

Introdução

Diversos tipos de suportes inorgânicos tem sido estudados como forma de uma constante otimização no processo de imobilização de enzimas. As argilas, se mostram promissoras por possuírem uma série de propriedades interessantes, como suas grandes áreas específicas. Além de modificações químicas, com variados compostos, pesquisam-se técnicas para melhorias de suas propriedades físicas. Uma delas é o uso de sonicação, através de ultrassom. Como consequência, são geradas mudanças na organização lamelar das argilas e de suas respectivas áreas específicas, também conhecidas como "esfoliação"¹. Neste trabalho, foi realizado um estudo comparativo da eficácia do tratamento de sonicação da argila montmorilonita (MMT K 10), para a posterior imobilização de enzima lipase na mesma. Foram comparados o uso de suportes com e sem sonicação, imobilizados através dos métodos de adsorção física e ligação covalente².

Metodologia

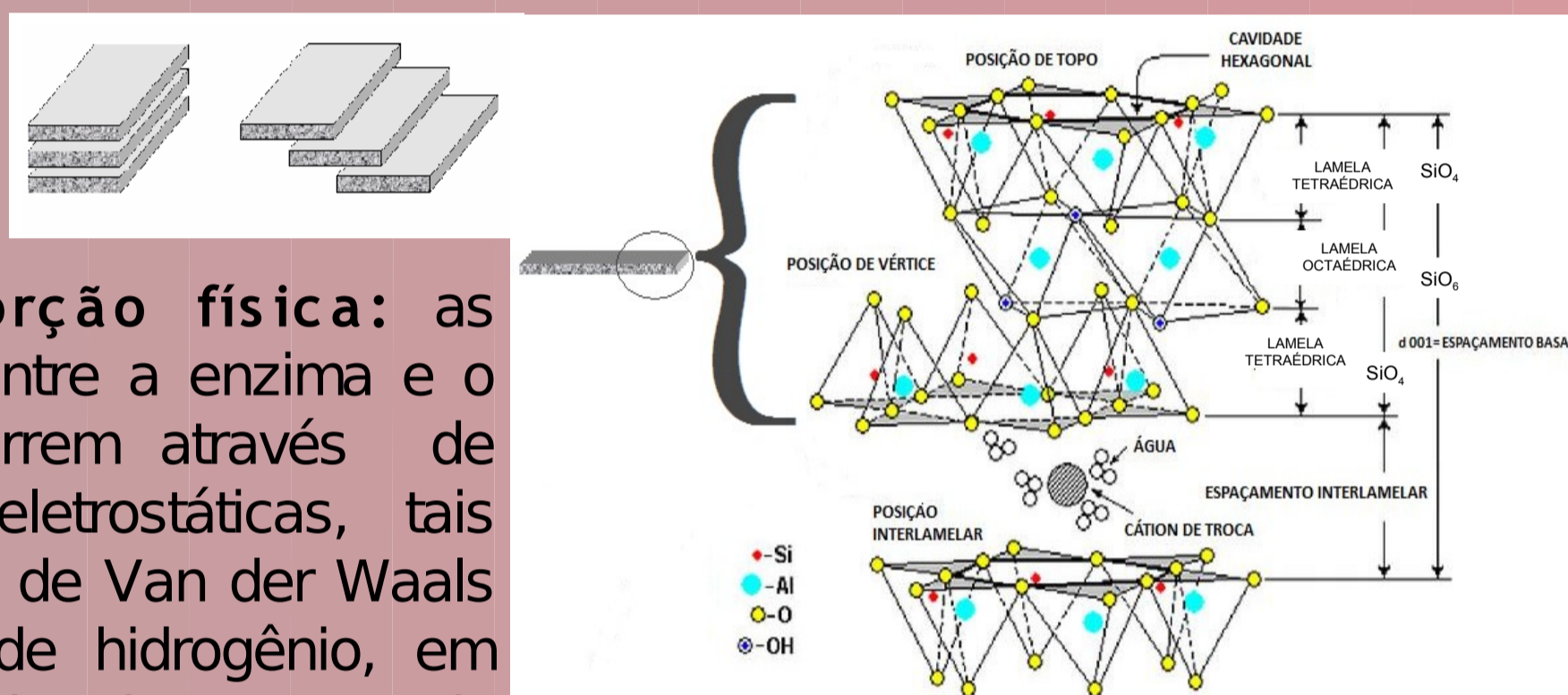
Processo de sonicação: - Solução aquosa (montmorilonita K 10 + água Milli Q)

- Agitação mecânica da solução por 8h

- Sonicação em ultrassom, sob agitação

mecânica, por 10 h, T=55°C, aproximadamente.

Figura 1. Ilustração do processo de esfoliação das lamelas da MMT K 10.



Adsorção física: as interações entre a enzima e o suporte ocorrem através de interações eletrostáticas, tais como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, em diferentes sítios da estrutura da

argila. **Ligação covalente:** a ligação entre a enzima e o suporte ocorre através de compostos intermediários que promovem ligações químicas covalentes.

Resultados e Discussão

A atividade catalítica da enzima imobilizada foi determinada através da reação de hidrólise do composto *p*-nitrofenilpalmitato em *p*-nitrofenol, através de espectrofotômetro, absorção em 410 nm. A determinação da quantidade de proteína imobilizada foi realizada conforme o método de Bradford. Uma unidade enzimática (U) ficou definida como sendo a quantidade de enzima que forma 1 μmol de *p*-nitrofenol por hora de reação.

Tabela 1. Atividade enzimática da lipase imobilizada em argila sem tratamento de sonicação.

Suporte	Proteína imobilizada (%)	Atividade no suporte (U)	Eficiência (%)
MMT nat sem glut	0	0	0,00
MMT calc sem glut	54	0,42	0,44
MMT calc com glut	56,33	2,02	6,15
MMT calc /APTES / glut	44	2,06	7,44

MMT= montmorilonita K 10 calc= calcinada glut= glutaraldeído nat=natural

Tabela 2. Atividade enzimática da lipase imobilizada em argila com tratamento de sonicação.

Suporte	Proteína imobilizada (%)	Atividade no suporte (U)	Eficiência (%)
MMT son	0	1,32	3,13
MMT son glut	0	0,17	1,29
MMT son/APTES /glut	58	1,22	5,95

son= sonicada

Tabela 3. Áreas específicas da montmorilonita K 10 obtidas por BET, em amostras com e sem sonicação.

Amostra	Área Específica (m ² /g)
MMT K 10 comercial	201
MMT K 10 sonicada	183
MMT K 10 sonicada imob	100
MMT K 10 comercial APTES / glut	72
MMT K 10 sonicada APTES / glut	50*
MMT K 10 comercial APTES / glut imob	67
MMT K 10 sonicada APTES / glut imob	52*

* Dentro da margem de erro da análise (2 m²/g para mais ou para menos).

Figura 2. Difratomogramas de raio - X mostrando mudanças pouco significativas nos espaços interlamelares (d₀₀₁) da MMT K 10 antes e após sonicação, imobilizada pelo método da ligação covalente.

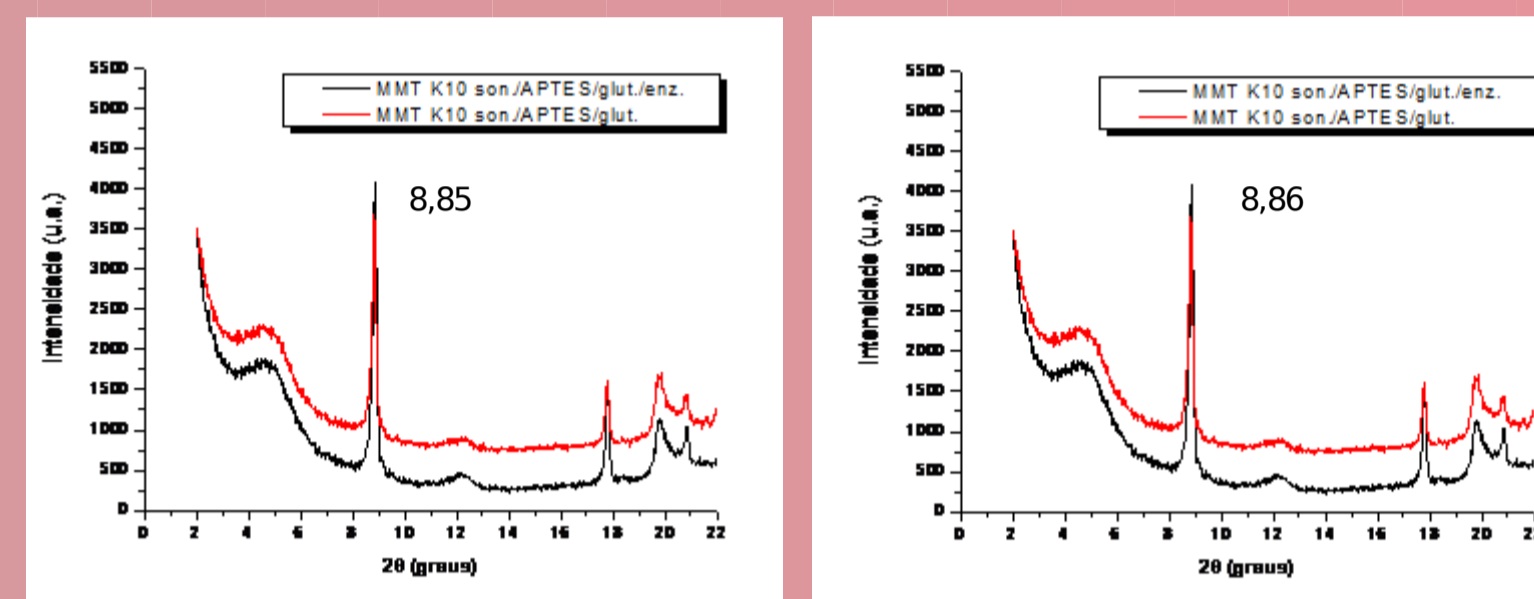
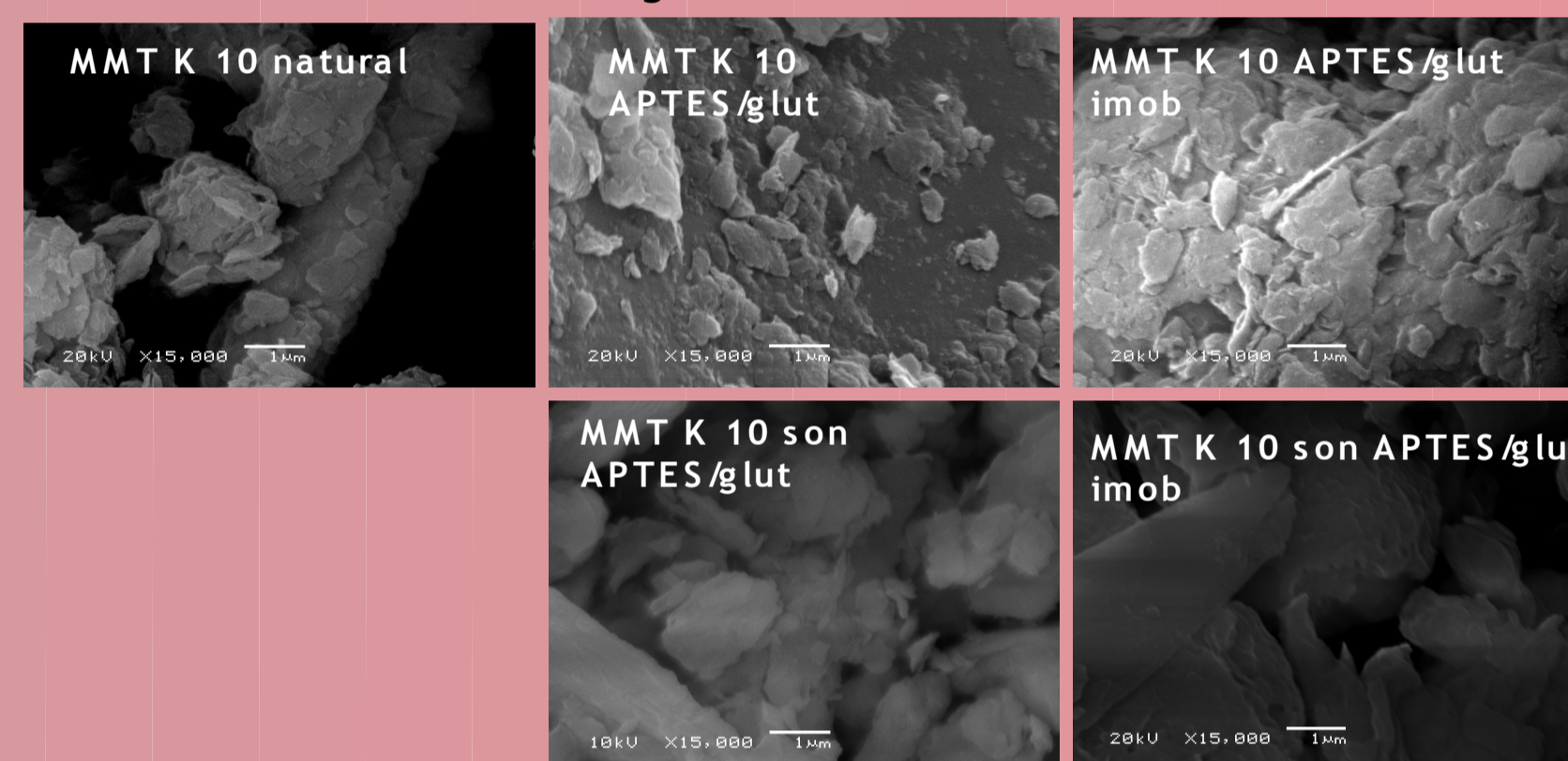


Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da MMT K10 após diferentes tratamentos físicos e químicos. A inserção dos compostos APTES e glutaraldeído, bem como a presença de lipase geram um aumento no tamanho dos grãos.



Análise do comportamento térmico das amostras através de Análise Termogravimétrica (TGA), e por Calorimetria Diferencial de Varredura:

Tabela 4. Perdas de massa e suas respectivas temperaturas de acordo com a derivada da TGA (DTG).

Amostra	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Perda de massa total (%)
MMT nat	50	14	18
	50-630	4	
MMT son	55	5	9
	55-630	4	
MMT sonicada imob	53	7	12
	53-630	5	
	62	2	
MMT son APTES /glut	62-815	15	22
	815	5	
	62	2	
MMT son/APTES /glut imob	51	3	24
	51-817	15	
	817	6	

Figura 5. Análise Termogravimétrica

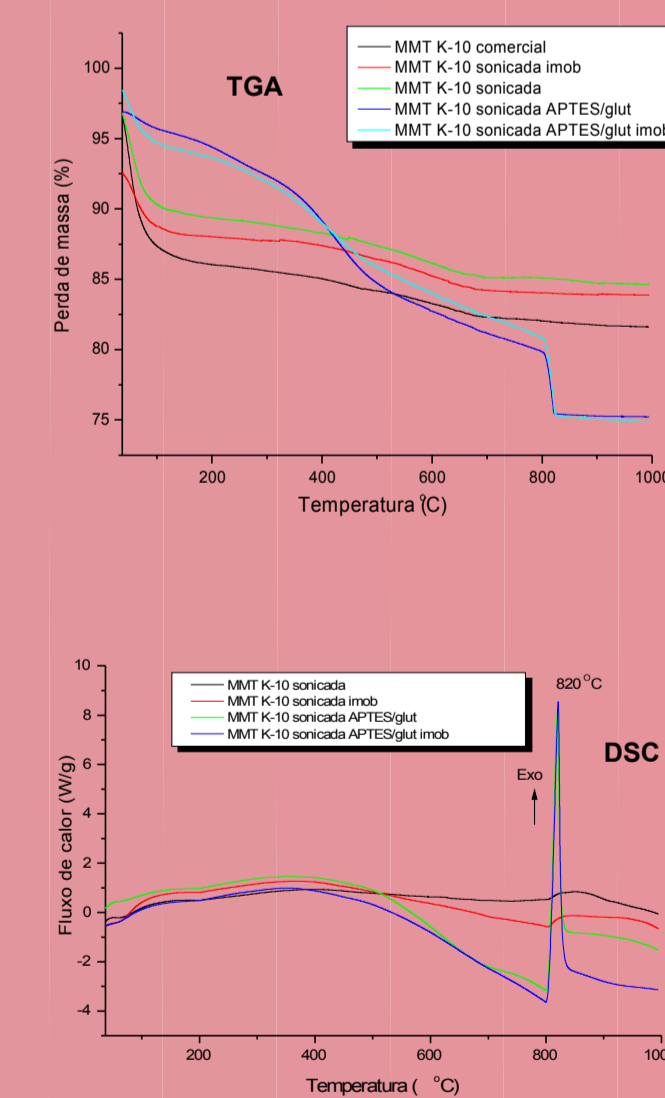


Figura 5. Calorimetria diferencial de varredura (DSC). As amostras MMT K 10 son e MMT K10 son imob apresentaram curvas com perfil semelhante, sem nenhum evento endotérmico ou exotérmico significativo. As amostras MMT K10 APTES/glut e MMT K 10 APTES/glut imob apresentaram um pico exotérmico a 820 °C correspondente a oxidação e volatilização do produto de oxidação da matéria orgânica degradada oclusa na amostra³.

Conclusões

Os melhores resultados de imobilização foram obtidos em suportes sem tratamento de sonicação, pelo método da ligação covalente (APTES/glut). Não foi obtido um aumento das áreas específicas da MMT K10 após a sonicação, como era esperado. Isso pode ser justificado pelo efeito da cavitação³, ou secagem do material em temperaturas excessivas, gerando uma colapso de suas lamelas. No entanto, através dos ensaios das atividades e das diversas caracterizações ficou provado a presença de enzima imobilizada nas amostras.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica e financiamento.

1. L. Poli, A. Batista, T. et al. Effect of sonication on the particle size of montmorillonite clays. Journal of Colloid and Interface Science 325 (2008) 386-390.
2. Sanjay, G.; Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. J. Porous Mater. No. 15, 359- 367 (2008).
3. Liu, G.; Wu, S.; Ven, M. V.; Molenaar, A. e Besamusca, J. Characterization of Organic Surfactant on Montmorillonite Nanoclay to Be Used in Bitumen. Journal of Materials in Civil Engineering 22(8) (2010) 794-799.
4. Barboza, J. C. S; Serra, A.A. Ultra-som (I): Influência do ultra-som na química. Química Nova 15 (4) (1992).