a utilização de laboratórios de pesquisa e equipamentos, não sendo possível a finalização completa de todas as etapas previstas no projeto de doutorado. Como perspectiva futura desse trabalho será otimizado o preparo do suporte ativado com genipina, alterando-se, por exemplo, a proporção de genipina utilizada. Esse material será posteriormente caracterizado, testado em reações de hidrólise e sua estabilidade operacional será avaliada em reator em batelada e fluxo contínuo.

REFERÊNCIAS

- (1) Chapman, J.; Ismail, A. E.; Dinu, C. Z. *Catalysts* **2018**, *8*, 238–264.
- (2) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1–12.
- (3) Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.
- (4) Clouthierzab, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605.
- (5) Madhavan, A.; Sindhu, R.; Binod, P.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 1304–1313.
- (6) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (7) Bolivar, J. M.; Eisl, I.; Nidetzky, B. *Catal. Today* **2016**, *259*, 66–80.
- (8) Urrutia, P.; Bernal, C.; Wilson, L.; Illanes, A. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10126–10135.
- (9) Britton, J.; Majumdar, S.; Weiss, G. A. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 5891–5918.
- (10) Thompson, M. P.; Peñafiel, I.; Cosgrove, S. C.; Turner, N. J. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 9–18.
- (11) Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678–2691.
- (12) Zdarta, J.; Meyer, A. S.; Jesionowski, T.; Pinelo, M. *Catalysts* **2018**, *8*, 92.
- (13) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (14) Grosová, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. *Czech J. Food Sci.* **2008**, *26*, 1–14.
- (15) Liu, D. M.; Chen, J.; Shi, Y. P. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 332–342.
- (16) Zucca, P.; Sanjust, E. *Molecules* **2014**, *19*, 14139–14194.
- (17) Li, S.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, X. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, *2*, e201209017.

- (18) Filice, M.; Aragon, C.; Mateo, C.; Palomo, J. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *21*, 139–148.
- (19) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- (20) Dekker, P. J. T.; Koenders, D.; Bruins, M. J. *Nutrients* **2019**, *11*, 1–14.
- (21) IUBMB Enzyme Nomenclature
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/23.html> (accessed Oct 28, 2020).
- (22) Saqib, S.; Akram, A.; Halim, S. A.; Tassaduq, R. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–7.
- (23) Xavier, J. R.; Ramana, K. V.; Sharma, R. K. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*.
- (24) Panesar, P. S.; Kaur, R.; Singh, R. S.; Kennedy, J. F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 667–679.
- (25) Li, H.; Cao, Y.; Li, S.; Jiang, Y.; Chen, J.; Wu, Z. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *127*, 38–44.
- (26) Wolf, M.; Gasparin, B. C.; Paulino, A. T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 157–164.
- (27) Klein, M. P.; Fallavena, L. P.; Schöffler, J. D. N.; Ayub, M. A. Z.; Rodrigues, R. C.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 465–470.
- (28) González-Delgado, I.; Segura, Y.; Martín, A.; López-Muñoz, M. J.; Morales, G. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *257*, 51–61.
- (29) Eskandarloo, H.; Abbaspourrad, A. *Food Chem.* **2018**, *251*, 115–124.
- (30) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- (31) Krajewska, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126–139.
- (32) Bilal, M.; Iqbal, H. M. N. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *130*, 462–482.
- (33) de Albuquerque, T. L.; Gomes, S. D. L.; D’Almeida, A. P.; Fernandez-Lafuente, R.; Gonçalves, L. R. B.; Rocha, M. V. P. *Process Biochem.* **2018**, *73*, 65–73.
- (34) 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.

- (35) Schöffner, J. D. N.; Klein, M. P.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1311–1316.
- (36) Vukajlovic, D.; Parker, J.; Bretcanu, O.; Novakovic, K. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 955–967.
- (37) Laranjo, M. T.; Ricardi, N. C.; Arenas, L. T.; Benvenuti, E. V.; de Oliveira, M. C.; Santos, M. J. L.; Costa, T. M. H. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *72*, 273–281.
- (38) Morawski, F. de M.; Deon, M.; Nicolodi, S.; de Menezes, E. W.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V.; Arenas, L. T. *Electrochim. Acta* **2018**, *264*, 319–328.
- (39) Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Gallas, M. R. *Quim. Nov.* **2009**, *32*, 1926–1933.
- (40) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M.; Pais, A. R. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6592–6620.
- (41) Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1583–1600.
- (42) Jin, J.; Song, M.; Hourston, D. J. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 162–168.
- (43) Flores, E. E. E.; Cardoso, F. D.; Siqueira, L. B.; Ricardi, N. C.; Costa, T. H.; Rodrigues, R. C.; Klein, M. P.; Hertz, P. F. *Process Biochem.* **2019**, *84*, 73–80.
- (44) 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.
- (45) Liu, Y.; Cai, Z.; Sheng, L.; Ma, M.; Xu, Q.; Jin, Y. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *215*, 348–357.
- (46) Zhang, M.; Li, L.; Du, Z.; Xu, S.; Li, C.; Chen, X.; Zhang, T.; Wang, T. *Sens. Lett.* **2009**, *7*, 543–549.
- (47) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
- (48) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2020**, 1–31.
- (49) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*; 7 ed.; Artmed:

Porto Alegre, 2019.

- (50) Li, G. C.; Anastas, P.; Sheldon, R. A. *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 1437–1451.
- (51) Haase, G.; Jelen, P.; Ga, M. G. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 685–694.
- (52) Xiao, Y.; Chen, Q.; Guang, C.; Zhang, W.; Mu, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**.
- (53) Adam, A. C.; Rubio-Teixeira, M.; Polaina, J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *44*, 553–557.
- (54) Whittier, E. O. *J. Dairy Sci.* **1944**, *27*, 505–537.
- (55) Jansson-Knodell, C. L.; Krajcicek, E. J.; Savaiano, D. A.; Shin, A. S. *Mayo Clin. Proc.* **2020**, *95*, 1499–1505.
- (56) Batista, R. A. B.; Assunção, D. C. B.; Penaforte, F. R. de O.; Japur, C. C. *Cienc. e Saude Coletiva* **2018**, *23*, 4119–4128.
- (57) Harju, M.; Kallioinen, H.; Tossavainen, O. *Int. Dairy J.* **2012**, *22*, 104–109.
- (58) Yadav, J. S. S.; Yan, S.; Pilli, S.; Kumar, L.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 756–774.
- (59) Prazeres, A. R.; Carvalho, F.; Rivas, J. J. *Environ. Manage.* **2012**, *110*, 48–68.
- (60) Carbohydrate-Active enZymes Database <http://www.cazy.org/> (accessed Oct 30, 2020).
- (61) Lu, L.; Guo, L.; Wang, K.; Liu, Y.; Xiao, M. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *39*, 107465.
- (62) Pavel, I. A.; Prazeres, S. F.; Montalvo, G.; García Ruiz, C.; Nicolas, V.; Celzard, A.; Dehez, F.; Canabady-Rochelle, L.; Canilho, N.; Pasc, A. *Langmuir* **2017**, *33*, 3333–3340.
- (63) Pereira-Rodríguez, Á.; Fernández-Leiro, R.; González-Siso, M. I.; Cerdán, M. E.; Becerra, M.; Sanz-Aparicio, J. J. *Struct. Biol.* **2012**, *177*, 392–401.
- (64) Fischer, C.; Kleinschmidt, T. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 678–697.

- (65) Vera, C.; Córdova, A.; Aburto, C.; Guerrero, C.; Suárez, S.; Illanes, A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32*.
- (66) Nath, A.; Mondal, S.; Chakraborty, S.; Bhattacharjee, C.; Chowdhury, R. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.* **2014**, 1–19.
- (67) DSM Food Specialities. *Boletim Técnico da Enzima Lactase, Maxilact LX 5000®*; Holanda do Sul, 2009.
- (68) Husain, Q. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30*, 41–62.
- (69) Zhang, Y.; Ge, J.; Liu, Z. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 4503–4513.
- (70) Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *178*, 1109–1115.
- (71) Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N.; Chibata, I. *Biotechnol. Bioeng.* **1967**, *9*, 603–615.
- (72) Di Cosimo, R.; Mc Auliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437–6474.
- (73) Yang, X. Y.; Tian, G.; Jiang, N.; Su, B. L. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 5540–5563.
- (74) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
- (75) Mendes, A. A.; De Oliveira, P. C.; De Castro, H. F.; Giordano, R. D. L. C. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 831–840.
- (76) Binyamin, G.; Shafi, B. M.; Mery, C. M. *Semin. Pediatr. Surg.* **2006**, *15*, 276–283.
- (77) Bakshi, P. S.; Selvakumar, D.; Kadirvelu, K.; Kumar, N. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *150*, 1072–1083.
- (78) Varlamov, V. P.; Il'ina, A. V.; Shagdarova, B. T.; Lunkov, A. P.; Mysyakina, I. S. *Biochem.* **2020**, *85*, 154–176.
- (79) Verma, M. L.; Kumar, S.; Das, A.; Randhawa, J. S.; Chamundeeswari, M. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 315–323.
- (80) Shinya, S.; Fukamizo, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1422–1435.

- (81) Urrutia, P.; Bernal, C.; Wilson, L.; Illanes, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 182–193.
- (82) Duarte, L. S.; Schöffner, J. da N.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Rodrigues, E.; Hertz, P. F. *Process Biochem.* **2017**, *55*, 96–103.
- (83) Hou, Y. C.; Tsai, S. Y.; Lai, P. Y.; Chen, Y. S.; Chao, P. D. L. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2764–2769.
- (84) Koo, H. J.; Lim, K. H.; Jung, H. J.; Park, E. H. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 496–500.
- (85) Koo, H. J.; Song, Y. S.; Kim, H. J.; Lee, Y. H.; Hong, S. M.; Kim, S. J.; Kim, B. C.; Jin, C.; Lim, C. J.; Park, E. H. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *495*, 201–208.
- (86) Zhang, C. Y.; Parton, L. E.; Ye, C. P.; Krauss, S.; Shen, R.; Lin, C. T.; Porco, J. A.; Lowell, B. B. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 417–427.
- (87) Suzuki, Y.; Kondo, K.; Ikeda, Y.; Umemura, K. *Planta Med.* **2001**, *67*, 807–810.
- (88) Yamazaki, M.; Chiba, K. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *581*, 255–261.
- (89) Tacias-Pascacio, V. G.; García-Parra, E.; Vela-Gutiérrez, G.; Virgen-Ortiz, J. J.; Berenguer-Murcia, Á.; Alcántara, A. R.; Fernandez-Lafuente, R. *Catalysts* **2019**, *9*, 1–19.
- (90) Neri-Numa, I. A.; Pessoa, M. G.; Paulino, B. N.; Pastore, G. M. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *67*, 271–279.
- (91) Butler, M. F.; Ng, Y. F.; Pudney, P. D. A. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2003**, *41*, 3941–3953.
- (92) Ramos-de-la-Peña, A. M.; Renard, C. M. G. C.; Montañez, J.; de la Luz Reyes-Vega, M.; Contreras-Esquivel, J. C. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 37–49.
- (93) Rodrigues, I.; Renhe, T.; Stringheta, P. C.; Fonseca, F. *Pesq. Agropec. Bras.* **2009**, *44*, 649–652.
- (94) Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. H.; Tsai, C. C. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*

- 1999**, *10*, 63–78.
- (95) Sigurdardóttir, S. B.; Lehmann, J.; Ovtar, S.; Grivel, J. C.; Negra, M. Della; Kaiser, A.; Pinelo, M. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 2578–2607.
- (96) Hartmann, M.; Kostrov, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277–6289.
- (97) Anaya-Esparza, L. M.; Ruvalcaba-Gómez, J. M.; Maytorena-Verdugo, C. I.; González-Silva, N.; Romero-Toledo, R.; Aguilera-Aguirre, S.; Pérez-Larios, A.; Montalvo-González, E. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 1–27.
- (98) Davis, R. J.; Liu, Z. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2311–2324.
- (99) Gao, X.; Wachs, I. E. *Catal. Today* **1999**, *51*, 233–254.
- (100) Fried, D. I.; Brieler, F. J.; Fröba, M. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 862–884.
- (101) Danks, A. E.; Hall, S. R.; Schnepf, Z. *Mater. Horizons* **2016**, *3*, 91–112.
- (102) Graham, T. *J. Chem. Soc.* **1864**, *17*, 318–327.
- (103) Ebelmen, M. *Ann. Chim. Phys.* **1846**, *16*, 129–166.
- (104) Hiratsuka, R. S.; Santilli, C. V.; Pulcinelli, S. H. *Quim. Nova* **1995**, *18*, 171–180.
- (105) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*; 1 Ed.; Gulf Professional Publishing, 1990.
- (106) El Kadib, A.; Bousmina, M. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 8264–8277.
- (107) Ricardi, N. C.; de Menezes, E. W.; Valmir Benvenuti, E.; da Natividade Schöffner, J.; Hackenhaar, C. R.; Hertz, P. F.; Costa, T. M. H. *Food Chem.* **2018**, *246*, 343–350.
- (108) Bellé, A. S.; Hackenhaar, C. R.; Spolidoro, L. S.; Rodrigues, E.; Klein, M. P.; Hertz, P. F. *Food Chem.* **2018**, *246*, 266–274.
- (109) Laranjo, M. T.; Morawski, F. M.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V.; Arenas, L. T.; Costa, T. M. H. *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 2660–2671.
- (110) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380.

- (111) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- (112) Lorenzoni, A. S. G.; Aydos, L. F.; Klein, M. P.; Ayub, M. A. Z.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *111*, 51–55.
- (113) Costa, T. M. H.; Gallas, M. R.; Benvenuti, E. V.; Jornada, J. A. H. *J. Non. Cryst. Solids* **1997**, *220*, 195–201.
- (114) Caldas, E. M.; Novatzky, D.; Deon, M.; de Menezes, E. W.; Hertz, P. F.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenuti, E. V. *Microporous Mesoporous Mater.* **2017**, *247*, 95–102.
- (115) Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquerol, J.; Siemieniewska, T. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603–619.
- (116) Isom, D. G.; Castañed, C. A.; Cannon, B. R.; García-Moreno, B. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5260–5265.
- (117) Song, Y. S.; Lee, J. H.; Kang, S. W.; Kim, S. W. *Food Chem.* **2010**, *123*, 1–5.