

TREVISAN

IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE
OXIDASE EM SUPORTES
SILÍCIOS

Este exemplar corresponde à Redação
Final da Tese Defendida por
Henrique Celso Trevisan e aprovada
pela Comissão julgadora em
29/01/90.

Henrique Celso Trevisan

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia de Campinas

Engenharia Química

"Imobilização de Glicose Oxidase
em Suportes Silícicos"

Autor: Henrique Celso Trevisan

Tese submetida à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Campinas - UNICAMP como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de "MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA".

Aprovada por:



Prof. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei

(Orientadora)



Prof. Dra. Maria Helena A. Santana



Prof. Dr. Edison Bittencourt

Campinas - SP - Brasil

29 de Janeiro de 1990

A minha esposa

Angela

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei, pela orientação e apoio na realização desse trabalho,

Ao Dr. Mário Camargo, da Biolab, pelo fornecimento de alguns reagentes necessários à realização desse trabalho,

Ao Técnico Walter Mariano, da Universidade Federal de São Carlos, pela pronta colaboração nas análises de porosidade,

Aos Profs. Drs. Nelson Duran, Anita Jocelyne Marsaioli e Paulo Imamura, do Instituto de Química da UNICAMP, pela valiosa colaboração no uso de instrumentos,

À Angela, pelo apoio e colaboração na elaboração desse trabalho,

À Profra. Dra. Gisella Maria Zanin, da Fundação Universidade Estadual de Maringá, pela troca de idéias,

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química que colaboraram no desenvolvimento desse trabalho,

Ao CNPq, pelo apoio financeiro na aquisição de aparelhos, e

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

RESUMO

Sílica gel macroporosa foi obtida pelo tratamento hidrotérmico da sílica gel microporosa, preparada a partir de silicato de sódio e ácido clorídrico, a temperatura ambiente. A sílica porosa, classificada em diferentes tamanhos de partícula, e um tipo de terra de diatomáceas (celite 545) foram analisados em termos de tamanho de poros pelo método de introdução de mercúrio por pressão. A sílica gel com diferentes tamanhos de partícula, celite 545 e vidro não poroso foram examinados quanto à possibilidade de serem utilizados como suportes para imobilização de glicose oxidase (EC 1.1.3.4), catalisando a oxidação de glicose para glicolactona. A enzima foi ligada a derivados alquilamino dos suportes utilizando-se glutaraldeído e a efetividade do método foi comparada em relação ao tamanho das partículas e dos poros. A performance da enzima imobilizada foi estudada em reator de leito fluidizado, utilizando ar como fonte de oxigênio.

ABSTRACT

Macroporous silica gel was obtained by hydrothermal treatment of a microporous silica gel, prepared from sodium silicate and hydrochloric acid, at room temperature. The macroporous silica, sieved in different particle sizes, and one grade of diatomaceous earth (celite 545) were analysed in terms of pore sizes by the mercury intrusion pressure method. Silica gel of different particle sizes, celite 545 and nonporous glass were examined for their suitability as support materials for glucose oxidase (EC 1.1.3.4) immobilization, catalysing the oxidation of glucose to glucolactone. The enzyme was coupled to the alkylamine derivatives of the supports by glutaraldehyde, and the effectiveness of the method was compared in relation to the particle and pore sizes. The performance of the immobilized enzyme was studied in a fluidized bed reactor using air as oxygen source.

INDICE

CAPÍTULO I - ENZIMAS E IMOBILIZAÇÃO

1 - Introdução	01
2 - Enzimas	03
2.1 - Generalidades	03
2.2 - Enzimas como Catalisadores	07
2.2.1 - Nomenclatura	07
2.2.2 - Características	08
2.2.3 - Atuação das Enzimas	09
2.2.4 - Cinética Enzimática	10
2.3 - Glicose Oxidase: Características e Apli- cações	15
2.3.1 - Características	15
2.3.2 - Aplicações	18
3 - Métodos e Suportes na Imobilização de Enzimas ...	19
3.1 - Métodos de Imobilização	19
3.1.1 - Ligação a Suportes Insolúveis	20
3.1.2 - Ligações Cruzadas	28
3.1.3 - Oclusão	29
3.1.4 - Imobilização de Enzimas Solúveis ..	32
3.2 - Comparação entre os Métodos de Imobili- zação	33
3.3 - Efeito da Imobilização nas Caracte- rísticas das Enzimas	35
3.3.1 - Efeitos Estéricos	35
3.3.2 - Efeitos de Partição	35
3.3.3 - Efeitos de Transferência de Massa .	36
3.4 - Seleção do Suporte	37

4 -	Reatores para Enzimas Imobilizadas	39
4.1 -	Reatores de Batelada	40
4.2 -	Reatores Contínuos	40
5 -	Imobilização da Glicose Oxidase	42
6 -	Objetivos	45

CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL

1 -	Materiais	46
1.1 -	Reagentes	46
1.2 -	Instrumentação	47
2 -	Preparo das Soluções	47
3 -	Métodos	48
3.1 -	Obtenção dos Suportes	48
3.1.1 -	Celite	48
3.1.2 -	Vidro	49
3.1.3 -	Sílica	50
3.2 -	Derivação Alquilamina dos Suportes	52
3.3 -	Derivação Arilamina dos Suportes	55
3.3.1 -	Síntese do Cloreto de 3,5-Dinitro- benzoíla	55
3.3.2 -	Funcionalização do Suporte	56
3.4 -	Ativação dos Suportes e Imobilização da Enzima	58
3.4.1 -	Via Glutaraldeído	58
3.4.2 -	Via Diazotização	59
3.5 -	Testes de Atividade da Glicose Oxidase	60
3.6 -	Reatores Utilizando Glicose Oxidase Imobilizada	62

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Preparação e Caracterização dos Suportes	66
1.1 - Sílica	66
1.2 - Celite	69
2 - Estudo da Silanização	70
3 - Análise da Glicose Oxidase	72
3.1 - Análise da Concentração de Glicose Oxidase	72
3.2 - Análise da Atividade	73
4 - Imobilização da Glicose Oxidase	78
4.1 - Comparação entre os Métodos de Imobili- zação	78
4.2 - Determinação do Tempo de Imobilização	79
4.3 - Determinação da Carga de Enzima na Sílica.	80
4.4 - Estudo da Imobilização	82
4.4.1 - Imobilização em Vidro	83
4.4.2 - Imobilização em Sílica	84
4.4.3 - Imobilização em Celite	86
5 - Caracterização da Enzima Imobilizada	88
5.1 - Atividade X pH	89
5.2 - Atividade X Temperatura	89
5.3 - Inativação Térmica	91
5.4 - Atividade X Concentração de Glicose	94
6 - Desempenho da Enzima em Reatores	95
<u>CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u>	103
Bibliografia	106

CAPÍTULO I - ENZIMAS E IMOBILIZAÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos seres vivos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições muito brandas, geralmente em soluções aquosas neutras, a temperatura e pressão ambientes. As enzimas também se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agindo quase sobre um único substrato.

As enzimas são usadas há muito tempo, mesmo antes de serem conhecidas, e seu uso estendeu-se gradualmente à produção de bebidas, alimentos, têxteis e medicina. O desenvolvimento da bioquímica, a elucidação dos mecanismos de reação e o desenvolvimento de novas fontes de enzimas diversificaram as suas aplicações.

Embora as enzimas sejam catalisadores eficientes, não são catalisadores ideais do ponto de vista prático, principalmente por serem instáveis, não tolerando solventes orgânicos e temperaturas elevadas. De forma a se conseguir um catalisador eficiente e estável, dois caminhos estão sendo investigados: um deles consiste em se sintetizar compostos que tenham atividade semelhante às enzimas (chamados sinzimas) e o outro consiste em se modificar a estrutura das enzimas produzidas por seres vivos, de forma a torná-las mais estáveis [9]. O método de imobilização se enquadra nesse segundo caminho citado. Uma enzima imobilizada ativa, que seja estável e insolúvel em água poderá ser usada da mesma maneira

que um catalisador químico sólido, com as vantagens da especificidade e das condições brandas de reação, minimizando o consumo de energia e a formação de subprodutos.

Em 1916, Nelson e Griffin [1] constataram que a enzima invertase, adsorvida em carvão ativado, tinha a mesma atividade que a enzima solúvel. Em 1948, Summer [2] descobriu que uma forma insolúvel da urease, precipitada em etanol 30% com cloreto de sódio, continuava ativa. Apesar dessas descobertas, a primeira tentativa de se imobilizar uma enzima com o objetivo de melhorar suas propriedades foi feita em 1953, por Grubhofer e Schleith [3], que imobilizaram carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease numa resina poliaminopoliestireno diazotizada. Na década de 1950, menos que dez trabalhos foram publicados a respeito do assunto. Os trabalhos começaram a aparecer no início da década de 60 e a se desenvolver extensamente no início da década de 70. O campo de aplicações para as enzimas imobilizadas tem se estendido recentemente, além da síntese química, para outras áreas como a cromatografia por afinidade e a área analítica, por exemplo.

Em 1986 foi defendido o primeiro trabalho de tese da Engenharia Química da UNICAMP no campo de imobilização de proteínas [L. Peres, Tese de Mestrado em Engenharia Química, UNICAMP, 1986]. Nesse trabalho foi pesquisado o uso de suportes poliméricos na imobilização de antígenos da doença de chagas, para realização de testes Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) em análises clínicas rotineiras. O campo de tratamento de superfícies dentro da Engenharia Química ficou, desta maneira, aberto a futuras pesquisas, atendendo aos mais diversos campos de aplicação. Em 1988, outro trabalho nessa linha demonstrou a habilidade desses

suportes poliméricos em imobilizar invertase e glicoamilase, enzimas de grande interesse [V.L.Cardoso, Tese de Mestrado em Engenharia Química, UNICAMP, 1988].

Dando continuidade a esses trabalhos, no sentido de contribuir na área de materiais aplicados à biotecnologia, começou-se a estudar o uso de suportes inorgânicos na imobilização de proteínas. Escolheu-se inicialmente para imobilização a enzima HRP (Horseradish Peroxidase), devido a seu uso na eliminação de aminas aromáticas carcinogênicas de resíduos aquosos [A.M.Klibanov, E.D.Morris, *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 119-122 (1981)]. Devido a dificuldade de se obter a enzima HRP e ao seu alto custo, optou-se então pela imobilização da enzima glicose oxidase, cujas aplicações estão apresentas na pag. 18.

O trabalho desenvolvido objetiva um estudo mais detalhado no campo de imobilização de enzimas, enfatizando principalmente o desenvolvimento das técnicas de imobilização, como uma introdução à realização de outros trabalhos na área.

2 - ENZIMAS

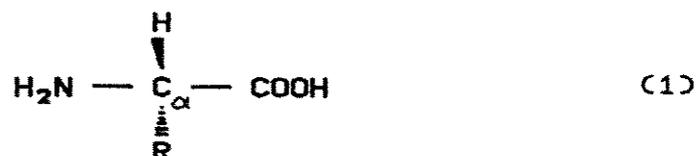
2.1 - GENERALIDADES

Proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes da célula, constituindo 30-70 % de sua massa seca. Elas contém os quatro elementos biológicos predominantes (C, O, H, N) e S, que contribui para a estabilização da estrutura tridimensional na maioria das proteínas, pela formação da ligação dissulfeto (S-S) em diferentes posições da cadeia polimérica. O tamanho da cadeia

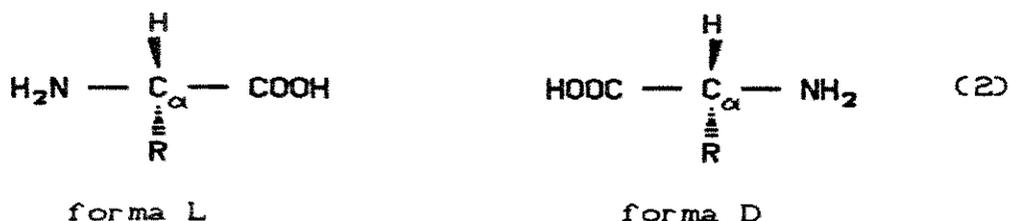
polimérica varia na faixa de pesos moleculares de 10^5 - 10^6 e as duas principais configurações encontradas são a fibrosa e a globular.

As proteínas cuja função exercida é a catálise são denominadas enzimas, que determinam as taxas de reações químicas ocorrendo dentro da célula. As enzimas são encontradas em diversos locais dentro da célula, podendo estar dispersas no citoplasma, ligadas a membranas ou em associação com estruturas moleculares maiores.

Os blocos monoméricos que constituem as proteínas são os α -aminoácidos, cuja estrutura geral é



Os aminoácidos se diferenciam pelo grupo R ligado ao carbono α como mostra a fórmula (1), que é assimétrico (possui quatro grupos diferentes, com exceção da glicina). A existência desse carbono assimétrico implica em dois isômeros óticos:



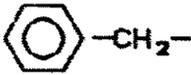
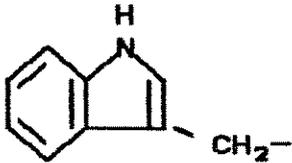
Esse isomerismo é muito importante, pois os microorganismos, devido às suas enzimas, geralmente agem sobre apenas um dos isômeros, deixando a outra forma intacta.

Na Tabela I.1 [80, pag. 58] estão representados os vinte

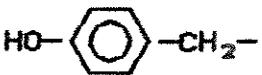
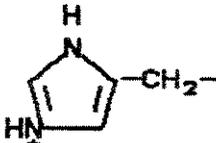
principais aminoácidos encontrados nas proteínas. O grupo R pode ser não polar (de caráter hidrofóbico) ou polar (de caráter hidrofílico), determinando o papel executado e a estrutura da proteína.

TABELA I.1 - OS 20 AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS NAS PROTEÍNAS (GRUPO R)

Hidrofóbicos

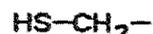
Glicina (Gly)	Alanina (Ala)	Valina (Val)	Leucina (Leu)
H-	CH ₃ -	(CH ₃) ₂ -CH -	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -
Metionina (Met)	Fenilalanina (Phe)	Triptofano (Trp)	
CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	 -CH ₂ -		
Isoleucina (Ile)			
CH ₃ -CH ₂ -CH-			
CH ₃			

Hidrofílicos

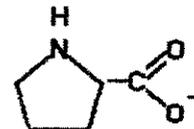
Serina (Ser)	Treonina (Thr)	Lisina (Lys)	Tirosina (Tyr)
HO-CH ₂ -	CH ₃ -CH-	⁺ H ₃ N-(CH ₂) ₄ -	HO-  -CH ₂ -
	OH		
Asparagina (Asn)	Glutamina (Glu)	Arginina (Arg)	
H ₂ N-C-CH ₂ -	H ₂ N-C-CH ₂ -CH ₂ -	H ₂ N-C-NH-(CH ₂) ₃ -	
O	O	NH ₂ ⁺	
Ácido Aspártico (Asp)	Ácido Glutâmico (Glu)	Histidina (His)	
⁻ O-C-CH ₂ -	⁻ O-C-(CH ₂) ₂ -		
O	O		

Outros

Cisteína (Cys)



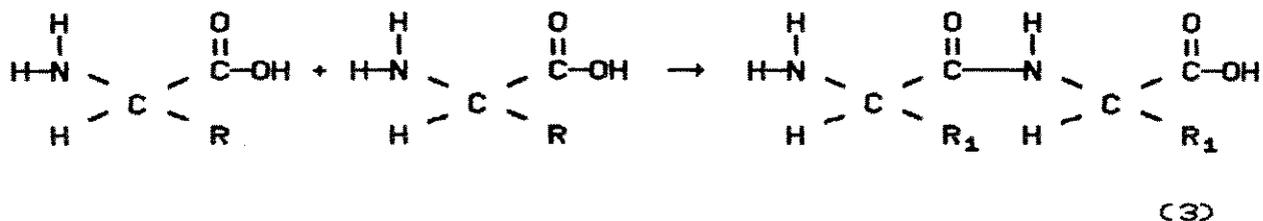
Prolina (Pro)



(molécula inteira)

Ref: [80, pag. 58]

Proteínas simples são formadas pela condensação de aminoácidos através da ligação peptídica:



O fragmento aminoácido mantido após a ligação peptídica é chamado resíduo e designado pela terminação il (ex.: glicil, alanil, etc.). A listagem da seqüência de resíduos de uma proteína começa no grupo ácido terminal.

Os aminoácidos não são os únicos constituintes das proteínas, que podem conter outros grupos orgânicos ou mesmo inorgânicos. Essa outra parte das chamadas proteínas conjugadas é denominado grupo prostético.

A estrutura das proteínas pode normalmente ser descrita em três níveis, embora um quarto nível seja necessário no caso de existência de mais de uma cadeia simples [31]. As interações que ocorrem a cada nível de estrutura são:

primárias- seqüência de aminoácidos, condensados pela ligação peptídica. Isto, na verdade, não é uma estrutura como costumamos nos referir, mas apenas uma identificação dos aminoácidos que compõe a cadeia.

secundárias- determinada principalmente pelas ligações peptícas mais as pontes de hidrogênio, são responsáveis pela conformação da cadeia. Existem dois tipos de estrutura secundárias predominantes na natureza: a) Helicoidal, predominante nas proteínas globulares, sendo a α -hélice a mais estável; b) Folha Pregueada, predominante nas proteínas fibrilares.

terciárias- enrolamento e dobramento da cadeia, induzido por pontes de hidrogênio, interações não covalentes (dipolares,

eletrostáticas não polares ou de Van der Waals e ligações dissulfídicas covalentes).

quaternárias- associação de duas ou mais estruturas terciárias através de ligações não covalentes; as interações não polares são as mais comuns.

Após essa abordagem geral a respeito da estrutura básica da enzima (uma proteína), passa-se a considerar a sua atuação específica.

2.2 - ENZIMAS COMO CATALISADORES

2.2.1 - NOMENCLATURA [31]

Não há um esquema de nomenclatura que seja aplicado a todas as enzimas; na maioria dos casos, entretanto, o nome da enzima deriva do que ela faz, e não do que ela é: o sufixo -ase é adicionado ao nome do substrato (urease catalisa a decomposição da uréia) ou da reação (álcool desidrogenase catalisa a degradação oxidativa de um álcool). Excessões a essa nomenclatura são as enzimas familiares, como pepsina, tripsina e renina. Há seis principais classes de reações catalisadas por enzimas que formam a base para o sistema de classificação da "Enzyme Commission (EC)", atribuindo números para todas as enzimas (Tabela I.2). Embora a nomenclatura empregada seja normalmente a tradicional, o sistema EC oferece uma relação organizada do campo de aplicação das enzimas [80, pag 87]:

TABELA I.2 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS EC

1- Oxidredutases (reações de oxidação-redução)	
1.1- $\begin{array}{c} \text{CH} - \text{OH} \\ \end{array}$	1.4- $\begin{array}{c} \\ \text{CH} - \text{NH}_2 \end{array}$
1.2- $\begin{array}{c} \text{C} = \text{O} \\ \end{array}$	1.5- $\begin{array}{c} \\ \text{CH} - \text{NH} - \end{array}$
1.3- $\text{CH} = \text{CH} -$	1.6- NADP, NADPH
.....	
2- Transferases (transferência de grupos funcionais)	
2.1- grupos de um carbono
2.2- grupo aldeídico ou cetônico	2.7- grupo fosfato
2.3- grupo acila	2.8- grupos contendo S
2.4- grupo glicosila
.....	
3- Hidrolases (reações de hidrólise)	
3.1- ésteres	3.4- ligações peptídicas
3.2- ligações glicosídicas	3.5- outras ligações C-N
.....	3.6- anidridos de ácido
.....	
4- Liases (adição a duplas)	5- Isomerases (reações de isomerização)
4.1- $\text{C} = \text{C}$	5.1- racemases
4.2- $\text{C} = \text{O}$
4.3- $\text{C} = \text{N}$
.....
.....	
6- Ligases (formação de ligações com quebra de ATP)	
6.1- $\text{C} - \text{O}$	6.3- $\text{C} - \text{N}$
6.2- $\text{C} - \text{S}$	6.4- $\text{C} - \text{C}$
.....

Ref: [31, Tabela 8.1]

2.2.2 - CARACTERÍSTICAS

Uma catalisador é um composto que aumenta a velocidade de uma reação química, sem acarretar uma mudança química permanente. Embora o catalisador altere a taxa de reação, diminuindo a energia de ativação requerida para que ela se complete, ele não afeta o seu equilíbrio.

A principal diferença entre um catalisador sintético e uma enzima é a especificidade. A maioria dos catalisadores sintéticos não são específicos, catalisando reações similares, envolvendo vários tipos de reagentes. O grau de especificidade das enzimas depende do seu papel biológico, não se podendo esperar, por exemplo, um alto grau numa enzima cuja função seja hidrolisar proteínas para produzir aminoácidos.

Outra característica das enzimas é a freqüente exigência de um cofator, um composto não protéico que combina-se com uma proteína inativa (apoenzima) para resultar num complexo cataliticamente ativo. Existem dois tipos de cofatores, os mais simples são íons metálicos e as coenzimas que são moléculas orgânicas complexas. A existência de cofatores é um ponto muito importante a se considerar na produção e aplicação de enzimas, mesmo porque enzimas com o mesmo nome, mas de diferentes fontes, podem exigir cofatores diferentes.

Outra diferença entre os catalisadores sintéticos e as enzimas é que as últimas exigem um manuseio cuidadoso, pois é relativamente fácil perturbar a configuração nativa da enzima e destruir suas propriedades catalíticas.

2.2.3 - ATUAÇÃO DAS ENZIMAS

Embora não haja uma teoria simples que explique a atividade e a especificidade da catálise enzimática, há vários fenômenos, baseados em evidências experimentais, que podem ser combinados de modo a conferir características especiais às enzimas. A ação da enzima ocorre através da formação do complexo

enzima-substrato, pela região da enzima denominada sítio ativo, onde ocorre posteriormente a reação e os produtos são liberados. A ligação enzima-substrato geralmente ocorre devido a forças de atração fracas, como pontes de hidrogênio, embora algumas ligações do tipo covalente sejam conhecidas. Acredita-se que apenas uma pequena fração da enzima participa do sítio ativo, sendo que o restante dos aminoácidos determina a sua estrutura espacial adequada para a catálise.

Há algumas teorias sobre a maneira como a enzima atua sobre o(s) substrato(s):

1- efeito da proximidade: a enzima "segura" o substrato de forma que os grupos catalíticos da enzima e o(s) grupo(s) reativo(s) do substrato estejam próximos,

2- efeito de orientação: a enzima orienta o substrato para a posição mais favorável à reação,

3- acoplamento induzido: algumas medidas feitas de forma a avaliar mudanças na estrutura da enzima, devido à interação com o substrato, evidenciam uma molécula levemente flexível, cuja estrutura se ajusta de modo a acoplar o substrato, e vai se alterando a medida que a reação progride, de forma a acelerar a transformação de cada intermediário.

2.2.4 - CINÉTICA ENZIMÁTICA

Um experimento típico para medir a cinética enzimática consiste em se misturar, em tempo zero, soluções de substrato e enzima, purificados, num recipiente com agitação moderada, fechado e isotérmico, contendo uma solução tampão para controle de pH. A

concentração de substrato e/ou produto é monitorada à medida que a reação se processa. Tipicamente, são usados dados relativos à velocidade inicial de reação, pois nesse ponto as concentrações são bem conhecidas. A inclinação inicial da curva de substrato, ou produto, em relação ao tempo é estimada a partir dos dados:

$$dp/dt|_{t=0} = - ds/dt|_{t=0} = v|_{t=0} \quad (4)$$

quando: $s = s_0$ = concentração inicial de substrato

$p = 0$ = concentração inicial de produto

Deve-se considerar, durante os estudos cinéticos, a possibilidade de degradação da enzima durante o experimento.

Devido ao fato das enzimas serem obtidas como uma mistura de diversas proteínas, que dificilmente podem ser separadas e dosadas individualmente, não se mede a quantidade de enzima pela "massa de enzima", mas sim pelo número de unidades de atividade. Uma unidade significa a quantidade de enzima que oferece uma certa atividade catalítica sob condições padrões fixadas para esta enzima; por exemplo, uma unidade de glicose oxidase pode ser especificada como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 μmol de glicose (ou de oxigênio), durante um minuto, a 25 °C, em tampão citrato-fosfato 0,05 M e pH 5.5. A flexibilidade em relação à definição da atividade, sem uma norma padronizada, faz com que uma mesma enzima seja dosada em condições de reação e em sistemas de unidades diferentes, não permitindo uma comparação direta dos valores disponíveis na literatura.

A modelagem dos dados cinéticos pode ser feita através da adoção de um mecanismo de reação, seu equacionamento e ajuste dos parâmetros a partir de dados experimentais. O tratamento pro-

posto por Michaelis-Menten é o mais simples usado e geralmente aplicado como uma derivação de mecanismos mais complicados, sendo, por isso, apresentado aqui. Como mecanismo de reação, assume-se a formação de um complexo ES (enzima-substrato) que pode se dissociar em E + P, ou liberar novamente o substrato:



Por questão de simplicidade, nas equações abaixo considera-se: $e = [E]$, $(es) = [ES]$, $e_0 = [E_0]$ e $s = [S]$

Para a reação em equilíbrio (5) define-se a constante de dissociação

$$K_m = e \cdot s / (es) = k_{-1} / k_1 \quad (7)$$

onde (es) é a concentração do complexo ES.

A formação irreversível do produto (6) é dada por

$$v = dp/dt = k_2 \cdot (es) \quad (8)$$

Um balanço de massa da quantidade de enzima fornece:

$$e + (es) = e_0 \quad (9)$$

Para um reator agitado fechado tem-se

$$v = -ds/dt = k_1 s \cdot e - k_{-1} (es) \quad (10)$$

$$d(es)/dt = k_1 s \cdot e - (k_{-1} + k_2)(es) \quad (11)$$

$$t = 0 \rightarrow s(0) = s_0, (es)(0) = 0 \quad (12)$$

Pouco depois de se iniciar a reação, quando pode ser adotada a aproximação do estado quasi-estacionário, tem-se

$$d(es)/dt = 0 \quad (13)$$

Substituindo (13) nas equações anteriores e eliminando e e (es) , tem-se:

$$v = - ds/dt = \frac{k_2 e_0 s}{((k_{-1} + k_2)/k_1) + s} \quad (14)$$

Fazendo $v_{\max} = k_2 e_0$ e $k_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, resulta na equação de Michaelis-Menten:

$$v = - ds/dt = \frac{v_{\max} \cdot s}{k_m + s} \quad (15)$$

A avaliação de v_{\max} e k_m é feita rearranjando-se a equação de Michaelis-Menten de forma a se adaptá-la melhor aos dados experimentais. Têm-se, dessa forma, as seguintes equações derivadas:

a) Equação Original

$$v = v_{\max} \cdot s / (k_m + s) \quad (16)$$

b) Equação de Lineweaver-Burk

$$1/v = 1/v_{\max} + (k_m/v_{\max}) \cdot (1/s) \quad (17)$$

c) sem denominação

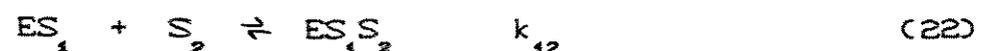
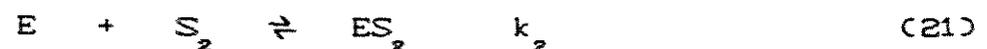
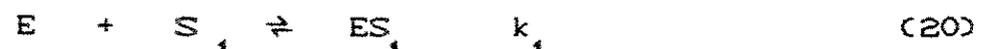
$$s/v = k_m/v_{\max} + (1/v_{\max}) \cdot s \quad (18)$$

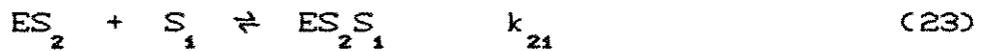
d) Equação de Eadie-Hofstee

$$v = v_{\max} - k_m \cdot v/s \quad (19)$$

Para se obter maior precisão, deve-se medir v_{\max} por b) ou c) e retornar-se a a) para calcular-se o valor de k_m e de $v_{\max}/2$.

No caso de reações envolvendo dois substratos, uma possível seqüência de reações é a seguinte:





k_1 , k_2 , k_{12} e k_{21} são as constantes de dissociação no equilíbrio.

A taxa de reação é

$$v = k.(e.s_1.s_2) \quad (25)$$

Assumindo equilíbrio nas reações (20-23) chega-se a:

$$v = \frac{k.e_0}{1 + \frac{k_{21}}{s_1} + \frac{k_{12}}{s_2} + \frac{1/2(k_2 k_{21} + k_1 k_{12})}{s_1 s_2}} \quad (26)$$

Fazendo-se a aproximação para o estado estacionário pode-se chegar a uma equação geral, mas com muitos parâmetros, do ponto de vista prático. Observa-se que no equilíbrio $k_1 k_{12} = k_2 k_{21}$ e, rearranjando-se a equação (26), chega-se na forma familiar:

$$v = v_{\max}^* . s_1 / (k_1^* + s_1) \quad (27)$$

onde
$$v_{\max}^* = k.e_0.s_2 / (s_2 + k_{12}) \quad (28)$$

$$k_1^* = (k_{21}.s_2 + k_1.k_{12}) / (s_2 + k_{12}) \quad (29)$$

Isso significa que no caso de reações envolvendo dois substratos, se s_2 for mantido constante e s_1 for variado, a reação seguirá a cinética de Michaelis-Menten. Pelas equações (28) e (29) pode-se verificar que os valores de v_{\max}^* e k_1^* dependerão de s_2 . A forma original da equação de Michaelis-Menten pode ser verificada, na prática, quando um substrato está em grande excesso, de forma que $v_{\max}^* \rightarrow k.e_0$ e $k_1^* \rightarrow k_{21}$; aproximações que serão válidas quando $s_2 \gg k_{12}$.

2.3 - GLICOSE OXIDASE: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

2.3.1 - CARACTERÍSTICAS

Após uma dissertação geral a respeito das enzimas, sua forma de atuação e cinética de reações, passa-se a considerar o caso específico da enzima glicose oxidase, utilizada no trabalho experimental aqui apresentado.

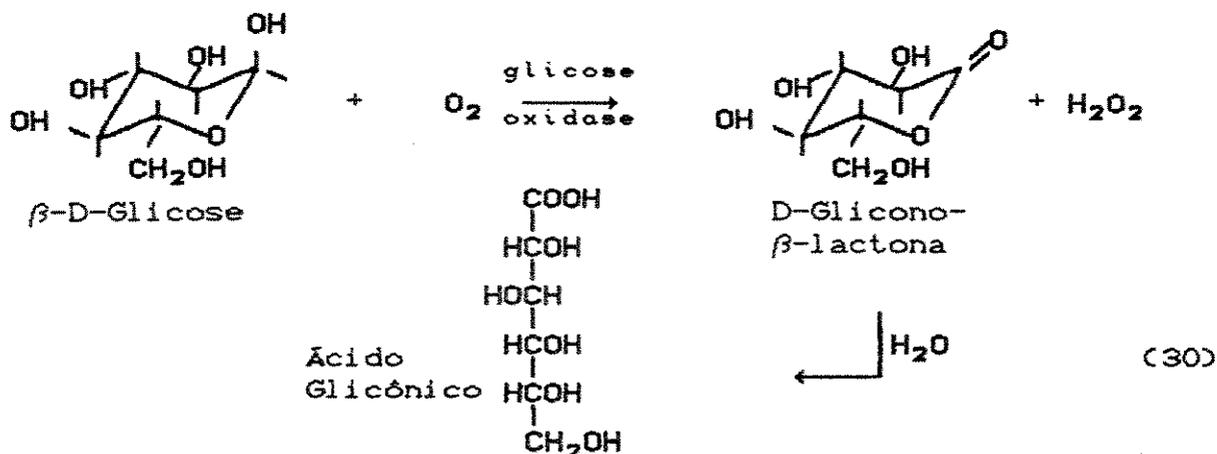
A enzima glicose oxidase é classificada, de acordo com o sistema da "Enzyme Commission", com E.C.1.1.3.4, correspondente às seguintes características:

1.- oxidoreductase (catalisa reações de oxi-redução)

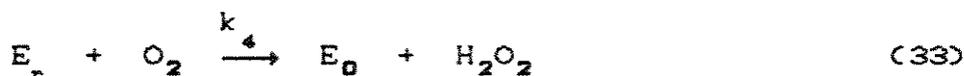
1.1.- atua no grupo $-\text{CH}-\text{OH}$

1.1.3.- usa oxigênio como acceptor de elétrons

A reação catalisada pela glicose oxidase é:



O mecanismo de reação sugerido, que se adapta aos dados experimentais [78] é, onde G = glicose:



e a taxa de reação sugerida [78]:

$$v = \frac{k \cdot [E]}{1 + k_m/[S] + k'_m/[O_2]} = \frac{k \cdot [E]}{1 + \frac{k}{k_{red} \cdot [G]} + \frac{k}{k_{ox} \cdot [O_2]}} \quad (34)$$

onde $k = k_2$, $[E] = \text{enzima total} = [E_r] + [E_o]$

$$k_m = (k_{-1} + k_2)/k_4, \quad k_{ox} = k_4, \quad k'_m = k_2/k_4$$

$$k_{red} = k_1 \cdot k_2 / (k_{-1} + k_2)$$

Como nos experimentos a glicose está sempre em grande excesso em relação ao O_2 , a equação (34) pode se tornar:

$$v = v_{max} \cdot [O_2] / ([O_2] + k_m) \quad (35)$$

onde

$$k_m = \frac{k \cdot k_{red} \cdot [G]}{k_{ox} \cdot k_{red} \cdot [G] + k \cdot k_{ox}} \quad (36)$$

$$v_{max} = \frac{k \cdot k_{red} \cdot [E] \cdot [G]}{k_{red} \cdot [G] + k} \quad (37)$$

Rearranjando-se as equações (35-37), tem-se as equações para caracterização cinética da enzima:

$$[O_2]/v = k_m/v_{max} + [O_2]/v_{max} \quad (38)$$

$$1/k_m = (k_{ox}/k_{red}) \cdot (1/[G]) + k_{ox}/k_{red} \quad (39)$$

$$1/v_{max} = 1/(k \cdot [E]) + 1/(k_{red} \cdot [E]) + 1/[G] \quad (40)$$

Experimentalmente, mede-se k_m e v_{max} em várias concentrações de glicose, plotando-se a equação (38) para cada concentração. Através desses dados, pela eq. (39), encontra-se k_{ox} e k_{red} . Encontra-se finalmente o valor de $k \cdot E$ pela eq. (40), determinando a equação da cinética de reação (34).

Em termos de especificidade, além de agir sobre a glicose, outros substratos podem ser oxidados pela glicose oxidase, mas com taxas de reação muito menores [77] como, por

exemplo: 6-metilglicose (1.85 % da taxa da D-glicose), manose (0,98 %), xilose (0,98 %), maltose (0,19 %), galactose (0,14 %).

A glicose oxidase é obtida de micélio de fungos como os *Aspergilli* e *Penicillia* , e normalmente contém como impurezas catalase, invertase, maltase, amilase e celulase. É comercializada como pó ou cristais, solúveis em água, resultando em soluções amarelo-esverdeadas. Trata-se de uma flavoproteína tendo como grupo prostético o dinucleotídeo flavina-adenina (FAD), exigido na proporção de dois grupos por molécula de enzima.

Outras propriedades são [84]

<u>Fonte</u>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium Notatum</i>
<u>Peso Molecular</u>	186.000	152.000
$K_m^{glicose}$	$1.1 \times 10^{-1} M$	9.6×10^{-3}
$K_m^{O_2}$	$2.0 \times 10^{-4} M$	-

pH ótimo: 5,50 (sendo mantida mais que 50 % da atividade entre 3,5 e 7,0)

pH (estabilidade): totalmente estável entre pH 4,0 e 6,0, a 40°C, durante 2 horas. Preparações estabilizadas para serem utilizadas em pH 2,5 são encontradas e o uso em pH 8,0 exige uma alta concentração de glicose.

temperatura: muito instável acima de 50 °C, perdendo totalmente a atividade em poucos minutos a 65 °C. Pequena mudança de atividade entre 15 e 60°C.

inibidores: sais de metais pesados e reagente de p-cloromercúriobenzoato. A enzima de *A.niger* também é inibida por D-arabinose.

2.3.2 - APLICAÇÕES

As principais aplicações para a glicose oxidase são:

Proteção de alimentos: como antioxidante, pela remoção de O_2 em refrigerantes, vinhos, molhos, alimentos desidratados e enlatados em geral [97, 85].

- para remoção da glicose de ovos antes da desidratação (secagem) de forma a impedir o escurecimento e desenvolvimento de sabor desagradável [85, 97]. A quantidade de glicose na clara de ovos pode ser reduzida de 1% para 0,1% em 4 horas de reação, a $30^{\circ}C$, pH 5,0-7,5 [80, pag. 253]

- misturada com catalase, aumenta a estabilidade de alimentos marinhos (o ácido glicônico formado diminui o pH e inibe o crescimento de microorganismos [97]), e é utilizada também no tratamento de invólucros para alimentos, impedindo a sua deteriorização oxidativa [85]

- estabilizante em solução de ácido ascórbico e vitamina B_{12} [85].

Produção de ácido glicônico [97, pag. 355; 4, pag. 363]

- o açúcar invertido (glicose + frutose) pode ser transformado em ácido glicônico + frutose, que podem ser separados por cromatografia de troca iônica [97]

- a ação sobre a glicose produz ácido glicônico, utilizado como agente complexante de íons metálicos em alimentos e remédios e como adoçante alternativo para diabéticos [97]

Análises:

- fabricação de papéis de teste para controle de diabetes e testes de fertilidade [95]

- análise automatizada de glicose, através de acoplamento a um espectrofotômetro [4, pag.367]

- determinação de glicose através de um sensor de Oz [4, pag.369]

Das aplicações citadas, o potencial para utilização da enzima imobilizada está na produção de ácido glicônico ,remoção de oxigênio das bebidas antes de serem embaladas, remoção da glicose de alimentos e utilização analítica , onde o uso da enzima imobilizada pode ser contínuo e prolongado, permitindo um grande número de análises no caso de métodos automatizados.

3 - MÉTODOS E SUPORTES NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Nesse ítem serão apresentados os principais métodos de imobilização de enzimas e exemplos dos suportes utilizados em cada método. Em seguida, aborda-se a seleção do método adequado para uso em processos químicos.

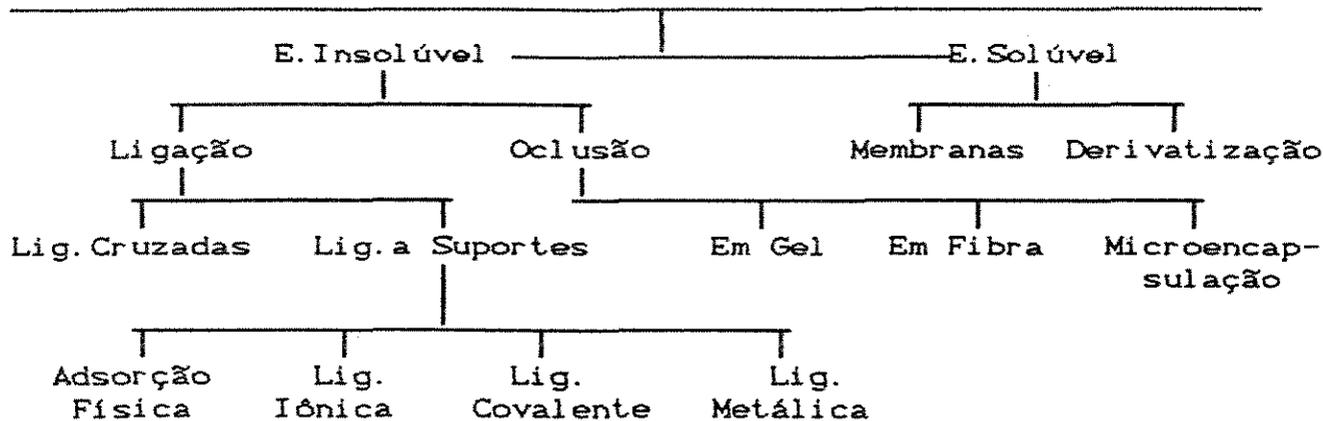
3.1 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Por definação, imobilização significa o confinamento da enzima numa região definida, sem perda da atividade catalítica, permitindo seu uso contínua e repetidamente.

Os métodos de imobilização podem ser agrupados em três categorias, subdivididas como mostrado no Diagrama I.1.

- 1 - ligação a suportes insolúveis
- 2 - ligações cruzadas
- 3 - oclusão

DIAGRAMA I.1 - METODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS



3.1.1 - LIGAÇÃO A SUPORTES INSOLÚVEIS

Consiste em ligar a enzima a suportes sólidos. É o mais antigo e principal método de imobilização. Pode ser subdividido em quatro categorias, de acordo com o tipo de interação enzima-suporte: adsorção física, ligação iônica, ligação metálica e ligação covalente.

i) Adsorção Física

Baseia-se na adsorção física da enzima na superfície do sólido. Por não haver espécies químicas envolvidas, há pouca mudança conformacional da enzima, obtendo-se um derivado com propriedades semelhantes às da enzima livre.

A adsorção depende de variáveis experimentais como o pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de enzima e adsorvente, tempo de contato e temperatura. A principal variável durante a imobilização é a concentração de enzima na solução, cujo aumento acarreta acréscimo da atividade imobilizada até um valor máximo assintótico para concentrações elevadas. Os efeitos difusionais são importantes, principalmente no caso de

suportes porosos.

Uma grande desvantagem desse método é a dessorção da enzima do suporte, causando perda de atividade e contaminação do produto com a enzima.

Como suportes para esse método, usa-se carvão ativado, materiais inorgânicos como vidro poroso, argila, caolinita, alumina, sílica gel e bentonita ou polímeros naturais como amido e glúten.

ii) Ligação Iônica

Baseia-se na ligação iônica entre a enzima e suportes contendo resíduos de troca iônica. Em muitos casos ocorre, concomitantemente adsorção física, sendo apenas diferenciada pela força de interação enzima-suporte, mais forte no caso da ligação iônica. Apesar disso, pode ainda ocorrer liberação da enzima do suporte. As mudanças conformacionais são pequenas e o derivado é também semelhante à enzima livre.

Os suportes empregados são os trocadores de íons, contendo grupos amino como alquilaminas, guanidina e aminas quaternárias, no caso de aniônicos (DEAE-, TEAE-, ECTEOLA-, etc) e grupos sulfato, fosfato e carboxil, no caso de catiônicos (SO_4^{-2} , PO_4^{-3} , etc).

iii) Ligação Metálica (ou Quelatização)

Consiste em imobilizar enzimas usando compostos de metais de transição para ativar a superfície de suportes orgânicos ou inorgânicos, ou óxidos metálicos precipitados a partir de sais metálicos.

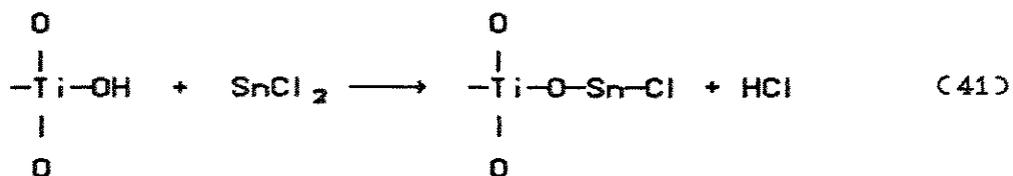
Embora o tipo de ligação deste método seja parcialmente covalente, observa-se o desprendimento da enzima do

suporte, em operações de longa duração.

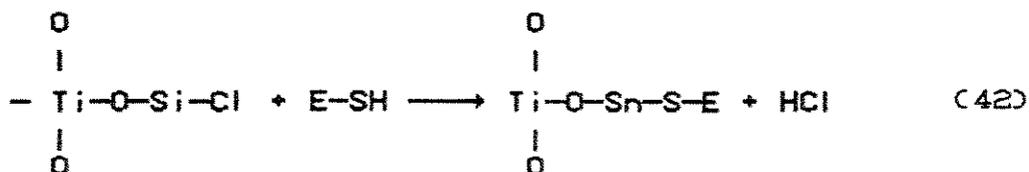
Os sais metálicos utilizados no processo de ativação tem sido $TiCl_3$, $TiCl_4$, $Ti_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$, $ZnCl_4$, $SnCl_2$, $SnCl_4$ e VCl_3 . A técnica usada constitui principalmente em se umidecer o suporte com uma solução do sal metálico, secá-lo, lavá-lo para remover o excesso de sal e colocá-lo em contato com a solução de enzima. Os suportes utilizados são orgânicos, como papel filtro, pó de serra, quitina, celulose, etc. ou inorgânicos, como celite, vidro, lã de vidro, alumina, sílica, titânia porosa, etc.

Como exemplo tem-se a imobilização sobre titânia porosa:

-ativação



-imobilização



iv- Ligação Covalente

Consiste na ligação covalente entre enzimas e suportes insolúveis. É o método mais difundido e investigado de imobilização. A seleção das condições de imobilização é mais difícil que nos outros três métodos e, às vezes, não requer condições tão brandas de reação. A ligação enzima-suporte é mais forte, de tal forma que não há perdas de enzima para a solução, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica.

A ligação da enzima deve envolver qualquer grupo químico que não seja essencial à atividade catalítica, o que significa que o sítio ativo não deve ser afetado pela imobilização.

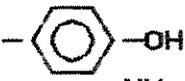
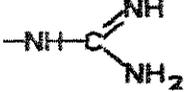
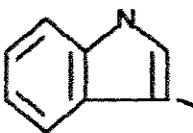
A grande variedade de reações de ligação e de matrizes com grupos químicos capazes de participar diretamente ou de serem ativados para formar as ligações, faz com que esse método seja de aplicação quase geral. Infelizmente, na maioria dos casos, a estrutura da enzima não é conhecida, de forma que fica difícil estabelecer regras gerais para a imobilização, excluindo os grupos do centro ativo, que não devem participar da ligação.

Os três principais fatores considerados para a imobilização de uma enzima, usando-se um método específico de reação, são:

a) O grupo funcional da proteína adequado para a ligação covalente em condições brandas de reação.

A Tabela I.3 mostra os resíduos de aminoácidos susceptíveis a se ligar aos suportes. Levando-se em consideração a reatividade dos grupos e a estabilidade da ligação formada, os resíduos mais convenientes são, em ordem decrescente: L-lisil, L-sisteína, L-tirosina, L-histidina, L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-arginina, L-triptofano, L-serina, L-treonina e L-metionina [4].

TABELA I.3 - RESÍDUOS REATIVOS DAS PROTEÍNAS

-NH ₂	ε-aminoácido da L-lisina (L-lys) e grupo amino terminal
-SH	tiol da L-cisteína (L-cys)
-COOH	carboxil terminal, do L-aspartato (L-Asp) e L-Glutamato (L-Glu)
	fenólico da L-tirosina (L-Tyr)
	guanidino da L-arginina (L-Arg)
	imidazol da L-histidina (L-His)
-S-S-	dissulfeto da L-cisteína (L-Cys)
	indol do L-triptofano (L-Trp)
-S-CH ₃	tioéter da L-metionina (L-Met)
-CH ₂ OH	hidroxil da L-serina (L-Ser) e L-treonina L-(Thr)

Ref: [5, pag. 11]

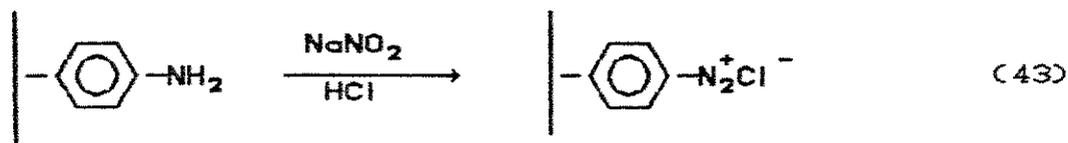
b) Reações de acoplamento enzima suporte

A reação normalmente é feita submetendo-se o suporte, previamente ativado, a uma solução de enzima, em condições brandas. As principais classes de reações de acoplamento usadas são, entre outras [4]:

- 1) diazotização
- 2) formação de amida (ligação peptídica)
- 3) alquilação e arilação
- 4) formação de base de Schiff

1) - Diazotização

O método de imobilização via diazotização é um dos mais comumente usados e baseia-se na ligação da proteína a grupos eletrofílicos arildiazônio do suporte. A ativação do suporte contendo grupos amino aromáticos é feita com nitrito em meio ácido:



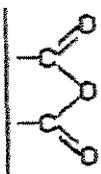
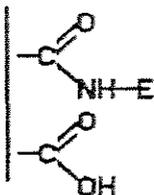
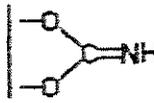
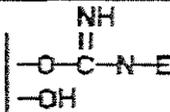
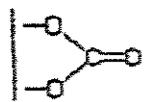
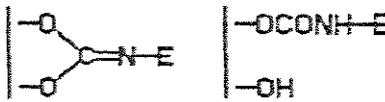
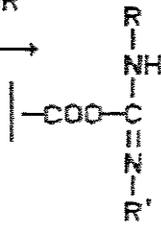
Os grupos da proteína que participam da ligação via sal de diazônio são principalmente o amino, fenol e imidazol (Tabela I.2).

2) - Formação de Amida

O método comum de formação de ligação peptídica é o ataque de grupos nucleófilos (amino, hidroxil, tiol) da enzima a grupos funcionais ativados do suporte. As reações são normalmente realizadas em valores intermediários de pH (7,5 - 8,5) e a baixas temperaturas ($\sim 4^\circ\text{C}$), de forma a se evitar desnaturação da enzima. Alguns exemplos de imobilização por ligação peptídica são dados na Figura I.1, classificada de acordo com a ligação formada enzima-suporte.

FIGURA I.1 - IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO PEPTÍDICA [4]

Enzima = H₂N-E

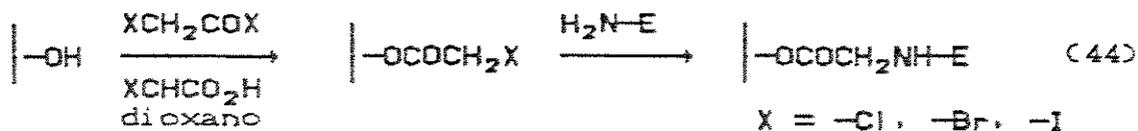
Suporte	Enzima Imobilizada Obtida
 <p>(anidrido de ácido)</p>	
<p>-OCH₂CON₃ (azida de acila)</p>	<p>-OCH₂CONH-E</p>
 <p>(imidocarbonato cíclico)</p>	
<p>-COCl (cloreto de acila)</p>	<p>-CONH-E</p>
 <p>(carbonato cíclico)</p>	
<p>Reagentes de Condensação</p> $R-N=C-NR'$	
<p>-COOH</p>	
	<p>-CONH-E + R'-NHCONH-R</p>

3) - Alquilação e Arilação

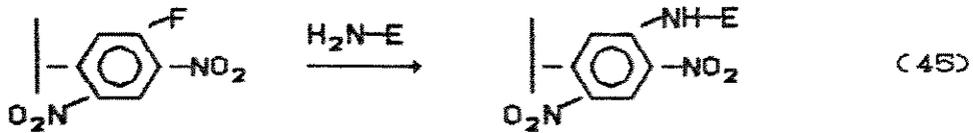
Baseados na alquilação ou arilação de grupos amino, fenol ou tiol de uma enzima, com suportes contendo grupos haleto ativos, oxirana, vinilsulfonil ou cetovinílicos.

Exemplos:

- alquilação

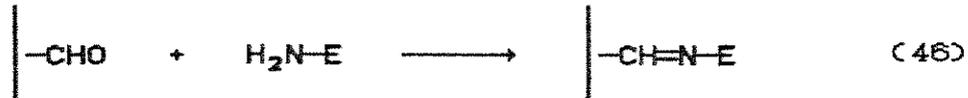


- arilação

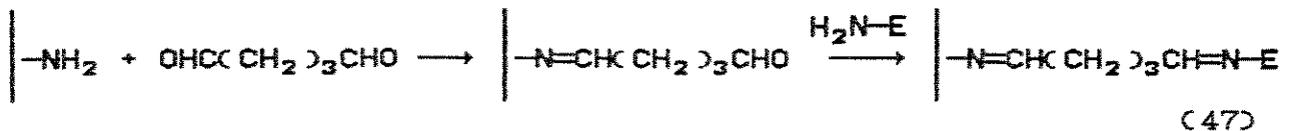


4) Formação de Base de Schiff

Baseado na formação de Base de Schiff entre grupos carboxílicos do suporte ativado e grupos amino da enzima. Normalmente o suporte ativado contém um grupo aldeído, sendo a imobilização segundo a reação:



Suportes contendo grupos amino podem ser ativados com glutaraldeído e, posteriormente, utilizados na imobilização:



c) Matrizes para Ligação Covalente

De acordo com a composição química, os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos, e subdivididos como mostrado na Tabela I.4.

TABELA I. 4 - MATRIZES PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE ENZIMAS

Suportes Orgânicos:

- | | | |
|----------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Polímeros Naturais | - Polissacarídeos | - celulose |
| | | - amido |
| | | - dextrana e agarose |
| | | - quitosana e quitina |
| | - Proteínas | - colágeno |
| | | - seda |
| | - Materiais de Carbono | |
| Polímeros Sintéticos | - Poliestirenos | |
| | - Poliácridatos | - poli(meta)acrilato |
| | | - anidrido polimetacrílico |
| | | - poliácridamidas |
| | | - poliácridonitrila |
| | | - etc |
| | - polímeros do anidrido maléico | |
| | - polipeptídeos | |
| | - polímeros alílicos e vinílicos | |
| | - poliamidas | |
-

Suportes Inorgânicos

- | | |
|------------|----------------------------------|
| Minerais | - argila |
| | - bentonita |
| | - celite |
| | - pedra pomes |
| Sintéticos | - vidro de porosidade controlada |
| | - óxidos metálicos |
| | - metais |
| | - vidro não poroso |
-

Ref: [4, pag. 303]

3.1.2 - LIGAÇÕES CRUZADAS [9]

Este método é baseado na formação de ligações covalentes, como o anterior, mas não usa suportes insolúveis. A imobilização é feita por meio de ligações entre as moléculas de enzima, através de reagentes bi ou multifuncionais. O método envolve a adição de uma quantidade apropriada de um agente de

ligações cruzadas a uma solução de enzima, de modo a se obter o derivado insolúvel desejado. As condições ótimas para se obter boa insolubilidade, sem perda da atividade, devem ser encontradas experimentalmente, por tentativas. Entre os agentes de ligações cruzadas utilizados, o glutaraldeído ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) tem sido o mais amplamente empregado, seguido pelo hexametileno diisocianato ($\text{OCN}-(\text{CH}_2)_6-\text{NCO}$). As ligações enzima-glutaraldeído são irreversíveis e suportam condições extremas de pH e temperatura.

As condições de reação que tem dado melhores resultados consistem em se usar concentrações de proteínas de 50-200 mg/ml e de glutaraldeído de 0,3-0,6 %. A temperatura ambiente, a imobilização demora 1-3 horas, embora se possa fazer a reação a temperaturas mais baixas, no caso de moléculas mais lábeis, exigindo, nesse caso, tempos maiores de reação.

A principal vantagem do método é que requer apenas um agente bi ou multifuncional para uma reação muito simples, obtendo-se um produto imobilizado que consiste em proteína quase pura. As desvantagens são a necessidade de uma quantidade relativamente grande de enzima, a inevitável perda de atividade devido à participação do centro ativo na imobilização e as propriedades mecânicas do produto gelatinoso obtido.

3.1.3 - OCLUSÃO [9]

Baseado no aprisionamento da enzima dentro de uma estrutura que impeça a sua liberação, mas que permita a penetração do substrato. Não há nenhuma ligação entre a enzima e a matriz utilizada, permitindo que o método seja aplicado a qualquer tipo

de enzima ou mesmo células e organelas. O método pode ser dividido em três tipos: oclusão em gel, oclusão em fibra e microencapsulação.

i) Oclusão em Gel

Envolve o aprisionamento da enzima nos espaços intersticiais de géis poliméricos insolúveis em água. Os géis normalmente são obtidos por polimerização em sistemas bifásicos, de forma a permitir o controle mecânico (por agitação) do tamanho da partícula. O grau de ligações cruzadas no polímero deve ser controlado, de forma a conferir ao gel distribuição de tamanho de poros e propriedades mecânicas adequadas. As matrizes que tem sido utilizadas nesse método são apresentadas na Tabela I.5.

TABELA I.5 - MATRIZES PARA OCLUSÃO DE ENZIMAS EM GEL

Naturais:	colageno, gelatina, carragenato, agar, alginato de cálcio, amido
Sintéticas:	poliacrilamida, poli(vinil álcool), poli(vinilpirrolidona), poli(2-hidroximetilmetacrilato)

Ref: [4, pag. 338].

ii) Oclusão em Fibras

É um método de aprisionamento nas microcavidades de fibras sintéticas, num processo contínuo, similar ao de produção de fibras têxteis.

Nessa técnica, o monômero é dissolvido num solvente orgânico e emulsionado numa solução aquosa de enzima. A emulsão é forçada num líquido coagulante (tolueno ou éter de petróleo) através de um processo de extrusão, precipitando o polímero numa

forma filamentosa, com as microgotas de solução de enzima ocluídas. As fibras são quimicamente resistentes e pode-se obter grandes áreas superficiais através de fibras muito finas. A principal fibra utilizada para esse método é o acetato de celulose.

iii) Microencapsulação

Envolve a inclusão da enzima em microcápsulas (diâmetro de 1-100 μm) poliméricas semipermeáveis, de tal forma que os substratos possam se difundir através da membrana externa.

As vantagens do método incluem a grande área superficial de contato e a possibilidade de imobilização simultânea de várias enzimas. A principal desvantagem é que ele não pode ser usado no caso de substratos de alto peso molecular.

Os principais métodos de microencapsulação são:

1) Método de Separação de Fases: é o método mais difundido; baseado na coacervação, um fenômeno físico utilizado para purificação de polímeros, que envolve a dissolução do polímero num solvente orgânico, seguida pela reprecipitação pela adição de outro solvente, miscível com o primeiro, mas que não dissolve o polímero. Para imobilizar enzimas por essa técnica, uma solução aquosa da enzima é primeiramente emulsionada com um solvente orgânico contendo o polímero e depois o segundo solvente é adicionado lentamente a esta suspensão. O polímero é concentrado, pela evaporação parcial dos solventes, e membranas são formadas ao redor das microgotas de solução de enzima.

2) Método da Polimerização Interfacial: baseado na síntese de um copolímero na interface da microgota. O monômero hidrofílico é parcialmente solúvel nas fases orgânica e aquosa e

o hidrofóbico, apenas na fase orgânica. Numa primeira fase, a solução aquosa da enzima e o monômero hidrofílico são emulsionados num solvente orgânico. Adiciona-se então a essa emulsão o monômero hidrofóbico, dissolvido no mesmo solvente orgânico. Como resultado, os monômeros reagem, por condensação, na interface das duas fases da emulsão, immobilizando a enzima na microgota aquosa.

O copolímero usual para esse tipo de microencapsulação é o nylon 6,10, obtido por polimerização do monômero hidrofílico 1,6-diaminohexano e do hidrofóbico cloreto de 1,10-decanoíla (cloreto de sebacoíla). O solvente utilizado é clorofórmio-ciclohexano (1:4 v/v), contendo 1 % de surfactante orgânico (Span 85).

3) Método da Secagem do Líquido: uma solução aquosa de enzima é emulsionada com um solvente orgânico de ponto de ebulição menor que o da água (benzeno, ciclohexano ou clorofórmio) contendo um polímero formador de membrana. A emulsão obtida é dispersada num meio aquoso contendo substâncias coloidais protetoras (gelatina, PVC e surfactantes), formando uma segunda emulsão. A enzima immobilizada é obtida eliminando-se o solvente orgânico por evaporação a vácuo. A principal vantagem do processo é que não ocorre desativação da enzima, pois os polímeros utilizados são pré-formados, não exigindo adição de compostos reativos.

3.1.4 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS SOLÚVEIS

i) Membranas Semipermeáveis

O método consiste em se confinar fisicamente a enzima através de uma membrana que seja permeável apenas ao produto e ao

substrato. O método é muito simples, pois consiste apenas em se colocar a solução de enzima de um lado da membrana, e adequado à conversão de substratos de alto peso molecular, pois permite o contato íntimo entre a enzima e o substrato.

ii) Derivatização da Enzima

É a reação da enzima com polímeros, de forma a aumentar-lhe a peso molecular, mas mantendo-a solúvel. O principal polímero solúvel usado é a dextrana, e o objetivo do método é permitir o uso de membranas menos restritivas ao fluxo (mais permeáveis) e o ataque a substratos insolúveis, praticamente impossível no caso dos métodos de imobilização onde se produzem enzimas insolúveis. A derivatização também é usada para se aumentar a estabilidade da enzima.

3.2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Embora várias técnicas de imobilização possam ser usadas para uma mesma enzima, nenhuma delas pode ser considerada como um método geral, devido à diversidade estrutural das enzimas, substratos e produtos. Cada método tem as suas limitações específicas e, para uma aplicação em particular, precisa-se encontrar um procedimento simples e barato, que resulte numa boa atividade e estabilidade operacional. A Tabela I.6 sumariza algumas das vantagens e desvantagens de diferentes processos de imobilização [4].

A imobilização por métodos químicos (ligações covalentes) envolve modificações na estrutura da enzima e pode

causar desativação parcial quando o sítio ativo participa da ligação. Assim, a imobilização por esses métodos deve ser feita em condições mais brandas possíveis, de forma a minimizar esse problemas. A ligação enzima-enzima ou enzima-suporte é muito forte, dando uma alta estabilidade operacional. A recuperação dos suportes é difícil ou impossível, principalmente no caso de serem orgânicos.

A imobilização pelos outros três métodos (adsorção física, ligação iônica e metálica) pode ser feita facilmente em condições brandas, com ligações fracas enzima-suporte. A estabilidade operacional da enzima imobilizada é baixa, podendo ocorrer desprendimento da enzima. Como não há modificações na estrutura química da enzima, a retenção de atividade é boa. Outra vantagem desses métodos é que o suporte pode ser recuperado toda vez que a atividade retida cai abaixo de determinado nível.

TABELA I.6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Característica	Ligações Cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	+-	simples	simples	simples	difícil	difícil
Força Ligação	forte	fraca	+-	+-	forte	+-
Atividade	baixa	+-	alta	alta	alta	baixa
Recup. Suporte	impos.	possível	pos.	pos.	rara	impos.
Custo	+-	baixo	baixo	+-	alto	+-
Estabilidade	alta	baixa	+-	+-	alta	baixa
Aplicabilidade	não	sim	sim	sim	não	sim
Proteção Microbiana	+-	não	não	não	não	sim

Ref: [4, pag. 349]

+ - = intermediário

No método de oclusão não há ligação enzima-suporte e, por isso, deve-se esperar uma boa retenção da atividade, limitada, no caso, a substratos e produtos de baixo peso molecular.

3.3 - EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS

Durante a imobilização, a enzima pode ter suas propriedades alteradas, principalmente as cinéticas, geralmente diminuindo sua atividade específica, ou seja, seu poder catalítico. Esse fenômeno pode ser atribuído a fatores como os efeitos estéricos e conformacionais, de partição e difusionais [6].

3.3.1 - EFEITOS ESTÉRICOS E CONFORMACIONAIS

O decréscimo de atividade é geralmente atribuído a mudanças na estrutura terciária da enzima, causadas pela introdução de ligações enzima-suporte, ou a impedimentos estéricos, dificultando o acesso de substratos ao sítio ativo. Para minimizar esses dois problemas, deve-se selecionar cuidadosamente as condições de imobilização, protegendo a enzima com um inibidor, substrato ou produto, antes da reação e introduzindo um "espaçador" entre a enzima e o suporte. [4, pag. 350].

3.3.2 - EFEITOS DE PARTIÇÃO

Ocorrem quando a enzima está ligada a um suporte eletricamente carregado. A diferença de comportamento cinético em relação à enzima livre é atribuída a efeitos de partição, que causam diferenças de concentração das espécies carregadas nas imediações da enzima imobilizada, devido a interações eletrostáticas com o suporte. A principal consequência desse efeito é a mudança do pH ótimo da enzima [7].

A partição de substratos ou produtos carregados também altera o comportamento da enzima devido à mudanças das concentrações próximas ao suporte. Para um substrato positivamente carregado, usando-uma uma matriz negativa, tem-se uma concentração mais alta próxima à enzima que no meio líquido e, conseqüentemente, a atividade, relativa a uma matriz neutra, é mais alta.

3.3.3 - EFEITOS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Os efeitos de transferência de massa existem na enzima imobilizada porque o substrato tem que se difundir da solução até o sítio ativo da enzima. Se a enzima está ligada a um suporte não poroso, há apenas efeitos externos de transferência de massa, pois o substrato deve deslocar-se da solução até a superfície externa do suporte. O transporte do substrato é realizado por difusão na camada estagnante, na superfície da partícula, e controlado pela velocidade linear do fluido. À medida que a velocidade aumenta, a concentração de substrato em contato com a enzima aproxima-se da concentração do meio e a taxa de reação aproxima-se do valor cinético.

Quando a enzima é imobilizada num suporte poroso, além dos possíveis efeitos de difusão externa, podem também ocorrer resistências internas à difusão do substrato e do produto, que têm que se mover através do poro, da superfície da partícula até a enzima e vice-versa. Conseqüentemente, um gradiente de concentrações de substrato e de produto é estabelecido ao longo do poro e controlado pela velocidade de reação. A taxa de reação

medida, no caso, depende da concentração de substrato no meio e da distância da enzima até a superfície do suporte. Os efeitos de difusão interna podem ser minimizados através da redução do tamanho da partícula, diminuindo, desta forma, a distância que o substrato tem que percorrer até a enzima.

Quando os efeitos de difusão externa e interna estão presentes simultaneamente, as contribuições de cada um devem ser analisadas separadamente e quantificadas pelos fatores de efetividade correspondentes.

3.4 - SELEÇÃO DO SUPORTE

Na seleção de um suporte para imobilização de enzimas, deve-se considerar os seguintes fatores [5]:

1- propriedades mecânicas, como a rigidez e a durabilidade, quando submetido a agitação mecânica, compressão, etc.;

2- forma física (grãos, fibras, tubos, etc.) e tamanho das partículas;

3- resistência a ataque químico e microbiano;

4- características de superfície, como: carga eletrostática, hidrofobicidade, possibilidade de adsorver substâncias, área superficial, composição química;

5- morfologia (poroso, não poroso ou gel);

6- permeabilidade;

7- capacidade de ser derivatizado (ativado);

8- preço e disponibilidade comercial;

9- possibilidade de regeneração.

A análise desses fatores deve levar em consideração as

características da enzima, do substrato, do meio reacional, do tipo de reator a ser utilizado, etc. Nesses termos, Eaton [8] fornece uma "arvore de decisão" com as questões que devem ser respondidas em relação à enzima e ao suporte para sua imobilização:

Com relação à enzima

1- qual é o peso molecular e forma da enzima?

2- quais as condições experimentais para que se tenha atividade catalítica máxima, com relação a escolha do tampão, pH de alimentação, concentração do substrato e presença de íons ativadores?

3- qual a máxima temperatura suportada pela enzima livre e a imobilizada?

4- quais são os inibidores da enzima?

5- em que tipo de material a enzima pode ser ligada?

6- qual a técnica de imobilização que será adotada?

7- em que condições a enzima imobilizada será utilizada?

Com relação ao suporte:

1- a morfologia do poro permite a entrada da enzima?

2- a enzima pode ser imobilizada no suporte?

3- a enzima imobilizada, e o suporte, são quimicamente resistentes a: (1) meio ácido?, (2) meio básico?, (3) meios salinos?

4- o material pode ser convenientemente manuseado?

5- o suporte resiste a compressão?

6- a carga de enzima no suporte é adequada ao sistema

7- qual a máxima queda de pressão tolerada pelo sistema?

8- como a queda de pressão é afetada pelo tamanho e forma da

partícula e pela vazão?

9- qual é a meia vida operacional do sistema?

10- como a meia vida é afetada pela temperatura, pH e outras condições?

11- em que condições a enzima imobilizada deve ser estocada?

12- qual o custo do sistema imobilizado?

Das questões apresentadas acima, a mais importante consideração a fazer é em relação ao tamanho do poro e da enzima, pois deve-se considerar que o poro deve comportar a enzima e o substrato durante a reação. Outra observação importante é em relação às condições de reação, pois deve-se usar um suporte quimicamente inerte, quando submetido ao meio reacional.

Devido ao grande número de métodos e enzimas existentes, não se podem fazer generalizações quanto à escolha do suporte, mas apenas coletar a maior quantidade de informações disponíveis sobre o sistema enzima-suporte que se deseja estudar e procurar conseguir uma enzima imobilizada barata, com boa atividade específica e estabilidade operacional.

4 - REATORES PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS

De acordo com o modo de operação e tipo de escoamento, os reatores enzimáticos podem ser classificados como mostrado na Tabela I.7.

TABELA I.7 - CLASSIFICAÇÃO DOS REATORES ENZIMATICOS

Modo de Operação	Tipo de Escoamento	Tipo de Reator
Batelada	Mistura	- Tanque Agitado
Contínuo	Mistura	- Tanque Agitado Contínuo (CSTR) - CSTR múltiplo
	Empistonado	- Leito Fixo - Leito Fluidizado - Tubo de Enzima - Filme de Enzima - Fibra Oca

Ref: [4, pag. 359; 94, pag. 8]

4.1 - REATORES DE BATELADA

O reator de batelada tipo tanque agitado é o mais simples dos reatores, constituído de um vaso com agitação. Para ser usado com enzimas imobilizadas, requer uma separação interna ou uma etapa de separação no processo, para se recuperar o catalisador. Como durante essa etapa de recuperação pode ocorrer tanto perda de enzima como de atividade enzimática, as operações em batelada só são utilizadas para pequenas produções. Algumas matrizes, como suportes inorgânicos, são quebradas, por atrito, nesse vaso, exigindo modificações alternativas. Em laboratório, para se evitar esse problema, a enzima é colocada num cesto, que pode também formar as lâminas do impelidor de agitação ou as chicanas do reator.

4.2 - REATORES CONTINUOS

A maioria das enzimas imobilizadas é utilizada em operações contínuas. As vantagens são as facilidades de controle

automático, operação e controle de qualidade do produto. Os reatores contínuos podem ser divididos em dois tipos básicos: tanque agitado contínuo (CSTR) e de escoamento empistonado (plug flow, PFR).

No reator CSTR ideal, o grau de conversão é independente da posição no reator, devido à agitação perfeita, e as condições na saída do reator são as mesmas do seu interior ou seja, baixa concentração de substrato e alta concentração de produto. No reator PFR o grau de conversão depende da extensão do reator e as concentrações variam ao longo dele.

Enquanto que um reator CSTR quase ideal é fácil de ser obtido, requerendo apenas uma agitação eficiente, o PFR ideal é muito difícil. Os fatores que contribuem para a não idealidade do PFR são os gradientes de temperatura e velocidade normais à direção do fluxo e a dispersão axial do substrato.

Em termos de escolha do tipo de reator, considerando-se uma cinética de Michaelis-Menten, o PFR requer menos enzima que o CSTR para se obter a mesma conversão final. No caso de inibição da enzima por produto, o uso do PFR é praticamente uma necessidade e o caso de inibição por substrato é o único que favorece o uso do CSTR.

A forma e característica da enzima imobilizada também influencia a escolha do tipo de reator, assim como as exigências operacionais. Quando é necessário um controle rígido de pH, o CSTR é preferível, em relação ao PFR. O CSTR não permite o uso de preparações imobilizadas mecanicamente frágeis. Para partículas muito finas, que causariam uma alta queda de pressão num leito fixo, deve-se utilizar um leito fluidizado, que constitui um

intermediário entre o CSTR e o PFR, em termos de mistura, mas que opera com baixas diferenças de pressão.

As características dos reagentes e/ou produtos também influenciam na escolha do reator. No caso de substratos insolúveis ou muito viscosos, deve-se utilizar um CSTR ou leito fluidizado, onde não há risco de entupimento, como no PFR.

Não há, na verdade, uma regra simples para a escolha do reator; diferentes fatores devem ser analisados individualmente para cada caso.

5 - IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE

A diversidade de métodos de imobilização aplicados à glicose oxidase é mostrada na Tabela I.8, que representa uma revisão geral dos principais trabalhos publicados. Pelos dados apresentados, observa-se que 60 % dos métodos descritos utilizam ligações covalentes, sendo metade deles com glutaraldeído como agente de ligação enzima-suporte e o resto através de outros métodos (carbodiimida, derivado diazo, etc).

A comparação entre as atividades obtidas para cada produto imobilizado é difícil, pois os suportes variam em porosidade, área superficial, tamanho e forma, implicando em diferentes cargas de enzima e problemas de transferência de massa, dados que não são normalmente incluídos nos trabalhos. De uma análise geral, pode-se tomar como atividades típicas da glicose oxidase imobilizada valores de 0,5 U/g, para imobilização via glutaraldeído em vidro não poroso aminosilanizado [46,56], até aproximadamente 110 U/g, para imobilização covalente em células

[47] ou oclusão em hidrogel de sílica [48].

TABELA I.8 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE

Método de Imobilização	Suporte	Ref.
Adsorção Física	copolímero de fenilenodiamina e glutaraldeído	20
Lig. Covalente	AE-celulose + glut.	21
Lig. Covalente	sílica silanizada + glutaraldeído	22
Lig. Covalente	carvão ativado + carbodimidida	23
Lig. Covalente	derivado azida de colágeno	25
Lig. Metálica	celulose + titânio IV	26
Lig. Covalente	derivado diazo do ácido poliacrílico	10
Lig. Covalente	azida de acila de poli-acrilamida	10
Adsorção Física	carvão ativado, alumina e argila ácida	27
Adsorção Física	vidro poroso	28
Adsorção Física	titânia	29
Lig. Iônica	amberlite CG-50	27,30
Lig. Covalente	vidro silanizado (diazo)	31,32
Lig. Covalente	CM-celulose (peptídica)	33
Lig. Covalente	cefarose ativada com CNBr	34
Lig. Covalente	celite aminoalquilado	35
Lig. Covalente	níquel-sílica-alumina aminoalquilada	36,37
Lig. Cruzadas	glutaraldeído	38,39
Oclusão	retículo de poliacrilamida	40,41 42,43
Lig. Covalente	p-amino estireno	5
Lig. Cruzadas	membrana de celofane (glutaraldeído)	5
Lig. Cruzadas	albumina + glutaraldeído	44

Microencapsulamento	nitrato de celulose + n-butil benzoato	5
Lig. Covalente	nylon aminoderivado (glut.)	45
Lig Covalente	vidro aminosilanzado (glutaraldeído)	46,49 54,57
Lig. Covalente	células	47
Oclusão	hidrogel de sílica	48
Lig. Covalente	pellets de micélios (glut.)	50
Lig. Covalente	carvão ativo + diimida	51
Lig. Covalente	carvão ativo + carbodiimida	52,55
Lig. Covalente	celite e similares, sila- nizados (glutaraldeído)	53
Lig. Covalente	vidro revestido com polieti- leno imina	56

Como os suportes escolhidos para o trabalho são todos constituídos de material silícico (SiO_2), baseando-se nas referências consultadas, resolveu-se utilizar o glutaraldeído como agente de ligação da enzima à matriz, após sua funcionalização através de silanização.

Aproveitando-se o suporte silanizado preparado para o método acima, optou-se por testar um método de silanização mais elaborado, via diazotação do suporte. Esse segundo método envolve a conversão do suporte alquilamino em arilamino, antes da imobilização, e a obtenção do seu sal de diazônio. A vantagem ou não de se utilizar esse método mais complexo será em função da comparação das atividades obtidas para cada um deles, ponderando-se a simplicidade do primeiro.

6 - OBJETIVOS

Devido à importância da glicose oxidase na indústria, como comentado no item 2.3.2 deste capítulo, o objetivo deste trabalho foi obter uma forma de glicose oxidase imobilizada de maneira simples, que pudesse ser utilizada em reatores. Assim, pode-se subdividir os objetivos nos seguintes itens:

6.1 - Sintetizar e/ou tratar os suportes selecionados, com áreas superficiais distintas, de modo que sejam adequados à imobilização, em termos de propriedades mecânicas, características superficiais, forma física e morfologia;

6.2 - Funcionalizar os suportes de forma mais simples e barata possível, otimizando esta etapa dentro da imobilização;

6.3 - Ativar o suporte funcionalizado e estudar a capacidade de carga de enzima e a atividade obtida, considerando-se a influência de parâmetros importantes, como a quantidade de enzima livre oferecida e o tamanho da partícula de suporte, nas características da enzima imobilizada obtida;

6.4 - Caracterizar a enzima imobilizada obtida através de dados de atividade em relação a variáveis como pH, temperatura, concentração de substrato, tamanho da partícula e tempo de incubação a temperaturas elevadas (inativação);

6.5 - Fazer um estudo prévio da performance da enzima em reatores tipo batelada, como uma forma de introduzir seu uso em processo contínuo.

CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL

1 - MATERIAIS

1.1 - REAGENTES

Estão listados abaixo os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental e sua procedência (fornecedor):

Celite 545	Nuclear
Ácido clorídrico 37 %	Merck
Silicato de sódio neutro	Prod. Quím. Labor
γ -aminopropiltrimetoxisilano	Aldrich
Glutaraldeído 25 %	Riedel-de-Haën
Glicose oxidase bruta	Sigma
Ácido 3,5-dinitro benzóico	Fluka
Piridina	Vetec
Ditionito de sódio	Merck
Nitrito de sódio	Vetec
Fosfato de sódio dibásico	Ecibra
Ácido cítrico	Ecibra
D-glicose anidra	Ecibra
Hidróxido de Sódio	Grupo Química
Sílica gel	sintetizada [62]
Catalase	Sigma
Peróxido de Hidrogénio	Merck

1.2 - INSTRUMENTAÇÃO

Oxígrafo : Oxigen Monitor, Modelo 53
Yellow Springs Instrument Co. (YSI)
pHmetro : Micronal, Modelo B 374
Banho Termostatizado : Fanem
Banho com Circulação : MACCHI, Engenharia Biomédica Ltda.
Agitador-aquecedor : Fanem, Modelo 258

Porosímetro de Mercúrio Aminco-Winslow, faixa de 0-5000 psi,
da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Cinética e
Tecnologia, Dep. de Engenharia de Materiais.

2 - PREPARO DAS SOLUÇÕES [95]

2.1- ACIDO CLORÍDRICO 3N

Dilui-se o ácido clorídrico comercial concentrado (12N), na
proporção de 1:4.

2.2- GLUTARALDEÍDO 2,5 %

Dilui-se a solução aquosa de glutaraldeído comercial, 25 %, na
proporção de 1:10.

2.3- TAMPÃO CITRATO-FOSFATO 0,05 e 0.10 M [95]

Preparam-se soluções estoque da seguinte forma:

Ácido Cítrico 0,10M - 21,01 g de $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ diluídos para 1 l
de água destilada

Fosfato de Sódio Dibásico 0,2M - 53,61 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
diluídos para 1 l de água destilada

Para se preparar aproximadamente 100 ml do tampão 0,05M coloca-se cerca de 20 ml de ácido cítrico num bequer e adiciona-se, sob agitação, a solução de fosfato dibásico até atingir o pH desejado. Obtem-se, dessa forma, um tampão citrato-fosfato 0,10M, que deve ser diluído na proporção de 1:2 se se desejar 0,05M

2.4- ÁCIDO CLORÍDRICO 2N

Dilui-se o ácido clorídrico comercial concentrado na proporção de 1:5

3 - MÉTODOS

3.1 - OBTENÇÃO DOS SUPORTES

De forma a se obter cada um dos suportes para a imobilização da enzima, foi executada a seguinte metodologia:

3.1.1 - CELITE

O celite comercial adquirido contém muitas partículas finas, que não decantam rapidamente em água. Para se evitar problemas com o arraste dessas partículas durante a imobilização e os ensaios, e de entupimentos durante as filtrações, faz-se a seguinte classificação:

- prepara-se uma suspensão aquosa de celite a aproximadamente 10 %,
- deixa-se o sólido decantar durante aproximadamente 5 min.

- despeja-se o sobrenadante contendo as partículas finas
- repete-se a operação até que o sobrenadante esteja praticamente límpido.

3.1.2 - VIDRO

O uso de vidro de porosidade controlada (controlled pore glass - CPG) como suporte para imobilização de enzimas é amplamente difundido [11,12,13,14,16,17,18,...], mas aparecem também alguns trabalhos que empregam vidro não poroso [14,46,54,56,57,...]. A principal desvantagem do emprego do vidro não poroso é a sua pequena área superficial, representada apenas pelo exterior da partícula. O vidro poroso comercial tem uma grande área superficial e o tamanho do poro definido, podendo-se inclusive selecionar experimentalmente o tamanho ótimo para se imobilizar determinada enzima. Apesar de todas as suas vantagens, o vidro poroso não é produzido nacionalmente e seu custo é elevado (catálogo da Sigma, 1988: US\$ 295,20/100 ml).

Vidros borossilicato de determinadas composições podem ser tratados termicamente de modo a se promover um rearranjo da fases na sua microestrutura [75]. Após essa separação de fases, a microfase mais alcalina pode ser removida por uma lavagem ácida, deixando no seu lugar microcavidades que resultariam, quando extendidas a todo o corpo do material, no vidro poroso. Descartando desse trabalho o desenvolvimento do processo para produção de vidro poroso, que envolveria desde a preparação do vidro (com agitação a 1300-1400 °C) passando pelo tratamento térmico e chegando à caracterização do produto final, escolheu-se

partir de um dos tipos de vidro mais utilizados, o Pyrex. Este é um vidroborosilicato [76] que após o tratamento térmico pode ser utilizado como suporte. A comparação da enzima imobilizada nesse material, com a descrita na literatura [46] para o vidro não poroso poderá dar uma noção da eficiência do método.

O procedimento usado é uma adaptação do método descrito na literatura [73,75]:

- pedaços de vidro Pyrex são tratados a 650°C, numa mufla, durante 6 horas,

- deixa-se o vidro esfriar a temperatura ambiente e moe-se, em almofariz ou moinho de bolas, classificando o pó na granulometria desejada (32-60, 60-100 e 100-200 mesh, no caso),

- refluxa-se o material em ácido clorídrico 3N durante 4 horas, resfria-se, filtra-se e lava-se com água destilada até remover todo o ácido,

- seca-se em estufa a 110 °C e estoca-se o sólido para uso.

3.1.3 - SÍLICA

A obtenção de sílica porosa com diâmetro de poro adequado para imobilização de enzimas (100-1000 Å) pode ser conseguida mediante tratamento durante o processo de lavagem e secagem do gel, de forma que o produto final tenha as características desejadas [62,63], ou então pelo alargamento dos poros de um produto já existente [61,64].

Como a obtenção da sílica porosa pelo tratamento do gel durante a lavagem envolve várias etapas, incluindo a substituição da água do gel por outros solventes [62,63], optou-se pela

preparação da sílica gel de poros pequenos, usada como dissecante, com posterior tratamento hidrotérmico para alargar os poros [61,62].

O procedimento adotado é:

- prepara-se, num bequer, uma solução de 62,6 g de ácido clorídrico concentrado ($d=1.19$ g/ml) em 44 ml de água,

- adiciona-se, sob agitação vigorosa, durante aproximadamente 5 min., a $25-30^{\circ}$ C, uma solução constituída de 173 g de silicato de sódio neutro em 202 ml de água,

- despeja-se a solução em uma forma de vidro quadrada, de forma que o nível do líquido seja de aproximadamente 2 cm, e deixa-se em repouso a temperatura ambiente. Depois de 4-5 horas o gel está formado, podendo ser utilizado após 6 horas.

- corta-se o gel obtido em pedaços de 2-3 cm de lado e lava-se, num bequer de 2 l, sob fluxo ascendente de água corrente, durante 12 horas. O objetivo da lavagem é remover o cloreto de sódio formado durante a gelificação e o excesso de ácido clorídrico, que causam o esfarelamento do gel durante a secagem.

- lava-se durante mais 12 h com água destilada, de forma a remover o máximo de sais do gel (principalmente cloreto de sódio)

- escorre-se a água da lavagem final e seca-se o gel em estufa a 110° C durante 12 h. Antes de se colocar todo o gel na estufa, aconselha-se retirar uma amostra e fazer um teste prévio de secagem, para verificar se não ocorre esfarelamento do produto. Em caso positivo, prolonga-se a lavagem com água destilada.

- despeja-se a sílica seca em água destilada e faz-se vácuo durante 30 min., para remover o ar dos poros. Durante a secagem do gel há perda de 85-90 % de sua massa, representada pela água

presente no seu interior. Essa eliminação de água garante a estrutura porosa e causa grandes tensões mecânicas no sólido seco. A rápida hidratação pelo contato com a água faz com que as partículas tensionadas se quebrem, conseguindo-se dessa forma suportes mecanicamente mais estáveis e com granulometria mais próxima à desejada para a imobilização.

- seca-se novamente a 110°C e peneira-se o produto, retirando-se as partículas menores, já na granulometria desejada. As partículas maiores são novamente tratadas com água, secas e peneiradas, repetindo-se o procedimento até que poucas partículas se quebrem durante o tratamento.

- suspende-se a sílica peneirada obtida em água, retira-se o ar dos poros com vácuo e coloca-se a suspensão num reator resistente a 100 atm de pressão interna.

- trata-se o produto no reator a 250°C (620-630 psi), durante 5 horas, sem agitação.

- depois de resfriar, lava-se o produto, cuja cor mudou de transparente para branco leitoso, com água destilada e seca-se.

- classifica-se o sólido obtido em várias granulometrias, na faixa de 16 a 100 mesh, e estoca-se para uso.

3.2 - DERIVAÇÃO ALQUILAMINA DO SUPORTE

Os suportes silícicos são funcionalizados através da silanização com um aminosilano, segundo as reações [65]:

Usou-se neste trabalho uma modificação do método descrito na ref. [66] e estudou-se o grau de silanização em relação à concentração de silano no meio reacional.

Procedimento:

- prepara-se uma solução de silano a 2 % em água destilada e deixa-se hidrolisar durante pelo menos 1 hora a temperatura ambiente,

- cobre-se o suporte a ser silanizado com essa solução e deixa-se sob vácuo durante 30 min. (vidro: 1,0 ml/g, sílica: 2,5 ml/g, celite: 3 ml/g),

- filtra-se o excesso de solução e deixa-se o suporte úmido reagindo, numa estufa a 50°C, durante 12 horas,

- lava-se o suporte com água destilada até que o pH da água de lavagem esteja neutro (6,5 - 7.0),

- seca-se a 100-110°C durante 12 horas e estoca-se.

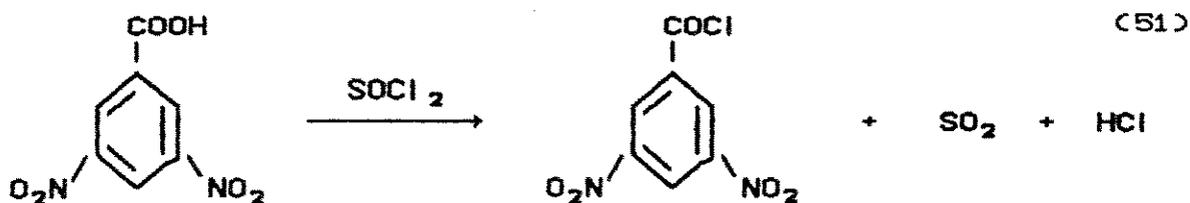
Estudo da Silanização

No procedimento descrito acima, varia-se a concentração de silano na solução adicionada ao suporte e a temperatura da estufa. Usa-se no método a sílica, que tem maior área superficial, e acompanha-se o grau de silanização pelo aumento de massa do suporte após a reação, lavagem e secagem.. A reação é feita num pesa-filtro e as pesagens em balança analítica, de modo a se minimizar a margem de erro decorrente do pequeno aumento de massa registrado, mesmo no caso da sílica, que absorve mais silano que os outros suportes.

3.3 - DERIVAÇÃO ARILAMINA DO SUPORTE

3.3.1 - PREPARAÇÃO DO CLORETO DE 3,5-DINITROBENZOÍLA (DNBC)

O DNBC é preparado a partir do ácido 3,5-dinitrobenzóico (DNBA). Entre os dois principais reagentes para síntese de cloretos de ácido [83], o cloreto de tionila (SOCl_2) e o pentacloreto de fósforo (PCl_5), escolheu-se o primeiro deles, devido à facilidade em se remover o excesso de reagente no final da reação (51).



Ácido 3,5-Dinitrobenzóico Cloreto de 3,5-Dinitrobenzoíla

O procedimento utilizado é o seguinte [83]:

- adiciona-se, num balão de duas bocas equipado com termômetro e condensador de refluxo, os dois reagentes na proporção de 3 ml de SOCl_2 destilado por grama de DNBA;

- conecta-se à saída do condensador um sistema de guarda, contendo uma solução de soda diluída para coletar o ácido clorídrico liberado pela reação;

- aquece-se o balão e mantém-se o sistema em refluxo até que todo o reagente se dissolva e que não haja mais liberação de gases (a reação leva 4-5 horas e a temperatura interna aumenta de 76,5 para 80°C), indicando o final da reação;

- desliga-se o aquecimento, deixa-se a reação parar de refluxar e troca-se rapidamente o condensador de refluxo por um de

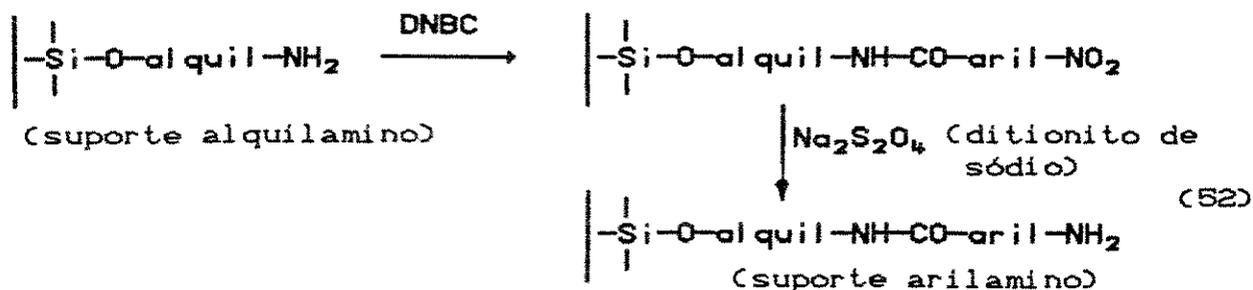
destilação;

- destila-se o SOCl_2 não reagido até que a temperatura interna suba para mais que 130°C . O SOCl_2 é dessa forma recuperado, podendo ser utilizado novamente.

- terminada a destilação, deixa-se o balão resfriar e adiciona-se piridina anidra (destilada sobre NaOH e mantida em peneira molecular), obtendo-se, dessa forma a solução que será utilizada na reação com o suporte alquilamino. O cloreto de ácido reage facilmente com água, devendo a solução ser mantida bem fechada e, preferencialmente, preparar-se apenas a quantidade necessária e usá-la logo em seguida. O DNBC também pode ser estocado, bem fechado, na forma sólida, preparando-se a solução com piridina imediatamente antes do uso; o inconveniente é que pode vir a reagir com água, voltando a DNBA, durante o manuseio constante do frasco.

3.3.2 - FUNCIONALIZAÇÃO DO SUPORTE

Partindo-se do suporte alquilamino, a preparação do derivado arilamino passa pelas reações apresentadas (52).



A reação do cloreto de ácido com o suporte alquilamino pode ser feita em piridina [81] ou clorofórmio misturado com

tetraetilamina [15,54,81,82]. O método com piridina implica em melhores resultados, na imobilização de peroxidase [81]. Nos métodos encontrados [15,54,81,82] utiliza-se o cloreto de p-nitrobenzoíla, em vez do cloreto de 3,5-dinitrobenzoíla, mas não se encontrou nenhum inconveniente a respeito do uso do segundo.

A redução com ditionito de sódio é feita como já descrito [15,54,81,82].

Procedimento:

- pesa-se o suporte num balão de boca esmerilhada, seca-se em estufa a 110°C e resfria-se em dessecador com vácuo;
- adiciona-se rapidamente a solução de DNBC em piridina preparada anteriormente (3.3.1), na seguinte proporção: vidro (1,0 ml/g), sílica (2,5 ml/g), celite (3,0 ml/g) e tampa-se o balão;
- deixa-se reagindo durante 30 min., com agitação ocasional;
- filtra-se e lava-se com água destilada até se eliminar completamente a piridina, e o DNBC não reagido;
- coloca-se o suporte num erlenmeyer e adiciona-se uma solução de ditionito de sódio a 5 %, na mesma proporção acima;
- deixa-se reagir, num banho em ebulição, durante 1 hora, com agitação ocasional;
- resfria-se, lava-se com água destilada e seca-se a 110°C durante 12 horas, para estocagem.

3.4 - ATIVAÇÃO DOS SUPORTES E IMOBILIZAÇÃO

3.4.1 - VIA GLUTARALDEIDO

A ativação do suporte alquilamino com um agente bifuncional é um dos métodos mais simples de imobilização por ligação covalente. O emprego de glutaraldeído como agente bifuncional é muito difundido [11,12,13,14,16,17,46,53,56,82,...] e aqui utilizado:

- pesa-se o suporte silanizado num erlenmeyer e adiciona-se uma solução de glutaraldeído 2,5 %, em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0, até cobri-lo (vidro: 1,0 ml/g; sílica: 2,5 ml/g; celite: 3,0 ml/g);

- deixa-se o suporte reagindo durante 1 hora, sob vácuo intermitente, a temperatura ambiente;

- lava-se o suporte ativado com água destilada até remover o excesso de glutaraldeído, terminando a lavagem com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0;

- após filtração, pesa-se o sólido úmido e adiciona-se uma solução de enzima cuja atividade tenha sido analisada (vidro: 1,0 ml/g; sílica: 2,5 ml/g; celite: 2,5 ml/g), em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0;

- deixa-se reagindo durante mais que 12 horas, a 4°C, com agitação ocasional;

- analisa-se o sobrenadante, filtra-se e lava-se com tampão citrato fosfato 0,05 M, pH 5,5, até que todo o excesso de enzima livre seja removido, acompanhado pela análise da atividade das águas de lavagem. O cálculo da atividade imobilizada é feito

considerando-se o volume de solução de enzima adicionado, a diluição pela água contida no suporte úmido, pesada antes da adição da enzima, e a análise final do sobrenadante;

- guarda-se a enzima imobilizada obtida em tampão citrato fosfato 0,05 M, pH 5,50, em geladeira a 4°C.

3.4.2 - VIA DIAZOTIZAÇÃO

A ativação do suporte via diazotização é também um método eficiente de se ligar a enzima ao suporte. Partindo de um suporte que contenha grupos arilamino, deve-se converter o grupo $-NH_2$ no sal de diazônio correspondente, altamente reativo, que reagirá posteriormente com os grupos amino e/ou fenol da enzima. O sal de diazônio resultante tem a terminação reativa $-N_2^+Cl^-$, como mostrado na Capítulo I, item 3.1.1, e é obtido pela ação do ácido nitroso, gerado pela adição de nitrito de sódio em meio ácido. O procedimento é bastante utilizado [15,16,19,54,60,81,82] e descrito abaixo.

- pesa-se o suporte arilamino (Cap. I, 3.3.2), coloca-se num erlenmeyer em banho de gelo e adiciona-se uma solução de HCl 2 N, também a 0°C (vidro: 2,0 ml/g; sílica: 5,0 ml/g; celite: 6,0 ml/g).

- adiciona-se pouco a pouco à suspensão obtida 25 mg de nitrito de sódio por ml de solução de HCl, mantendo agitação manual da frasco, e deixa-se reagir durante 30 min a 0°C, com agitação ocasional. O suporte adquire uma coloração amarelada ou laranja forte, como no caso da sílica.

- lava-se o sal de diazônio obtido com água destilada a 0°C

até remover o ácido clorídrico (pH > 5,5) e termina-se a lavagem com tampão citrato-fosfato 0.05 M, pH 7,0, também gelado.

- retira-se o excesso de líquido da última lavagem, pesa-se o suporte úmido e adiciona-se, ainda a 0°C, uma solução de enzima previamente analisada, em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0 (vidro: 1,0 ml/g; sílica: 2,5 ml/g; celite: 2,5 ml/g).

- deixa-se reagir durante 1 hora a 0-4 °C, analisa-se o sobrenadante e lava-se até completa remoção da enzima não imobilizada. O cálculo da atividade de enzima absorvida é feito da mesma forma que no método com glutaraldeído (Cap. I, 3.4.1) e a enzima imobilizada estocada da mesma forma.

3.5 - TESTES DE ATIVIDADE PARA GLICOSE OXIDASE

Entre os métodos de medida de atividade para glicose oxidase, pode-se citar os da Tabela II.2.

TABELA II.2 - GLICOSE OXIDASE: MEDIDA DE ATIVIDADE					
[Glicose] Temp. (°C)	Medida	Fonte O ₂	Tampão	Unidade	Ref.
13,9 mM ----	[O ₂]	ar	citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,50	$\frac{\text{pmol O}_2}{\text{mg.s}}$	[56]
---- 30	[Glic]	ar	pH 5,0	$\frac{\mu\text{mol glicose}}{\text{min}}$	[52]
2,25 %	[H ₂ O ₂]	ar	fosfato 0,1M, pH 5,0	$\frac{10 \mu\text{g glicose}}{\text{min}}$	[50]
3% 30	[O ₂]	ar	pH 5,90	$\frac{10 \text{ mm}^3 \text{O}_2}{\text{min}}$	[84]
13,9 mM	[O ₂]	ar	citrato-fosfato pH 5,5)	$\frac{\mu\text{mol O}_2}{\text{min}}$	[5]

O método adotado consiste em se seguir o consumo de O₂ na solução (devido à reação: glicose + O₂ → gliconolactona +

H_2O_2), a $25^\circ C$, através de um eletrodo de O_2 [5, pag. 481]. O meio reacional consiste de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,50, glicose 13,9 mM e catalisador. O volume final de reação é de 3-10 ml e deve ser borbulhado ar para saturar o meio antes de se iniciar a reação. A solução de glicose a ser adicionada para iniciar a reação deve ficar pelo menos duas horas a temperatura ambiente para permitir o equilíbrio entre os seus anômeros α e β . O valor de k_m para a glicose é de 15,4 mM, sendo então a concentração de glicose não saturante, mas em grande excesso em relação à de O_2 . A concentração de O_2 na água saturada com ar, a $25^\circ C$, é de 0,25 mM [5] e a força iônica do tampão tem efeito desprezível sobre esse valor.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1,0 μmol de O_2 por minuto nas condições acima, e é medida como uma taxa de reação de primeira ordem.

O método é executado seguindo-se a seguinte metodologia:

- adiciona-se a solução tampão à cela de reação, satura-se através do borbulhamento com ar e estabiliza-se a temperatura em $25^\circ C$;

- adiciona-se a amostra de enzima a ser analisada, livre ou imobilizada, coloca-se o eletrodo de O_2 , liga-se a agitação e ajusta-se a concentração de O_2 para 100 % no oxígrafo;

- adiciona-se a solução de glicose (25 μl de solução a 100 mg/ml para cada ml de tampão) através de uma microseringa e começa-se a cronometrar o tempo quando a concentração de O_2 cai para 96 % da saturação. Esse valor foi escolhido porque no momento da adição da glicose verificou-se um período transiente de

reação, com taxa não linear, descartado com segurança cronometrando-se o tempo abaixo de 96 % de saturação (ver Gráfico 9, Cap. III)

- quando é consumido 20 % do O_2 ($[O_2] = 76$ % da saturação), para-se o cronômetro e mede-se o tempo transcorrido. Os resultados mostram que os valores mais precisos do método estão na faixa de quantidade de enzima ajustada de tal forma que o tempo transcorrido para consumir 20 % do O_2 esteja entre 25 e 110 s. A atividade é calculada por:

$$At. = \frac{0,20 \times 0,25 \times V \times 60}{(V_a \text{ ou } m_a) \times t} \frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{min} \times (\text{ml} \text{ ou } \text{g})} \quad (\text{U/g ou ml}) \quad (53)$$

onde: $0,20 =$ consumo de O_2

$0,25$ (mM) = $[O_2]$ na solução saturada

$V =$ volume de tampão (~ volume da reação) (l)

$60 =$ fator de conversão (s \rightarrow min)

$V_a =$ volume de amostra (ml)

$m_a =$ massa seca de enzima imobilizada

$t =$ tempo de reação (s)

3.6 - REATORES UTILIZANDO GLICOSE OXIDASE IMOBILIZADA

Os reatores utilizando glicose oxidase que aparecem na literatura devem ser analisados do ponto de vista de seu objetivo. Na ref.[93], a glicose oxidase é utilizada, junto com peroxidase, em um analisador de injeção de fluxo, para se determinar $[O_2]$ em amostras. Reatores tubulares contínuos [46,88,89,91,92] e reatores de batelada [46] com glicose oxidase são também utilizados para estudos cinéticos (mecanismos de reação e de inativação) da enzima imobilizada. Apesar dessas aplicações, está

se buscando nesse trabalho o uso da enzima imobilizada em processos químicos; nesse sentido, os trabalhos publicados estão listados na Tabela II.3.

TABELA II.3 - USOS DA GLICOSE OXIDASE EM PROCESSOS QUÍMICOS							
Enzima(s) Imobilizada (s)	[Glicose]	T (°C)	Objetivo	pH	Fonte de O ₂	Tipo de Reator	Ref
GOx./Catalase (hidrogel de sílica)	6 %	30	Ác. Glic.	5.8	O ₂	batelada	[48]
GOx. (pellets de micélios)	0,5-2,0 %	--	Ác. Glic.	5.0	ar	mistura semi-contínuo	[50]
GOx./Catalase (células)	10 %	25	Ác. Glic.	6.0	H ₂ O ₂	batelada	[47]
GOx./Catalase (gelatina)	10 - 50 %	2	Ác. Glic.	5.2	O ₂	mistura contínuo	[86]
GOx./Cat. (gel poliacrilamida)	ovos (~ 0.3%)	37	Remoção Glicose	6.0	--	batelada	[87]

Como já demonstrado experimentalmente, a presença do produto de reação H₂O₂ acelera a inativação da enzima GOx [89]. Estudos mais aprofundados no mecanismo de inativação concluem que o envenenamento da enzima envolve o ataque do peróxido ao complexo glicose-glicose oxidase formado durante a reação [46]. Essas características sugerem que um reator operando com concentrações relativamente altas de glicose (>2%) devem conter a enzima catalase, adicionada com o objetivo de degradar o peróxido formado e que, ao mesmo tempo, aumenta a taxa de reação pela liberação de oxigênio nascente no meio ($H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + 1/2O_2$). O uso de baixas concentrações de glicose no reator implica em baixas concentrações de peróxido, minimizando o problema da inativação da enzima, mas não é interessante do ponto de vista da produtividade, pois têm-se que eliminar a água para se isolar o ácido glicônico formado.

Em termos de fontes de oxigênio, as que implicam em maiores taxas de reação são, em ordem crescente: ar, oxigênio puro e peróxido de hidrogênio/catalase [47].

Por motivo de simplicidade e disponibilidade de material, optou-se por usar inicialmente uma baixa concentração de glicose (2%) e ar como fonte de O_2 , de forma a se avaliar o desempenho do reator nessas condições. Testou-se depois a mesma enzima imobilizada com glicose 10 %, excesso de catalase e H_2O_2 como fonte de oxigênio, de forma a se comparar os resultados.

O reator utilizado no primeiro caso (Figura II.3) foi aerado através de uma placa porosa localizada na sua parte inferior e, no segundo caso, utilizou-se apenas um bequer com agitação magnética.

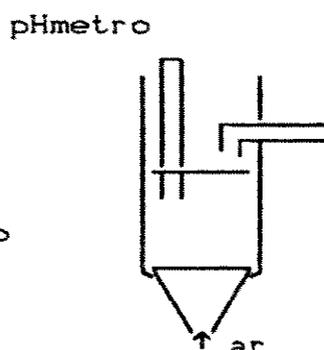


Figura II.3
Esquema do Reator Aerado

Na reação aerada, carrega-se o reator com a solução de glicose 2 %, com pH ajustado em 5,50, usando-se NaOH e HCl diluídos. Adiciona-se a enzima livre ou imobilizada, coloca-se e liga-se o pHmetro e inicia-se a aeração em tempo zero. À medida que a reação se processa, mantém-se o pH do meio em 5,40- 5,60, pela adição de solução padronizada de NaOH. O avanço da reação é medido em função do volume de NaOH consumido.

Na reação usando-se peróxido de hidrogênio, coloca-se a solução de glicose 10 %, com pH 5,50, num béquer, sobre uma placa

de agitação magnética e adiciona-se a enzima imobilizada e a catalase solúvel. Inicia-se a agitação e adiciona-se peróxido de hidrogênio 30 % a vazão constante durante toda a reação. Em relação ao acompanhamento da reação, procede-se da mesma forma anterior, pela adição de NaOH.

CAPITULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1-PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

1.1 - SILICA

Numa batelada típica de sílica gel obtém-se, após lavagem com água destilada, um gel com 13,5% de sólidos, correspondendo a um teor de 29% de SiO_2 no silicato de sódio utilizado.

Após tratamento hidrotérmico a 250°C durante 5 horas obtém-se o produto utilizado na imobilização de glicose oxidase e que foi caracterizado quanto a distribuição de poros. A classificação das partículas obtidas resulta na seguinte distribuição granulométrica: 10-16 mesh (24%); 16-24 (36%); 24-52 (22%); 32-60 (15%); 60-100 (3%).

De acordo com o Gráfico 1 [75] há uma relação entre a área superficial da sílica porosa e o diâmetro dos poros. No Gráfico 2 está o resultado da análise da porosidade de duas sílicas com faixas de granulometria diferentes (16-24 e 32-69 mesh). Embora a capacidade do porosímetro não tenha abrangido a totalidade dos poros presentes (opera de 350 a $8,75 \cdot 10^5 \text{ \AA}^\circ$), testes utilizando água resultaram na penetração de $0,59 \text{ cm}^3/\text{g}$, valor máximo que deveria ser obtido no porosímetro. A penetração de $0,43 \text{ cm}^3/\text{g}$ de mercúrio corresponde a cerca de 70% do valor máximo e a inclinação da curva indica uma faixa de poros estreita, como é esperado para o suporte utilizado na imobilização, com 60% entre 350 e 700 \AA° e um diâmetro médio de 440 \AA° . Pelo Gráfico 1, esse valor corresponde a uma área superficial de aproximadamente $40 \text{ m}^2/\text{g}$.

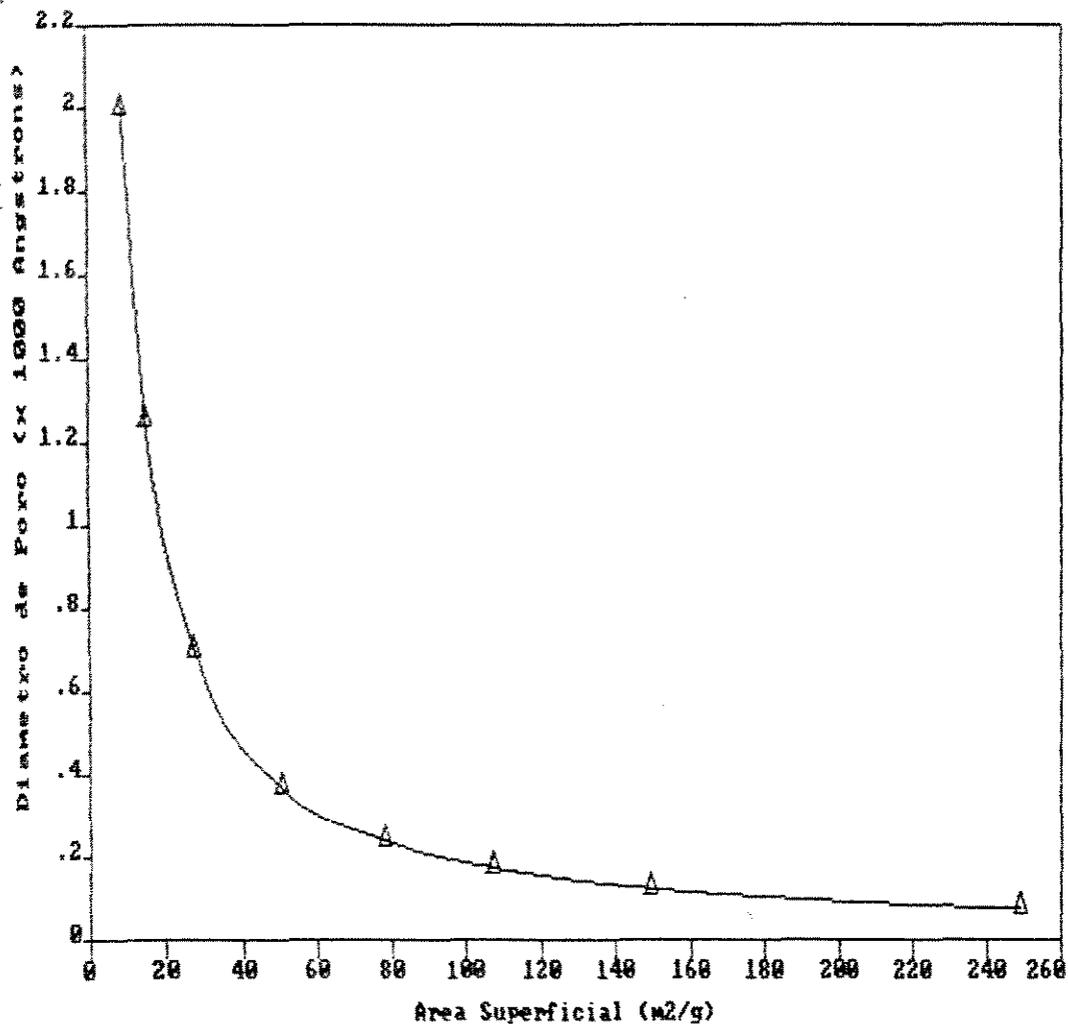
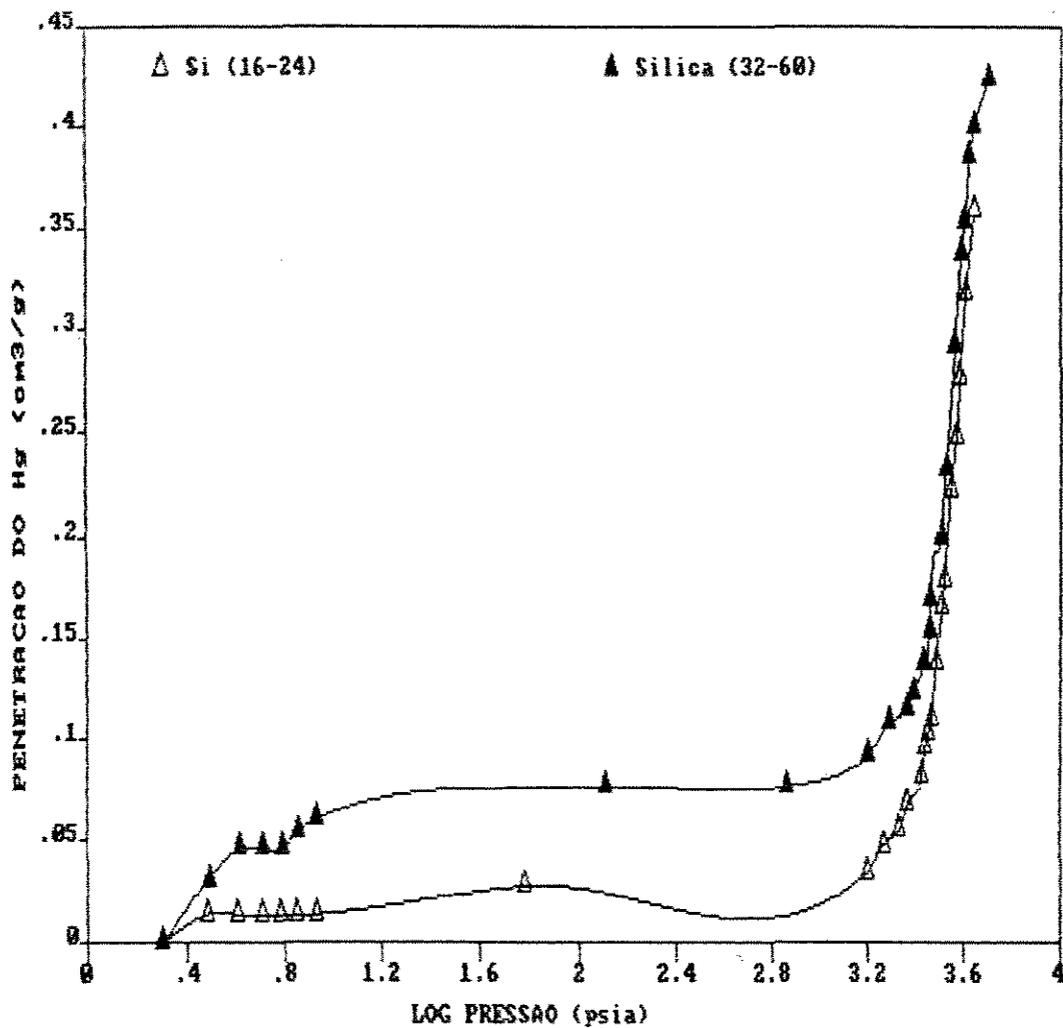


Gráfico 1 - Relação entre Diâmetro de Poro e Área Superficial Para Vidro Poroso [75]

O volume retido nos poros após o alívio da pressão (14% na sílica 32-60 e 23% na 16-24, em relação ao total penetrado) indica a presença de maior quantidade de poros não ideais (não cilíndricos) nas partículas maiores, como se poderia esperar.



$$\text{Diâmetro de Poro} = (175/P) \times 10^4 \text{ (A}^{\circ}\text{)}$$

$$\text{Diâmetro Médio dos Poros (} \rightarrow \text{Log P} = 3.6 \text{)} = 440 \text{ A}^{\circ}$$

	Hg penetrado(*)	Hg retido(**)
Sílica 32-60	0.423 cm ³ /g	0.061 cm ³ /g
Sílica 16-24	0.359 cm ³ /g	0.083 cm ³ /g

(*) volume máximo de mercúrio penetrado

(**) volume de mercúrio retido após alívio da pressão

Gráfico 2 - Sílica : Distribuição de Poros

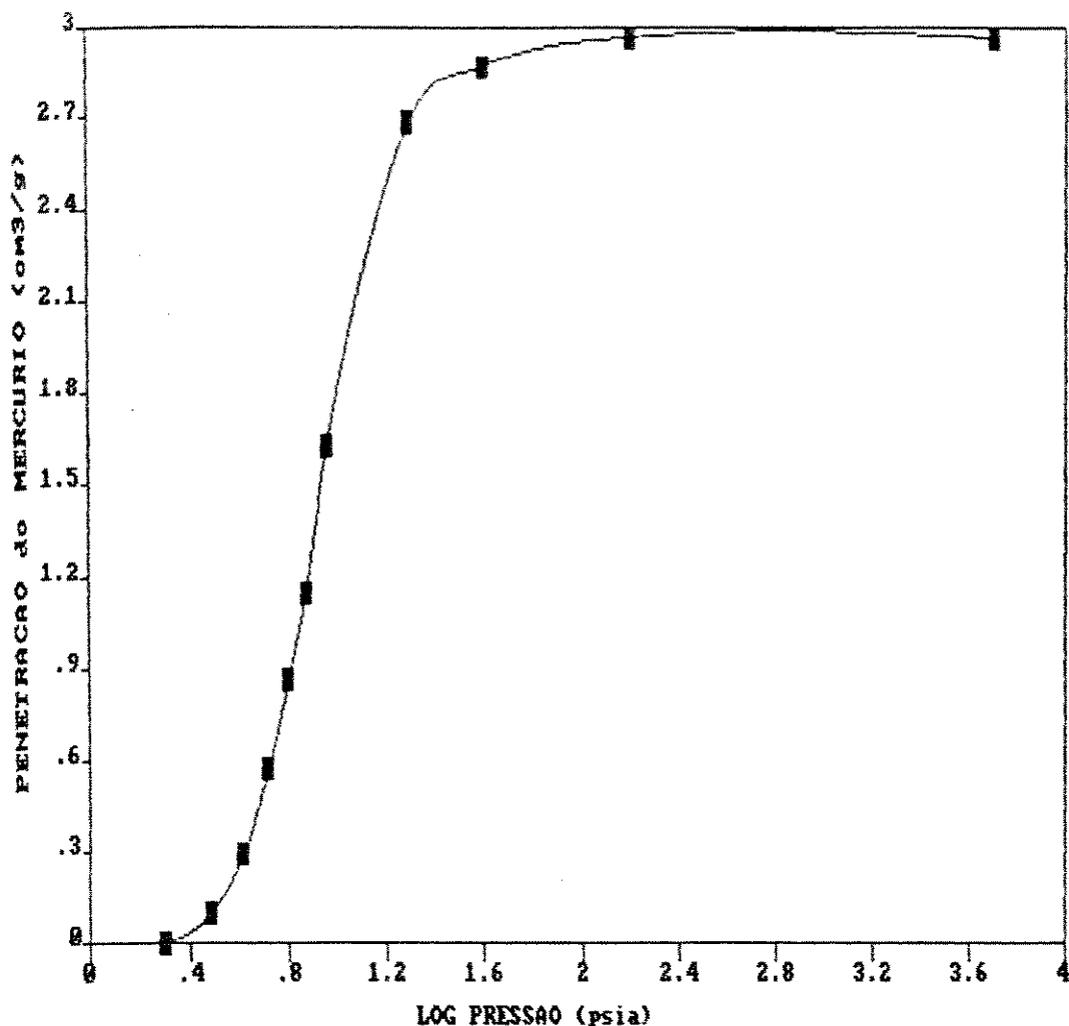
1.2 - CELITE

Na eliminação das partículas finas do celite, feita através de oito decantações durante 5-8 minutos, a partir de uma suspensão contendo 10% de sólidos, obteve-se 75% de produto classificado e 25% de finos.

A distribuição de poros no celite classificado é muito mais ampla que na sílica, como mostrado no Gráfico 3, sendo que 80% dos poros estão entre $8,8 \cdot 10^4$ e $44 \cdot 10^4 \text{ \AA}$.

O celite é formado pelo tratamento da terra de diatomácea, que consiste de esqueletos silícicos de microorganismos fossilizados, contendo em geral um grande espaço interno ocupado originalmente pelo vacúolo [68]. Durante o tratamento da terra de diatomácea para obtenção do celite, os microporos são destruídos e as partículas de diatomita se fundem, obtendo-se, após moagem, um produto macroporoso e mecanicamente mais resistente [68].

O diâmetro médio dos poros do celite é $19,6 \mu\text{m}$ ($1,96 \times 10^5 \text{ \AA}$) e o mercúrio penetrado foi $2,97 \text{ cm}^3/\text{g}$, ficando retido, após o alívio da pressão, 84% desse volume. O grande volume de mercúrio penetrado e retido confirma a estrutura formada por cascas porosas ocas, sendo que o diâmetro dos poros medidos corresponde, na realidade, às passagens para o espaço interior das microestruturas que compõem a partícula.



$$\text{Diâmetro de poro} = (175/P) \times 10^4 (\text{Å})$$

$$\text{Diâmetro médio dos poros } (\rightarrow \text{Log } P = 0.95) = 1.96 \times 10^5 \text{ Å}$$

$$\text{Hg penetrado} = 2.97 \text{ cm}^3/\text{g}$$

$$\text{Hg retido} = 2.94 \text{ cm}^3/\text{g}$$

Gráfico 3 - Celite : Distribuição de Poros

2 - ESTUDO DA SILANIZAÇÃO

Com o objetivo de se otimizar a silanização, em termos da concentração de silano na solução aquosa, foi feito inicialmente uma reação a 50°C, durante 12 horas na estufa, variando-se a concentração de silano de 0 a 10%. Como pode ser visto no Gráfico 4, para concentrações acima de 7,5% o ganho de massa do suporte

devido à reação com o silano se estabiliza em 15,8 mg/g de suporte. Aumentando-se o tempo de reação para 18 horas observa-se que a 50°C a sílica satura-se em concentrações mais baixas (4% de silano) e com o mesmo ganho de massa (16,2 mg/g de suporte) da reação em 12 horas. Reagindo-se durante 18 horas a 120°C verifica-se um ganho de massa maior que o obtido a 50°C, com um máximo de aproximadamente 15 mg/g de suporte, a 2,5% de silano. Acima desse valor o ganho de massa diminui e se estabiliza em aproximadamente 13 mg /g de sílica.

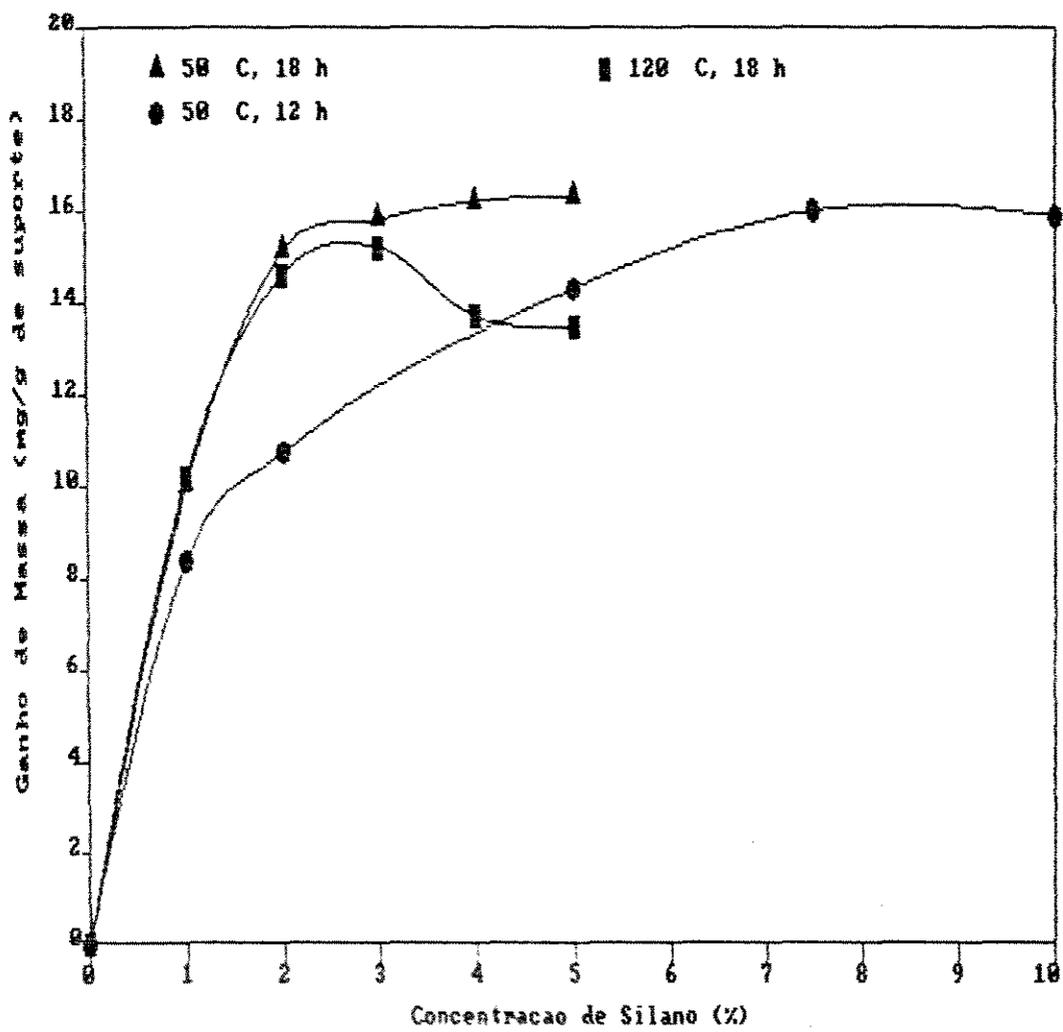


Gráfico 4 - Acompanhamento da Silanização

Considerando-se que o aumento máximo de massa de 16,0 mg/g corresponda ao valor típico de $4,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ para a reação da superfície com trimetilsilano [65] (equivalente a um aumento de massa de $4,5 \times (179 - 3 \times (12+2) - 2 \times 18) = 4,5 \times 10^3 = 0,4635 \text{ mg}/\text{m}^2$) pode-se estimar a área superficial de $16/0,4635 = 34 \text{ m}^2/\text{g}$. Como tratam-se apenas de estimativas grosseiras, esse valor obtido para a área superficial e a obtida pelo Gráfico 1, $40 \text{ m}^2/\text{g}$, podem ser consideradas concordantes.

3 - ANÁLISE DA GLICOSE OXIDASE

3.1-ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE

O espectro UV-visível de uma solução de glicose oxidase em tampão citrato-fosfato 0,05 M , pH 6.0 (Gráfico 5) mostra um pico de absorção máxima em aproximadamente 275 nm, correspondente aos aminoácidos tirosina e triptofano presentes na molécula de proteína [96]. Embora a medida da absorbância não permita uma medida absoluta da quantidade de proteína na solução, pois o coeficiente de extinção não é conhecido, esse método pode ser utilizado para se acompanhar a imobilização e a lavagem da enzima imobilizada [96]. Usando-se na imobilização uma solução de enzima que tenha sido inicialmente analisada , como mostrado no Gráfico 6, a quantidade relativa de proteína imobilizada pode ser avaliada pela análise do sobrenadante e/ou águas de lavagem.

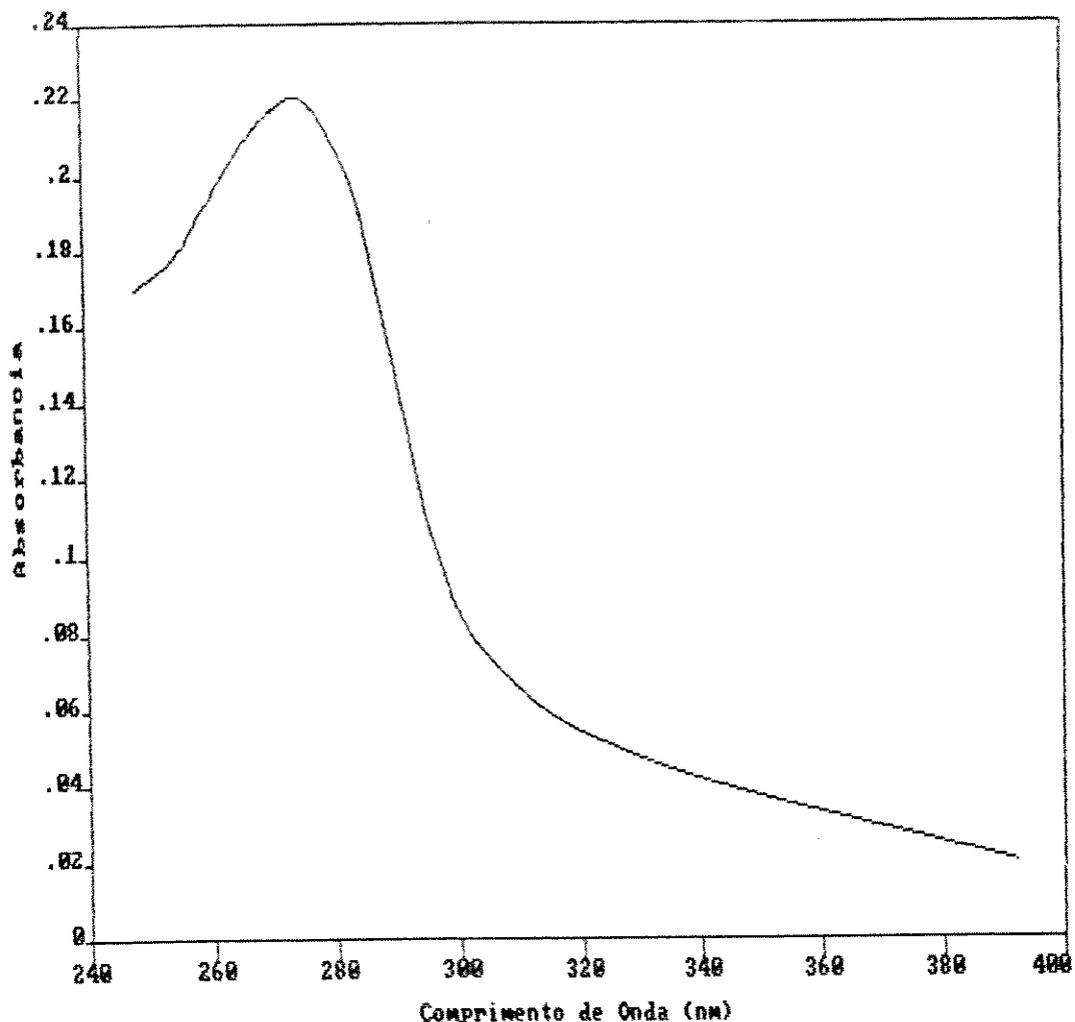


Gráfico 5 - Espectro UV-Visível da Glicose Oxidase

3.2 - ANÁLISE DA ATIVIDADE

A medida da atividade da glicose oxidase descrita no item 3.5 do Capítulo II foi desenvolvida a partir de um estudo do consumo de oxigênio na reação, considerando-se a linearidade (faixas de concentrações em que a reação é de 1^a ordem em relação ao O₂) e a simplicidade do método. Primeiramente preparou-se uma solução de glicose oxidase e acompanhou-se o consumo de oxigênio para várias quantidades de amostra testadas, em 12 ml de meio reacional, como mostrado no Gráfico 7. Verificou-se dessa forma que

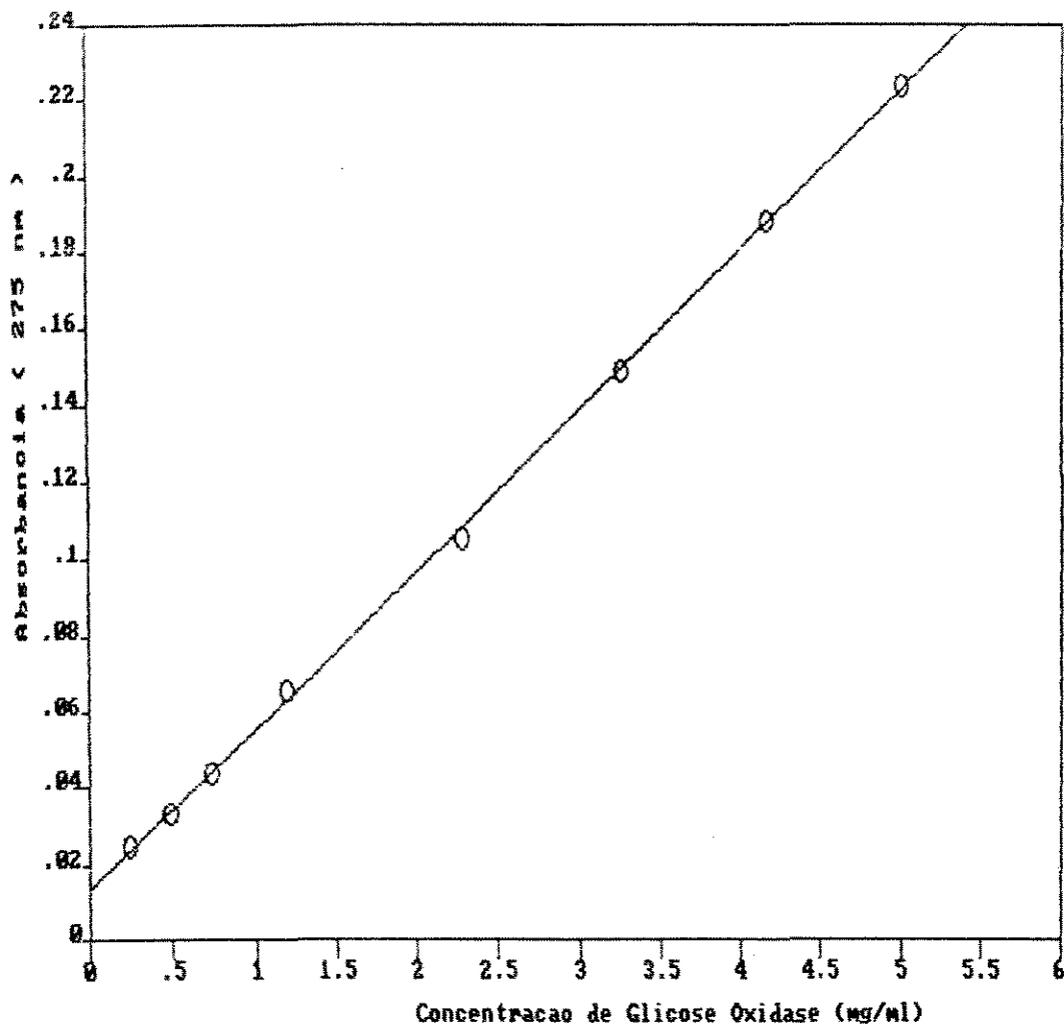
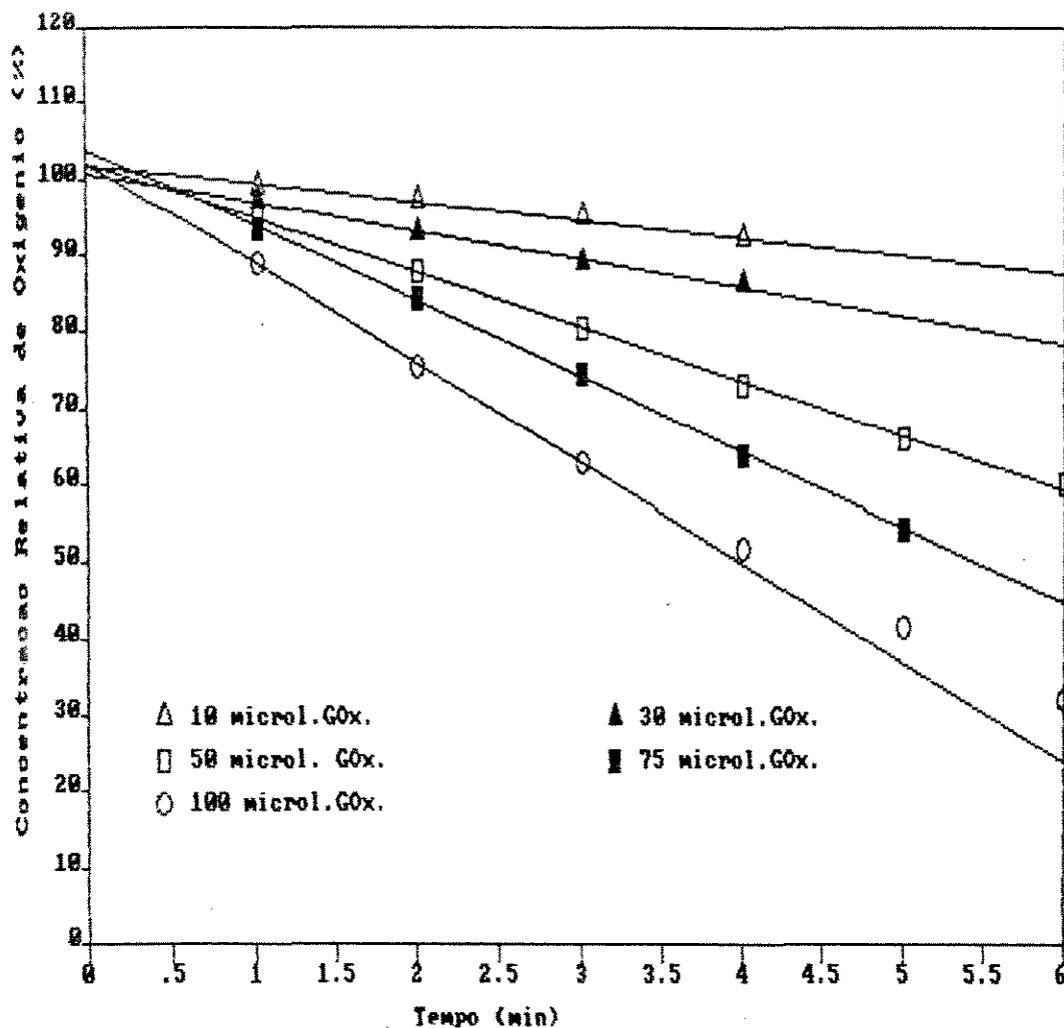


Gráfico 6 - Curva de Calibração da Concentração de Glicose Oxidase

o consumo de O_2 não era linear abaixo de 60% de saturação de O_2 no meio e que os resultados obtidos para essa faixa de atividade ($5,75 \times 10^{-3}$ - $32,50 \times 10^{-3}$ U/ml) estavam um pouco dispersos, dando uma reta com baixo coeficiente de correlação ($r = 0,9956$), Gráfico 8.

Considerando-se a metodologia utilizada nas análises acima, detectou-se os seguintes inconvenientes:

- existe uma oscilação na medida da concentração de O_2 no momento da adição da glicose para se iniciar a reação, provavelmente devido a perturbação do potencial da solução.

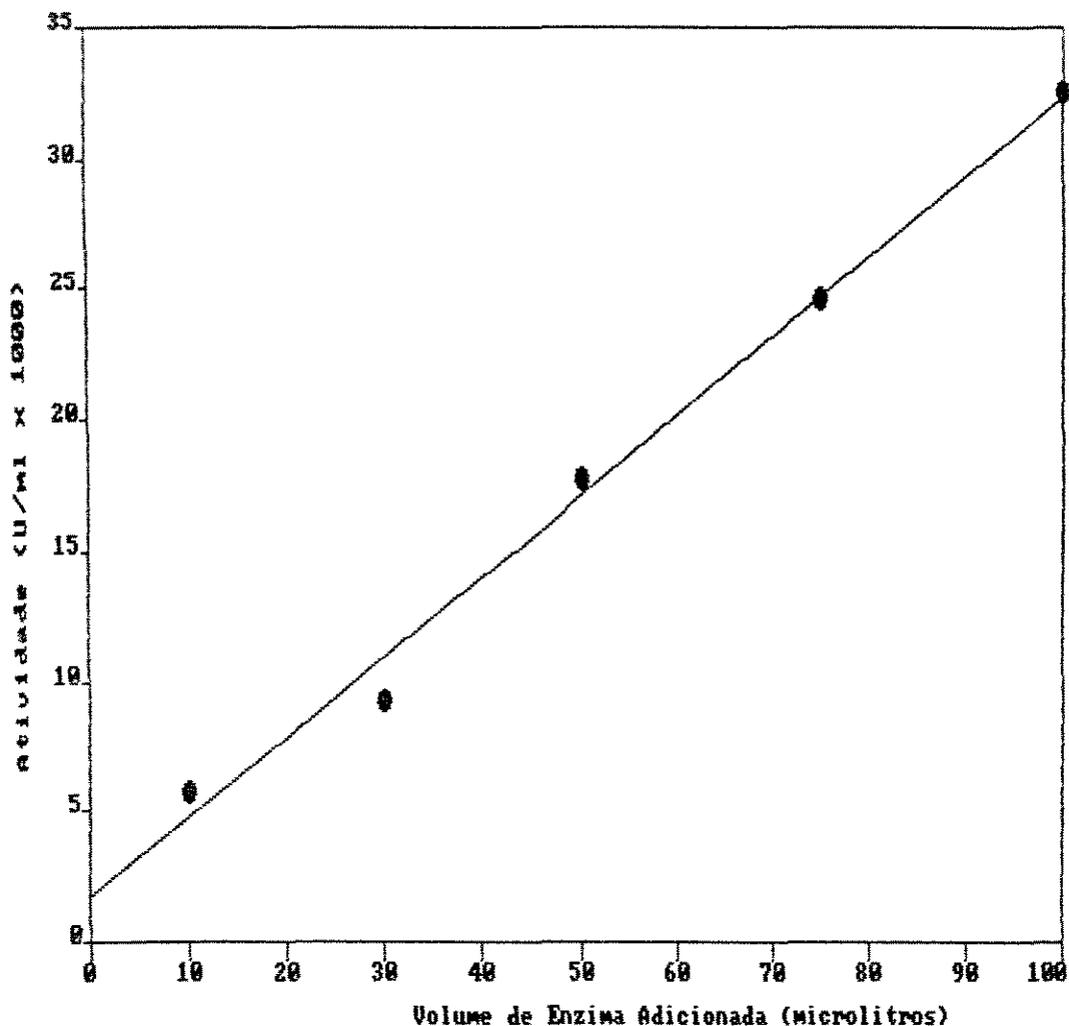


$$\text{Atividade (eq. 53)} = \frac{\Delta (\% \text{ O}_2)}{\Delta t (\text{min})} \times 0.25/100 \quad (\text{U/ml})$$

Gráfico 7 - Curvas de Consumo de Oxigênio

- a medida de pequenas variações do consumo de O_2 é muito imprecisa, pois a escala do oxígrafo é graduada em divisões de 2%,

- o acompanhamento cronométrico da reação, para depois se construir as curvas como do Gráfico 7, e calcular a atividade não é simples do ponto de vista prático. Objetivando conseguir melhores resultados que os do Gráfico 7, foram introduzidas as seguintes modificações:



reta obtida: Atividade (U/ml) = $(1.714 + 0.3063 \times V(\mu\text{l})) \times 10^{-3}$
 coeficiente de correlação = .9956

Gráfico 8 - Curva de Calibração do Teste de Atividade

- em vez de se acompanhar ponto a ponto o consumo de O_2 em função do tempo, passou-se a fixar o consumo em determinado valor (20%) e a cronometrar o tempo gasto para que isso ocorresse;
- para eliminar o período inicial não linear da reação, considerou-se como tempo zero a concentração de O_2 de 96% da saturação, iniciando-se a reação em 100%..

Depois dessas mudanças chegou-se ao procedimento descrito no item 3.5 do Cap. II e cujos resultados estão apresentados na Tabela III.1 e no Gráfico 9.

TABELA III.1 - RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE PARA GOx

Condições: consumo de 20% de O₂, 8,0 ml de tampão citrato-fosfato 0.05 M, pH 5.5, 200 µl de solução de glicose a 100 mg/ml para iniciar a reação.

Volume de Enzima (µl)	Tempo (s)	U/ml de Meio (1)	U/ml calculada (reta 1) (2)	* Erro1 (%)	U/ml calculada (reta2) (3)	** Erro2 (%)
2.50	210	0.0143	-	-	0.0177	+23.7
5.00	107.5	0.0279	0.0283	+1.4	0.0282	+1.1
10,0	60,0	0,0500	0,0496	-0,8	0,0492	-1,6
15,0	42,0	0,0714	0,0709	-0,7	0,0701	-1,8
20,0	32,8	0,0915	0,0922	+0,8	0,0910	-0,5
25,0	26,4	0,1136	0,1135	-0,1	0,1119	-1,5
30,0	21,6	0,1389	-	-	0,1329	-4,3
35,0	19,8	0,1515	-	-	0,1538	+1,5
40,0	17,6	0,1705	-	-	0,1747	+2,5

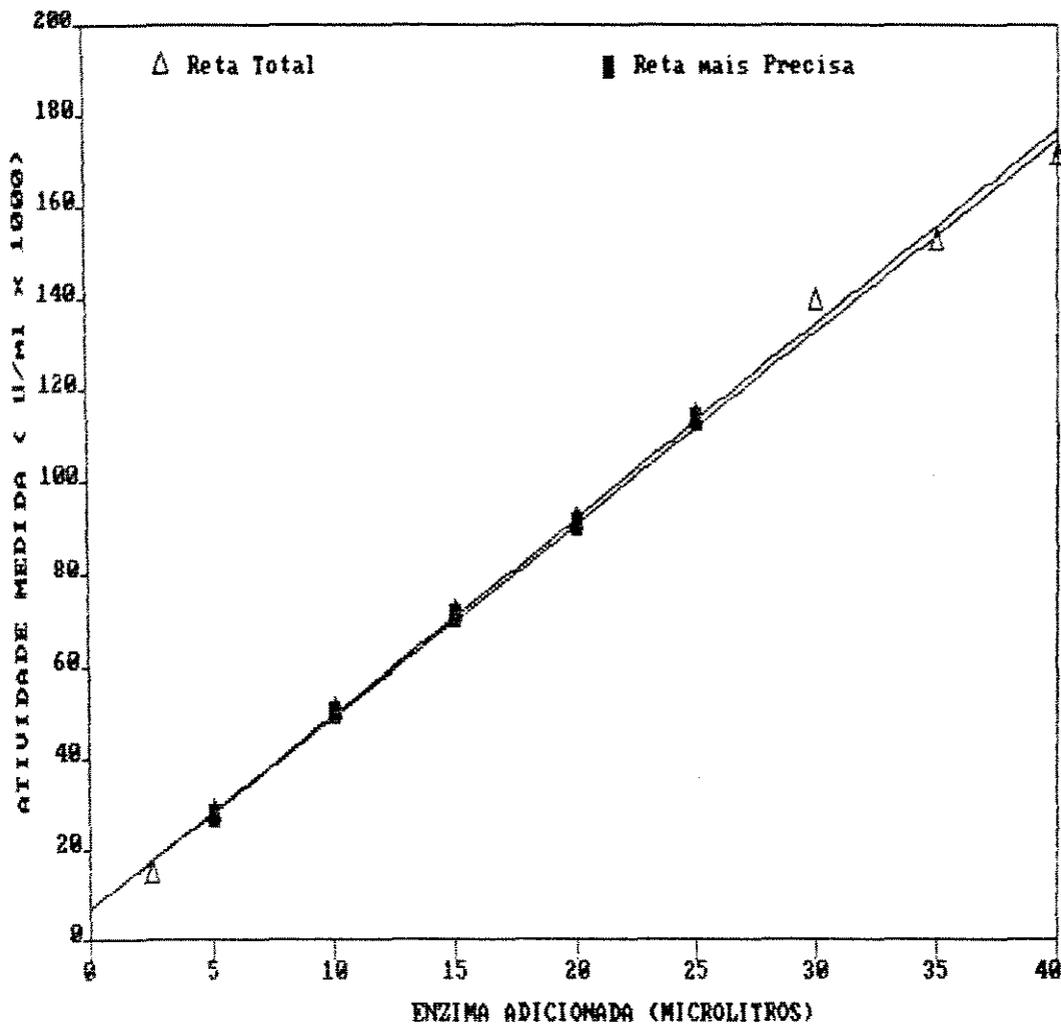
$$\text{Erro 1} = \frac{(2)-(1)}{(1)} \times 100 \quad \text{Atividade} = \frac{0,20 \times 0,25 \times 60}{t} = \frac{3}{t} \text{ (U/ml)}$$

$$\text{Erro 2} = \frac{(3)-(1)}{(1)} \times 100 \quad \text{onde: } 0,20 = 20\% \text{ de O}_2 \text{ consumido}$$

$$0,25 \text{ mM} = [\text{O}_2]$$

$$60 = \text{conversão (s} \rightarrow \text{min)}$$

Os resultados obtidos indicam que deve-se trabalhar em faixas de atividade de 0,028 - 0,110 U/ml para se obter resultados mais precisos (erro < 1,4%; Gráfico 9, reta mais precisa, coeficiente de correlação linear = .999), implicando num tempo de reação de 25- 110 s para consumir 20% do oxigênio. O erro obtido para atividades abaixo de 0,028 U/ml pode ser justificado pelo fato da reta obtida não passar pela origem (Gráfico 9), o que sugere uma região de não linearidade. Para atividades acima de 0,110 U/ml, e tempos de reação menores que 25 segundos, o erro na cronometragem começa a ser significativo: para uma diferença de 1 segundo entre 20 e 21 segundos de reação a variação na atividade medida é de aproximadamente 5%.



reta total: Atividade = $(7.306 + 4.185 \times V(\mu\text{l})) \times 10^{-3}$ U/ml
 reta + precisa: Ativ. = $(7.012 + 4.258 \times V(\mu\text{l})) \times 10^{-3}$ U/ml

Gráfico 9 - Curva de Calibração do Teste de Atividade

4 - IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE

4.1 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

Como uma forma de se testar a eficiência dos dois métodos de imobilização escolhidos (via glutaraldeído e via sal de diazônio), fez-se um teste utilizando os três suportes. A imobili-

zação foi feita como descrito no item 3.4 do Cap. II, utilizando-se uma solução de enzima com 4,0 U/ml.

Método	Atividade Obtida (U/g de suporte seco)		
	Sílica 16-24	Celite	Vidro 60-100
Glutaraldeído	2.10	3.86	0.22
Diazotização	1.83	3.85	0.24

Comparando-se os resultados da Tabela III.2 vê-se que os valores obtidos para cada um dos métodos são parecidos, não justificando o uso do método de diazotização, muito mais dispendioso em termos de custo e trabalho.

4.2 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO

Para se avaliar o tempo de contato necessário à imobilização da enzima nos suportes ativados com glutaraldeído, acompanhou-se a variação da atividade no sobrenadante, conforme o Gráfico 10. Observa-se que para todos os suportes grande parte da enzima foi imobilizada após 1,5 horas de reação. No caso da sílica 10-16, que foi o maior tamanho de partícula utilizada, vê-se que a reação é mais lenta, provavelmente controlada pela difusão de enzima no interior dos poros. À medida que o tamanho da partícula diminui, representado apenas pela sílica 16-24, a reação tende a se tornar mais rápida e se completar durante as primeiras horas. Por motivo de padronização, principalmente no caso de se trabalhar com várias reações de imobilização ao mesmo tempo, adotou-se 12 horas como tempo de reação. O vidro não foi testado

porque imobiliza uma quantidade de enzima pequena demais para ser detectada com precisão.

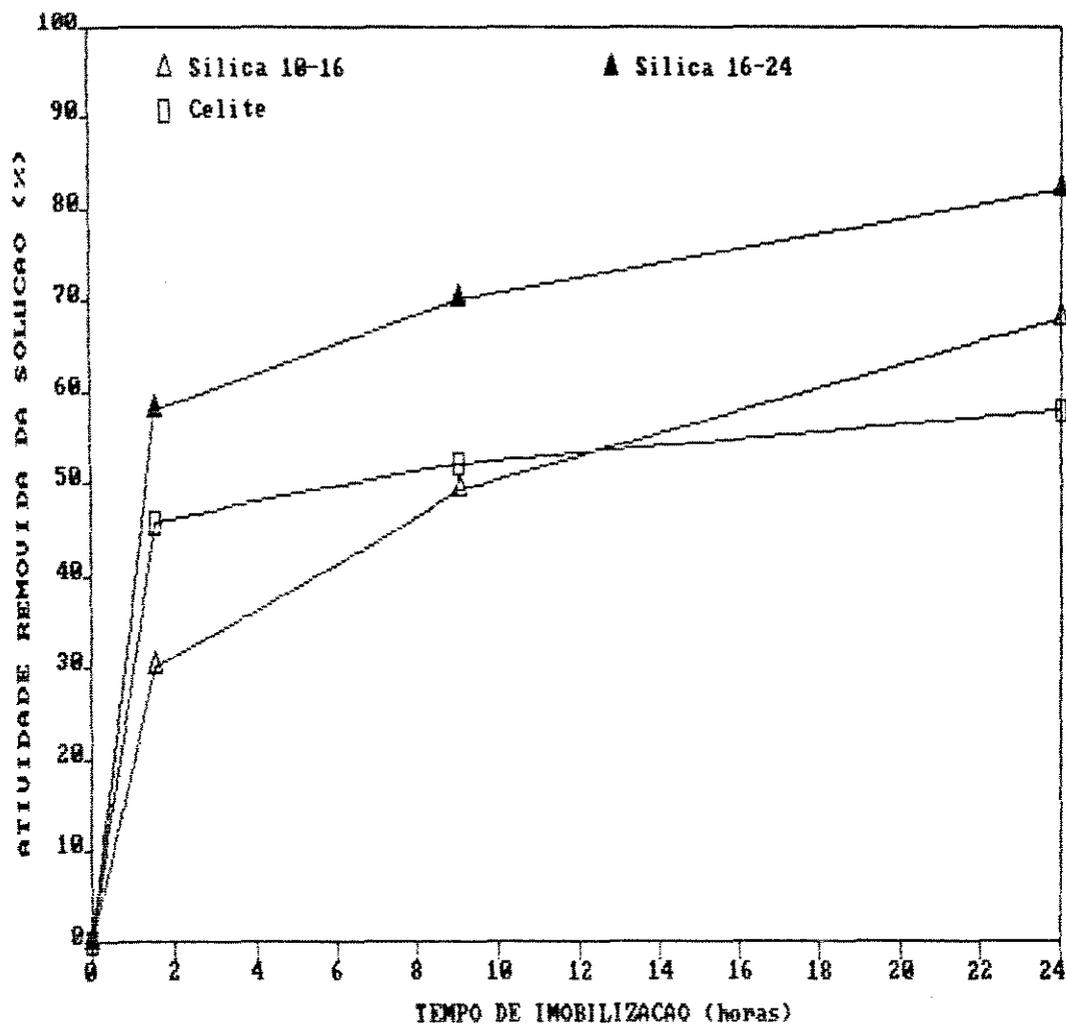
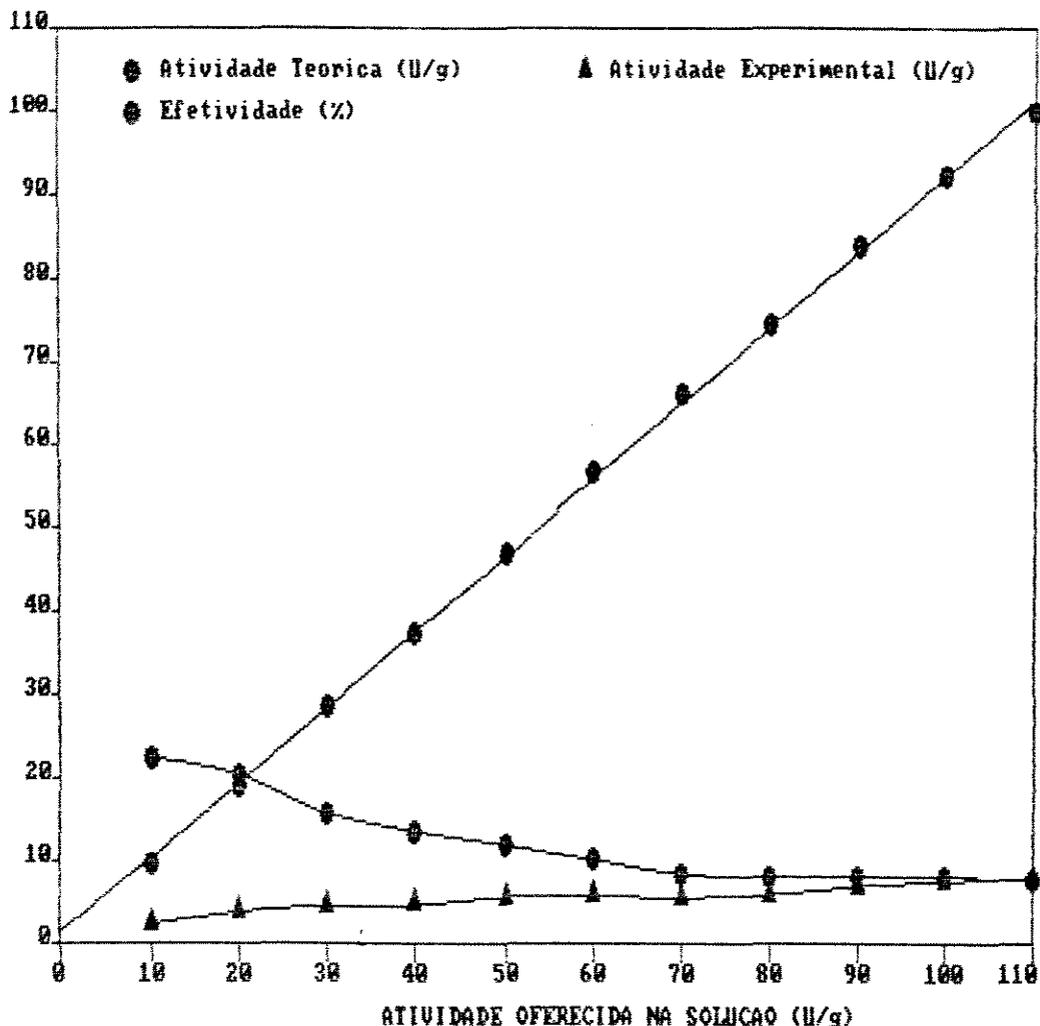


Gráfico 10 - Curva de Imobilização

4.3 - DETERMINAÇÃO DA CARGA DE ENZIMA NA SÍLICA

Um teste realizado com sílica 16-24, variando-se a quantidade de enzima oferecida e deixando-se a reação se completar durante 48 horas forneceu o Gráfico 11. Observa-se que independentemente da quantidade de enzima oferecida, a sílica absorve cerca



reta: $Y = 1.284 + 0.9099 \times X$

Gráfico 11 - Capacidade de Imobilização da Sílica 16-24 mesh

de 90% da enzima em solução, até o limite de 110 U/g testado. Apesar do aumento linear da quantidade de enzima imobilizada, quando se analisa a atividade do produto obtido constata-se que o ganho de atividade vai decrescendo e a atividade tende assintoticamente para um valor máximo de aproximadamente 8,0 U/g. Como os testes de atividade são realizados com grande excesso de glicose em relação ao oxigênio, conclui-se que o parâmetro que controla a atividade da enzima imobilizada na sílica é a difusão do oxigênio

nos poros .Mesmo para uma atividade teórica de 9,0 U/g, apenas 22% desse valor é efetivo. À medida que a carga de enzima no suporte aumenta, cada vez fração menor da mesma participa da reação, devido à falta de O₂ disponível; essas afirmações são confirmadas pelas curvas do Gráfico 11.

4.4 - ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO

Os resultados apresentados nesse item foram obtidos através de uma variação do método de imobilização do item 3.4.1 do Capítulo II. Para cada um dos suportes foram pesadas amostras com massas próximas (m_i , $i=1, \dots, 5$) e colocadas em tubos de ensaio (50- 90 mg de sílica, 150- 200 mg de vidro e 40-70 mg de celite). Os suportes foram ativados com 0,5 ml de glutaraldeído 2,5%, lavados com tampão citrato-fosfato 0.05M, pH 7.0 e foram adicionadas 0.5 ml de soluções de enzima em cinco concentrações A_0^i ($A_0^1 = 48$ U/ml, $38,4$ U/ml, $28,8$ U/ml, $19,2$ U/ml e $A_0^5 = 9,6$ U/ml). Após aproximadamente 24 horas de reação os sobrenadantes foram analisados em termos de atividade e os suportes contendo a enzima imobilizada foram lavados várias vezes com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. A atividade das enzimas imobilizadas foi determinada experimentalmente como descrito no item 3.5 do Capítulo II.

A partir das medidas feitas calculou-se os seguintes parâmetros:

- Atividade Absorvida pelo Suporte (U/g absorvida): calculada pela diferença entre a atividade adicionada ao suporte ((0,5 ml de solução) x A_0^i) e a atividade do sobrenadante (A_5^i , $i=1, \dots, 5$) após a reação, considerando-se a diluição pela umidade do suporte

(baseando-se em resultados experimentais 50% para a sílica e o celite e 10% para o vidro).

Atividade Absorvida = U Absorvida = $(0.5 \times A_0^i) - (0.5 + f \times m_i)$, onde f = correção devido à umidade = 1.0, para celite e sílica
= 0.1, para o vidro

Atividade Teórica (U/g teórica) = (Atividade Absorvida)/ m_i

Efetividade = $\frac{\text{Atividade Experimental (U/g)}}{\text{Atividade Teórica (U/g)}} \times 100$

4.4.1 - IMOBILIZAÇÃO EM VIDRO

No caso da imobilização em vidro 100 200 mesh não foi possível se medir a quantidade de enzima absorvida de solução com exatidão, pois os valores medidos nas condições da imobilização estão muito próximos da faixa de erro do método de análise. Os resultados obtidos são dados na Tabela III. 3, e no Gráfico 12.

[GOx] (U/ml) V=.5ml	U/g ofe- recida	massa vidro (mg)	U/ml sobrena- dante	U/g imobili- zada	U/g medida	Eficiên- cia (%)
9.60	21.40	224.12	7.92	2.96	5.51	186
19.2	63.7	150.70	17.7	3.21	6.32	197
28.8	95.7	150.54	25.9	7.05	7.07	100
38.4	121.8	157.62	35.0	7.32	7.92	108
48.0	150.6	159.36	42.9	11.7	9.24	79

Como pode ser observado no Gráfico 12, à medida que se aumenta a concentração de enzima na reação de imobilização, também há um aumento da atividade imobilizada. Apesar de não ter sido possível determinar a eficiência exata da imobilização, valores na faixa de 80-100% são esperados, já que a reação ocorre na

superfície do suporte, não existindo portanto resistências internas de difusão.

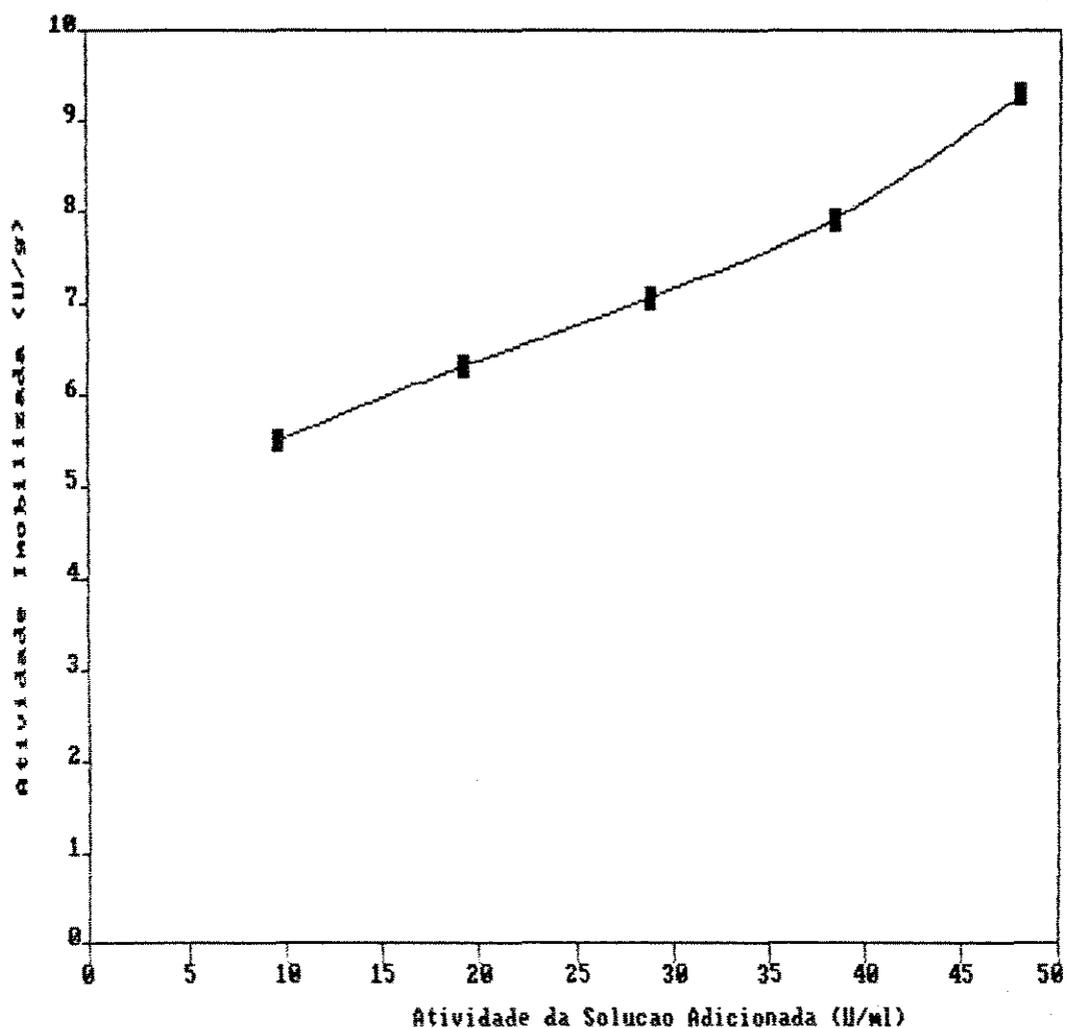


Gráfico 12 - Imobilização em Vidro 100-200 mesh

4.4.2 - IMOBILIZAÇÃO EM SILICA

A imobilização em sílica foi estudada em função da quantidade de enzima absorvida pelo suporte e do tamanho da partícula. Verificou-se que os resultados do item 4.3 deste capítulo podem

ser extendidos até o valor de 400 U de enzima oferecida por grama de sílica, mantendo-se a absorção de aproximadamente 90% da enzima da solução.

Como pode ser visto no Gráfico 13, à medida que o tamanho da partícula de suporte diminui, a atividade da enzima imobilizada aumenta. Para a sílica 10-16 mesh, a máxima atividade obtida é de aproximadamente 7,0 U/g, chegando a 28 U/g na sílica 60-100, o que confirma a limitação da atividade devido a resistências à difusão de O_2 .

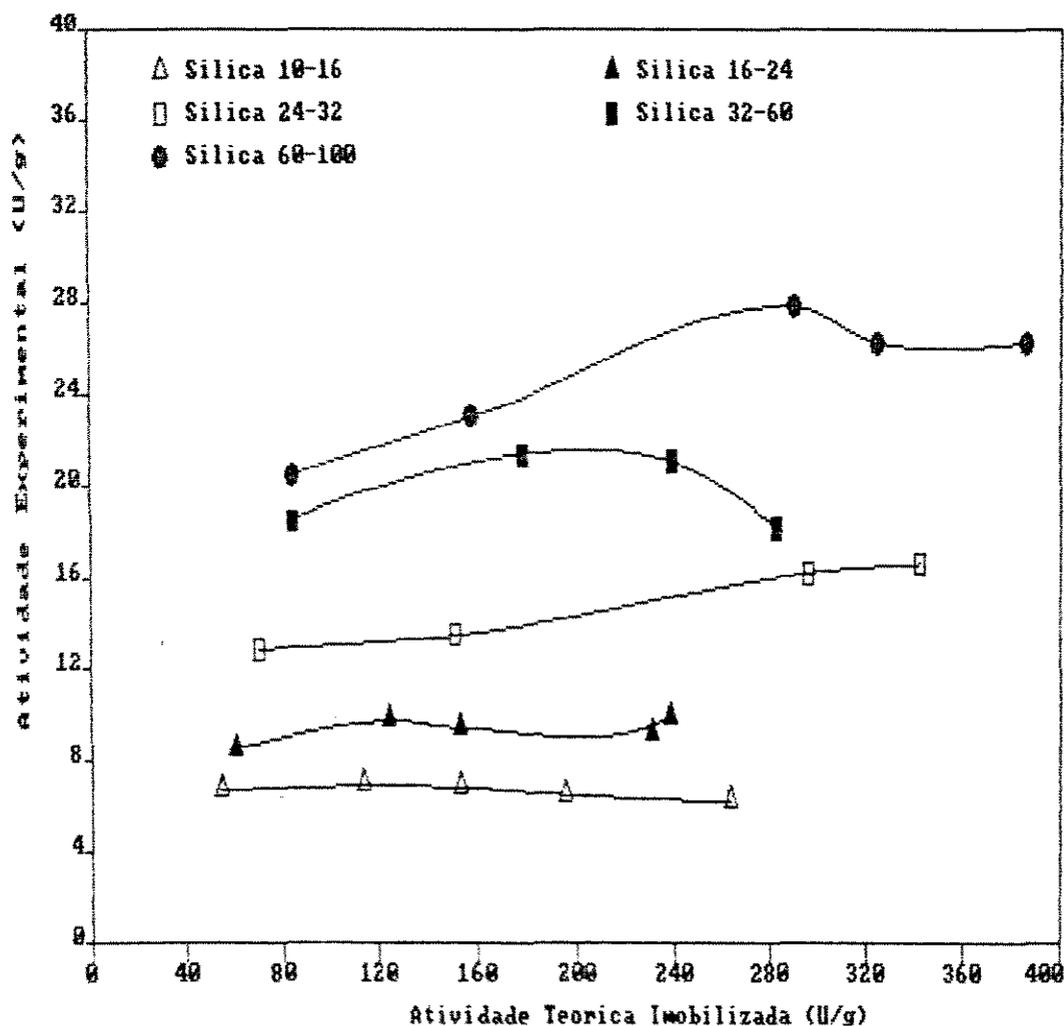


Gráfico 13 - Atividade da Glicose Oxidase Imobilizada em Sílica

No Gráfico 14 apresenta-se a fração da atividade teórica imobilizada, calculada como a atividade experimentalmente medida dividida pela atividade absorvida da solução, para vários tamanhos de partícula. Podem ser observadas nesse gráfico as curvas de eficiência da imobilização para cada tamanho de partícula. Observa-se que existe um compromisso entre a carga de enzima e a eficiência da imobilização. Para a sílica 60-100 têm-se uma eficiência 24% (Gráf.14) e uma atividade de 20 U/g(Gráf. 13), para carga de 85 U/g, e uma eficiência de apenas 10% para uma carga de 290 U/g (Gráf.14). Na seleção das condições de imobilização para uso do suporte em reatores, deve-se levar em consideração os custos envolvidos e as condições reais de operação, devido à possível redução das resistências difusionais em função das condições de escoamento.

4.4.3 - IMOBILIZAÇÃO EM CELITE

Os resultados da imobilização em celite estão no Gráfico 15, incluindo a atividade obtida e a eficiência da imobilização. Observa-se uma queda da eficiência com o aumento da carga de enzima e um aumento muito pequeno da atividade na faixa de concentrações estudada, em relação à atividade teórica. Embora o comportamento do celite seja qualitativamente similar ao da sílica, conseguiu-se uma eficiência de até 76%, enquanto o valor máximo para a sílica foi de 25% (Gráfico 13). Obteve-se preparações imobilizadas em celite com até 50 U/g, comparadas a 28 U/g para a sílica 60-100. Essa maior eficiência é resultado da estrutura do celite discutida no item 1.2, com poros de grande

diâmetro facilitando a difusão interna. Atribui-se esse aumento de eficiência à menor resistência à difusão de O_2 , aumentando a sua disponibilidade nas imediações da enzima imobilizada e resultando em maiores velocidades de reação.

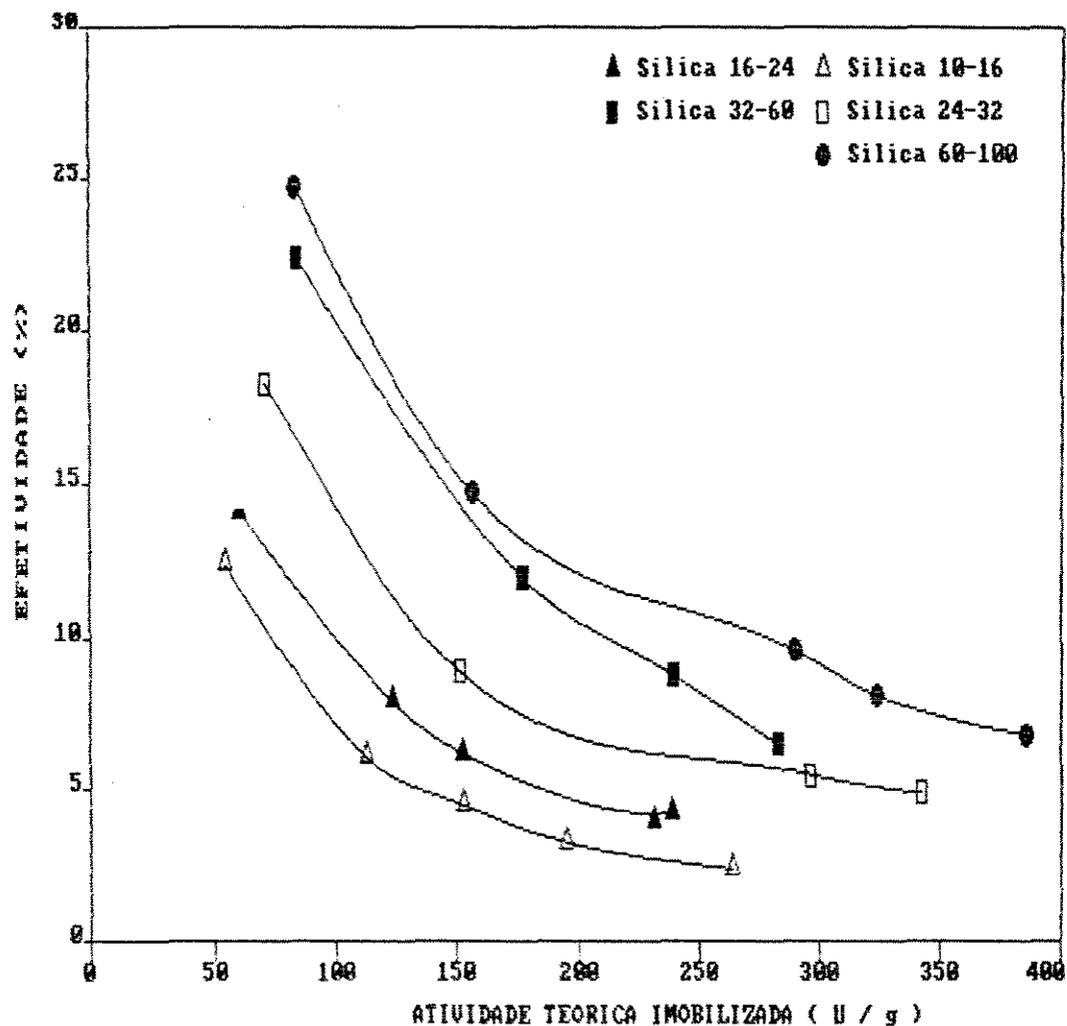


Gráfico 14 - Eficiência da Glicose Oxidase Imobilizada em Silica

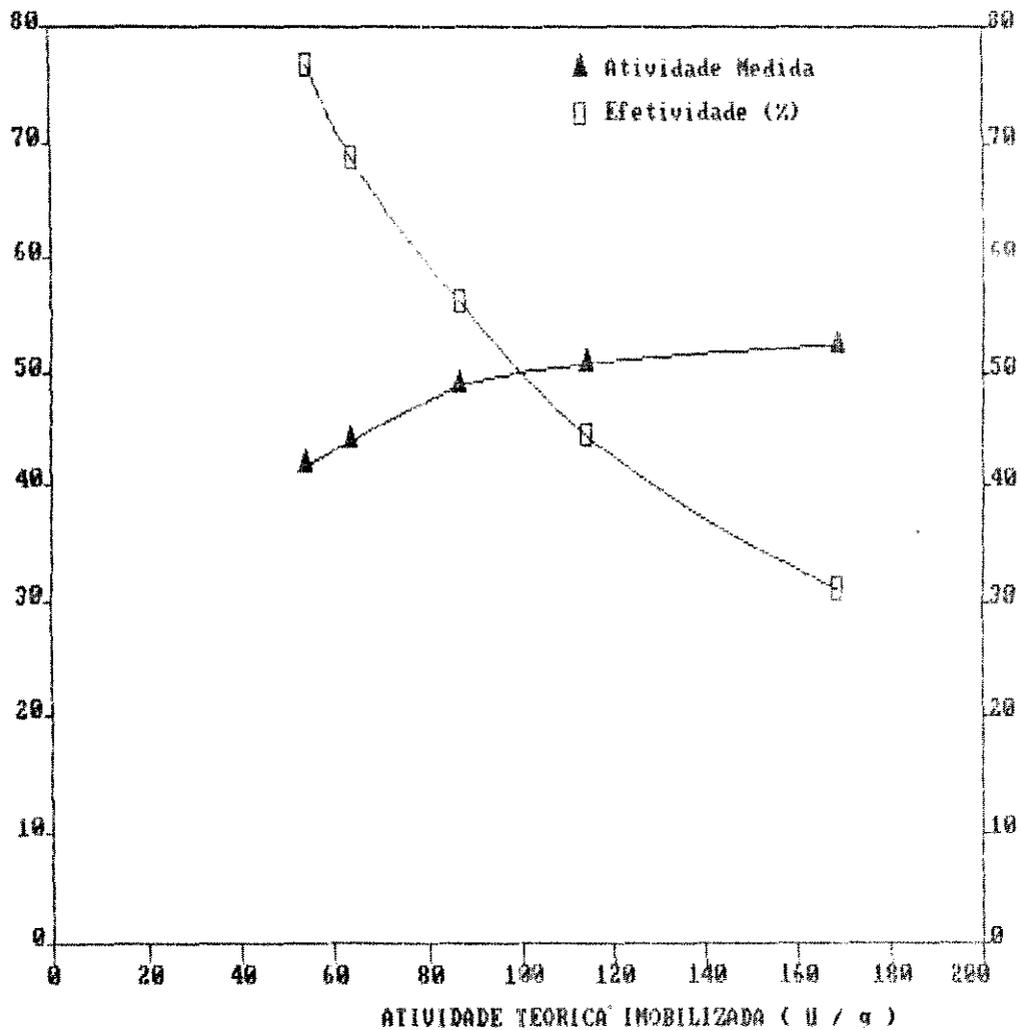


Gráfico 15 - Glicose Oxidase Imobilizada em Celite

5 - CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Com o objetivo de se caracterizar a enzima imobilizada, foram feitos alguns testes de atividade comparando-a com a enzima na forma solúvel.

5.1 - ATIVIDADE X pH

A atividade da enzima solúvel e da imobilizada em sílica foi medida como descrito no item 3.5 do Capítulo II, mas variando-se o pH do tampão citrato-fosfato 0,05 M entre 3,0 e 7,0.

Alguns valores encontrados na literatura para os pontos extremos de pH usados são dados na Tabela III.4. Comparando-se os resultados obtidos, com os dados dispersos encontrados na

Fração da Atividade Máxima (%)				Suporte	pH ótimo		ref.
pH = 3.0		pH = 7.0			E. L.	E. I.	
E. L.	E. I.	E. L.	E. I.				
5	65	85	98	carvão	5.5	6.5	51
22	38	50	75	micélios	5.0	6.0	50
22	30	73	76	poliacrilami- da	6.0	6.0	87
20	55	84	97	sílica	6.0	6.0	48
60	3	46	37	vidro não poroso	5.5	5.5	54
36	50	74	83	sílica	5.5	5.5	este trab.
-	10	-	44	Ni-NiO	5.6	5.6	79

E.L. = enzima livre, E.I. = enzima imobilizada

literatura, pode-se dizer que as curvas concordam com o esperado (Gráfico 16) não havendo alteração do pH ótimo da enzima e tendo a curva da enzima imobilizada se alargado, alterando a faixa de pH com atividade >80% de 4,3-6,7 para 4,0-7,2.

5.2 - ATIVIDADE x TEMPERATURA

Aumentando-se a temperatura do meio nos testes de atividade descritos no item 3.5 do Capítulo II, obteve-se o Gráfico 17. Observou-se que a 50°C houve um aumento de 40% em

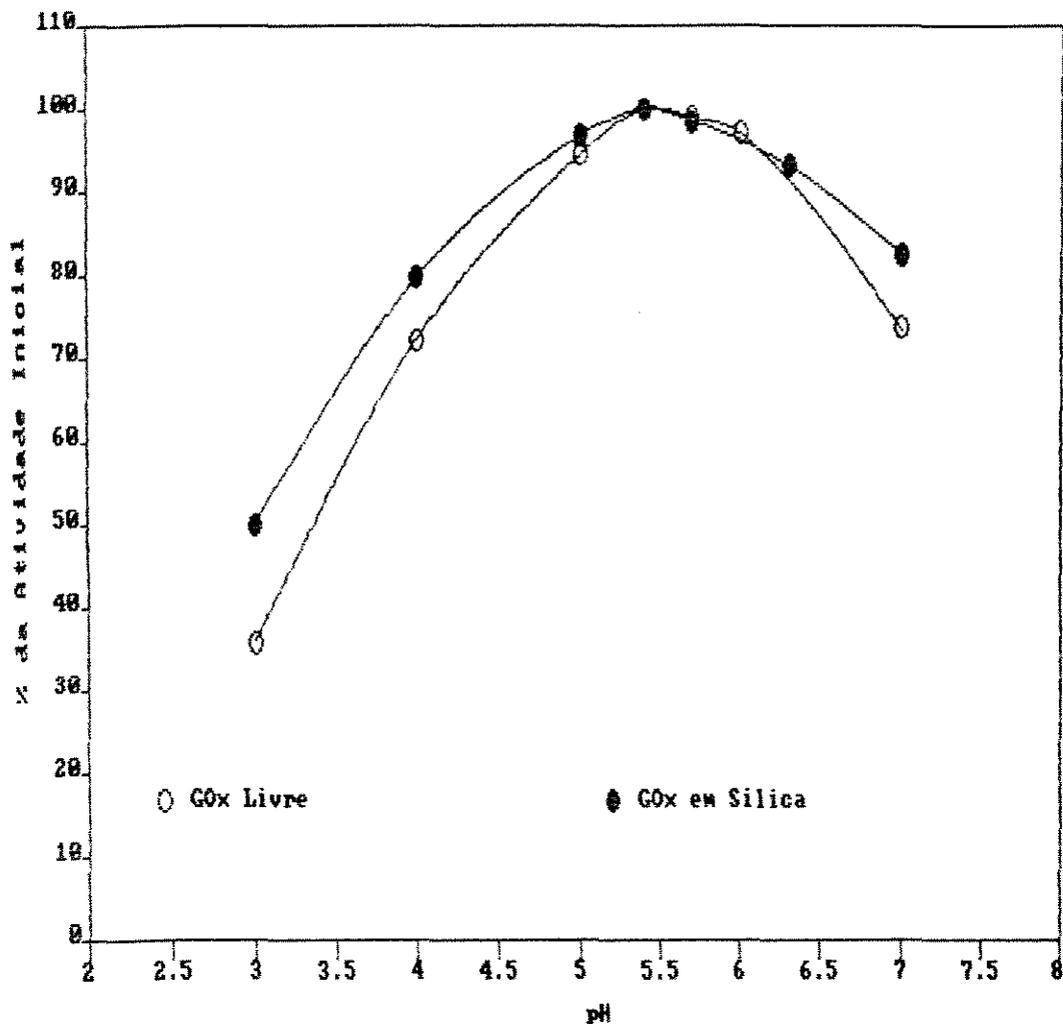


Gráfico 16 - Atividade da Glicose Oxidase em Função do pH

relação à atividade a 25°C e que essa variação foi praticamente igual nos casos da enzima livre e imobilizada em sílica. O aumento maior ocorre na faixa de 25 - 35°C (28%), sendo que na faixa de temperatura 40 - 50°C o aumento é de apenas 7%, e a atividade tende a se estabilizar, provavelmente para depois diminuir, próximo à temperatura limite de atuação da enzima de 65% (ver item 5.3)

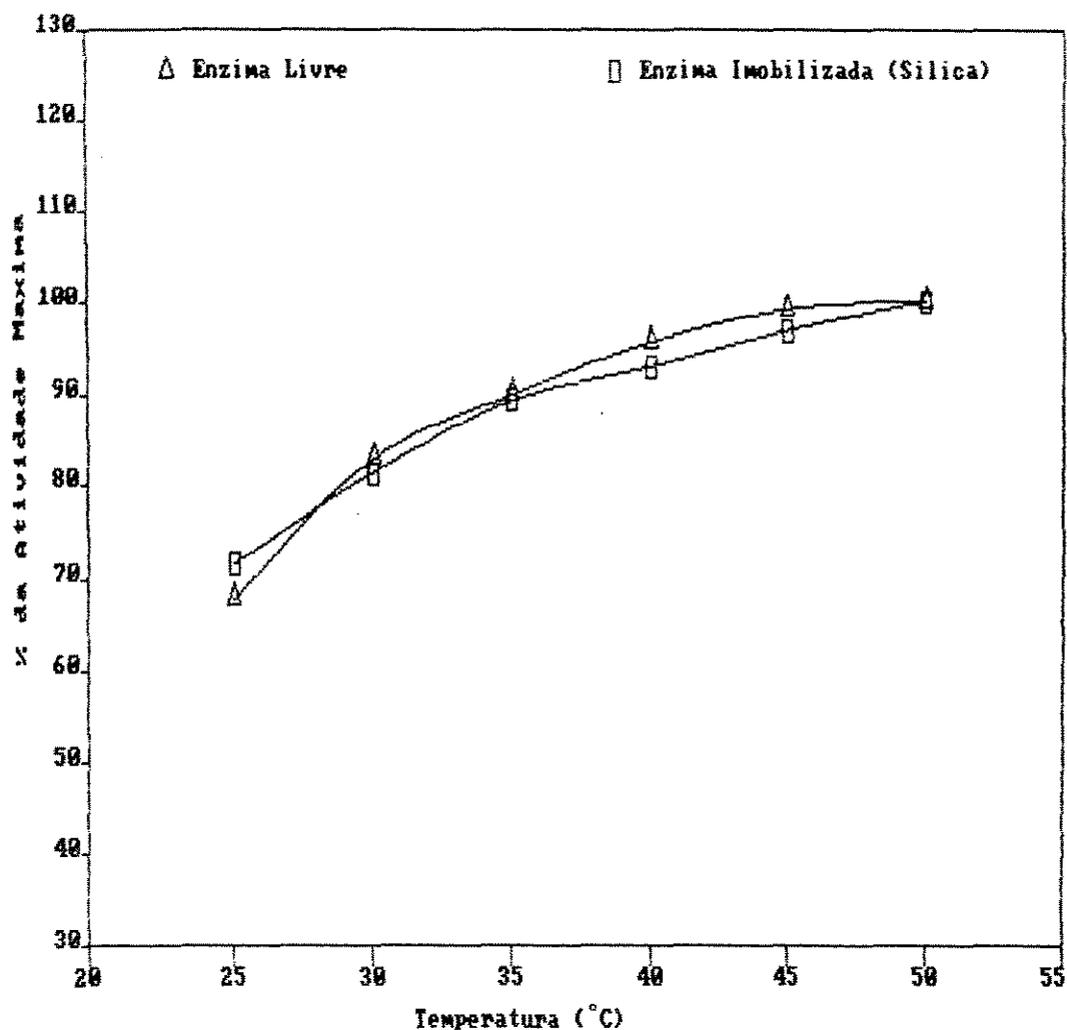


Gráfico 17 - Atividade da Glicose Oxidase em Função da Temperatura

5.3 - INATIVAÇÃO TÉRMICA

O efeito do aquecimento sobre a atividade da glicose oxidase tem sido estudado em vários trabalhos [48, 53, 56, 57], mas em apenas dois desses a 60°C, como foi feito experimentalmente. A temperatura de 60°C foi escolhida devido à rápida inativação da enzima livre a temperaturas mais altas, (2 minutos, a 65°C [48]), impedindo-se medidas experimentais precisas nesse pequeno intervalo de tempo. Para se avaliar numericamente a

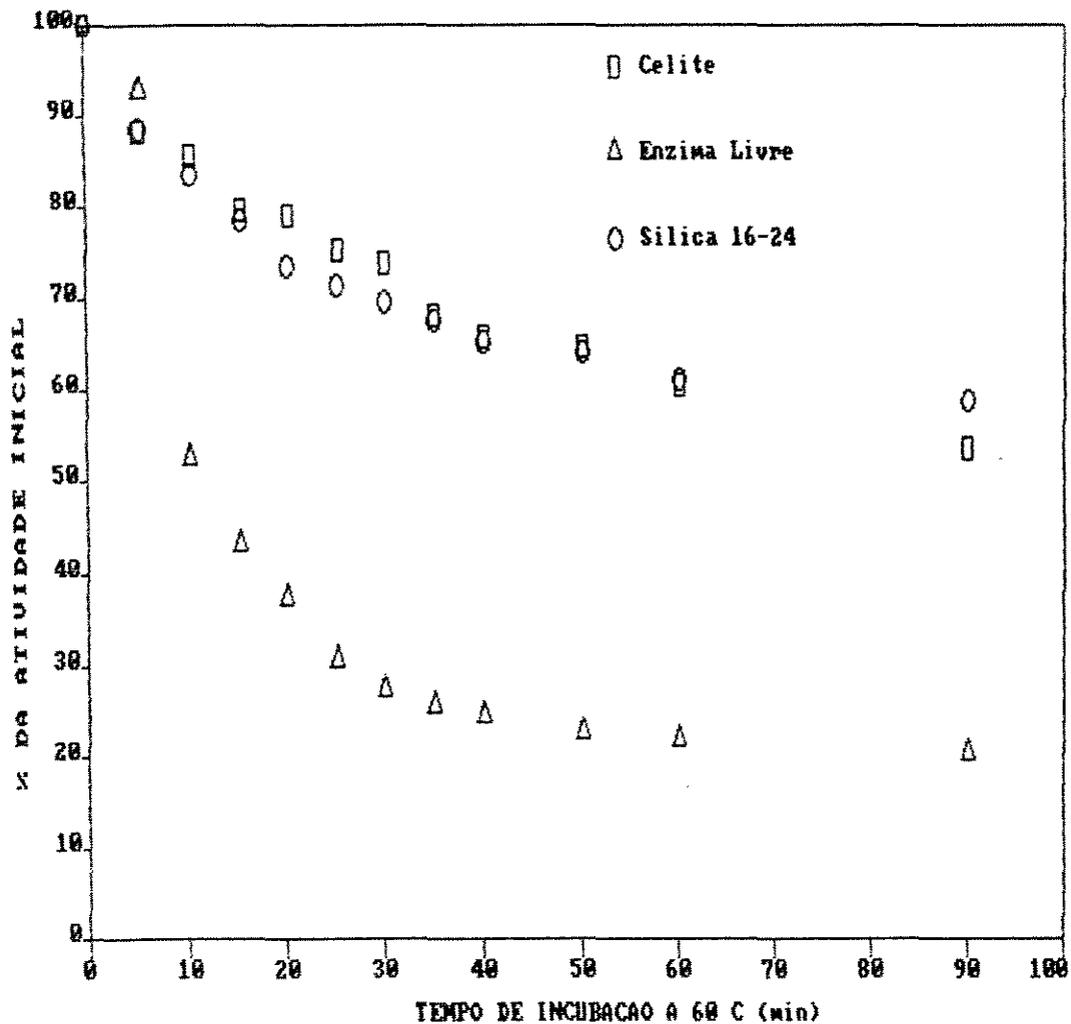


Gráfico 18 - Inativação da Glicose Oxidase a 60 °C

taxa de inativação foi considerado o tempo de meia vida da enzima (tempo para que a atividade atingisse 50% do valor inicial) e a constante de inativação K_i (min^{-1}) dada pela Equação [56]:

$$\ln A = \ln A_0 - k_i(t - t_0)$$

onde A = atividade no instante t

A_0 = atividade no instante t_0 inicial

Observa-se como mostrado no Gráfico 18, uma queda relativamente rápida da atividade nos primeiros 5 minutos a 60°C e a redução gradual dessa queda nas faixas de 5-40 e 40-90

minutos, tanto para a enzima em solução quanto as imobilizadas. Na Ref. [56] a inativação rápida da enzima imobilizada ocorre nos primeiros 10 minutos de aquecimento a 61°C e a inativação mais lenta, de 10 a 30 minutos. As informações disponíveis não permitem comparar os resultados obtidos acima de 30 minutos nem os resultados para a enzima livre, que são sempre tratados como uma única reta. Os valores numéricos obtidos são apresentados na Tabela III. 5.

TABELA III.5 - INATIVAÇÃO TERMICA A 60°C						
	$k_1 \times 10^3$ (1/min)	$k_2 \times 10^3$ (1/min)	$k_3 \times 10^3$ (1/min)	Meia Vida (min)	Ref.	
Enzima Livre	14	-	-	48	57	
	462	-	-	1.5	56	
	92	37	3.7	11	este trab.	
Enzima Imobilizada	39	17	-	33	56	vidro poli-etilenimina
	14	-	-	83	57	vidro
	25	8	4	100	este	celite
	25	9	2	160	trabalho	sílica

A discrepância entre os dados encontrados para a inativação da enzima livre só permite observar que se obteve um valor intermediário entre os da literatura, tanto em termos de K_i como de tempo de meia vida. Com relação à enzima imobilizada, o produto obtido apresentou-se mais estável termicamente, com até o dobro do tempo de meia vida da Ref. [57]. A enzima imobilizada em sílica é mais estável termicamente que a imobilizada em celite.

5.4 - ATIVIDADE x CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da variação de atividade em relação à concentração de glicose foi feita como descrito no Capítulo II, item 3.5, mas adicionando-se soluções de glicose mais concentradas (1M ou 2M), de forma a se conseguir a concentração de glicose desejada na reação sem aumento substancial do volume do meio. Os resultados obtidos estão mostrados no Gráfico 19.

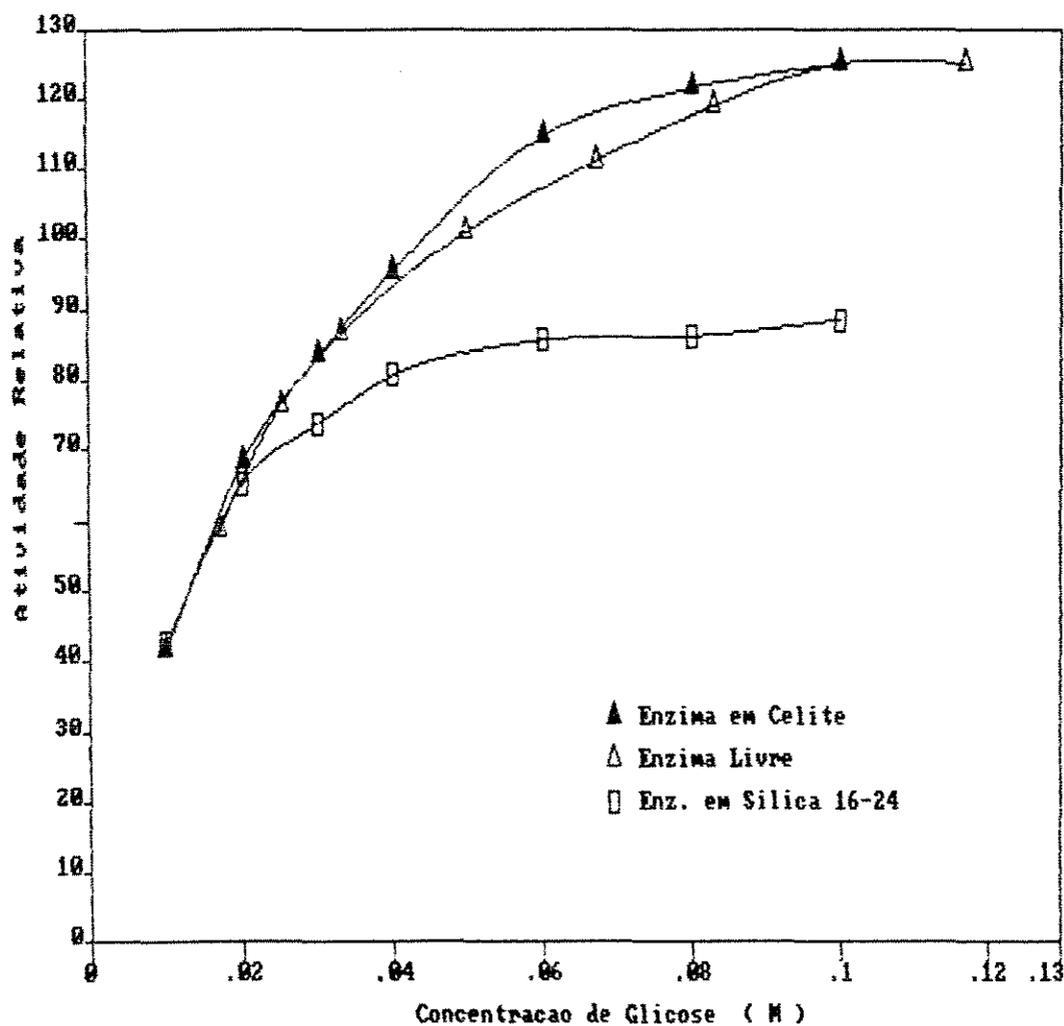


Gráfico 19 - Atividade da Glicose Oxidase em Função da Concentração de Glicose

No Gráfico 20 está plotado a equação de Lineweaver-Burk (equação I. 17), para se calcular os valores de K_m e v_{max} para a enzima. Os resultados calculados foram:

	v_{max} (UD)	k_m (mM)
Glicose Oxidase Livre	0,16	28,9
Glicose Oxidase em Celite	0,17	29,8
Glicose Oxidase em Sílica	0,14	10,8

Segundo a literatura o k_m para a glicose oxidase livre é 34 mM [47], próximo ao valor encontrado de 28,9 mM.

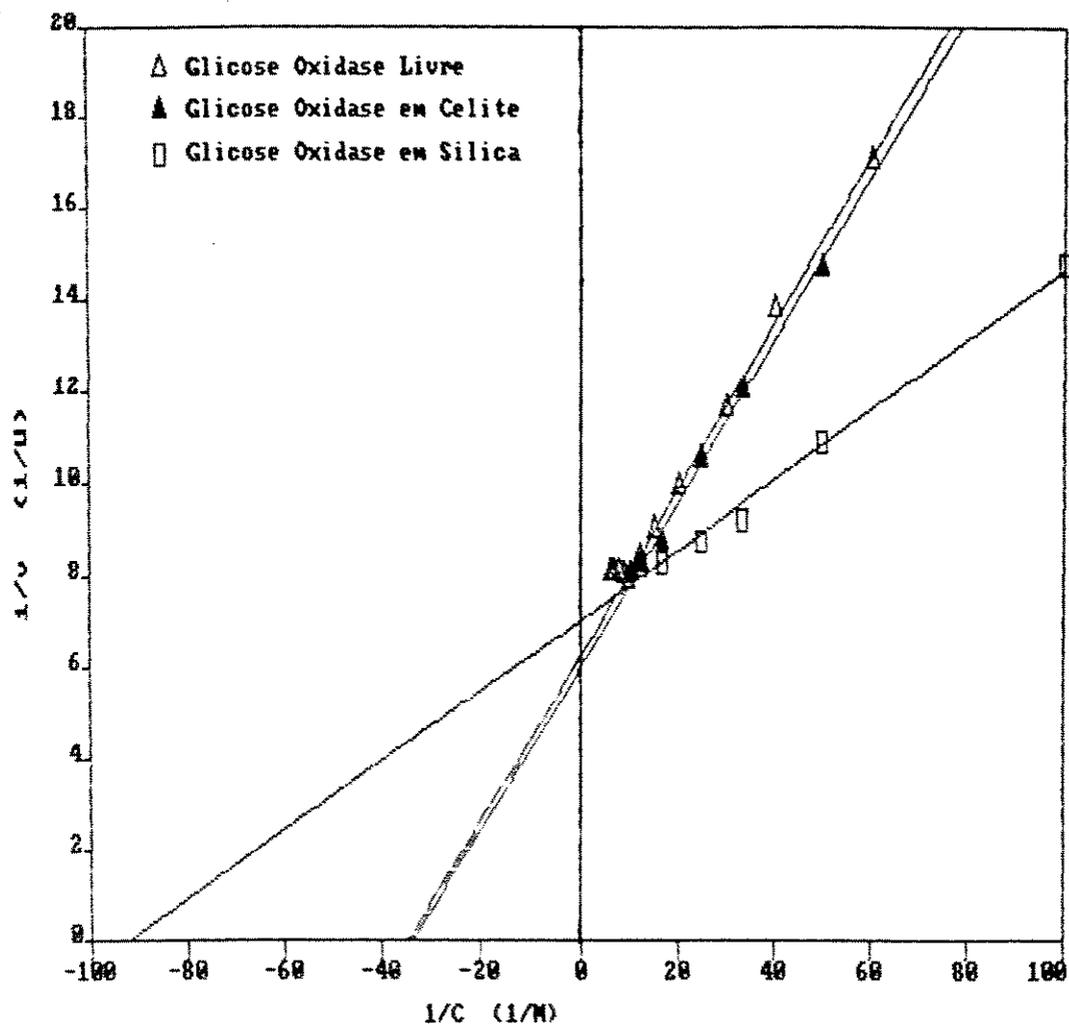
Com relação ao efeito da imobilização sobre esses parâmetros cinéticos, pode-se observar que praticamente não houveram alterações no caso da imobilização em celite.

Embora se pudesse esperar a mesma igualdade de valores para o caso da enzima imobilizada em sílica, tal fato não ocorreu. A interpretação dessa grande variação de k_m para a enzima em sílica é dada pela análise do Gráfico 19, onde pode-se observar que à medida que se aumenta a concentração de glicose começa a ocorrer um decréscimo da velocidade de reação, em relação a curva cinética da enzima livre. Essa diferença de comportamento é explicada pelo fato de que os dados coletados não são puramente cinéticos, para a enzima imobilizada, englobando efeitos de transferência de massa.

6 - DESEMPENHO DA ENZIMA EM REATORES

A atuação da enzima imobilizada foi estudada principalmente num reator de leito fluidizado operado em batelada. A solução de glicose 2% utilizada como substrato, com pH ajustado em

5,50. é adicionada ao reator juntamente com a enzima imobilizada e a agitação e aeração do meio são promovidas pelo borbulhamento de ar através de uma placa porosa que constitui o fundo do reator, ver item 3.6, Cap. III. A reação é acompanhada pelo volume de solução de NaOH 0,50 M adicionado para manter o pH constante em



Equação de Lineweaver-Burk: $1/v = 1/v_{max} + k_m/v_{max} \times 1/[Glicose]$

Glicose Oxidase Livre : $1/v = 6.262 + 0.1808/C$

GOx em Celite : $1/v = 5.984 + 0.1782/C$

GOx em Sílica 16-24 : $1/v = 7.040 + 0.0764/C$

Gráfico 20 - Gráfico de Lineweaver-Burk em Função da [Glicose]

5,50, pela neutralização do ácido glicônico formado na reação.

Outro teste feito foi a reação em batelada, utilizando-se uma barra magnética para a agitação e peróxido de hidrogênio com catalase solúvel como fonte de O_2 .

Foi utilizado nas reações um volume de 120 ml de solução de glicose a 20g/l, num reator de 4.0 cm de diâmetro interno e 12 cm de altura, uma solução de NaOH 0,05M para neutralização e uma vazão de ar de aproximadamente 100 l/h. Inicialmente foi testada a atuação de cada suporte e da enzima livre em testes de duração relativamente longa, seguindo-se a reação até 75% de conversão (o consumo de NaOH teórico é de 26.67 ml, para 120 ml de glicose 20 g/l reagido). Os resultados para a reação utilizando enzima livre e imobilizada em celite e sílica 32-60 estão no Gráfico 21. No caso da enzima imobilizada em vidro 100-200, o ensaio foi de duração menor e os resultados estão no Gráfico 22. Observou-se em todos os casos um período inicial de baixa velocidade de reação, provavelmente devido à estabilização das concentrações na proximidade da enzima. A solução de glicose do meio reacional deve se difundir nos poros dos suportes e substituir a solução tampão inicialmente presente, até que seja estabelecido o perfil de concentrações nos poros, determinado pelas taxas de difusão e de reação. Após esse período inicial, atinge-se a velocidade máxima de reação mantida durante a conversão de aproximadamente metade da glicose, nas condições estudadas (2% de glicose). A taxa de reação começa então a decair lentamente, devido à redução de concentração do substrato, até se anular ao término da reação.

No caso de reação com a enzima imobilizada em vidro, não foi possível se estendê-la durante muito tempo devido ao fato de

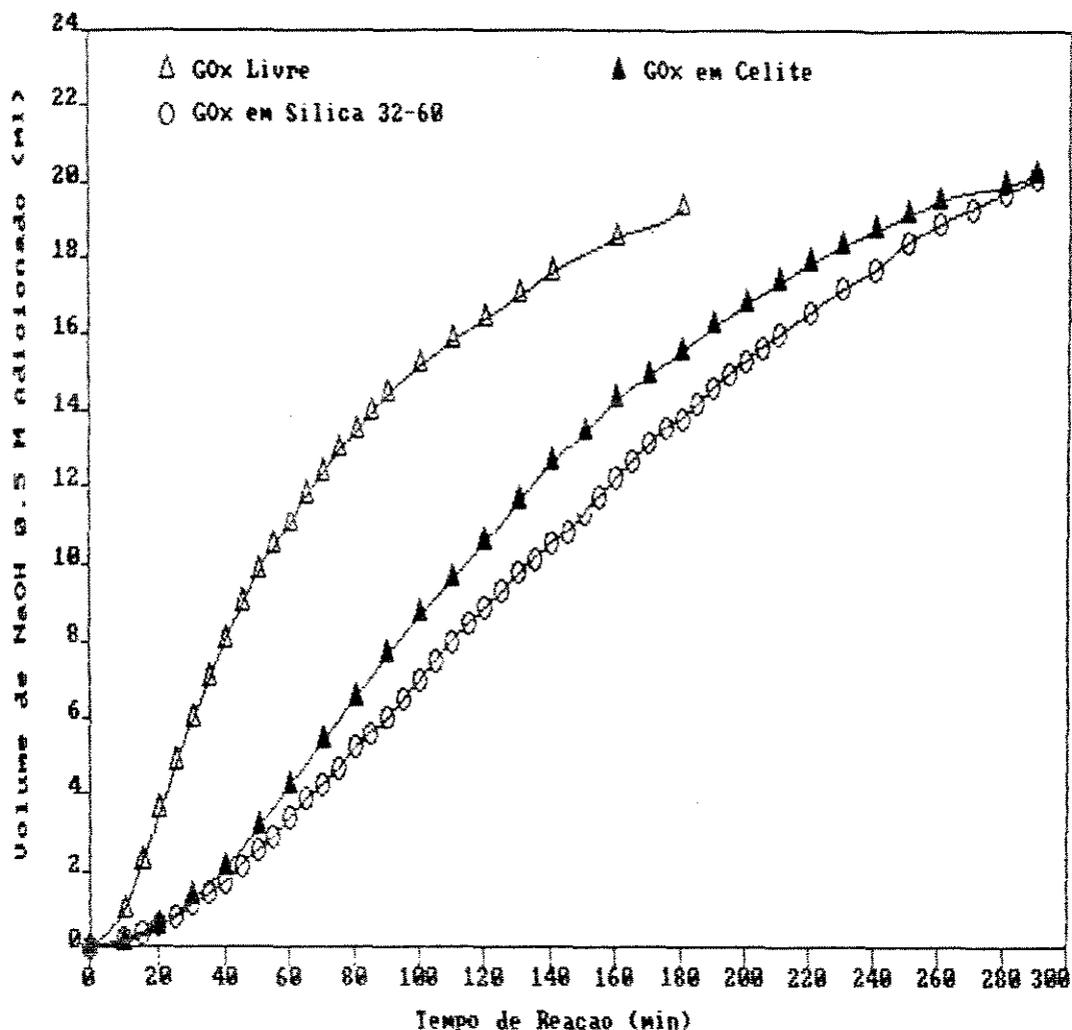
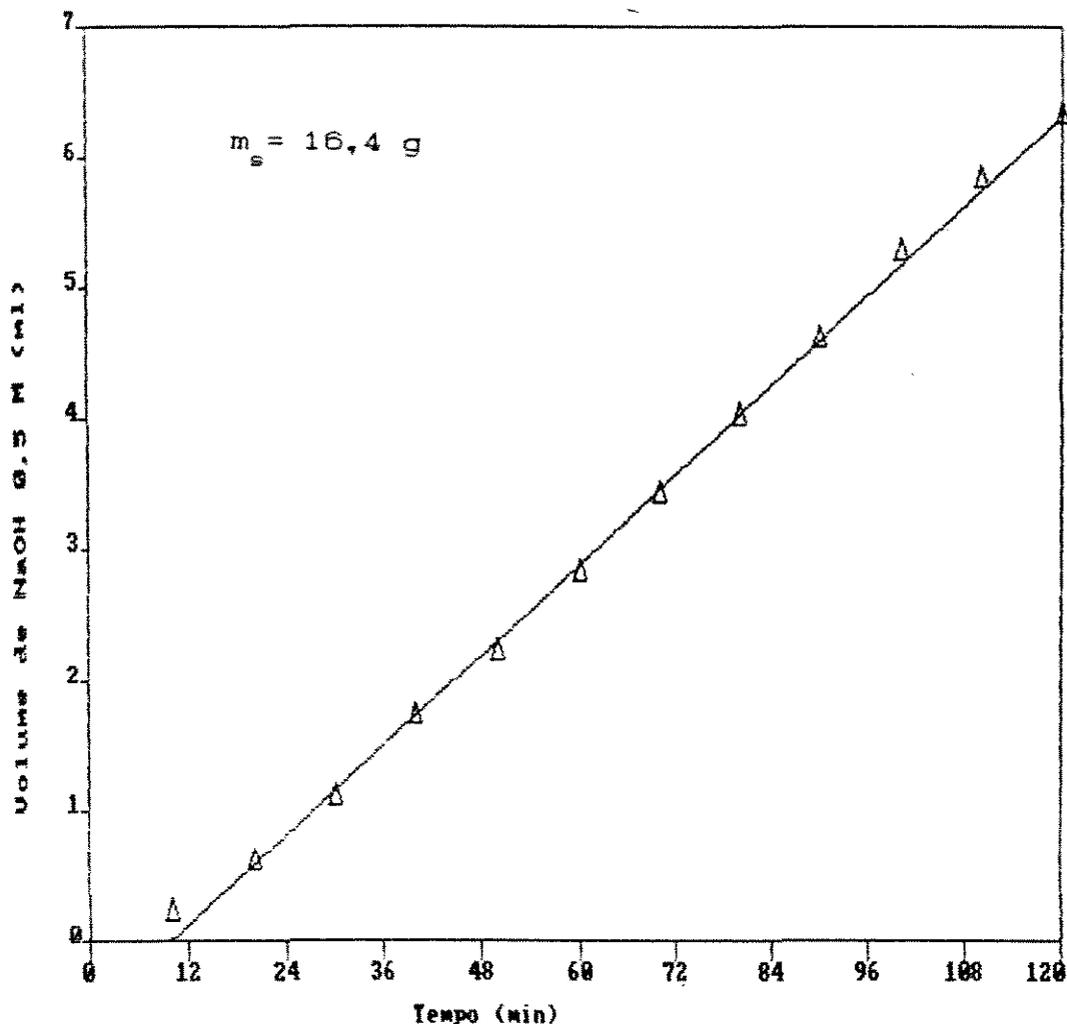


Gráfico 21 - Curva da Reação de Formação de Ácido Glicônico

que as partículas tendem a se acumular nas paredes acima do meio reacional, arrastadas pelas bolhas de ar. A atividade desse suporte no reator calculada pelo Gráfico 22 foi de 1,74 U/g, o que corresponde a um valor minimizado, já que uma parte da enzima está sempre fora do meio reacional não participando da reação. Devido a esses problemas, os ensaios com a enzima em vidro, em reator aerado, foram abandonados.

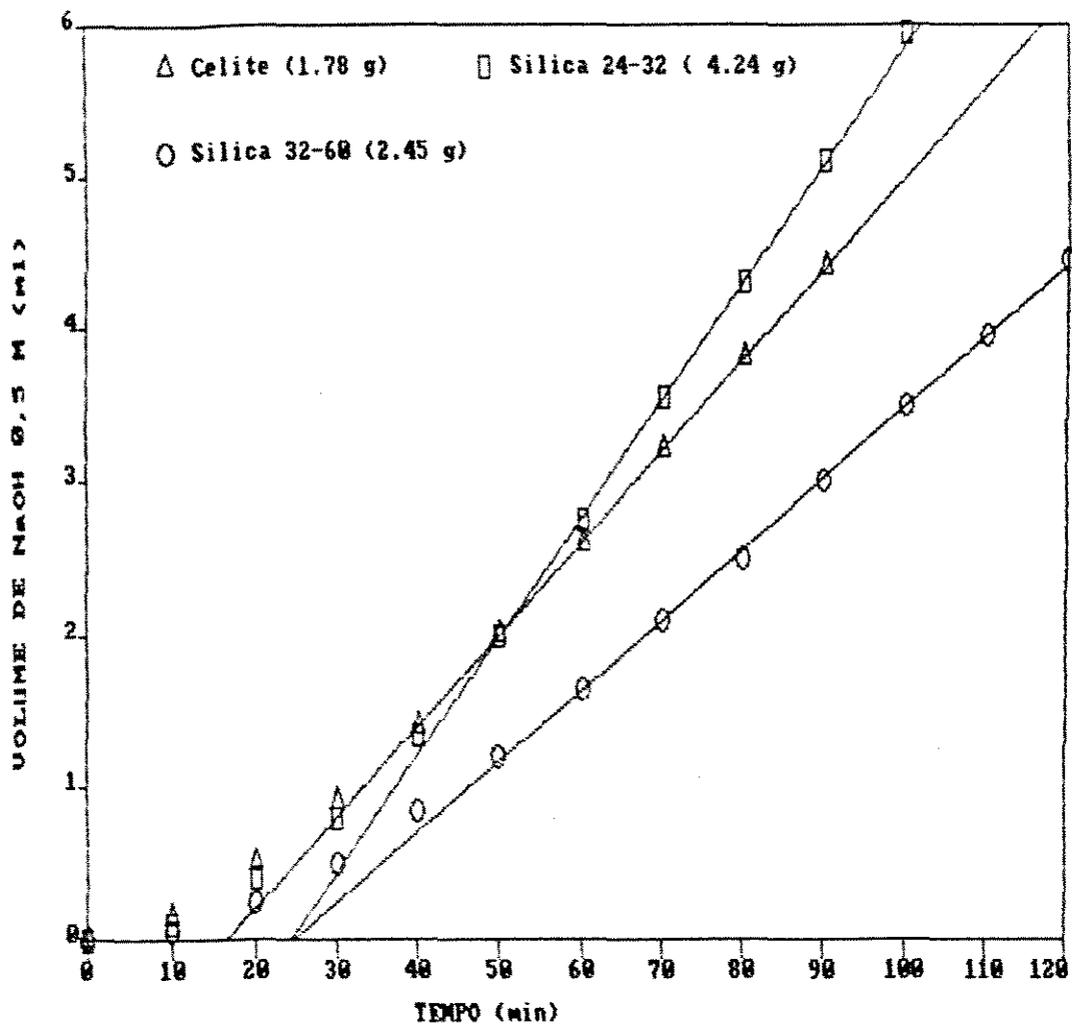
Após esses ensaios preliminares foram realizados outros de mais curta duração, para se avaliar o desempenho da enzima em celite, sílica 24-32 e sílica 32-60. Os ensaios foram feitos nas



$$\Delta V(\text{ml})/\Delta t(\text{min}) = 0,05715 \text{ ml/min}$$

Gráfico 22 - Formação de Ácido Glicônico Catalisada por Glicose Oxidase Imobilizada em Vidro 100-200 mesh

mesmas condições anteriores, tomando-se o cuidado de se analisar as enzimas imobilizadas quanto a atividade e se lavá-las, pesá-las e secá-las após a reação, determinando-se a massa exata utilizada. Os resultados obtidos estão no Gráfico 23. A atividade das enzimas utilizadas foi de 25 U/g, 17 U/g e 18 U/g, para celite, sílica 24-32 e sílica 32-60, respectivamente. A atividade máxima



Celite: $\Delta V/\Delta t = 0.0600 \text{ ml/min}$

Silica 24-32: $\Delta V/\Delta t = 0.0775 \text{ ml/min}$

Silica 32-60: $\Delta V/\Delta t = 0.04637 \text{ ml/min}$

Gráfico 23 - Reação de Formação de Ácido Glicônico

no reator, calculada pelas retas do Gráfico 23, foi de 16,8 U/g, 9,14 U/g e 9,46 U/g, correspondendo a 67%, 54% e 52% da atividade adicionada. Esses resultados, similares ao obtido na reação aerada da Ref. [47, Fig. 3], podem ser atribuídos a resistências à transferência de oxigênio do ar para a solução e da solução para a enzima dentro do poro.

Para se testar a limitação da reação devido à escassez de oxigênio fez-se a reação utilizando-se a enzima catalase na forma solúvel e peróxido de hidrogênio como fonte de oxigênio. A catalase catalisa a reação de decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$) e foi adicionado ao meio reacional, enquanto o peróxido de hidrogênio é adicionado continuamente.

Na execução da reação, foi adicionado a um béquer 30 ml de solução de glicose a 100g/l, com pH ajustado em 5,5, aproximadamente 1 mg de catalase (atividade= $\sim 10^4$ U/mg) e a enzima imobilizada em celite. A reação foi iniciada e mantida pela adição de 10 μ l/min de peróxido de hidrogênio 30% e acompanhada pelo consumo de NaOH 0,5M para manter o pH em 5,5. Os resultados obtidos estão no Gráfico 24. A atividade da enzima em celite adicionado era 25 U/g e obteve-se no reator 68 U/g, calculada pela reta do Gráfico 24, representando um aumento de 170%. Esse grande aumento de atividade confirma a limitação da atividade devido à insuficiência de oxigênio no caso da reação aerada.

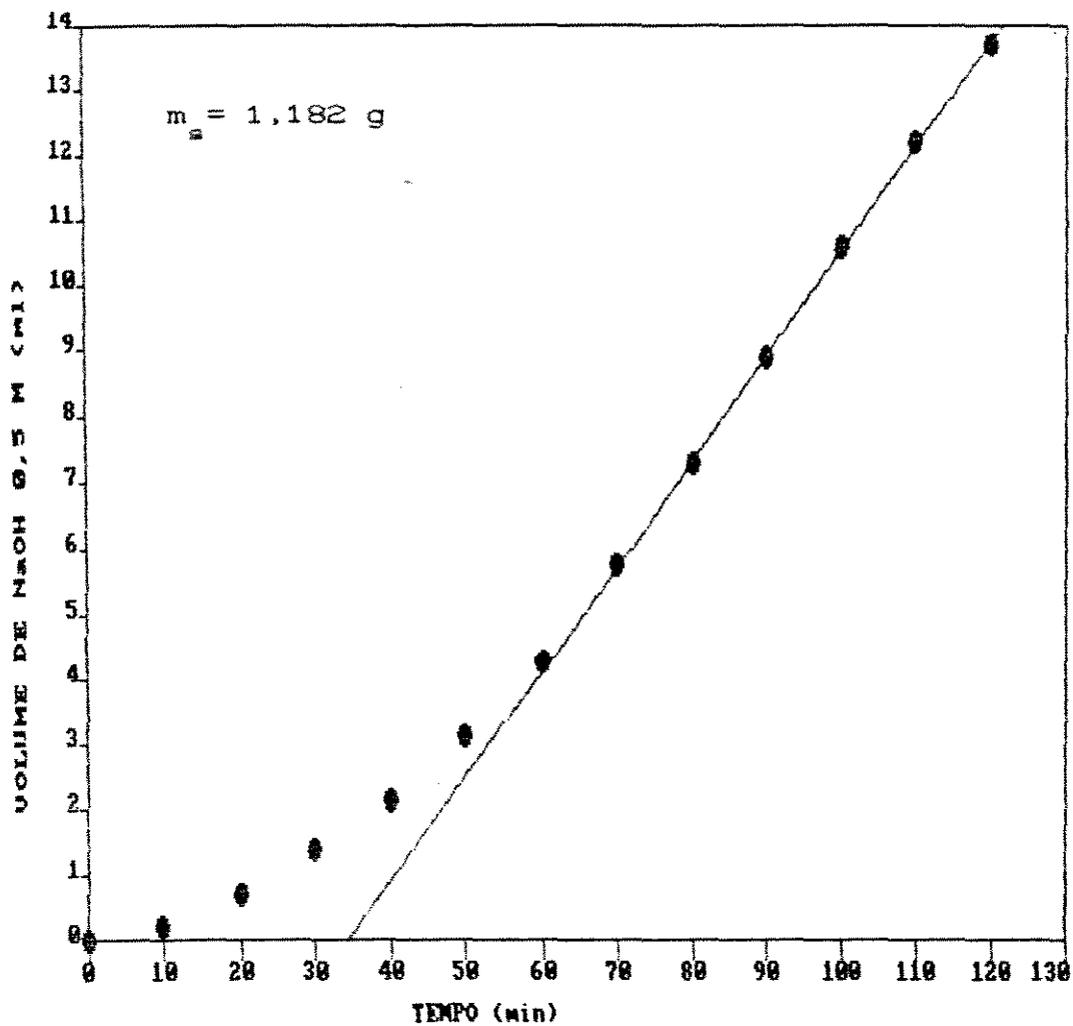


Gráfico 24 - Formação de Ácido Glicônico Utilizando Peróxido de Hidrogênio + Catalase como Fonte de Oxigênio

CAPITULO IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Referindo-se aos objetivos propostos no Cap.I, item 6, desenvolvidos no decorrer do trabalho, colocam-se as seguintes conclusões e perspectivas de desenvolvimento :

1 - Suportes silícicos da mesma natureza já foram utilizados na imobilização de glicose oxidase. Como mostrado na Tabela IV.1, todos os suportes utilizados são adequados à imobilização, em relação às propriedades físicas e ao uso em reatores de leito fixo e batelada. A sílica e o vidro tratados tem a vantagem de poderem ser classificados na granulometria desejada, fator importante quando se consideram as perdas de carga para o caso de utilização em reatores de leito fixo.

TABELA IV.1 - SUPORTES SILÍCICOS NA IMOBILIZAÇÃO DE GOx

Tipo de Reator	Características do Suporte	Ref.
PFR	vidro poroso, dp = 720, ϕ = 100-200	93
estocagem	vidro poroso, dp = 735 \pm 50	80
PFR (reciclo)	vidro não poroso, ϕ = 40-60	54
PFR	vidro poroso, dp = 475, ϕ = 80-120	49
PFR, batelada	vidro não poroso, ϕ = 16-20	46
batelada	celite, ϕ = 20-30 e 50-80	53
batelada	celite 560, ϕ = 100-200	68
PFR	celatom MP-76, ϕ = 32, 20-32 e 8-10	89

PFR = reator de leito fixo
dp = diâmetro de poro (angstroms)
 ϕ = diâmetro da partícula (mesh)

Os suportes silícicos amino silanizados podem ser utilizados para muitas enzimas e com diferentes métodos de ligação covalente [9, pag. 17-18 (diazotização); pag. 27 (ligação peptídica); pag. 39-40 (glutaraldeído)], o que proporciona grande

campo de aplicações para os suportes estudados. A utilização do tratamento hidrotérmico para alargamento dos poros da sílica permite a obtenção do produto com diferentes tamanhos de poro, dependendo da temperatura do tratamento [61], possibilitando assim o estudo e a otimização da imobilização de determinada enzima em função desse parâmetro. Embora o vidro não tenha sido caracterizado, a atividade imobilizada de 5 U/g (Cap. III, 4.4.1) representa de dez a cem vezes os valores obtidos anteriormente [46], sugerindo que o tratamento feito (Cap. II, 3.1.2) deve ter alterado a estrutura superficial do vidro, melhorando as suas propriedades para a imobilização.

2 - O estudo das condições de silanização feito com a sílica permitiram o estabelecimento de condições simples de reação em relação a outros métodos descritos na literatura (Tabela II.1), com uma boa cobertura do suporte (Cap. III.2). O método de medida pelo ganho de massa do suporte após a silanização (Cap. III,3.2) pode ser aplicado a um suporte silícico de área superficial conhecida, determinando-se assim a quantidade média de grupos amino disponíveis por unidade de área do suporte.

3 - Apesar da alta capacidade de absorção da enzima durante a imobilização (até 110 U/g para o celite e 400 U/g para a sílica) houve limitação da taxa de reação devido a efeitos de difusão interna, principalmente na caso da sílica. Essas resistências foram atribuídas principalmente à difusão do substrato em concentração limitante, o oxigênio, e parcialmente vencidas pelo aumento de sua concentração através do uso de catalase + peróxido de hidrogênio (Cap. III, 6). A imobilização de enzimas que catalisem reações envolvendo um único substrato

deve ser considerada como uma melhor forma de avaliar esses efeitos difusionais, além de se esperar nesse caso uma melhor eficiência do produto imobilizado devido à ausência do segundo substrato de concentração limitante.

Comparando-se as atividades obtidas (até 28 U/g para a sílica e 50 U/g para o celite) com as do produto oferecido pela Sigma (Catálogo Sigma, Sigma Chemical Company, 1989, pag. 643, item G 9255, preço : 25 U x US\$ 3.392/U), imobilizado por oclusão em gel de poliacrilamida, com 20-40 U/g, pode-se considerar que a glicose oxidase obtida é compatível com as características de um produto comercial, embora não tenha sido feita uma análise de custos.

4 - As atividades da enzima livre e imobilizada em relação ao pH, temperatura e concentração de glicose concordaram com os resultados encontrados na literatura (Cap. III, 5.1, 5.2, 5.4). Em termos de estabilidade térmica, obteve-se um produto mais estável que os descritos (Tabela III.5).

5 - Os resultados com reatores aerado e utilizando peróxido de hidrogênio, também estão de acordo com os esperados, obtendo-se uma atividade muito maior no segundo caso [47]. Considera-se esses testes com reatores apenas como uma avaliação prévia porque o ideal seria utilizar um reator de leito fixo, com reciclo, reduzindo os efeitos de difusão e operando em concentrações próximas às desejadas num processo (pelo menos 10 % de glicose na alimentação do reator).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- J. M. Nelson, E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* 38, 1109 (1916)
- 2- J. B. Sumner, *Science* 108, 410 (1948)
- 3- N. Grubhofer, L. Schleith, *Naturwissenschaften* 40, 508 (1953)
- 4- W. H. Scouten, *Chemical Analysis* 66, "Solid Phase Biochemistry", John Wiley & Sons (1983)
- 5- P. A. Srere, K. Uyeda, *Methods in Enzymology* 44, Academic Press, New York (1976)
- 6- R. W. Silman, L. T. Black et al., *Biotechnol. Bioeng.* 22, 533 (1980)
- 7- L. Goldstein, Y. Lenin, E. Katchalski-Katzir, *Biochemistry* 3, 1916 (1964)
- 8- D. L. Eaton, "Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography", 241-248, Plenum, New York (1974)
- 9- I. Chibata, "Immobilized Enzymes, Research and Development", Halsted Press, NY (1978, Kodansha Ltd.)
- 10- J. Woodward, "Immobilized Cells and Enzymes, a Practical Approach", IRL Press Ltd., Oxford, England (1985)
- 11- H. H. Weetall, C. C. Detar, *Biotechnol. Bioeng.* 16, 1095-1102 (1974)
- 12- D. L. Marshall, *Biotechnol. Bioeng.* 15, 447-453 (1973)
- 13- D. R. Marsh, G. T. Tsao, *Biotechnol. Bioeng.* 18, 349-362 (1976)
- 14- J. Lobarzewski, A. Paszczynski, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 3207-3212 (1983)
- 15- T. L. Newirth et al., *Biotechnol. Bioeng.* 15, 1089-1100 (1973)
- 16- R. D. Mason, C. C. Detar, H. H. Weetall, *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1019-1027 (1975)
- 17- G. I. Kvesitadze, M. Sh. Dvali, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1765-1772 (1982)

- 18- V.G. Janolino, H.E. Swaisgood, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1069-1080 (1982)
- 19- H.H. Weetall, *Nature* 223, 959-960 (1969)
- 20- V. Krasnobajew, R. Böniger, *Chimia* 29, 123 (1975)
- 21- C.G. Beddows, R.A. Mirauer, J.T. Guthrie, *Biotechnol. Bioeng.* 22, 311 (1980)
- 22- H.N. Chang, P.J. Heilly, *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1753 (1980)
- 23- Y.K. Cho, J.E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* 21, 461 (1979)
- 24- Y.K. Cho, J.E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1651 (1978)
- 25- P.R. Coulet, R. Sternberg, D.R. Thivenot, *Biochim. Biophys. Acta* 612, 317 (1980)
- 26- S.A. Barker, A.N. Emery, J.M. Novais, *Process Biochem.* 6, 11 (1971)
- 27- K. Miyamoto, T. Fujü, T. Muira, *J. Ferment. Technol.* 49, 565 (1971)
- 28- R.A. Messing, *Enzimologia* 39, 12 (1970)
- 29- R.A. Messing, *Biotechnol. Bioeng.* 16, 897 (1974)
- 30- K. Miyamoto, T. Fujü, N. Tmaoki, Y. Miura, *J. Ferment. Technol.* 51, 566 (1973)
- 31- L. Lehninger, "Biochemistry", 22 ed., Worth Publishers, INC., NY, 1975
- 32- M.K. Weibel, W. Dritschilo, H.J. Bright, A.E. Humphrey, *Anal. Biochem.* 52, 402 (1973)
- 33- H.H. Weetall, *Biochim. Biophys. Acta* 212, 1-7 (1970)
- 34- S. Gestrelus, B. Mattiasson, K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta* 276, 339 (1972)
- 35- P.E. Market, P.F. Greenfield, J.R. Kittrell, *Biotechnol. Bioeng.* 17, 285 (1975)

- 36- J.C. Bouin, M.J. Atallah, H.O. Hultin, *Biochim. Biophys. Acta* 438, 23 (1976)
- 37- M.J. Atallah, B.P. Wasserman, H.O. Hultin, *Biotechnol. Bioeng.* 18, 1833 (1976)
- 38- S. Avrameas, *Immunochemistry* 6, 43 (1969)
- 39- S. Avrameas, T. Ternynck, *Immunochemistry* 6, 53 (1969)
- 40- S.J. Updike, G.P. Hicks, *Nature* 214, 986 (1967)
- 41- L.B. Wingard Jr., C.C. Liu, N.L. Nagda, *Biotechnol. Bioeng.* 13, 629 (1971)
- 42- K. Kawashima, K. Umeda, *Biotechnol. Bioeng.* 16, 609 (1974)
- 43- S.J. Updike, G.P. Hicks, *Anal. Chem.* 38, 762 (1966)
- 44- S. Avrameas, T. Ternynck, *J. Biol. Chem.* 242, 651 (1967)
- 45- J. Campbell, W.E. Hornlry, D.L. Morris, *Biochim. Biophys. Acta* 384, 307 (1975)
- 46- C.O. Malikkides, R.H. Weiland, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2419-2439 (1982)
- 47- G. Richter, H. Heinecker, *Starch* 31(12), 418-422 (1979)
- 48- A. Kojuharova, Y. Popova, N. Kirova, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 42, 95-104 (1988)
- 49- Md. M. Hossain, D.D. Do, *Biotechnol. Bioeng.* 27, 842-851 (1985)
- 50- I. Karube, K. Hirano, S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1233-1238 (1977)
- 51- Y.K. Cho, J.E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1651-1665 (1978)
- 52- K.E. Denis et al., *Biotechnol. Bioeng.* 26, 892-900 (1984)
- 53- J.C. Bouin, H.O. Hultin, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1225-1231 (1982)
- 54- K.B. Ramachandran, D.D. Perlmutter, *Biotechnol. Bioeng.* 18, 669-684 (1976)
- 55- J.E. Bailey, Y.K. Cho, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1923-1935 (1983)

- 56- B.P.Wasserman, H.O.Hultin, B.S.Jacobson, *Biotechnol.Bioeng.* 22, 271-287 (1980)
- 57- C.O.Malikkides, R.H.Weiland, *Biotechnol.Bioeng.* 24, 1911-1914 (1982)
- 58- J.E.Bailey, "Enzyme Eng." vol. 6, 213-214 (1982), publicado por I.Chibata, S.Fukui, L.B.Wingard Jr., Plenum Press
- 59- M.B.Fadda, M.R.Denis et al., *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 19, 306-311 (1984)
- 60- H.H.Weetall, *Science* 166, 615-617 (1969)
- 61- U.S.Patent 3.888.972 (10/06/1975)
- 62- U.S.Patent 3.652.214 (28/03/1972)
- 63- British Patent 1.171.651 (26/11/1969)
- 64- British Patent 1.334.606 (24/10/1973)
- 65- E.Grushka, E.J.Kikta Jr., *Anal.Chem.* 49(12), 1004A-1014A (1977)
- 66- S.Naviroj, S.R.Culler, J.L.Koenig, H.Ishida, *J.Colloid Interface Sci.* 97(2), 308-317 (1984)
- 67- J.L.Veuthey, M.A.Bagnoud, W.Haerdi, *Chimia* 40(10), 353-6 (1986)
- 68- R.A.Wisdom, P.Dunnill, M.D.Lilly, *Enzyme Microb.Technol.* 6, 443-446 (1984)
- 69- R.A.Wisdom, P.Dunnill, M.D.Lilly, *Enzyme Microb.Technol.* 7, 567-572 (1985)
- 70- D.D.Do, *Biotechnol.Bioeng.* 26, 1032-1037 (1984)
- 71- M.Tanaka, M.Ikesaca, R.Matsumo, A.O.Converse, *Biotechnol. Bioeng.* 32, 698-706 (1988)
- 72- Q.H.Gibson, B.E.P.Swolvoda, V.Massey, *J.Biol.Chem.* 239(11), 3927-3934 (1969)
- 73- W.Haller, *J.Chem.Physics* 42(2), 686-693 (1969)

- 74- *Chem. Abst.* 105: P 28646a, Japan Patent 6141.106 (28/02/1986)
- 75- R. A. Messing, "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors", Academic Press (1975)
- 76- "Chem. Technol.: An Encyclopedic Treatment", vol. II, Barnes & Noble INC, NY
- 77- D. Keilin, E. F. Hartree, *Biochem. J.* 42, 221-229 (1948)
- 78- M. K. Weibel, H. J. Bright, *J. Biol. Chem* 246, 2734 (1971)
- 79- H. H. Weetall, L. S. Hersh, *Biochem. Biophys. Acta* 206, 54-60 (1970)
- 80- J. E. Bailey, D. F. Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd Edition, McGraw-Hill (1986)
- 81- B. Olsson, *Mikrochimica Acta (Wien)* 1985II, 211-221 (1985)
- 82- B. Olsson, L. Ögren, *Anal. Chimica Acta* 145, 87-89 (1983)
- 83- A. I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", 3rd Edition, Longman (1970)
- 84- A. Wiseman. "Handbook of Enzyme Biotechnology", John Wiley & Sons (1975)
- 85- The Merck Index, tenth edition, Merck & CO. INC, New Jersey, USA (1983)
- 86- V. W. Hartmeier, *Starch* 33(3), 97-102 (1981)
- 87- T. Kobayashi et al., *J. Ferm. Technol.* 56(5), 506-510 (1978)
- 88- K. Buchholz, B. Gödelmann, *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1201-1220 (1978)
- 89- S. Krishnaswamy, J. R. Kittrell, *Biotechnol. Bioeng.* 20, 821-835 (1978)
- 90- J. E. Prenosil, *Biotechnol. Bioeng.* 21, 89-109 (1979)
- 91- D. G. Mercer, K. F. O'Driscoll, *Biotechnol. Bioeng.* 23, 2447-2464 (1981)

- 92- D.G. Mercer, K.F. O'Driscoll, *Biotechnol. Bioeng.* 23,
2465-2481 (1981)
- 93- B. Olsson, L. Ögren, G. Johansson, *Anal. Chim. Acta* 145,
101-108 (1983)
- 94- A. I. Laskin, "Enzymes Immobilized Cells in Biotechnology",
The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park,
California (1985)
- 95- T. Morita, R.M.V. Assumpção, "Manual de Soluções, Reagentes e
Solventes, Padronização-Preparação-Purificação", Segunda
Edição, Editora Edgard Blücher Ltda. (1972)
- 96- R.E. Thach, M. R. Newburger, "Research Techniques in
Biochemistry and Molecular Biology", W.A. Benjamin, Inc.,
Menlo Park, California (1972)
- 97- A. Wiseman, "Handbook of Enzyme Technology", 2nd Edition,
Ellis Horwood Ltd., Chichester, England (1986)