



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SANDRA MARIA LOPES DOS SANTOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICAS MESOPOROSAS PARA A
ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS MODELO (BSA, LISOZIMA E CELULASE).**

FORTALEZA

2013

SANDRA MARIA LOPES DOS SANTOS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICAS MESOPOROSAS PARA A ADSORÇÃO
DE BIOMOLÉCULAS MODELO (BSA, LISOZIMA E CELULASE).

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de processos químicos e bioquímicos

Orientadora: Prof.^a Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S238s Santos, Sandra Maria Lopes dos.
Síntese e caracterização de sílicas mesoporosas para a adsorção de biomoléculas modelo (bsa, lisozima e celulase) / Sandra Maria Lopes dos Santos. – 2013.
136f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Profª. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.
Coorientação: Ivanildo José da Silva Júnior.
1. Biomoléculas. 2. Albumina. 3. Lisozima. 4. Celulase. I. Título.

SANDRA MARIA LOPES DOS SANTOS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICAS MESOPOROSAS PARA A ADSORÇÃO
DE BIOMOLÉCULAS MODELO (BSA, LISOZIMA E CELULASE).

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 23 de setembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof.(a) Dra. Diana Cristina Silva de
Azevedo – Orientadora (UFC)



Prof. Dr. Antonio Souza de Araújo
(UFRN)



Prof.(a) Dra. Luciana Rocha Barros
Gonçalves (UFC)



M^{te} Cristiane Martins de Souza
Dra. Maria Cristiane Martins de Souza
(UFC)



Dra. Solange Assunção Quintella (UFC)

FORTALEZA

2013

À Deus dedico porque sem a presença d'Ele nada seria possível.

Aos meus pais Luiz Beca e Maria Eunice, bem como aos meus irmãos Hellen, Elaine Cristina e Luiz Filho.

Ao meu esposo Anderson.

A vocês dedico por toda paciência com que suportaram todas as minhas dificuldades, mas principalmente pelo carinho e amor que sempre me deram e continuam me dando até hoje.

AGRADECIMENTOS

Costumo falar que sou uma pessoa muito abençoada por Deus, pois Ele sempre coloca anjos no meu caminho para ajudar em minha jornada. Senhor Deus, gostaria de agradecê-lo por todas as bênçãos concedidas, por todos os obstáculos vencidos e por todos os não vencidos, pois destes vieram às maiores lições.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida desde o maternal até o Doutorado. Esta longa caminhada só foi possível porque pude contar com a valiosa contribuição de cada um de vocês.

Obrigada à professora Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo e ao professor Dr. Ivanildo José da Silva Júnior, foi um prazer tê-los como orientadores de Doutorado. Além de serem grandes profissionais, vocês são grandes pessoas. Muito obrigada por todos os ensinamentos, as cobranças, os incentivos e, acima de tudo, pelo sorriso amigo na hora certa. Esta Tese e eu devemos muito a vocês dois.

Também quero agradecer ao Grupo de Pesquisa em Separação por Adsorção (GPSA) por ter me recebido e pelos ensinamentos a mim repassados. Agradeço especialmente aqueles que conviveram comigo no LP1 durante estes quatro anos ou parte deles: Josy, Kerolaine, Ana Vívian, Elaine, Diego, Eurânio e Érika. Vocês sempre estarão em um lugar especial no meu coração.

Aos meus pequenos-grandes AMIGOS, meu eterno agradecimento. Agradeço a oportunidade de tê-los conhecido, aprendi muitíssimo com cada um de vocês, que são na minha concepção uma das minhas maiores conquistas nestes quatro anos. Tenho muito orgulho de ter conquistado a confiança de vocês, espero ter conseguido colaborar de alguma forma para o crescimento de vocês meus “filhos queridos do coração” Mariana, Bruna, Karina e Marlon. Neste trabalho há um pouquinho de cada um de vocês. Obrigada por esta alegre convivência!

Obrigada à Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de fazer a graduação, o mestrado e o doutorado. Tenho muito orgulho de dizer que estudei nesta Instituição.

Da minha instância em Málaga quero agradecer ao professor Dr. Enrique Castellón por sua disponibilidade, orientação e presteza. É realmente admirável a forma como trata seus alunos dentro e fora da Universidade. *¡Fué un gusto trabajar com Usted!*

Quero agradecer também a Juan, Cristina, Enrique, Diana, Álvaro, Sabrina, Juammi, Jaasiel y Mara. Vocês foram muito mais do que companheiros de laboratório ou de

viagem, vocês foram meus amigos, minha família. *¡Muchas gracias por cada sonrisa! Vosotros hicieron de aquellos meses una experiencia inolvidable.*

Muito obrigada professor Dr. Karim Sapag e seu grupo (Universidad Nacional de San Luis, Argentina) por sua preciosa ajuda na análise e discussão dos resultados obtidos a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio (artigo 1). *¡Muchas gracias!*

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e no exterior (através dos projetos nº PE – 055/2008 e 5993/11-3, respectivamente) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (processo nº 577363/2008-5).

Quero agradecer a presença constante de todos os meus amigos não citados aqui por falta de espaço, mas nem por isso menos importantes, afinal, já dizia Silene B. Ayub: “Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar”.

E como o mais importante costuma ficar para o final, muito obrigada a meus pais, irmãos, esposo e aos demais membros da minha família, porque TUDO devo a vocês. Se eu cheguei até aqui foi por vocês. Os amo INCONDICIONALMENTE!

A todos, muito obrigada por tudo e por tanto.

Sandra Maria Lopes dos Santos

RESUMO

Parte do custo de produção de biomoléculas com elevada pureza e o rendimento deste processo depende das etapas de separação e purificação utilizadas. Nestas etapas, geralmente é necessário utilizar técnicas de cromatografia e um dos fatores que influenciam no seu elevado desempenho é o desenvolvimento de fases estacionárias ou adsorventes adequados. O presente trabalho investiga a adsorção de três biomoléculas-modelo (albumina de soro bovino - BSA, lisozima - LYS e celulase - CEL) em sílicas mesoporosas obtidas a partir de copolímeros tribloco como agentes direcionadores estruturais. Relatam-se diferentes procedimentos de síntese que visam modificar a química da superfície e promover alterações texturais como, por exemplo, o alargamento e/ou encurtamento dos poros, bem como a sua ordenação mesoscópica. Na primeira parte da tese, foram sintetizadas (i) SBA-15 por duas rotas distintas, sol-gel e hidrotérmica, e (ii) SBA-16 por via hidrotérmica. Na segunda parte, amostras de SBA-15 com diferentes tamanhos de poros e comprimento de canais foram sintetizados utilizando 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), heptano e fluoreto de amônio (NH_4F). O TMB foi utilizado para aumentar o diâmetro dos poros e o heptano combinado com NH_4F , para modificar o tamanho dos canais da SBA-15. Já na terceira parte do trabalho, a acidez da SBA-15 foi modificada pela adição de zircônio com três razões molares Si/Zr distintas (5, 10 e 15). A adsorção das três biomoléculas-alvo foi estudada por experimentos em tanques agitados. Os resultados indicam que, para sílicas puras, maiores capacidades de adsorção são obtidas quando o pH está próximo ao ponto isoelétrico da biomolécula. Resultados muito promissores foram encontrados para a adsorção de proteínas sobre as sílicas com maior diâmetro de poros (acima de 10 nm), chegando a centenas de miligramas por grama de adsorvente. No caso dos materiais com zircônio, os melhores resultados foram encontrados para os materiais com a menor quantidade do referido heteroátomo (Si/Zr = 15), que apresentam textura similar ao suporte original. Isto sugere que pode haver uma acidez moderada ótima para a adsorção das biomoléculas estudadas ou que o “excesso” de átomos de zircônio leva a impedimentos estéricos que causam uma redução na capacidade de adsorção da biomolécula.

Palavras-chave: SBA-15. Biomoléculas. Adsorção. Agente expander de poros. Acidez.

ABSTRACT

Part of the cost of production of biomolecules with high purity and yield depends on the separation and purification steps used. In these steps, it is usually necessary to use chromatography techniques and one of the factors that influence on its high performance is the development of stationary phases or suitable adsorbents. The present study investigates the adsorption of biomolecules three model (bovine serum albumin - BSA, lysozyme - LYS cellulase and - CEL) in mesoporous silica obtained from tri-block copolymers as agents drivers structure. We report different synthesis procedures aimed at modifying the surface chemistry and promoting textural changes, such as enlargement and/or pores, and the mesoscopic ordering. In the first part of this thesis were synthesized (i) SBA-15 by two different routes, sol-gel and hydrothermal and (ii) SBA-16 by hydrothermal. In the second part, SBA-15 samples with different pore sizes and channel length were synthesized using 1,3,5-trimethylbenzene (TMB), heptane and ammonium fluoride (NH_4F). TMB was used to increase the pore diameter and heptane combined with NH_4F to modify the size of the channels of SBA-15. In the third part of the work, the acidity of SBA-15 was modified by the addition of zirconium with three molar ratios Si/Zr distinct (5, 10 and 15). The adsorption of the three target biomolecules was studied by experiments in stirred tanks. The results indicate that for pure silicas, higher adsorption capacities are obtained when the pH is close to the isoelectric point of biomolecule. Very promising results for were found the adsorption of proteins on silicas with larger pore diameters (above 10 nm), up to hundreds of milligrams per gram of adsorbent. In the case of materials with zirconium, the best results were found for the materials with the lowest amount of said heteroatom (Si/Zr = 15), which have similar texture to the original support. This suggests that there may be a moderate acidity which-enhances the adsorption of the studied biomolecules or excess zirconium atoms lead to steric hindrances causing a decrease in the adsorption capacity of the biomolecule.

Keywords: SBA-15. Biomolecules. Adsorption. Pore-expanding agents. Acidity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2. 1 - Esquema de formação de estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura.	23
Figura 2. 2 - Ilustração esquemática dos canais de SBA-15	26
Figura 2. 3 - Ilustração esquemática dos nanocompartimentos da SBA-16.....	28
Figura 2. 4 - Classificação dos diferentes tipos de isoterma de adsorção.	33

Capítulo 3

Figura 3. 1 – Ilustração esquemática dos canais da SBA-15 (a) e nanocaixas da SBA-16 (b).	48
Figura 3. 2 – Difração de raios-X a baixo ângulo das amostras SBA-15 SG (a), SBA-15 HD (b) and SBA-16 (c).....	53
Figura 3. 3 – Imagens TEM das amostras de SBA-15 SG (A1 - A2), SBA-15 HD (B1 - B2) e SBA-16 (C1 - C2).....	54
Figura 3. 4 – Isoterma de adsorção e dessorção de N ₂ (a) e distribuição de tamanho de poros por NLDFT (b) para SBA-15 SG (■) e SBA-15 HD (○). A linha pontilhada representa a dessorção.	55
Figura 3. 5 - Isoterma de adsorção e dessorção de N ₂ (a) e distribuição de tamanho de poros por NLDFT (b) para SBA-16. A linha pontilhada representa a dessorção.....	56
Figura 3. 6 – Influência do pH na adsorção de BSA (a), LYS (b) e CEL (c) em SBA-15 obtidos por via sol-gel (■), via hidrotérmica (○) e SBA-16 (▲).	59
Figura 3. 7 – Cinética de adsorção de BSA (a), LYS (b) e CEL (c) em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲).	61
Figura 3. 8 – Isoterma de adsorção de BSA a 295 K em (a): SBA-15 SG (■) e SBA-15 HD (○); (b) SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir, linhas pontilhadas (···) representam o modelo de Langmuir-Freundlich e as linhas tracejadas (---) representam o modelo de Henry.	64
Figura 3. 9 – Isoterma de adsorção de LYS a 295 K em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir e linhas pontilhadas (···) representam o modelo de Langmuir-Freundlich.	65
Figura 3. 10 – Isoterma de adsorção de CEL a 295K em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir e as linhas pontilhadas (···) representam o modelo de Langmuir-Freundlich.	65

Capítulo 4

- Figura 4. 1– Difratoograma XRD obtido para SBA-15 sintetizada com e sem agente expensor de poros e calcinada a 550 °C. (a) S, (b) S1, (c) S2 e (d) S3. 86
- Figura 4. 2 – Micrografias TEM de SBA-15 (a) S, (b) S1, (c) S2 e (d) S3. As imagens menores em (a) e (b) mostram uma visão transversal dos canais, demonstrando seu comprimento. 86
- Figura 4. 3 – Isoterma de adsorção/desorção de N₂ a 77 K (a) e distribuição de diâmetro de poros por NLDFT (b) para SBA-15 (■) S, (○) S1, (△) S2 e (●) S3 e calcinada a 550 °C. 88
- Figura 4. 4 - Comparação dos espectros FTIR de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3). 90

Capítulo 5

- Figura 5. 1 – Isoterma de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K para SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15. 117
- Figura 5. 2 – Micrografias TEM de SBA-15 (a) S, (b) S1, (c) Zr-SBA-15_05 (d) Zr-SBA-15_10 e (e) Zr-SBA-15_15. 118
- Figura 5. 3 – Difratoograma XRD a baixo ângulo obtido para SBA-15 sintetizada com e sem agente expensor de poros e calcinada a 550 °C. (a) S, (b) S1, (c) Zr-SBA-15_5, (d) Zr-SBA-15_10 e (e) Zr-SBA-15_15. 119
- Figura 5. 4 – Isoterma de adsorção de CEL nas SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15. T= 25 °C. pH = 4,0. 127

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 3. 1 – Propriedades texturais das amostras de SBA-15 HD, SBA-15 SG e SBA-16. ..	57
Tabela 3. 2 - Parâmetros da equação de Langmuir, Henry e Langmuir-Freundlich para a adsorção de BSA em sílica mesoporosa.	66
Tabela 3. 3 – Parâmetros da equação de Langmuir e Langmuir-Freundlich para a adsorção de LYS em sílica mesoporosa.	66
Tabela 3. 4 - Parâmetros da equação de Langmuir e Langmuir-Freundlich para a adsorção de CEL em sílica mesoporosa.	66

Capítulo 4

Tabela 4. 1 – Sumário das sílicas mesoporosas sintetizadas.	82
Tabela 4. 2 – Parâmetros estruturais das amostras de SBA-15 sintetizadas.....	89
Tabela 4. 3 – Parâmetros da equação de Henry para adsorção de celulase em sílica mesoporosa.	94
Tabela 4. 4 – Parâmetros das equações de Langmuir e de Langmuir-Freundlich para adsorção de BSA em sílicas mesoporosas.	97
Tabela 4. 5 – Parâmetros das equações de Langmuir e de Langmuir-Freundlich para adsorção de LYS em sílicas mesoporosas.	97
Tabela 4. 6 – Comparação entre a quantidade adsorvida de BSA em SBA-15 e suas características texturais reportado neste trabalho e em outros da literatura.	99
Tabela 4. 7 - Comparação entre a quantidade adsorvida de LYS em SBA-15 e suas características texturais reportado neste trabalho e em outros da literatura.	100

Capítulo 5

Tabela 5.1– Parâmetros estruturais das amostras de SBA-15 e Zr-SBA-15 sintetizadas.....	116
Tabela 5.2 – Percentagens atômicas dos diferentes adsorventes mesoporosos sintetizados. .	120
Tabela 5.3 – Parâmetros das equações de Langmuir para adsorção de BSA em sílicas mesoporosas SBA-15 e Zr-SBA-15. Medidas a T= 25 °C. pH = 4.8	126
Tabela 5.4 – Parâmetros das equações de Langmuir para adsorção de CEL em sílicas mesoporosas SBA-15 e Zr-SBA-15.	127

SUMÁRIO

Capítulo 1	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 MOTIVAÇÃO	18
3 OBJETIVOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

Capítulo 2	21
1 MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS	21
2 MECANISMO DE FORMAÇÃO DE MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS	23
3 MATERIAL MESOESTRUTURADO DO TIPO SBA-15 E SBA-16	25
4 ACIDEZ DAS SÍLICAS MESOPOROSAS	28
5 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	29
6 ADSORÇÃO E SEUS MODELOS TEÓRICOS	31
7 ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SÍLICAS MESOPOROSAS	34
7.1 Albumina de soro bovino (BSA)	35
7.2 Lisozima (LYS)	36
7.3 Celulase (CEL)	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Capítulo 3 - Síntese e caracterização de sílica mesoporosa ordenada (SBA-15 e SBA-16) para adsorção de biomoléculas	46
ABSTRACT	46
RESUMO	47
1 - INTRODUÇÃO	47
2 PARTE EXPERIMENTAL	49
2.1 Reagentes	49
2.2 Sínteses	50

2.3. Caracterizações	51
2.4. Experimentos de adsorção de proteínas	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Caracterização de SBA-15 e SBA-16	52
3.2 Adsorção de biomoléculas.....	58
3.2.1. Efeito do pH na adsorção de BSA, LYS e CEL.....	58
3.2.2 Cinética e isoterma de adsorção de BSA, LYS e CEL em SBA-15 e SBA-16	61
4 CONCLUSÕES.....	69
Referências	70

Capítulo 4 - Adsorção de biomoléculas em sílica mesoporosa SBA-15: efeito do comprimento do poro e da dimensão molecular

ABSTRACT	76
1 INTRODUÇÃO	78
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	80
2.1 Reagentes.....	80
2.2 Síntese de suportes mesoestruturados	81
2.2.1 Síntese de SBA-15 com diâmetro de poro médio e canais longos	81
2.2.2 Síntese de SBA-15 com poro largo e canais longos	81
2.2.3 Síntese SBA-15 com poros largos e canais curtos.....	81
2.3 Técnicas de caracterização	83
2.4 Experimentos de adsorção de biomoléculas.....	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1 Caracterização	85
3.2 - Resultados de adsorção em tanques agitados	91
4 CONCLUSÕES.....	102
REFÊRENCIAS	103

Capítulo 5 - Equilíbrio e cinética de adsorção de bsa e celulase em sílica mesoporosa SBA-15 dopada com zircônio

.....	108
1 INTRODUÇÃO	110
2 PARTE EXPERIMENTAL	112
2.1 Reagentes	112
2.2. Síntese de suportes mesoestruturados	112
2.2.1. Síntese de SBA-15 de poro médio (S)	112
2.2.2. Síntese de SBA-15 de poro largo (S1)	112
2.2.3. Síntese de Zr-SBA-15	113
2.3. Caracterizações	113
2.4 experimentos de adsorção de BSA e CEL	115
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
3.1 Caracterização	116
3.2 Resultados de adsorção em tanques agitados	122
4 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	128

Capítulo 6..... 132

1 CONCLUSÕES GERAIS	132
2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	133

Anexo..... 135

ANEXO 1: Cópia da primeira página do artigo publicado	135
--	-----

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

A bioseparação é um ramo da bioengenharia que vem sendo muito estudada com o intuito de desenvolver técnicas mais eficientes e econômicas em larga escala (“*scale-up*”), alcançando um elevado grau de pureza e recuperação de biomoléculas sem comprometer sua atividade (1).

A separação, recuperação e purificação parcial ou mesmo total dessas biomoléculas, sobretudo proteínas e enzimas, requer a obtenção de produtos livres de contaminantes tais como endotoxinas, bactérias, vírus, partículas sólidas ou outras moléculas biologicamente ativas. É importante ressaltar que o número de etapas envolvidas nestes processos (separação, recuperação e purificação) deve ser reduzido, a fim de minimizar os custos e aumentar o rendimento do produto final.

Algumas características do produto biológico podem ser utilizadas para ajudar no processo de bioseparação. Em se tratando de enzimas e proteínas, tamanho, carga, afinidade biológica e solubilidade são fatores que podem influenciar positiva ou negativamente a escolha do método de bioseparação. As diferentes técnicas empregadas nos processos de separação, tais como filtração, extração, adsorção, cromatografia e eletroforese entre outras, são baseadas em uma ou mais destas propriedades (2).

Geralmente, na etapa de purificação, utilizam-se operações cromatográficas com o objetivo de isolar e purificar o metabólito de interesse em relação aos demais. Esta operação conduz à pureza adequada da molécula, deixando-a em condição ótima para seu uso. Um dos princípios da operação cromatográfica baseia-se na adsorção de diferentes moléculas sobre uma determinada matriz seguida de dessorção seletiva, que resultará na separação destas moléculas (3). Um dos fatores que influenciam no elevado desempenho das operações cromatográficas é o desenvolvimento de fases estacionárias ou materiais adsorventes adequados. Como a maioria das biomoléculas apresentam dimensões em escala nanométrica, os materiais mesoporosos

(tamanho de poros entre 2 e 50 nm) ordenados se apresentam como uma excelente alternativa para esta finalidade.

Uma das principais vantagens dos materiais mesoporosos estruturados é que eles podem ser manipulados quimicamente através da modificação de sua superfície com a adição de moléculas orgânicas ou inorgânicas específicas, possibilitando sua alteração de forma seletiva com o intuito de serem utilizados para aplicações específicas, o que vislumbra uma vasta área a ser explorada, levando-se em consideração as características intrínsecas dos mesmos. As propriedades destes materiais os tornam atrativos para sua utilização em processos de adsorção, catálise, nanotecnologia e como hospedeiros de uma infinidade de moléculas. Cada aplicação requer certas propriedades em termos da estrutura de sua fase nanométrica e organização da mesoestrutura. Desta maneira, a síntese, a modificação e o controle das propriedades desses materiais em escala nanométrica representam o acesso a novas funcionalidades e diversificação de suas aplicações.

Neste contexto, muitos materiais vêm sendo estudados como candidatos potenciais para diversos tipos de aplicações. Dentre estes materiais, destaca-se a sílica mesoporosa ordenada denominada SBAn (*Santa Barbara Amorphous*) descrita por Zhao e seus colaboradores (4). Sílicas mesoporosas ordenadas são compostos a base de silicatos que, embora amorfos, apresentam estruturas altamente organizadas, que conferem a esses materiais características texturais bastante interessantes, tais como estabilidade térmica, tamanho de poros bem definido, distribuição estreita de tamanho de poros e elevada área superficial.

Estruturalmente falando, a SBA-15 apresenta uma rede de canais e poros com arranjo hexagonal. Já os materiais mesoporosos tipo SBA-16, apresentam um arranjo cúbico, cujos poros tipo gaiola estão conectados por poros cilíndricos. Em comum, estes materiais têm a característica de apresentar estabilidade térmica e hidrotérmica, apresentar poros com tamanhos bem definidos na escala nanométrica e permitir modificações de sua química superficial (5). Essa arquitetura particular de poros torna esses materiais (SBA-15 e SBA-16) viáveis para várias aplicações como, por exemplo, encapsulação de uma infinidade de compostos na matriz da sílica para liberação controlada, imobilização de enzimas (biocatalisadores) e separação cromatográfica de biomoléculas.

2 MOTIVAÇÃO

O presente trabalho envolve o estudo da adsorção nestas sílicas mesoporosas ordenadas de três biomoléculas modelo: albumina de soro bovino, lisozima e celulase. Esses materiais têm despertado um interesse cada vez maior na comunidade científica motivada tanto pela singularidade das suas propriedades, quanto pelas diversificadas possibilidades de avanços tecnológicos associados. Os materiais mesoporosos estruturalmente ordenados são candidatos promissores para incorporação de moléculas orgânicas como, por exemplo, proteínas e enzimas, considerando que estas moléculas geralmente, retêm suas características físicas e propriedades químicas mesmo após processos como adsorção, encapsulamento e imobilização. Além disso, elas são acessíveis a reagentes externos por causa da rede de poros dos materiais, desta forma reações químicas e interações podem acontecer. Embora se tenha alcançado um progresso significativo quanto ao desenvolvimento de sistemas para a adsorção, encapsulamento ou imobilização de biomoléculas, ainda há muito a ser estudado. A funcionalização ou modificação química da sílica mesoporosa através do ancoramento de átomos ou moléculas às superfícies dos poros é a estratégia proposta para conferir especificidade química e permitir a manipulação da sílica nas diversas aplicações, com possibilidade inclusive de controle do grau de modificação de suas propriedades. Os materiais adsorventes SBA-15 e SBA-16 foram escolhidos dentre os vários materiais mesoporosos devido ao formato de sua estrutura porosa, o que favorece a difusão de moléculas nesses. Contudo, dentre os diferentes materiais mesoporos investigados por vários grupos de pesquisa do mundo, existem poucas publicações sobre a aplicação de SBA-16 na adsorção de biomoléculas. Neste trabalho, a adição de agentes expansores de poros foi utilizada como ferramenta para aumentar a capacidade de adsorção de biomoléculas e a adição de zircônio com diferentes razões molar Si/Zr (5 a 15) foi utilizada a fim de modificar a acidez da estrutura mesoporosa SBA-15 e verificar se esta acidez conferiria ao adsorvente maior afinidade pelas biomoléculas em estudo. A isoterma de adsorção de celulase sobre sílica tridimensional SBA-16 foi descrita pela primeira vez neste trabalho.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar peneiras moleculares de sílica a partir de agentes direcionadores do tipo copolímero tribloco (SBAn) com diferentes características, visando estudar a influência do tamanho dos poros e dos canais, além da acidez superficial na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS) e celulase (CEL).

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

i. Sintetizar sílicas mesoporosas ordenadas do tipo SBA-15 (via sol-gel e via hidrotérmica) e SBA-16 e investigar o seu potencial na adsorção de BSA, LYS e CEL.

ii. Sintetizar sílicas mesoporosas com diferentes tamanhos de poro e comprimento de canais através da utilização de três compostos, 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), heptano e fluoreto de amônio (NH₄F), além de estudar a capacidade de adsorção destes materiais frente a biomoléculas-modelo, como BSA, LYS e CEL.

iii. Modificar a acidez superficial de sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 através da adição de zircônio em diferentes concentrações a sua estrutura e testar a influência desta acidez na capacidade de adsorção de BSA e celulase.

iv. Caracterizar os materiais mesoporosos obtidos por difração de raios-X de baixo ângulo (DRX), adsorção de nitrogênio, microscopia de transmissão eletrônica (TEM) e espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), relacionando suas características texturais e composicionais com a capacidade de retenção das biomoléculas-modelo.

Nos próximos capítulos serão apresentadas uma breve revisão da literatura abordando a história da descoberta dos materiais mesoporosos ordenados, os aspectos gerais da síntese de sílicas mesoporosas, em especial a SBA-15 e a SBA-16 (capítulo 2); a descrição da metodologia experimental empregada na obtenção dos adsorventes estudados e sua caracterização, bem como os resultados e conclusões obtidos na forma de artigos (capítulos 3, 4 e 5) e as conclusões gerais do trabalho seguidos de sugestões para trabalhos futuros (capítulo 6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Evangelista AF, Biazus JPM, Santana JCC, Jordão E, Souza RR. Produção e estudo do potencial de hidrólise de uma nova fonte de enzimas amilolíticas a partir do malte de milho (*Zea mays*). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2005; 1:1-14.
2. Hong JW, Hosokawa K, Fujii T, Seki M, Endo I. Microfabricated structures for bioseparation. In: I. Endo TNSKaTY, editor. *Progress in Biotechnology*. Volume 16: Elsevier; 2000. p. 69-74.
3. Pessoa Jr. A, Kilikian BV. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri, SP: Manole; 2005. 444 p.
4. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society*. 1998; 120: 6024-6036.
5. Tsoncheva T, Rosenholm J, Teixeira CV, Dimitrov M, Linden M, Minchev C. Preparation, characterization and catalytic behavior in methanol decomposition of nanosized iron oxide particles within large pore ordered mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2006; 89: 209-218.

Capítulo 2

1 MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS

Materiais porosos de uma forma geral têm recebido bastante destaque devido à possibilidade de aplicação em vários campos. De acordo com a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (1), os materiais porosos são divididos em três classes dependendo do diâmetro do poro (d_p) do material:

- Microporosos ($d_p \leq 2$ nm)
- Mesoporosos ($2 < d_p < 50$ nm)
- Macroporosos ($d_p \geq 50$ nm)

Os materiais microporosos, com diâmetro de poros variando até 2 nm, abrangem desde a sílica amorfa e os géis inorgânicos até materiais cristalinos como os aluminosilicatos, aluminofosfatos, galofosfatos e outros materiais que fazem parte desta família. Dentre eles, destacam-se as zeólitas, que são aluminosilicatos naturais ou sintéticos que possuem elevada área superficial, distribuição de poros estreita e elevada estabilidade térmica. No entanto este material apresenta como fator limitante para sua utilização, seu diâmetro de poros que é considerado relativamente pequeno (0,3-0,72 nm).

Por volta das décadas de 80 e 90 vários grupos de pesquisa e companhias multinacionais começaram a direcionar seus esforços no sentido de sintetizar materiais com diâmetros de poros maiores. Isto aconteceu porque precisava-se atender as exigências ambientais nos processos de purificação de petróleo. Os diâmetros cinéticos elevados dos compostos presente no petróleo (enxofre, nitrogênio e oxigênio) dificultavam a utilização das zeólitas para esta finalidade já que as dimensões dos seus poros são relativamente pequenas. Com isso, surgem então os materiais mesoporosos com características de materiais amorfos ou sólidos paracristalinos, como sílicas ou aluminas paracristalinas, ou materiais de superfícies modificadas. Sua estrutura é formada de camadas como argilas pilarizadas, as quais podem ser

afastadas uma das outras com a inclusão de cátions entre elas. Apesar de apresentarem poros com tamanhos largamente distribuídos, em geral os mesmos se apresentam com espaçamento irregular (2).

No início dos anos 1990, os cientistas da *Mobil Oil Corporation* desenvolveram uma nova classe de materiais inorgânicos, que ficou conhecida como família M41S. Estes materiais foram obtidos por via hidrotérmica utilizando sais quaternários de amônio como surfactante em condições básicas. Por apresentarem diâmetros de poros entre 2 e 10 nm, os materiais assim sintetizados foram classificados como materiais mesoporosos (2, 3). A novidade deste trabalho foi a substituição de espécies catiônicas por moléculas surfactantes como direcionadoras de estrutura (4).

Os pesquisadores observaram que variando as condições de síntese e o agente direcionador, era possível obter materiais mesoporosos com estruturas diferentes, tais como o MCM-41 (forma hexagonal), o MCM-48 (forma cúbica) e o MCM-50 (forma lamelar não estável). Estes novos sólidos despertaram um grande interesse devido à uniformidade dos tamanhos de poros, além do alcance da escala mesoporosa e um ordenamento de poros a médio e longo alcance (2, 3).

Em 1995 foi sintetizada pela primeira vez a sílica mesoporosa hexagonal (HMS) por pesquisadores da Universidade Estadual de Michigan utilizando uma rota neutra (5). Este suporte apresenta uma estrutura de canais pequenos de tamanho uniforme (em torno de 2 nm) porém com uma estrutura hexagonal desordenada. Normalmente é empregado dodecilamina como tensoativo, porém outros materiais tais como aminas alifáticas de maior e menor tamanho de cadeia (8 – 18 Carbonos) também podem ser utilizadas. Como resultado, sólidos com diâmetros de poros variando entre 1,6 e 3,1 nm foram obtidos.

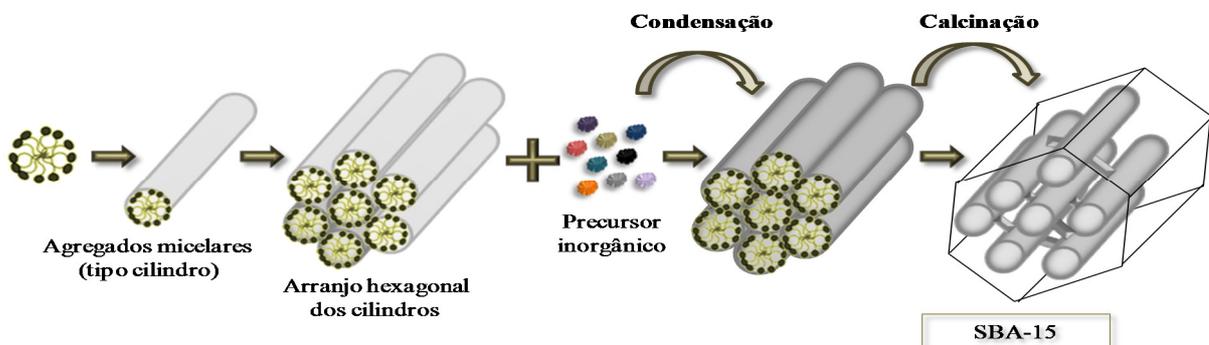
No final da década de 1990, pesquisadores da Universidade da Califórnia – Santa Bárbara – EUA (6) relataram a síntese de novas estruturas de sílica mesoporosa utilizando tensoativos não iônicos de baixo peso molecular em meio ácido, obtendo materiais com estruturas diversas tais como cúbica, hexagonal tridimensional e hexagonal bidimensional. A estes materiais deram o nome de SBAn (*Santa Bárbara Amorphous*). A SBA-15, por exemplo, contém mesoporos em arranjo hexagonal uniforme e paredes espessas, fatores que promovem uma maior estabilidade térmica e hidrotérmica que a da sílica mesoporosa convencional MCM-41(6). Além disso, os agentes direcionadores de estrutura utilizados para a síntese do SBA-15

são relativamente mais baratos, não tóxicos e biodegradáveis, quando comparados aos usados na preparação do MCM-41 (7).

2 MECANISMO DE FORMAÇÃO DE MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS

Inúmeros estudos têm sido realizados para entender a formação das mesoestruturas na presença de surfactantes. De uma forma geral, a síntese de sílicas mesoporosas pode ocorrer por duas principais rotas para a formação de sua estrutura. Na primeira rota (direcionador por cristal líquido – LCT), tem-se uma organização das moléculas do surfactante independente da espécie inorgânica presente, ocorrendo em seguida a condensação da sílica e polimerização em torno da estrutura pré-formada (Figura 2.1). Para a segunda rota (rota cooperativa), a fonte de sílica é adicionada juntamente com o surfactante, auxiliando de forma conjunta na formação da estrutura do material. Independente da rota escolhida para a síntese do adsorvente, o material apresentará um arranjo composto por micelas cercadas por uma matriz inorgânica (8). Ao final desta etapa o surfactante é removido, geralmente por calcinação. Este método é usado tanto na formação dos materiais da família M41S (meio básico) quanto dos materiais da família SBAn (meio ácido).

Figura 2.1 - Esquema de formação de estrutura inorgânica mesoporosa mediada por agente direcionador de estrutura.



Fonte: adaptado de HOFFMANN et al. (9)

Em resumo, os silicatos mesoporosos são preparados a partir de uma fonte de sílica, um surfactante e um solvente misturados em quantidades apropriadas. Outros reagentes que podem ser utilizados são os ácidos, bases, sais, agentes dilatadores e co-solventes. Dependendo das condições de síntese podem-se obter diferentes materiais.

A formação da sílica mesoporosa ocorre através do equilíbrio termodinâmico entre a sílica polimerizada e a interação sílica-micela. As espécies mais comuns usadas como monômeros na formação de sílicas mesoporosas são alcóxidos tetrafuncionais, como o tetraetilortosilicato (TEOS) e outras fontes de sílica como solução de silicato de sódio (10, 11).

Os surfactantes ou agentes tensoativos são guias para a formação da mesoestrutura inorgânica solubilizados no meio. Eles atuam como agentes direcionadores de estrutura determinando a forma na qual se dará a condensação do precursor sobre a estrutura. Trata-se de uma molécula anfifílica, ou seja, é uma molécula constituída por uma parte polar hidrofílica (cabeça) unida a uma cadeia hidrofóbica geralmente linear de hidrocarbonetos (calda). Em dissolvente, onde uma das suas partes é insolúvel devido à natureza anfifílica do surfactante, vai ocorrer a sua agregação, por isso os surfactantes em meio aquoso se reagrupam formando diferentes estruturas micelares de modo que as partes hidrofóbicas ficam protegidas do meio exterior.

No caso da síntese de SBAs, o surfactante mais comumente utilizado é um copolímero chamado comercialmente de plurônico. Ele é um surfactante polimérico que pertence à família de surfactantes copolímeros em blocos poli (óxido de etileno) - poli (óxido de propileno) - (PEO-PPO-PEO), sendo os PEO os blocos hidrofílicos e os PPO os blocos mais hidrofóbicos. A razão de composição (peso molecular) PEO/PPO pode variar.

Cada plurônico apresenta um nome específico que nos dá informações sobre a quantidade relativa dos diferentes blocos e, conseqüentemente, quanto à massa molar. Seu nome fornece várias informações relevantes, podendo começar com letra F (*flakes*), L (*liquid*) ou P (*Paste*) a depender da forma como a micela se apresenta em seu interior. Por exemplo, o plurônico P123, utilizado na síntese de SBA-15, é um copolímero na forma de pasta com 30% de PEO (do número 3 em 123).

Uma vez conhecida a disposição das micelas dos surfactantes em solução, os pesquisadores começaram a usar uma nova técnica para aumentar o diâmetro de poro dos materiais sintetizados (12-14). Esta técnica consiste na substituição de moléculas orgânicas cada vez maiores por moléculas hidrófobas, já que estas se dissolvem na zona interna da micela

atuando assim como agentes de inchamento e conferindo à micela formada um maior volume de poros.

A interação entre o composto orgânico-inorgânico é regida por ligações não covalentes fracas como ligações de hidrogênio, força de van der Waals e ligações eletrovalentes entre o surfactante e o composto inorgânico. Em vez de uma superposição de interações fracas, uma reação complexa integrada e sinérgica facilita o processo. Uma montagem cooperativa entre o surfactante orgânico e o precursor inorgânico está geralmente envolvida, formando compostos mesoestruturados inorgânicos/orgânicos. Peneiras moleculares mesoporosas podem ser obtidas depois da remoção do surfactante (15).

3 MATERIAL MESOESTRUTURADO DO TIPO SBA-15 E SBA-16

A SBA-15 é uma peneira molecular mesoporosa de sílica sintetizada em meio ácido na presença do surfactante copolímero tribloco poli(etilenoglicol)–poli(propilenoglicol)–poli(etilenoglicol), denominado P123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀) (6).

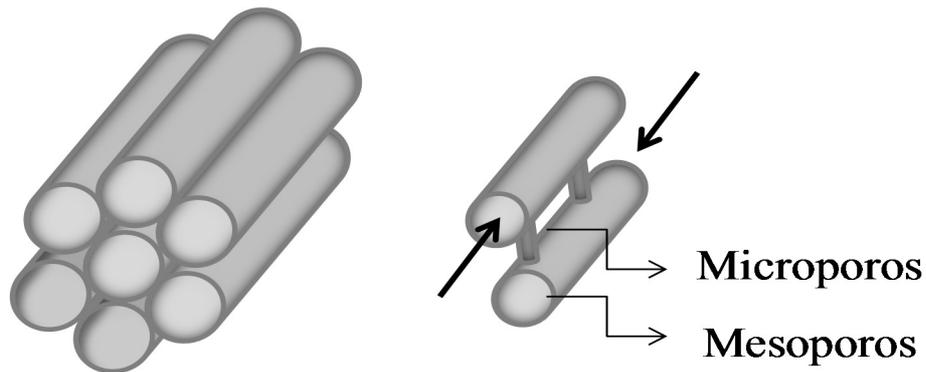
O P123 é um material branco, não tóxico, com massa molar média de 5750 g/mol, onde a designação “P” é determinada pela sua forma de pasta, como já explicado anteriormente. Ele apresenta a habilidade de formar estruturas líquido-cristalinas e pode ser usado para sintetizar uma variedade de diferentes materiais mesoporosos ordenados com tamanhos de poros maiores, sob condições fortemente ácidas, onde as unidades PEO [poli- (óxido de etileno)] e as espécies catiônicas de sílica interagem para formar as mesoestruturas organizadas (16).

A síntese de SBA-15 é geralmente iniciada com a diluição do surfactante (agentes de ativação superficial), em concentração geralmente baixa, ocasionando a formação da micela. Em seguida, a fonte de sílica é adicionada à solução e um ácido (geralmente HCl) desencadeia a polimerização da sílica. As interações entre a sílica polimerizada e a micela resultam numa reação de precipitação. Em seguida remove-se o modelo orgânico presente no interior dos poros por calcinação e/ou extração com solvente adequado sob refluxo (17, 18), digestão por microondas (19, 20) ou radiação ultravioleta (21).

A SBA-15 é uma sílica mesoporosa com poros paralelos e arranjo hexagonal altamente organizado como mostrado na Figura 2.2. Tem as vantagens da produção combinada

de micro e mesoporosidade e paredes de sílica relativamente espessas. Estes microporos são criados pela penetração da cadeia de óxido de etileno hidrofóbico proveniente do surfactante plurônico P123 nas paredes da sílica (22).

Figura 2.2 - Ilustração esquemática dos canais de SBA-15



Fonte: adaptado de Zhao et al.(6).

As propriedades texturais da SBA-15 podem variar dependendo do método de síntese. A síntese pode ser realizada pelo método de sol-gel (23) ou pelo método hidrotérmico (24). A principal vantagem da via sol-gel é a possibilidade de ser realizada sob condições moderadas de temperatura e pressão. Já as principais vantagens da síntese hidrotérmica são o menor tempo necessário para a condensação do precursor inorgânico, melhor organização da sua mesoestrutura e, conseqüentemente maior tamanho dos poros. Alguns estudos têm demonstrado que o aumento do diâmetro dos poros promove um maior acesso das biomoléculas ao adsorvente (25-27).

A SBA-15 é capaz de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas em sua superfície, como também em seu interior, possuindo grande aplicabilidade em processos de troca de íons (3), adsorção (28), separação (29), síntese de nanoestruturas (30), sensores (31), catálise (32) e sistema de liberação de fármacos (33).

Outro adsorvente que tem recebido atenção é a SBA-16. A facilidade do método de preparação, a estrutura ordenada, e o controle sobre o tamanho e a forma dos seus poros, faz da SBA-16 um material versátil, potencialmente aplicável em muitas áreas da ciência e da engenharia de materiais (34). Embora seja relatada na literatura a aplicação de SBA-16 em campos tais como a catálise (35-37), funcionalização (38), incorporação de metais (39),

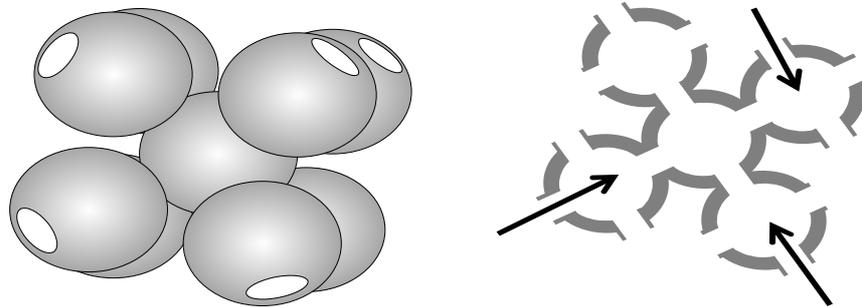
aplicações biomédicas (40) e templating (41, 42), existem poucos registros de uso de tais materiais para fins de adsorção/cromatografia (43) e imobilização de enzimas (44).

A SBA-16 é sintetizada pela junção de um sistema ternário de água, butanol e polímero tribloco, sob condições ácidas, em que a reação ocorre através do mecanismo $S^0H^+X^-I^+$. Este mecanismo consiste da reação entre uma fonte de sílica representada por I^+ , com carga positiva, geralmente, uma espécie de silício monomérico. S^0H^+ representa um surfactante que forma ligação de hidrogênio com íons hidrônios (H_3O^+) e X^- representa o íon clorídrico proveniente do ácido clorídrico, geralmente utilizado para tornar o meio ácido; esse íon é responsável pela interação entre as espécies, formando ligações fracas não covalentes entre o surfactante copolímero tribloco e a sílica (34). O surfactante copolímero ou direcionador de estrutura utilizado neste caso é o plurônico F127 ($PEO_{106}PPO_{70}PEO_{106}$), que proporciona um aumento na porosidade d este material (45).

O Plurônico F-127 é um surfactante não iônico composto de copolímeros poli(etilenoglicol)–poli(propilenoglicol)–poli(etilenoglicol), com massa molar média de 13000 g/mol, contendo aproximadamente 70% de óxido de etileno, que é responsável pelo caráter hidrofílico (46). São grãos brancos, moles e inodoros, sendo que a designação “F” refere-se a sua forma de floco. Em baixa concentração ocorre formação de micelas isoladas, mas em alta concentração formam-se micelas agregadas constituídas por um centro hidrofóbico com cadeias hidrofílicas de PEO na parte externa das micelas (46).

Ao final da síntese é obtido um material esférico denominado SBA-16, uma sílica mesoporosa cuja estrutura dos mesoporos é tridimensional cúbica de corpo centrado, obtida por remoção da fase orgânica e cada uma de suas esferas está ligada a oito esferas vizinhas (47) como pode ser visto na Figura 2.3. Ela apresenta geralmente poros variando entre 5 e 15 nm, elevada área superficial (400-1000 m^2/g) e alta estabilidade térmica.

Figura 2.3 - Ilustração esquemática dos nanocompartimentos da SBA-16.



Fonte: adaptado de Kim et al. (47) e Flodström et al. (48).

4 ACIDEZ DAS SÍLICAS MESOPOROSAS

Uma importante característica das sílicas mesoestruturadas é a possibilidade de incorporar heteroátomos e/ou funções orgânicas na superfície dos canais formando parte das paredes ou dentro da rede sólida. A estabilidade térmica, mecânica ou estrutural é proporcionada pela matriz de sílica. As funções orgânicas e os heteroátomos também podem fornecer estabilidade ao material e/ou atuarem como precursores das espécies ativas na aplicação final do suporte.

Quando se trata da modificação da acidez superficial em meio sólido, uma das principais dificuldades, além de incrementá-la, é estabilizá-la. A ancoragem ou deposição superficial de compostos com propriedades ácidas, como metais, óxidos metálicos ou heteropoliácidos, é uma alternativa eficiente para se incrementar a acidez em sólidos. Para a incorporação e/ou a adequação das espécies ácidas de Lewis ou de Brønsted, existe uma série de estratégias de síntese que podem ser desenvolvidas, como impregnação, deposição, precipitação, calcinação, redução, etc. As variações estruturais são muito diversificadas, e inúmeras espécies químicas podem ser incorporadas à superfície de um suporte, em composição, estados de oxidações e ambientes químicos variados (49).

Existem atualmente várias técnicas disponíveis para qualificar e quantificar os sítios ácidos e básicos. Estas normalmente são complementares, havendo as que são melhores para a determinação da concentração dos sítios, outras são importantes na caracterização da natureza do sítio ácido e, há ainda as que utilizam reações modelos para estimar a acidez.

Entre as técnicas de medida da densidade de sítios ácidos, as mais importantes são os métodos de dessorção térmica programada (TPD - *Thermal Programmed Desorption*), tipicamente de moléculas sonda básicas quimissorvidas, como a amônia ou aminas. Neste método, a molécula sonda é adsorvida sobre a amostra limpa e então se procede à dessorção aumentando-se a temperatura de forma controlada. A determinação da quantidade dessorvida e, conseqüentemente, do número de sítios ácidos pode ser feita analisando-se o gás que evolui a amostra, por cromatografia a gás ou espectrometria de massas, ou determinando-se a perda de massa da amostra por análise termogravimétrica. O número total de sítios ácidos está relacionado à área total das curvas de TPD geradas pelas medidas cromatográficas, de espectrometria ou pela perda de massa, enquanto a força é proporcional à temperatura na qual ocorre a dessorção das espécies. Quanto mais forte o sítio ácido, maior a interação com o adsorbato e maior a temperatura necessária para dessorvê-lo). A TPD de amônia é uma técnica relativamente barata, bem estabelecida e que permite obter resultados satisfatórios em pouco tempo (49).

A caracterização da natureza do sítio ácido pode ser realizada por espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) ou por microcalorimetria, entre outras técnicas. A espectroscopia de IV é uma das técnicas mais comuns para se avaliar a natureza da acidez em sólidos porosos. Tradicionalmente utiliza-se a quimissorção da molécula de piridina como molécula sonda. A interação da piridina com os sítios ácidos de Brønsted ou de Lewis gera espécies com frequências de vibração características, que são correlacionadas aos sítios. Pode ser feita a quantificação destas espécies pela área das bandas formadas nos espectros, de acordo com a lei de Lambert-Beer. O maior problema associado a estas medidas está sempre na quantificação absoluta dos sítios ácidos ou básicos, sendo muitas vezes limitado a comparações relativas entre amostras (49).

5 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

As etapas de separação e purificação de bioprodutos (*downstream*) são complexas e muitas vezes custam mais caro do que o próprio processo de síntese/extração (*upstream*). Desde que a produção de bioprodutos em larga escala começou, processos como filtração, extração, adsorção, cromatografia e eletroforese têm sido estudados e utilizados (50). Vale salientar que é de fundamental importância manter a estrutura original da proteína para que

possam ser preservadas suas funções biológicas. As proteínas são altamente sensíveis a mudanças no meio e desvios de condições fisiológicas podem afetar sua conformação e até causar desnaturação. Fatores como pH, força iônica e temperatura podem afetar a atividade da proteína.

No caso de proteínas, por exemplo, elas podem ser separadas de substâncias de baixo peso molecular contidos em uma solução pelo processo de diálise. Neste processo, moléculas grandes, como as proteínas, ficam retidas dentro de um saco de material com poros ultramicroscópicos, como o papel celofane contendo a solução com biomoléculas de tamanhos variados, que ao serem suspensos em água permite a passagem das moléculas pequenas como os sais, porém as proteínas, que têm alto peso molecular, permanecerão no interior do mesmo (51).

Outra forma de separação é a filtração em gel, que é um tipo de cromatografia de exclusão, onde a separação dos componentes ocorre segundo ordem decrescente de tamanho molecular e não por interação com a fase estacionária (52). Esta é uma técnica cromatográfica baseada na diferença de tamanho, onde a solução contendo a mistura de proteínas é passada através de uma coluna contendo esferas porosas muito pequenas de um polímero altamente hidratado. As moléculas menores de proteína poderão penetrar nos poros das esferas, o que aumenta o tempo necessário para que estas proteínas cheguem ao final da coluna, mas as moléculas grandes de proteína como não podem penetrar nas esferas porosas, passam pela coluna mais rapidamente. Proteínas com tamanhos intermediários passarão pela coluna com velocidades intermediárias, dependentes do grau com que podem penetrar nas esferas. Uma coluna de filtração em gel é também conhecida como peneira molecular (51).

Outra forma de separar proteínas é por eletroforese. Esta técnica baseia-se no sinal e no número de das cargas elétricas oriundas dos grupos R dos resíduos de aminoácidos e dos grupos amino e carboxila terminais. As cadeias polipeptídicas das proteínas têm pontos isoelétricos característicos, os quais refletem o número relativo de grupos R ácidos e básicos. Em qualquer valor de pH, uma mistura de proteínas contém algumas com carga líquida positiva, algumas com carga líquida negativas e outras neutras, ou seja, com carga líquida zero. Quando uma mistura assim é colocada em um campo elétrico, as proteínas com carga positiva migrarão para o eletrodo carregado negativamente, aqueles com carga líquida negativa migrarão para o eletrodo carregado positivamente e aquelas com carga líquida neutra permanecerão estacionárias. Frequentemente a eletroforese é feita em um suporte consistindo de uma tira de

papel, ou de acetato de celulose, ou em uma fatia de gel hidrofílico para impedir que as moléculas protéicas se difundam rapidamente pela fase aquosa (51). A eletrofocalização é uma sofisticação desta técnica e utiliza adicionalmente um gradiente de pH no gel de modo que as proteínas migrem até a região onde o pH seja igual ao seu pI (53).

A cristalização é utilizada com mais frequência para purificação de proteínas específicas e não para separar misturas de proteínas. Na cristalização as proteínas são distribuídas em duas fases líquidas devido à solubilidade preferencial em cada fase (53).

As proteínas podem também ser separadas por cromatografia de troca iônica com base em grande parte nas diferenças entre proteínas com respeito à densidade e sinal de suas cargas elétricas em um dado pH (51). Esta técnica é uma das mais utilizadas devido ao elevado poder de resolução e capacidade de processamento (54).

6 ADSORÇÃO E SEUS MODELOS TEÓRICOS

A adsorção é essencialmente um fenômeno de superfície e está relacionado na maioria dos casos a três tipos de interfaces: a sólido-gás, a sólido-líquido e líquido-líquido, caracterizando a adsorção em fase gasosa, no primeiro caso, e a adsorção em fase líquida, nos dois últimos casos. Atualmente, estes fenômenos de superfície são objeto de grande interesse teórico e prático.

O fenômeno anteriormente citado não é somente observado espontaneamente na própria natureza (irrigação do solo, tecidos animais e vegetais), mas também chega a compor, na engenharia, uma gama quase infindável de aplicações intrinsecamente ligadas a processos químicos, físicos ou físico-químicos (lubrificação, catálise heterogênea, processos de separação e purificação, análise cromatográfica de gases e líquidos e etc.).

O processo de adsorção consiste na separação de um ou mais componentes de uma mistura líquida ou gasosa mediante sua fixação seletiva sobre a superfície de um sólido e pode ser classificada em dois tipos, adsorção física ou adsorção química, dependendo da natureza da interação adsorvente-adsorbato.

A adsorção física ou fisissorção é resultante de interações fracas do tipo íon-dipolo, dipolo-dipolo e do tipo forças de Van der Waals entre o adsorvente (sólido sobre o qual ocorre a adsorção) e o adsorbato ou sorbato (molécula que se adsorve ao adsorvente). Não há alteração

química das moléculas adsorvidas e ocorre com baixo calor de adsorção, sendo da mesma ordem de grandeza do calor de condensação. Para este tipo de adsorção, podem-se ter várias camadas de moléculas adsorvidas. A adsorção física representa o fenômeno presente na maioria dos processos de purificação e separação.

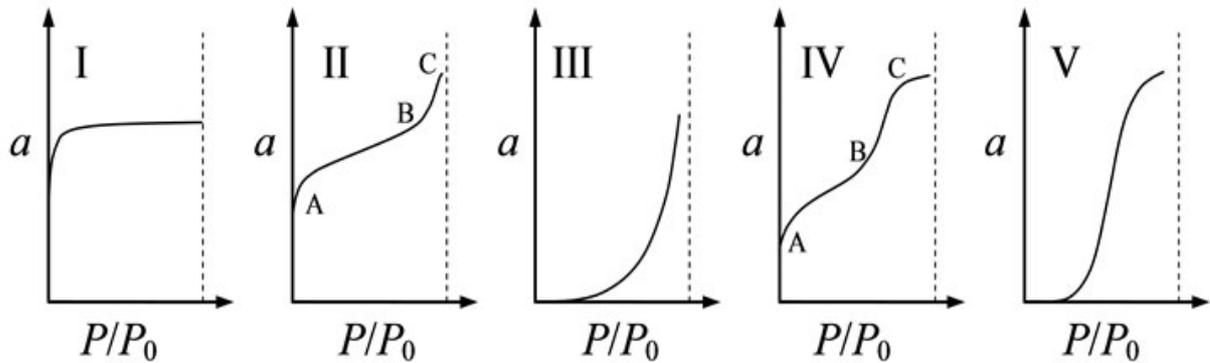
Na adsorção química ou quimissorção, os átomos ou as moléculas unem-se à superfície do adsorvente através de ligações químicas, que geralmente são covalentes (55), conduzindo à formação de um composto químico de superfície. Neste tipo de adsorção, forma-se uma única camada de substância adsorvida na superfície do adsorvente. Além disso, o calor de adsorção possui a mesma ordem de grandeza de calores de reação.

Vários fatores podem influenciar na eficiência da adsorção, dentre eles destacam-se o pH, a temperatura e o diâmetro do adsorbato. Por exemplo, em meios ácidos, ocorre o favorecimento da adsorção de ácidos orgânicos enquanto que em meios básicos as interações com bases orgânicas são favorecidas. A adsorção, que geralmente é um processo exotérmico, diminui quando ocorre o aumento da temperatura, embora a velocidade e a extensão do fenômeno adsorptivo seja influenciado também por outros fatores. O diâmetro da molécula é um fator importante no processo de adsorção das espécies de adsorbato, pois quando estas apresentam grandes dimensões, ocorre dificuldade na difusão das mesmas no sólido, ou mesmo exclusão, diminuindo a adsorção. Outro fator bastante relevante é a área específica do adsorvente, já que a adsorção é um fenômeno que ocorre necessariamente na superfície.

A adsorção de uma substância presente em uma fase, na superfície de outra fase, em um sistema específico, leva a uma distribuição termodinamicamente definida desta substância entre as fases, situação em que o sistema atinge o equilíbrio. Os dados de equilíbrio são geralmente apresentados na forma de uma isoterma, que é um diagrama que mostra a variação da concentração da fase adsorvida em equilíbrio com a concentração da fase fluida ou a pressão parcial, a uma temperatura fixa (56).

As propriedades superficiais de diversos materiais, como área superficial, volume e distribuição de poros se baseia no fenômeno da adsorção. As isotermas relativas ao fenômeno de adsorção física foram classificadas por Brunauer et al. (57) em cinco diferentes tipos, como pode ser observado na Figura 2.4.

Figura 2. 4 - Classificação dos diferentes tipos de isoterma de adsorção.



Fonte: Brunauer et al. (57).

A representação do tipo I é característica de adsorventes microporosos onde a adsorção se dá eminentemente a baixas pressões devido à forte interação entre as paredes porosas e o adsorbato. Também podem ser encontradas em adsorção química. Quando a adsorção física produz isothermas do tipo I, indica que os poros são microporosos e que a superfície “ativa” reside somente dentro dos microporos, os quais, uma vez cheios com o adsorbato, deixam pouca ou nenhuma superfície para adsorção adicional.

A representação do tipo II é encontrada quando a adsorção ocorre em materiais porosos ou com grande diâmetro. Nesse tipo de isoterma a baixas pressões relativas ocorre a formação de uma monocamada de moléculas adsorvidas. O ponto de inflexão ocorre quando a primeira camada de cobertura se completa.

A representação do tipo III é caracterizada, principalmente, por calores de adsorção inferiores ao calor de liquefação do adsorbato. Conforme a adsorção procede, a adsorção adicional é facilitada porque a interação entre moléculas adsorvidas é maior do que a adsorção com a superfície do adsorvente.

A representação do tipo IV ocorrem em materiais mesoporosos. Neste caso, ocorre inicialmente a cobertura de uma monocamada. O segundo degrau de adsorção indica a adsorção na faixa dos mesoporos. Normalmente esse tipo de isoterma apresenta um “loop” de histerese, ou seja, a isoterma não segue o mesmo caminho para a adsorção e dessorção.

Já a representação do tipo V ocorre quando existe pouca interação entre o adsorvente e o adsorbato, como no tipo III. Entretanto, o tipo V está associado a estruturas porosas que produzem o mesmo degrau que nas isothermas de tipo IV.

Um dos métodos mais empregados para se obter área superficial total de sólidos porosos foi proposto por Brunauer, Emmet e Teller (BET) (57, 58). Com esse método é possível determinar a massa de gás nitrogênio necessária para recobrir uma monocamada a 77 K. Outros gases como criptônio, argônio e hélio podem também serem utilizados em substituição ao nitrogênio. O método BET assume que:

- a) O calor de adsorção da primeira camada é constante;
- b) A interação lateral entre as moléculas adsorvidas é desprezada;
- c) As moléculas adsorvidas atuam como novos centros de adsorção para novas moléculas;
- d) O calor de adsorção da segunda camada e subseqüentes é igual ao calor de condensação.

Para determinação da distribuição e volume mesoporoso existem dois métodos bastante difundidos: Barret, Joyner e Halenda (BJH) (59) e o *Non-local Density Functional Theory* (NLDFT) (60). Estes métodos são amplamente utilizados e podem ser encontrados comercialmente nos softwares de tratamento de dados em muitos equipamentos de levantamento de isotermas de adsorção.

7 ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SÍLICAS MESOPOROSAS

A adsorção/separação de proteínas/enzimas como a albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS), mioglobina e ovalbumina em SBA-15 tem sido relatada na literatura (26, 28, 61-66). Em alguns destes estudos, tornou-se evidente que a quantidade adsorvida é fortemente dependente do tamanho da biomolécula e do tamanho dos poros do adsorvente. A acessibilidade de grandes biomoléculas aos poros pode ser facilitada através do aumento dos diâmetros de poros durante o processo de síntese. Além disso, o pH e a força iônica podem contribuir para a ocorrência de interações entre as proteínas e a SBA-15. Muitos autores investigaram a influência do pH e da força iônica sobre a adsorção de biomoléculas (25, 62, 67). Embora o pH determine a carga de superfície de ambos, a proteína e o adsorvente, a força iônica pode promover ou desfavorecer a adsorção, dependendo da natureza da proteína (68).

No presente trabalho foram utilizadas três biomoléculas como modelo, a albumina de soro bovino (BSA), a lisozima (LYS) e a celulase (CEL).

7.1 Albumina de soro bovino (BSA)

A Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* - BSA) é uma proteína globular presente no plasma sanguíneo que é usada em numerosas aplicações bioquímicas devido à sua estabilidade e não interferência em reações biológicas. Proteínas globulares são uma das duas grandes classes em que estão divididas as proteínas. Esta classificação está baseada em sua forma e em certas características físicas. Como o próprio nome indica, elas possuem uma forma globular ou esférica. São proteínas que apresentam um maior ou menor grau de solubilidade em soluções aquosas, formando soluções coloidais. Esta característica principal ajuda a distinguí-las das proteínas fibrilares, que são praticamente insolúveis (51).

A BSA é uma proteína modelo grande de massa molecular de 69 kDa, formato elipsóide, solúvel em água, com dimensões de 4,0 x 4,0 x 14,0 nm³ e ponto isoelétrico (pI) 4,8 (27, 63, 69). É constituída por cadeias polipeptídicas simples com 583 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária. Cerca de 70% de sua estrutura secundária é formada por α -hélice e sua estrutura terciária é estabilizada por 17 ligações dissulfeto (70).

Pesquisas sobre a separação de albumina de soro bovino têm atraído uma atenção considerável pelo seu grande potencial nas indústrias de proteínas do soro. Vários estudos para separação de BSA têm sido reportados na literatura (71-73).

A adsorção de albumina do soro bovino em adsorventes Al-MCM-41 com diferente teor de alumínio foi reportada por Ji et al. (71). Eles reportaram uma capacidade de adsorção de até 600 mg/g em Al-MCM-41 com uma razão de Si/Al de 10. Acredita-se que esta capacidade de adsorção seja, em grande parte, devido à área de superfície externa (278 m²/g).

Zhang et al. (72) modificaram grupos amino da superfície de quitosana com ligante azul cibracon F3GA e investigou a adsorção em batelada, comparando a capacidade de adsorção da quitosana natural, frente à modificada. Para a quitosana modificada com o corante, a quantidade máxima adsorvida de BSA foi de 95,2 mg/g e da quitosana natural foi de 14,7 mg/g.

Chang et al. (73) estudaram a adsorção de BSA (Albumina de soro Bovino), como proteína modelo, em resina de troca iônica Streamline usando várias condições de operação,

tais como: o pH de adsorção, condutividade e hidrofobicidade. Verificou-se que a adsorção de BSA é, portanto, dependente do pH da solução tampão utilizada.

7.2 Lisozima (LYS)

A lisozima (LYS), proteína do ovo de galinha, é uma enzima antibacteriana e, devido a esta característica, é amplamente usada em vários campos. Na indústria farmacêutica, por exemplo, esta enzima é utilizada como um fármaco para o tratamento de úlceras e de infecções. É também utilizada na preparação de soluções oftalmológicas (74), uma vez que no homem, é um agente desinfetante produzido naturalmente pela lágrima e tem amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (75). Na indústria de alimentos, a LYS é frequentemente utilizada na fase de preservação de alimentos, podendo ser aplicada em filmes de embalagem de alimentos e de conservação de carnes, tais como embutidos (74).

Do ponto de vista químico, é uma proteína globular, que consiste em 129 resíduos, é considerada uma biomolécula modelo pequena com um peso molecular de 14,4 kDa, com as dimensões de 3,0 x 3,0 x 4,5 nm³. Ela apresenta forma elipsóide que é estabilizada por quatro pontes dissulfeto e seu sítio ativo pode se ligar a seis resíduos de carboidratos para executar a sua função de catalisador. Seu pH isoelétrico é de aproximadamente 11 (62, 67).

A adsorção (imobilização) de proteínas em materiais inorgânicos é crucial para melhorar a estabilidade de enzimas, sob condições extremas (76). Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas.

Kisler et al. (77, 78) relataram a adsorção de lisozima em MCM-41 e a superfície revestida de MCM-41. Eles descobriram que o material revestido mostra uma alta capacidade de adsorção quando comparado ao material de origem MCM-41. No entanto, foi relatado que são necessários vários dias para a adsorção de lisozima alcançar o equilíbrio nestes materiais.

Fan et al. (29) relataram que através do controle da morfologia da sílica mesoporosa do tipo SBA-15, a taxa de adsorção e a carga máxima atingida podem ser drasticamente melhoradas. Foi demonstrado que a capacidade específica pode chegar a 533 mg/g de enzima e que esta pode ser completamente adsorvido em apenas 10 min.

A adsorção de lisozima em SBA-16 e FDU-12 foi avaliada e foi também sugerido que um grande diâmetro da entrada do poro ($d > 7$ nm) é benéfico para a rápida adsorção da proteína (43).

7.3 Celulase (CEL)

A biotecnologia de celulases e hemicelulases começou no início de 1980, sendo direcionada inicialmente à alimentação animal e, em seguida, a aplicações alimentares. Posteriormente, estas enzimas foram utilizadas nas indústrias têxtil, de lavanderia, de papel e celulose. Atualmente, estas enzimas são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas, obtidas principalmente a partir de *Trichoderma* e *Aspergillus* (79).

A celulase (CEL) realiza a conversão de celulose em beta d-glicose de forma eficiente e econômica. A glicose produzida a partir do substrato de celulose pode ser utilizada diretamente na alimentação humana e animal. Estes produtos contendo glicose podem ser ainda utilizados como substrato para a fermentação ou por outros processos que podem produzir produtos finais valiosos, tais como metanol, etanol, aminoácidos, ácidos orgânicos, proteínas de célula única e de outros bioreatores. A celulase pode também ser usada para aumentar a digestibilidade de alimentos enriquecidos com elevado teor de fibras e em alimentos para realçar o sabor, textura e quantidade (80).

A celulase é formada por três moléculas principais que trabalham sinergicamente durante a hidrólise da celulose: celobiohidrolase (CBH), endobeta-1,4-glucanase (EG), e beta-glucosidase (ou celobiase) (81, 82), que variam em tamanho desde 24 a 74 Å (quando esférica) ou de 13×79 Å² a 42×252 Å² (quando elipsoidal) (81, 83), e cada uma destas três enzimas apresentam um pH isoelétrico específico. Segundo Hurst et al (84) e Okada et al. (85), a celulase apresenta uma massa molecular variando entre 26 kDa e 31 kDa (valor determinado por eletroforese) e pH ótimo variando entre 3,7 e 4,0.

Os avanços das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos várias contribuições científicas vêm sendo geradas continuamente, no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, ao aumento da expressão de celulases por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação de estruturas tridimensionais das

celulases e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas. Os trabalhos desenvolvidos por Takimoto et al. (86), Hartono et al. (87) e Rodrigues et al. (88) são apenas alguns dos vários trabalhos reportados na literatura.

Takimoto et al. (86) estudaram as atividades enzimáticas de celulase encapsuladas em materiais mesoporosos do tipo SBA-15 de uma variedade de tamanho de poro (5,4-11 nm de diâmetro). Eles observaram que a quantidade de celulase encapsulada aumentou com aumento do tamanho dos poros da SBA-15. No entanto, a celulase encapsulada em SBA-15 com um tamanho de poro de 8,9 nm apresentou maior atividade enzimática, apesar de não ter o maior tamanho de poro e deste poro ser comparável às dimensões da celulase.

Hartono et al. (87) apresentam a síntese de sílica mesoporosa amino- funcionalizada do tipo FDU-12 com um grande poro (30,2 nm) e uma mesoestrutura altamente ordenada usando 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) como uma fonte de organossilanos. Os resultados mostraram que a sílica aminofuncionalizada apresentou o dobro da capacidade de adsorção de celulase em relação à sílica pura.

Rodrigues et al. (88) investigaram a capacidade de adsorção de celulase numa coluna de leito fixo utilizando partículas de quitosana/alginato funcionalizada com epícloridrina (Cs/Ag-E), como o adsorvente. Eles observaram que a capacidade máxima de adsorção foi de cerca de 11 mg de celulase/g de adsorvente. Ciclos sucessivos (adsorção/ lavagem/eluição) foram executados e os resultados demonstraram a reversibilidade do processo e de seu potencial para a separação e purificação de enzimas. Contudo, a atividade da celulase na fração eluída foi de apenas 29% da atividade da enzima fresca.

Não foram encontrados na literatura trabalhos aplicando SBA-16 na adsorção de celulase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rouquerol J, Rodriguez-Reinoso F, Sing KSW. Characterization of Porous Solids III. Amsterdam: Elsevier; 1994.
2. Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ, Leonowicz ME, Kresge CT, Schmitt KD, et al. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*. 1992; 114:10834-43.

3. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992; 359: 710-2.
4. Vartuli JC, Schmitt KD, Kresge CT, Roth WJ, Leonowicz ME, McCullen SB, et al. Development of a formation mechanism for M41S materials. In: J. Weitkamp HGKHPaWH, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 84: Elsevier; 1994. p. 53-60.
5. Tanev PT, Pinnavaia TJ. A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular Sieves. *Science*. 1995;267:865-7.
6. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:6024-36.
7. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. 1998;279:548-52.
8. Zholobenko VL, Khodakov AY, Impéror-Clerc M, Durand D, Grillo I. Initial stages of SBA-15 synthesis: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2008;142:67-74.
9. Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, Fröba M. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006;45:3216-51.
10. Kim JM, Stucky GD. Synthesis of highly ordered mesoporous silica materials using sodium silicate and amphiphilic block copolymers. *Chemical Communications*. 2000;0:1159-60.
11. Kim JM, Sakamoto Y, Hwang YK, Kwon Y-U, Terasaki O, Park S-E, et al. Structural Design of Mesoporous Silica by Micelle-Packing Control Using Blends of Amphiphilic Block Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002;106:2552-8.
12. Sayari A, Kruk M, Jaroniec M, Moudrakovski IL. New Approaches to Pore Size Engineering of Mesoporous Silicates. *Advanced Materials*. 1998;10:1376-9.
13. Blin JL, Su BL. Tailoring Pore Size of Ordered Mesoporous Silicas Using One or Two Organic Auxiliaries as Expanders. *Langmuir*. 2002;18:5303-8.
14. Jana SK, Nishida R, Shindo K, Kugita T, Namba S. Pore size control of mesoporous molecular sieves using different organic auxiliary chemicals. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;68:133-42.
15. Wan Y, Zhao. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. *Chemical Reviews*. 2007;107:2821-60.
16. Stein A. Advances in Microporous and Mesoporous Solids—Highlights of Recent Progress. *Advanced Materials*. 2003;15:763-75.
17. Kruk M, Jaroniec M, Ko CH, Ryoo R. Characterization of the porous structure of SBA-15. *Chemistry of Materials*. 2000;12:1961-8.

18. Margolese D, Melero JA, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD. Direct syntheses of ordered SBA-15 mesoporous silica containing sulfonic acid groups. *Chemistry of Materials*. 2000;12:2448-59.
19. Newalkar BL, Komarneni S, Katsuki H. Rapid synthesis of mesoporous SBA-15 molecular sieve by a microwave-hydrothermal process. *Chemical Communications*. 2000:2389-90.
20. Newalkar BL, Komarneni S. Control over Microporosity of Ordered Microporous–Mesoporous Silica SBA-15 Framework under Microwave-Hydrothermal Conditions: Effect of Salt Addition. *Chemistry of Materials*. 2001;13:4573-9.
21. Xiao L, Li J, Jin H, Xu R. Removal of organic templates from mesoporous SBA-15 at room temperature using UV/dilute H₂O₂. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2006;96:413-8.
22. Van Der Voort P, Ravikovitch PI, De Jong KP, Benjelloun M, Van Bavel E, Janssen AH, et al. A New Templated Ordered Structure with Combined Micro- and Mesopores and Internal Silica Nanocapsules. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002;106:5873-7.
23. Villarroel Rocha J, Barrera D, Sapag K. Improvement in the Pore Size Distribution for Ordered Mesoporous Materials with Cylindrical and Spherical Pores Using the Kelvin Equation. *Topics in Catalysis*. 2011;54:121-34.
24. Araujo A, Quintella S, Coutinho A. Synthesis monitoring of SBA-15 nanostructured materials. *Adsorption*. 2009;15:306-11.
25. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:7323-30.
26. Lee J-W, Tra PT, Kim S-I, Roh S-H. Adsorption Properties of Proteins on SBA-15 Nanoparticles Functionalized with Aminosilanes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008;8:5152-7.
27. Diao X, Wang Y, Zhao J, Zhu S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2010;18:493-9.
28. Katiyar A, Yadav S, Smirniotis PG, Pinto NG. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A*. 2006;1122:13-20.
29. Fan J, Lei J, Wang L, Yu C, Tu B, Zhao D. Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies. *Chemical Communications*. 2003;0:2140-1.
30. Han Y-J, Kim JM, Stucky GD. Preparation of Noble Metal Nanowires Using Hexagonal Mesoporous Silica SBA-15. *Chemistry of Materials*. 2000;12:2068-9.

31. Veloso CM, Rangel MdC. Preparação de carbonos porosos por moldagem sequencial. *Química Nova*. 2009;32:2133-41.
32. Quintella SA, Saboya RMA, Salmin DC, Novaes DS, Araújo AS, Albuquerque MCG, et al. Transesterification of soybean oil using ethanol and mesoporous silica catalyst. *Renewable Energy*. 2012;38:136-40.
33. Vallet-Regí M, Doadrio JC, Doadrio AL, Izquierdo-Barba I, Pérez-Pariente J. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics*. 2004;172:435-9.
34. Rivera-Muñoz EM, Huirache-Acuña R. Sol Gel-Derived SBA-16 Mesoporous Material. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11:3069-86.
35. Jermy BR, Kim S-Y, Bineesh KV, Selvaraj M, Park D-W. Easy route for the synthesis of Fe-SBA-16 at weak acidity and its catalytic activity in the oxidation of cyclohexene. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009;121:103-13.
36. Zhu Y, Dong Y, Zhao L, Yuan F. Preparation and characterization of Mesoporous VOx/SBA-16 and their application for the direct catalytic hydroxylation of benzene to phenol. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2010;315:205-12.
37. Sun H, Tang Q, Du Y, Liu X, Chen Y, Yang Y. Mesoporous SBA-16 with excellent hydrothermal, thermal and mechanical stabilities: Modified synthesis and its catalytic application. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009;333:317-23.
38. Knöfel C, Descarpentries J, Benzaouia A, Zelenák V, Mornet S, Llewellyn PL, et al. Functionalised micro-/mesoporous silica for the adsorption of carbon dioxide. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2007;99:79-85.
39. Lee B, Ma Z, Zhang Z, Park C, Dai S. Influences of synthesis conditions and mesoporous structures on the gold nanoparticles supported on mesoporous silica hosts. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009;122:160-7.
40. Yiu HHP, Niu H-j, Biermans E, van Tendeloo G, Rosseinsky MJ. Designed Multifunctional Nanocomposites for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*. 2010;20:1599-609.
41. Shi K, Peng L-M, Chen Q, Wang R, Zhou W. Porous crystalline iron oxide thin films templated by mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;83:219-24.
42. Guo W, Zhao GXS. Well-ordered cubic mesoporous carbon with Im3m symmetry. In: Abdelhamid Sayari and Mietek J, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 156: Elsevier; 2005. p. 551-6.
43. Fan J, Yu C, Gao F, Lei J, Tian B, Wang L, et al. Cubic Mesoporous Silica with Large Controllable Entrance Sizes and Advanced Adsorption Properties. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003;42:3146-50.

44. Aburto J, Ayala M, Bustos-Jaimes I, Montiel C, Terrés E, Domínguez JM, et al. Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;83:193-200.
45. Mesa M, Sierra L, Guth JL. Contribution to the study of the formation mechanism of mesoporous SBA-15 and SBA-16 type silica particles in aqueous acid solutions. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;112:338-50.
46. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Pharm Pharmaceut Sci*. 2006;9:339-58.
47. Kim T-W, Ryoo R, Gierszal KP, Jaroniec M, Solovyov LA, Sakamoto Y, et al. Characterization of mesoporous carbons synthesized with SBA-16 silica template. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15:1560-71.
48. Flodström K, Wennerström H, Teixeira CV, Amenitsch H, Lindén M, Alfredsson V. Time-Resolved in Situ Studies of the Formation of Cubic Mesoporous Silica Formed with Triblock Copolymers. *Langmuir*. 2004;20:10311-6.
49. Moreno EL, Rajagopal K. Desafios da acidez na catálise em estado sólido. *Química Nova*. 2009;32:538-42.
50. Hong JW, Hosokawa K, Fujii T, Seki M, Endo I. Microfabricated structures for bioseparation. In: I. Endo TNSKaTY, editor. *Progress in Biotechnology*. Volume 16: Elsevier; 2000. p. 69-74.
51. Lehninger AL. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier; 1993. 725 p.
52. Cienfuegos F, Vaitsman D. *Análise instrumental*. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2000. 606 p.
53. Freire JT, Silveira AM. *Tópicos especiais em sistemas particulados*. São Carlos: Gráfica da UFSCar; 1998. 370 p.
54. Pessoa Jr. A, Kilikian BV. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri, SP: Manole; 2005. 444 p.
55. Gregg SJ, Sing KSW. *Adsorption, Surface Area and Porosity*. 2 ed. Londres: Academic Press Inc; 1982. 303 p.
56. Ruthven DM. *Encyclopedia of Separation Technology*. New York: John Wiley; 1997.
57. Brunauer S. *The Adsorption of Gases and Vapors*. Oxford: University Press; 1945.
58. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60:309-19.
59. Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society*. 1951;73:373-80.

60. Olivier J. Modeling physical adsorption on porous and nonporous solids using density functional theory. *Journal of Porous Materials*. 1995;2:9-17.
61. Zhao J, Gao F, Fu Y, Jin W, Yang P, Zhao D. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography. *Chemical Communications*. 2002:752-3.
62. Katiyar A, Ji L, Smirniotis PG, Pinto NG. Adsorption of Bovine Serum Albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;80:311-20.
63. Katiyar A, Ji L, Smirniotis P, Pinto NG. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. *Journal of Chromatography A*. 2005;1069:119-26.
64. Miyahara M, Vinu A, Ariga K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27:232-6.
65. Nguyen TPB, Lee J-W, Shim WG, Moon H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;110:560-9.
66. Bhattacharyya MS, Hiwale P, Piras M, Medda L, Steri D, Piludu M, et al. Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry C*. 2010;114:19928-34.
67. Salis A, Bhattacharyya MS, Monduzzi M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114:7996-8001.
68. Hudson S, Magner E, Cooney J, Kieran B. Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109:19496-506.
69. Mehta SK, Bhawna, Bhasin KK, Kumar A. An insight into the micellization of dodecylmethylammonium bromide (DDAB) in the presence of bovine serum albumin (BSA). *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008;323:426-34.
70. Gelamo EL, Silva CHTP, Imasato H, Tabak M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002;1594:84-99.
71. Ji L, Katiyar A, Pinto NG, Jaroniec M, Smirniotis PG. Al-MCM-41 sorbents for bovine serum albumin: relation between Al content and performance. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;75:221-9.
72. Zhang J, Zhang Z, Song Y, Cai H. Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres. *Reactive and Functional Polymers*. 2006;66:916-23.

73. Chang Y-K, Chou S-Y, Liu J-L, Tasi J-C. Characterization of BSA adsorption on mixed mode adsorbent: I. Equilibrium study in a well-agitated contactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;35:56-65.
74. Lei J, Fan J, Yu C, Zhang L, Jiang S, Tu B, et al. Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;73:121-8.
75. Quinto GG, Martins SAR, Tiemi R, Campos M, Behrens A. Líquido amniótico tóxico: uma potencial nova alternativa para doenças da superfície ocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2008;71:55-60.
76. Hartmann M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. *Chemistry of Materials*. 2005;17:4577-93.
77. M. Kisler J, Dähler A, W. Stevens G, J. O'Connor A. Separation of biological molecules using mesoporous molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001;0:769-74.
78. Kisler JM, Stevens GW, O'Connor AJ. Adsorption of proteins on mesoporous molecular sieves. *J Mater Phys Mech*. 2001;4:89-93.
79. CORAL G, ARIKAN B, ÜNALDI MN, GÜVENMEZ H. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. *Turk J Biol*. 2002;26:209-13.
80. Iram A, Amani S, Furkan M, Naeem A. Equilibrium studies of cellulase aggregates in presence of ascorbic and boric. *Int J Biol Macromol*. 2013;52:286-95.
81. Hartono SB, Qiao SZ, Liu J, Jack K, Ladewig BP, Hao Z, et al. Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Cellulase Immobilization. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010;114:8353-62.
82. Akiba S, Kimura Y, Yamamoto K, Kumagai H. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995;79:125-30.
83. Cowling EB, Kirk TK. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol Bioeng Symp*. 1976:95-123.
84. HURST PL, NIELSEN J, SULLIVAN PA, SHEPHERD MG. Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*. 1977;165:33-41.
85. Okada G. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and biological chemistry*. 1985;49:1257-65.
86. Takimoto A, Shiomi T, Ino K, Tsunoda T, Kawai A, Mizukami F, et al. Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;116:601-6.
87. Budi Hartono S, Qiao S, Jack K, Ladewig BP, Hao Z, Lu G. Improving Adsorbent Properties of Cage-like Ordered Amine Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Bioadsorption. *Langmuir*. 2009;25:6413-24.

88. Rodrigues E, Bezerra B, Farias B, Adriano W, Vieira R, Azevedo D, et al. Adsorption of Cellulase Isolated from *Aspergillus niger* on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin. *Adsorption Science & Technology*. 2013;31:17-34.

Capítulo 3

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICA MESOPOROSA ORDENADA (SBA-15 E SBA-16) PARA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS¹.

Sandra Maria Lopes dos Santos ^a; Karina Alexandre Barros Nogueira ^a; Marlon de Souza Gama ^a; Jeann Diniz Ferreira Lima ^a; Ivanildo José da Silva Júnior ^a; Diana Cristina Silva de Azevedo ^a

^a Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, S/N – Bloco 710 – CEP: 60455-760 – Fortaleza – CE – Brasil.

ABSTRACT

The present work describes the adsorption of biomolecules (bovine serum albumin - BSA, lysozyme - LYS and cellulase - CEL) on ordered mesoporous silicas with different pore diameters (SBA-15 and SBA-16) from buffered solutions. These adsorbents were synthesized by sol-gel and hydrothermal routes and characterized by X-ray diffraction, N₂ adsorption/desorption isotherms and transmission electron microscopy (TEM). The results by X-ray diffraction and TEM show that the synthesized materials have distinct degrees of mesoporous ordering. The influence of pH on the adsorption of BSA, LYS and CEL as well the kinetics and adsorption isotherms were evaluated in stirred tanks. Among the materials studied, hydrothermally synthesized SBA-15 showed the highest maximum adsorption capacity of BSA and LYS (329 and 636 mg/g, respectively). CEL was best adsorbed in SBA-15 synthesized by the sol-gel route.

Keywords: Separation. Adsorption isotherm. Protein. Enzyme. Silica.

¹ Artigo publicado na revista *Microporous & Mesoporous Materials* conforme mostrado em anexo.

RESUMO

O presente trabalho descreve a adsorção de biomoléculas (albumina bovina - BSA, lisozima - LYS e celulase - CEL) em sílicas mesoporosas ordenadas com diferentes diâmetros de poros (SBA-15 e SBA-16) em soluções tamponadas. Estes adsorventes foram sintetizados pelas rotas sol-gel e hidrotérmica e caracterizados por difração de raios-X, isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os resultados de difração de raios-X e TEM mostram que os materiais sintetizados apresentam graus distintos de ordenação mesoporosa. A influência do pH sobre a adsorção de BSA, LYS e CEL assim como a cinética e a isoterma de adsorção foram avaliadas em tanques agitados. Entre os materiais estudados, a SBA-15 sintetizada hidrotérmicamente apresentou maior capacidade máxima de adsorção para BSA e LYS (329 e 636 mg/g, respectivamente). Já a CEL foi melhor adsorvida em SBA-15 sintetizado pela via sol-gel.

Palavras-chave: Separação. Isoterma de adsorção. Proteína. Enzima. Sílica.

1 - INTRODUÇÃO

Em 1992, foi reportada pela primeira vez a descoberta de materiais mesoporosos pertencentes à família do M41S (1, 2). Destes, dois materiais têm recebido maior destaque, a MCM-41, sintetizada em meio básico e SBA-15, sintetizada em meio ácido.

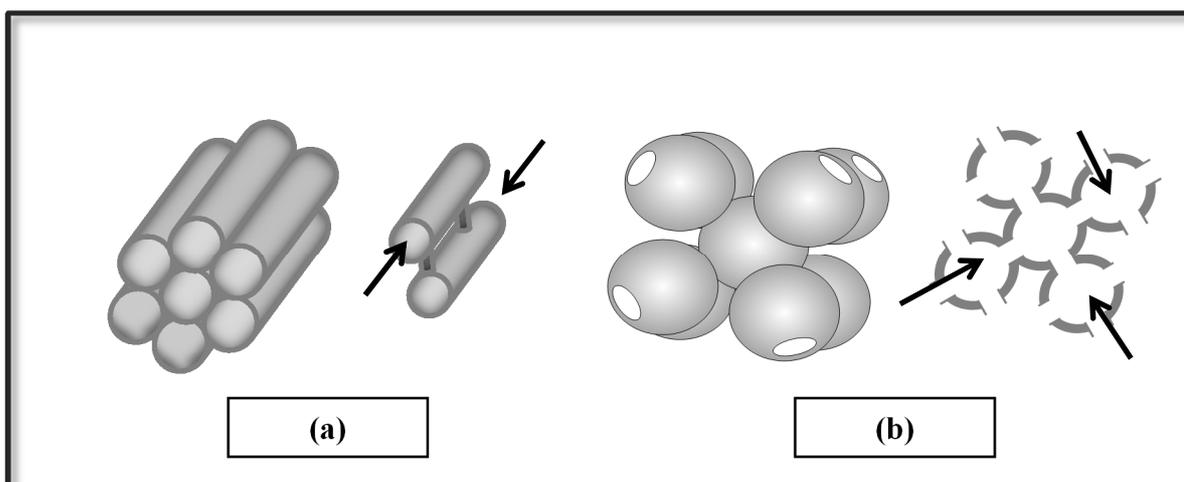
SBA-15 (Santa Barbara Amorphous), desenvolvida em 1998 por Zhao et al. (3), tem atraído bastante interesse devido às suas grandes áreas superficiais específicas, estrutura de poros bem definida, caráter inerte, não tóxico, alta biocompatibilidade (4) e estabilidade térmica e hidrotérmica (5), o que permite que sejam utilizadas em catálise (6, 7), adsorção (8-10), como sensor químico (11), agente de imobilização (12), liberação de fármacos (13, 14) e de separação por técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (15-17).

Outro adsorvente mesoporoso que tem recebido atenção é a SBA-16, cujo mecanismo de formação é semelhante ao da SBA-15 (18-22). A facilidade do método de preparação, a estrutura ordenada, e a possibilidade de controle sobre o tamanho e a forma dos seus poros, tornam a SBA-16 um material versátil, potencialmente aplicável em muitas áreas

da ciência e da engenharia de materiais (23). Embora seja relatada na literatura a aplicação de SBA-16 em campos distintos como catálise (24-26), funcionalização (27), incorporação de metais (28) e templating (29, 30), existem poucos registros de uso de tais materiais para fins de adsorção/cromatografia (31).

Tanto a SBA-15 quanto a SBA-16 são sintetizadas em meio ácido, na presença de surfactantes copolímero tribloco Pluronic P123 ($\text{PEO}_{20}\text{PPO}_{70}\text{PEO}_{20}$) (3) e Pluronic F127 ($\text{PEO}_{106}\text{PPO}_{70}\text{PEO}_{106}$) (18), respectivamente. No entanto, os materiais resultantes têm estruturas muito distintas, como mostradas na Figura 3.1. SBA-15 é uma sílica mesoporosa com poros paralelos e arranjo hexagonal altamente ordenado (ver a Figura 3.1a). Tem como vantagens a produção combinada de micro e mesoporosidade e paredes de sílica relativamente espessas. Os microporos são criados pela penetração da cadeia de óxido de etileno hidrofóbico nas paredes de sílica (32). Por outro lado, SBA-16 é uma sílica mesoporosa que possui uma estrutura com nanocompartimentos esféricos, com arranjo cúbico de corpo centrado, onde cada esfera está ligada a outras oito esferas vizinhas (33) (ver Figura 3.1b). Em operações como catálise ou separações, esta diferença na estrutura pode favorecer ou não a eficiência do processo. Por exemplo, Li et al. (34) verificaram que a encapsulação de complexos de Ru em nanocompartimentos de SBA-16 é um método eficiente para alcançar elevada atividade catalítica, aumentando a oxidação da água. Dados sobre a aplicação do SBA-16 na adsorção de biomoléculas são escassos, por isso ainda está por ser investigado se este modelo de estrutura poderia influenciar positivamente a separação de biomoléculas volumosas.

Figura 3. 1 – Ilustração esquemática dos canais da SBA-15 (a) e nanocaixas da SBA-16 (b).



Fonte: adaptado de Zhao et al. (3) e Flodström et al. (21), respectivamente.

Alguns autores relataram recentemente a utilização de hidrotalcitas sintéticas conhecidas como hidróxidos de dupla camada (35-37) e espumas celulares mesoestruturadas (MCF) (38), como novos adsorventes potenciais para biomoléculas. Estes materiais têm mostrado capacidade de adsorção elevada para proteínas padrão, por exemplo, albumina de soro bovino (BSA), Albumina de Soro Humano (HSA), lisozima (LYS) e mioglobina (Mb).

Neste trabalho, a SBA-15 foi sintetizada por duas vias distintas, sol-gel e hidrotérmica. A via sol-gel tem como principal vantagem a possibilidade de ser realizada sob condições moderadas de temperatura e pressão. No entanto, o tempo requerido para as etapas de hidrólise e condensação ocorrerem é geralmente muito superior ao exigido pela síntese hidrotérmica. Por sua vez, este último método resulta freqüentemente em materiais com áreas específicas e diâmetros de poros maiores do que os obtidos pela via sol-gel. Por esse motivo, é interessante comparar a capacidade de materiais do tipo SBA-15 obtidos por estas duas vias para adsorver as biomoléculas em estudo.

Assim, este trabalho destina-se à síntese de sílicas mesoporosas ordenadas do tipo SBA-15 e SBA-16, e investiga o seu potencial na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS) e celulase (CEL).

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Os copolímeros triblocos plurônico P123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀) e plurônico F127 (PEO₁₀₆PPO₇₀PEO₁₀₆), tetraetoxissilano (TEOS, 98%), ácido clorídrico (36%), CEL de *Aspergillus niger* e LYS foram comprados da Sigma Aldrich (USA). A BSA foi fornecida pela INLAB (Brasil); álcool butílico da Aldrich (99,4%); etanol, octano e fluoreto de amônio (NH₄F) da Vetec (Brasil). Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional.

2.2 Sínteses

A SBA-15 foi sintetizada por via sol-gel e hidrotérmica. A SBA-16 só foi sintetizado hidrotermicamente. A síntese hidrotérmica da SBA-15 (SBA-15 HD) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Zhang et al. (39), com adaptações. Como procedimento de síntese, 4,6 g de P123 foram dissolvidos em 160 mL de uma solução de HCl (1,3 M), seguido pela adição de 0,052 g de NH₄F. Depois de algumas horas, sob agitação, a 298 K, uma solução clara foi obtida e, em seguida, foram adicionados 21,72 g de octano e 9,76 g de TEOS. A mistura resultante foi agitada durante 24 h e, em seguida, transferida para uma autoclave para o envelhecimento a 373 K durante 48 h. O sólido foi filtrado, seco ao ar e calcinado a 823 K durante 5 h para remover os compostos orgânicos. A composição molar do gel de síntese foi 1,00 TEOS: 0,018 P123: 6,36 HCl: 201,8 H₂O: 0,033 NH₄F: 4,7 octano.

A síntese de SBA-15 obtida via sol-gel (SBA-15 SG) foi realizada como reportado por Esparza et al. (40), com adaptações. 1,7 g P123 foram dissolvidos numa solução de 50,4 mL de HCl aquoso (2 M) e mantidos sob agitação a 323K até que uma solução transparente foi obtida. 3,75 mL de TEOS foram adicionados gota a gota, sob agitação vigorosa. Posteriormente, a mistura foi ainda envelhecida durante 24 h à mesma temperatura, sem agitação. Subseqüentemente, a temperatura foi elevada até 353 K e mantida neste valor durante 48 horas. Os sólidos foram filtrados, lavados com água deionizada abundante para eliminar o excesso de surfactante. Finalmente, o sólido foi seco a 333 K durante 12 horas e calcinado a 823 K durante 6 h. A composição molar do gel de síntese foi 1,00 TEOS: 0,017 P123: 6 HCl: 160 H₂O.

A síntese hidrotérmica de SBA-16 foi realizada seguindo o método relatado por Kleitz et al. (41). A sílica mesoestruturada do tipo SBA-16 foi preparada utilizando uma mistura de plurônico F127 e álcool butílico como agentes de direcionamento da estrutura. A fonte de sílica foi o TEOS. Numa síntese típica, 4,0 g F127 foram dissolvidos em solução aquosa 0,4 M HCl (200 mL). A síntese foi realizada num frasco de polipropileno fechado. Após dissolução completa, 13,75 g de álcool butílico foram adicionados de uma só vez a 318 K. Após 1 h sob agitação, 19,3 g de TEOS foram rapidamente adicionados a esta mistura. A composição molar do gel de síntese foi de 1,00 TEOS: 0,0035 F127: 1,78 BuOH: 0,88 HCl: H₂O 119. A mistura foi ainda agitada vigorosamente a 318 K durante 24 horas para permitir a formação do produto mesoestruturado. Subseqüentemente, a mistura de reação foi aquecida numa autoclave a 373 K durante 24 h sob condições estáticas. O precipitado branco foi então filtrado sem lavagem e

secou-se a 373 K durante 24 horas ao ar. Para remover o modelo de copolímero, o sólido foi enxaguado brevemente à temperatura ambiente com uma mistura de etanol/HCl, durante 20 minutos, em seguida foi filtrado, seco e depois calcinado a 823 K durante 2 h.

2.3. Caracterizações

A difração de raios-X (XRD) foi utilizada para identificar as fases cristalinas dos sólidos sintetizados. As análises foram realizadas com um difratômetro de raios-X Siemens D5000 equipado com uma fonte de radiação de $\text{CuK}\alpha$ (comprimento de onda de 1,5418 Å). As medições foram obtidas para 2θ variando de 1-10°. As micrografias eletrônicas de transmissão (TEM) foram obtidas com o auxílio de um microscópio de alta resolução Philips CCCM 200 SuperTwin-DX4. As medições de adsorção e dessorção de N_2 a 77 K foram realizadas utilizando um equipamento de adsorção volumétrica (AUTOSORB-1MP, Quantachrome Instruments). A área de superfície específica (S_{BET}) das amostras foi calculada com o método de Brunauer, Emmet e Teller (BET) (42), utilizando os dados de adsorção na gama de pressões relativas 0,05-0,18 e 0,05-0,23 para as amostras SBA-15 e SBA-16, respectivamente, onde as condições de linearidade e considerações a respeito do método foram cumpridas (43). A distribuição do tamanho dos poros foi calculada a partir do ramo de dessorção das isotermas usando a *Nonlocal Density Functional Theory* (NLDFT) (44). O volume total de poro foi calculado como o volume adsorvido em $P/P_0 = 0,95$.

2.4. Experimentos de adsorção de proteínas

Experimentos de adsorção foram realizados num agitador orbital (Tecnal, Brasil). Para isso, 15 mg de adsorvente foram colocados em contato com 3,0 mL de solução tampão contendo a biomolécula alvo (BSA, LYS ou CEL). Inicialmente, foi avaliado o efeito do pH na adsorção da biomolécula. Para a BSA, uma concentração inicial de 1,0 mg/mL em tampão acetato (50 mmol/L) foi utilizado com o pH variando entre 3,6 e 5,6 através da adição de HCl ou de NaOH. Para as outras biomoléculas, a concentração inicial foi de 3,0 mg/mL, utilizando tampão de bicarbonato de sódio (25 mmol/L) com o pH variando entre 6,5 e 12,0 para LYS e tampão acetato (50 mmol/L) com o pH variando entre 3,0 e 5,4 para a CEL. Para os

experimentos de cinética, as concentrações iniciais utilizadas foram as mesmas usadas nos testes de pH. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados. Para a medição das isothermas de adsorção, diferentes concentrações iniciais de BSA (1,0 a 15,0 mg/mL), LYS (1,0 a 15,0 mg/mL) e CEL (1,0 a 7,0 mg/mL) com pH e força iônica definidas foram agitadas durante tempo suficiente para assegurar o equilíbrio. A razão sólido/líquido usada na determinação das isothermas de adsorção foi de 5,0 mg/mL. Em todos os experimentos, após um dado tempo, as amostras foram recolhidas e centrifugadas durante 10 min a 10.000 g (microcentrífuga refrigerada Cientec CT - 15000R, EUA). A concentração do sobrenadante foi analisada com um espectrofotômetro a 280 nm (espectrofotômetro de UV-Vis Biomate 3, Thermo Scientific, EUA).

A concentração de cada biomolécula adsorvida foi calculada usando um balanço de massa simples, de acordo com a Equação 1:

$$q = \frac{V_{sol}(C_0 - C_{eq})}{m_{ads}} \quad (1)$$

onde V_{sol} representa o volume de solução de biomolécula no equilíbrio (tipicamente de 3 mL); C_0 a concentração inicial da biomolécula (mg/mL); C_{eq} é a concentração de equilíbrio (mg/mL) e M_{ads} é a massa do adsorvente (normalmente de 15 mg).

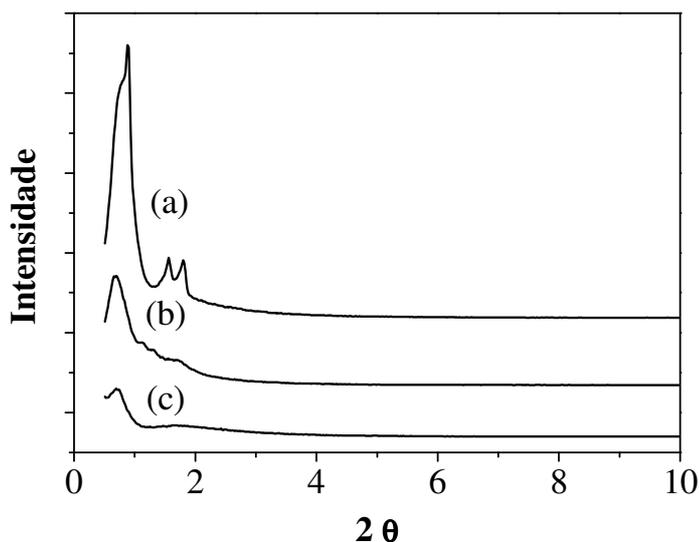
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização de SBA-15 e SBA-16

Os padrões de difração de raios-X foram usados para identificar o ordenamento estrutural dos materiais mesoporosos em estudo. Os resultados são mostrados na Figura 3.2. No caso da SBA-15 SG, três principais picos de difração estão presentes correspondentes aos planos cristalinos correspondentes aos índices de Miller (100), (110) e (200). Estes três primeiros picos são característicos de um arranjo hexagonal de poros de duas dimensões, normalmente encontrado em materiais como SBA-15 (45, 46), indicando uma mesoestrutura bem definida. Por outro lado, a SBA-15 HD é muito menos regular e praticamente mostra

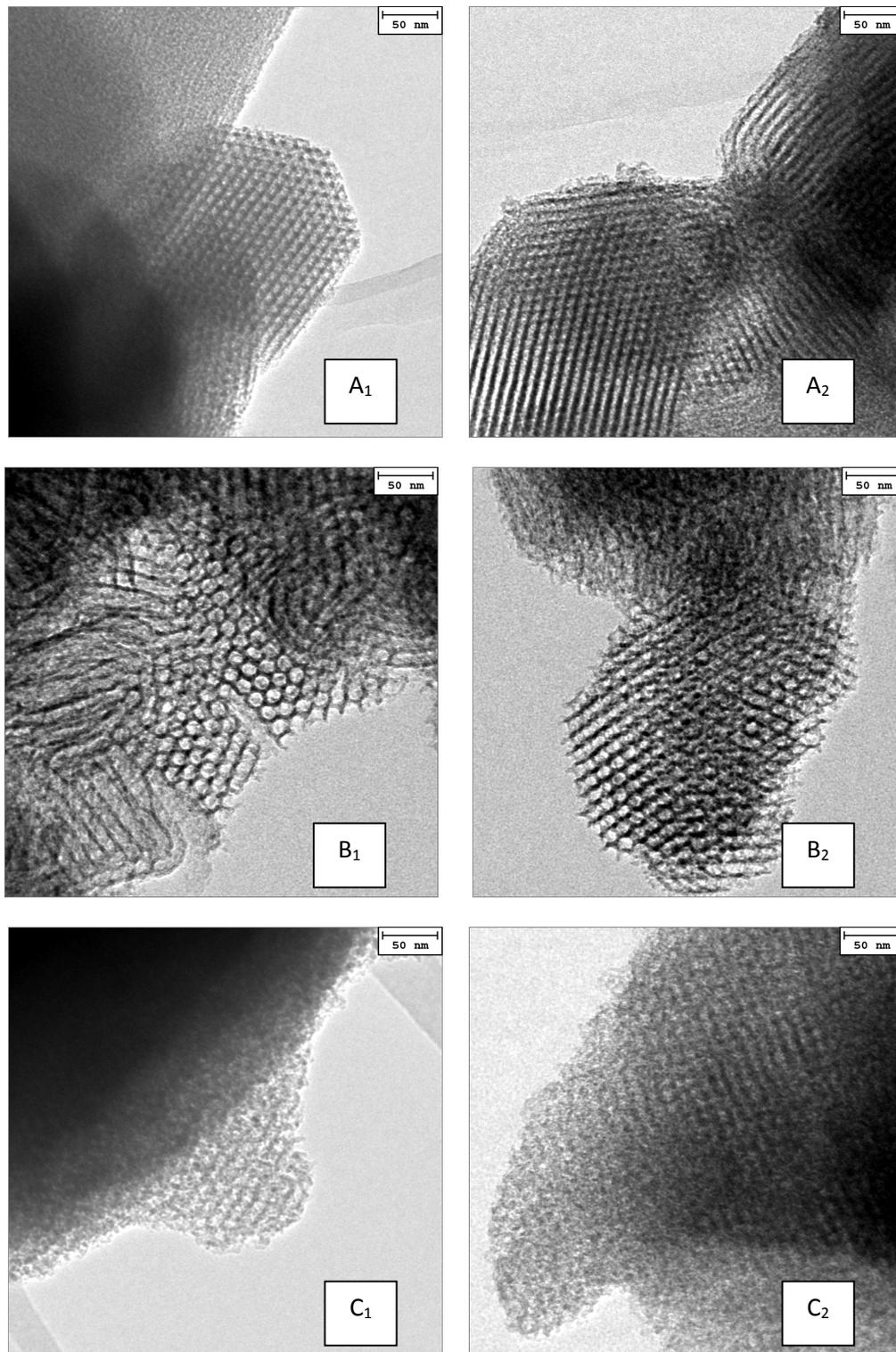
apenas um pico bem resolvido em $2\theta \approx 1^\circ$. Após $2\theta = 1^\circ$, existem picos não resolvidos que podem indicar que existe algum grau de arranjo mesoporoso, a ser confirmado por TEM. SBA-16 também só mostra um pico bem pronunciado em baixo ângulo. Sua posição corresponde ao forte observado com partículas poliédricas e indexado pelo plano (110) (47). Tal arranjo de materiais pode também ser observado através das imagens de TEM ilustradas na Figura 3.3. Os poros dispostos em arranjo hexagonal das amostras de sílica SBA-15 podem ser claramente observados em ambas as vias de síntese (Figuras 3 A1, B1, A2 e B2). Como esperado, as imagens de TEM de SBA-16 não mostram um ordenamento hexagonal como na SBA-15, mas sim de poros interligados tipo gaiola.

Figura 3. 2 – Difração de raios-X a baixo ângulo das amostras SBA-15 SG (a), SBA-15 HD (b) and SBA-16 (c).



Fonte: elaborado pelo autor.

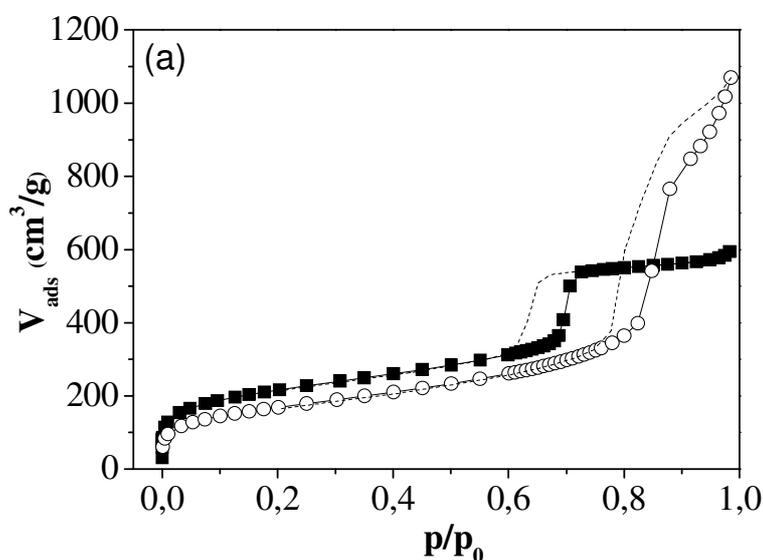
Figura 3.3 – Imagens TEM das amostras de SBA-15 SG (A1 - A2), SBA-15 HD (B1 - B2) e SBA-16 (C1 - C2).

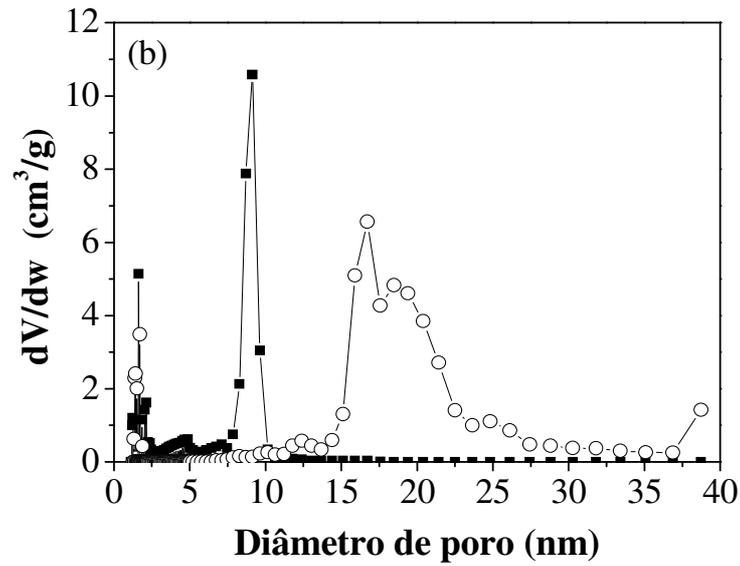


Fonte: elaborado pelo autor.

As Figuras 3.4 e 3.5 mostram as isotermas de adsorção e dessorção de N₂ das amostras SBA-15 e SBA-16, que podem ser classificados como tipo IV. Isto é característico de materiais mesoporosos com um ciclo de histerese típico de poros cilíndricos paralelos, no caso da Figura 3.4 (amostras de SBA-15). A SBA-16 (Figura 3.5) apresenta uma histerese do tipo H2 (48), típico de materiais mesoporosos tipo gaiola (49). Nas Figuras 4b e 5b, as distribuições de tamanho de poro das três amostras revelaram que os tamanhos dos poros são praticamente todos superiores a 2 nm (mesoporos de acordo com a classificação IUPAC). Tamanhos de poros consideravelmente maiores foram obtidos para SBA-15 HD, o que pode ser uma das razões para o material ser menos ordenado que os demais. É interessante notar que a SBA-16 apresenta uma distribuição bimodal de tamanho de poro, o que corresponde ao tamanho das gaiolas (aproximadamente 11 nm) e a seus poros de conexão (cerca de 3 nm).

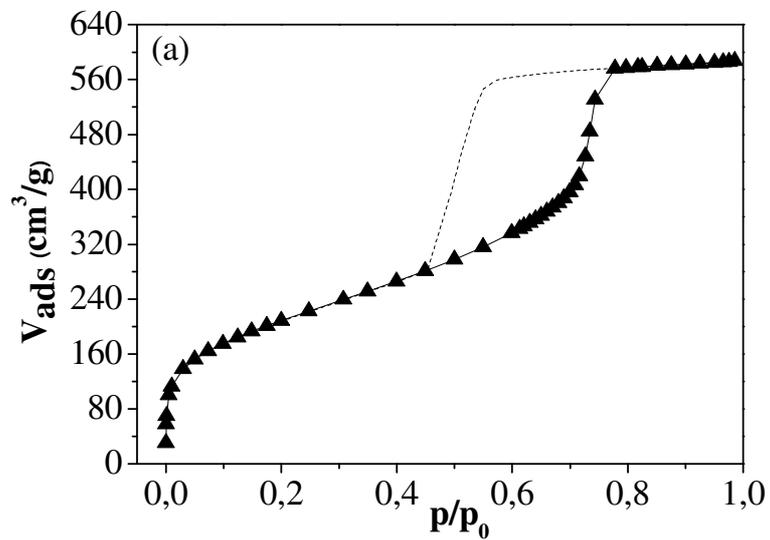
Figura 3.4 – Isoterma de adsorção e dessorção de N₂ (a) e distribuição de tamanho de poros por NLDFT (b) para SBA-15 SG (■) e SBA-15 HD (○). A linha pontilhada representa a dessorção.

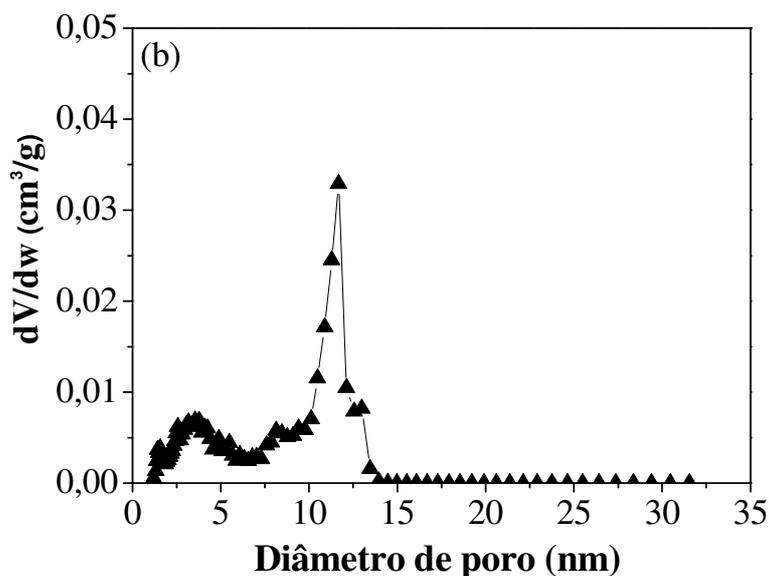




Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3. 5 - Isoterma de adsorção e dessorção de N_2 (a) e distribuição de tamanho de poros por NLDFT (b) para SBA-16. A linha pontilhada representa a dessorção.





Fonte: elaborado pelo autor.

As características texturais dos adsorventes foram obtidas a partir das isotermas de adsorção de N_2 a 77 K e estão resumidos na Tabela 3.1. É possível observar que, apesar de ter a menor área superficial específica, a SBA-15 HD apresenta o maior volume de poros e diâmetro dos poros, características interessantes para adsorção de biomoléculas.

Tabela 3. 1 – Propriedades texturais das amostras de SBA-15 HD, SBA-15 SG e SBA-16.

Amostras	S_{BET} (m^2/g)	D_p (nm)	V_p (cm^3/g)
SBA-15 HD	609	16,7	1,65
SBA-15 SG	777	9,1	0,92
SBA-16	755	11,7	0,91

S_{BET} = área superficial; D_p = diâmetro de poros obtidos pelo método NLDFT a partir dos dados de dessorção; V_p = volume total de poros.

As SBA-15 SG e SBA-15 HD mostram propriedades texturais e estruturais muito diferentes devido às diferentes condições de síntese, em relação ao tempo e temperatura de agitação, bem como a adição de agentes de expansão de poros. A SBA-15 HD foi sintetizada por via hidrotérmica, com a ajuda de octano como um agente de expansão de poro e fluoreto de amônio como agente solubilizante. De acordo com Zhang et al. (50), a adição de tais reagentes promove a formação de estruturas organizadas em baixas temperaturas, o que é benéfico, uma

vez que os blocos de óxido de propileno (PPO) tendem a tornar-se mais hidrofílico a temperaturas baixas e ser facilmente hidratados. Por outro lado, esta hidratação prejudica a formação e agregação das micelas. De fato, apesar da síntese hidrotérmica geralmente levar à formação de SBA-15 bastante ordenada com picos de reflexão (100) DRX bem resolvidos, a SBA-15 HD é bastante desordenada, provavelmente devido à temperatura relativamente baixa (298 K) no passo de condensação. Por outro lado, a presença de alcanos, como por exemplo, octano, tende a suprimir a hidratação do PPO hidrofóbico, ao passo que a solubilização de tais alcanos com o auxílio de fluoreto de amônio expande o núcleo hidrofóbico das micelas (51). A combinação de todos estes fatores (a baixa temperatura de condensação e a adição de agentes de expansão de poro) resulta em sílicas mesoporosas com maiores diâmetros de poro (superiores a 10 nm), que, no entanto, tendem a ser mais desordenada do que os sintetizados seguindo um procedimento convencional, tal como SBA-15 SG. Esta última foi preparada sem a adição de expansores de poros ou potenciadores de solubilidade e a etapa de condensação ocorreu a 323K, o que conduziu a uma agregação de micelas mais eficaz e, portanto, a um material mais ordenado, mas com um tamanho de poro mais estreito.

3.2 Adsorção de biomoléculas

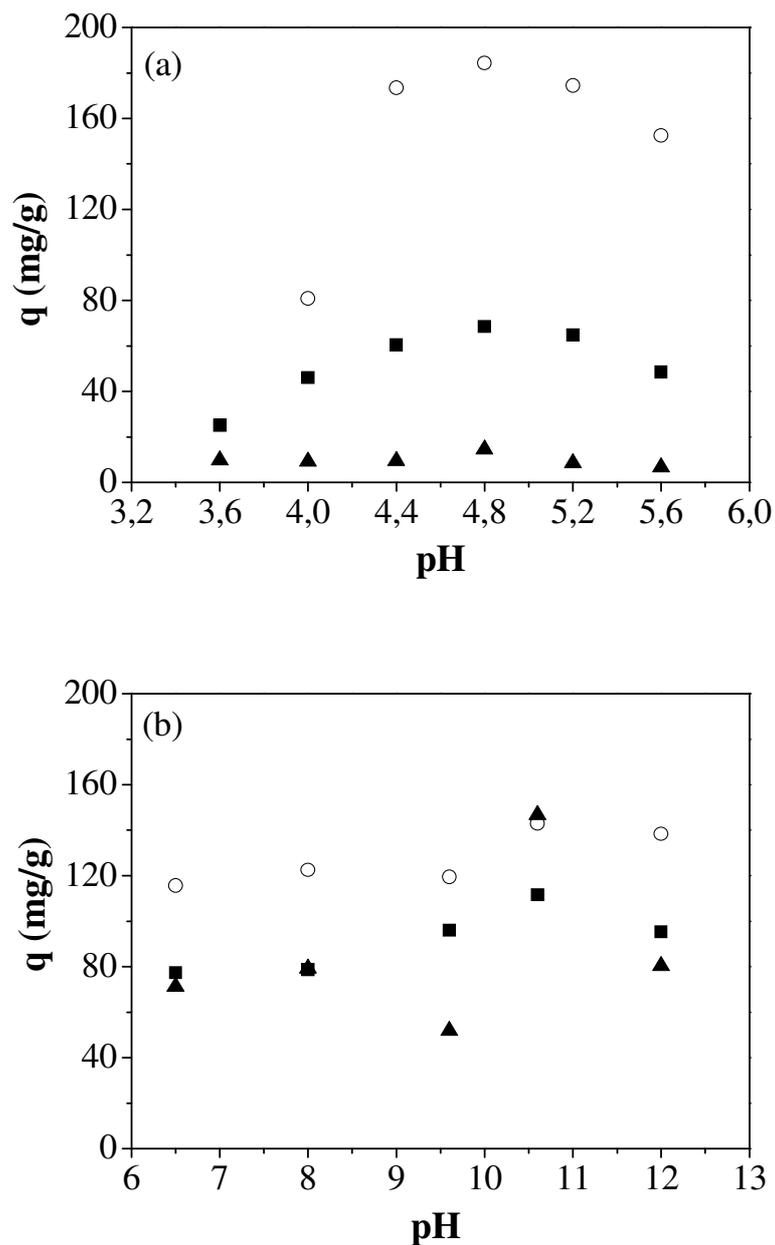
3.2.1. Efeito do pH na adsorção de BSA, LYS e CEL

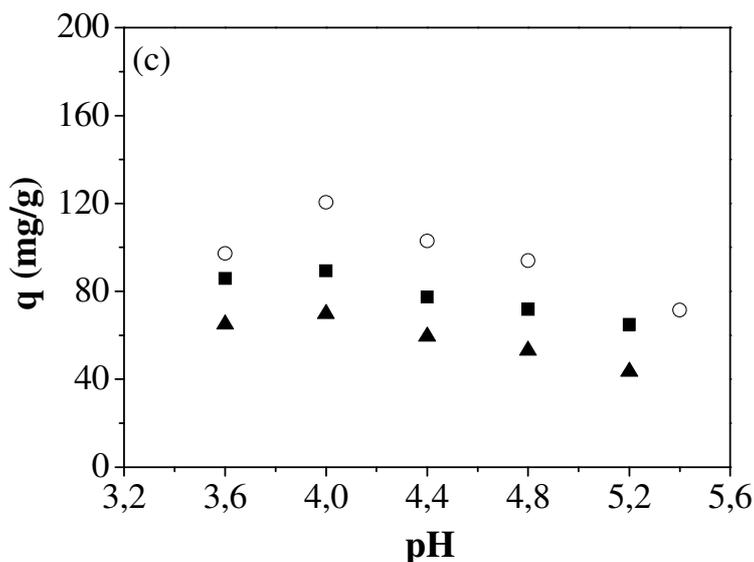
A adsorção de BSA, LYS e CEL nas amostras de SBA-15 e SBA-16 foi investigada em diferentes valores de pH e os resultados estão mostrados nas Figuras 3.6a, 3.6b e 3.6c, respectivamente.

De acordo com estes resultados, a capacidade máxima de adsorção ocorre em pH 4,8 para BSA, 10,6 para LYS e 4.0 para CEL. No caso das proteínas (BSA e LYS), estes valores aproximam-se dos respectivos pontos isoelétricos ($pI_{BSA} = 4,8$ e $pI_{LYS} = 11,0$), em que a carga líquida da proteína é zero. A um pH abaixo do pI, a proteína/enzima é carregada positivamente, ao passo que é negativamente carregada a um pH acima do pI. Portanto, as repulsões laterais entre as proteínas adsorvidas são mínimas quando o pH é igual ao pI. A diferença de carga pode promover ou não a interação das biomoléculas com o adsorvente e essas interações podem ser regida por forças hidrofóbicas, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. No nosso caso, as interações entre a proteína/enzima e SBA-15 são susceptíveis de ser interação

hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxila na superfície da SBA-15 e os grupos funcionais de proteína/enzima (52).

Figura 3.6 – Influencia do pH na adsorção de BSA (a), LYS (b) e CEL (c) em SBA-15 obtidos por via sol-gel (■), via hidrotérmica (○) e SBA-16 (▲).





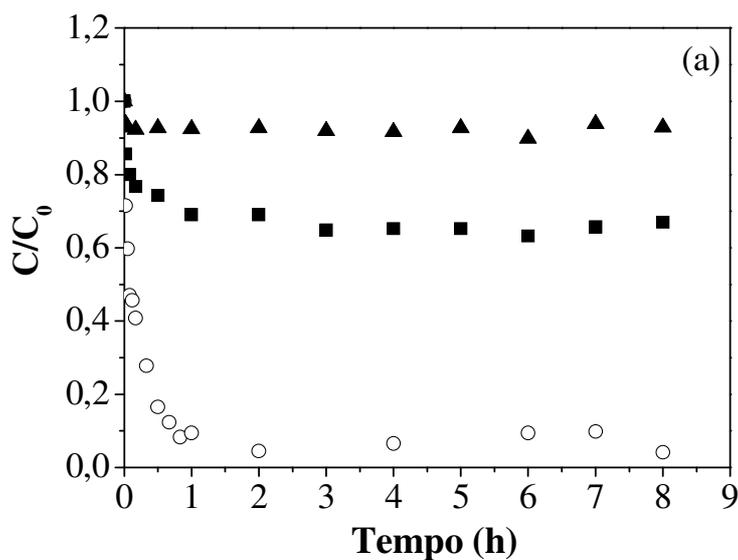
Fonte: elaborado pelo autor.

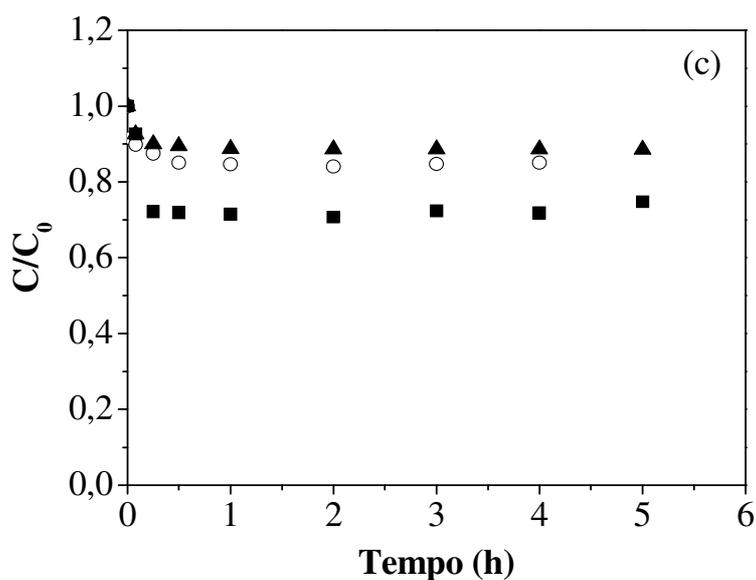
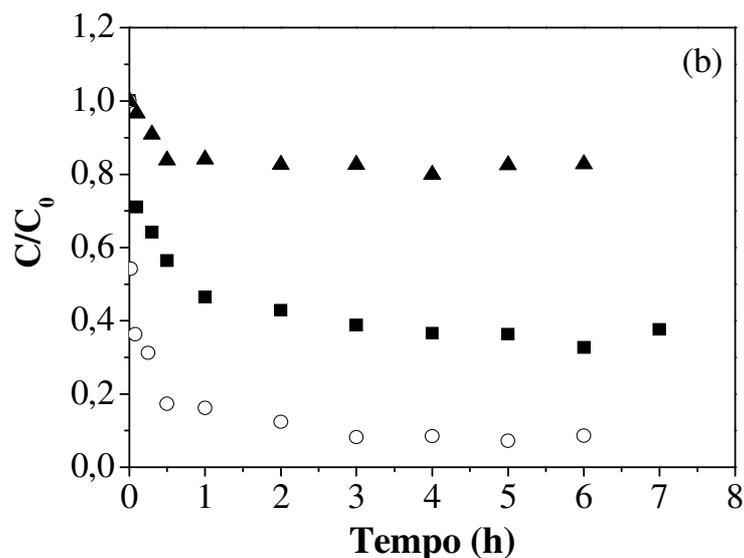
Outra explicação para favorecer a adsorção no ponto isoelétrico é a alteração na conformação da cadeia da proteína. No caso da BSA e LYS, tem sido relatado na literatura que estas moléculas têm a capacidade de dobrar ou desdobrar a sua estrutura de acordo com o pH do meio. BSA, por exemplo, existe sob uma forma compacta, entre pH 4,3 e 10,5 (53, 54). A diminuição do pH pode levar à transição de BSA de uma conformação compacta em formato coração (forma N) para desdobrada na forma charuto (forma F) a pH 4,5 e as alterações de conformação são irreversíveis quando o pH < 4,0 (54, 55), esta transição sempre envolve a expansão da molécula. Gao et al. (54) relataram que, quando o valor do pH é diminuído de 5,0 para 2,4, tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o volume molecular da BSA aumentam significativamente. Isso implica que a diminuição observada da capacidade de adsorção, com a diminuição do pH poderia ser considerado como um resultado do desdobramento e aumento do volume molecular da BSA. Fenômeno semelhante deve acontecer com a LYS, que também muda a sua estrutura com o pH, de acordo com a literatura (56). Registros na literatura não foram encontrados em relação a CEL no que diz respeito a este assunto, mas acreditamos que mudanças similares na conformação tridimensional acontecerão no pH abaixo do pI. Deve ser levado em conta que a celulase é uma associação de três enzimas (celobiohidrolase, endobeta-1,4-glucanase, e beta-glicosidase ou celobiase), cada uma tendo o seu próprio pI (57). Assim, isto pode explicar as adsorções mais elevadas a pH 4 (Figura 3.6c), um pH ligeiramente mais baixo do que o pI reportado para CEL.

3.2.2 Cinética e isoterma de adsorção de BSA, LYS e CEL em SBA-15 e SBA-16

As curvas de adsorção em função do tempo para BSA (a), LYS (b), e CEL (c) em SBA-15 HD, SBA-15 SG e SBA-16 são mostrados na Figura 3.7. De acordo com estes resultados, pode-se observar uma rápida diminuição na concentração de biomoléculas na fase líquida. O equilíbrio foi atingido em cerca de 240 minutos (4 horas) para BSA e LYS, em ambas as amostras de SBA-15 e de 120 min (2 horas) em SBA-16. No caso de CEL, o equilíbrio foi atingido em 240 min para todos os adsorventes. Esta informação é útil para o conhecimento do tempo de contato necessário para o equilíbrio de adsorção ser estabelecida.

Figura 3.7 – Cinética de adsorção de BSA (a), LYS (b) e CEL (c) em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲).





Fonte: elaborado pelo autor

As Figuras 3.8, 3.9 e 3.10 mostram as isotermas de adsorção de BSA, LYS e CEL, respectivamente, obtidas com SBA-15 SG, SBA-15 HD e SBA-16 em tanques agitados. As curvas mostradas em todas as Figuras representam a regressão dos dados experimentais, de acordo com os modelos de Langmuir (L), de Henry (H) e de Langmuir-Freundlich (LF), conforme expresso abaixo (Equações 2, 3 e 4). Os parâmetros estimados destes modelos de isotermas são apresentados na Tabela 3.2, 3.3 e 3.4.

$$q = \frac{q_{\max} (k_L C_{eq})}{1 + k_L C_{eq}} \quad (2)$$

onde q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de peso (mg/g), C_{eq} é a concentração de proteína na fase líquida de equilíbrio de adsorção (mg/mL), K_L é a constante de dissociação de Langmuir (mL/mg), que está relacionada com a energia de adsorção e o q_{\max} é a capacidade máxima de adsorção por unidade de peso (mg/g).

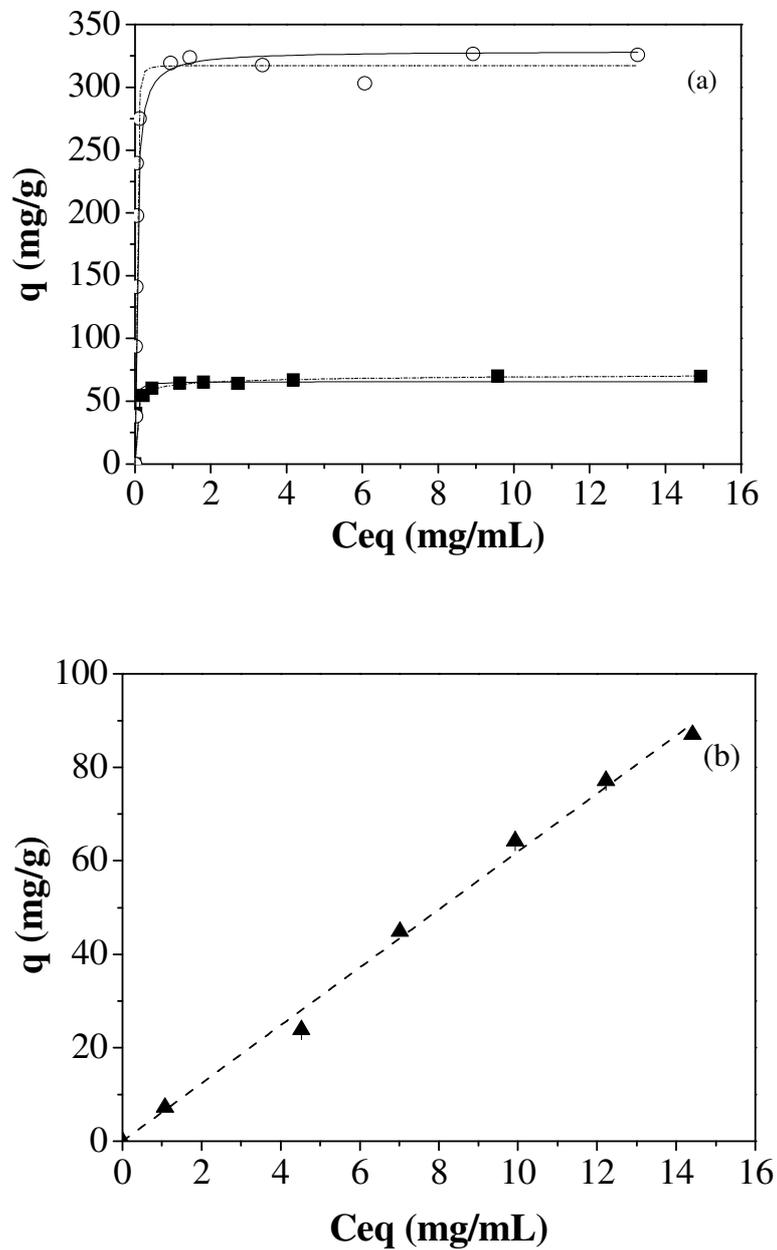
$$q = k_H \cdot C_{eq} \quad (3)$$

onde k_H é a constante da lei de Henry (mL/g) e C_{eq} é a concentração na fase fluida (mg/mL).

$$q = \frac{q_{\max} (k_{LF} C_{eq})^b}{1 + (k_{LF} C_{eq})^b} \quad (4)$$

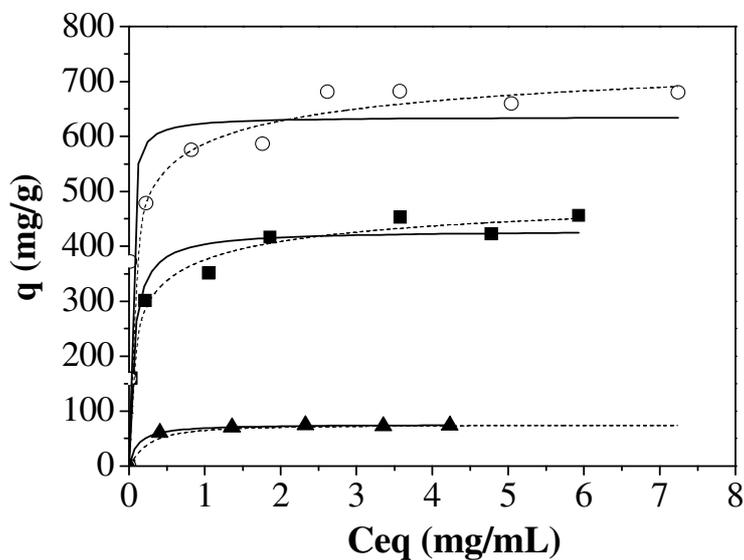
onde q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de peso (mg/g), C_{eq} é a concentração de proteína na fase líquida no equilíbrio de adsorção (mg/mL), k_{LF} (mL/mg)^{1/b} é a constante de Langmuir-Freundlich associado com a energia de adsorção, b é a constante de heterogeneidade de Langmuir-Freundlich. LF tende para a isoterma de Langmuir quando a constante de heterogeneidade b é próximo da unidade.

Figura 3. 8 – Isotherma de adsorção de BSA a 295 K em (a): SBA-15 SG (■) e SBA-15 HD (○); (b) SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir, linhas pontilhadas (⋯) representam o modelo de Langmuir-Freundlich e as linhas tracejadas (---) representam o modelo de Henry.



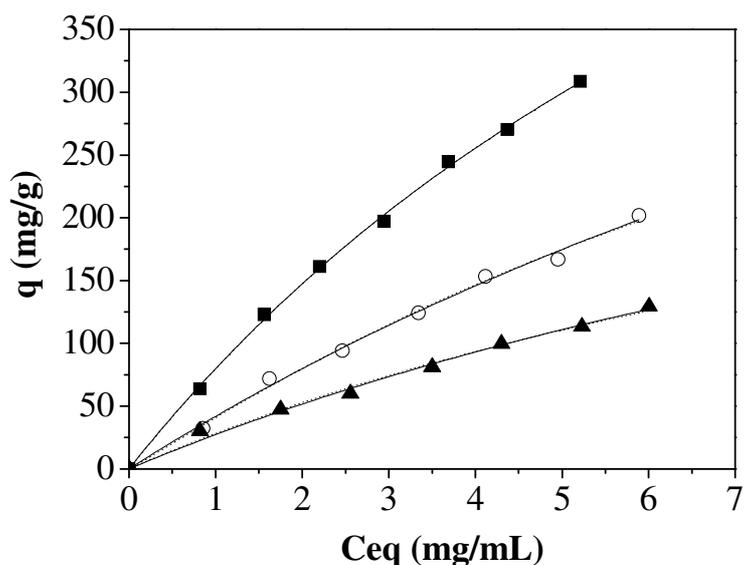
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 3.9 – Isoterma de adsorção de LYS a 295 K em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir e linhas pontilhadas (---) representam o modelo de Langmuir-Freundlich.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3.10 – Isoterma de adsorção de CEL a 295K em SBA-15 SG (■), SBA-15 HD (○) e SBA-16 (▲). Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir e as linhas pontilhadas (---) representam o modelo de Langmuir-Freundlich.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3. 2 - Parâmetros da equação de Langmuir, Henry e Langmuir-Freundlich para a adsorção de BSA em sílica mesoporosa.

Amostra	Modelo	Parâmetros			R ²
		q_{max} (mg/g)	k_L (mL/mg), k_{LF} (mL/mg) ^{1/b}	b	
SBA-15 SG	Langmuir	65,02 ± 1,35	70,52 ± 17,62	-	0,9682
	LF*	74,69 ± 2,22	70,42 ± 12,05	0,39 ± 0,05	0,9973
SBA-15 HD	Langmuir	328,74 ± 14,86	23,10 ± 4,98	-	0,9195
	LF*	317,38 ± 10,54	25,17 ± 2,19	2,21 ± 0,47	0,9501
SBA-16	Langmuir	-	-	-	-
	Henry	-	6,20 ± 0,10	-	0,9951

* Langmuir-Freundlich.

Tabela 3. 3 – Parâmetros da equação de Langmuir e Langmuir-Freundlich para a adsorção de LYS em sílica mesoporosa.

Amostra	Modelo	Parâmetros			R ²
		q_{max} (mg/g)	k_L (mL/mg), k_{LF} (mL/mg) ^{1/b}	b	
SBA-15 SG	Langmuir	429.10 ± 16.69	15.79 ± 5.12	-	0.9627
	LF*	535.23 ± 75.08	0.42 ± 0.24	0.46 ± 0.12	0.9682
SBA-15 HD	Langmuir	635.69 ± 29.99	52.71 ± 19.17	-	0.9129
	LF*	819.85 ± 221.15	0.40 ± 0.43	0.38 ± 0.18	0.9504
SBA-16	Langmuir	76.07 ± 0.58	9.35 ± 0.79	-	0.9994
	LF*	75.03 ± 1.60	0.08 ± 0.04	1.20 ± 0.38	0.9994

* Langmuir-Freundlich.

Tabela 3. 4 - Parâmetros da equação de Langmuir e Langmuir-Freundlich para a adsorção de CEL em sílica mesoporosa.

Amostra	Modelo	Parâmetros			R ²
		q_{max} (mg/g)	k_L (mL/mg), k_{LF} (mL/mg) ^{1/b}	b	
SBA-15 SG	Langmuir	957.30 ± 71.91	0.09 ± 0.01	-	0.9989
	LF*	931.29 ± 301.47	0.09 ± 0.05	1.01 ± 0.09	0.9987
SBA-15 HD	Langmuir	845.84 ± 195.70	0.05 ± 0.01	-	0.9952
	LF*	605.19 ± 7.47	0.09 ± 0.00	1.07 ± 0.00	0.9961
SBA-16	Langmuir	473.38 ± 122.64	0.06 ± 0.02	-	0.9922
	LF*	412.81 ± 6.62	0.07 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.9930

* Langmuir-Freundlich.

As isotermas de adsorção de BSA e LYS em SBA-15 SG e HD em todos os adsorventes mostraram um considerável aumento inicial, o que sugere uma elevada afinidade entre estas biomoléculas e a superfície do adsorvente até que, finalmente, a isoterma atinge um patamar (tipo de isoterma de Langmuir) (58). Observa-se que o valor de q_{max} tanto para BSA quanto para LYS é relativamente elevado quando comparado com os dados descritos na literatura (9, 58-60), especialmente para SBA-15 HD. Este material apresenta maior diâmetro de poros e de volume de poro e, portanto, acomoda mais biomoléculas por unidade de massa. A capacidade de adsorção das proteínas/enzimas sobre as peneiras moleculares mesoporosas é conhecida por ser fortemente influenciada pela área e volume de poros específico (61). Tanto a BSA quanto a LYS foram adsorvidas no seu ponto isoelétrico, deste modo que é provável que a adsorção seja impulsionada majoritariamente por efeitos de exclusão de tamanho.

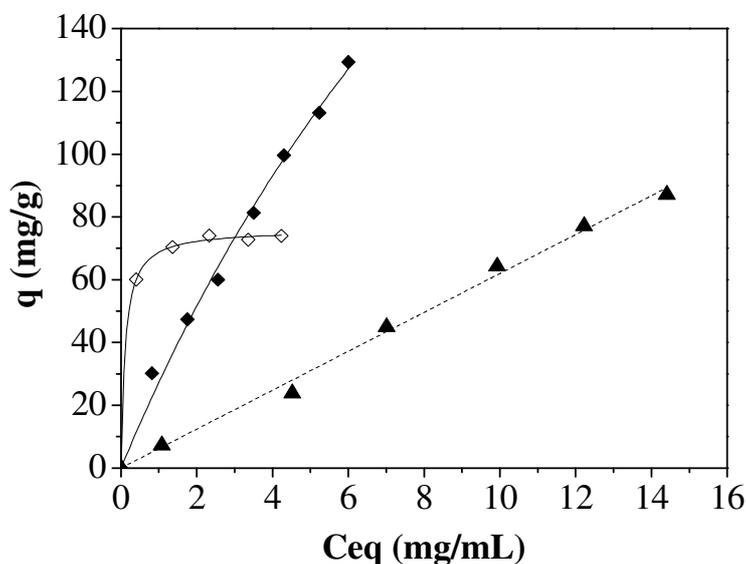
As linhas sólidas e pontilhadas na Figura 3.8 representam os modelos de L e LF para a adsorção de BSA em SBA-15 HD e SBA-15 SG. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.2, em ambas as SBAs a adsorção de BSA foi bem ajustada por LF. A quantidade máxima de BSA adsorvida em SBA-15 HD foi 317,38 mg/L e 74,69 mg/g em SBA-15 SG. A BSA é uma grande proteína de forma elipsóide com massa molecular de 69 kDa e de tamanho molecular de 4 nm × 4 nm × 14 nm (61). A sua seção transversal é mais próxima do tamanho do diâmetro de poro médio de SBA-15 SG (9 nm) do que o diâmetro dos poros da SBA-15 HD (17 nm). Além disso, o volume de poro da SBA-15 SG é de cerca de ± 55% do volume da SBA-15 HD. Portanto, não é surpreendente que a capacidade de adsorção de BSA no primeiro adsorvente seja muito menor do que no segundo. Baseado no mesmo raciocínio, BSA é dificilmente adsorvido na SBA-16 (Figura 3.8b), que tem uma distribuição de tamanho de poro nitidamente bimodal (ver Fig. 3.4b.). Mesmo que as gaiolas do adsorvente tenham espaço suficiente para acomodar a BSA (entre 10 e 13 nm), o tamanho dos poros de ligação é menor do que 4 nm, que interpõe sérios obstáculos estéricos. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Diao et al. (61), que investigou o efeito do tamanho do poro de SBA-15 na adsorção de BSA e LYS. Observou-se também que a capacidade de adsorção de equilíbrio de BSA em SBA-15 aumentou com o aumento do tamanho dos poros.

LYS é uma biomolécula bastante menor do que a BSA, com dimensões de 3 nm × 3 nm × 4,5 nm (9). Ela é adsorvida em todas as três sílicas com adsorções máximas mais elevadas do que as obtidas para BSA. Em SBA-16, LYS é a única biomolécula a mostrar comportamento de isotermas de Langmuir, embora a adsorção seja mais baixa em comparação com as outras sílicas. Isto pode ser explicado novamente devido ao pequeno tamanho dos poros

de acesso às gaiolas cúbicas. Como pode ser visto na Fig. 4b, o tamanho médio de tais poros é de cerca de 3 nm, as quais podem também limitar a adsorção de LYS, não obstante a gaiola relativamente grande. Para o caso de adsorção de LYS em SBA-15 HD, SBA-15 SG e SBA-16 (Fig. 3.9), as linhas sólidas e linhas pontilhadas representam os modelos de L e LF. Como mostrado na Tabela 3.3, ao contrário da adsorção de BSA, o modelo L foi o mais adequado para representar os dados experimentais em todos os adsorventes. Embora visualmente mostrando um melhor ajuste, o modelo de LF apresentou grandes desvios-padrão para os parâmetros estimados.

No caso de CEL, todos os adsorventes mostraram capacidade de adsorção apreciável a 295 K e um comportamento apenas ligeiramente não-linear. Os parâmetros de ajuste das equações de L e de LF são resumidos na Tabela 3.4. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, o modelo de L foi também mais apropriado para representar os dados experimentais da isoterma de adsorção de CEL em todas as SBAs. É a biomolécula mais adsorvida pela SBA-16, possivelmente devido a suas diferentes conformações e tamanhos das enzimas individuais que constituem a celulase, o que leva a um efeito de exclusão menos pronunciado do que o observado para BSA e LYS. Isto pode ser melhor apreciado na Figura 3.11, em que as isotermas das três biomoléculas estudadas são mostradas para SBA-16. De fato, foi relatado em Hartono et al. (57) que a celulase pode assumir forma esférica (2,4-7,4 nm de diâmetro) ou elipsoidal ($1,3 \times 7,9 \times 4,2$ nm a 25,2 nm). Levando-se em conta que o diâmetro da boca do poro da SBA-16 sintetizada é de cerca de 3 nm (ver fig. 3.5b), as enzimas menores ou elipsoidais longelíneas terão livre acesso às gaiolas cúbicas.

Figura 3.11 – Isoterma de adsorção a 295K em SBA-16: BSA (▲), LYS (◇) e CEL (◆).



Fonte: elaborado pelo autor.

4 CONCLUSÕES

SBA-15 e SBA-16 foram sintetizadas pelas rotas sol-gel e hidrotérmica. As três sílicas mesoporosas sintetizadas foram capazes de adsorver as biomoléculas estudadas (BSA, LYS e CEL) nos pHs próximos aos seus pIs com capacidades relativamente elevadas na maioria dos casos. Entre as sílicas com poros cilíndricos paralelos (SBA-15), o material sintetizado hidrotérmicamente apresentou propriedades texturais superiores (tamanho dos poros e de volume específico de poros) e mostrou a maior capacidade de adsorção tanto para a BSA (317 mg/g) quanto para LYS (636 mg/g), apesar de seu arranjo dos poros mal ordenado. Por outro lado, SBA-15 sintetizado pela via sol-gel mostrou uma maior capacidade de adsorção de celulase (957 mg/g) em comparação com os outros materiais. Não só é o material com melhor arranjo mesoscópico dos poros (Fig. 3.2), mas também exibe uma distribuição de tamanho de poros estreita (Fig. 3.4-B) em comparação com os demais adsorventes, o que sugere que a celulase parece ser mais densamente empacotada em SBA-15 SG do que na SBA-15 HD. Quanto a SBA-16, capacidades de adsorção mais baixas eram esperadas para todas as biomoléculas estudadas, devido à natureza da sua própria estrutura, uma vez que apresenta uma estrutura cúbica de corpo centrado ligado por poros estreitos. No entanto, a adsorção de celulase por este material (473 mg/g), descrita pela primeira vez neste trabalho, ultrapassa as adsorções

de outras biomoléculas, e esta pode ser uma característica interessante para ser explorada nos processos de separação cromatográfica desta enzima.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao CNPq (processo número 577363/2008-5) e a CAPES (processo número PE - 055/2008) pelo apoio financeiro para esta pesquisa. Os autores agradecem também ao professor Dr. Karim Sapag e seu grupo (Universidad Nacional de San Luis, Argentina) pelas análises e discussões dos resultados de adsorção de N₂ bem como ao Professor Dr. Enrique Rodriguez-Castellón (Universidad de Málaga, Espanha) por disponibilizar algumas das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992; 359: 710-712.
2. Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ, Leonowicz ME, Kresge CT, Schmitt KD, Chu TW, Olson DH, Sheppard EW, McCullen SB, Higgins JB, Schlenker JL. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*. 1992; 114: 10834-10843.
3. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *Journal of the American Chemical Society*. 1998; 120: 6024-6036.
4. Zhao W, Gu J, Zhang L, Chen H, Shi J. Fabrication of Uniform Magnetic Nanocomposite Spheres with a Magnetic Core/Mesoporous Silica Shell Structure. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127: 8916-8917.
5. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. 1998; 279: 548-552.
6. Wang X, Lin KSK, Chan JCC, Cheng S. Direct Synthesis and Catalytic Applications of Ordered Large Pore Aminopropyl-Functionalized SBA-15 Mesoporous Materials. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005; 109: 1763-1769.
7. Quintella SA, Saboya RMA, Salmin DC, Novaes DS, Araújo AS, Albuquerque MCG, Cavalcante Jr CL. Transesterification of soybean oil using ethanol and mesoporous silica catalyst. *Renewable Energy*. 2012; 38:136-140.

8. Guan M, Liu W, Shao Y, Huang H, Zhang H. Preparation, characterization and adsorption properties studies of 3-(methacryloyloxy)propyltrimethoxysilane modified and polymerized sol-gel mesoporous SBA-15 silica molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009; 123: 193-201.
9. Katiyar A, Yadav S, Smirniotis PG, Pinto NG. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1122: 13-20.
10. Salis A, Bhattacharyya MS, Monduzzi M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010; 114:7996-8001.
11. Lin VS, Lai CY, Huang J, Song SA, Xu S. Molecular recognition inside of multifunctionalized mesoporous silicas: toward selective fluorescence detection of dopamine and glucosamine. *Journal of the American Chemical Society*. 2001; 123:11510-11511.
12. Li Y, Zhou G, Li C, Qin D, Qiao W, Chu B. Adsorption and catalytic activity of Porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009; 341: 79-85.
13. Fagundes LB, Sousa TGF, Sousa A, Silva VV, Sousa EMB. SBA-15-collagen hybrid material for drug delivery applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2006; 352:3496-3501.
14. Sousa A, Maria D, Sousa R, Sousa E. Synthesis and characterization of mesoporous silica/poly(N-isopropylacrylamide) functional hybrid useful for drug delivery. *Journal of Materials Science*. 2010; 45: 1478-1486.
15. Zhao J, Gao F, Fu Y, Jin W, Yang P, Zhao D. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography. *Chemical Communications*. 2002: 752-753.
16. Yasmin T, Müller K. Synthesis and characterization of surface modified SBA-15 silica materials and their application in chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 6464-6475.
17. Liu X, Li L, Du Y, Guo Z, Ong TT, Chen Y, Ng SC. Yang Y. Synthesis of large pore-diameter SBA-15 mesostructured spherical silica and its application in ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216: 7767-7773.
18. Mesa M, Sierra L, Guth JL. Contribution to the study of the formation mechanism of mesoporous SBA-15 and SBA-16 type silica particles in aqueous acid solutions. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008; 112: 338-350.
19. Flodström K, Teixeira CV, Amenitsch H, Alfredsson V, Lindén M. In Situ Synchrotron Small-Angle X-ray Scattering/X-ray Diffraction Study of the Formation of SBA-15 Mesoporous Silica. *Langmuir*. 2004; 20: 4885-4891.

20. Flodström K, Wennerström H, Alfredsson V. Mechanism of Mesoporous Silica Formation. A Time-Resolved NMR and TEM Study of Silica-Block Copolymer Aggregation. *Langmuir*. 2004; 20: 680-688.
21. Flodström K, Wennerström H, Teixeira CV, Amenitsch H, Lindén M, Alfredsson V. Time-Resolved in Situ Studies of the Formation of Cubic Mesoporous Silica Formed with Triblock Copolymers. *Langmuir*. 2004; 20: 10311-10316.
22. Yu C, Fan J, Tian B, Zhao D. Morphology Development of Mesoporous Materials: a Colloidal Phase Separation Mechanism. *Chemistry of Materials*. 2004; 16: 889-898.
23. Rivera-Muñoz EM, Huirache-Acuña R. Sol Gel-Derived SBA-16 Mesoporous Material. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11: 3069-3086.
24. Jermy BR, Kim S-Y, Bineesh KV, Selvaraj M, Park D-W. Easy route for the synthesis of Fe-SBA-16 at weak acidity and its catalytic activity in the oxidation of cyclohexene. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009; 121: 103-113.
25. Zhu Y, Dong Y, Zhao L, Yuan F. Preparation and characterization of Mesoporous VOx/SBA-16 and their application for the direct catalytic hydroxylation of benzene to phenol. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2010; 315: 205-212.
26. Sun H, Tang Q, Du Y, Liu X, Chen Y, Yang Y. Mesoporous SBA-16 with excellent hydrothermal, thermal and mechanical stabilities: Modified synthesis and its catalytic application. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009; 333: 317-323.
27. Knöfel C, Descarpentries J, Benzaouia A, Zeleňák V, Mornet S, Llewellyn PL, Hornebecq V. Functionalised micro-/mesoporous silica for the adsorption of carbon dioxide. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2007; 99: 79-85.
28. Lee B, Ma Z, Zhang Z, Park C, Dai S. Influences of synthesis conditions and mesoporous structures on the gold nanoparticles supported on mesoporous silica hosts. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009; 122:160-167.
29. Shi K, Peng L-M, Chen Q, Wang R, Zhou W. Porous crystalline iron oxide thin films templated by mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005; 83: 219-224.
30. Guo W, Zhao GXS. Well-ordered cubic mesoporous carbon with Im3m symmetry. In: Abdelhamid Sayari and Mietek J, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 156: Elsevier; 2005. p. 551-556.
31. Fan J, Yu C, Gao F, Lei J, Tian B, Wang L, Luo Q, Tu B, Zhou W, Zhao D. Cubic Mesoporous Silica with Large Controllable Entrance Sizes and Advanced Adsorption Properties. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003; 42: 3146-3150.
32. Van Der Voort P, Ravikovitch PI, De Jong KP, Benjelloun M, Van Bavel E, Janssen AH, Neimark AV, Weckhuysen BM, Vansant EF. A New Templated Ordered Structure with Combined Micro- and Mesopores and Internal Silica Nanocapsules. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002; 106: 5873-5877.

33. Kim T-W, Ryoo R, Gierszal KP, Jaroniec M, Solovyov LA, Sakamoto Y, Terasaki O. Characterization of mesoporous carbons synthesized with SBA-16 silica template. *Journal of Materials Chemistry*. 2005; 15: 1560-1571.
34. Li B, Li F, Bai S, Wang Z, Sun L, Yang Q, Li C. Oxygen evolution from water oxidation on molecular catalysts confined in the nanocages of mesoporous silicas. *Energy & Environmental Science*. 2012; 5: 8229-8233.
35. Jin L, He D, Li Z, Wei M. Protein adsorption on gold nanoparticles supported by a layered double hydroxide. *Materials Letters*. 2012; 77: 67-70.
36. Bellezza F, Alberani A, Posati T, Tarpani L, Latterini L, Cipiciani A. Protein interactions with nanosized hydrotalcites of different composition. *J Inorg Biochem*. 2012; 106: 134-142.
37. Ralla K, Sohling U, Suck K, Sander F, Kasper C, Ruf F, Scheper T. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 87: 217-225.
38. Kim J, Desch RJ, Thiel SW, Gulians VV, Pinto NG. Adsorption of biomolecules on mesostructured cellular foam silica: Effect of acid concentration and aging time in synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2012; 149: 60-68.
39. Zhang H, Sun J, Ma D, Weinberg G, Su DS, Bao X. Engineered Complex Emulsion System: Toward Modulating the Pore Length and Morphological Architecture of Mesoporous Silicas. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006; 110: 25908-25915.
40. Esparza JM, Ojeda ML, Campero A, Domínguez A, Kornhauser I, Rojas F, Vidales AM, López RH, Zgrablich G. N₂ sorption scanning behavior of SBA-15 porous substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2004; 241: 35-45.
41. Kleitz F, Czuryzkiewicz T, Solovyov LA, Lindén M. X-ray Structural Modeling and Gas Adsorption Analysis of Cagelike SBA-16 Silica Mesophases Prepared in a F127/Butanol/H₂O System. *Chemistry of Materials*. 2006; 18: 5070-5079.
42. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938; 60: 309-319.
43. Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K. *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*. San Diego, California: Academic Press; 1999. 467 p.
44. Olivier J. Modeling physical adsorption on porous and nonporous solids using density functional theory. *Journal of Porous Materials*. 1995; 2: 9-17.
45. Dhar GM, Kumaran GM, Kumar M, Rawat KS, Sharma LD, Raju BD, K. Rao SR. Physico-chemical characterization and catalysis on SBA-15 supported molybdenum hydrotreating catalysts. *Catalysis Today*. 2005; 99: 309-314.
46. Muthu Kumaran G, Garg S, Soni K, Kumar M, Sharma LD, Murali Dhar G, Rama Rao KS. Effect of Al-SBA-15 support on catalytic functionalities of hydrotreating catalysts: I. Effect

of variation of Si/Al ratio on catalytic functionalities. *Applied Catalysis A: General*. 2006; 305: 123-129.

47. Mesa M, Sierra L, Patarin J, Guth J-L. Morphology and porosity characteristics control of SBA-16 mesoporous silica. Effect of the triblock surfactant Pluronic F127 degradation during the synthesis. *Solid State Sciences*. 2005; 7: 990-997.

48. Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*. 1985; 57: 603-619.

49. Ravikovitch PI, Neimark AV. Density functional theory of adsorption in spherical cavities and pore size characterization of templated nanoporous silicas with cubic and three-dimensional hexagonal structures. *Langmuir*. 2002; 18: 1550-1560.

50. Zhang H, Sun J, Ma D, Bao X, Klein-Hoffmann A, Weinberg G, Su D, Schlögl R. Unusual Mesoporous SBA-15 with Parallel Channels Running along the Short Axis. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(24):7440-1.

51. Sun J, Zhang H, Ma D, Chen Y, Bao X, Klein-Hoffmann A, Pfander N, Su DS. Alkanes-assisted low temperature formation of highly ordered SBA-15 with large cylindrical mesopores. *Chemical Communications*. 2005; 0: 5343-5345.

52. Lee J-W, Tra PT, Kim S-I, Roh S-H. Adsorption Properties of Proteins on SBA-15 Nanoparticles Functionalized with Aminosilanes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008; 8: 5152-5157.

53. Tanford C, Buzzell JG, Rands DG, Swanson SA. The Reversible Expansion of Bovine Serum Albumin in Acid Solutions I. *Journal of the American Chemical Society*. 1955; 77: 6421-6428.

54. Gao D, Lin DQ, Yao SJ. Mechanistic analysis on the effects of salt concentration and pH on protein adsorption onto a mixed-mode adsorbent with cation ligand. *Journal of Chromatography B*. 859. Netherlands: Elsevier; 2007. p. 16-23.

55. Carter DC, Ho JX. Structure of Serum Albumin. In: C.B. Anfinsen JTEFMRaDSE, editor. *Advances in Protein Chemistry*. Volume 45: Academic Press; 1994. p. 153-203.

56. Katiyar A, Ji L, Smirniotis P, Pinto NG. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1069: 119-126.

57. Hartono SB, Qiao SZ, Liu J, Jack K, Ladewig BP, Hao Z, Lu GQM. Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Cellulase Immobilization. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010; 114: 8353-8362.

58. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108: 7323-7330.

59. Nguyen TPB, Lee J-W, Shim WG, Moon H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008; 110: 560-569.
60. Katiyar A, Ji L, Smirniotis PG, Pinto NG. Adsorption of Bovine Serum Albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005; 80: 311-320.
61. Diao X, Wang Y, Zhao J, Zhu S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2010; 18: 493-499.

Capítulo 4

ADSORÇÃO DE BIOMOLECULAS EM SILICA MESOPOROSA SBA-15: EFEITO DO COMPRIMENTO DO PORO E DA DIMENSÃO MOLECULAR

Sandra M. L. Santos¹; Juan A. Cecilia²; Enrique Vilarrasa-Garcia²; Ivanildo J. Silva Junior¹,
Enrique Rodríguez-Castellón²; Diana C. S. Azevedo¹

¹Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, S/N – Bloco 710 – CEP: 60455-760 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: (55-85) 3366-9611, Ramal 206.

²Departamento de Química Inorgánica, Cristalografía y Mineralogía, Facultad de Ciencias – Universidad de Málaga – 29071 – Málaga – Spain. Email: diana@gpsa.ufc.br.

ABSTRACT

Mesoporous silicas (SBA-15) with different pore sizes and channel lengths were synthesized by hydrothermal route and then calcined to 550 °C in order to evaluate the adsorption capacity of three biomolecules (Bovine Serum Albumin – BSA, Lysozyme – LYS and Cellulase – CEL). The pore volume was increased with the use of 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) as swelling agent. The pore length was modified by the addition of heptane and/or ammonium fluoride (NH₄F). The adsorbents, identified as SBA-15 (S), SBA-15 (S1) (TMB), SBA-15 (S2) (TMB and NH₄F) and SBA-15 (S3) (NH₄F and heptane) were characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR), transmission electron microscopy (TEM) and N₂ adsorption/desorption isotherms at 77 K. Adsorption behavior of BSA, LYS and CEL onto SBA-15 was investigated using the batch experiments at 25°C. S2 and S3 showed the highest adsorption capacity for all biomolecules. These results can be explained by the larger pore diameter of the adsorbents, which facilitates the access to these biomolecules within these pores. All cellulase adsorption isotherms showed a linear behavior and Henry's Law fits well

the experimental data. The maximum adsorption capacity of cellulase in S2 was approximately 250 mg/g for a liquid-phase concentration of 6 mg/mL. BSA and LYS adsorption isotherms were well fitted by the Langmuir model and the maximum adsorption capacities were 580 and 786 mg/g, respectively.

Keywords: SBA-15. Swelling agent. Adsorption. Biomolecules.

RESUMO

Sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 com diferentes tamanhos de poros e comprimento dos canais foram sintetizadas por via hidrotérmica e, em seguida, calcinadas a 550 °C. A capacidade de adsorção de biomoléculas (albumina de soro bovino - BSA, lisozima - LYS e celulase - CEL) nestes materiais foi estudada. O volume de poro foi aumentado com a utilização de 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) como agente expensor de poros. O comprimento do poro foi modificado pela adição de heptano e/ou de fluoreto de amônio (NH₄F). Os adsorventes identificados como SBA-15 (S), SBA-15 (S1) (TMB), SBA-15 (S2), (TMB e NH₄F) e SBA-15 (S3) (TMB, NH₄F e heptano) foram caracterizados por difração de raios-X de baixo ângulo (XRD), espectroscopia ao infravermelho (IR), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e isotermas de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K. O comportamento da adsorção de BSA, LYS e CEL, em SBA-15 foi investigado utilizando ensaios em tanque agitado a 25 °C. S2 e S3 apresentaram boa capacidade de adsorção para todas as biomoléculas. Estes resultados podem ser explicados pelo maior diâmetro de poro do adsorvente, o que facilita o acesso a essas biomoléculas dentro desses poros. Todas as isotermas de adsorção de celulase apresentaram um comportamento linear e o modelo de Henry se ajustou bem aos dados experimentais. A capacidade máxima de adsorção da celulase em S2 foi de aproximadamente 250 mg/g para uma concentração em fase líquida de 6 mg/mL. As isotermas de adsorção de BSA e LYS foram bem ajustadas pelo modelo de Langmuir e a capacidade máxima de adsorção foi de 580 e 786 mg/g, respectivamente.

Palavras-chave: SBA-15. Agente expensor de poros. Adsorção. Biomoléculas.

1 INTRODUÇÃO

Desde os avanços causados pelos materiais da família M41S (MCM-41, MCM-48 e MCM-50) reportados por investigadores da Mobil em 1992 (1), sílicas mesoporosas ordenadas têm atraído um interesse científico extraordinário em diversos campos. Suas excelentes características estruturais incluem área superficial específica elevada, bem como diâmetro dos poros extremamente uniforme na faixa nanométrica, que pode ser adequado para uma gama bastante ampla de aplicações. No entanto, os materiais M41S estão limitados a um tamanho máximo de poro de cerca de 8 nm (2). Por outro lado, um grupo da Universidade da Califórnia sintetizou outros materiais mesoporosos denotados como Santa Barbara Amorfo (SBA) (3) a partir de copolímeros tribloco como agente direcionador em condições altamente ácidas. SBA-15 são materiais que apresentam estruturas de sílica com diâmetro de poros cilíndricos uniformes e arranjo hexagonal. Estes materiais apresentam uma elevada área superficial, semelhante a outras sílicas mesoestruturadas hexagonais tais como MCM-41. No entanto, a SBA-15 pode apresentar um tamanho de poro mais largo, entre 5 nm e 30 nm, bem como uma espessura de parede mais elevada, em comparação com MCM-41, sendo superior a esta em resistência térmica, mecânica e química.

O tamanho de poro da SBA-15 pode ser ajustado através do emprego de diferentes agentes expansores de poros, que são incorporados às micelas surfactantes. Este é o primeiro passo da síntese de tais materiais, com a penetração do agente expansor no núcleo hidrofóbico das micelas do surfactante, aumentando a dimensão dos poros da SBA-15 obtida. Neste sentido, benzeno e compostos aromáticos tri-substituídos como 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), 1,3,5-trietilbenzeno (TEB) ou 1,3,5-triisopropilbenzeno (TiPb) (4, 5), alcanos (6), aminas (7) ou uma mistura de diferentes agentes expansores (8) têm sido reportados com o intuito de alterar o tamanho do poro com sucesso.

A estrutura da SBA-15 normalmente apresenta canais de poros paralelos e longos. Isto provoca difusão molecular restrita através dos extensos canais e bloqueio de poros eventualmente ocorre ao longo dos canais, sendo estas as principais preocupações quanto ao uso da SBA-15 em adsorção e catálise de moléculas volumosas. Neste sentido, recentes avanços têm sido relatados para a síntese de SBA-15 mesoporosa com mesocanais mais curtos, na faixa de comprimento de sub-mícrons, levando à formação de mesoestruturas de SBA-15 em forma de fibras (9), esferas (10), “nanorods” (11) e as plaquetas finas (12). Estas estruturas foram conseguidas ao adicionar co-agentes tensoativos, co-solventes, eletrólitos e organossilanos à

solução de síntese. Da mesma forma, SBA-15 com morfologia cubóide ou flocos e mesocanais na escala de sub-mícrons também foram obtidas por adição de aditivos fluorados tais como fluoreto de amônia (NH_4F) à solução durante a síntese convencional de SBA-15 e alcanos de cadeia longa, tais como heptano, octano e decano como co-solvente (12, 13). Sugeriu-se que os co-solventes e agentes tensoativos de fluorocarbono envolvem as partículas de sílica mesoporosas e, assim, limitam a agregação e alongamento dos mesocanais.

A SBA-15 foi testada com sucesso em uma variedade de aplicações tais como catálise (14), separação (15), detecção química (16) e sistemas de liberação controlada de medicamentos (17). Também tem sido utilizada na adsorção/imobilização de biomoléculas, tais como BSA (18), lisozima (19), mioglobina (20), lipase (21), celulase (22), citocromo C e xilanase (23).

As enzimas ou proteínas podem ser imobilizadas em matrizes sólidas por reticulação, ligação covalente, aprisionamento e adsorção física. Este último método é o mais adequado para fins de separação/recuperação, uma vez que normalmente não afeta a natureza da enzima/proteína e é um procedimento experimental relativamente simples (24, 25). Quando a adsorção física é usada, os grupos NH_2 e $\text{C} = \text{O}$ das proteínas geralmente interagem com os grupos silanóis do suporte de sílica. No entanto, esta interação deve ser ajustável para ser irreversível (nos casos de imobilização) ou reversível para permitir a lixiviação e a recuperação da proteína sob diferentes valores de pH e força iônica. Neste sentido, diversos estudos demonstraram o efeito do pH e da força iônica na capacidade de adsorção de diversos tipos de adsorventes (26, 27). Normalmente, a capacidade máxima de adsorção ocorre perto do ponto isoelétrico (pI) das biomoléculas (28-30).

A adsorção física de proteínas pode ser aumentada se o diâmetro dos poros do suporte mesoporoso estiver próximo do tamanho da proteína (21). Não só o diâmetro dos poros, mas também o ordenamento dos poros pode interferir na adsorção de biomoléculas. Isto foi recentemente demonstrado por Santos et al. (27). Estes autores usaram SBA-15 (sintetizado por vias hidrotérmica e sol-gel) e SBA-16 (preparada pelo método hidrotérmico) na adsorção de albumina de soro bovino (BSA), lisozima (LYS) e celulase (CEL). A SBA-15 sintetizada hidrotérmicamente apresentou propriedades texturais superiores (tamanho dos poros e do volume específico de poros) e mostrou a maior capacidade de adsorção tanto para a BSA (317 mg/g) quanto para LYS (636 mg/g), mesmo com o arranjo hexagonal de poros mal ordenado. Por outro lado, a SBA-15 sintetizada pelo método sol-gel mostrou uma maior capacidade de

adsorção de celulase (957 mg/g) em comparação com os outros materiais. Este adsorvente não só foi o material com melhor arranjo mesoscópico de poro, mas também exibiu uma distribuição de tamanho de poro mais estreita em comparação com os outros adsorventes, o que sugere que a celulase parece ser mais densamente empacotada em SBA-15 com canais ordenados e longos e tamanho de poro suficientemente largo. Em relação à SBA-16, as capacidades de adsorção mais baixas eram esperadas para todas as biomoléculas estudadas, devido à natureza da sua própria estrutura, uma vez que apresenta uma estrutura cúbica de face centrada ligada por poros estreitos.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi a síntese de sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 variando o tamanho de poros e o comprimento de seus canais. O tamanho do poro foi aumentado usando TMB como agente de inchamento e o comprimento do poro foi modificado pela adição de heptano e NH_4F . Estes materiais foram caracterizados por difração de raios-X a baixo ângulo (XRD), espectroscopia de infravermelho (IR), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e isoterma de adsorção/dessorção de N_2 a 77 K. Os ensaios de adsorção com a BSA, LYS e CEL foram realizados em sistema descontínuo para avaliar a capacidade de adsorção destes materiais.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para preparar a SBA-15 foram o copolímero tribloco Plurônico P123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀ \approx PM 5800) (Aldrich, EUA), tetraetoxisilano (TEOS 98%) (Aldrich, EUA) e ácido clorídrico (HCl a 37%) (VWR, EUA). A fim de aumentar o volume do poro foi utilizado 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) (Aldrich, EUA). O comprimento do poro foi modificado com NH_4F (Vetec, Brasil) e heptano (99,9%) (Aldrich, EUA). As biomoléculas empregadas nos ensaios de adsorção em tanque agitado foram BSA (INLAB, Brasil), LYS (Aldrich, EUA) e CEL de *Aspergillus niger* (Aldrich, EUA). Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional. Os gases utilizados foram He (Ar Líquido, 99,999%, França) e N_2 (Ar Líquido 99,9999%, França).

2.2 Síntese de suportes mesoestruturados

2.2.1 Síntese de SBA-15 com diâmetro de poro médio e canais longos

A SBA-15 com diâmetro de poro médio ($3 \leq D_p \leq 8$ nm) e com uma morfologia de partícula convencional foi preparada através do ajuste da temperatura do tratamento hidrotérmico, tal como descrito por Fulvio et al. (31). P123 foi dissolvido em 1,7 M HCl (aq.) a 313 K e depois TEOS foi adicionado gota a gota. A composição molar final do gel de síntese foi 1 P123 : 55 SiO₂ : 350 HCl : 11100 H₂O. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h e, em seguida, transferida para uma autoclave revestida de Teflon, onde foi tratada hidrotermicamente a 393K durante 72 h. Os sólidos resultantes foram então filtrados, lavados com água destilada e secos a 333 K por uma noite antes de serem calcinados. Este material foi referido como S.

2.2.2 Síntese de SBA-15 com poro largo e canais longos

SBA-15 com poro largo ($D_p > 8$ nm) e canal longo foi sintetizada por modificação da síntese hidrotérmica descrita por Fulvio et al. (31). P123 foi dissolvido em 1,7 M HCl (aq.) a 313 K, e, em seguida, adicionou-se TMB como agente para aumentar o tamanho dos poros e manteve-se a solução sob agitação até tornar-se transparente. Após 30 min, TEOS foi adicionado gota a gota. A razão molar final no gel de síntese foi 1 P123 : 55 SiO₂ : 48 TMB : 350 HCl : 11100 H₂O. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h e, em seguida, transferida para uma autoclave revestida de Teflon, onde foi tratada hidrotermicamente a 393K durante 72 h. O sólido resultante foi então filtrado, lavado com água destilada e seco a 333 K por uma noite antes de serem calcinados. Este material foi referido como S1.

2.2.3 Síntese SBA-15 com poros largos e canais curtos

SBA-15 com poros largos e comprimento curto dos canais foi preparada de acordo com o método de emulsão água-alciano proposto por Zhang et al. (13). Alguns investigadores têm sugerido que o fluoreto de amônio atua como um catalisador de hidrólise do precursor de silício (10, 32). Numa primeira síntese, P123 e NH₄F foram dissolvidos em 1,7 M de HCl (aq.) a 313K, e em seguida, adicionou-se TMB como agente de inchamento à solução transparente

para aumentar o tamanho dos poros. Após 30 min, TEOS foi adicionado gota a gota. As razões molares finais no gel de síntese foram 1 P123 : 55 SiO₂ : 48 TMB : 350 HCl : 1,8 NH₄F : 11100 H₂O. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h e, em seguida, foi tratada hidrotermicamente a 393K durante 72 h. Os sólidos foram, em seguida, filtrados, lavados com água destilada e secos a 333 K por uma noite antes de serem calcinados. Este material foi referido como S2.

Numa segunda síntese, P123 e NH₄F foram dissolvidos em 1,7 M de HCl (aq.) a 313K. Por sua vez, TEOS foi pré-misturado com heptano, adicionado gota a gota à solução transparente e agitado durante 24 h à mesma temperatura. As razões molares finais no gel de síntese foram 1 P123 : 55 SiO₂ : 350 HCl : 1,8 NH₄F : 235 heptano : 11100 H₂O. A suspensão branca resultante foi então transferida para uma autoclave onde foi tratada hidrotermicamente a 373 K durante 72 h. O sólido foi finalmente filtrado, lavado com água destilada e seco a 333 K por uma noite, antes de serem calcinados. Este material foi referido como S3.

Todos os materiais foram calcinados a 823 K, com uma taxa de aquecimento de 1 K por minuto, durante 6 h. A Tabela 4.1 resume os quatro materiais sintetizados.

Tabela 4. 1 – Sumário das silicas mesoporosas sintetizadas.

Código da amostra	Composição molar do gel de síntese	Características desejadas*
S	1P123:55SiO ₂ :350HCl:11100H ₂ O	Poros médio Canal longo 
S1	1P123:55SiO ₂ :48TMB:350HCl:11100H ₂ O	Poros largo Canal longo 
S2	1P123:55SiO ₂ :48TMB:350HCl:1,8NH ₄ F:11100H ₂ O	Poros largo Canal curto 
S3	1P123:55 SiO ₂ :350 HCl:1,8NH ₄ F:235heptano:11100H ₂ O	Poros largo Canal curto 

*Poros médio: $3 \leq D_p \leq 8$ nm; Poros largo: $D_p > 8$ nm; Canais longos: $L > 1$ μ m; Canais curtos: $L \leq 1$ μ m.

2.3 Técnicas de caracterização

Medidas de adsorção/dessorção de N_2 a 77 K foram realizados utilizando um equipamento de adsorção volumétrica (AUTOSORB-1MP, Quantachrome instruments). A área de superfície específica (S_{BET}) das amostras foi calculada com o método Brunauer, Emmett e Teller (33), utilizando os dados de adsorção na gama de pressões relativas 0,05-0,18 para as amostras SBA-15, onde as condições de linearidade e considerações sobre o método foram cumpridas (34). A distribuição do tamanho dos poros e o volume total de poros foram calculados a partir do ramo de dessorção das isotermas usando a *Nonlocal Density Functional Theory* (NLDFT) (35). O volume total de poros também foi considerado experimentalmente como o volume adsorvido em $p/p_0 = 0,95$. Todas as amostras foram degaseificadas a 473 K a uma pressão de cerca de 2,7 Pa durante 6 h antes da análise.

Difração de raios-X a baixo ângulo (X) foi usada para identificar o ordenamento dos sólidos mesoporosos sintetizados. Estes experimentos foram realizados em um X'Pert Pro MPD difratômetro automatizado equipado com um monocromador primário Ge (1 1 1) (estritamente monocromática radiação Cu-K α) e um detector X'Celerator. As medições foram obtidas para 2θ variando de 1-10 °.

Para investigar as bandas características dos grupos silanóis presentes na superfície de SBA-15 e dos grupamentos amidas presentes na estrutura da celulase, foi utilizada a técnica da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrofotômetro Varian 3100 equipado com uma célula DRIFT. A amostra foi moída em conjunto com KBr (90, p.%) até a obtenção de uma mistura sólida homogênea a qual foi transferida para a célula DRIFT para só então efetuar a leitura.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das amostras de adsorventes foram obtidos usando um microscópio Philips CCCM 200 SuperTwin-DX4. As amostras foram dispersas em etanol e uma gota de suspensão foi colocada sobre uma grelha de cobre (300 mesh).

2.4 Experimentos de adsorção de biomoléculas

Experimentos de adsorção em tanques agitados foram realizados colocando em contato 25 mg de adsorvente (S, S1, S2 e S3) com 5,0 mL de uma solução tampão apropriada contendo a biomolécula e submetidos a agitação em um shaker (Julabo, modelo SW 22). Em cada frasco foi adicionada uma esfera de vidro para aumentar a eficiência da agitação.

Para as medidas de cinética de adsorção, a concentração inicial utilizada foi de 1,0 mg/mL em tampão acetato 50 mmol/L (pH = 4,8) para BSA; 3,0 mg/mL em tampão de bicarbonato de sódio 25 mmol/L (pH = 10,6) para LYS e 3,0 mg/mL em tampão de acetato 50 mmol/L (pH = 4,0) para CEL por um período máximo de 8h. Os pHs das soluções tampão foram os mesmos previamente testados por Santos et al. (27). As amostras foram coletadas a partir da fase líquida em intervalos de tempo pré-determinados e as concentrações de BSA, LYS e CEL foram monitoradas por espectrofotômetro na região do UV-visível utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Os dados de absorvância foram convertidos para concentração, a fim de se obter a variação da concentração adsorvida com o tempo.

Para a medição das isotermas de adsorção, diferentes concentrações iniciais de biomoléculas (BSA 1,0 a 15 mg/mL; LYS 1,0 a 10 mg/mL e CEL 1,0 a 7,0 mg/mL) com pH fixo foram colocadas em contato com quantidades conhecidas de adsorvente por tempo suficiente para assegurar o equilíbrio. Em todas as experiências, após o tempo de contato, alíquotas foram coletadas e centrifugadas, antes de analisar a concentração da biomolécula. A absorvância de cada solução foi medida antes e após o contato com o adsorvente em um espectrofotômetro modelo UV-1800P UV-visível Shimadzu a um comprimento de onda de 280 nm. A partir de uma curva de calibração previamente construída, os valores das absorvâncias foram convertidos à concentração.

A concentração de cada biomolécula adsorvida foi calculada usando um balanço de massa simples, de acordo com a Equação 1:

$$q = \frac{V_{sol}(C_0 - C_{eq})}{m_{ads}} \quad (1)$$

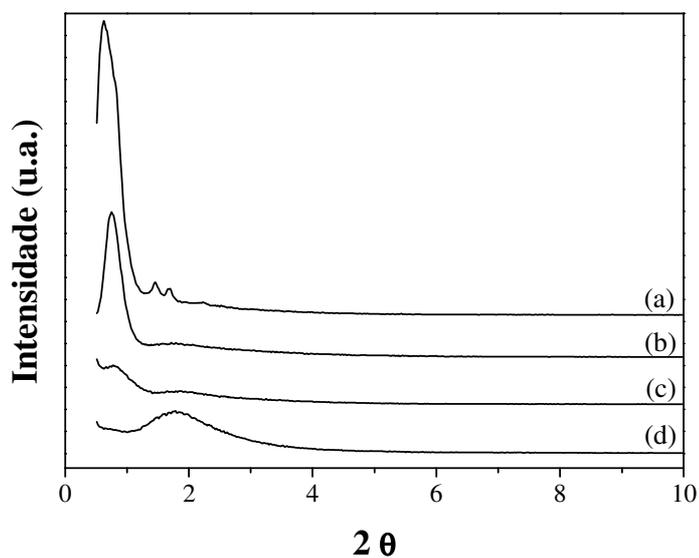
onde q é a quantidade adsorvida por grama de adsorvente (mg/g); V_{sol} representa o volume de solução contendo a biomolécula (tipicamente 5 mL); C_o a concentração inicial da solução adicionada ao frasco (mg/mL); C_{eq} é a concentração no equilíbrio (mg/mL) e m_{ads} é a massa de adsorvente (tipicamente 25 mg).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização

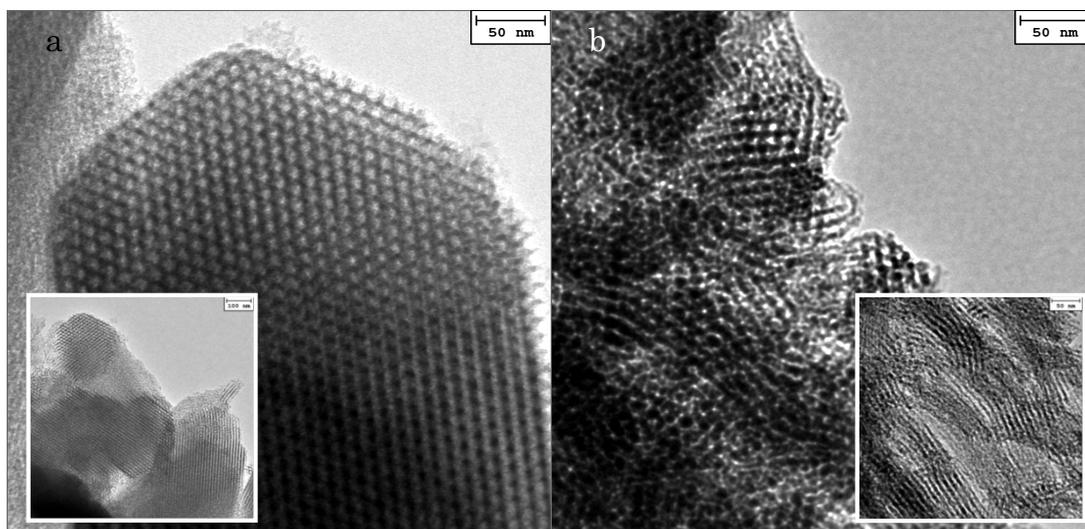
A Figura 4.1 mostra os padrões de difração de raios-X em 2θ entre $0,5^\circ$ e 10° para as quatro sílicas sintetizadas. A SBA-15 (S) mostra um padrão típico de XRD de uma rede ordenada de mesoporos com três picos de reflexões (100), (110) e (200) com uma ordem de longo alcance, caracterizando assim uma estrutura mesoporosa ordenada P6mm com simetria hexagonal (36). No caso do S1, a adição do agente de inchamento durante a síntese provoca a diminuição do pico de difração (100) e leva à ausência dos picos de reflexões (110) e (200), sugerindo que a adição de TMB dá origem a materiais menos ordenados, o que é confirmado por imagens TEM (Figura 4.2). Neste sentido, Nguyen et al. (37) postularam que a expansão do tamanho de poro pode ser explicado pela interação entre TMB e o copolímero tribloco, o que aumenta o volume do molde hidrofóbico produzindo uma perda da ordem de longo alcance. No que diz respeito às amostras sintetizadas com fluoreto S2 e S3, diversos investigadores verificaram que a presença de fluoreto limita o crescimento e a agregação dos mesocanais, conduzindo a materiais com um comprimento menor de poros e uma ordem de longo alcance também menor, o que é indicado pela diminuição drástica do pico de reflexão (100) (38). Isto pode levar à separação dos nós de favo de mel da tradicional SBA-15 para formar um material mesocelular com um tamanho de poro maior, como mostram as imagens TEM (Figura 4.2).

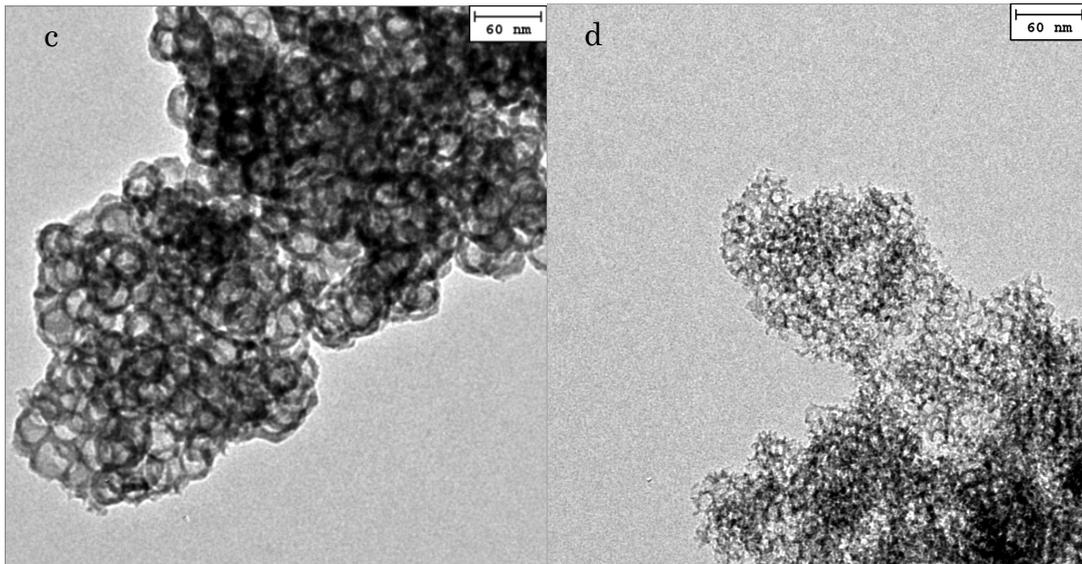
Figura 4. 1– Difratoograma XRD obtido para SBA-15 sintetizada com e sem agente expansor de poros e calcinada a 550 °C. (a) S, (b) S1, (c) S2 e (d) S3.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 4. 2 – Micrografias TEM de SBA-15 (a) S, (b) S1, (c) S2 e (d) S3. As imagens menores em (a) e (b) mostram uma visão transversal dos canais, demonstrando seu comprimento.





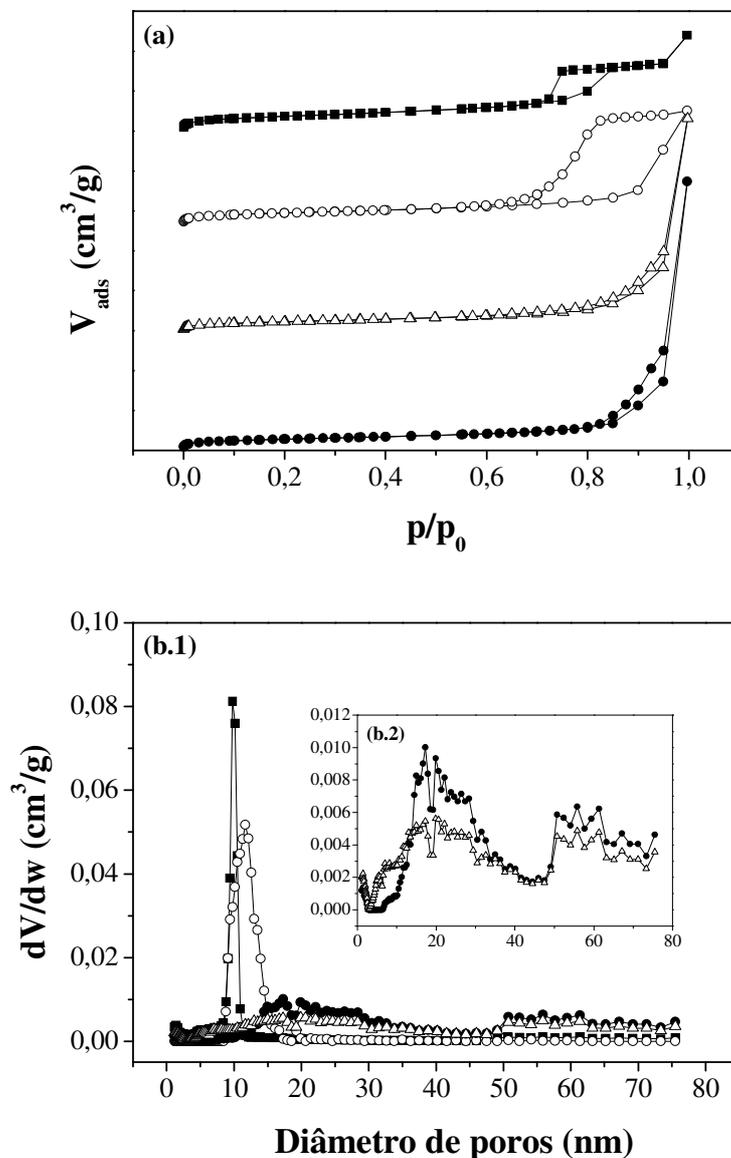
Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 4.3 apresenta as isotermas de adsorção/dessorção de N_2 a 77 K e as propriedades texturais das amostras de SBA-15 sintetizadas estão resumidas na Tabela 4.2. A SBA-15 obtida por via hidrotérmica tradicional (S) apresenta maior área superficial S_{BET} devido à estrutura bem ordenada e aos longos mesocanais dispostos sob a forma de favo de mel (Figura 4.2a). As amostras S e S1 apresentam isotermas de adsorção do tipo IV, de acordo com a classificação IUPAC, com laços de histerese bem caracterizados e indicativos de mesoporos em formato aproximadamente cilíndrico (39). Os ramos de adsorção e dessorção da amostra S foram localizados a pressões relativas na gama 0,7-0,95. Quando TMB é adicionado (S1), a histerese é ligeiramente deslocada para p/p_0 superiores, o que indica um aumento do tamanho dos poros devido à introdução do agente de expansão sobre o núcleo hidrofílico. O aumento do tamanho da micela surfactante modifica o empacotamento do favo de mel típico da SBA-15 hidrotérmica, como foi mostrado no DRX e nas micrografias de TEM (Figuras 4.1 e 4.2), o que conduz a uma estrutura menos definida com uma menor área S_{BET} . A distribuição de tamanho de poros obtida por DFT (Figura 4.3 b.1) para estas duas amostras confirma uma distribuição relativamente estreita de tamanho de poros e a eficácia do TMB como agente expander.

As isotermas das amostras S2 e S3, obtidas mediante adição de fluoreto de amônio, se assemelham a uma isoterma do tipo II, exibindo uma histerese menos definida e localizada a valores de p/p_0 superiores aos das amostras S e S1. Esta histerese menos definida é provavelmente devida ao menor comprimento dos canais observado nas imagens TEM (Figs. 4.2 c e d), que leva os processos de condensação capilar e evaporação a ocorrerem a pressões relativas mais próximas. A distribuição de tamanho de poros destas amostras (Figura 4.3 b.2)

revela uma ampla variedade de tamanhos de poros presentes em valores bastante superiores àqueles obtidos na ausência de fluoreto (S e S1). O aumento do tamanho de poros em uma ampla faixa está relacionado a uma estrutura bem menos definida, como revelado pelo XRD e nas imagens TEM, e conduz a menores valores de S_{BET} . Note que os picos observados na Figura 4.3 (b.2) para tamanhos de poros acima de 50 nm se situam na faixa dos macroporos e provavelmente correspondem aos espaços interparticulares das amostras S2 e S3.

Figura 4. 3 – Isoterma de adsorção/desorção de N_2 a 77 K (a) e distribuição de diâmetro de poros por NLDFT (b) para SBA-15 (■) S, (○) S1, (△) S2 e (●) S3 e calcinada a 550 °C.



Fonte: elaborado pelo autor.

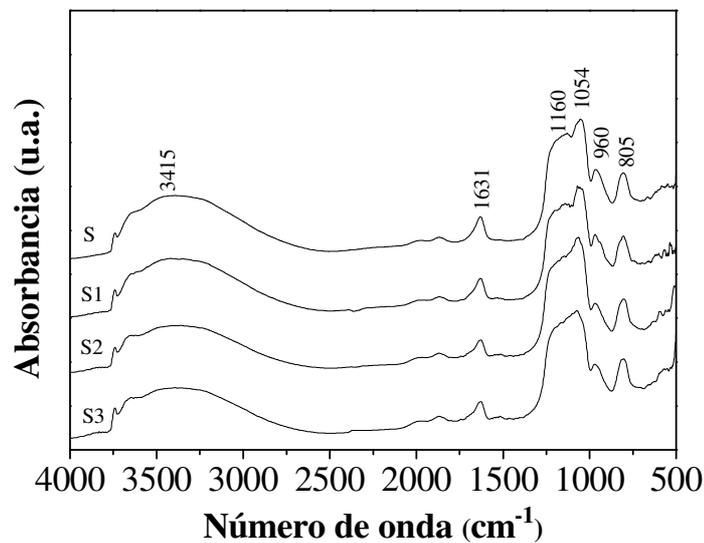
Tabela 4. 2 – Parâmetros estruturais das amostras de SBA-15 sintetizadas.

Amostra	S_{BET} ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	D_p (nm) _{BJH}	V_{TP} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) _{DFT}	V_{TP} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) _{0,95}
S	730	9,8	1,52	1,33
S1	579	11,7	2,13	1,48
S2	503	19,2	2,49	1,26
S3	487	17,3	3,12	1,33

S = SBA-15; S1 = SBA-15/TMB; S2 = SBA-15/TMB_NH₄F e S3 = SBA-15/NH₄F_heptano.

A fim de verificar as ligações químicas presentes na estrutura química das SBA-15 sintetizadas, análises espectroscópicas no infravermelho (FTIR) foram realizadas, cujos resultados são mostrados na Figura 4.4 no intervalo de 4000-400 cm^{-1} . Os espectros de FTIR para as amostras são tipicamente dominados pelo estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si em 1054 cm^{-1} , com um ombro em 1160 cm^{-1} , que mostram a existência de uma rede densa de sílica, em que os átomos de oxigênio desempenham o papel de pontes entre dois átomos de silício. As vibrações de alongamento simétrico ocorrem a 805 cm^{-1} e são atribuídos ao modo de dobragem de Si-O-Si. A banda a 960 cm^{-1} pode ser atribuída ao Si-O em plano e vibrações de estiramento dos grupos silanol Si-OH gerados pela presença dos sítios de defeito (40). A banda de baixa energia a 560 cm^{-1} é atribuída ao alongamento Si-O referente aos defeitos de rede de SiO₂ (41). As bandas no intervalo de 3740-3415 cm^{-1} foram atribuídas à sobreposição das bandas O-H de moléculas de água (H-O-H) e os silanóis de superfície ligados ao hidrogênio molecular da água (SiO-O...H₂O) (42, 43). A banda de vibração com pico em 1631 cm^{-1} foi atribuída a vibrações de alongamento H-O-H (40).

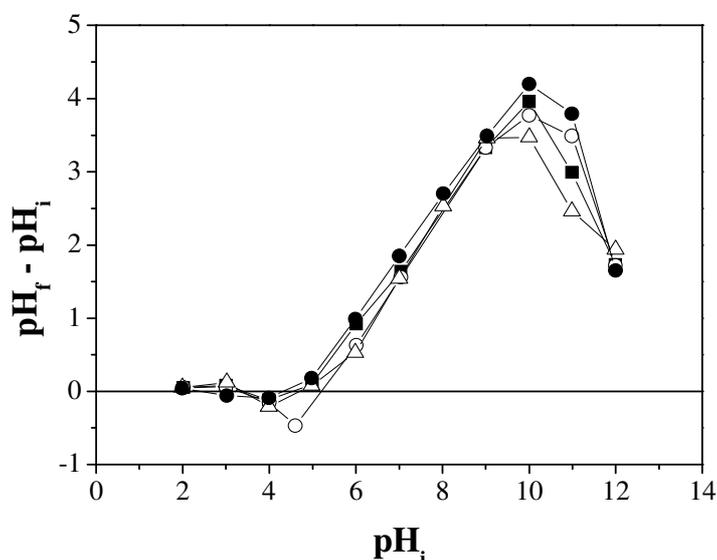
Figura 4.4 - Comparação dos espectros FTIR de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3).



Fonte: elaborado pelo autor.

O ponto de carga zero ou pH_{zpc} é um parâmetro que indica o valor de pH no qual um determinado sólido apresenta carga igual a zero em sua superfície. Este parâmetro é importante porque permite prever a carga na superfície do adsorvente em função do pH. O resultado encontrado para os adsorventes S, S1, S2 e S3 estão apresentados na Figura 4.5. Observa-se que todos os materiais apresentam um comportamento similar, localizando-se o ponto de carga zero em torno de 5,0. Este valor é coerente com o fato das quatro amostras não possuírem heteroátomos na sua estrutura, portanto sua acidez superficial é fraca e eminentemente devida à presença dos grupos silanóis.

Figura 4.5 – Teste de suspensão para determinar o pH do ponto de carga zero dos adsorventes mesoporosos (■) S, (○) S1, (Δ) S2 e (●) S3 pelo método de variação de pH. (-) $pH_f = pH_i$.

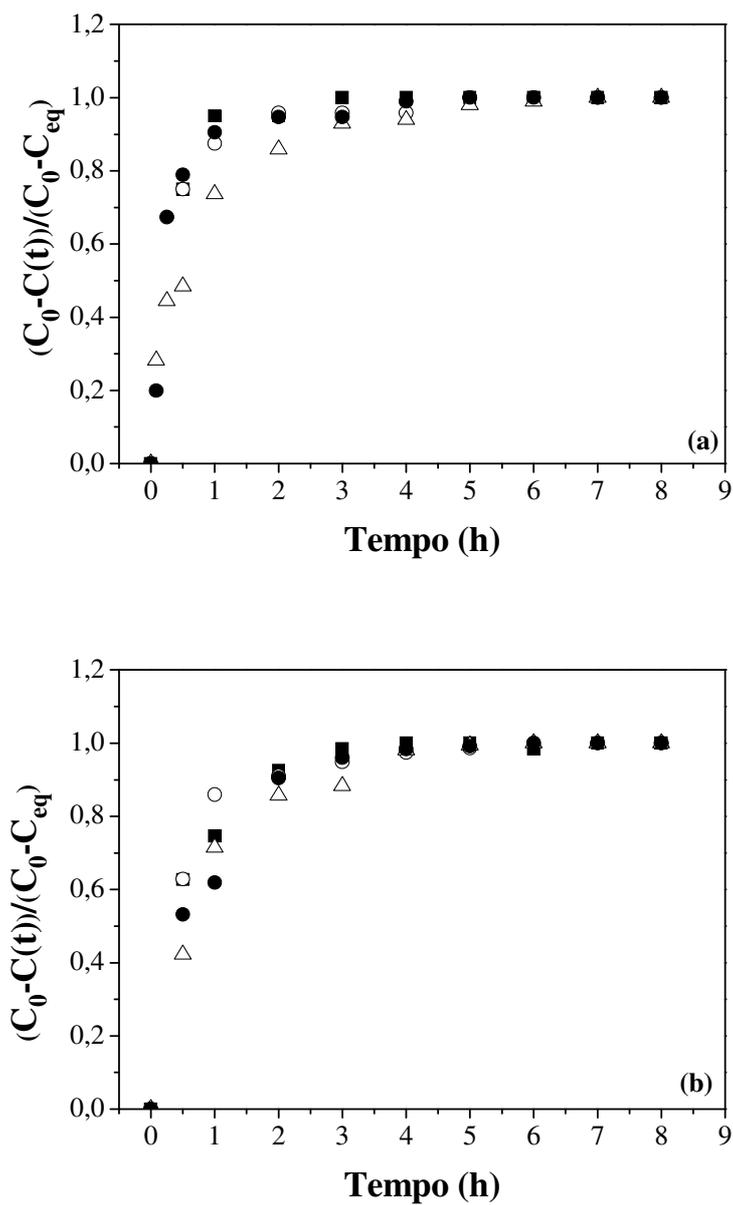


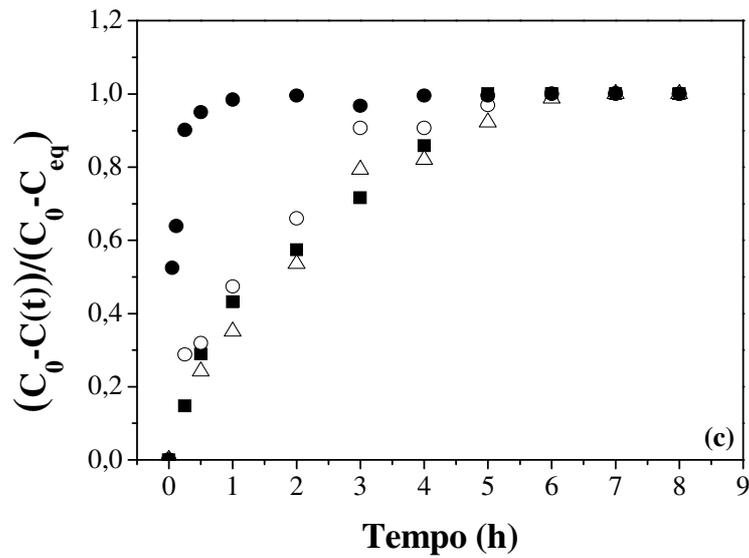
3.2 - Resultados de adsorção em tanques agitados

As curvas de adsorção para CEL, LYS e BSA nas amostras S, S1, S2 e S3 em função do tempo são mostrados na Figura 4.6 em termos da aproximação fracional ao equilíbrio. De acordo com estes resultados, é possível observar que não há diferenças significativas na cinética de adsorção da CEL e LYS nas quatro amostras de SBA-15. Isto provavelmente se deve ao fato destas biomoléculas serem pequenas o suficiente para não sofrerem restrições difusivas em materiais ordenados ou não-ordenados. Por outro lado, no caso da BSA, observa-se uma cinética de adsorção notavelmente mais rápida para a amostra S3. Esta amostra apresenta uma ampla faixa de distribuição de tamanho de poros acima dos 10 nm (ver Fig. 4.3 b2), além dos canais curtos ou dispostos sem ordenamento de longo alcance (ver Fig. 4.2d). Em contrapartida, a amostra S2, apesar de possuir o maior diâmetro médio de poros, exibe um volume significativo de poros com diâmetro entre 3 e 6 nm, o que pode representar restrições à difusão das biomoléculas. De fato, em todas as curvas apresentadas nas Figuras 4.6, esta amostra tende a exibir a cinética mais lenta. Todas as demais amostras, particularmente a S e S1, atingiram o equilíbrio em cerca de 360 minutos (6 horas) para BSA para todos os adsorventes (exceto S2, com tempo de equilíbrio de 60 minutos) e em 240 minutos (4 horas)

para LYS e CEL. Esta informação é útil para o conhecimento do tempo de contato necessário para ser estabelecido o equilíbrio de adsorção.

Figura 4. 6 – Cinética de adsorção de CEL (a), LYS (b) e BSA (c) nos adsorventes (■) S, (○) S1, (Δ) S2 e (●) S3 a 25°C.





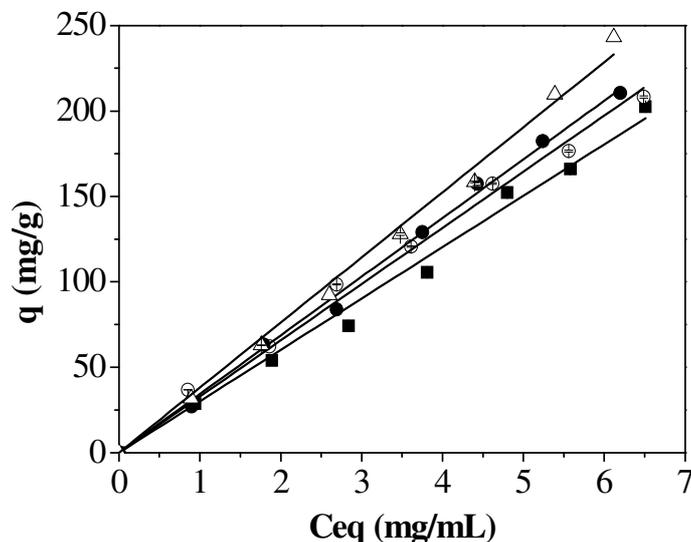
Fonte: elaborado pelo autor.

As isotermas de adsorção de CEL nos adsorventes S, S1, S2 e S3 a pH 4.0 são mostradas na Figura 4.7. A celulase apresentou um comportamento de adsorção linear para todas as SBAs e a lei de Henry se ajustou bem aos dados experimentais (Equação 2):

$$q = k_H \cdot C_{eq} \quad (2)$$

onde k_H é constante de Henry (mL/g), q (mg/g) é a concentração de soluto na fase sólida em equilíbrio com C_{eq} que é a concentração da fase líquida (mg/mL). As constantes de Henry estão resumidas na Tabela 4. 3. De acordo com os resultados, as constantes de Henry (k_H) indicam uma afinidade mais alta de CEL pela amostra S2, em comparação com os outros adsorventes.

Figura 4. 7 – Isoterma de adsorção de celulase nos adsorventes (■) S, (○) S1, (△) S2 e (●) S3. Linhas sólidas representam o modelo de Henry. Condições experimentais: T = 25 °C; tampão acetato 50 mmol/L e pH = 4,0; Tempo de contato: 6 h.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4. 3 – Parâmetros da equação de Henry para adsorção de celulase em sílica mesoporosa.

SBA-15	$k_H \pm SD$ (mL/g)	R^2
S	$30,07 \pm 0,62$	0,9908
S1	$32,89 \pm 0,58$	0,9923
S2	$38,11 \pm 0,62$	0,9942
S3	$34,34 \pm 0,41$	0,9967

S = SBA-15; S1 = SBA-15/TMB; S2 = SBA-15/TMB_NH₄F e S3 = SBA-15/NH₄F_heptano.

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram as isotermas de adsorção de BSA e LYS, respectivamente, para os adsorventes S, S1, S2 e S3. As equações de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) foram utilizadas para descrever os dados de equilíbrio de adsorção obtidos. O modelo de Langmuir, descrito abaixo pela Equação 3, assume que a adsorção ocorre em uma monocamada, uma molécula sendo adsorvida por cada sítio e que os sítios possuem a mesma energia de ligação (superfície homogênea), não havendo interações entre as moléculas vizinhas (interação adsorbato-adsorbato). A equação de Langmuir é descrita como:

$$q = \frac{q_{\max}(k_L C_{eq})}{1 + k_L C_{eq}} \quad (3)$$

onde q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa (mg/g), C_{eq} é a concentração de proteína na fase líquida no equilíbrio de adsorção (mg/mL), k_L é a constante de dissociação de Langmuir (mL/mg) que está relacionado com a energia de adsorção e o q_{\max} é a capacidade máxima de saturação por unidade de peso (mg/g).

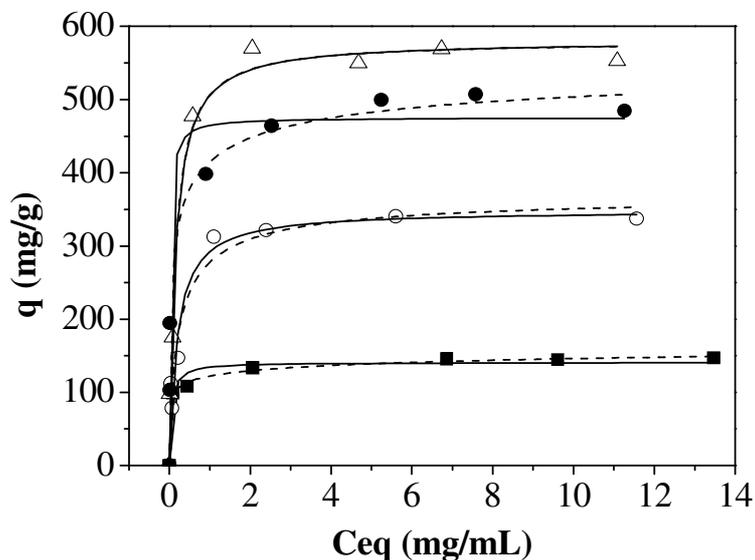
Ao contrário da equação de Langmuir, a equação de Langmuir-Freundlich assume que a superfície do adsorvente é não-homogênea, sendo descrita de acordo com a Equação 4:

$$q = \frac{q_{\max}(k_{LF} C_{eq})^b}{1 + (k_{LF} C_{eq})^b} \quad (4)$$

onde q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa (mg/g), C_{eq} é a concentração de proteína na fase líquida no equilíbrio de adsorção (mg/mL), k_{LF} (mL/mg)^{1/b} é a constante de Langmuir-Freundlich relacionada com a energia de adsorção, b é a constante de heterogeneidade de Langmuir-Freundlich.

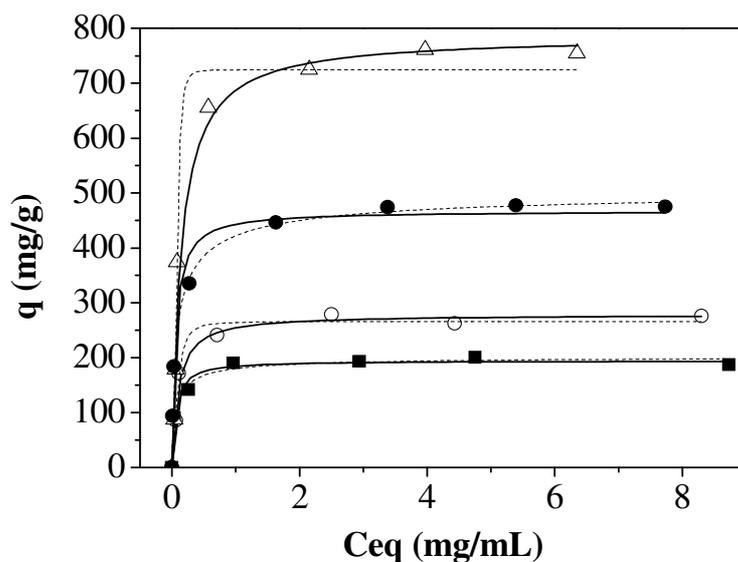
Os parâmetros estimados destes modelos de isotermas são mostrados na Tabela 4.4 e 5.5. A partir destes dados, pode-se observar que o adsorvente S2 apresentou maior capacidade de adsorção tanto para BSA quanto para LYS. Pode ser observado na Tabela 4.4, que embora modelo LF tenha se ajustado bem aos dados experimentais de adsorção de BSA, não tem nenhum valor estatístico confiável, uma vez que os erros são da mesma ordem de grandeza dos parâmetros e em alguns casos superiores.

Figura 4. 8 – Isoterma de adsorção de BSA nos adsorventes (■) S, (○) S1, (Δ) S2 e (●) S3. Linha sólida (—) representa o modelo de Langmuir, linha tracejada (--) representa o modelo de Langmuir-Freundlich. Condições experimentais: T = 25 °C; tampão acetato 50 mmol/L e pH = 4,8; tempo de contato: 24 h).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4. 9 – Isoterma de adsorção de LYS nos adsorventes (■) S, (○) S1, (Δ) S2 e (●) S3. Linhas sólidas (—) representam o modelo de Langmuir, linhas tracejadas (--) representam o modelo de Langmuir-Freundlich. Condições experimentais: T = 25 °C; tampão acetato 50 mmol/L e pH = 4,8; tempo de contato: 24 h).



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4. 4 – Parâmetros das equações de Langmuir e de Langmuir-Freundlich para adsorção de BSA em sílicas mesoporosas.

SBA-15	Modelo	Parâmetros			R ²
		$q_{m\acute{a}x}$ (mg.g ⁻¹)	k_L (mL/mg), k_{LF} (mL/mg) ^{1/b}	b	
S	Langmuir	140,8 ± 5,1	20,5 ± 6,9	-	0,9682
	LF*	237,71 ± 155,00	1,34 ± 10,10	0,18 ± 0,13	0,9947
S1	Langmuir	348,4 ± 19,3	5,2 ± 1,6	-	0,9562
	LF*	372,29 ± 43,94	4,26 ± 2,31	0,74 ± 0,23	0,9499
S2	Langmuir	580,5 ± 18,1	6,8 ± 1,5	-	0,9843
	LF*	579,83 ± 27,18	6,76 ± 1,80	1,01 ± 0,23	0,9780
S3	Langmuir	475,3 ± 19,1	44,0 ± 13,3	-	0,9633
	LF*	573,43 ± 91,55	8,98 ± 10,20	0,44 ± 0,13	0,9755

S = SBA-15; S1 = SBA-15/TMB; S2 = SBA-15/TMB_NH₄F e S3 = SBA-15/NH₄F_heptano. * Langmuir-Freundlich

Tabela 4. 5 – Parâmetros das equações de Langmuir e de Langmuir-Freundlich para adsorção de LYS em sílicas mesoporosas.

SBA-15	Modelo	Parâmetros			R ²
		$q_{m\acute{a}x}$ (mg.g ⁻¹)	k_L (mL/mg), k_{LF} (mL/mg) ^{1/b}	b	
S	Langmuir	195,5 ± 5,7	17,8 ± 3,9	-	0,9826
	LF*	203,71 ± 10,70	16,86 ± 4,45	0,73 ± 0,19	0,9832
S1	Langmuir	278,5 ± 9,1	10,5 ± 1,9	-	0,9827
	LF*	266,12 ± 7,19	11,80 ± 1,03	1,97 ± 0,52	0,9839
S2	Langmuir	786,0 ± 1,9	6,9 ± 1,5	-	0,9728
	LF*	724,71 ± 19,97	12,48 ± 0,83	3,27 ± 0,84	0,9683
S3	Langmuir	467,0 ± 13,6	18,2 ± 3,8	-	0,9837
	LF*	510,75 ± 12,70	11,53 ± 1,67	0,64 ± 0,05	0,9976

S = SBA-15; S1 = SBA-15/TMB; S2 = SBA-15/TMB_NH₄F e S3 = SBA-15/NH₄F_heptano. * Langmuir-Freundlich.

A capacidade máxima de adsorção de BSA em S2 foi de aproximadamente 581 mg/g, enquanto que para S, S1 e S3 foi de 141 mg/g, 348 mg/g e 475 mg/g, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores (ver Tabela 4.6). No caso

de LYS, a capacidade máxima de equilíbrio de adsorção em S2 foi de aproximadamente 785 mg/g, enquanto que para S, S1 e S3 foi de 196 mg/g, 279 mg/g e 465 mg/g respectivamente. Os resultados situam-se na mesma ordem de grandeza dos reportados na literatura (29, 44, 45) para este tipo de material, como se observa na Tabela 4.7. Além disso, as amostras obtidas neste trabalho apresentam uma boa capacidade de adsorção de lisozima em comparação com outros adsorventes, tais como MCM-41 (29, 46), carbonos mesoporosos (47) e MCF (48). Os dados de adsorção sugerem uma correlação estreita entre a dimensão dos poros do adsorvente e a capacidade de adsorção. Neste sentido, S2 apresentou as maiores capacidades de adsorção para todas as biomoléculas estudadas devido ao maior tamanho de poro de 18,1 nm, apesar do baixo ordenamento do adsorvente mesoestruturado. Além disso, a adição das espécies de fluoreto durante a síntese diminuiu o comprimento de poro, aumentando a capacidade de adsorção devido aos canais mais curtos, minimiza um eventual bloqueio dos poros ao longo desses canais por adsorção de moléculas volumosas. A dimensão molecular dessas biomoléculas desempenha um papel importante na adsorção. A celulase é um conjunto de três enzimas (celobiohidrolase, endobeta-1,4-glucanase, e beta-glicosidase ou celobiase) e pode ser encontrado sob uma forma esférica (2,4-7,4 nm de diâmetro) ou forma elipsoidal (1,3 x 7,9 nm a 4,2 x 25,2 nm) (22). Para o caso de BSA e LYS, estas biomoléculas são reportadas como proteínas globulares e as suas dimensões são 4 nm x 4 nm x 14 nm e 3 nm x 3 nm x 4,5 nm, respectivamente (18). Os tamanhos de poro presentes nas amostras S2 e S3 (Figura 4.3 b2) situam-se numa ampla faixa e majoritariamente em valores mais elevados do que as dimensões das biomoléculas modelo estudadas. Além disso, a presença dos canais de comprimento menor, com grandes volumes de espaço interparticular indica que a adsorção das biomoléculas pode estar localizada tanto na superfície do adsorvente quanto no interior da estrutura porosa. No caso de materiais mesoestruturados com um tamanho de poro menor, tais como S e S1, as biomoléculas volumosas provavelmente não tem acesso aos canais em toda a sua extensão, tendo lugar a adsorção principalmente na superfície mais externa do adsorvente diminuindo a capacidade de adsorção, como mostrado na Figura 4.7-4.9 e Tabela 4.3-4.5.

Tabela 4.6 – Comparação entre a quantidade adsorvida de BSA em SBA-15 e suas características texturais reportado neste trabalho e em outros da literatura.

Amostra	Tempo de envelhecimento (h)	Diâmetro de poros (nm)	q_{max} (mg/g)	Referência
SBA-15	72	5,6	141	Este trabalho
	*	9,1	65	(27)
	24	3,5	60	(37)
	*	4,0	< 100	(49)
	*	8,0	< 100	(49)
SBA-15/ NH ₄ F e octano	48	16,7	329	(27)
SBA-15/TMB	72	10,6	348	Este trabalho
	72	14,5	210	(37)
	144	16,7	590	(37)
	*	24,0	> 450	(49)
SBA-15/TMB e NH ₄ F	72	18,1	581	Este trabalho
	30	10,1	51	(18)
	30	13,2	257	(18)
	30	15,4	674	(18)
SBA-15/APTES	144	18,8	300	(37)

*Sintetizado por via sol-gel.

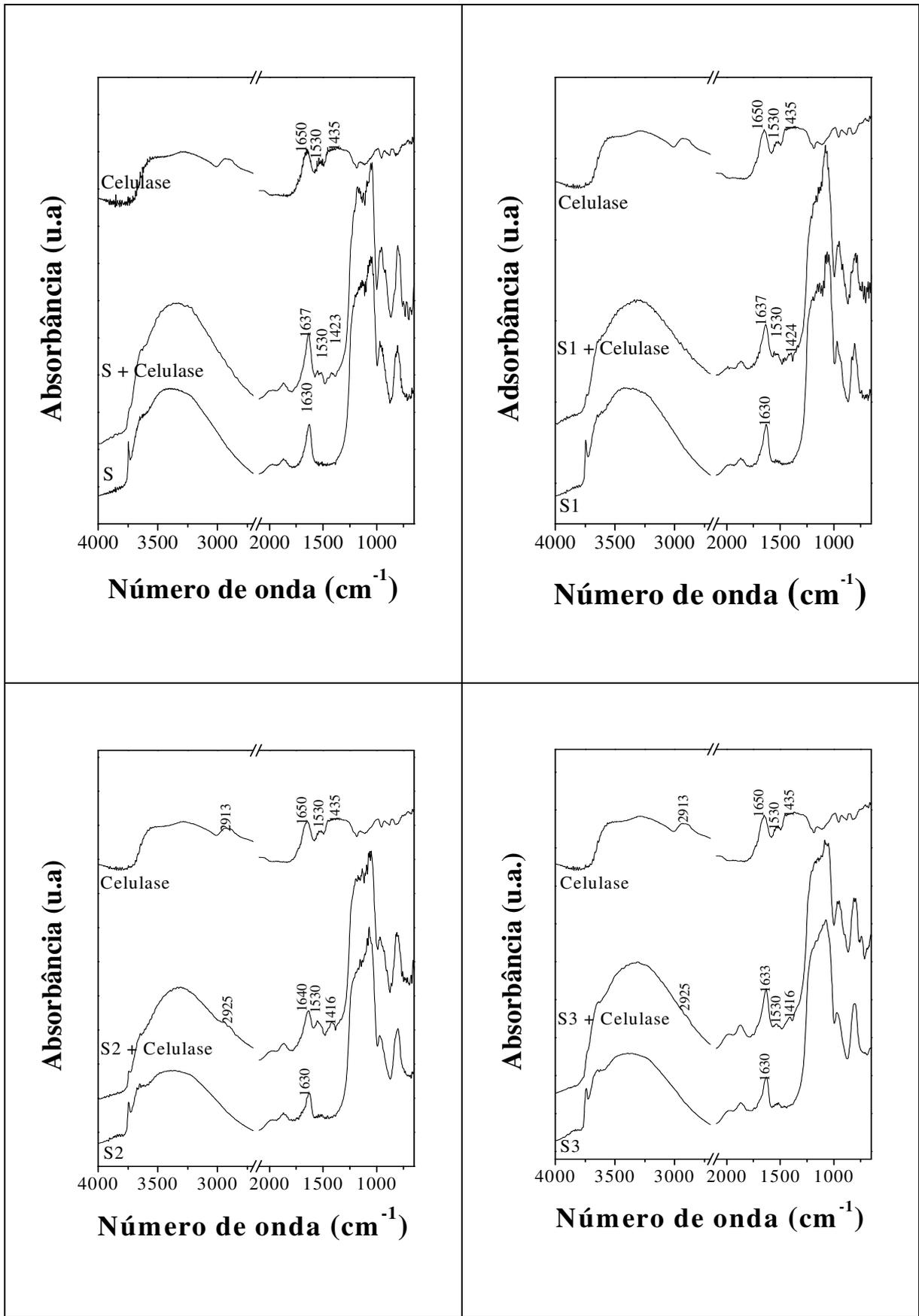
Tabela 4. 7 - Comparação entre a quantidade adsorvida de LYS em SBA-15 e suas características texturais reportado neste trabalho e em outros da literatura.

Amostra	Tempo de envelhecimento (h)	Diâmetro de poros (nm)	q_{max} (mg/g)	Referência
SBA-15	72	5.6	196	Este trabalho
	72	10.6	279	Este trabalho
SBA-15/ TMB	72	8.6	676	(19)
	*	24	> 350	(49)
	72	18.1	786	Este trabalho
SBA-15/TMB	30	10.1	1120	(18)
e NH ₄ F	30	13.2	1401	(18)
	30	15.4	2161	(18)
AlSBA-15	**	9.1	680	(29)

* Sintetizado por rota sol-gel; ** Dado não informado pelo autor.

Tendo em vista a dificuldade de encontrar dados na literatura sobre a adsorção de celulase em sílicas mesoporosas, foram realizados alguns experimentos nos adsorventes depois do contato com a referida enzima. O espectro FTIR de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3) em KBr foi realizado para ver se depois do contato a celulase ficava retida na parede das sílicas e os resultados estão apresentados na Figura 4.10. É possível observar na celulase alguns picos específicos, são eles: 3340 cm⁻¹, 2913 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1530 cm⁻¹. Note que em todas as amostras há um ligeiro alongamento da banda de hidrogênio ligado por álcool (OH) situada na vibração em 3340 cm⁻¹ que pode ser devido à sobreposição de alongamento das vibrações de OH e NH. Antes do contato com a enzima, as SBA-15 apresentavam um pico em 1630. Após o contato com a referida enzima, ocorreu um ligeiro deslocamento do pico para a esquerda. Na amostra que apresentou maior capacidade de adsorção de celulase (S2) é possível notar que este deslocamento é um pouco maior, acredito que seja em função da presença de maior quantidade da enzima. As duas bandas 1640 cm⁻¹ (amida I) e 1530 cm⁻¹ (amida II) demonstram claramente a presença da enzima adsorvida na matriz.

Figura 4.10 - Comparação do espectro FTIR de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3) em KBr.



A Tabela 4.8 apresenta as percentagens atômicas de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3) antes e depois do contato com a CEL. É possível notar a presença de N1s em todas as amostras, porém a Amostra S2 que apresentou maior capacidade de adsorção não foi a que apresentou maior quantidade de N, isto pode ser justificado pelo fato desta técnica ser uma análise de superfície, como a S2 apresenta um poro maior, pode ser que parte da enzima adsorvida esteja localizada na superfície interna na qual os raios-x não podem alcançar.

Tabela 4.8 – Percentagens atômicas de SBA-15 (S), SBA-15/TMB (S1), SBA-15/TMB_NH₄F (S2) e SBA-15/NH₄F_heptano (S3) antes e depois do contato com a CEL.

SBA-15	C1s (%)	N1s (%)	O1s (%)	Si2p (%)
S	2,92	0,00	65,24	31,84
S_CEL	6,74	0,80	62,44	30,02
S1	2,14	0,00	65,60	32,26
S1_CEL	8,18	1,14	60,70	29,98
S2	2,90	0,00	66,50	30,60
S2_CEL	12,18	1,65	57,76	28,41
S3	1,49	0,00	65,41	33,10
S3_CEL	14,58	2,56	55,90	26,95

4 CONCLUSÕES

A peneira molecular mesoporosa SBA-15 com diferentes tamanhos de poro foi sintetizada com copolímero tribloco P123 como o agente estrutural, TMB e heptano como agente expensor de poros e fluoreto para alterar o comprimento de poro, obtendo-se materiais com diferentes texturas (diâmetro de poros entre 9,8 nm e 19,2 nm) e ordenamento de poros.

Embora S2 e S3 exibam uma estrutura menos ordenada, do tipo MCF (*mesostructured celular foam*), ambos adsorventes apresentaram as maiores capacidades de adsorção para a celulase, lisozima e albumina de soro bovino. Os resultados obtidos podem ser atribuídos ao maior diâmetro de poros, a uma faixa mais ampla de distribuição destes tamanhos

e a um menor comprimento dos poros do adsorvente, o que facilita o acesso dessas biomoléculas volumosas ao interior e exterior (espaço interparticular) destes poros, e permite uma maior capacidade de adsorção mediante a acomodação das biomoléculas na superfície interna e externa da estrutura mesocelular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES - Brasil (5993/11-3) e CNPq - Brasil (577363/2008-5) e ao Projeto Espanha-Brasil (PHB2011-0074-PC) pelo apoio financeiro recebido.

REFÊRENCIAS

1. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992;359:710-2.
2. Katiyar A, Yadav S, Smirniotis PG, Pinto NG. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A*. 2006;1122:13-20.
3. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120: 6024-36.
4. Luechinger M, Pirngruber GD, Lindlar B, Laggner P, Prins R. The effect of the hydrophobicity of aromatic swelling agents on pore size and shape of mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;79:41-52.
5. Liang Y, Anwender R. Synthesis of pore-enlarged mesoporous organosilicas under basic conditions. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;72:153-65.
6. Jana SK, Nishida R, Shindo K, Kugita T, Namba S. Pore size control of mesoporous molecular sieves using different organic auxiliary chemicals. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;68:133-42.
7. Sayari A, Kruk M, Jaroniec M, Moudrakovski IL. New Approaches to Pore Size Engineering of Mesoporous Silicates. *Advanced Materials*. 1998;10:1376-9.
8. Blin JL, Su BL. Tailoring Pore Size of Ordered Mesoporous Silicas Using One or Two Organic Auxiliaries as Expanders. *Langmuir*. 2002;18:5303-8.

9. Wang J, Zhang J, Asoo BY, Stucky GD. Structure-Selective Synthesis of Mesostructured/Mesoporous Silica Nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125:13966-7.
10. Boissière C, Larbot A, van der Lee A, Kooyman PJ, Prouzet E. A New Synthesis of Mesoporous MSU-X Silica Controlled by a Two-Step Pathway. *Chemistry of Materials*. 2000;12:2902-13.
11. Ji X, Lee KT, Monjauze M, Nazar LF. Strategic synthesis of SBA-15 nanorods. *Chemical Communications*. 2008;0:4288-90.
12. Zhang H, Sun J, Ma D, Bao X, Klein-Hoffmann A, Weinberg G, et al. Unusual Mesoporous SBA-15 with Parallel Channels Running along the Short Axis. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:7440-1.
13. Zhang H, Sun J, Ma D, Weinberg G, Su DS, Bao X. Engineered Complex Emulsion System: Toward Modulating the Pore Length and Morphological Architecture of Mesoporous Silicas. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:25908-15.
14. Quintella SA, Saboya RMA, Salmin DC, Novaes DS, Araújo AS, Albuquerque MCG, et al. Transesterification of soybean oil using ethanol and mesoporous silica catalyst. *Renewable Energy*. 2012;38:136-40.
15. Zhao J, Gao F, Fu Y, Jin W, Yang P, Zhao D. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography. *Chemical Communications*. 2002:752-3.
16. Lin VS, Lai CY, Huang J, Song SA, Xu S. Molecular recognition inside of multifunctionalized mesoporous silicas: toward selective fluorescence detection of dopamine and glucosamine. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123:11510-1.
17. Zhao W, Gu J, Zhang L, Chen H, Shi J. Fabrication of Uniform Magnetic Nanocomposite Spheres with a Magnetic Core/Mesoporous Silica Shell Structure. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127:8916-7.
18. Diao X, Wang Y, Zhao J, Zhu S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2010;18:493-9.
19. Bhattacharyya MS, Hiwale P, Piras M, Medda L, Steri D, Piludu M, et al. Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry C*. 2010;114:19928-34.
20. Miyahara M, Vinu A, Ariga K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27:232-6.
21. Kang Y, He J, GuoGuo X, Guo, Song Z. Influence of Pore Diameters on the Immobilization of Lipase in SBA-15. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2007;46:4474-9.

22. Hartono SB, Qiao SZ, Liu J, Jack K, Ladewig BP, Hao Z, et al. Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Cellulase Immobilization. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010;114:8353-62.
23. Hudson S, Magner E, Cooney J, Kieran B. Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109:19496-506.
24. Corma A, Fornes V, Rey F. Delaminated Zeolites: An Efficient Support for Enzymes. *Advanced Materials*. 2002;14:71-4.
25. Tischer W, Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17. England 1999. p. 326-35.
26. Ralla K, Sohling U, Suck K, Sander F, Kasper C, Ruf F, et al. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;87:217-25.
27. Santos SML, Nogueira KAB, Gama MS, Lima JDF, Silva Júnior IJ, Azevedo DCS. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;180:284-92.
28. Zou B, Hu Y, Yu D, Xia J, Tang S, Liu W, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;53:150-3.
29. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:7323-30.
30. Essa H, Magner E, Cooney J, Hodnett BK. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2007;49:61-8.
31. Fulvio PF, Pikus S, Jaroniec M. Tailoring properties of SBA-15 materials by controlling conditions of hydrothermal synthesis. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15:5049-53.
32. Boissière C, Larbot A, Prouzet E. Synthesis of Mesoporous MSU-X Materials Using Inexpensive Silica Sources. *Chemistry of Materials*. 2000;12:1937-40.
33. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60:309-19.
34. Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K. *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*. San Diego, California: Academic Press; 1999. 467 p.
35. Olivier J. Modeling physical adsorption on porous and nonporous solids using density functional theory. *Journal of Porous Materials*. 1995;2:9-17.

36. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. 1998;279:548-52.
37. Nguyen TPB, Lee J-W, Shim WG, Moon H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;110:560-9.
38. Lettow JS, Han YJ, Schmidt-Winkel P, Yang P, Zhao D, Stucky GD, et al. Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir*. 2000;16:8291-5.
39. Kruk M, Jaroniec M, Ko CH, Ryoo R. Characterization of the porous structure of SBA-15. *Chemistry of Materials*. 2000;12:1961-8.
40. Colilla M, Izquierdo-Barba I, Sánchez-Salcedo S, Fierro JLG, Hueso JL, Vallet-Regí M. Synthesis and Characterization of Zwitterionic SBA-15 Nanostructured Materials. *Chemistry of Materials*. 2010;22:6459-66.
41. Al-Oweini R, El-Rassy H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}'\text{Si}(\text{OR}')_3$ precursors. *Journal of Molecular Structure*. 2009;919:140-5.
42. Burneau A, Barres O, Gallas JP, Lavalley JC. Comparative study of the surface hydroxyl groups of fumed and precipitated silicas. 2. Characterization by infrared spectroscopy of the interactions with water. *Langmuir*. 1990;6:1364-72.
43. Vrancken KC, Van Der Voort P, Gillis-D'Hamers I, Vansant EF, Grobet P. Influence of water in the reaction of $[\gamma]$ -aminopropyltriethoxysilane with silica gel. A Fourier-transform infrared and cross-polarisation magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance study. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1992;88:3197-200.
44. Lee J-W, Tra PT, Kim S-I, Roh S-H. Adsorption Properties of Proteins on SBA-15 Nanoparticles Functionalized with Aminosilanes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008;8:5152-7.
45. Lei J, Fan J, Yu C, Zhang L, Jiang S, Tu B, et al. Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;73:121-8.
46. M. Kisler J, Dähler A, W. Stevens G, J. O'Connor A. Separation of biological molecules using mesoporous molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001;44-45:769-74.
47. Vinu A, Miyahara M, Hossain KZ, Nakanishi T, Ariga K. Adsorption of lysozyme over mesoporous carbons with various pore diameters. In: Abdelhamid Sayari and Mietek J, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 156: Elsevier; 2005. p. 637-42.

48. Kim J, Desch RJ, Thiel SW, Gulians VV, Pinto NG. Energetics of lysozyme adsorption on mesostructured cellular foam silica: Effect of salt concentration. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218:6697-704.
49. Katiyar A, Ji L, Smirniotis P, Pinto NG. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. *Journal of Chromatography A*. 2005;1069:119-26.

Capítulo 5

EQUILÍBRIO E CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE BSA E CELULASE EM SÍLICA MESOPOROSA SBA-15 DOPADA COM ZIRCÔNIO

Sandra M. L. Santos¹; Juan A. Cecilia²; Enrique Vilarrasa-Garcia²; Ivanildo J. Silva Junior¹;
Enrique Rodríguez-Castellón² and Diana C. S. Azevedo¹

¹Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, S/N – Bloco 710 – CEP: 60455-760 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: (55-85) 3366-9611, Ramal 206.

²Departamento de Química Inorgánica, Cristalografía y Mineralogía, Facultad de Ciencias – Universidad de Málaga – 29071 – Málaga – Spain. Email: diana@gpsa.ufc.br.

ABSTRACT

Mesoporous silica SBA-15 and SBA-Zr-n (n = molar ratio Si/Zr ranging entity 5-15) were synthesized by hydrothermal route with P123 triblock copolymer as structure directing agent, TMB as swelling agent and different concentrations of Zr in order to assess whether the increased acidity of the adsorbents have a positive influence on the adsorption capacity of BSA and CEL. The adsorbents were characterized by isotherms of adsorption / desorption of N₂ at 77 K, transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), temperature programmed desorption of ammonia (NH₃-TPD) and point of zero charge (pH_{PZC}). The behavior of BSA and CEL adsorption in the different adsorbents was investigated in tests using a stirred tank at 25 °C. The addition of zirconium in smaller proportions (molar ratio Si/Zr = 15) matched the inclusion of pore expander (TMB) has led to a material with randomly distributed structure mesocelular (MCF - mesostructured cellular foam) and a surface acidity moderate. In addition it was presented that the adsorbent higher adsorption capacities for both biomolecules studied. In the case of BSA, assigns the superiority of the sample Zr-SBA-15 effects the accessibility provided by its larger pore diameter, whereas

the sample without pore expanded zirconium (S1) adsorbs almost the same as the samples more acid and all have the same pore diameter. As for the case of the cellulase, the non-linearity of the isotherms was much less pronounced than for BSA, which suggests that there is significant crowding. The adsorption capacity for this enzyme appears to be related to the presence of a weak to moderate surface acidity, because the samples Zr-SBA-15 and Zr-SBA-10 showed similar adsorption equilibrium, despite their significantly different textural parameters.

Keywords: SBA-15. Pore-expanding agent. Adsorption. Acidity. Biomolecules.

RESUMO

Sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 e Zr-SBA-n ($n =$ razão molar Si/Zr, variando entre 05 e 15) foram sintetizadas por via hidrotérmica com copolímero tribloco P123 como o agente direcionador de estrutura, TMB como agente expensor de poros e diferentes concentrações de Zr a fim de avaliar se o aumento da acidez dos adsorventes influenciaria positivamente na capacidade de adsorção de BSA e CEL. Os adsorventes foram caracterizados por isothermas de adsorção/dessorção de N_2 a 77 K, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios-X (XRD), espectroscopia fotoeletrônica de raios-x (XPS), dessorção a temperatura programada de amônia (TPD- NH_3) e ponto de carga zero (pH_{PZC}). O comportamento da adsorção de BSA e CEL nos diferentes adsorventes foi investigado utilizando ensaios em tanque agitado a 25 °C. A adição de zircônio em menores proporções (razão molar Si/Zr = 15) combinado à inclusão do expensor de poros (TMB) levou a um material com estrutura mesocelular distribuída aleatoriamente (MCF – *mesostructured celular foam*) e uma acidez superficial moderada. Além disso, ele foi o adsorvente que apresentou mais altas capacidades de adsorção para as duas biomoléculas estudadas. No caso da BSA, atribui-se a superioridade da amostra Zr-SBA-15 a efeitos de acessibilidade proporcionados pelo seu maior diâmetro de poro, visto que a amostra de poros expandidos sem zircônio (S1) adsorve praticamente o mesmo que as amostras mais ácidas e todas possuem o mesmo diâmetro de poro. Já para o caso da celulase, a não-linearidade das isothermas foi bem menos pronunciada que para a BSA, o que sugere que não há efeitos de exclusão importantes. A capacidade de adsorção para esta enzima parece estar relacionada à presença de uma acidez superficial fraca a moderada, pois as amostras Zr-SBA-15 e Zr-SBA-10 apresentaram equilíbrio de adsorção similar, a despeito de seus parâmetros texturais significativamente distintos.

Palavras-chave: SBA-15. Agente expensor de poros. Adsorção. Acidez. Biomoléculas.

1 INTRODUÇÃO

Materiais a base de sílica mesoporosa têm recebido muita atenção devido ao seu potencial de aplicação em troca iônica, refino de petróleo e petroquímica, catálise e adsorção, entre outras (1-4). Dentre estes materiais, destaca-se a SBA-15, que foi reportada pela primeira vez em 1998 por Zhao *et al.* (5). Trata-se de uma peneira molecular com mesoporos uniformes formando uma estrutura hexagonal bidimensional obtida a partir da síntese em meio ácido utilizando copolímero tribloco anfifílico com blocos de poli (óxido de etileno) como agente direcionador de estrutura (6).

A SBA-15 pode atingir maior espessura de parede quando comparada ao MCM-41, o que confere ao primeiro material maior estabilidade hidrotérmica que o segundo. Além disso, o tamanho dos poros da SBA-15 pode ser ajustado dependendo das condições de síntese, o que torna vantajoso usar este suporte mesoporoso em catálise, separação e processos de adsorção, particularmente no caso de moléculas volumosas (dimensões nanométricas). Neste sentido, é particularmente interessante aumentar o diâmetro dos poros por meio da adição de agentes expansores de poros como os compostos aromáticos tri-substituídos (7, 8), alcanos (9) ou aminas (10). Embora o uso de alguns alcanos como agentes expansores conduzam a uma estrutura bem ordenada e nítida distribuição de tamanhos de poro, compostos aromáticos tri-substituídos mostram um aumento significativo do tamanho dos poros no SBA-15, sendo 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) o composto mais comumente utilizado para expansão (7).

A fisissorção é dominada por forças adsorvente-adsorbato fracas, ou seja, do tipo van der Waals ou forças de dispersão. É mostrado em alguns estudos que as proteínas tendem a ser mais fortemente adsorvidas quando interações eletrostáticas entre a superfície do suporte e a proteína têm lugar. Neste sentido, a afinidade adsorvente-adsorbato pode ser aumentada por meio da incorporação de heteroátomos tais como zircônio (Zr), titânio (Ti) ou alumínio (Al) na estrutura da sílica. De igual modo, a presença de heteroátomos na sílica mesoporosa pode melhorar a estabilidade térmica e as propriedades texturais, além de conduzir a materiais mesoporosos com diferentes funcionalidades na superfície (11). Assim, em processos de catálise ou adsorção, a sílica mesoporosa SBA-15 pura costuma exibir baixa atividade catalítica

ou seletividade, devido à ausência de sítios ácidos. No entanto, a incorporação de metais na estrutura pode gerar sítios ácidos de Lewis e/ou de Brønsted (12-14), incrementando a atividade catalítica e/ou as propriedades de adsorção de tais materiais. Por outro lado, sob estas condições, a dessorção de proteínas pode ser um problema comum, em particular na presença de fortes forças adsorvente-adsorbato, situação favorável a processos de imobilização (15).

Em geral, a inserção de um heteroátomo durante a síntese é considerada vantajosa sobre os métodos de funcionalização pós-síntese, pois conduz a uma melhor dispersão dos sítios ativos e evita a formação de espécies fora da estrutura. No entanto, a capacidade de controlar a inserção do heteroátomo numa síntese é um grande desafio na preparação de materiais porosos à base de sílica.

O ajuste do diâmetro dos poros em conjunto com a incorporação de heteroátomos na síntese de SBA-15 leva a materiais com potencial para adsorção ou imobilização de moléculas biologicamente ativas em espaços confinados, em escala nanométrica (16, 17). A adsorção de biomoléculas tem atraído muita atenção devido a sua aplicação em diversas áreas, como a indústria farmacêutica e de alimentos. A imobilização de proteínas em materiais inorgânicos pode melhorar a estabilidade de enzimas, sob condições extremas (16, 18). Além disso, a adsorção controlada de proteínas é essencial para os campos da catálise enzimática, biossensores e diagnóstico de doenças (16, 19).

A SBA-15 tem sido usada em processos de adsorção de biomoléculas, tais como citocromo C (20, 21), tripsina (22), xilanase (23), lisozima (24, 25), mioglobina (26), albumina de soro bovino (BSA) (27, 28) e celulase (29). Contudo, os relatos de sílicas mesoestruturadas modificadas com heteroátomos para esta finalidade têm sido escassos e limitados à incorporação de alumínio em estruturas de MCM-41 e SBA-15 (30, 31).

O objetivo desta pesquisa foi sintetizar SBA-15 contendo zircônio em sua estrutura e testá-la na adsorção de biomoléculas. A razão molar Si/Zr variou de 5 a 15. As propriedades de adsorção dos materiais mesoestruturados foram medidas com a enzima celulase (CEL) e a proteína albumina de soro bovino (BSA).

Os adsorventes do presente trabalho foram preparados por incorporação do zircônio através de síntese direta, e caracterizados por isotermas de adsorção/dessorção de N₂, difração de raios-X (XRD), microscopia de transmissão eletrônica (TEM), Espectroscopia fotoeletrônica de raios-x (XPS), dessorção a temperatura programada de amônia (TPD-NH₃) e medições do pH_{pzc}.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na síntese de SBA-15 foram o copolímero tribloco Pluronic P123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀ PM \approx 5800) (Aldrich, EUA), tetraetoxisilano (TEOS 98%) (Aldrich, EUA), propóxido de zircônio (Zr (OCH₂CH₂CH₃)₄, 70% em peso em solução em 1-propanol) (Aldrich, EUA) e ácido clorídrico (HCl a 37%) (VWR, EUA). A fim de aumentar o volume de poro, o 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) (Aldrich, EUA) foi usado. As biomoléculas empregadas nos ensaios de adsorção foram celulase de *Aspergillus niger* (Aldrich, EUA) e albumina de soro bovino (INLAB, Brasil). Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional. Os gases utilizados foram He (99,99%) (Air Liquide, França), N₂ (99,9999%) (Air Liquide, França) e NH₃ (99,99%) (Air Liquide, França).

2.2. Síntese de suportes mesoestruturados

2.2.1. Síntese de SBA-15 de poro médio (S)

SBA-15 com diâmetro mediano de poro ($3 \leq D_p \leq 8$ nm) e morfologia de partícula convencional foi preparada através do ajuste da temperatura do tratamento hidrotérmico, tal como descrito por Fulvio *et al.* (32). Inicialmente, P123 foi dissolvido em 1,7 M HCl (aq.) a 313 K e depois TEOS foi adicionado gota a gota. A composição molar final do gel de síntese foi P123/SiO₂/HCl/H₂O = 1/55/350/11100. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h, transferida para uma autoclave de Teflon, onde foi tratada hidrotérmicamente a 393K durante 72 h. O sólido foi então filtrado, lavado com água deionizada e seco a 333 K *overnight*.

2.2.2. Síntese de SBA-15 de poro largo (S1)

SBA-15 com poros largos foi sintetizada por modificação da síntese hidrotérmica descrita por Fulvio *et al.* (32). P123 foi dissolvido em 1,7 M HCl (aq.) a 313 K, e, em seguida, adicionou-se TMB como agente expander de poro à solução transparente obtida. Após 30 min, foi adicionado TEOS gota a gota. A razão molar final no gel de síntese foi

P123/SiO₂/TMB/HCl/H₂O = 1/55/48/350/11100. A suspensão resultante foi agitada a 313 K durante 24 h e, em seguida, colocada em uma autoclave, onde foi tratada hidrotermicamente a 393K durante 72 h. O sólido foi então filtrado, lavado com água deionizada e seco a 333 K *overnight*.

2.2.3. Síntese de Zr-SBA-15

Para produzir materiais com acidez diferente, foi utilizada a metodologia relatada por Fulvio *et al.* (32), com algumas modificações. Inicialmente, o P123 foi dissolvido em 1,7 M HCl (aq.) sob agitação magnética até a dissolução completa de plurônico, quando TMB foi adicionado. Após 30 minutos de agitação adicional, foi incorporada a fonte de sílica e de zircônio, gota a gota. O material foi preparado com razão molar Si/Zr compreendida entre 5 (Zr-SBA-15_5) e 15 (Zr-SBA-15_15). O processo foi conduzido sob agitação durante um período de 24 horas a 40 °C. Para o tratamento hidrotérmico, o gel de síntese foi transferido para uma autoclave e aquecido a 100 °C durante 72 horas. No final do processo, o material foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada e seco a 60 °C durante 24 horas em estufa.

A calcinação de todos os materiais foi realizada a 550 °C durante seis horas, com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min.

2.3. Caracterizações

As isotermas de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K foram realizadas utilizando um equipamento de adsorção volumétrica (ASAP 2020, Micromeritics). Antes da adsorção de nitrogênio, as amostras foram submetidas a uma limpeza degasificando-as a 200 °C com uma pressão de aproximadamente 2,7 Pa durante 6h. A temperatura de adsorção do nitrogênio (77 K) foi alcançada termostatazando o porta-amostra com um *Dewar* com N₂ líquido. A partir dos dados de volumes de N₂ adsorvidos a diferentes pressões, foram construídas as isotermas de adsorção e dessorção de N₂. A área superficial específica (S_{BET}) das amostras foi calculada com o método descrito por Brunauer, Emmett e Teller (33), utilizando os dados de adsorção na gama de pressões relativas 0,05-0,18, onde as condições de linearidade e considerações sobre o método foram cumpridas (34). A distribuição dos valores de diâmetro de poro (D_p) foi obtida

através da correlação do volume (V_p) dessorvido como uma função da pressão relativa (p/p_0) de acordo com os algoritmos propostos por Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (35).

As micrografias eletrônicas de transmissão (TEM) das amostras foram obtidas com o auxílio de um microscópio de alta resolução Philips CCCM 200 SuperTwin-DX4. As amostras foram previamente dispersas em etanol e posteriormente colocadas em um rendilha de Cu de 3,5 mm de diâmetro.

A difração de raios-X a baixo ângulo (XRD) foi utilizada para identificar as fases cristalinas dos sólidos sintetizados. Estas experiências foram realizadas em um difratômetro automatizado X'Pert Pro MPD equipado com um monocromador primário Ge (1 1 1) (radiação Cu-K α estritamente monocromática) e um detector X'Celerator. As medidas foram obtidas para 2θ variando na faixa de 1-10 °.

Os espectros XPS foram obtidos com um espectrômetro Physical Electronic s-5700 equipado com uma fonte dupla de excitação de raios-x de Mg-K α ($h\nu= 1253,6$ eV) e de Al-K α ($h\nu= 1483,6$ eV) e um analisador de elétrons esférico multicanal Eletronics 80-365B. A energia de ligação foi determinada com uma precisão de $\pm 0,1$ eV e usando como referência o sinal C 1s do carbono adventício a 284,8 eV. Para a análise dos dados foi utilizado o software Multipak. O espectro foi ajustado usando sempre curvas de Gauss-Lorentz para determinar a forma adequada de energia de ligação (B.E) do nível interno dos diferentes elementos.

A dessorção a temperatura programada de amônia (TPD-NH₃) foi realizada para avaliar a acidez superficial dos materiais mesoporosos dopados de zircônio. 80 mg de cada amostra foram inicialmente limpas com hélio puro (35 mL/min) mediante aquecimento a partir da temperatura ambiente até 550 °C, com rampa de 10 min. Subseqüentemente, a amostra foi resfriada até 100 °C e a adsorção da amônia pura ocorreu nesta temperatura por 5 min. Um fluxo de He (35 mL/min) foi passado por 40 min para eliminar a amônia simplesmente fisissorvida. Finalmente, a dessorção termo-programada de NH₃ foi realizada entre 100 °C e 550 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob fluxo de hélio e mantida a 550 °C durante 15 min. A amônia dessorvida foi analisada por cromatografia em fase gasosa (Shimadzu GC-14A) com detector de condutividade térmica (TCD). A fim de quantificar a amônia dessorvida, o equipamento foi previamente calibrado, através da medição dos sinais correspondentes à decomposição térmica de quantidades conhecidas de cloreto hexaaminoníquel (II) [Ni (NH₃)₆] Cl₂.

A determinação do ponto de carga zero dos adsorventes foi realizada seguindo a metodologia reportada por Hameed *et al.* (36). O pH_{PZC} é o pH onde a carga na superfície do adsorvente é zero. Para isto, 500 mL de solução 0,01 N de NaCl foi preparada, desta foram retiradas alíquotas de 5,0 mL e adicionadas a uma série de tubos. Em seguida, os seus valores de pH foram ajustados no intervalo entre 2 e 12, utilizando solução de HCl e solução NaOH. Os pH iniciais das soluções foram medidas com pHmetro e depois de estabilizados foram adotados como $\text{pH}_{\text{inicial}}$, só então foi adicionado 0,015 g da amostra de SBA-15 em cada tubo. Após 48 horas, o pH da solução foi novamente medido e foi adotado como pH_{final} .

2.4 Experimentos de adsorção de BSA e CEL

Ensaio de adsorção foram realizados em *shaker* (Julabo modelo SW 22). Para tanto, foram colocados 25 mg de adsorvente em contato com 5,0 mL de solução tampão acetato de sódio contendo BSA ou CEL nas mesmas condições de pH e força iônica testada por Santos *et al.* (37). Para as medições de cinética de adsorção, as concentrações iniciais utilizadas foram de 1 mg/mL para BSA e de 3 mg/mL para celulase. Alíquotas de sobrenadante foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados. Para a medição das isotermas de adsorção, diferentes concentrações iniciais de BSA (1,0 a 15 mg/mL) e de celulase (1,0 a 7,0 mg/mL) com pH (4,8 para BSA e 4,0 para celulase) e força iônica (50 mM) fixos foram agitados durante o intervalo de tempo necessário para estabelecer o equilíbrio de adsorção. Em todos os experimentos, após o contato, amostras de sobrenadante foram colhidas e centrifugadas. A concentração no sobrenadante foi analisada com um espectrofotômetro (UV-1800P, Shimadzu) a 280 nm.

A quantidade adsorvida para cada biomolécula foi calculada usando um balanço de massa, de acordo com a Equação 1:

$$q = \frac{V_{\text{sol}}(C_0 - C_{\text{eq}})}{m_{\text{ads}}} \quad (1)$$

onde V_{sol} representa o volume de solução contendo a biomolécula de interesse (mL); C_0 a concentração inicial da biomolécula (mg/mL); C_{eq} é a concentração de equilíbrio (mg/mL) e m_{ads} é a massa de adsorvente (g).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização

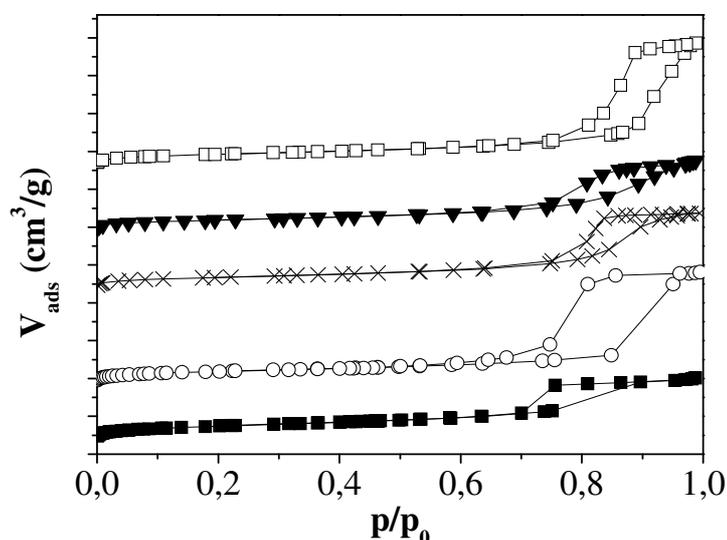
A Figura 5.1 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K, enquanto que a Tabela 5.1 resume as propriedades texturais das amostras sintetizadas de SBA-15 e Zr-SBA-15. Todas as amostras apresentam isotermas de adsorção tipo IV de acordo com a classificação IUPAC (38), com laços de histerese a partir de p/p_0 igual a 0,7. A SBA-15 obtida por via hidrotérmica tradicional (S) apresenta maior área superficial S_{BET} devido à estrutura bem definida e aos mesocanais longos sob a forma de um favo de mel, característica comprovadas nas imagens TEM (Fig. 5.2). Quando TMB é adicionado (S2), a histerese é ligeiramente deslocada para p/p_0 superiores, o que sugere um aumento do tamanho dos poros devido à introdução do agente de expansão no interior do núcleo hidrofílico da micela do surfactante, aumentando seu tamanho e alterando o empacotamento de favo de mel típico da SBA-15 hidrotérmica, o que conduz a uma estrutura menos definida e com uma menor área S_{BET} .

Tabela 5.1– Parâmetros estruturais das amostras de SBA-15 e Zr-SBA-15 sintetizadas.

Amostra	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	Dp (nm)	V_{TP} (cm ³ .g ⁻¹)
1 - S	730	5,6	1,29
2 - S1	647	12,8	2,80
3 - Zr-SBA-15_15	602	16,5	2,64
4 - Zr-SBA-15_10	522	10,7	1,57
5 - Zr-SBA-15_5	545	11,3	1,69

S = SBA-15; S1 = SBA-15/TMB; Zr-SBA-15_15 (Si/Zr = 15), Zr-SBA-15_10 (Si/Zr = 10) e Zr-SBA-15_05 (Si/Zr = 05).

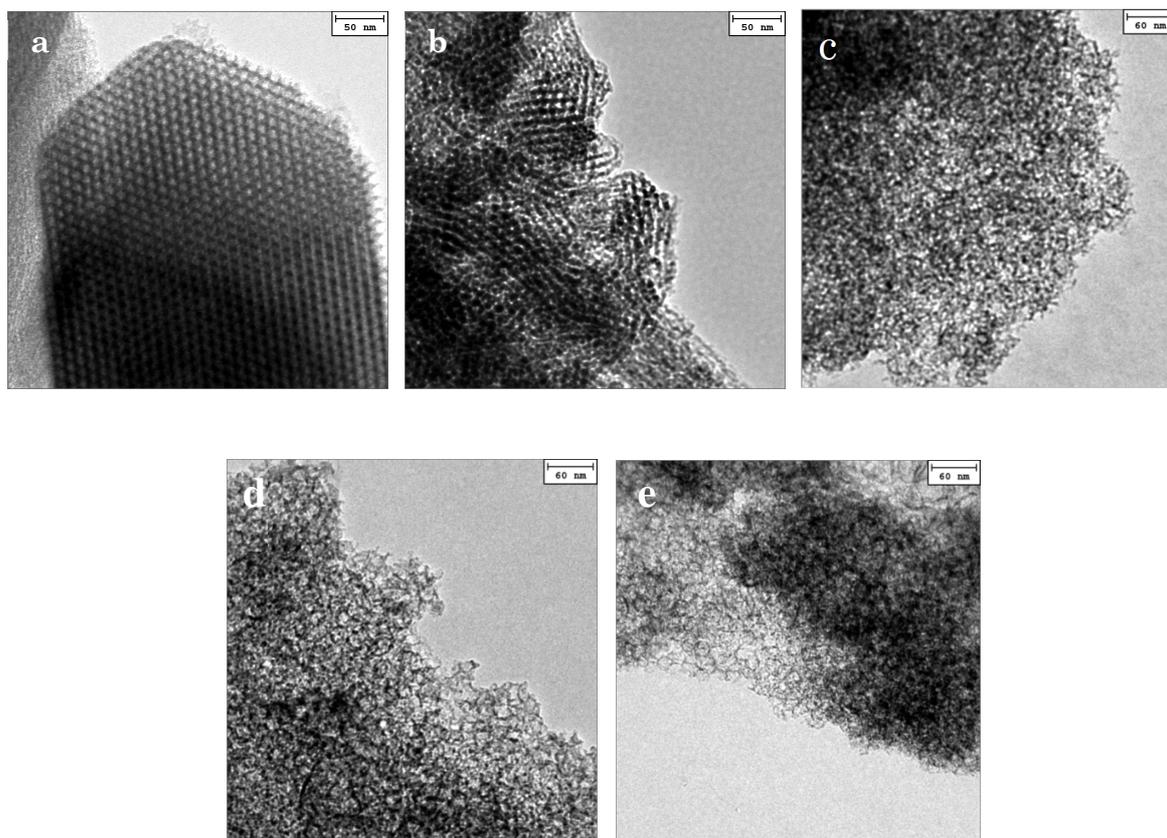
Figura 5. 1 – Isoterma de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K para SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15.



Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação aos materiais dopados com zircônio (Si/Zr de 15 a 5), pode-se observar que a adição de zircônio em pequenas quantidades (Zr-SBA-15_15) promoveu um desvio do laço de histerese a maiores valores de p/p_0 , juntamente com uma diminuição da área superficial, quando comparado a S e S1, gerando um material com tamanho de poro relativamente grande e com estrutura menos ordenada, como pode ser confirmado nos resultados TEM (Figura 5.2) e XRD (Figura 5.3). A tendência a uma menor área S_{BET} e menor volume de poro prossegue com o aumento do teor de Zr adicionado ou para menores razões Si/Zr, apesar de não haver grandes diferenças de textura entre os materiais com razão Si/Zr igual a 10 e 5. Os três materiais aos quais se adicionou zircônio parecem manter poros de diâmetro irregular na faixa nanométrica – haja vista o formato dos ramos de histerese – mas altamente desordenados. Isto pode ser resultado não só da adição de zircônio na amostra, mas também do TMB, já que segundo a literatura a adição de uma solução de TMB à síntese convencional de SBA-15, apesar de aumentar o diâmetro dos poros, conduz a uma transição da fase bem ordenada hexagonal para uma espuma celular mesoestruturada (MCF - *mesostructured cellular foam*), com poros fracamente ordenados (39-41).

Figura 5.2 – Micrografias TEM de SBA-15 (a) S, (b) S1, (c) Zr-SBA-15_05 (d) Zr-SBA-15_10 e (e) Zr-SBA-15_15

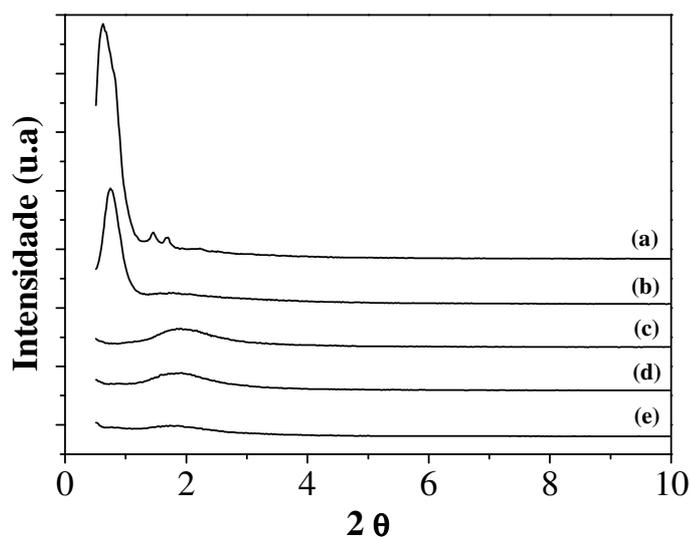


Fonte: elaborado pelo autor.

Os padrões de difração de raios-X em 2θ entre $0,5^\circ$ e 10° para os cinco materiais sintetizados são apresentados na Figura 5.3 e demonstram que a SBA-15 (S) apresenta um padrão típico de uma rede ordenada de mesoporos, exibindo três picos de reflexões (100), (110) e (200) com ordenamento de longo alcance. Isto a caracteriza como uma estrutura mesoporosa ordenada com simetria $P6mm$ hexagonal (34). No caso do S1, a adição do agente expander de poros durante a síntese provoca a diminuição do pico de difração referente ao plano (100) e ausência dos picos de reflexões (110) e (200), sugerindo que a adição de TMB dá origem a materiais menos ordenados, o que é confirmado nas imagens TEM (Figura 5.2b). Neste sentido, Nguyen *et al.* (35) postularam que a expansão do tamanho de poro pode ser explicado pela interação entre TMB e o copolímero tribloco, o que aumenta o volume do molde hidrofóbico e produz uma perda de ordenamento de longo alcance. No que diz respeito às amostras dopadas com diferentes concentrações de zircônio, mesmo o pico de reflexão (100) diminui drasticamente chegando até mesmo a desaparecer. De fato, as imagens TEM para as amostras contendo zircônio (Fig. 5.2 c, d, e) demonstram se tratar de um material bastante poroso, porém

com conectividade completamente aleatória. Além do papel do TMB em levar a um material mais desordenado, a adição do zircônio parece interferir também na condensação da fase inorgânica sobre a micela surfactante.

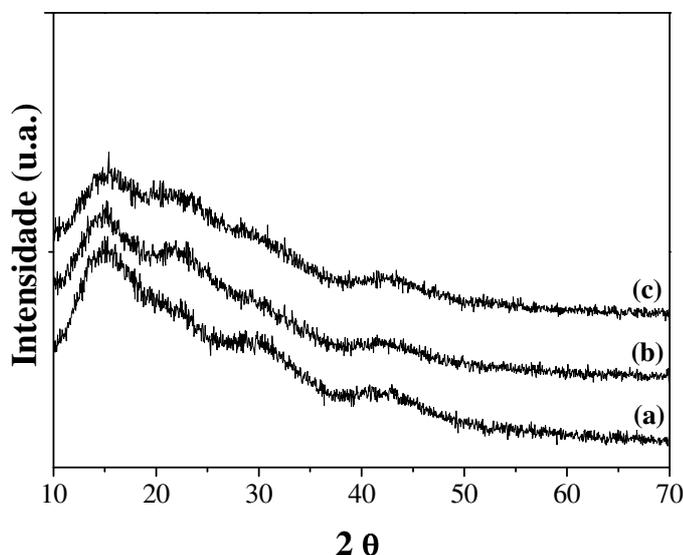
Figura 5. 3 – Difratoograma XRD a baixo ângulo obtido para SBA-15 sintetizada com e sem agente expensor de poros e calcinada a 550 °C. (a) S, (b) S1, (c) Zr-SBA-15_5, (d) Zr-SBA-15_10 e (e) Zr-SBA-15_15.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os padrões de difração de raios-X em 2θ entre 10° e 70° para os materiais sintetizados com zircônio são apresentados na Figura 5.4. Nenhum pico característico da presença de zircônio pôde ser observado neste intervalo, o que pode sugerir que este metal está totalmente disperso na estrutura da SBA-15. Estes picos característicos costumam se localizar a partir de $2\theta = 27,8$.

Figura 5. 4 – Difratoograma XRD a alto ângulo obtido para SBA-15 sintetizada com e sem agente expander de poros e calcinada a 550 °C. (a) S, (b) S1, (c) Zr-SBA-15_5, (d) Zr-SBA-15_10 e (e) Zr-SBA-15_15.



Fonte: elaborado pelo autor

As percentagens atômicas dos adsorventes sintetizados com diferentes razões Si/Zr obtidas através da técnica do XPS estão resumidas na Tabela 5.2. Dentre os materiais sintetizados com Zr, a SBA-15_{Si/Zr} = 10 apresentou uma menor quantidade deste heteroátomo. Uma possível justificativa é o fato do zircônio ter se aderido também na superfície interna dos poros deste material não sendo possível sua quantificação por esta metodologia já que os raios-x incididos nesta técnica são capazes de alcançar apenas os átomos mais externos da superfície.

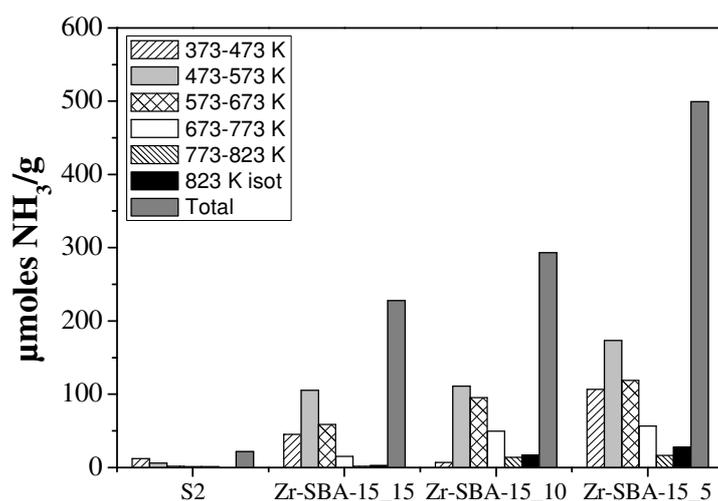
Tabela 5.2 – Percentagens atômicas dos diferentes adsorventes mesoporosos sintetizados.

SBA-15	C1s (%)	O1s (%)	Si2p (%)	Zr3d (%)
Si/Zr = 15	5,05	62,76	31,53	0,66
Si/Zr = 10	5,44	63,41	30,56	0,59
Si/Zr = 05	4,95	63,81	30,29	0,95

Os resultados de avaliação da acidez utilizando a técnica de dessorção termo-programada de NH₃ estão resumidos na Figura 5.5 em termos da quantidade de amônia

dessorvida para cada faixa de temperatura. É possível observar que a amostra S2 (sintetizada sem Zr) apresentou uma acidez total muito baixa (21,4 μmoles de NH_3/g). À medida que se adiciona zircônio aos adsorventes, a acidez total vai aumentando. Verifica-se, pela barra de acidez total que, dentre os adsorventes sintetizados com zircônio, a Zr-SBA-15_5 é a amostra mais ácida e a Zr-SBA-15_15 é a menos ácida, como era de se esperar devido à concentração decrescente de Zr na estrutura. É reportado na literatura que em termos de força ácida, os grupamentos silanóis (Si-OH), presentes tanto na parte interna quanto na parte externa da superfície das sílicas são considerados como sítios ácidos de Brønsted e normalmente são sítios fracos ou no máximo moderados (42). De acordo com a Figura 5.5, todos os adsorventes contendo Zr apresentam maior concentração de sítios ácidos entre 473-623 K, que segundo Araújo *et al.* (43) caracteriza a força do ácido como fraca a moderada. À medida que se reduz a razão molar Si/Zr ou se aumenta a concentração de zircônio, aumenta-se a acidez superficial total, particularmente dos sítios com maior força (NH_3 desorvida a $T > 473$ K). Outro resultado interessante é que para as amostras com Si/Zr = 5 e Si/Zr = 10 foi observado que há ainda alguma amônia que somente é desorvida a temperaturas superiores a 773 K, sugerindo a existência de sítios ácidos de força muito elevada. Tais sítios estão ausentes para a Si/Zr = 15.

Figura 5.5 - Distribuição de acidez da superfície das amostras sintetizadas usando a desorção a temperatura programada de técnica de amoníaco (TPD- NH_3).

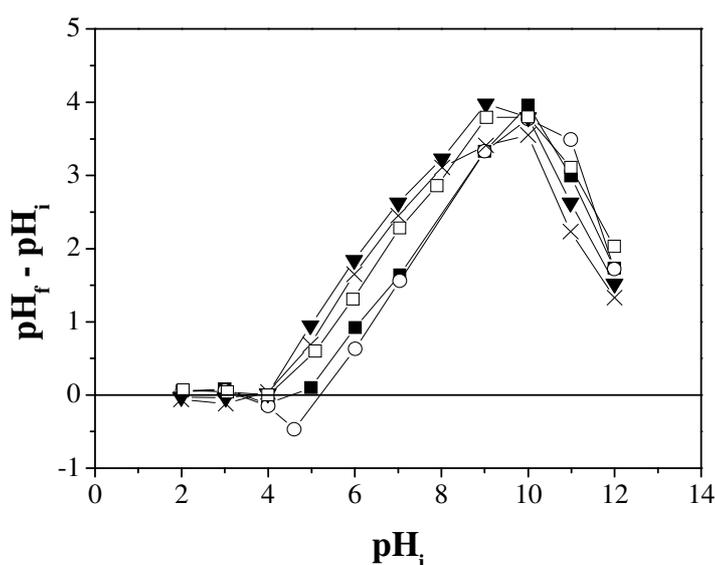


Fonte: elaborado pelo autor.

Os processos de adsorção são fortemente dependentes do pH, que afeta a carga superficial do adsorvente, bem como o grau de ionização e as espécies do adsorbato (44). Este

fato justifica a investigação da eficiência da adsorção dos diferentes adsorventes numa ampla faixa de pH, bem como a determinação do ponto de carga zero do adsorvente. O ponto de carga zero ou pH_{zpc} é um parâmetro que indica o valor de pH no qual um determinado sólido apresenta carga igual a zero em sua superfície. Este parâmetro é importante porque permite prever a carga na superfície do adsorvente em função do pH. O resultado encontrado para os diferentes adsorventes é apresentado na Figura 5.6. De acordo com esse gráfico, o pH_{zpc} dos adsorventes sintetizados são 4,5; 5,2; 3,7; 3,7 e 4,0 para as amostras S, S1, Si/Zr = 5, Si/Zr = 10 e Si/Zr = 15 respectivamente. Isto indica que abaixo desses valores o sólido apresenta uma carga superficial positiva favorecendo a adsorção de ânions e acima deste valor a superfície está carregada negativamente, favorecendo a adsorção de cátions.

Figura 5.6 – Teste de suspensão para determinar o pH do ponto de carga zero dos adsorventes mesoporosos (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15 pelo método de variação de pH. (–) $\text{pH}_f = \text{pH}_i$.



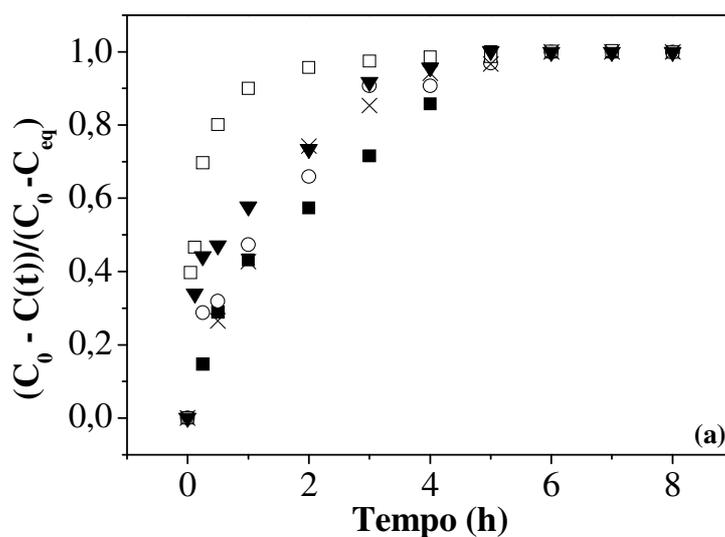
Fonte: elaborado pelo autor.

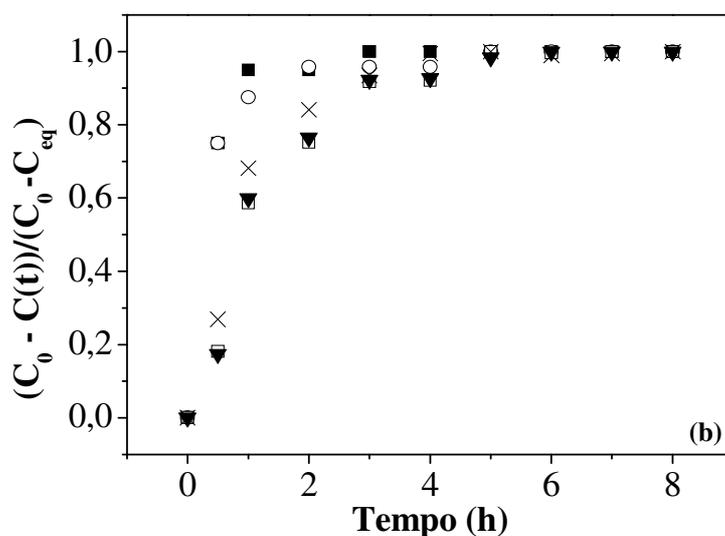
3.2 Resultados de adsorção em tanques agitados

As cinéticas de adsorção de BSA e CEL nos cinco adsorventes sintetizados em função do tempo são mostradas na Figura 5.6. De acordo com estes resultados, é possível observar que a amostra Zr-SBA-15_15, quando em contato com a BSA, alcança mais rapidamente o equilíbrio quando em comparação com os demais adsorventes. Isto pode ser justificado pelo tamanho de seus poros que é bastante superior aos demais adsorventes estudados. É interessante notar que para esta proteína, a cinética é mais lenta na amostra S,

precisamente aquela que apresenta menor tamanho de poro. Por outro lado, a CEL apresenta uma cinética menos dependente das dimensões de poro dos adsorventes. Os materiais melhor ordenados, que foram as sílicas S e S1, são precisamente aqueles que se apresentam cinéticas de adsorção mais favorável. Neste caso, deve-se levar em consideração o fato da celulase ser constituída de um pool de enzimas, de dimensões menores que a BSA, que é pouco retida nos adsorventes que não contém zircônio (como se verá posteriormente), tornando-se assim mais “ágil nos canais destes materiais. O equilíbrio foi atingido em cerca de 360 minutos (6 horas) para a CEL nos adsorventes que contém zircônio e, em metade deste tempo para as sílicas S e S1. Já para a BSA o equilíbrio foi atingido em 6 horas para todos os adsorventes, exceto para a amostra Zr-SBA-15_15, em que o tempo de equilíbrio foi reduzido para 4 horas.

Figura 5. 6 – Cinética de adsorção de BSA (a) e de CEL (b) nas SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15. Dose típica: 5 mL de solução 50 mmol/L em 0,0250 g de adsorvente. T= 25 °C. pH = 4,8 (BSA) e 4,0 (CEL).



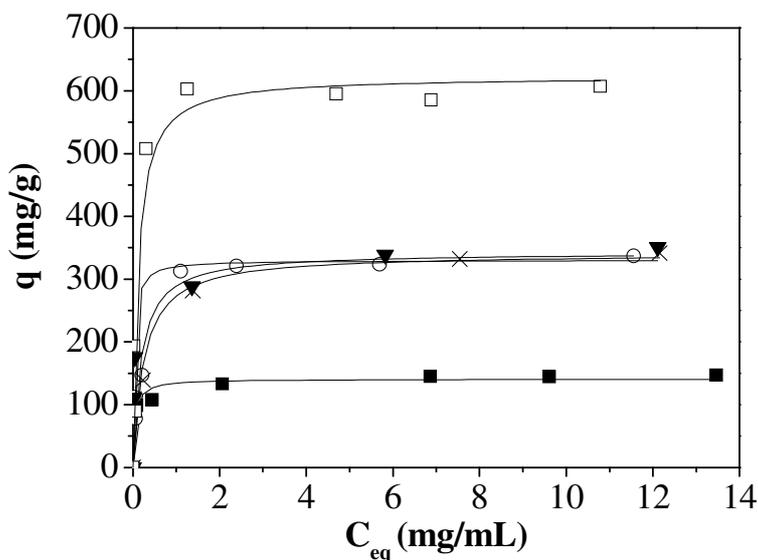


Fonte: elaborado pelo autor.

A partir dos resultados de cinética obtidos, todas as isotermas de equilíbrio foram medidas após 24 horas de contato. Na Figura 5.7, é possível observar o comportamento das isotermas de adsorção de BSA nos adsorventes S, S1, Zr-SBA-15_5, Zr-SBA-15_10 e Zr-SBA-15_15. Dentre estes, o que apresentou maior capacidade de adsorção foi o Zr-SBA-15_15 (623 mg/g), cerca do dobro da capacidade de adsorção de S1 (material sintetizado nas mesmas condições, porém sem a adição de zircônio) e quatro vezes mais do que o material sintetizado sem agente expander de poros S (141 mg/g). Outro resultado interessante é que a adição de Zr em quantidades maiores (Zr-SBA-15_5 e Zr-SBA-15_10) e conseqüentemente com maior acidez, comprovada tanto pela técnica de TPD-NH₃ (Figura 5.4) quanto pelo pH_{pzc} (Tabela 5.3), não aumentou a capacidade de adsorção de BSA nestes adsorventes quando comparado com o material S1. Se uma acidez excessiva fosse prejudicial à adsorção da proteína, esperar-se-ia que a amostra com maior acidez (Zr-SBA-15_5) adsorvesse menos que a amostra Zr-SBA-15_10, o que não é observado. O que há de comum entre as amostras S1, Zr-SBA-15_5 e Zr-SBA-15_10, que possuem aproximadamente a mesma capacidade máxima de adsorção de BSA, é o diâmetro médio dos poros, que é aproximadamente o mesmo. Estas observações experimentais levam a crer que o fator mais importante para a adsorção da BSA nestas amostras é a acessibilidade da proteína aos poros do material e uma disponibilidade de volume poroso significativo para hospedar a biomolécula. Note que as isotermas de adsorção de BSA foram medidas em pH 4,8, ou seja no mesmo valor do pI da proteína, quando esta possui carga líquida neutra. Também os pontos de carga zero dos adsorventes em estudo estão próximos deste valor

de pH, de modo que não parece ser vantajoso – nestas condições – inserir acidez adicional na superfície para alcançar uma alta capacidade de adsorção.

Figura 5.7 – Isoterma de adsorção de BSA nas SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15. T=25 °C. pH = 4,8.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados experimentais de adsorção (símbolos) foram ajustados pelos modelos de Langmuir (L), como expresso pela equação abaixo (Equação 2) e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

$$q = \frac{q_{\max}(k_L C_{eq})}{1 + k_L C_{eq}} \quad (2)$$

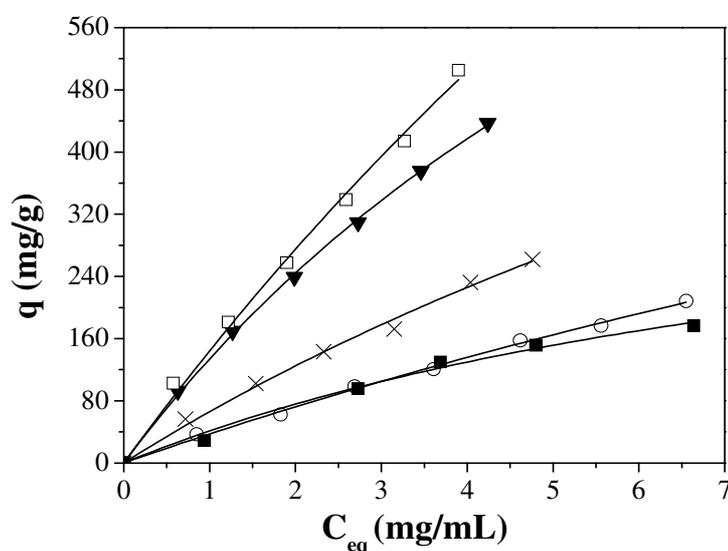
onde q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa (mg/g), C_{eq} é a concentração de proteína na fase líquida em equilíbrio (mg/mL), k_L é a constante de Langmuir (mL/mg), que está relacionada com a interação adsorvente-adsorbato e o q_{\max} é a capacidade máxima de adsorção por unidade de peso (mg/g).

Tabela 5.3 – Parâmetros das equações de Langmuir para adsorção de BSA em sílicas mesoporosas SBA-15 e Zr-SBA-15. Medidas a T= 25 °C. pH = 4,8

Amostra	Parâmetros		
	$q_{max}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$k_L(\text{mL}/\text{mg}),$	R^2
S	$140,8 \pm 5,1$	$20,5 \pm 6,9$	0,9682
S1	$342,5 \pm 19,3$	$5,4 \pm 1,7$	0,9541
Zr-SBA-15_15	$622,9 \pm 42,1$	$8,6 \pm 3,7$	0,9264
Zr-SBA-15_10	$330,1 \pm 12,5$	$31,2 \pm 6,4$	0,9819
Zr-SBA-15_05	$340,6 \pm 29,6$	$4,0 \pm 2,0$	0,9301

As isotermas de adsorção de CEL nos adsorventes S, S1, Zr-SBA-15_5, Zr-SBA-15_10 e Zr-SBA-15_15 a pH 4,0 são mostradas na Figura 5,6; onde pode ser observado que o comportamento das isotermas exibe apenas uma ligeira não-linearidade, comportamento semelhante ao observado por Santos *et al.* (37) para esta enzima em outras sílicas mesoporosas. Os parâmetros do modelo de Langmuir estão resumidos na Tabela 5.4. A SBA-15 dopada com zircônio em menor quantidade (Si/Zr =15) foi a que apresentou maior capacidade de adsorção para celulase (1666 mg/g). Sendo este o adsorvente com maior tamanho de poro e volume poroso significativo, pode-se levantar a mesma hipótese do mecanismo de acessibilidade que o observado para a BSA. No entanto, os dois adsorventes constituídos apenas de sílica (S e S1), embora tenham propriedades texturais bastante diferenciadas, possuem isotermas de adsorção bastante semelhantes e são os materiais com menor capacidade de adsorção dentre todos os estudados. Já para as amostras contendo zircônio, em toda a faixa estudada, as concentrações adsorvidas são inversamente proporcionais à quantidade de zircônio na estrutura e, portanto, à acidez do material final. Portanto, no caso da adsorção da enzima celulase, a presença de acidez moderada introduzida por pequenas quantidades de zircônio na estrutura foi determinante para provocar um aumento significativo na capacidade de adsorção.

Figura 5.4 – Isoterma de adsorção de CEL nas SBA-15 (■) S, (○) S1, (×) Zr-SBA-15_5, (▼) Zr-SBA-15_10 e (□) Zr-SBA-15_15. T= 25 °C. pH = 4,0.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5.4 – Parâmetros das equações de Langmuir para adsorção de CEL em sílicas mesoporosas SBA-15 e Zr-SBA-15.

Amostra	Parâmetros		
	$q_{max}(mg.g^{-1})$	$k_L(mL/mg)$	R^2
S	$453,55 \pm 105,71$	$0,10 \pm 0,03$	0,9916
S1	$1134,66 \pm 296,72$	$0,03 \pm 0,01$	0,9974
Zr-SBA-15_15	$1666,35 \pm 323,12$	$0,10 \pm 0,02$	0,9981
Zr-SBA-15_10	$1423,10 \pm 105,98$	$0,10 \pm 0,01$	0,9994
Zr-SBA-15_05	$1189,93 \pm 400,79$	$0,06 \pm 0,02$	0,9946

4 CONCLUSÕES

Sílicas mesoporosas do tipo SBA-15 e Zr-SBA-n (n = razão molar Si/Zr, variando entre 05 e 15) foram sintetizadas com copolímero tribloco P123 como o agente direcionador de estrutura, TMB como agente expensor de poros e diferentes concentrações de Zr, obtendo-se materiais com diferentes texturas (diâmetro de poros entre 5,6 nm e 16,5 nm), ordenamento de poros e acidez superficial.

A adição de zircônio em menores proporções (razão molar Si/Zr = 15) combinado à inclusão do expansor de poros (TMB) levou a um material com estrutura mesocelular distribuída aleatoriamente (MCF – *mesostructured celular foam*), diâmetro de poro de 16,5 nm e uma acidez superficial moderada. Foi o adsorvente que apresentou mais altas capacidades de adsorção para as duas biomoléculas estudadas, a proteína BSA e a enzima celulase. No caso da BSA, as isotermas obtidas foram praticamente retangulares no pH estudado (4,8), o qual é idêntico ao pI da proteína e próximo aos pontos de carga zero dos adsorventes estudados (exceto os mais ácidos, Zr-SBA-5 e Zr-SBA-10). Atribui-se a superioridade da amostra Zr-SBA-15 a efeitos de acessibilidade proporcionados pelo seu maior diâmetro de poro, visto que a amostra de poros expandidos sem zircônio (S1) adsorve praticamente o mesmo que as amostras mais ácidas e todas possuem o mesmo diâmetro de poro. Já para o caso da celulase, as isotermas também foram obtidas em pH próximo tanto ao pI da enzima quanto ao ponto de carga zero dos adsorventes contendo zircônio. A não-linearidade das isotermas foi bem menos pronunciada que para a BSA, o que sugere que não há efeitos de exclusão importantes. A capacidade de adsorção para esta enzima parece estar relacionada à presença de uma acidez superficial fraca a moderada, pois as amostras Zr-SBA-15 e Zr-SBA-10 apresentaram equilíbrio de adsorção similar, a despeito de seus parâmetros texturais significativamente distintos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES – Brasil (5993/11-3), CNPq – Brasil (62/2008) e ao Projeto Espanha-Brasil pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Zhu J, Wang T, Xu X, Xiao P, Li J. Pt nanoparticles supported on SBA-15: Synthesis, characterization and applications in heterogeneous catalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2013;130–131:197-217.
2. Lu Q, Gao F, Komarneni S, Mallouk TE. Ordered SBA-15 nanorod arrays inside a porous alumina membrane. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:8650-1.
3. Vallet R, Mar, Colilla M, Izquierdo-Barba I. Bioactive Mesoporous Silicas as Controlled Delivery Systems: Application in Bone Tissue Regeneration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2008;4:1-15.

4. Zhao J, Gao F, Fu Y, Jin W, Yang P, Zhao D. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography. *Chemical Communications*. 2002:752-3.
5. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:6024–36.
6. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. 1998;279:548-52.
7. Luechinger M, Pirngruber GD, Lindlar B, Laggner P, Prins R. The effect of the hydrophobicity of aromatic swelling agents on pore size and shape of mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;79:41-52.
8. Liang Y, Anwander R. Synthesis of pore-enlarged mesoporous organosilicas under basic conditions. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;72:153-65.
9. Jana SK, Nishida R, Shindo K, Kugita T, Namba S. Pore size control of mesoporous molecular sieves using different organic auxiliary chemicals. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;68:133-42.
10. Sayari A, Kruk M, Jaroniec M, Moudrakovski IL. New Approaches to Pore Size Engineering of Mesoporous Silicates. *Advanced Materials*. 1998;10:1376-9.
11. Cheralathan KK, Hirata H, Ogura M. Assembling mode of alumina and zirconia particles inside the mesopores of SBA-15 under high loading. In: Antoine Gédéon PMAFB, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 174, Part A: Elsevier; 2008. p. 161-6.
12. Fuxiang L, Feng Y, Yongli L, Ruifeng L, Kechang X. Direct synthesis of Zr-SBA-15 mesoporous molecular sieves with high zirconium loading: Characterization and catalytic performance after sulfated. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2007;101:250-5.
13. Do DM, Jaenicke S, Chuah G-K. Mesoporous Zr-SBA-15 as a green solid acid catalyst for the Prins reaction. *Catalysis Science & Technology*. 2012;2:1417-24.
14. Szczodrowski K, Prélot B, Lantenois S, Douillard J-M, Zajac J. Effect of heteroatom doping on surface acidity and hydrophilicity of Al, Ti, Zr-doped mesoporous SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009;124:84-93.
15. Matsui M, Kiyozumi Y, Yamamoto T, Mizushina Y, Mizukami F, Sakaguchi K. Selective Adsorption of Biopolymers on Zeolites. *Chemistry – A European Journal*. 2001;7:1555-60.
16. Hartmann M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. *Chemistry of Materials*. 2005;17:4577-93.
17. Vinu A, Mori T, Ariga K. New families of mesoporous materials. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2006;7:753-71.

18. Klibanov AM. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. 1983;219:722 - 7.
19. Martin BD, Gaber BP, Patterson CH, Turner DC. Direct Protein Microarray Fabrication Using a Hydrogel “Stamper”. *Langmuir*. 1998;14:3971-5.
20. Vinu A, Murugesan V, Tangermann O, Hartmann M. Adsorption of Cytochrome c on Mesoporous Molecular Sieves: Influence of pH, Pore Diameter, and Aluminum Incorporation. *Chemistry of Materials*. 2004;16:3056-65.
21. Vinu A, Hartmann M. Adsorption of cytochrome c on MCM-41 and SBA-15: Influence of pH. In: E. van Steen MCalHC, editor. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Volume 154, Part C: Elsevier; 2004. p. 2987-94.
22. Li S, Wu Z, Lu M, Wang Z, Li Z. Improvement of the Enzyme Performance of Trypsin via Adsorption in Mesoporous Silica SBA-15: Hydrolysis of BAPNA. 2013;18:1138-49.
23. Hudson S, Magner E, Cooney J, Kieran B. Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109:19496-506.
24. Salis A, Bhattacharyya MS, Monduzzi M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114:7996-8001.
25. Ding Y, Yin G, Liao X, Huang Z, Chen X, Yao Y, et al. A convenient route to synthesize SBA-15 rods with tunable pore length for lysozyme adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;170:45-51.
26. Miyahara M, Vinu A, Ariga K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27:232-6.
27. Nguyen TPB, Lee J-W, Shim WG, Moon H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;110:560-9.
28. Diao X, Wang Y, Zhao J, Zhu S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2010;18:493-9.
29. Takimoto A, Shiomi T, Ino K, Tsunoda T, Kawai A, Mizukami F, et al. Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008;116:601-6.
30. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:7323-30.
31. Ji L, Katiyar A, Pinto NG, Jaroniec M, Smirniotis PG. Al-MCM-41 sorbents for bovine serum albumin: relation between Al content and performance. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;75:221-9.

32. Fulvio PF, Pikus S, Jaroniec M. Tailoring properties of SBA-15 materials by controlling conditions of hydrothermal synthesis. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15:5049-53.
33. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60:309-19.
34. Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K. *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*. San Diego, California: Academic Press; 1999. 467 p.
35. Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society*. 1951;73:373-80.
36. Hameed BH, Tan IAW, Ahmad AL. Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon. *Chemical Engineering Journal*. 2008;144:235-44.
37. Santos SML, Nogueira KAB, Gama MS, Lima JDF, Silva Júnior IJ, Azevedo DCS. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;180:284-92.
38. Rouquerol J, Rodriguez-Reinoso F, Sing KSW. *Characterization of Porous Solids III*. Amsterdam: Elsevier; 1994.
39. Lettow JS, Han YJ, Schmidt-Winkel P, Yang P, Zhao D, Stucky GD, et al. Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir*. 2000;16:8291-5.
40. Chen W-D, Dong X-Y, Sun Y. Analysis of diffusion models for protein adsorption to porous anion-exchange adsorbent. *Journal of Chromatography A*. 2002;962:29-40.
41. Sun J, Zhang H, Ma D, Chen Y, Bao X, Klein-Hoffmann A, et al. Alkanes-assisted low temperature formation of highly ordered SBA-15 with large cylindrical mesopores. *Chemical Communications*. 2005;0:5343-5.
42. Moreno EL, Rajagopal K. Desafios da acidez na catálise em estado sólido. *Química Nova*. 2009;32:538-42.
43. Araújo RS, Maia DAS, Azevedo DCS, Cavalcante Jr CL, Rodríguez-Castellón E, Jimenez-Lopez A. Assessment of surface acidity in mesoporous materials containing aluminum and titanium. *Applied Surface Science*. 2009;255:6205-9.
44. Elliott HA, Huang CP. Adsorption characteristics of some Cu(II) complexes on aluminosilicates. *Water Research*. 1981;15:849-55.

Capítulo 6

1 CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos de síntese utilizados levaram à obtenção de materiais adsorventes a base de sílica com propriedades texturais e estruturais, tais como diâmetro e volume de poros, bastante expressivos e potencialmente aplicáveis à adsorção de moléculas de dimensões nanométricas. Os estudos foram direcionados inicialmente para a determinação do tempo de equilíbrio e do pH do meio que favorecesse as interações entre os adsorventes e as biomoléculas (BSA, lisozima e celulase). Neste sentido, foi observado tempo de equilíbrio em geral menor que 300 minutos e capacidades máximas de adsorção com pH próximo ao pI das biomoléculas estudadas na maioria dos casos de adsorventes constituídos de sílica pura. Esta evidência experimental nos leva a crer que, em sílicas puras, o mecanismo fundamental de retenção está relacionado à acessibilidade da biomolécula à rede porosa (ou seja, à textura do adsorvente) e as interações adsorvente-adsorbato são do tipo forças de dispersão (van der Waals).

Em sínteses convencionais, sem a adição de agentes especiais para expansão de poros e encurtamento de canais, obtiveram-se sílicas do tipo SBA-15 com distintos ordenamentos de poro e propriedades texturais (por via sol-gel e hidrotérmica) e SBA-16. Apesar da SBA-15 (rota sol-gel) e da SBA-16 apresentarem mesmo volume de poro, a lisozima adsorve muito mais na sílica com poros paralelos (cerca de cinco vezes mais). Por ser uma biomolécula relativamente pequena, parece empacotar-se melhor em materiais ordenados. Quanto a SBA-16, capacidades de adsorção mais baixas eram esperadas e foram obtidas para todas as biomoléculas estudadas, devido à natureza da sua própria estrutura, uma vez que apresenta uma estrutura cúbica de corpo centrado ligado por poros de acesso estreitos. No entanto, a adsorção de celulase por este material (473 mg/g), descrita pela primeira vez neste trabalho, ultrapassa as adsorções de outras biomoléculas, e esta pode ser uma característica interessante para ser explorado nos processos de separação cromatográfica desta enzima.

A adição de TMB à síntese hidrotérmica convencional de SBA-15 contribuiu exitosamente para a expansão dos poros, não obstante materiais com textura porosa semelhante podem ser obtidos na ausência de TMB sob condições adequadas de síntese hidrotérmica.

A adição de fluoreto de amônio e heptano tende a produzir materiais muito desordenados, do tipo MCF (*mesostructured cellular foam*), aparentemente com poros mais curtos. Apesar das áreas de superfície significativamente mais baixas em relação aos materiais mais ordenados, as sílicas preparadas com TMB e NH_4F tem capacidades de adsorção significativamente mais elevadas para as biomoléculas estudadas (BSA, lisozima e celulase) em pH próximo ao respectivo pI. Nestes materiais expandidos, as isotermas das proteínas são bastante retangulares, o que podem ser uma característica interessante para fins de imobilização, enquanto que são bastante suaves (tendendo à linearidade) no caso da enzima celulase.

A introdução de acidez superficial mediante a adição de uma fonte de zircônio à síntese mostrou que o material mesoporoso modificado com maior razão Si/Zr (= 15) tem um número significativo de sítios ácidos fracos e médios (e ausência de sítios fortes), tendo este apresentado maior capacidade de adsorção para BSA e CEL nas condições em que o presente estudo foi realizado. Maiores teores de zircônio introduzem sítios com alta força ácida, que levam a uma menor capacidade de adsorção. No entanto, no caso da BSA, o efeito de retenção preponderante parece ser a acessibilidade aos poros, pois adsorventes com menor razão Si/Zr (10 e 5) e sem zircônio tem isotermas de adsorção praticamente idênticas e propriedades texturais muito similares.

2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Com o objetivo de se determinar com maior precisão a quantidade de heteroátomo efetivamente introduzida nas sílicas modificadas e estabelecer com mais refinamento a natureza das fases ativas, recomenda-se caracterizar os suportes mesoporosos por outras técnicas como Fluorescência de Raios-X (FRX), Ressonância Magnética Nuclear de silício e zircônio (RMN) e Estrutura Fina de Raios-X Absorvidos (EFXA).
- No que se refere à discriminação da acidez dos compostos, também seria interessante realizar as análises de volumetria de n-butilamina,

termodesorção de ciclohexilamina e adsorção de piridina para verificar a presença ou não dos sítios ácidos de Lewis e de Brønsted.

- Obter os parâmetros fundamentais de equilíbrio e de transporte de massa da BSA, LYS e CEL nas sílicas mesoporosas sintetizadas neste trabalho, particularmente as amostras SBA-15 HD (capítulo 3), S2 (capítulo 4) e Zr-SBA-15_15 (capítulo 5) em condições de distintas forças iônicas para avaliar condições de eluição.
- Realizar estudos de adsorção e dessorção das biomoléculas com estes materiais em leito fixo, assim como experimentos de adsorção utilizando misturas de biomoléculas para fins de separação.
- Realizar estudos de medidas da atividade enzimática ou resposta fisiológica das biomoléculas dessorvidas ou imobilizadas para avaliar se as condições de adsorção não alteraram sua funcionalidade.

Anexo

ANEXO 1: Cópia da primeira página do artigo publicado. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.06.043>

Microporous and Mesoporous Materials 180 (2013) 284–292



Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micromeso



Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules



Sandra Maria Lopes dos Santos, Karina Alexandre Barros Nogueira, Marlon de Souza Gama, Jeann Diniz Ferreira Lima, Ivanildo José da Silva Júnior, Diana Cristina Silva de Azevedo*

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, S/N, Bloco 710, CEP: 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2013
Received in revised form 28 June 2013
Accepted 29 June 2013
Available online 12 July 2013

Keywords:

Separation
Adsorption isotherm
Protein
Enzyme
Silica

ABSTRACT

The present work describes the adsorption of biomolecules (bovine serum albumin (BSA), lysozyme (LYS) and cellulase (CEL)) on ordered mesoporous silicas with different pore diameters (SBA-15 and SBA-16) from buffered solutions. These adsorbents were synthesized by sol-gel and hydrothermal routes and characterized by X-ray diffraction, N₂ adsorption/desorption isotherms and transmission electron microscopy (TEM). The results by X-ray diffraction and TEM show that the synthesized materials have distinct degrees of mesoporous ordering. The influence of pH on the adsorption of BSA, LYS and CEL as well the kinetics and adsorption isotherms were evaluated in stirred tanks. Among the materials studied, hydrothermally synthesized SBA-15 showed the highest maximum adsorption capacity of BSA and LYS (329 and 636 mg/g, respectively). CEL was best adsorbed in SBA-15 synthesized by the sol-gel route.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In 1992, it was first reported the discovery of mesoporous materials belonging to the M41S family [1,2]. Out of these, two materials have been highlighted, the MCM-41, obtained in basic media route and SBA-15, and obtained in acid media.

SBA-15 (Santa Barbara Amorphous), developed in 1998 by Zhao et al. [3], has attracted intense interest due to their large surface areas, well-defined pore structure, inert framework, nontoxicity, high biocompatibility [4] and thermal and hydrothermal stability [5], which allows them to be used in catalysis [6,7], adsorption [8–10], chemical sensing [11], immobilization [12], drug delivery systems [13,14] and separation by chromatographic techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) [15–17].

Another mesoporous adsorbent that has received attention is the SBA-16 whose formation mechanism is similar to that of SBA-15 [18–22]. The easiness of the method of preparation, the orderly structure, and control over the size and shape of their pores, above all of these factors, makes SBA-16 a versatile material, potentially applicable in many areas of science and engineering of materials [23]. Although it is reported in the literature the application of SBA-16 in fields such as catalysis [24–26], functionalization [27], metals incorporation [28] and templating [29,30], there are a few records [31] of the use of such materials for adsorption/chromatographic purposes.

Both SBA-15 as SBA-16 are synthesized in acidic media in the presence of triblock copolymer surfactants Pluronic P123 (PEO20P-PO70PEO20) [3] and Pluronic F127 (PEO106PPO70PEO106) [18], respectively. However, the resulting materials have very distinct structures, as shown in Fig. 1. SBA-15 is a mesoporous silica with parallel pores and highly ordered hexagonal arrangement (see Fig. 1a). It has the benefits of combined micro and mesoporosity and relatively thick silica walls. The micropores are created by the penetration of the hydrophobic ethylene oxide chain in the silica walls [32]. On the other hand, SBA-16 is a mesoporous silica having a structure of spherical body-centered nanocages with cubic arrangement, wherein each sphere is connected to eight neighboring spheres [33] (see Fig. 1b). For operations such as catalysis or separations, this difference in structure may favor or not the efficiency of the process. For example, Li et al. [34] found that the encapsulation of Ru complexes in nanocages of SBA-16 is an efficient method to achieve high catalytic activity by enhancing water oxidation. Data on application of SBA-16 in the adsorption of biomolecules are scarce, hence it is yet to be investigated if this structure model could positively influence the separation of these bulking biomolecules.

Some authors have recently reported the use of synthetic hydrogels known as Layered Double Hydroxides [35–37] and mesostructured cellular foams (MCF) [38] as new potential adsorbents for biomolecules. These materials have shown high adsorption capacity for standard proteins, for example bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA), lysozyme (LYS) and myoglobin (Mb).

* Corresponding author. Tel.: +55 8533669611; fax: +55 8533669610.
E-mail address: diana@spsa.ufc.br (D.C.S. de Azevedo).