

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE POLÍMEROS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE PRODUÇÃO DE SÍLICA DE
POROSIDADE CONTROLADA E SUA UTILIZAÇÃO
NA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Autor: Henrique Celso Trevisan (t) 7201

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei t

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia Química como parte dos
requisitos exigidos para obtenção
do título de Doutor em Engenharia
Química

Campinas

1993

A minha esposa

Angela

Aos meus filhos

Júlia e Caio

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei, pela orientação, amizade e incentivo ao longo desse trabalho,

A Profra. Dra. Gisella Maria Zanin, pela amizade, sugestões e apoio material,

Aos Engs. Luiza Pedrina Vilxenski e Lauro Mitsuaki Kambara, pelo apoio técnico no desenvolvimento da parte experimental,

A Técnica Solange, pelo apoio prestado na execução do trabalho experimental,

A Angela, pelo incentivo, apoio e compreensão durante a elaboração desse trabalho,

Ao Prof. Dr. José Arana Varella, pela pronta e valiosa colaboração na execução das análises de porosimetria de mercúrio,

A ICI Brasil S.A. pelo fornecimento do Silicato de Sódio,

A Crossfield Chemicals, Divisão da Gessy Lever Ltda., pelo fornecimento da Sílica Sorbsil Branca,

A Novo Industri A/S, pelo fornecimento das enzimas amiloglicosidase, invertase e lactase,

A FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro e

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Essa dissertação apresenta os resultados, com o objetivo de se produzir suportes silícicos de porosidade controlada para a imobilização de enzimas.

Inicialmente, sílicas de três procedências, uma preparada em laboratório e duas disponíveis comercialmente, foram submetidas a tratamento hidrotérmico em cinco temperaturas, os produtos resultantes caracterizados por porosimetria de intrusão de mercúrio e suas capacidades de imobilização da enzima amiloglicosidase avaliadas. Os resultados sugeriram uma relação linear entre a pressão do tratamento hidrotérmico e o diâmetro de poro médio resultante, mostrando também que a sílica preparada em laboratório era a mais adequada para imobilização da enzima.

Partindo-se dos dados anteriores, começou-se a otimizar o método de preparação da sílica, como o objetivo de melhorar a capacidade de imobilização do material, avaliando-se a qualidade dos produtos pela medida do volume de intrusão de água, porosimetria de mercúrio e imobilização de amiloglicosidase. Os suportes foram considerados adequados quando se conseguiu imobilizar uma quantidade de enzima equivalente aos melhores dados encontrados na literatura. Para suportes tratados a 150-270°C, obteve-se diâmetros médios de poro de 100-790Å e conseguiu-se estabelecer uma relação simples entre a temperatura e o tamanho de poro resultante. Esses suportes foram caracterizados por porosimetria de mercúrio e microscopia eletrônica de varredura e utilizados na imobilização de "horseradish" peroxidase, amiloglicosidase, glicose oxidase, invertase, lactase e albumina de soro bovino. Para cada proteína foi estabelecido o diâmetro de poro ótimo para imobilização e a relação entre a atividade retida após a imobilização e o tamanho de partícula, nesse diâmetro ótimo.

Os resultados foram comparados com publicados na literatura para cada enzima e também foi sugerido um método para se avaliar o diâmetro de poro ótimo para imobilização de determinada proteína, a partir do seu peso molecular.

ABSTRACT

This dissertation presents the results aiming the development of controlled pore siliceous supports for enzyme immobilization.

At first, silicas from three sources, one prepared in laboratory and two commercially available, were submitted to hydrothermal treatment in five temperatures, the resulting products were characterized by mercury intrusion porosimetry and their capacity of immobilizing the enzyme amyloglucosidase were evaluated. The results suggested a linear relationship of the hydro thermal treatment pressure with the medium pore diameter and also showed that the silica prepared in laboratory was the more suitable for enzyme immobilization.

Starting from the previous data, the method optimization for preparation of the silica support was initiated, being the quality of the products evaluated by measuring the water intrusion volume, mercury porosimetry and amyloglucosidase immobilization. The supports were considered suitable when the amount of immobilized enzyme was equivalent to the best data on the literature. Supports hydrothermically treated in the range of 150-270°C, the medium pore diameter was 100-270Å, and a single relation between the temperature and the resulting pore diameter was established. The last supports were characterized by mercury porosimetry and scanning electronic microscopy and the immobilization of horseradish peroxidase, amyloglucosidase, glucose oxidase, invertase, lactase and bovine serum albumin were afforded.

For each protein, the optimum pore diameter for immobilization and the relation between the immobilized activity and the particle size, in this optimum diameter, was established.

The results were compared with the previously published on the literature, for the enzymes under study, and a method to evaluate the optimum pore diameter for protein immobilization, from its molecular weight, was suggested.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
 CAPÍTULO I - SUPORTES INORGÂNICOS PARA IMOBILIZAÇÃO	
DE ENZIMAS	3
1 - Introdução	3
2 - Propriedades	4
2.1 - Propriedades Físicas e Hidráulicas	5
2.2 - Propriedades Químicas	6
3 - Seleção do Suporte	6
4 - Métodos de Preparação de Suportes Silícicos	8
 CAPÍTULO II - ENZIMAS	14
1 - Introdução	14
2 - Enzimas como Catalisadores	14
2.1 - Atuação das Enzimas	15
2.2 - Cinética Enzimática	16
3 - Características e Aplicações das Enzimas Utilizadas	19
3.1 - Amiloglicosidase	19
3.2 - Lactase	21
3.3 - Invertase	22
3.4 - Glicose Oxidase	23
3.5 - Horseradish Peroxidase (HRP)	25
3.6 - Albumina de Soro Bovino (BSA)	28
 CAPÍTULO III - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES	29
1 - Introdução	29
2 - Métodos de Imobilização em Suportes	30
2.1 - Adsorção Física	31
2.2 - Ligação Iônica	31

2.3 - Ligação Metálica	32
2.4 - Ligação Covalente	32
3 - Propriedades das Enzimas Imobilizadas	38
3.1 - Efeitos Estéricos e Conformacionais	38
3.2 - Efeitos de Partição	38
3.3 - Efeitos de Transferência de Massa	39
4 - Aplicações das Enzimas Imobilizadas	40
5 - Objetivos	41
CAPÍTULO IV - MATERIAIS	44
1 - Reagentes	44
2 - Proteínas e Enzimas	45
3 - Instrumentação	45
4 - Reatores	46
5 - Equipamentos	46
CAPÍTULO V - MÉTODOS	47
1 - Métodos Analíticos Gerais	47
1.1 - Determinação de Proteína	47
1.2 - Determinação de Glicose	48
1.2.1 - Método da Orto-Toluidina	48
1.2.2 - Método GOD-PAP	48
1.2.3 - Método do DNS	49
2 - Determinação das Atividades Enzimáticas	51
2.1 - Amiloglicosidase	52
2.2 - Lactase	53
2.3 - Invertase	54
2.4 - Glicose Oxidase	54
2.5 - Horseradish Peroxidase	56
3 - Preparação da Sílica	57
3.1 - Obtenção da Sílica Microporosa	57

3.2 - Tratamento Hidrotérmico	59
3.3 - Caracterização da Sílica	59
3.3.1 - Medida do Volume de Poros por Intrusão de Água	60
4 - Preparação da Sílica Alquilaminada	60
5 - Preparação da Sílica Arilaminada	61
6 - Ativação dos Suportes e Imobilização das Enzimas ..	62
6.1 - Via Glutaraldeído	62
6.2 - Via Diazotização	63
 CAPÍTULO VI - RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
1 - Obtenção e Caracterização da Sílica	65
1.1 - Testes Preliminares	65
1.2 - Otimização do Método	73
2 - Imobilização das Enzimas	85
2.1 - Imobilização de Horshadish Peroxidase (HRP)	85
2.2 - Imobilização de Amiloglicosidase	88
2.3 - Imobilização de Glicose Oxidase	93
2.4 - Imobilização de Invertase	96
2.5 - Imobilização de Lactase	99
2.6 - Imobilização de Albumina de Soro Bovino	101
3 - Sinopse dos Resultados	103
 CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES	105
 CAPÍTULO VIII - RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS	108
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ANEXOS	125
ANEXO I - Curva de calibração para análise de proteína ...	126
ANEXO II - Curva de calibração para análise de glicose: método o-toluidina	127
ANEXO III - Curva de calibração para análise de glicose: método GOD-PAP	128
ANEXO IV - Curva de calibração para análise de glicose: método DNS	129
ANEXO V - Amiloglicosidase imobilizada nas sílicas Série I, Gessy e Merck	130
ANEXO VI - Imobilização de amiloglicosidase na sílica Série III	138
ANEXO VII - Imobilização de amiloglicosidase na sílica Série IV	144
ANEXO VIII- Imobilização de HRP na sílica Série V	147
ANEXO IX - Imobilização de amiloglicosidase na sílica Série V	157
ANEXO X - Imobilização de amiloglicosidase na sílica Série V tratada a 215°C, variando-se a quantidade de proteína e o tamanho de partícula	166
ANEXO XI - Imobilização de glicose oxidase na sílica Série V	181
ANEXO XII - Imobilização de invertase na sílica Série V	187
ANEXO XIII- Imobilização de lactase na sílica Série V	196
ANEXO XIV - Imobilização de albumina na sílica Série V	204

LISTA DE ABREVIATURAS

A.E.L.	atividade específica da enzima livre
A.E.Máx.	atividade específica máxima da enzima imobilizada
agrg.	agregação (enzima + proteína)
aprisionam.	aprisionamento em gel
A.T.Máx.Im.	atividade total máxima imobilizada
BSA	albumina de soro bovino
copolir.	copolimerização
cov.	covalente
CPG	controlled pore glass (vidro de porosidade controlada)
Cum.	cumulativo
E.L.	enzima livre
FB	fibrinogênio
glut.	glutaraldeído
HRP	horseradish peroxidase
Int.	intrusão
lig. lg.	ligação
MEV	micrografia eletrônica de varredura
PM	peso molecular
Pr.Im.	proteína imobilizada
SPC	sílica de porosidade controlada
tenv	tempo de envelhecimento
Tenv	temperatura de envelhecimento
tgel	tempo de gelificação
Tgel	temperatura de gelificação
tlav	tempo de lavagem
Vpor	volume de poros
V _r	volume de reação

INTRODUÇÃO GERAL

A imobilização de uma enzima significa que ela foi confinada ou localizada numa região definida, com retenção da atividade, de modo a ser continuamente utilizada. Há diversos motivos que tornam a imobilização um procedimento desejável, destacando-se o fato de que a enzima pode ficar retida no reator, o que poderá significar uma economia apreciável quando se considera o custo elevado da maioria delas. Na utilização da enzima na sua forma solúvel, além da necessidade de recarga do reator, o produto obtido sai contaminado com a mesma, podendo requerer uma operação para sua remoção ou inativação, o que acarretaria um aumento de custo do processo. A imobilização normalmente tende também a aumentar a vida útil da enzima, otimizando dessa forma seu aproveitamento. Outra vantagem é a possibilidade de coimobilização de mais de uma enzima, aumentando a eficiência global no caso de se utilizar uma sequência catalítica (Bailey & Ollis, 1986). Essas características fazem com que a enzima imobilizada seja atrativa para produção em larga escala e/ou utilização de enzimas de elevado custo de obtenção.

A tecnologia da imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de um suporte e do método de imobilização a esse suporte que resulte num preparado imobilizado ativo e estável. Dispõe-se atualmente de várias técnicas de imobilização de enzimas (Chibata, 1978), assim como de um grande número de matrizes (Woodward, 1985), englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos. Apesar da existência de suportes baratos, como polímeros e minerais naturais, a utilização de enzimas imobilizadas em processos tem exigido a elaboração de matrizes específicas para essa finalidade, que resultem em preparados imobilizados com altas atividades e características hidrodinâmicas adequa-

das ao uso em reatores.

A imobilização de biocatalisadores está agora amadurecendo como uma tecnologia estabelecida e com fronteiras delimitadas. Seu sucesso está intimamente ligado ao desenvolvimento de novas enzimas e as metodologias de imobilização começam a ser consideradas como uma opção no desenvolvimento de processos. Nesse contexto, a produção de um suporte específico para a imobilização representa uma etapa chave no estabelecimento da autonomia na tecnologia de enzimas imobilizadas. O potencial de aplicações tem se estendido às áreas de processo industrial, tratamento médico, analítica e estudos bioquímicos, entre outras (Rosevear, 1984).

Em 1986 foi defendido o primeiro trabalho de tese da Engenharia Química da UNICAMP no campo da imobilização de proteínas (Peres, 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, dessa maneira, aberto a futuras pesquisas, atendendo aos diversos campos de aplicação. Em 1988, outro trabalho nessa linha demonstrou a habilidade desses suportes poliméricos em imobilizar invertase e glicoamilase (Cardoso, 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. Dessa forma, em 1990 foi concluído um trabalho objetivando a preparação de suportes silícicos para imobilização de proteínas, testados com a enzima glicose oxidase (Trevisan, 1990). Considerando os bons resultados obtidos, os estudos agora desenvolvidos visam a otimização dos suportes silícicos, objetivando a generalização do uso dos suportes, de forma a propiciar condições ótimas de imobilização para qualquer proteína.

CAPÍTULO I - SUPORTES INORGÂNICOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

1 - INTRODUÇÃO

Quando se considera a utilização de uma enzima imobilizada em reatores, deve-se procurar o tipo de suporte mais adequado às características de fluxo e no qual a enzima possa ser eficientemente imobilizada. Os materiais disponíveis podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos, de acordo com a composição, e naturais ou sintéticos, segundo o método de obtenção (Tab. 1.1).

Tabela 1.1 - Matrizes para Imobilização de Enzimas

Suportes Orgânicos:

- | | | |
|----------------------|----------------------------------|--|
| Polímeros Naturais | - Polissacarídeos | - celulose
amido
dextransa e agarose
quitosana e quitina |
| | - Proteínas | - colágeno
seda |
| | - Materiais de Carbono | |
| Polímeros Sintéticos | - Poliestirenos | |
| | - Poliacrilatos | - poli(meta)acrilato
anidrido polimetacrílico
poliacrilamidas
poliacrilonitrila |
| | - polímeros do anidrido malêico | |
| | - 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. (Scouten, 1976)

Embora os primeiros artigos se referissem a enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos (Nelson & Griffin, 1916; Tate & Lyle, 1944), na fase seguinte de desenvolvimento os polímeros orgânicos foram favorecidos, devido à facilidade com que as enzimas podem ser ligadas às suas superfícies. Os procedimentos utilizados eram muito úteis e quimicamente compreensíveis, mas não davam ênfase adequada ao uso da matriz em larga escala, onde o seu custo e as propriedades hidráulicas são as características mais importantes.

Muitos materiais inorgânicos podem ser fabricados na forma de corpos porosos rígidos e mecanicamente resistentes. Esses materiais tem sido usados há muito tempo na indústria química e possuem muitas das propriedades necessárias aos suportes para imobilização de enzimas. Embora muitos pós inorgânicos tenham características adsorptivas adequadas e sejam baratos, suas propriedades físicas e hidráulicas geralmente requerem que eles sejam produzidos ou modificados especificamente para a imobilização. Dessa forma, vários suportes foram desenvolvidos, de modo a comportar a enzima e os substratos de alto peso molecular geralmente presentes (Weetall & Filbert, 1974; Tomb & Weetall, 1974; Messing, 1975; Miles & Thomson, 1976).

2 - PROPRIEDADES

Com o objetivo de maximizar o contato enzima-substrato, o suporte deve ter também a área superficial maximizada. Para se conseguir isso pode-se utilizar partículas não porosas muito finas ($< 50 \mu\text{m}$) (Robinson *et al.*, 1973), ou partículas porosas maiores, onde a superfície interna acessível através dos poros compensa a redução da área externa pelo aumento de seu tamanho (Weetall, 1975; Messing, 1975a). O contato mais eficiente com o fluido de

processo normalmente é conseguido através de um leito de partículas rígidas, que não devem ser muito pequenas, no caso de um leito fixo, para não restringir demasiadamente o fluxo. Por essas razões, os trabalhos recentes estão concentrados na utilização de partículas inorgânicas porosas, na faixa de 100-1000 μm .

As principais propriedades dos suportes inorgânicos em relação aos orgânicos são:

2.1- Propriedades físicas e hidráulicas: os suportes inorgânicos são incompressíveis, mesmo sobre pressão hidrostática, o que pode não ocorrer com os orgânicos, implicando em empacotamento do leito, com alteração do tamanho e forma da partícula. Embora tais problemas não ocorram com polímeros fibrosos como a celulose, esse tipo de material não é muito versátil do ponto de vista do uso em reatores. Outra diferença entre os dois tipos de suporte é a maior densidade dos materiais inorgânicos, facilitando sua retenção em sistemas de leito fluidizado. Os suportes inorgânicos podem também ser esterilizados com vapor a altas temperaturas e até mesmo calcinados, de forma a remover resíduos orgânicos e permitir sua reutilização.

O tamanho e formato dos poros é importante pelo fato das enzimas serem moléculas grandes (50-500 Å), e também os substratos em alguns casos. Dessa forma, a utilização de materiais rígidos é vantajosa, no sentido de que os poros podem ser controlados durante a sua preparação e sua forma e tamanho serão mantidas durante a utilização.

A estabilidade mecânica dos suportes inorgânicos resulta num leito de partículas com velocidades de escoamento constantes e baixa queda de pressão (mesmo com fluidos viscosos), o que minimiza os custos de bombeamento e simplifica o controle do processo.

2.2- Propriedades químicas: a maior vantagem dos suportes inorgânicos é o fato deles serem relativamente inertes.

A insolubilidade do suporte é um dos requisitos para a imobilização, já que sua solubilidade, mesmo baixa, pode acarretar liberação da enzima imobilizada, alterações na estrutura dos poros ou mesmo o colapso das partículas.

A inércia química é vantajosa em minimizar possíveis efeitos da superfície sobre a enzima ou substrato, além de reduzir o potencial do material como substrato para microorganismos e permitir o uso de calor e reagentes fortes para sua esterilização e limpeza (Messing, 1975). É importante lembrar que a recuperação do suporte pode representar a redução dos custos operacionais em uma planta utilizando enzimas imobilizadas.

Outra característica decorrente da baixa solubilidade dos suportes inorgânicos é a sua baixa toxicidade, característica primordial em indústrias alimentícias e farmacêuticas. É claro que a técnica de imobilização também deve ser considerada nesse caso.

3 - SELEÇÃO DO SUPORTE

Na seleção de um suporte para imobilização de enzimas, deve-se considerar os seguintes fatores (Eaton, 1974; Weetall, 1976; Porath & Åxen, 1976):

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

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, hidrofiliabilidade, possibilidade de adsorver substâncias, área su-

perficial, 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 e do tipo de reator a ser utilizado, entre outras. Nesses termos, Eaton (1974) fornece uma "árvore 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 à 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 à 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 pode 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 obter uma enzima imobilizada de baixo custo, com boa atividade específica e estabilidade operacional.

4 - MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE SUPORTES SILÍCICOS

Desde minerais baratos até materiais cuidadosamente confeccionados tem sido usados como suportes para imobilização de enzimas. Embora o uso de minerais tenha a sua importância, devido ao baixo custo do suporte, o desenvolvimento de suportes inorgânicos sintéticos fez-se necessário devido à escassez de aerogéis ma-

croporosos naturais. Normalmente o suporte deve ter poros com diâmetro na faixa de 250 a 1000 Å para permitir o acesso da enzima e do substrato (Huang, 1989). O volume de poros também deve ser o maior possível, sem comprometer as propriedades mecânicas. Acima de tudo, o suporte deve permitir a formação de um "composto" ativo enzima-suporte.

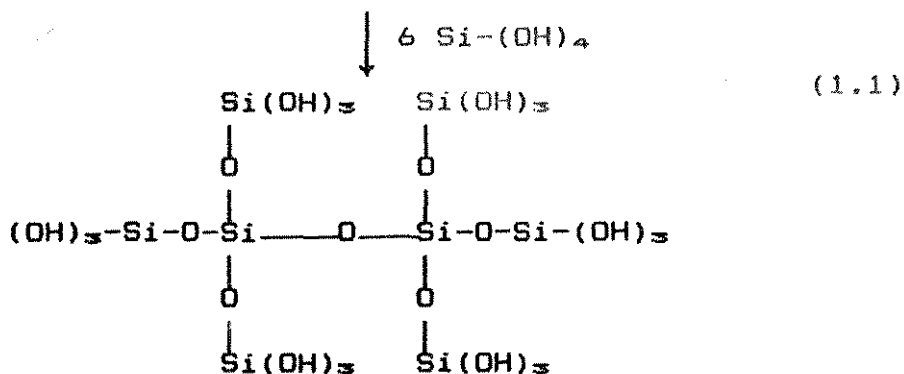
O suporte sintético mais amplamente empregado é o vidro de porosidade controlada (controlled pore glass, CPG), um vidro macroporoso com alto teor de sílica preparado por lavagem da fase alcalina de um vidro borossilicato (Huang, 1989; Weetall, 1975; Eaton, 1974; Yang & Huang, 1989; Tanaka, 1987; Nakajima *et al.*, 1986; Hitachi, 1985; Miyazaki, 1982; Sumitomo, 1981; Sumitomo 1981a; Sumitomo, 1981b; Haller, 1965). O volume e tamanho dos poros pode ser controlado até certa extensão, de modo a se conseguir propriedades próximas às desejadas. O problema encontrado no CPG é que ele se mostrou instável em operações de longa duração, devido à continuidade na remoção da fase alcalina, aumentando o tamanho e volume dos poros. O custo do CPG (US\$ 19,26/ml) (Sigma, 1992) torna-o indesejável para certas aplicações (Messing, 1974), mas outros materiais porosos mais baratos podem ser fabricados. Sílica, alumina ou titânia podem ser produzidas em partículas de porosidade controlada, pela formação de uma pasta com sais de zircônio e aquecimento a 600°C (Messing, 1975a); alternativamente, ácidos orgânicos e seus sais podem ser utilizados na formação da pasta (Messing, 1974a). A fabricação de suportes silícicos porosos pode ser também a partir da hidrólise de compostos silícicos, como o tetraetóxi-silano ou o tetrametóxi-silano (Zorya *et al.*, 1989; Kakuta *et al.*, 1989; Sakubana & Yukitsuka, 1989; Boonstra *et al.*, 1989; De la Rosa-Fox *et al.*, 1987; Ota, 1987; Shimadzu, 1984; Suwa, 1983).

Outro método utilizado para a preparação de suportes

consiste em se tratar hidrotermicamente géis de sílica. O procedimento compreende em se preparar a sílica gel microporosa a partir de silicato de sódio neutro e ácido clorídrico (Trevisan, 1990; Novak & Berek, 1984; Pal *et al.*, 1984; Tamenori & Yoshagawa, 1985; Klein, 1985; Broecker *et al.*, 1986; Yamauchi & Nomura, 1986) e tratá-la numa autoclave, de modo a se obter o tamanho de poro adequado à imobilização de enzimas. Embora já existam trabalhos que considerem o uso do tratamento hidrotérmico como meio de alargar os poros de materiais silícicos (Le Page, 1973; Kiselev *et al.*, 1975; Pak & Chu, 1988), nenhum deles se dedicou especificamente ao estudo de sua aplicação na imobilização de enzimas.

Em trabalho recente (Kondo *et al.*, 1989), sílicas sintetizadas pela decomposição de silicato de sódio e tetraetóxido de silício foram tratadas hidrotermicamente, obtendo-se suportes com diâmetro de poro entre 40 e 957 Å, utilizados no estudo da adsorção de albumina e fibrinogênio bovino. A preparação de sílica gel a partir de uma solução de silicato de sódio (um sol de sílica estabilizado) compreende as seguintes etapas (Hench & West, 1990):

1 - *Gelificação* : com a desestabilização da solução de silicato de sódio pela variação do pH as partículas coloidais se ligam, formando uma estrutura tridimensional. A viscosidade do sol aumenta drasticamente e resulta num corpo sólido com o formato do recipiente que o contém. O tempo necessário para a gelificação varia em função do pH e a curva obtida tem um máximo em torno de pH 2 e um mínimo em pH 5-6 (Hench & West, 1990). As reações de polimerização que ocorrem (1.1) são ativadas termicamente, de modo que o aumento da temperatura acelera o processo, diminuindo o tempo de gelificação (Mackenzie, 1986).



2- *Envelhecimento*: implica em se manter o gel durante determinado tempo imerso num líquido. Quando o gel é mantido com líquido nos poros sua estrutura e propriedades continuam a mudar depois de atingido o ponto de gelificação. Alguns processos que podem ocorrer durante o envelhecimento são:

a) As reações de policondensação (1.1) continuam a ocorrer na estrutura, desde que hajam grupos silanóis suficientemente próximos. Esse fenômeno pode ser acelerado pelo tratamento hidrotérmico, que aumenta a taxa da reação de condensação.

b) O envelhecimento do gel e a resultante expulsão de líquido dos poros é chamada sinérese (Hench & West, 1990; Scherer, 1988; Yoldas, 1986). O fenômeno ocorre devido à formação de pontes de ligação entre as partículas coloidais do gel e é controlado pelo balanço entre forças de repulsão eletrostática e de atração por forças de van der Waals, podendo ser controlado pela adição de eletrólitos. A taxa de contração do gel por sinérese tem um mínimo no ponto isoelétrico, que para os silicatos ocorre num pH próximo de 2. A sinérese aumenta com a concentração de sílica e a temperatura e diminui com o tempo, resultado do aumento da rigidez da estrutura pela formação de "pontes" (Hench & West, 1990).

c) O endurecimento do gel envolve dissolução e reprecipitação na estrutura. Como superfícies convexas são mais solúveis do que côncavas, o material dissolvido tende a reprecipitar em regiões de

curvatura negativa, preenchendo poros pequenos e ligando regiões na estrutura. O resultado é um aumento do tamanho médio dos poros e decréscimo da área superficial.

Durante o envelhecimento a rigidez do gel é aumentada, diminuindo sua quebra durante a secagem. Os principais parâmetros que controlam o processo são o tempo, a temperatura e o pH. Depois que o gel foi formado, o envelhecimento pode ser utilizado com a finalidade de reforçar sua estrutura sem alterá-la ou aumentar o tamanho do poro e diminuir a sua área superficial (Iler, 1986). O envelhecimento térmico envolve dois estágios distintos (Hench & West, 1990): primeiramente o volume e diâmetro dos poros aumenta, com pouca mudança na área superficial; prolongando-se o envelhecimento a área superficial começa a diminuir e o tamanho do poro continua a aumentar, sem alteração significativa no volume de poros.

3- *Secagem*: durante a secagem do gel, que pode ser dividida em três estágios (Hench & West, 1990; Kawaguchi et al., 1986; Dwivedi, 1986), o líquido é removido da sua estrutura.

1º Estágio: o decréscimo de volume do gel é igual ao volume de líquido perdido por evaporação. A estrutura se deforma devido a grandes forças capilares, o que causa o encolhimento do gel. As maiores mudanças em volume, massa, densidade e estruturais ocorrem nesse estágio, que termina quando cessa a contração do gel.

2º Estágio: o 1º estágio termina e começa o 2º quando o ponto crítico é alcançado. Nesse ponto a rigidez da estrutura aumentou suficientemente, devido à maior densidade de empacotamento da fase sólida, para impedir que ela continue a contrair-se. Durante esse estágio ocorre o esvaziamento dos poros, que ficaram cheios durante todo o estágio anterior de secagem.

3º Estágio: inicia-se quando os poros estão praticamente vazios e começa a evaporação dos filmes superficiais. No início des

se estágio o gel pode já ser considerado seco, pois não há mais mudanças dimensionais, mas apenas uma perda lenta e progressiva de peso até se atingir um ponto de equilíbrio, ditado pela temperatura e pressão parcial de água no ambiente.

A quebra do gel durante a secagem dificilmente ocorre durante o 1º estágio, a não ser que o gel não tenha sido suficientemente envelhecido e esteja muito frágil (Scherer, 1986; Scherer, 1987; Scherer, 1987a; Scherer, 1987b; Scherer, 1987c; Scherer, 1988), porém ocorre com frequência no início do 2º estágio. Neste ponto os poros maiores pararam de contrair-se, devido à perda mais rápida de líquido, e os menores ainda estão se contraindo, gerando altas tensões no material. Durante o 3º estágio não ocorre quebra do gel.

O tratamento hidrotérmico consiste em se manter o gel, com os poros cheios de água, durante determinado tempo, em condições de temperatura (e pressão) acima do ponto normal de ebulição da água. Após a gelificação, esse tratamento acelera o envelhecimento do gel, aumentando sua resistência, tamanho e volume de poros, com decréscimo da sua área superficial. Submetendo-se o gel após secagem ao tratamento hidrotérmico pode-se observar apenas o aumento do tamanho de poro, com decréscimo da área superficial, sem alteração do volume de poros. O processo é semelhante ao 2º estágio do envelhecimento e parecem predominar os fenômenos de dissolução e reprecipitação, com reações de condensação entre os grupos silanóis próximos.

CAPÍTULO II - ENZIMAS

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 que exclusivamente 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.

2 - ENZIMAS COMO CATALISADORES

Um catalisador é um composto que aumenta a velocidade de uma reação química, sem sofrer uma mudança química permanente na sua estrutura. 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, que 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 (Bailey & Ollis, 1986).

2.1 - 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 estrutura espacial (terciária) 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 (Bailey & Ollis, 1986).

2.2 - 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:

$$dp/dt|_{t=0} = - ds/dt|_{t=0} = v|_{t=0} \quad (2.1)$$

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, além da possibilidade da presença de moléculas de enzima inativas, 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 proposto 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 (2.2) define-se a constante de dissociação

$$K_m = e.s/(es) = k_{-1}/k_1 \quad (2.4)$$

onde (es) é a concentração do complexo ES.

A formação irreversível do produto (2.3) é dada por

$$v = dp/dt = k_2.(es) \quad (2.5)$$

Um balanço de massa da quantidade de enzima fornece:

$$e + (es) = e_0 \quad (2.6)$$

Para um reator agitado fechado tem-se

$$v = -ds/dt = k_1s.e - k_{-1}(es) \quad (2.7)$$

$$d(es)/dt = k_1s.e - (k_{-1} + k_2)(es) \quad (2.8)$$

$$t = 0 \Rightarrow s(0) = s_0, (es)(0) = 0 \quad (2.9)$$

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

$$d(es)/dt = 0 \quad (2.10)$$

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

$$v = -ds/dt = \frac{k_2e_0s}{((k_{-1} + k_2)/k_1) + s} \quad (2.11)$$

Fazendo $v_{max} = k_2e_0$ e $k_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, resulta na equação de Michaelis-Menten:

$$v = -ds/dt = \frac{v_{max}.s}{k_m + s} \quad (2.12)$$

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

$$v = v_{max}.s/(k_m + s) \quad (2.13)$$

b) Equação de Lineweaver-Burk

$$1/v = 1/v_{max} + (k_m/v_{max}).(1/s) \quad (2.14)$$

c) sem denominação

$$s/v = k_m/v_{max} + (1/v_{max}).s \quad (2.15)$$

d) Equação de Eadie-Hofstee

$$v = v_{\max} - k_m \cdot v/s \quad (2.16)$$

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 $v_{\max}/2$.

3 - CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DAS ENZIMAS UTILIZADAS

3.1 - Amiloglicosidase

A amiloglicosidase é uma exoenzima que catalisa a produção de β -glicose a partir da extremidade não redutora da molécula de amido (Fig.2.1), clivando as ligações glicosídicas α -1,4 tão mais rapidamente quanto maior o grau de polimerização do substrato, por exemplo, da ordem de 5 vezes mais rápida para a maltopentose do que para a maltose.

Amiloglicosidase isolada de diferentes microorganismos apresenta propriedades ligeiramente diferentes, de acordo com o tipo de cultivo e o métodos de purificação empregado. Assim, por exemplo, a maioria das linhagens de *A. niger* produzem, principalmente, duas isoenzimas: amiloglicosidase I e II, normalmente presentes nas soluções comerciais em proporções variáveis. As duas isoenzimas diferem no comprimento, sendo que a amiloglicosidase I apresenta um peso molecular da ordem de 82.000 (66.000 sem o carboidrato associado), enquanto que a II apresenta a mesma sequência de aminoácidos, porém é deficiente de um C-terminal. A amiloglicosidase I é 4 vezes mais estável que a II. A remoção do carboidrato, por oxidação, diminui a atividade e estabilidade da enzima (Reilly, 1985). Nas soluções comerciais, além das isoenzimas I e II, podem ser encontrados como principais contaminantes as enzimas α -amilase e transglicosidase.

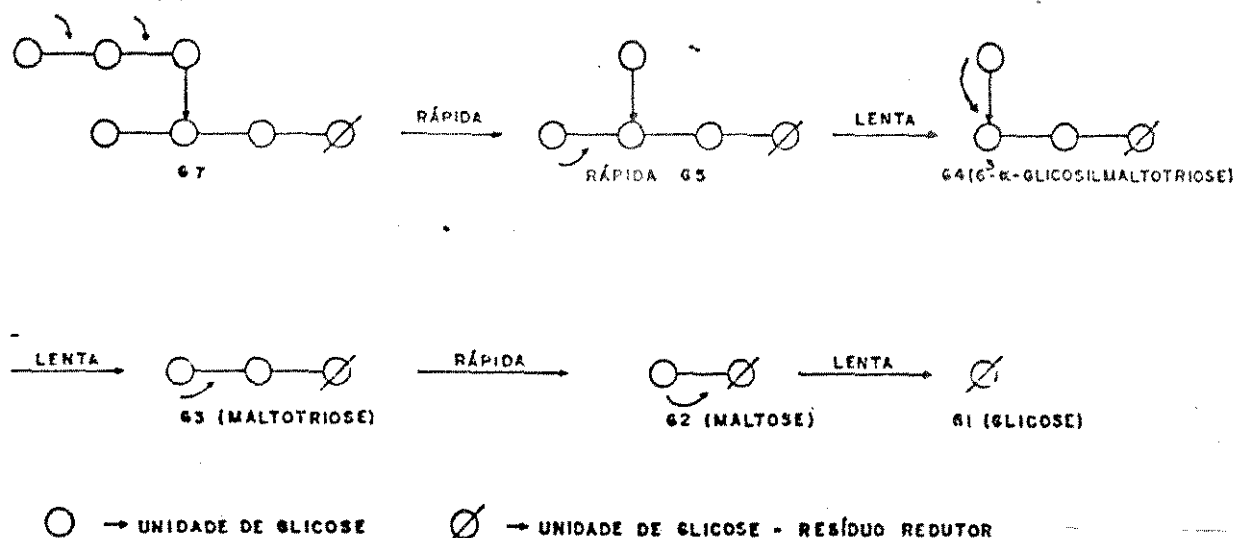


Figura 2.1 - Representação esquemática da ação da amiloglicosidase (↓) na dextrina-limite

A amiloglicosidase também hidrolisa as ligações α -1,6, no ponto de ramificação da amilopectina, porém mais lentamente do que as ligações α -1,4, sendo a velocidade da ordem de 40 vezes menor. Embora hidrolise preferencialmente as ligações α -1,4 e α -1,6, a amiloglicosidase também atua nas ligações α -1,3 (nigero-se), apesar da velocidade ser de 1 até 100 vezes mais lenta do que para as ligações α -1,6 (Bucke, 1982).

Outras propriedades são (Gould, 1975)

pH (ótimo): entre 3,0 e 5,5 a enzima mantém acima de 80% de sua atividade no pH ótimo, que é em pH $4,0 \pm 0,5$;

pH (estabilidade): a enzima é mais estável entre pH 4 e 5;

temperatura: a atividade aumenta até um máximo entre 60 e 65°C, porém cai rapidamente a 65°C. A 60°C, 75% da atividade está ainda presente após 1 hora em pH 4,2;

aplicações: produção de glicose a partir de amido, completando a solubilização iniciada com α -amilase; degradação de dextrinas residuais nos processos fermentativos para produção de cerveja e vinho (Wiseman, 1975).

3.2 - Lactase

A lactase (β -galactosidase) catalisa a hidrólise do terminal β -D-galactose não redutor de β -galactosídeos. Assim como a atividade hidrolítica, que é medida pela produção de glicose, reações de transferência, com produção de oligossacarídeos, também ocorrem (Pazur *et al.*, 1958).

A enzima pode ser obtida de diversas fontes, incluindo plantas, órgãos de animais, leveduras, bactérias e mofos, sendo que as formas isoladas de microorganismos são mais adequadas para uso industrial (Matioli, 1991), destacando-se a lactase isolada da levedura *K. fragilis*, apropriada para uso em alimentos (Mahoney & Whitaker, 1977).

O preparado comercial utilizado, denominado Lactozym e produzido pela NOVO A/S, é produzido a partir de cepa selecionada da levedura *Kluyveromyces fragilis*. A enzima utilizada foi a Lactozym 3000 LAU/ml Tipo HP (High Purity), recomendada para o tratamento de leite destinado ao consumo direto.

A lactase de *Kluyveromyces fragilis* tem um peso molecular de 201.000 Daltons, diâmetro molecular de 16 nm (por microscopia eletrônica) e ponto isolétrico 5,1, não tendo sido detectado nenhum carboidrato ligado (Mahoney & Whitaker, 1978). O preparado Lactozym 3000 LAU, além de poder ser estocado por vários meses a 5-10°C, tem as seguintes propriedades:

pH (ótimo): 6,6, com boa atividade entre 6,5 e 8,5, sendo fortemente reduzida fora desta faixa;

pH (estabilidade): estabilidade máxima entre pH 6,5 e 7,5, a 37°C;

temperatura: a atividade máxima é alcançada a 40°C, acima desta temperatura a desnaturação é muito rápida;

inibidores: metais pesados, incluindo cobre e ferro são ini-

bidores fortes, mas este efeito pode ser minimizado pela adição de agentes redutores como cisteína e sulfito de sódio (Stimpson & Stamberg, 1956). O leite cru também possui um inibidor, que pode ser inativado por tratamento térmico. Ions cálcio e sódio também inibem a enzima (Mahoney & Adamchuk, 1980);

ativadores: ions potássio, numa concentração mínima de 5 mM, e ions magnésio (Mahoney & Whitaker, 1977; Mahoney & Adamchuk, 1980);

aplicações: hidrólise de lactato para formar glicose e galactose, produtos mais doces e de maior solubilidade; remoção de lactose do leite para pessoas com intolerância e para consumo do soro por aves. Também é utilizada para tornar o soro residual dos laticínios um melhor substrato para produção de proteína unicelular (Wiseman, 1975).

3.3 - Invertase

A invertase (β -fructofuranosidase) catalisa a hidrólise do terminal não redutor do resíduo β -D-fructofuranosídeo em fructofuranosídeos. A maioria das enzimas originadas de leveduras contém atividade de β -glicosidase, mas isto resulta nos mesmos produtos finais com a sacarose. A invertase também catalisa reações de transferência com outros aceptores além da água. Isto resulta na formação de oligossacarídeos, reação cuja taxa aumenta com o aumento da concentração de sacarose (Bacon, 1954). A invertase é isolada de leveduras e as preparações obtidas contém "mannan" fortemente associada. O peso molecular da enzima é de 270.000 (aproximadamente 50% como carboidrato). Outras propriedades são:

pH (ótimo): aproximadamente 4,5, com boa atividade na faixa de pH 3,5-5,5;

pH (estabilidade): boa estabilidade entre pH 3,5 e 5,5

temperatura: atividade máxima é alcançada entre 50 e 60°C em presença de soluções de sacarose diluída. Altas concentrações de sacarose melhoram a estabilidade da enzima e podem permitir sua utilização em temperaturas de até 65-70°C;

inibidores: íons de metais pesados, incluindo Ag^+ como um potente inibidor, que se combinam reversivelmente com os resíduos histidina da enzima (Myrbäck, 1957). A taxa de reação é também dependente da concentração de sacarose. Acima de 8% de sacarose, a taxa de reação começa a diminuir, chegando a apenas um quarto da atividade com 70% de sacarose. Uma razão disso é a redução da concentração da água no meio.

aplicações: produção de açúcar invertido, principalmente para produção de geléias, onde a menor cristalinidade do açúcar invertido, em relação à sacarose, não deixa que haja cristalização.

3.4 - Glicose Oxidase

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.

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 (Keiling & Hartree, 1948) como, por exemplo: 6-metilglicose (1.85 % da taxa da D-glicose), manose (0,98 %), xilose (0,98 %), maltose (0,19 %), galactose (0,14 %).

Outras propriedades são (Gould, 1975)

<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.

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 (Wiseman, 1975; Merck, 1983);

- para remoção da glicose de ovos antes da desidratação (secagem) de forma a impedir o escurecimento e desenvolvimento de sabor desagradável. A quantidade de glicose na clara de ovos pode ser reduzida de 1% para 0,1% em 4 horas de reação, a 30°C, pH 5,0-7,5 (Bailey & Ollis, 1986, p. 253]

- misturada com catalase, aumenta a estabilidade de alimentos marinhos (o ácido glicônico formado diminui o pH e inibe o crescimento de microorganismos (Wiseman, 1975)), e é utilizada também no tratamento de invólucros para alimentos, impedindo a sua deterioração.

rização oxidativa (Merck, 1983).

- estabilizante em solução de ácido ascórbico e vitamina B₁₂ (Merck, 1983).

Produção de ácido glicônico (Wiseman, 1986)

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

- 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.

Análises:

- fabricação de papéis de teste para controle de diabetes e testes de fertilidade (Wiseman, 1986);

- análise automatizada de glicose, através de acoplamento a um espectrofotômetro (Scouten, 1976);

- determinação de glicose através de um sensor de O₂ (Scouten, 1976).

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.

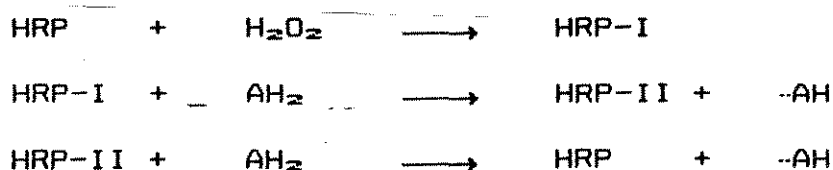
3.5 - Horsehadish Peroxidase

Peroxidases tem sido encontradas nas células da maioria das plantas estudadas e parecem ser um componente normal dessas células. Todas as peroxidases isoladas de plantas contém o grupo prostético hemin ou ferriprotoporfirin. As fontes mais ricas de peroxidases são a seiva da figueira e as raízes de rabanete, sendo

que desta última se extrai a "horseradish peroxidase" (HRP), facilmente purificada na forma cristalina (Maehly, 1955; Dunford & Stillman, 1976).

A HRP é uma glicoproteína, com 18,0-18,5% de carboidrato associado, sendo esse fato associado à estabilidade da enzima, mesmo a temperaturas elevadas (Dunford & Stillman, 1976).

O mecanismo da reação catalisada pela enzima pode ser esquematizado pelo seguinte ciclo (George, 1952):



onde AH_2 é o substrato redutor.

A especificidade da reação catalisada pela HRP é alta, sendo que apenas H_2O_2 , MeOOH e EtOOH se combinam com a enzima para resultar em complexos enzima-substrato ativos (Maehly, 1955). Por outro lado, a especificidade do complexo em relação ao doador de hidrogênio (AH_2) é baixa, sendo que várias substâncias são facilmente oxidadas, incluindo fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ácido ascórbico e certos aminoácidos (Maehly, 1955).

A análise da atividade da enzima normalmente é feita através da oxidação de compostos (AH_2) que produzem substâncias coloridas ou fluorescentes. Os métodos mais usados (Maehly & Chance, 1954) incluem a oxidação de guaiacol (Mäkinen & Tenovu, 1982; Marshall & Chism, 1979), pirogalol (Marshall & Chism, 1979), mesidina e benzidina. Entre os vários métodos utilizando outros doadores de hidrogênio desenvolvidos mais recentemente podemos destacar o da *o*-dianisidina (Lundquist & Josefsson, 1971; Marshall & Chism, 1979), *o*-fenilenodiamina (Bovaird *et al.*, 1982), 3,3'-diaminobenzidina (Herzog & Fahimi, 1973), cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona e ácido 3-(dimetilamino) benzóico (Ngo & Lenhoff, 1980) e N,N-dimetil-*p*-fenilenodiamina (Sastry *et al.*, 1985).

Outras propriedades são (Maehly, 1955):

Peso Molecular: 39.800 - 40.200

Ponto isoelétrico: 7,20

Solubilidade em água: 5g/100ml (com traços de sais)

Estabilidade: entre pH 5,5 e 12, na presença de fluoreto;

entre pH 4,5 e 12, na presença de outros íons de halogênios, N_3^- e CN^- e

entre pH 3,5 e 12, na ausência de todos os íons acima.

- Estável durante 15 min a 63°C e durante semanas a temperatura ambiente.

Usos: a principal aplicação da HRP está na área analítica, sendo utilizada principalmente na determinação de glicose, associada à enzima glicose oxidase, como no Método 1.2.2 desse trabalho e em testes ELISA.

Além de utilizada diretamente na análise de H_2O_2 (Olsson, 1985), também é aplicada em associação com outras enzimas que podem resultar na geração de H_2O_2 , para análise de outros substratos como a glicose (Método 1.2.2) e oxigênio dissolvido (Olsson *et al.*, 1983). A HRP também pode ser utilizada na análise de uma série de substâncias que afetam a sua atividade catalítica (enzyme effectors), como compostos orgânicos nitrogenados, compostos orgânicos contendo enxofre e íons metálicos (Dolmanova *et al.*, 1987). Outras aplicações potenciais são no tratamento de efluentes contendo aminas ou fenóis (Dezotti *et al.*, 1991; Klibanov, 1982; Klibanov & Morris, 1981; Paice & Jurasek, 1984) e síntese de compostos orgânicos (Klibanov *et al.*, 1981).

3.6 - Albumina de Soro Bovino

A albumina é a menor e mais abundante proteína do plasma sanguíneo (cerca de 60%). Ela está envolvida na regulação osmótica e no transporte de produtos metabólicos pouco solúveis de um tecido para outro, especialmente de ácidos graxos livres. Sua estrutura consiste de uma cadeia polipeptídica sem carboidrato associado, conectando quatro segmentos globulares de tamanhos diferentes; ela é estabilizada por dezessete ligações dissulfeto (Merck, 1983). A albumina obtida da Sigma Chemical Company, com um teor de 98-99%, tem um peso molecular de 66.000 Daltons (Sigma, 1992, p.1578). A molécula de albumina, na forma dobrada, tem o formato de um elipsóide com 4 x 12 nm, sendo seu ponto isoelétrico 4,7 (Kondo *et al.*, 1989).

Usos: na forma imobilizada, a albumina tem sido utilizada principalmente adsorvida em sílica, como fase estacionária para resolução de isômeros ópticos em HPLC (Thompson *et al.*, 1989; Vindevogel *et al.*, 1988; Aubel & Rogers, 1987; Aubel & Rogers, 1987a). Outra aplicação em potencial é na hidrólise enantiosseletiva de ésteres arilpropionílicos (Kamal *et al.*, 1991).

CAPÍTULO III - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES SILÍCICOS

1 - INTRODUÇÃO

Nelson e Griffin (1916) constataram que a enzima invertase, adsorvida em carvão ativado, tinha a mesma atividade que a enzima solúvel. Sumner (1948) 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 (Grubhofer & Schleith, 1953), quando carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease foram imobilizadas numa resina poliaminopoliestireno diazotizada.

A maioria dos trabalhos começou a aparecer no início da década de 60, sendo que o desenvolvimento extensivo deu-se no início da década de 70. Embora um grande volume de trabalho tenha sido realizado nesse período, apenas o processo de resolução óptica de aminoácidos foi estabelecido em escala industrial (Chibata *et al.*, 1972). O campo de aplicações para enzimas imobilizadas parecia estar mais restrito a processos em pequena escala, com produtos de alto valor agregado, onde as rotas químicas convencionais seriam superadas pela alta especificidade enzimática. Contrariando essas expectativas surgiu, nos meados de 70, o processo de produção em grande escala de um produto de baixo valor agregado, o xarope de glicose isomerizado (Chem.Eng.News, 1975), mudando as perspectivas em relação ao uso das enzimas imobilizadas.

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. Com o objetivo de se conseguir um catalisador eficiente e estável, dois caminhos estão sendo investigados: um de-

les consiste em se sintetizar compostos que tenham atividade semelhante às enzimas (chamados "synzymes") e o outro consiste em se modificar a estrutura das enzimas produzidas por seres vivos, de forma a torná-las mais estáveis (Chibata, 1978). 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.

2 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTES

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

Os métodos de imobilização que resultam numa enzima insolúvel podem ser agrupados em três categorias, subdivididas como mostrado na Fig. 3.1, e serão considerados com maiores detalhes.

i - ligação a suportes insolúveis

ii - ligações cruzadas

iii - inclusão

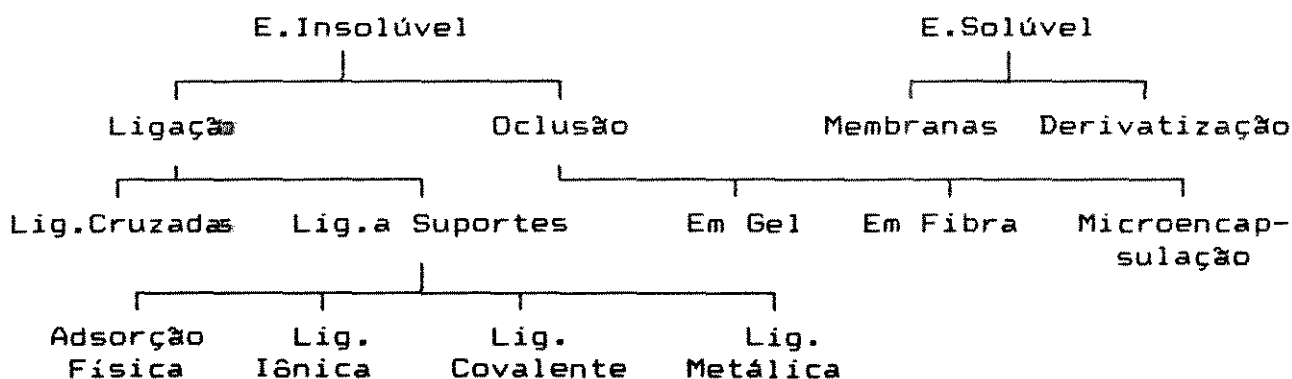


Figura 3.1 - Métodos de imobilização de enzimas (Kennedy & White, 1985)

O método de ligação da 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.

2.1) - 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 (Woodward, 1985).

2.2) 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 (Kennedy & White, 1985).

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

2.3) 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 , $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , FeCl_2 , FeSO_4 , ZnCl_4 , SnCl_2 , SnCl_4 e VCl_3 . A técnica usada constitui principalmente em se umedecer 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 e celulose ou inorgânicos, como celite, vidro, lã de vidro, alumina, sílica e titânia porosa (Kennedy & White, 1985).

2.4) 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 (Zaborsky, 1973).

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 (Scouten, 1976):

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

Levando-se em consideração a reatividade dos grupos e a estabilidade da ligação formada, os resíduos de aminoácidos mais convenientes para se ligar a suportes são, em ordem decrescente: L-lisina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-arginina, L-triptofano, L-serina, L-treonina e L-metionina;

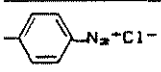
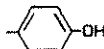
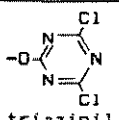
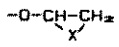
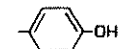
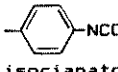
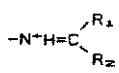
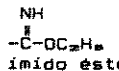
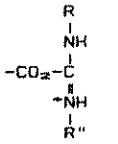
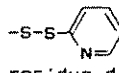
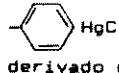
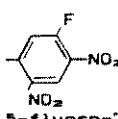
b) Reações de acoplamento enzima suporte

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, como mostrado na Tab. 3.1.

- diazotização
- formação de amida (ligação peptídica)
- alquilação e arilação
- formação de base de Schiff

Tabela 3.1 - Métodos de imobilização de enzimas por ligação covalente, mostrando o grupo do suporte ativado e o(s) da enzima que será acoplado (Kennedy & White, 1985)

Grupo Reativo do Suporte	Grupos Reativos da Enzima	Reação de Acoplamento	Grupo Reativo do Suporte	Grupos Reativos da Enzima	Reação de Acoplamento
 sal de diazônio	-NH ₂ -SH 	ligação diazo	 triazinil	-NH ₂	arilação
 anidrido ácido	-NH ₂	formação de amida	 X = >NH, >O, >S	-NH ₂ -OH -SH	alquilação
-CH ₂ CON ₂ azida de acila	-NH ₂ -SH 	formação de amida	-O-CH ₂ CH ₂ SO ₂ CH=CH ₂ vinilsulfonila	-NH ₂ -SH -OH	alquilação
 imidocarbonato	-NH ₂	formação de amida	 cetovinílico	-NH ₂ -SH -OH	arilação
-R-NCS isotiocianato	-NH ₂	formação de amida	-CHO aldeído	-NH ₂	formação de base de Schiffs
 isocianato	-NH ₂	formação de amida		-CO ₂ H -NH ₂	reação de Ugi
-CH ₂ COCl cloreto de acila	-NH ₂	formação de amida	 ímido éster	-NH ₂	amidinação
 carbonato cíclico	-NH ₂	formação de amida	-CN cianeto	-NH ₂	amidinação
 O-acilisouréia	-NH ₂	formação de amida	 resíduo dissulfeto	-SH	troca tiol-dissulfeto
-CO ₂ -C(=CH-CO-NH-C ₂ H ₅)  derivado do reagente k de Woodward	-NH ₂	formação de amida	 derivado de mercúrio	-SH	interação mercúrio-enzima
 5-fluoro-2,4-dinitroanilida	-NH ₂	arilação	M [•] radical do suporte	E [•] radical da enzima	acoplamento induzido por radiação γ
			-NH ₂ amina	-NH ₂ -CO ₂ H	formação de amida
			-CONHNH ₂ hidrazida de acila	-NH ₂ -CO ₂ H	formação de amida

- 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.

- 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.

- Alquilação e Arilação

Baseados na alquilação ou arilação de grupos amino, fenol ou tiol de uma enzima, com suportes contendo grupos haletos ativos, oxiranos, vinilsulfonílicos ou cetovinílicos.

- 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, e a imobilização ocorre segundo a reação (3.4).

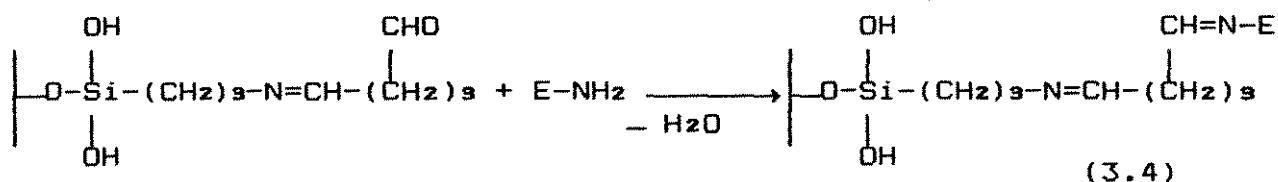
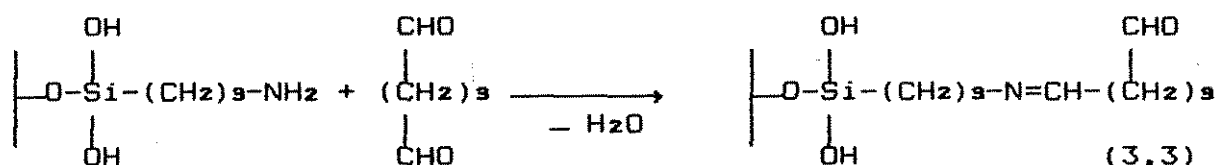
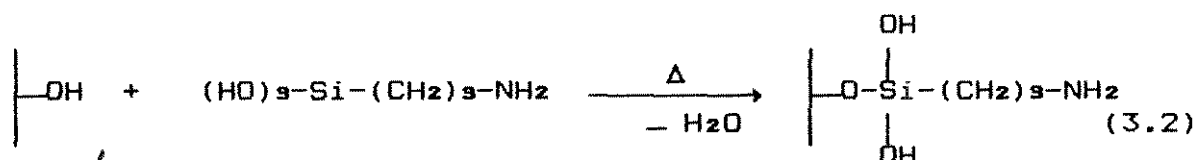
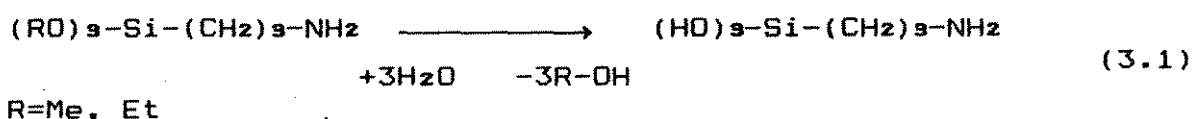
Suportes contendo grupos amino podem ser ativados com glutaraldeído e, posteriormente, utilizados na imobilização, como na reação (3.3).

c) matrizes para ligação covalente

De acordo com a composição química, os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos e subdivididos como mostrado anteriormente (Tab. 1.1, p.3).

Entre os vários métodos de imobilização de enzimas em materiais silícicos existentes (Chibata, 1978), o da ligação covalente ao derivado silanizado do suporte, utilizando glutaraldeído como agente ativante é um dos mais simples e geralmente leva à formação de preparados enzimáticos ativos e estáveis (Kent *et al.*, 1978; Weetall, 1975; Kennedy & White, 1985).

A sequência de reações está mostrada nas reações (3.1) a (3.4).



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 esta-

bilidade operacional. A Tabela 3.2 sumariza algumas das vantagens e desvantagens de diferentes processos de imobilização (Scouten, 1976).

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 despreendimento da mesma. 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 3.2 - 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.	pos.	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: (Scouten, 1976)

+ - = intermediário
pos.= possível

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 - PROPRIEDADES DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

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 (Silman et al., 1980).

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 (Scouten, 1976).

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 (Goldstein *et al.*, 1964).

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, utilizando-se 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 - 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 atingir 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 concentração 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 in-

terna 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.

4 - APLICAÇÕES DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Segundo levantamento bibliográfico até 1977 (Kent *et al.*, 1978; Chibata, 1978), pelo menos 50 enzimas diferentes já tinham sido imobilizadas, por diferentes métodos, em sílica e vidro porosos. A grande diversidade de enzimas e métodos de imobilização já desenvolvidos permite afirmar que qualquer enzima pode ser imobilizada num suporte silícico, sendo que a atividade do produto dependerá principalmente da escolha do tamanho do poro e da partícula, bem como do tipo de ligação à matriz. Além de enzimas, tem-se fixado nesses suportes proteínas em geral, células e organelas, exigindo-se, conseqüentemente, propriedades adequadas para cada caso.

O campo de aplicações das enzimas imobilizadas abranje as seguintes áreas (Chibata, 1978):

1- Processos químicos: envolve a utilização catalítica das enzimas em reações de oxidação-redução, transferência de grupos, hidrólise, síntese assimétrica e isomerização. Entre os produtos obtidos estão os aminoácidos racêmicos, L-DOPA, glicose, açúcar invertido, penicilinas, cefalosporinas e frutose;

2- Analítica: são várias as aplicações na química e na medicina,

- análise automatizada de várias substâncias como eta-

nol, ácido láctico, ácido L-málico, glicose, uréia, sacarose, maltose, lactose, ácido L-aspartico e L-triptofano;

- eletrodos enzimáticos (biosensores) para análise de aminoácidos, glicose, uréia, penicilina, peróxido de hidrogênio, etanol, colesterol e sacarose, entre outras;

- tiras de teste para análise de glicose na urina;

- análise estrutural de proteínas, polipeptídeos e ácidos nucleicos;

- elucidação de mecanismos enzimáticos como a coagulação do sangue;

3- Médicas

- administração de enzimas imobilizadas em terapia enzimática;

- ensaios imunológicos;

4- Processamento de alimentos como leite e cerveja;

5- Cromatografia por afinidade para purificação de substâncias biológicas de acordo com suas propriedades específicas.

Além das aplicações para as enzimas a metodologia utilizando microorganismos, células vegetais ou animais e organelas desenvolveu-se paralelamente e está amadurecendo (Woodward, 1985).

Com o objetivo de ampliar o aproveitamento desse enorme potencial, principalmente no caso de processos químicos em larga escala, é que se propõe preparar uma matriz cujo tamanho de poro possa ser ajustado de acordo com a estrutura a ser imobilizada e cujo tamanho da partícula possa ser selecionado para a escala de produção planejada.

5 - OBJETIVOS

Sabendo-se que o diâmetro de poro ótimo para a albumina de soro bovino (PM = 66.000) é de 300 Å (Kondo et al., 1989), para

a amiloglicosidase (PM = 82.000) é 350 Å (Eaton, 1974), para a glicose oxidase (PM = 186.000), 420 Å (Messing, ^{et al.} 1978) e para o fibrinogênio (PM = 330.000), 700 Å (Kondo *et al.*, 1989), acredita-se que suportes com poros de até 1.000 Å devam comportar a maioria das enzimas isoladas, garantindo um campo amplo de aplicações. Considerando-se esses parâmetros, escolheu-se as seguintes enzimas, de acordo com a disponibilidade no mercado:

Amiloglicosidase	PM=82.000	(Zanin, 1989, p.22)
Glicose Oxidase	PM=150.000-180.000	(Bouing <i>et al.</i> , 1976)
β -Galactosidase	PM=201.000	(Gekas <i>et al.</i> , 1985)
HRP	PM=40.000	(Mahehly, 1955)
Invertase	PM=270.000	(Gascon <i>et al.</i> , 1967)
Albumina de Soro Bovino	PM=68.000	(Kondo <i>et al.</i> , 1989)

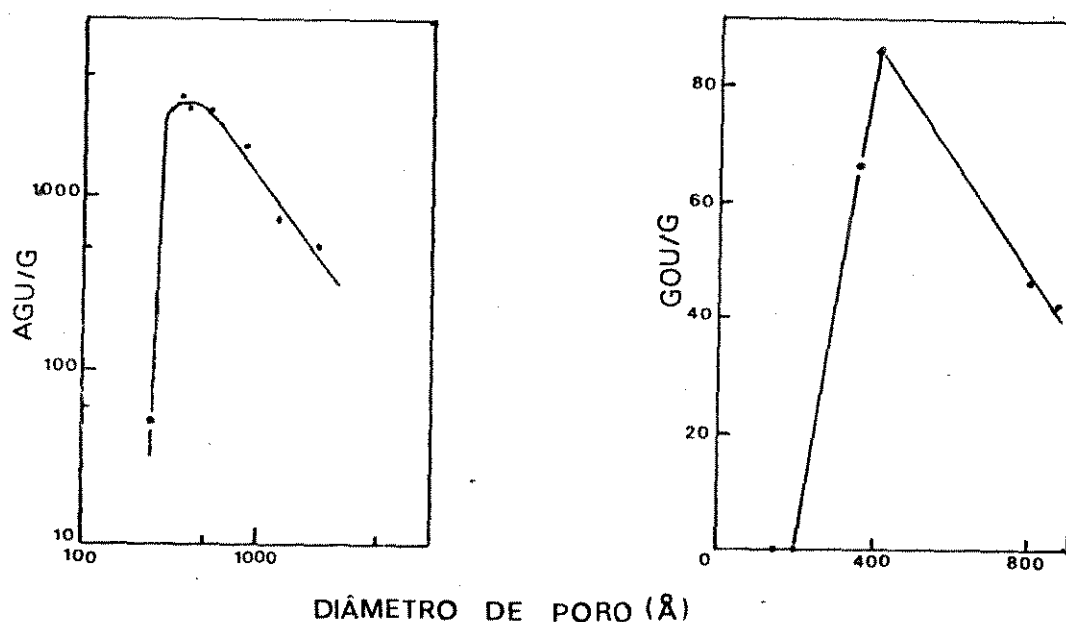


Figura 3.2 - Relação entre tamanho de poro e a atividade enzimática imobilizada para as enzimas amiloglicosidase (A) e glicose oxidase (B). AGU = unidades de amiloglicosidase, GOU = unidades de glicose oxidase.

Como exemplificado para a amiloglicosidase (Fig. 3.2A) (Eaton, 1974; Weetall, 1976) e glicose oxidase (Fig. 3.2B) (Messing, 1978), à medida que se aumenta o diâmetro de poro do suporte, diminuindo sua área superficial, chega-se num ponto ótimo,

onde a quantidade de enzima imobilizada é máxima. Antes de se atingir esse ponto o poro não é suficientemente grande para permitir a entrada da enzima e depois desse ponto há um decréscimo na quantidade de enzima imobilizada devido à menor área superficial (Weetall, 1976). Nesse trabalho pretende-se estabelecer curvas como as da Fig.3.2 para as enzimas estudadas, determinando-se assim os pontos ótimos de imobilização e as condições de preparação do suporte que levem a esse ponto para cada enzima.

CAPÍTULO IV - MATERIAIS

Os reagentes, as proteínas e enzimas foram utilizados nesse trabalho na forma como recebidas do fornecedor, sem nenhuma purificação adicional.

1 - <u>REAGENTES</u>	Procedência
acetato de sódio triidratado 99,5%	Merck
ácido acético glacial	Merck
ácido cítrico 99,5%	Merck
ácido 3,5-dinitrosalicílico monoidratado	Aldrich
ácido clorídrico >36,5%	Reagen
ácido fosfórico 85%	Merck
amido solúvel	Ecibra
3-aminopropiltriethóxi silano >96%	Fluka
azida de sódio >99%	Merck
bicarbonato de sódio >99,7%	Grupo Quimica
brilliant blue G 80% (TLC)	Sigma
citrato de sódio.2H ₂ O >99%	Reagen
cloreto de cálcio.2H ₂ O 99%	Reagen
cloreto de magnésio.6H ₂ O	Ecibra
cloreto de p-nitrobenzoila >99,5%	Fluka
cloreto de tionila 99%	Carlo Erba
ditionito de sódio >87%	Merck
fenol 99%	Reagen
fosfato dibásico de potássio	Reagen
fosfato dibásico de sódio diidratado >99,5%	Merck
fosfato monobásico de sódio	Reagen
D-glicose anidra	Ecibra
glutaraldeído (solução 25%)	Vetec

hidróxido de potássio 85%	Merck
hidróxido de sódio 99%	Merck
kit p/ glicose (o-toluidina)	Biobrás
kit p/ glicose (GOD-PAP)	Merck
D-lactose monoidratada	Reagen
nítrito de sódio >98%	Vetec
peróxido de hidrogênio (Peridrol 30%)	Merck
piridina >99,5%	Merck
pirogalo 98%	Sigma
sacarose comercial (açúcar refinado)	União
silicato de sódio neutro	ICI
sulfito de sódio >98%	Vetec
sulfato de potássio >99%	Inlab
tartarato de sódio e potássio >99%	Ecibra

2 - PROTEÍNAS E ENZIMAS

Procedência

albumina bovina (fração V)	Sigma
amiloglicosidase 200L	NOVO
glicose oxidase (tipo X-S)	Sigma
invertase N 200.000	NOVO
lactase (lactozym 3000L HP-G)	NOVO
"horsehadish" peroxidase (tipo VI)	Sigma

3 - INSTRUMENTAÇÃO

espectrofotômetros:

- 1-Micronal, Modelo B382 (UV-Visível)
- 2-Micronal, Modelo B280
- 3-Van Den, Modelo VDC1000

oxígrafo:

-Biological Oxygen Monitor, da Yellow Springs Instrument Co., Modelo 5300

porosímetro: as análises de porosimetria de mercúrio foram executadas no instituto de Química da UNESP de Araraquara, num porosímetro marca Micromeritics (Pore Sizer modelo 9310) com capacidade para até 30.000 psia, o que corresponde a um diâmetro mínimo de poro de 72 Å

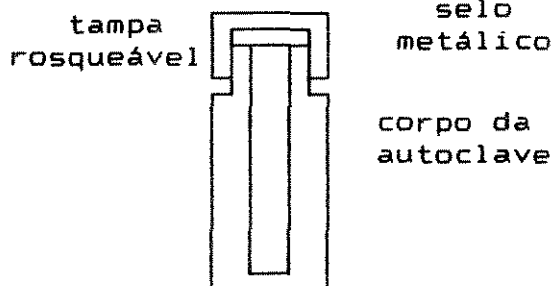
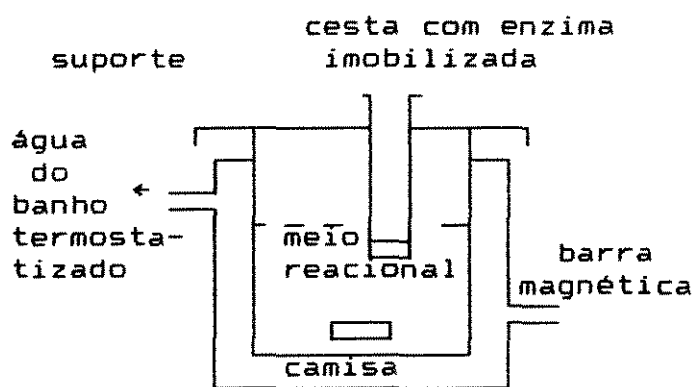
microscópio eletrônico de varredura:

-Marca JEOL, Modelo JSM 35CS

4 - REATORES

reator de vidro encamisado

autoclaves de 10 e 200 ml
em aço inox



5 - EQUIPAMENTOS

- estufa com controlador de temperatura até 100°C
- estufa com controlador de temperatura até 300°C
- agitador mecânico

CAPÍTULO V - MÉTODOS

1 - MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

1.1 - Determinação de Proteína

O método para análise de proteína foi o do Coomassie Brilliant Blue G250 (Sedmak & Grossberg, 1977; Bradford, 1976). O método baseia-se na conversão da forma leuco de corante G250 numa forma de cor azul intensa, quando o ânion do corante interage com grupos NH_3^+ das proteínas.

As amostras são diluídas com água para se adequar à faixa de operação do método (4,0 - 50,0 $\mu\text{g/ml}$).

O corante coomassie é preparado como uma solução a 0,06% em HCl 2,2% (0,6N) e filtrado para eliminar possíveis insolúveis. Como alguns lotes do corante possuem uma cor laranja mais forte do que outros pode-se diluir a solução obtida com HCl de forma a se obter uma absorbância de 1,3-1,5 a 465 nm, absorbância máxima para a forma leuco do corante. Estas soluções podem ser estocadas por longo tempo a temperatura ambiente (Reisner *et al.*, 1975). Em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de solução de proteína a ser analisada adiciona-se 1,5 ml da solução de coomassie, mistura-se, deixa-se reagindo durante 10 min e lê-se a absorbância a 620 nm num espectrofotômetro, usando-se cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. A análise é conduzida a temperatura ambiente.

A calibração do zero no aparelho é feita pela adição de 1,5 ml de água destilada à 1,5 ml do corante.

A concentração de proteína é calculada através de uma curva de calibração obtida com uma série de concentrações de albumina bovina padrão, na faixa de 4,0 a 50,0 $\mu\text{g/ml}$. Nessa faixa de concentrações as absorbâncias medidas estão entre 0,033 e 0,380.

1.2 - Determinação de Glicose

1.2.1 - Método da Orto-Toluidina (Cooper & McDaniel, 1970).

As amostras são diluídas com água destilada para se adequarem à faixa de operação do método (0,1 - 0,9 mg/ml)

O reagente de o-toluidina foi obtido como um kit comercial da Biobrás.

Em tubos de ensaio coloca-se 0,1 ml de amostra e adiciona-se 5 ml do reagente orto-toluidina. Deixa-se em um banho de água em ebulição durante 7 min. Resfria-se em um banho de água a temperatura ambiente e agita-se em "vortex". A cor é estável durante 30 min. A absorbância é lida em um espectrofotômetro a 625 nm, utilizando-se cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico.

A calibração do aparelho é feita utilizando-se um branco preparado pela adição de 5 ml de reagente orto-toluidina a 0,1 ml de água destilada, tratado da mesma forma que as amostras.

A concentração de glicose é calculada através de uma curva de calibração utilizando-se concentrações padrões de glicose na faixa de 0,1 a 0,9 mg/ml. Para esta faixa as absorbâncias lidas estão entre 0,070 e 0,700.

1.2.2 - Método GOD-PAP

Este método enzimático, cujos reagentes são obtidos comercialmente na forma de kit, baseia-se na reação da glicose com O_2 catalisada pela enzima glicose oxidase, liberando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido liberado pela reação anterior reage, catalisado pela enzima peroxidase, com 4-aminofe-

nazona e 2,4-diclorofenol, formando o produto colorido antipiril-cloroquinonimina, cuja quantidade formada é proporcional à quantidade de glicose presente na amostra. O procedimento adotado é:

- adiciona-se 2,0 ml da solução reagente (diluída segundo a recomendação do fornecedor) a 100 µl de amostra;

- agita-se e deixa-se reagindo durante 20 min num banho a 25°C;

- adiciona-se 3,0 ml de água destilada;

- agita-se e lê-se a absorbância em 525 nm, utilizando-se como branco, para zerar o aparelho, uma amostra de água destilada tratada nas mesmas condições.

- a concentração de glicose é calculada através de uma curva de calibração utilizando-se padrões de glicose nas concentrações de 0,05 a 0,40 mg/ml, obtendo-se absorbâncias na faixa de 0,066 a 0,534.

1.2.3 - Método do DNS

O procedimento utilizado é uma variação do método original (Miller, 1959; Summer, 1921), modificada no Laboratório Lawrence Berkeley (Dove *et al.*, 1981), no que se refere à preparação do reagente e ao comprimento de onda de leitura. Quanto ao volume de reagente adicionado, optou-se pela metodologia empregada no laboratório de Berkeley, com diluição da amostra após o desenvolvimento da cor.

A- Preparação do reagente DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico)

- i) Solução 1 - dissolve-se 24 g de NaOH em 200 ml de água destilada e deixa-se resfriar a temperatura ambiente, podendo-se utilizar um banho de água;

- ii) Solução 2 - dissolve-se 8,0 g de DNS (monohidrato ou sal monossódico) em 500 ml de água destilada;
- iii) Solução 3 - dissolve-se 5,0 g de fenol em 80 ml de água, utilizando um banho a 45-50°C;
- iv) Solução 4 - adiciona-se, sob agitação, 15 ml da solução 1 sobre a solução 3;
- v) Solução 5 - adiciona-se lentamente o restante da solução 1 à solução 2, agitando-se para dissolver;
- vi) Solução 6 - adiciona-se 200g de tartarato de sódio e potássio à solução 5 e agita-se até dissolução completa e não se observar mais liberação de bolhas;
- vii) Solução 7 - adiciona-se 6,1 g de sulfito de sódio à solução 4 e agita-se até dissolução;
- viii) Solução 8 - adiciona-se a solução 7 à solução 6 e completa-se o volume para 1 l;
- ix) filtra-se a solução 8, adiciona-se 6,1 g de sulfito de sódio e mistura-se até dissolver;
- x) guarda-se a solução em frasco escuro sob condições mínimas de luz (proteger o frasco com papel alumínio).

B- Determinação de Açúcares Redutores na Amostra

- tomar 0,50 ml da amostra e adicionar 2,50 ml do reagente de DNS;
- colocar em um banho maria em ebulição e deixar reagir durante 10 min;
- resfriar em água a temperatura ambiente durante 3-5 min;
- adicionar 3,0 ml de água destilada; a cor é estável durante 30 min;
- agitar em "vórtex" e ler a absorbância em 600 nm, zerando o aparelho com um branco preparado com uma amostra de água destilada;

- a concentração de (glicose + frutose) é determinada através de uma curva de calibração utilizando quantidades equimolares de (glicose + frutose) até uma concentração total de 1,0 mg/ml. Para a faixa de concentrações de 0,1-1,0 mg/ml as absorbâncias obtidas estão entre 0,023 e 0,660.

2 - DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade enzimática é determinada pelo método das velocidades iniciais. A curva de progresso da maioria das reações enzimáticas tem a forma representada na Fig.4.1.

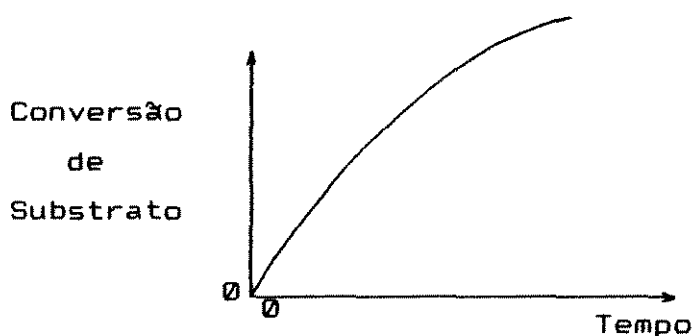


Figura 4.1 - Curva típica de reação enzimática

Os fatores que podem contribuir para o decréscimo da velocidade de reação são: (i) inibição da enzima pelo produto; (ii) diminuição do grau de saturação da enzima devido ao decréscimo da concentração de substrato à medida que a reação avança; (iii) maior contribuição de reações reversas à medida que a concentração de produto aumenta; e (iv) inativação da enzima pela temperatura ou pelo pH. Esses fatores podem agir isoladamente ou em conjunto, de forma que a curva de reação enzimática não segue exatamente as equações das reações homogêneas (Dixon & Weeb, 1979; Hawcroft, 1987).

A atividade enzimática é medida através da velocidade inicial de reação, uma vez que no início da reação os fatores acima

mencionados ainda não começaram a se manifestar e se conhece, nesse ponto, as condições exatas em que se processa a reação. Dessa forma, utiliza-se o início da curva de progresso da reação, que é praticamente linear até uma conversão de aproximadamente 20 % (Dixon & Weeb, 1979).

A evolução da reação enzimática pode ser seguida de duas maneiras: (i) método de amostragem; e (ii) métodos contínuos. No método de amostragem as análises são realizadas em amostras retiradas em vários tempos, obtendo-se vários pontos separados da curva de progresso da reação. A retirada de várias amostras permite a verificação da linearidade da curva de progresso no intervalo de tempo considerado. No método contínuo a curva é construída no decorrer da reação por meio de um grande número de leituras e/ou de registradores automáticos.

A Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica recomenda a seguinte definição de atividade (Dixon & Weeb, 1979) " uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto", nas condições do ensaio.

As atividades de todas as enzimas foram determinadas num reator de batelada, utilizando-se a enzima livre ou imobilizada. Nos testes com a enzima imobilizada, ela era colocada num cesto e imersa num reator encamisado, a temperatura constante e contendo o substrato sob agitação.

2.1 - Amiloglicosidase

- carrega-se o reator com 35 ou 50 ml de amido liquefeito a 5% em tampão acetato 0,05M, pH 4,5 e estabiliza-se a temperatura em 45°C;

- adiciona-se a enzima livre ou coloca-se o cesto com a enzi-

ma imobilizada e inicia-se a contagem do tempo;

- retira-se, a cada 2 min, uma amostra de 0,5 ml, adiciona-se a um tubo de ensaio com tampa contendo 1,5 ml de água destilada e deixa-se inativando num banho em ebulição durante 10 min;

- resfria-se a amostra, dilui-se, caso necessário e analisa-se o teor de glicose pelo método da o-toluidina (1.2.1), obtendo-se assim a concentração de glicose no reator;

- considerando-se que a cada amostra o volume de meio reacional diminui em 0,5 ml, calcula-se a quantidade de glicose presente no reator a cada amostra, em μ moles, pela equação:

$$\text{Glicose } (\mu\text{moles}) = [\text{Glicose (mg/ml)}] \cdot V_R / 0,180$$

onde V_R = volume de solução de substrato presente no reator quando a amostra foi retirada
 0,180 = massa molecular da glicose (mg/ μ mol)

- plota-se a curva da quantidade de glicose liberada (μ moles) em função do tempo (min), considera-se a região linear do método das velocidades iniciais e calcula-se a atividade de amiloglicosidase presente como a inclinação da reta obtida. A atividade da enzima imobilizada é calculada como a atividade medida dividida pela massa seca de enzima imobilizada utilizada na determinação. A atividade específica é calculada dividindo-se a atividade obtida pela massa de proteína presente no preparado enzimático utilizado.

2.2 - Lactase

O procedimento utilizado é basicamente o mesmo da amiloglicosidase, com as seguintes diferenças:

- o substrato constitui-se de lactose 4,5%, em tampão láctico, pH 6,5;

- o tampão láctico, ajustado em pH 6,5 com NaOH/HCl 4N tem a seguinte composição:

<u>Componente</u>	<u>[Sal] (mM)</u>
Citrato de Sódio	2,70
Ácido Cítrico	7,91
Sulfato de Potássio	1,03
Fosfato Dibásico de Potássio	2,99
Hidróxido de Potássio	19,43
Cloreto de Magnésio	4,08
Cloreto de Cálcio	5,10
Hidróxido de Sódio 4M (ml/l)	10,0
Bicarbonato de Sódio	3,33
Azida de Sódio (NaN ₃)	0,01%

- a quantidade de glicose formada é analisada pelo Método GOD-PAP (1.2.2).

2.3 - Invertase

O procedimento utilizado para se determinar a atividade da invertase é basicamente o mesmo da amiloglicosidase, com as seguintes diferenças:

- utiliza-se como substrato uma solução de sacarose a 5% em tampão acetato 0,05M, pH 4,5, a 45°C;

- para análise das amostras utiliza-se o Método do DNS (1.2.-3), com uma curva de calibração utilizando uma mistura equimolar de (glicose + frutose).

2.4 - Glicose Oxidase

O método adotado consiste em se seguir o consumo de O₂ na solução (devido à reação: glicose + O₂ → gliconolactona + H₂O₂), a 25°C, através de um eletrodo de O₂ (Bouin *et al.*, 1976). O meio reacional consiste de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,50 e glicose 13,9 mM. O volume final de reação é de 10 ml e deve ser borbulhado ar para saturar o meio antes de se iniciá-la. A solução de glicose a ser adicionada para iniciar a reação deve fi-

car 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°C, é de 0,25 mM (Bouin *et al.*, 1976) 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 μ mol 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°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 μ l de solução a 100 mg/ml para cada ml de tampão) através de uma seringa e liga-se o registrador acoplado ao oxígrafo, plotando-se o consumo de O_2 do meio em função do tempo (min);

- a atividade é calculada em função da inclinação da reta I (% O_2 /min) obtida do consumo de O_2 em função do tempo pela seguinte equação:

$$At. = \frac{I \times 0,25 \times V}{(V_a \text{ ou } m_a) \times 100} \quad \frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{min} \times (\text{ml ou g})} \quad (\text{U/g ou ml})$$

onde:

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

V = volume de tampão (~ volume da reação) (ml)

V_a = volume de amostra (ml)

m_a = massa seca de enzima imobilizada

2.5 - Horsehadish Peroxidase (HRP)

No caso dessa enzima a atividade é determinada utilizando-se o procedimento e a definição de atividade determinada pelo fornecedor (Sigma, 1992). Devido à dificuldade em se acompanhar a alta velocidade de reação numa cubeta de 3 ml, como descrito no método do fornecedor, principalmente no caso da enzima imobilizada, utilizou-se um volume de reação de 30 ml e acompanhou-se o aumento de absorbância num espectrofotômetro com recurso para aspirar amostras de 1 ml do meio reacional. O procedimento adotado foi:

<u>Reagentes</u>	<u>Volume</u>
tampão fosfato 0,1M, pH 6,0, 20°C	3,2 ml
peróxido de hidrogênio 0,147M	1,6 ml
pirogallol 5%	3,2 ml
água destilada	22 ml

- mistura-se os reagentes na ordem acima, no reator termosta-
tizado a 20°C e espera-se 5 min, até que a absorbância fique cons-
tante;

- adiciona-se 0,4 a 0,7 unidades de peroxidase (livre ou imo-
bilizada), aciona-se o cronômetro e aspira-se as amostras de 30 em
30 s, aguardando 15 s para a leitura da absorbância em 420 nm.
Como a cada 30 s é retirado 1 ml do meio reacional, corrige-se os
valores obtidos multiplicando por 30/V, no caso das amostras de
enzima imobilizada, onde V é o volume de meio presente no reator
quando a amostra foi retirada;

- plota-se a curva da absorbância corrigida versos o tempo,
em segundos;

- toma-se a reta das velocidades iniciais e calcula-se a ati-
vidade como:

$$U/g = \frac{\Delta A_{420nm}/20s}{1,2 \times m_a}$$

onde: $\Delta A/20$ = variação de absorbância verificada em 20 s
 $1,2$ = absortividade molar/10
 m_e = massa de enzima utilizada

3 - PREPARAÇÃO DA SÍLICA

3.1 - Obtenção da Silica Microporosa

A obtenção de sílica porosa com diâmetro de poro adequado para imobilização de enzimas (250-1000 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 (Aboutboul *et al.*, 1972; Le Page & Duchene, 1967), ou então pelo alargamento dos poros de um produto já existente (Kiselev *et al.*, 1975; Le Page, 1971), considerando-se como matéria prima o silicato de sódio.

Como a obtenção da sílica porosa pelo tratamento do gel durante a lavagem envolve várias etapas, com a substituição da água do gel por outros solventes (Aboutboul *et al.*, 1972; Le Page & Duchene, 1967), optou-se pela preparação da sílica gel microporosa, com posterior tratamento hidrotérmico para alargar os poros (Le Page & Duchene, 1967; Kiselev *et al.*, 1975). A metodologia adotada é:

- prepara-se, num béquer, 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°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 constante. Após determinado tempo, fixado em 16 horas na maioria dos ensaios, deixa-se o gel atingir

a temperatura ambiente,

- corta-se o gel obtido em pedaços de 1-2 cm de lado e lava-se, com água destilada, até que o pH do sobrenadante esteja neutro. 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.

- num béquer, cobre-se o gel lavado com água destilada e deixa-se envelhecendo durante determinado tempo (geralmente 16 h) a temperatura constante,

- escorre-se a água e seca-se o gel em estufa a 120°C durante 12 h. Antes de se colocar todo o gel na estufa, retira-se uma amostra e faz-se um teste de secagem, para verificar se não ocorre esfarelamento do produto. Em caso positivo, lava-se novamente o gel,

- despeja-se a sílica seca em água destilada e agita-se ocasionalmente com uma espátula durante 30 min., até que não haja mais liberação de bolhas de ar. 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 120°C, moe-se e peneira-se o produto, classificando-o nas faixas de granulometria desejadas.

Para uniformização dos ensaios e maior controle da influência dos parâmetros de preparação nas características da sílica produzida, dividiu-se o procedimento nas seguintes etapas (Hench & West, 1990).

- gelificação: etapa decorrida entre a mistura do silicato de

sódio com o HCl, até a adição de água de lavagem ao gel;

- lavagem: etapa durante a qual o gel fica em contato com a água de lavagem, até a remoção completa do excesso de HCl e do NaCl formado durante a gelificação;

- envelhecimento: tempo em que o gel lavado é mantido imerso em água destilada, a temperatura constante.

3.2 - Tratamento Hidrotérmico

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

- trata-se o produto no reator a temperatura constante durante 5 horas.

- depois de resfriar, lava-se o produto com água destilada e seca-se a 120°C.

- amostras tratadas nas condições acima podem ser analisadas através do método de intrusão de mercúrio determinando-se a curva de distribuição dos poros.

3.3 - Caracterização da Sílica

A caracterização das sílicas obtidas foi feita, especialmente do produto final, por porosimetria de intrusão de mercúrio e microscopia eletrônica de varredura, em aparelhos destinados a esse tipo de análise, descritos no Cap.IV. Como as análises citadas acima são caras e dependem da disponibilidade de equipamentos de outras instituições, fora da Faculdade de Engenharia Química e mesmo da UNICAMP, acompanhou-se a otimização do método de produção da sílica pela medida do volume de poros por intrusão de água, conforme método descrito abaixo.

3.3.1 - Medida do Volume de Poros por Intrusão de Água

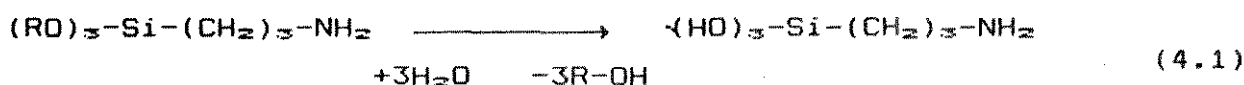
O método utilizado consiste em se preencher os poros do suporte com água, pesá-lo, secá-lo e pesá-lo novamente para se obter a massa seca. A quantidade de água dentro dos poros é medida pela diferença de massa obtida. Embora o erro do método seja relativamente grande, devido à dificuldade em se remover seletivamente somente a água do exterior da partícula, ele foi empregado para as partículas maiores (0,5-0,7 mm), considerando-se o objetivo de uma avaliação prévia.

Procedimento:

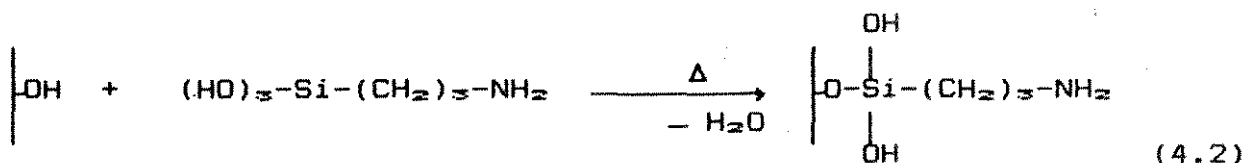
- adiciona-se água destilada a uma certa quantidade de sílica (~ 10 g) até cobri-la e faz-se vácuo, eliminando-se todo o ar dos poros;
- filtra-se a sílica úmida num funil de placa porosa média até que não se observe mais gotejamento e água;
- transfere-se a sílica úmida para um béquer tarado e determina-se sua massa;
- seca-se a sílica em estufa a 120°C e pesa-se novamente, determinando-se a massa de água eliminada na secagem por diferença.
- considerando-se a massa específica da água como 1,0 g/cm³, calcula-se o volume de intrusão de água como sendo a razão entre a massa de água removida por secagem e a massa de sílica seca.

4 - PREPARAÇÃO DA SÍLICA ALQUILAMINADA

Os suportes silícicos são funcionalizados através da silanização com um aminosilano, segundo as reações (Gruchka & Kikta, 1977):



R=Me, Et



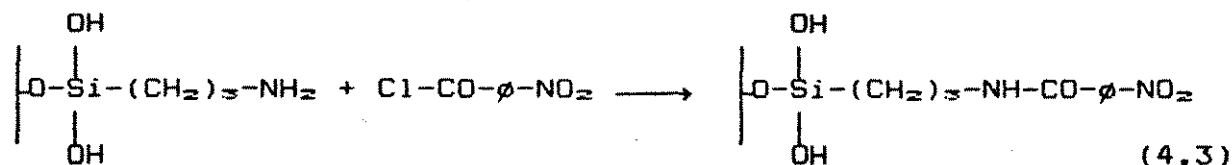
Usou-se neste trabalho um método descrito anteriormente (Trevisan, 1990).

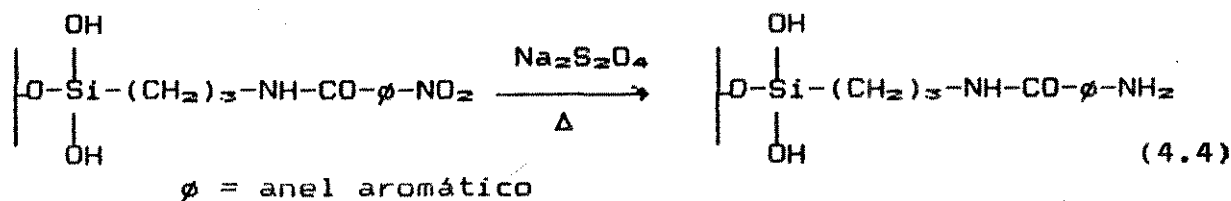
Procedimento:

- 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 (2,5 ml/g de sílica)
- filtra-se o excesso de solução e deixa-se o suporte úmido reagindo, numa estufa a 60°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.

5 - PREPARAÇÃO DA SÍLICA ARILAMINADA

Partindo-se do derivado alquilamino obtido pelo método anterior, o objetivo dessa etapa é se conseguir um derivado arilaminado da sílica, permitindo dessa forma a ativação via diazotação. O método baseia-se nas reações (4.3) e (4.4), e o procedimento utilizado é uma modificação do descrito em (Olsson, 1985).





Procedimento:

- prepara-se uma solução de cloreto de p-nitrobenzoila a 5% p/v em 5 ml de piridina seca (destilada após secagem sobre KOH) contendo 50 µl de cloreto de tionila;
- adiciona-se esta solução a um tubo de ensaio com tampa rosqueável contendo 1,0 g de sílica silanizada seca e deixa-se reagir durante 30 min num banho-maria em ebulição;
- deixa-se esfriar até 40-50°C, filtra-se a solução e lava-se a sílica exaustivamente com água destilada, até remover toda a piridina, e o excesso de cloreto de ácido não reagido;
- adiciona-se à sílica lavada ainda úmida 10 ml de uma solução de ditionito de sódio a 5% p/v e deixa-se reagindo num banho-maria em ebulição durante 1 h;
- resfria-se, filtra-se e lava-se com água destilada. Seca-se a 50-60°C para estocagem.

6 - ATIVAÇÃO DOS SUPORTES E IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

6.1 - Via Glutaraldeído

A ativação do suporte alquilaminado 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 (Weetall & Detar, 1974; Marshall, 1973; Marsh & Tsao, 1976; Lobarzewski & Paszczynski, 1983; Mason *et al.*, 1975; Kvesitadze & Dvali, 1982; Malikkides & Weiland, 1982; Bouin & Hultin, 1982; Wasserman *et al.*, 1980; Olsson *et al.*, 1983), sendo

também aqui utilizado:

- pesa-se o suporte silanizado num erlenmeyer e adiciona-se uma solução de glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, até cobri-lo (2,5 ml/g sílica);
- 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 fosfato 0,05 M, pH 7,0;
- após filtração, pesa-se o sólido úmido e adiciona-se uma solução de enzima cuja atividade e/ou teor de proteína tenham sido analisados;
- deixa-se reagindo durante aproximadamente 24 horas, a 4°C, com agitação ocasional;
- analisa-se o sobrenadante, filtra-se e lava-se com tampão apropriado até que todo o excesso de enzima livre seja removido, o que pode ser detectado pela análise 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 apropriado, em geladeira a 4°C.

6.2 - Via Diazotização

O procedimento adotado é o que foi utilizado para a enzima peroxidase (Olsson *et al.*, 1983):

- prepara-se uma solução de HCl a 2,4M e outra de nitrito de sódio a 200mg/ml, deixando-as depois resfriar até 0°C num banho de gelo;

- coloca-se 1,0 g de sílica arilamino (Método III.3) num tubo de ensaio, adiciona-se 10 ml de HCL 2,4M gelado e faz-se vácuo para remover o ar dos poros. Coloca-se então o tubo num banho de gelo e deixa-se a temperatura estabilizar na faixa 0-1°C;

- adiciona-se, gota a gota, 1,0 ml de solução de nitrito de sódio, agitando-se o tubo a cada gota e mantendo-se a temperatura na faixa de 0-2°C;

- após o término da adição, deixa-se reagir durante mais 30 min a 0-2°C, filtra-se e lava-se com água destilada até que o pH da água de lavagem esteja aproximadamente neutro (pH >6);

- adiciona-se aproximadamente 5 ml de solução de enzima em tampão fosfato 0,05M, pH 7,0 (medir a quantidade exata de solução), cuja atividade e/ou teor de proteína tenham sido analisados. Deixa-se reagindo em geladeira a 4°C durante 24 h, com agitação ocasional;

- filtra-se e lava-se o sólido 4 ou 5 vezes com 10 ml de tampão apropriado para a enzima cada vez. Coleta-se separadamente o sobrenadante e as águas de lavagem para análise. A quantidade de proteína e/ou atividade imobilizada é calculada como a diferença entre a adicionada e a recuperada no sobrenadante e águas de lavagem;

- após a última lavagem, estoca-se a enzima imobilizada na geladeira, imersa em tampão apropriado.

CAPÍTULO VI - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA

1.1. TESTES PRELIMINARES

Nesta etapa preliminar de desenvolvimento do projeto preparou-se um lote de sílica microporosa fixando-se o tempo de gelificação em 16 h. O gel obtido foi lavado (e envelhecido) durante 24 h a temperatura ambiente e depois seco como descrito no Método 3.1, obtendo-se a sílica codificada como "Série I".

Como base inicial para avaliação dos parâmetros, três tipos de sílica de procedências diferentes foram submetidas ao tratamento hidrotérmico (Método 3.2):

- 1- Sílica Série I (tamanho de partícula = 0,50-0,70 mm)
- 2- Sílica Gessy (tamanho de partícula = 0,30-1,00 mm)
- 3- Sílica Merck 60 (tamanho de partícula = 0.060-0,20 mm)

A utilização desses dois produtos comerciais visou avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico em materiais já produzidos industrialmente, considerando-se a possibilidade de se utilizá-los diretamente na obtenção de suportes para a imobilização de enzimas.

Quanto à temperatura de tratamento, tomou-se como valor intermediário 250°C, de um dado obtido anteriormente, resultando em um diâmetro médio de poro de 440 Å (Trevisan, 1990) e optou-se pelas seguintes condições: 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

Os resultados das análises dos produtos, obtidos por porosimetria de mercúrio, estão mostrados nas Figs. 6.1-6.3. Nas Figs. 6.1a-6.3a os mesmos resultados estão normalizados em função do volume de intrusão máxima, de forma a facilitar a visualização das curvas.

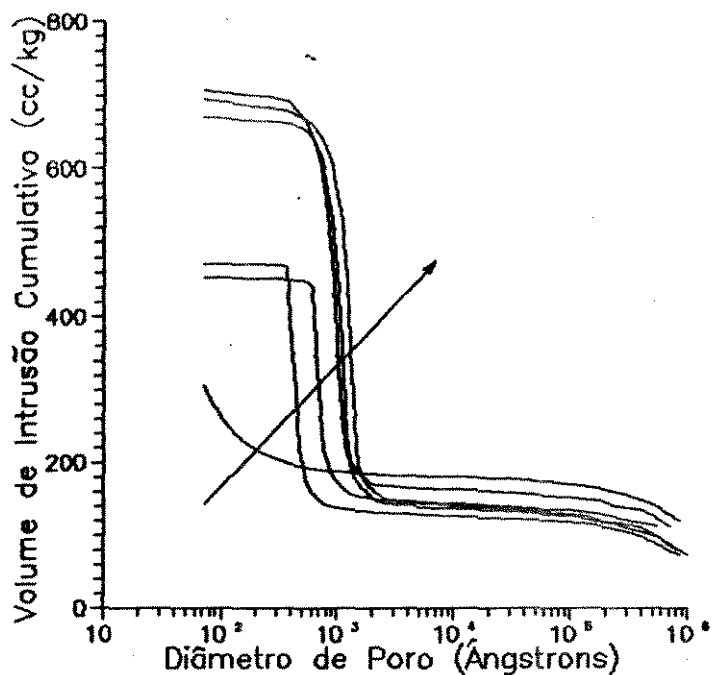


Figura 6.1 - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão para a sílica Série I tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado no gráfico: sem tratamento, 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

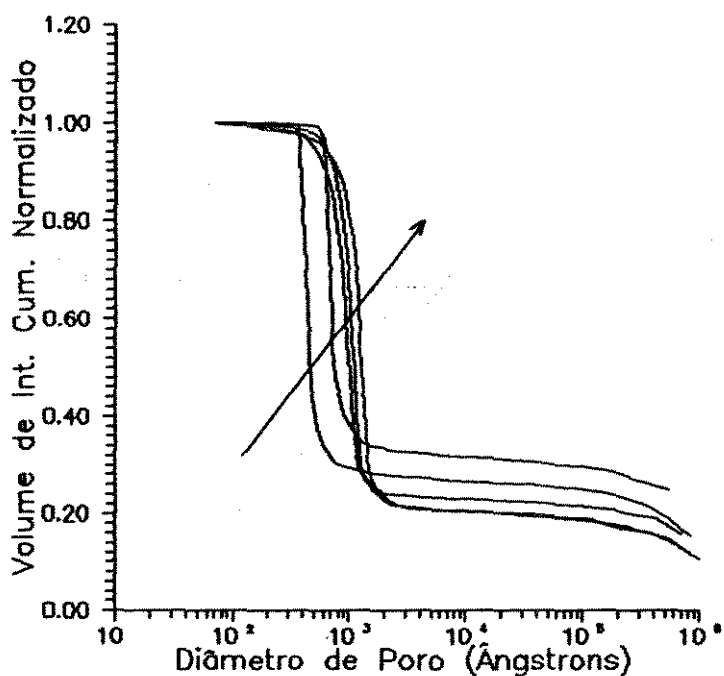


Figura 6.1a - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão normalizado para a sílica Série I tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado no gráfico: 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

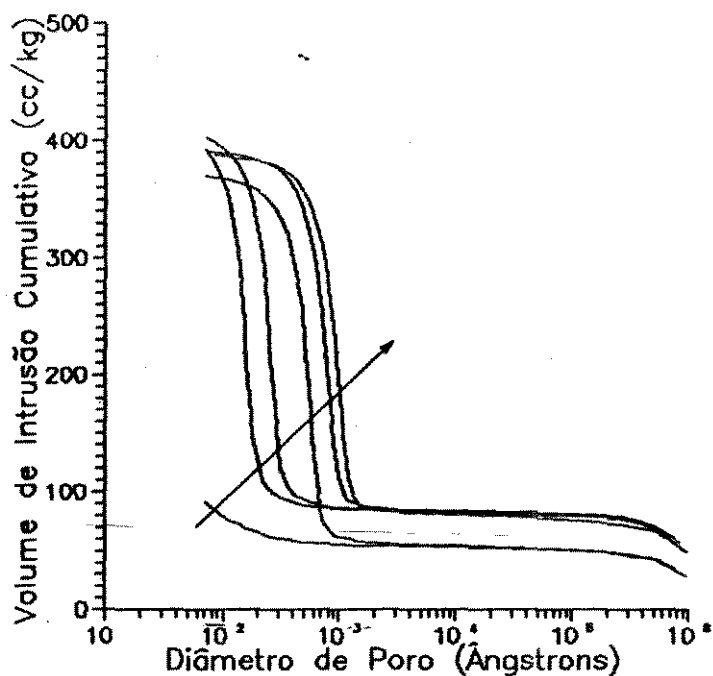


Figura 6.2 - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão para a sílica Gessy tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado no gráfico: sem tratamento, 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

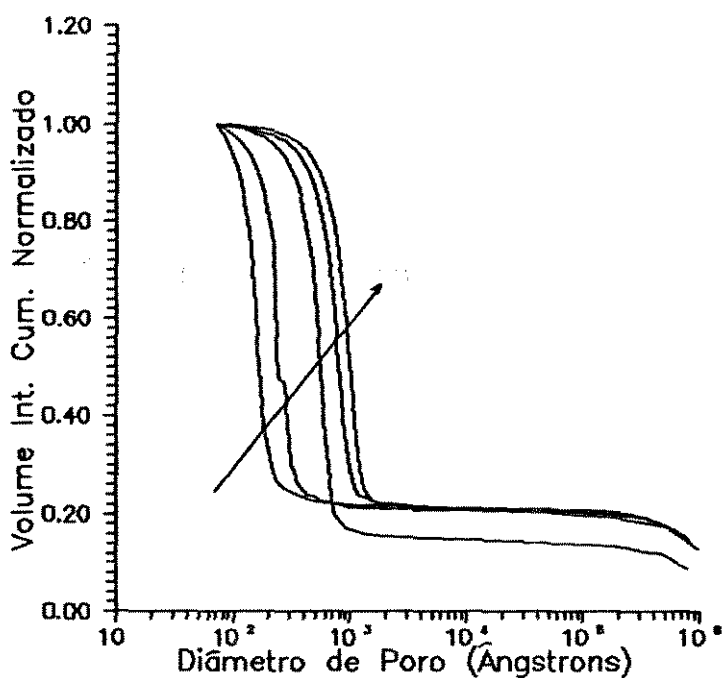


Figura 6.2a - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão normalizado para a sílica Gessy tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado gráfico: 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

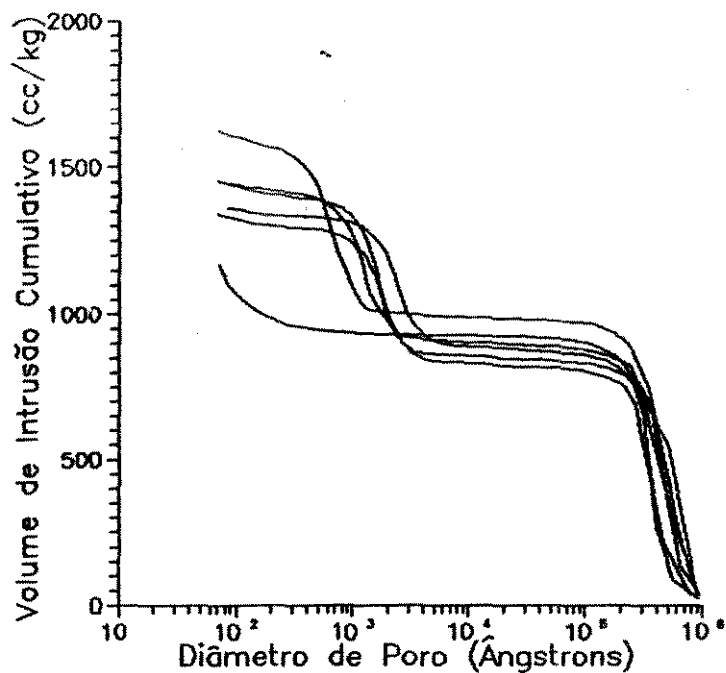


Figura 6.3 - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão para a sílica Merck tratada nas seguintes temperaturas: sem tratamento, 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

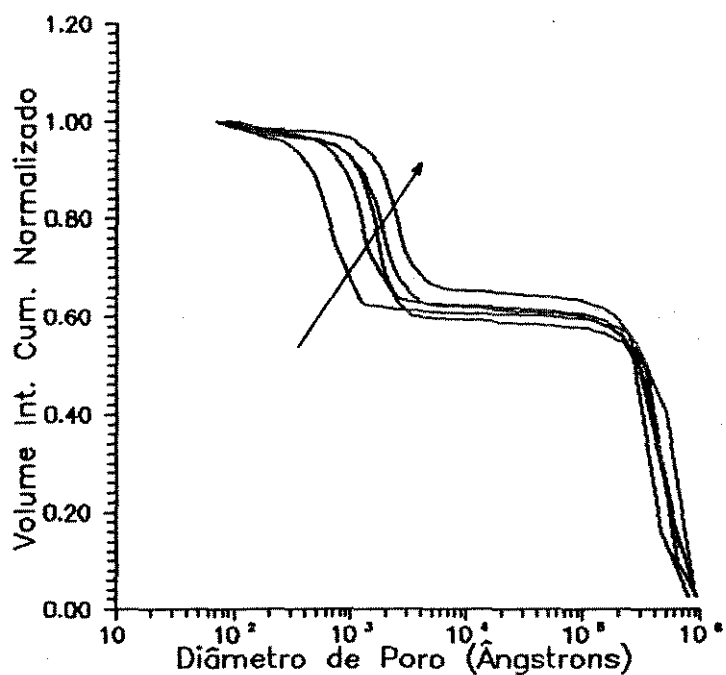


Figura 6.3a - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão normalizado para a sílica Merck tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado no gráfico: 213°C, 243°C, 265°C, 281°C e 296°C.

Nas Tabs. 6.1-6.3 estão sumarizados os resultados da análise de cada amostra, incluindo o diâmetro médio de poro levando-se em consideração três parâmetros: a distribuição de área superficial, a distribuição de volume de intrusão e o cálculo direto a partir do volume de intrusão e da área superficial, dado como $4V/A$.

Tab. 6.1 - Dados da Análise de Porosimetria da Sílica Série I

T(°C)	P(atm)	V(cc/g)	A(m ² /g)	d _c (g/cc)	Diâmetro Médio de Poro (Å)		
					(Volume)	(Área)	(4V/A)
TA	-	0,3061	37,69	1,025	334091	99	325
213	20	0,4715	30,17	1,358	472	433	625
243	35	0,4534	17,27	1,357	760	690	1050
265	50	0,7069	28,21	2,043	995	831	1002
281	65	0,6699	23,33	1,976	1101	964	1149
296	80	0,6946	23,61	2,188	1289	1065	1177

T=temp. do tratamento, P=pressão de equilíbrio líquido-vapor, V=volume de intrusão total, A=área superficial total, d_c=densidade cristalina da sílica

Tab. 6.2 - Dados da Análise de Porosimetria da Sílica Gessy

T(°C)	P(atm)	V(cc/g)	A(m ² /g)	d _c (g/cc)	Diâmetro Médio de Poro (Å)		
					(Volume)	(Área)	(4V/A)
TA	-	0,0913	10,91	1,3700	362058	102	335
213	20	0,3928	83,47	1,9572	168	146	188
243	35	0,4035	57,97	1,9832	264	225	278
265	50	0,3696	28,35	1,9925	561	465	521
281	65	0,3920	21,02	1,9986	810	625	746
296	80	0,3877	16,74	2,0282	986	777	926

T=temp. do tratamento, P=pressão de equilíbrio líquido-vapor, V=volume de intrusão total, A=área superficial total, d_c=densidade cristalina da sílica

Como pode ser visualizado nas Figs. 6.1-6.3a, o aumento na temperatura de tratamento resultou, como se esperava, em um aumento do tamanho dos poros (Hench & West, 1990). Num caso ideal,

considerando-se um material com todos os poros cilíndricos e do mesmo tamanho, a curva obtida por intrusão de mercúrio deveria ser do tipo da ilustrada na Fig.6.4, constituída de uma reta vertical. Nesse caso, o diâmetro médio dos poros seria único, por volume, área ou $4V/D$.

Tab. 6.3 - Dados da Análise de Porosimetria da Sílica Merck

T(°C)	P(atm)	V(cc/g)	A(m ² /g)	d _s (g/cc)	Diâmetro Médio de Poro (Å)		
					(Volume)	(Área)	(4V/A)
TA	-	1,1696	79,80	1,1201	326740	93	586
213	20	1,6244	58,55	2,3207	296965	391	1110
243	35	1,4507	31,26	2,2595	302075	598	1856
265	50	1,4412	28,30	2,2847	319937	562	2037
281	65	1,3402	27,90	2,4099	271455	175	1921
296	80	1,3593	16,34	2,1969	354907	689	3327

T=temp. do tratamento, P=pressão de equilíbrio líquido-vapor, V=volume de intrusão total, A=área superficial total, d_s=densidade cristalina da sílica

Volume
de
Intrusão
Cumulativo



Figura 6.4 - Análise por intrusão de mercúrio de uma amostra com poros uniformes e cilíndricos (ideal).

Comparando-se as curvas obtidas (Figs. 6.1-6.3a) com a ideal, constata-se que a sílica Merck apresenta uma distribuição de poros muito pouco uniforme, não sendo adequada à preparação de uma sílica de porosidade controlada. A sílica Gessy foi a que apresentou uma distribuição mais uniforme de poros e um melhor comportamento em relação à temperatura de tratamento, resultando em curvas bem distintas nas Figs.3 e 3a, com diâmetro médio de poro

entre 168 e 986 Å. No caso da sílica Série I, o comportamento das curvas foi semelhante ao da sílica Gessy, mas os diâmetros de poro obtidos foram maiores (entre 472 e 1289 Å) e o comportamento em relação à temperatura de tratamento não foi tão distinto.

Complementando essas informações, foi feita a imobilização da enzima amiloglicosidase em todas as amostras analisadas, pelo método do glutaraldeído (p. 62), de forma a se relacionar as propriedades dos suportes com a imobilização de enzimas. Os resultados obtidos estão na Tab. 6.4 e detalhados no Anexo V. De acordo com dados da literatura o diâmetro de poro ótimo para se imobilizar esta enzima é de aproximadamente 300 Å (Eaton, 1974). No caso da sílica Merck, as atividades obtidas foram maiores que para as outras duas e na amostra tratada a 213°C, com o menor diâmetro de poro e maior área superficial, a atividade foi maior. Para a sílica Gessy, a maior atividade foi obtida para a sílica tratada a 213°C, com diâmetro de poro de 168 Å. Para a sílica Série I, o máximo de atividade foi observado na amostra tratada a 213°C, com diâmetro médio de poro de 472 Å, sendo a atividade três vezes maior que para a sílica Gessy.

Tab. 6.4 - Atividade de Amiloglicosidase (em U/g) Imobilizada

Temperatura	Série I	Gessy	Merck
TA	163	~ 0	615
213	634	175	712
243	534	138	503
265	480	138	245
281	352	113	285
296	370	99	235

Baseando-se nos resultados apresentados até aqui, descartou-se a possibilidade de se utilizar as sílicas Gessy e Merck, cuja preparação não pode ser controlada; a primeira por apresentar área superficial muito baixa e a segunda devido à distribuição he-

terogênea de tamanhos de poro. Passou-se então a considerar a otimização de uma sílica cujo tratamento hidrotérmico levasse a um produto mais adequado à imobilização de enzimas.

Na tentativa de se estabelecer uma relação entre a temperatura do tratamento hidrotérmico e o diâmetro médio de poro resultante, a melhor correlação encontrada foi entre a pressão de equilíbrio líquido-vapor da água e o tamanho do poro. Como mostrado na Fig.5, esta relação é aproximadamente linear e depende do tipo de sílica tratada.

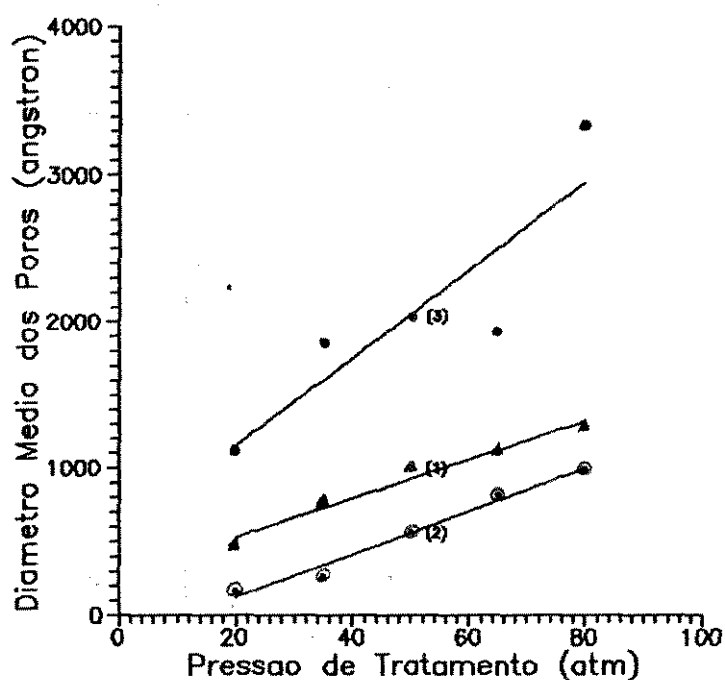


Figura 6.5 - Variação do diâmetro médio de poro em função da pressão do tratamento hidrotérmico. (1) Sílica Série I, média por área; Sílica Gessy, média por área; (3) Sílica Merck, média por 4V/A.

1.2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Baseando-se nos resultados preliminares obtidos, principalmente no fato de que os poros da sílica Série I foram muito grandes e a primeira temperatura de tratamento já resultou na atividade máxima para a enzima amiloglicosidase, preparou-se a sílica Série II, nas condições da Tab.6.6. Diminuiu-se o tempo de gelificação, na tentativa de tornar o método mais rápido e reduzir o tamanho dos poros (Ota, 1987).

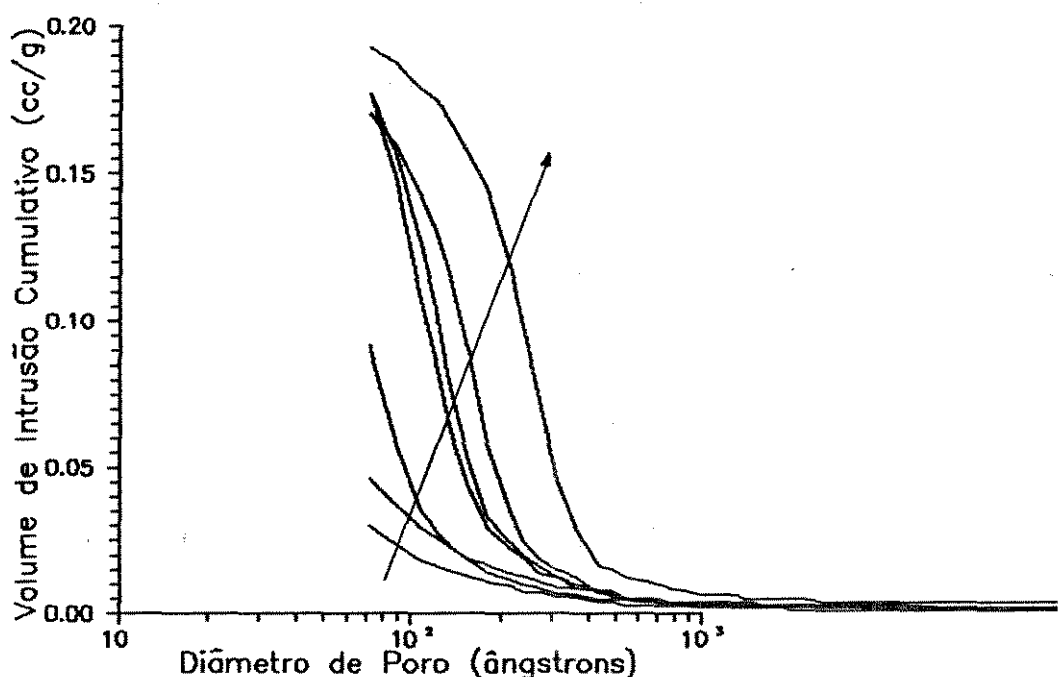


Figura 6.6 - Distribuição do tamanho dos poros em função do volume de intrusão para Sílica Série II tratada nas seguintes temperaturas, no sentido indicado no gráfico: sem tratamento, 180°C, 213°C, 234°C, 251°C, 265°C e 277°C.

Como sumarizado na Fig.6.6 e na Tab.6.5, as novas condições de preparo resultaram na redução do volume de poros para a metade em relação à Série I. O diâmetro médio de poro também diminuiu bastante, para a mesma temperatura de tratamento. O teste de imobilização de amiloglicosidase resultou em atividades muito baixas, não avaliadas com precisão e, por essa razão, não apresentadas.

Tab.6.5- Diâmetro Médio de Poro da Sílica Série II
(pelo volume de intrusão de mercúrio)

T (°C)	P (atm)	D _m (Å)
180	10	-
213	20	99
234	30	119
251	40	129
265	50	158
277	60	240

Tendo-se em vista minimizar o número de amostras para análise por porosimetria de mercúrio e considerando-se que o aumento do tempo de gelificação aumenta o volume e tamanho dos poros, preparou-se uma série de amostras (Tab.6.6) utilizando como parâmetro de controle o volume de poros por intrusão de água (Método 3.3.1).

Preparou-se inicialmente a sílica Série III, em condições similares às da Série I, para confirmação dos resultados. Não querendo estender-se o tempo de preparo da sílica microporosa por períodos superiores a 48 h, como no caso da Série III, passou-se a considerar as temperaturas de gelificação e envelhecimento como novos parâmetros a serem estudados. Dessa forma, fixou-se o tempo de gelificação em 16 h, o tempo necessário para a lavagem foi estimado em 7 h e o tempo de envelhecimento também foi fixado em 16 h.

Pela Tab.6.6, para $T_{gel}=55^{\circ}\text{C}$ e $T_{env}=\text{ambiente}$, o volume de poros subiu para $0,71\text{ cm}^3/\text{g}$. Nas mesmas condições de gelificação, para $T_{env}=55^{\circ}\text{C}$ e 70°C , o volume de poros foi de $0,74$ e $0,85\text{ cm}^3/\text{g}$, respectivamente. Quando T_{gel} e T_{env} passaram de 55°C para 60°C o volume de poros subiu de $0,74$ para $0,78\text{ cm}^3/\text{g}$. Para $T_{env}=80^{\circ}\text{C}$, o aumento de T_{gel} de 65°C para 80°C não resultou em mudança significativa do volume de poros. O aumento de T_{env} para 150°C resultou num acréscimo significativo do volume de poros mas, por

implicar no uso de uma autoclave na etapa precedente ao tratamento hidrotérmico, a prática dessas condições só será considerada no caso de não se chegar a resultados satisfatórios com as outras sílicas.

Tabela 6.6 - Resumo das Condições de Preparação das Sílicas

Amostra	tgel(h)	Tgel(°C)	tlav(h)	tenv(h)	Tenv(°C)	Vpor(cc/g)
Série II	6	TA	24		TA	0,35
Série III	22	TA	24		TA	0,55
---	16	55	7	16	TA	0,71
---					55	0,74
---					70	0,85
Série IV	16	60	7	16	60	0,78
---	16	65	7	16	80	0,93
---	16	80	7	16	80	0,92
---					150	1,25
Série V	16	65	7	16	80	0,94

tgel= tempo de gelificação, Tgel= temperatura de gelificação, tenv= tempo de envelhecimento, Tenv=temper. de envelhecimento, tlav= tempo de lavagem, Vpor=volume de poros (intrusão de água)

Paralelamente à análise da sílica por intrusão de água, o que definiu a aplicabilidade do suporte para imobilização de enzimas e a faixa de temperatura para o tratamento hidrotérmico foram os testes de imobilização com a enzima amiloglicosidase, realizados nas sílicas Série III, IV e V.

Na sílica Série III, com volume de poros de 0,55 cm³/g, como mostrado na Tab.6.7 (dados detalhados no Anexo VI) conseguiu-se imobilizar um máximo de 21,9 mg de proteína por grama de suporte, sendo que a diferença não foi significativa para as sílicas tratadas a 180-234°C. A atividade máxima foi verificada na sílica tratada a 180°C, mas permaneceu praticamente constante em 180-234°C.

No caso da sílica Série IV, com volume de poros de 0,78 cm³/g, a capacidade de imobilização de proteína dobrou em relação

Tab.6.7-Imobilização de Amiloglicosidase na Sílica Série III			
T(°C)	P(atm)	Proteína Imobilizada (mg/g)	Atividade Imobilizada (U/g)
TA	-	0,7	~ 0
152	5	8,9	342
180	10	18,7	562
200	15	21,9	534
213	20	20,5	536
224	25	19,7	489
234	30	19,4	528
243	35	17,4	343
250	40	15,4	325
258	50	13,3	250

à Série III, chegando-se a um valor máximo de imobilização de proteína e atividade em 192-215°C (Tab. 6.8 e Anexo VIII). Um teste feito com uma sílica de porosidade controlada (SPC) da Corning Glass Works revelou uma capacidade de imobilização de proteína igual à da Série IV, embora a atividade observada fosse 30% maior para a primeira (Tab. 6.8, última linha). Essa diferença de atividade pode ser resultante de efeitos difusionais internos na partícula, implicando que partículas maiores resultem numa atividade menor, para a mesma quantidade de enzima imobilizada (Eaton, 1974), pois a SPC tem um diâmetro médio de partícula de 0,46 mm, sendo de 0,60 mm para a sílica Série IV.

Nos testes feitos com a sílica Série V observou-se um aumento da capacidade de imobilização para 60 (mg de Proteína)/g (Fig.6.18), considerado suficiente para se interromper a otimização das condições de preparação do suporte para imobilização de enzimas. As temperaturas para o tratamento hidrotérmico ficaram na faixa de 150-270°C e as análises por porosimetria de mercúrio

desses suportes, considerados como produto final, estão sumarizados nas Figs.6.7-6.9 e na Tab.6.9.

Tab.6.8 - Imobilização de Amiloglicosidase na Sílica Série IV			
T(°C)	P(atm)	Proteína Imobilizada (mg/g)	Atividade Imobilizada (U/g)
TA	-	~ 0	-
130	5	~ 0	-
152	4,95	27,5	210
192	12,94	39,2	676
215	20,79	43,4	663
240	33,05	30,9	561
SPC	-	41,3	890

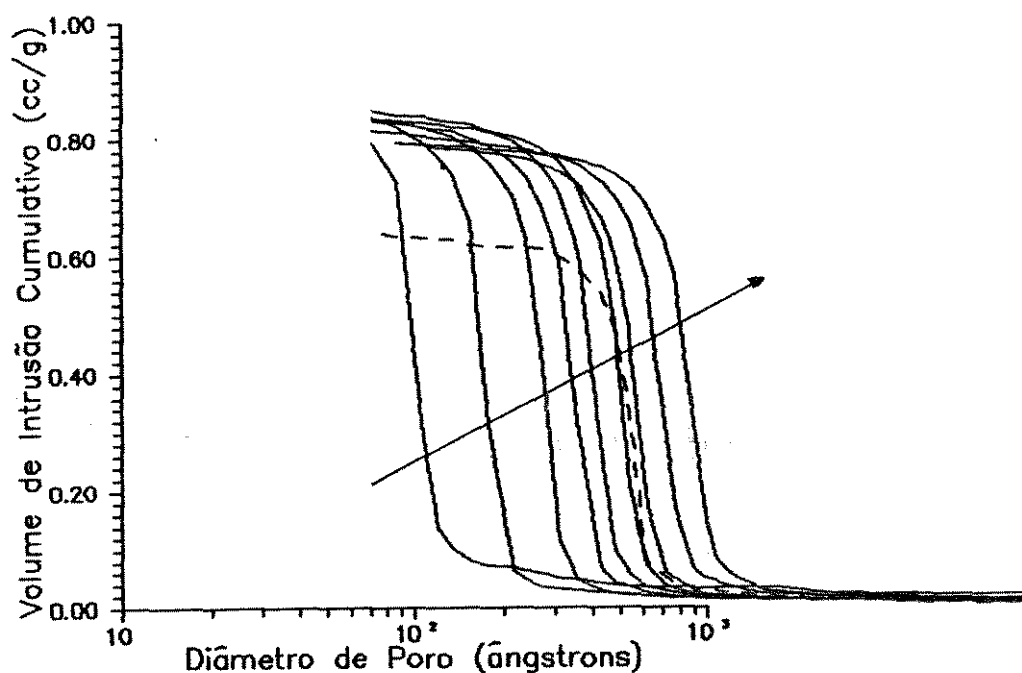


Figura 6.7 - Distribuição do tamanho de poro em função do volume de intrusão para a Sílica Série V tratada nas temperaturas (sentido da seta nas linhas cheias): 151, 181, 203, 215, 225, 236, 245, 255 e 270°C. Linha pontilhada = SPC 500A da Corning.

Para a sílica Série V, observa-se, pelas Figs.6.7 e 6.8, uma curva distinta para cada temperatura do tratamento hidrotérmico, resultado de um aumento gradual no tamanho dos poros em toda a faixa de distribuição. A curva obtida para a SPC, utilizada espe-

cificamente como suporte na imobilização de enzimas, exibe o mesmo tipo de comportamento e confirma a qualidade do suporte preparado.

Nas curvas de distribuição do tamanho de poro em relação à área superficial (Fig.6.9) pode-se constatar a redução da área superficial com o aumento do tamanho dos poros. Outro efeito observado foi uma maior dispersão dos poros nas temperaturas mais altas de tratamento. A curva obtida para a SPC (pontilhada no gráfico) vem mais uma vez confirmar a semelhança com o suporte obtido, nas temperaturas de tratamento entre 236 e 245°C.

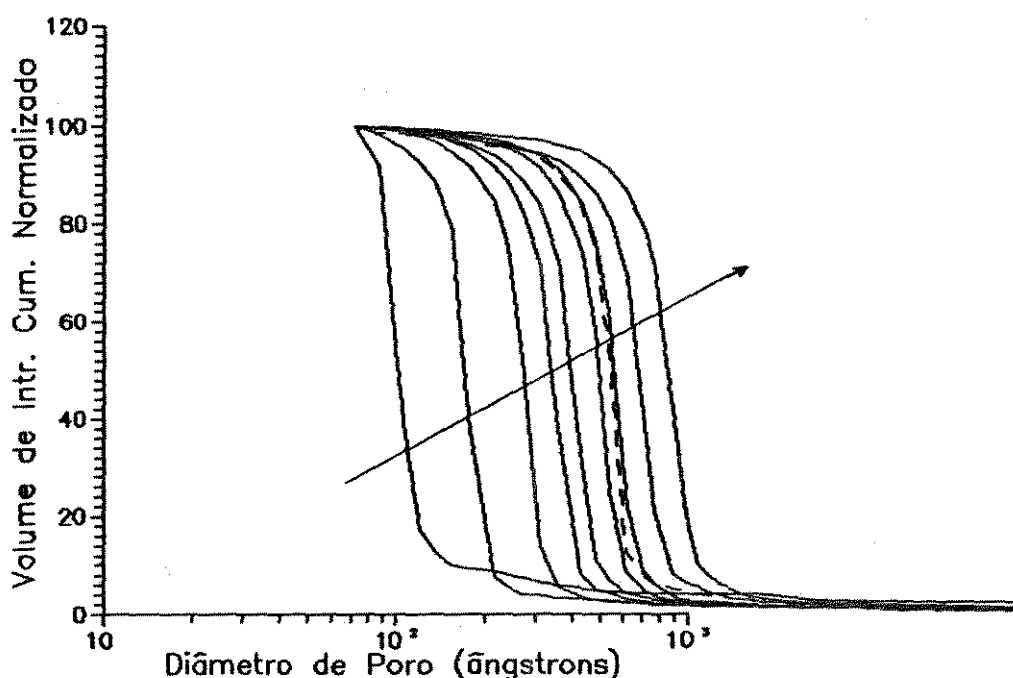


Figura 6.8 - Distribuição do tamanho de poro em função do volume de intrusão normalizado para a Sílica Série V tratada nas temperaturas (sentido da seta nas linhas cheias): 151, 181, 203, 215, 225, 236, 245, 255 e 270°C. Linha pontilhada = SPC 500A da Corning.

Além da caracterização preliminar dos suportes pela medida do volume de poros através do método de intrusão de água e da análise da distribuição de poros por posimetria de intrusão de mercúrio, tentou-se caracterizá-los por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Devido às limitações do aparelho utilizado, não

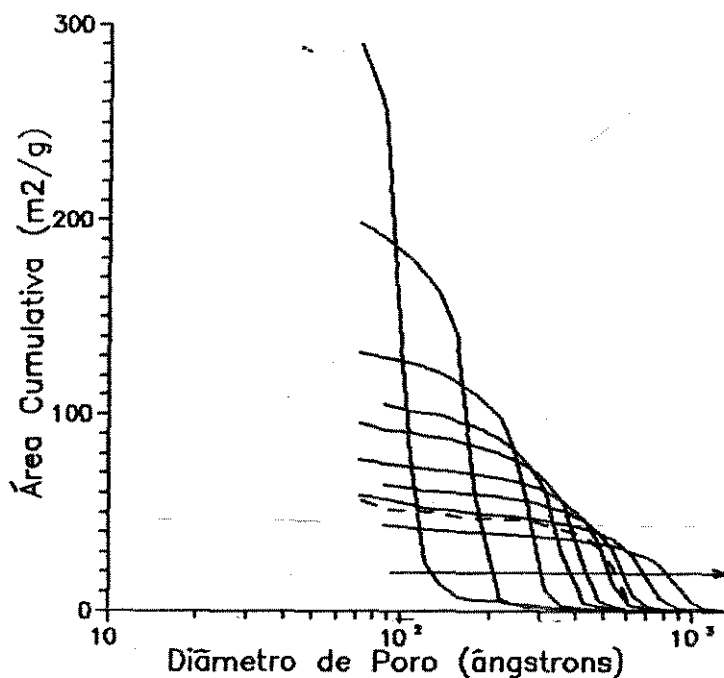


Figura 6.9 - Distribuição do tamanho de poro em função da área superficial para a Sílica Série V tratada nas temperaturas (sentido da seta nas linhas cheias): 151, 181, 203, 215, 225, 236, 245, 255 e 270°C. Linha pontilhada = SPC 500A da Corning.

se conseguiu visualizar a estrutura da maioria das amostras analisadas, pois as dimensões a serem consideradas estão na faixa de 100-1000Å (0,01-0,10 µm). Apenas para a sílica com diâmetro médio de poro de 792 Å foram conseguidos resultados satisfatórios, como mostrado nas Figs.6.10, 6.12 e 6.13.. Na Fig.6.10 está mostrada uma visão geral da superfície da sílica onde, além da superfície porosa relativamente uniforme podem ser verificados alguns pontos que parecem ser macroporos, devido ao contraste da foto. Numa ampliação de um desses pontos, conseguida para uma amostra de sílica de 464 Å e mostrada na Fig.6.11, pode-se confirmar o fato dessa região irregular ser apenas superficial, não se estendendo ao interior da partícula. Na Fig.6.12 está mostrada uma ampliação da região uniforme da superfície, onde já pode ser observada a sua estrutura porosa.

Finalmente, na Fig.6.13, a melhor ampliação que se conseguiu da superfície, pode-se visualizar a estrutura porosa do ma-

terial obtido, formada por um emaranhado de material sólido, formando poros interconectados, numa estrutura parecida com a de uma esponja.

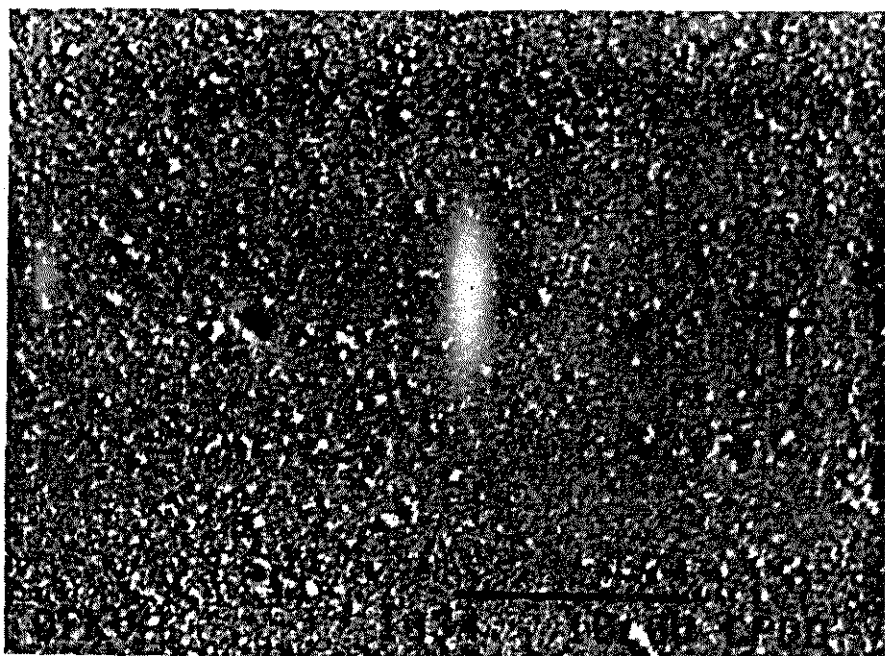


Figura 6.10 - MEV da Sílica Série V, 792 A, tratada a 270°C. Escala: 3 mm = 1 micron

Tabela 6.9 - Dados da Análise de Porosimetria da Sílica Série V

T(°C)	P(ata)	V(cc/g)	A(m ² /g)	d _c (g/cc)	Diâmetro Médio de Poro (Å)		
					(Volume)	(Área)	(4V/A)
TA	-	0,3004	87,13	0,959	131	101	138
151	4,96	0,7937	290,75	1,675	103	100	109
181	10,5	0,8369	198,56	1,716	173	167	169
203	16,9	0,8330	131,94	1,877	273	260	253
215	21,5	0,8308	105,63	1,917	342	324	315
225	26,0	0,8499	95,92	1,719	399	375	354
236	31,8	0,8362	77,12	1,886	495	464	434
245	37,2	0,7951	64,64	1,965	560	526	492
255	44,1	0,8161	58,43	2,005	679	619	559
270	56,1	0,7962	43,65	1,776	855	792	730
SPC	--	0,6431	56,49	1,171	543	502	455

T=temp. do tratamento, P=pressão de equilíbrio líquido-vapor, V=volume de intrusão total, A=área superficial total, d_c=densidade cristalina da sílica

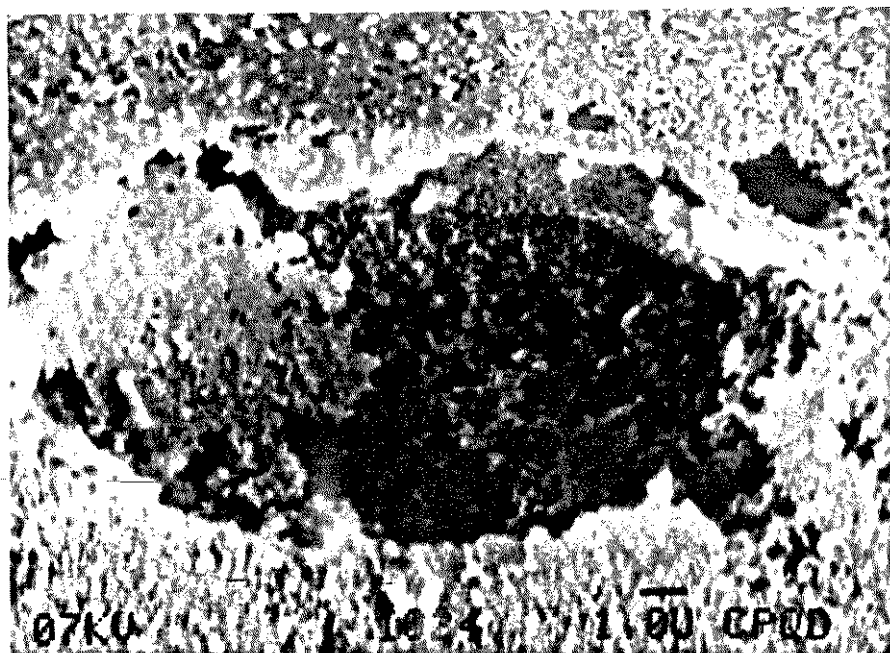


Figura 6.11 - MEV de uma região irregular da Sílica Série V, 464 A, tratada a 236°C. Escala: 5 mm = 1 micron.

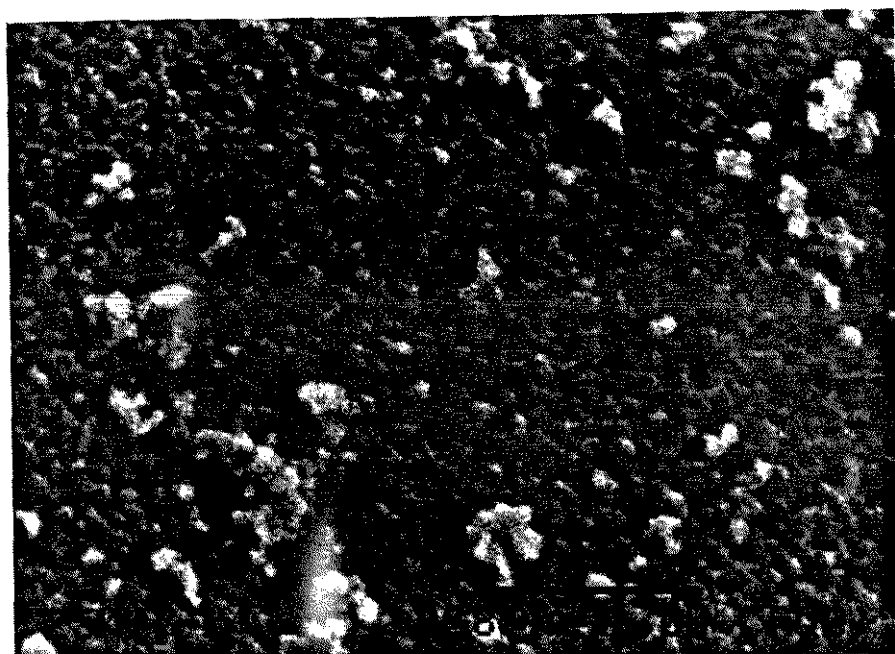


Figura 6.12 - MEV da Sílica Série V, 792 A, tratada a 270°C. Escala: 30 mm = 1 micron. As regiões mais claras são devido à irregularidades na metalização da amostra para a micrografia.

Comparando-se a micrografia da sílica apresentada na Fig.6.13 com a do vidro de porosidade controlada da Fig.6.14 (Haller, 1965), pode-se constatar que o tipo de estrutura dos su-

portes é o mesmo quanto ao formato e distribuição dos poros. Embora na micrografia da Fig.6.14 apenas a superfície do suporte tenha sido tratada para dar contraste, a remoção completa da fase alcalina deve levar à mesma estrutura da sílica obtida.

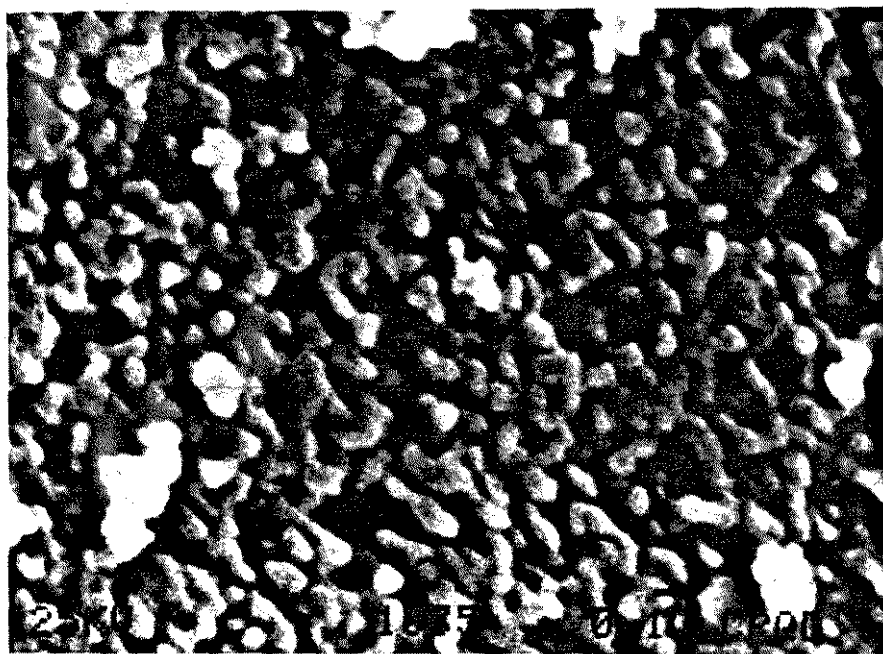


Figura 6.13 - MEV da Sílica Série V, 792 Å, tratada a 270°C. Escala: 50 mm = 1 micron.



Figura 6.14 - Eletromicrografia do rearranjo de microfases no processo de obtenção do vidro de porosidade controlada. A fase solúvel foi removida apenas o suficiente para dar contraste (Haller, 1965).

Em um trabalho recente, Nakanishi & Soga (1992) estudaram a separação de fases num sistema sol-gel de sílica contendo ácido poliacrílico. Embora no caso o gel fosse preparado a partir da hidrólise de tetraetóxi- ou tetrametóxi- silano, sendo os diâmetros médios de poro obtidos na faixa da 10^4 - 10^5 Å, a morfologia dos géis preparados, com poros interconectados, é similar à das sílicas produzidas por tratamento hidrotérmico, como pode ser observado comparando-se a Fig.6.14a com a Fig.6.13.

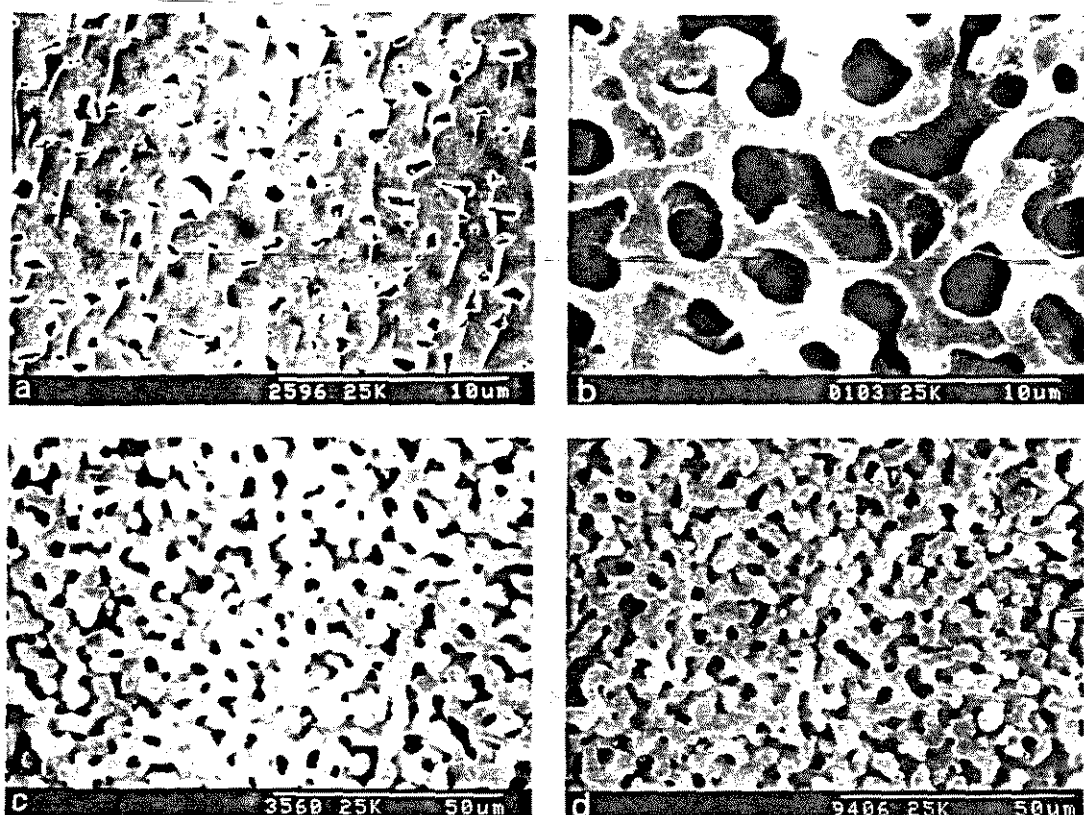


Figura 6.14a - MEV das morfologias dos géis preparados por Nakanishi & Soga (1992), variando-se a concentração de ácido poliacrílico.

Pelos dados plotados na Fig.6.15, foi confirmada a relação linear entre a pressão do tratamento hidrotérmico (considerada como sendo a pressão do vapor d'água em equilíbrio na temperatura do tratamento) e o diâmetro médio de poros da sílica. De acordo com esses resultados, uma vez padronizadas as condições de preparo da sílica microporosa e estabelecida uma curva do tipo da Fig.6.15, pode-se obter suportes silícicos com uma distribuição de poros relativamente estreita e com o diâmetro médio de poro dese-

jado, pela seleção da temperatura do tratamento hidrotérmico; sendo esse o objetivo do trabalho proposto.

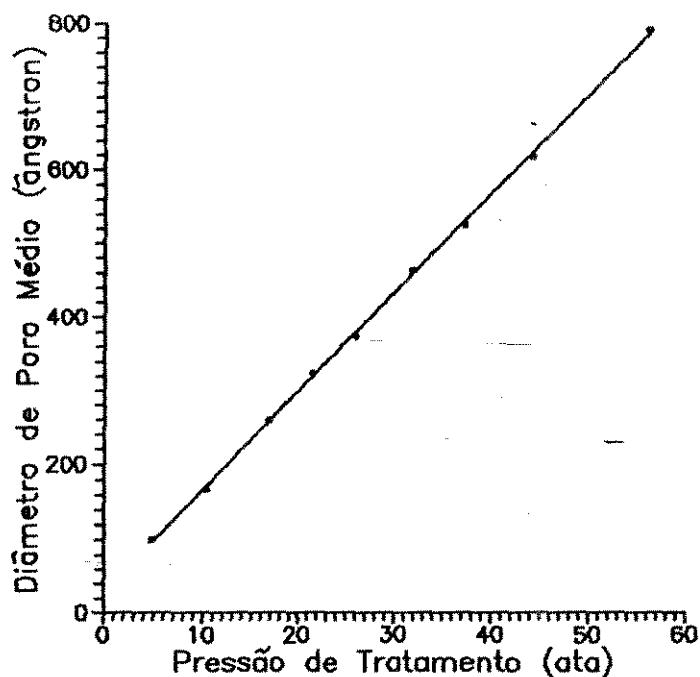


Figura 6.15 - Efeito da pressão do tratamento hidrotérmico no diâmetro médio de poros (pôr área superficial) da Sílica Série V.

2 - IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Os suportes produzidos pelo tratamento hidrotérmico da sílica Série V, cuja análise porosimétrica foi mostrada nas Figs. 6.7-6.9 e na Tab.6.9, foram utilizados na imobilização de cinco enzimas com pesos moleculares distintos: Horseradish peroxidase (HRP) (PM = 40.000 (Maehly, 1955), amiloglicosidase (PM = 82.000 (Zanin, 1989)), glicose oxidase (PM = 150.000-180.000 (Bouin et al, 1976)), invertase (PM = 270.000 (Gascon et al., 1967)) e lactase (PM = 201.000 (Gekas & Lopez-Leiva, 1985)), além da albumina de soro bovino (PM = 66.000 (Sigma, 1992)).

2.1. IMOBILIZAÇÃO DE HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)

A enzima HRP foi imobilizada à sílica arilaminada através da ativação via sal de diazônio, como descrito no Método 6.2, com base em referências que utilizaram esse método para essa enzima (Olsson, 1985; Olsson et al., 1983).

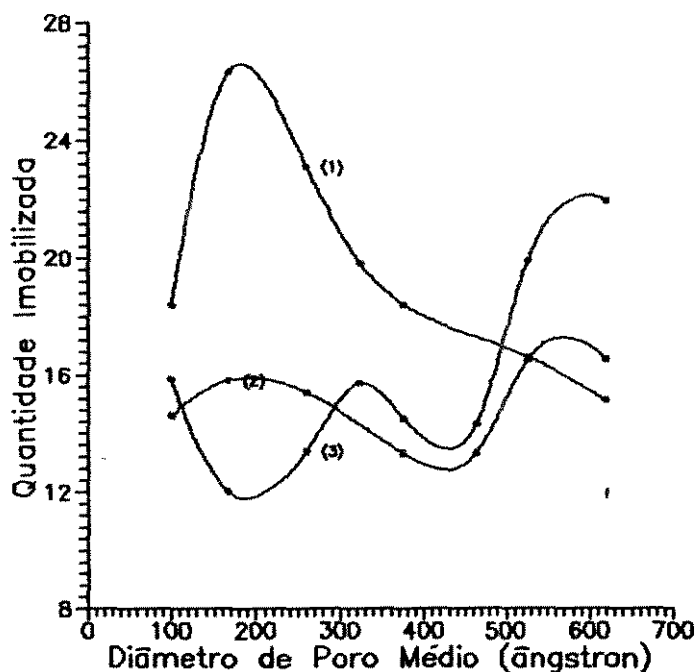


Figura 6.16 - (1) Proteína (mg/g de sup.), (2) Atividade (U/g de sup.) e (3) Atividade específica (U/10 mg de prot.) imobilizadas em função do diâmetro médio de poro para a enzima HRP.

O máximo de proteína foi imobilizado no suporte com diâmetro médio de poro de 200 Å (Fig.6.16). Quanto à atividade, observou-se dois pontos máximos, um coincidente com o de proteína e outro em 526-619 Å. Durante a determinação da atividade imobilizada, observou-se que o produto colorido formado aderiu-se ao suporte contendo a enzima logo que era colocado em contato com o meio reacional. Considerando-se que haja um bloqueio parcial dos poros, causado pela presença do produto aderido à superfície, seu efeito será menor para poros maiores, podendo resultar no segundo máximo de atividade, embora a quantidade de proteína imobilizada seja menor.

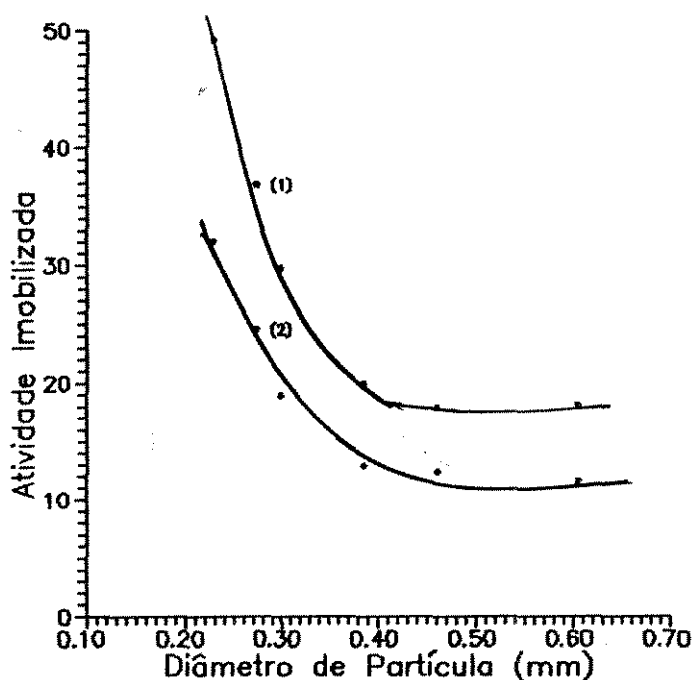


Figura 6.17 - (1)Atividade (U/g de sup.) e (2)Atividade específica (U/10 mg de prot.) da HRP Imobilizada em Função do - Tamanho de Partícula, para a sílica 167 Å.

Em termos de atividade específica, o valor máximo foi obtido para a sílica de 560 Å (Fig.6.16), coincidente com o segundo pico de atividade máxima total, indicando que para esse tamanho de poro há um maior aproveitamento da enzima imobilizada.

O efeito do tamanho da partícula do suporte na atividade

pode ser observado na Fig.6.17. Para partículas menores que 0,35 mm há uma grande variação na atividade, enquanto que para partículas maiores não há praticamente variação da atividade. Esse tipo de comportamento sugere que nas partículas maiores a atividade esteja totalmente limitada pelas taxas de difusão no interior do poro, enquanto nas menores a atividade está apenas parcialmente limitada, devido às menores resistências difusionais.

Tabela 6.10 - Atividades da Enzima HRP Imobilizada						
Suporte	Método de Imobilização	A.E.L. (U/mg)	Pr.Im. (mg/g)	A.E.Máx. (U/mg)	A.T.Máx. Im. (U/g)	Referência
copolímero (estireno divinilbenzeno)	covalente (glut.)	--	5,75	13,7	79	Wójcik et al. (1990)
copolímero (metilmetacrilato)		--	7,79	77,8	600	
silica gel		--	5,73	279,2	1600	
agarose	copolímer.	100	16,2	40	650	D'Angiuro et al. (1987)
polímero (metacrilato)	adsorção	--	10,5	0,95	10	Fiedurek et al. (1986)
sepharose	copolímer.	50	6,00	20	125	D'Angiuro et al. (1985) Cremonesi & D'Angiuro (1983)
		50	--	--	125	
copolímeros (glicidil metacrilato)	copolímer.	50	5-13	5,7-2,6	26-34	D'Angiuro et al. (1980)
poli(ácido 4-metacriloxibenzoico)	covalente (acilação)	900	--	175		Bartling et al. (1975)
		138	--	--	220	Bartling et al. (1974)
silica 167A, 0,23 mm	cov.(díazot)	499	15,3	3,21	49,2	Este

Como pode ser observado na Tab.6.10, no caso da HRP, os resultados da imobilização em sílica são inferiores aos encontrados na literatura, embora todos os dados comparativos utilizassem polímeros como suporte. Os dados obtidos para a HRP permitiram avaliar a imobilização principalmente em termos de proteína em função do tamanho de poro, não se aconselhando a utilização de sílica, pelo menos via sal de diazônio, para a imobilização dessa enzima.

2.2 - IMOBILIZAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE

A enzima amiloglicosidase foi imobilizada via glutaraldeído, como descrito no Método 6.1.

No caso da amiloglicosidase, o máximo de proteína imobilizada ficou na faixa de 260-324 Å, sendo que atividade máxima foi para o suporte de 324 Å (Fig.6.18). Esses valores encontrados estão próximos ao de 300 Å citado na literatura (Eaton, 1974).

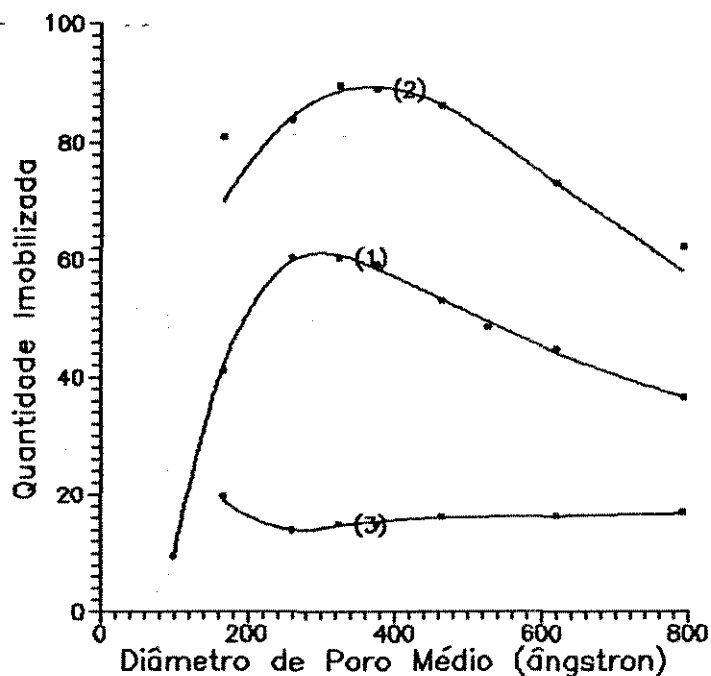


Figura 6.18 - (1) Proteína (mg/g de sup.), (2) Atividade (U/100mg de sup.) e (3) Atividade específica (U/mg de prot.) imobilizada em função do diâmetro médio de poro para a enzima amiloglicosidase.

Pela Fig.6.19 pode-se notar um grande aumento da atividade total e específica à medida que se diminui o tamanho da partícula. Esse aumento é justificado pela redução nas resistências à difusão interna na partícula à medida que o tamanho da partícula diminui, efeito este que será observado para o restante das enzimas estudadas.

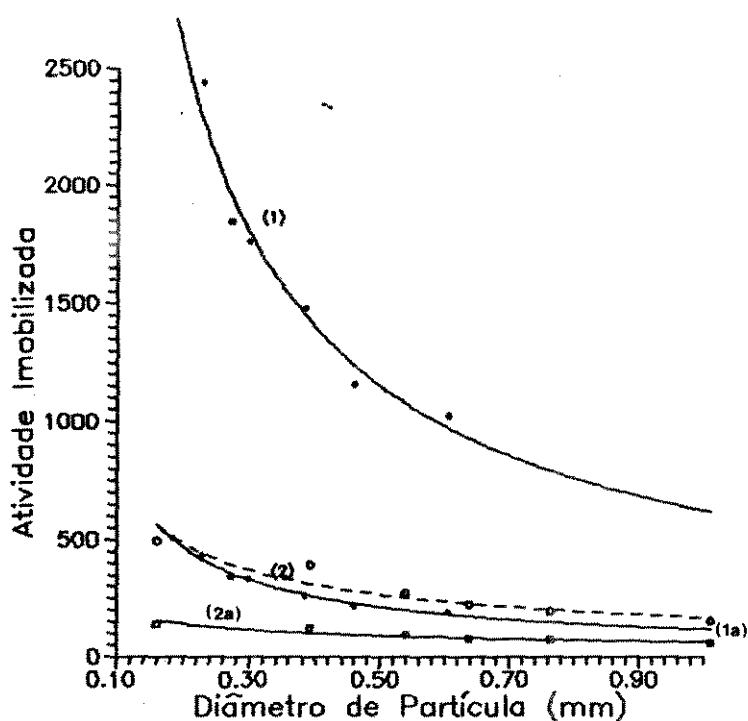


Figura 6.19 - (1)Atividade (U/g de sup.) e (2)Atividade específica (U/10 mg de prot.) da Amiloglicosidase Imobilizada em Função do Tamanho de Partícula, sílica 324A. (1a)Atividade (U/10 g de sup.) e (2a)Atividade específica (U/100 mg de prot.) imobilizadas em carvão ativado segundo Bailey & Cho (1983)

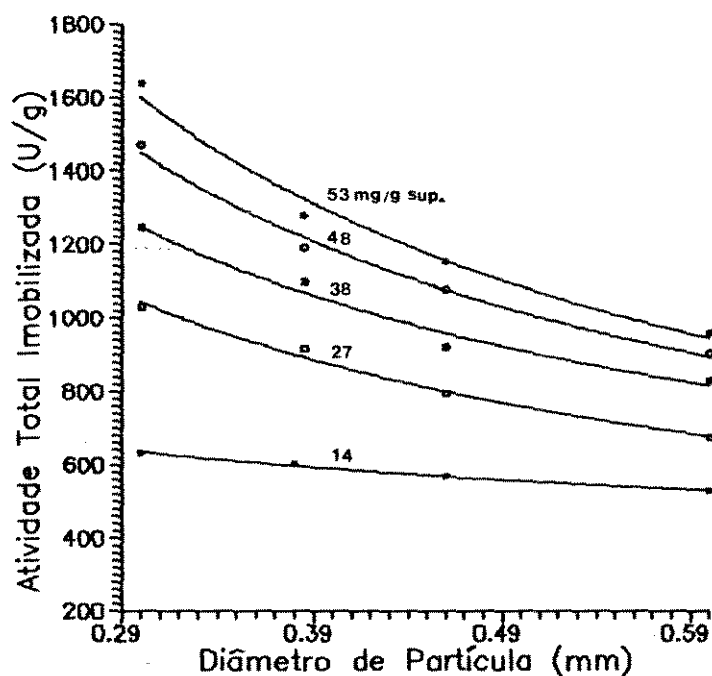


Figura 6.20 - Atividade total da amiloglicosidase imobilizada em função da quantidade de proteína e do tamanho de partícula.

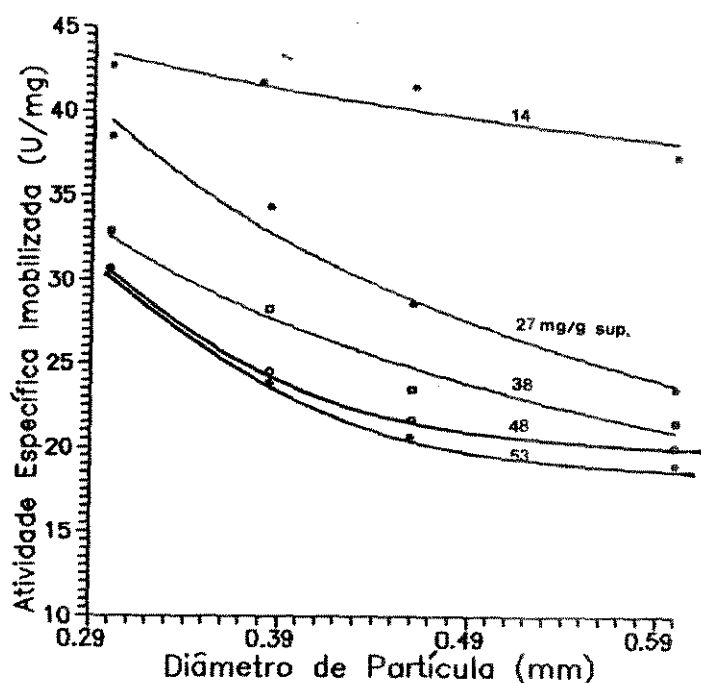


Figura 6.20a- Atividade específica da amiloglicosidase imobilizada em função da quantidade de proteína e o tamanho de partícula

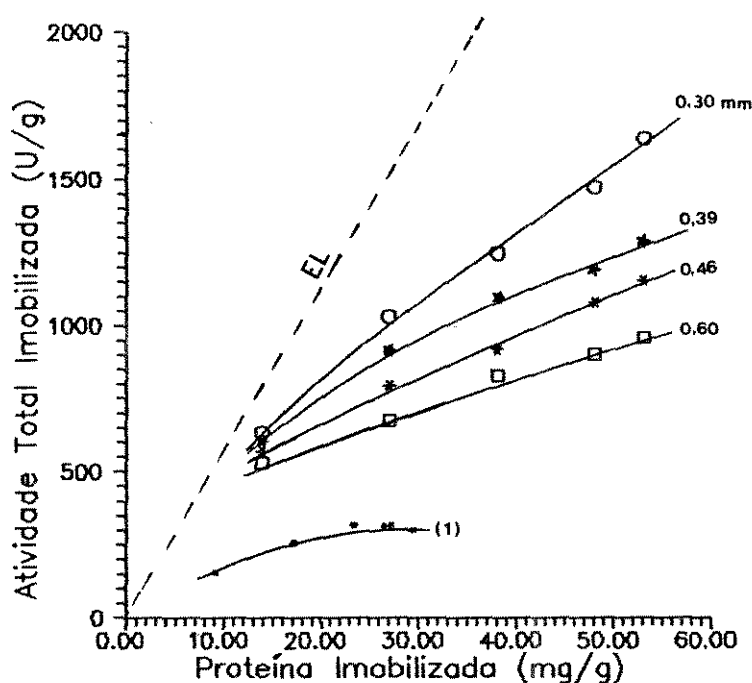


Figura 6.21 - Atividade total da amiloglicosidase imobilizada em função da quantidade de proteína e do tamanho de partícula. (1) Dados segundo Bailey & Cho (1983)

Comparando-se os resultados obtidos com os da literatura (Tab.6.11) observa-se que eles estão sensivelmente melhores, tanto para partículas pequenas (0,23 mm), como para as maiores (0,605

mm). Os resultados também foram melhores que os obtidos com a sílica de porosidade controlada da Corning Glass Works. O único resultado aparentemente melhor encontrado (Weetall *et al.*, 1976) é, na realidade equivalente ao deste trabalho, pois os ensaios de atividade, no caso, são realizados a 60°C, e não a 45°C. Segundo a literatura (Zanin, 1989), o aumento de temperatura de 45°C para 60°C deve acarretar num aumento de atividade de 150% para a enzima livre. A atividade do preparado imobilizado obtido, com o mesmo tamanho de partícula (0,46 mm, 1161 U/g), levando-se em conta a correção por esse fator, deveria estar por volta de 2900 U/g, resultado praticamente igual ao valor máximo apresentado por Weetall *et al.* (1976).

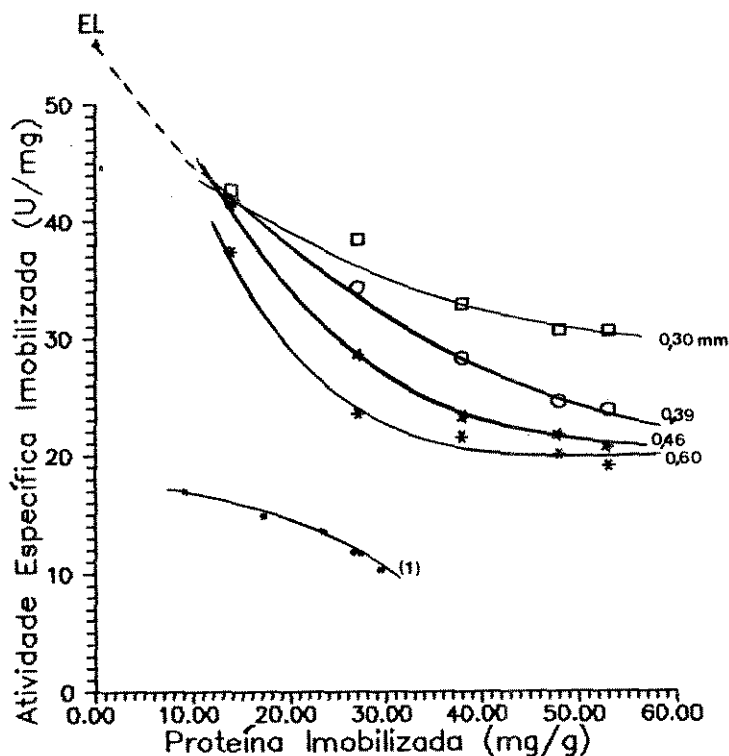


Figura 6.21a- Atividade específica da amiloglicosidase imobilizada em função da quantidade de proteína e o tamanho de partícula. (1) Dados segundo Bailey & Cho (1983)

Com o objetivo de se avaliar melhor os efeitos da imobilização sobre a atividade foram realizados, com a amiloglicosidase, testes variando-se tanto o tamanho de partícula quanto a quantidade de proteína imobilizada.

Nas Figs. 6.20 e 6.20a estão apresentados os dados da a-

tividade total e específica, em função do tamanho de partícula, para várias quantidades de amiloglicosidase imobilizada. Para quantidades menores imobilizadas, há uma redução da atividade total e um aumento da atividade específica. Nessas condições, não há influência significativa do tamanho de partícula sobre a atividade. Quando se aumenta a quantidade imobilizada, a atividade total aumenta e a específica diminui, sendo agora mais significativa a redução da atividade com o aumento do tamanho de partícula.

Os mesmos dados estão apresentados nas Figs. 6.21 e 6.21a. Pela Fig. 6.21 pode-se observar que a atividade específica imobilizada tende à da enzima livre (representada pela reta pontilhada EL) quando a proteína imobilizada diminui, para todos os tamanhos de partícula, ou quando a partícula diminui. Esse fato é confirmado pela tendência das curvas à atividade da enzima livre, representada pelo ponto EL na Fig. 6.21a. Os dados obtidos por Bailey & Cho (1983), para um único tamanho de partícula, apresentam essa mesma tendência.

A explicação para o comportamento dessas curvas é que a atividade da amiloglicosidase imobilizada depende quase que exclusivamente das resistências à difusão do substrato no interior do poro, sendo pouco afetada pelo processo de ligação à sílica, já que para partículas e/ou quantidades de proteína pequenas, a atividade tende à da enzima livre. O que ocorre é que quando o tamanho da partícula é reduzido, a distância que o substrato tem que percorrer no interior do poro também o é; quando a proteína imobilizada é reduzida, o processo de imobilização ocorre apenas numa "casca" externa da partícula (enzima ocupa os poros de fora para dentro), ocasionando também uma redução da distância que o substrato tem que percorrer. Essa redução acarreta uma minimização das resistências difusionais e, conseqüentemente, um aumento da atividade específica da enzima imobilizada.

2.3 - IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE

A glicose oxidase foi imobilizada via glutaraldeído, segundo o Método 6.1. A curva de imobilização de proteína para a glicose oxidase não apresentou um máximo distinto, ficando na faixa de 464-619 Å (Fig.6.22). A curva de atividade, por outro lado, apresentou um máximo distinto em 375 Å. Segundo dado da literatura, a atividade máxima para a glicose oxidase foi obtida em 420 Å (Messing, 1978), valor concordante com o da curva (2) na Fig.6.22.

Tabela 6.11 - Atividade da Enzima Amiloglicosidase Imobilizada

Suporte	Método de Imobilização	A.E.L. (U/mg)	Pr.Im. (mg/g)	A.E.Máx. (U/mg)	A.T.Máx. Im.(U/g)	Referência
copolímero (estireno divinilbenzeno)	covalente (glut.)	--	0,482	1,59	0,767	Wójcik et al. (1990)
copolímero (metilmetacrilato)		--	2,09	2,31	4,83	
silica gel		--	2,09	3,31	6,91	
resina (troca iônica fracamente básica)	lig. iônica lig. cov.	2,46 2,46	284,1 217,2	2,32 2,37	659 515	Maxim et al. (1988)
silica gel	cov. (BCl ₃)	--	8,2	2,06	16,9	Wójcik et al. (1987)
vidro poroso	covalente	25,76	105	3,50	367	Toldrá et al. (1986)
polímero (metacrilato)	adsorção	--	12,8	0,45	5,78	Fiedurek et al. (1986)
vidro poroso	quelção	60	--	--	98	Cabral et al. (1984)
carvão ativado sepharose 4B	adsorção cov.(CNBr)	-- --	6,89 5,6	2,41 6,96	16,6 39,0	Dennis et al. (1984)
vidro poroso	covalente (glutar.)	40,5 115,0	3,7 3,1	11,29 69,00	41,8 288,9	Lobarzewski & Paszcynski (1983)
vidro poroso 760A	quelção	2,15	34	35,3(?)	1200(?)	Kivesitadze & Dvali (1982)
carvão ativado	adsorção	3,70	9-29	1,7-1	16-30	Bailey & Cho (1983)
sepharose-CMB	cov. (CNBr)	20	4	12,25	49	Katwa & Rao (1983)
silica 400A, 0,43 mm	cov. (glut.)	60	112	26,8	3000	Weetall et al. (1976)
silica 324A, 0,23 mm	covalente glutaraldeído	67,6	56,3	43,3	2441	Este
324A, 0,46 mm		67,6	52,7	22,0	1161	
324A 0,60 mm		67,6	54,0	19,0	1024	
500A 0,46 mm		55,3	42,4	21,3	903	

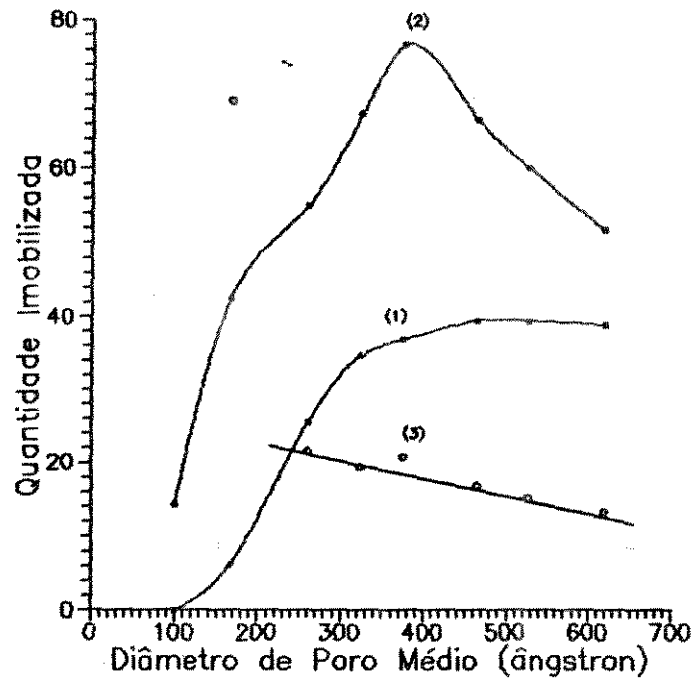


Figura 6.22 - (1) Proteína (mg/g de sup.), (2) Atividade (U/g de sup.) e (3) Atividade específica (U/mg de prot.) imobilizadas em função do diâmetro médio de poro para a enzima glicose oxidase.

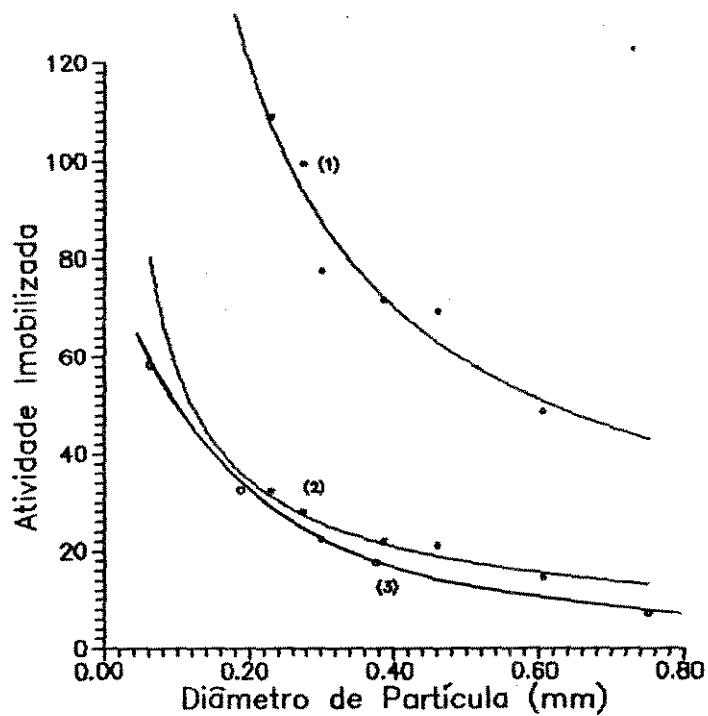


Figura 6.23 - (1) Atividade (U/g de sup.) e (2) Atividade específica (U/10 mg de prot.) da GOx imobilizada em função do tamanho de partícula. (3) Atividade (U/g de suporte) por (Markey et al., 1975).

O comportamento da curva de atividade em função do tamanho de partícula (Fig.6.23) foi semelhante ao da enzima amiloglicosidase (Fig.6.19).

Comparando-se a atividade obtida com dados da literatura (Tab.6.12), verifica-se que os resultados obtidos são equivalentes aos melhores encontrados.

Tabela 6.12 - Atividades da Enzima 60x Imobilizada						
Suporte	Método de Imobilização	A.E.L. (U/mg)	Pr.Im. (mg/g)	A.E.Máx. (U/mg)	A.T.Máx. Im. (U/g)	Referência
nylon-6,6 (membrana)	cov.(glut.)	66,7	14,1	35,9	507	da Silva et al. (1991)
hidrogel de sílica	aprisionam.	--	--	--	112,8	Kojuharova et al. (1988)
concanavalin A - sepharose	quelação	--	--	--	1200	Iqbal & Saleemuddin (1983)
vidro não poroso	cov. (glut.)	--	--	--	0,5	Malikkides & Weiland (1982)
copolímero de glicidil metacrilato	copolimer.	14	19-43	6,6-2,4	125-101	D'Angiuro et al. (1980)
vidro revestido com polietilenoimina	adsorção + glut.	--	--	--	35,3	Wasserman et al. (1980)
paredes celulares	n especific.	--	--	--	110	Richter & Heinecker (1979)
carvão ativado	adsorção	16,5	6,5-43	1,4-0,38	9-16,3	Bailey & Cho (1983)
		15,5	--	--	9,1	Cho & Bailey, 1978
		--	30	0,66	19,7	Dennis et al. (1984)
micélios	cov.(glut.)	0,11	--	--	11,0	Karube et al. (1977)
silica-alumina	cov.(glut.)	--	--	--	58,3	Markey et al. (1975)
silica 375A, 0,60 mm 375A, 0,23 mm	cov.(glut.)	80,2	33,3 33,5	2,12 3,25	48,7 109	Este

2.4.IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE

A invertase foi imobilizada via glutaraldeído, segundo o Método 6.1.

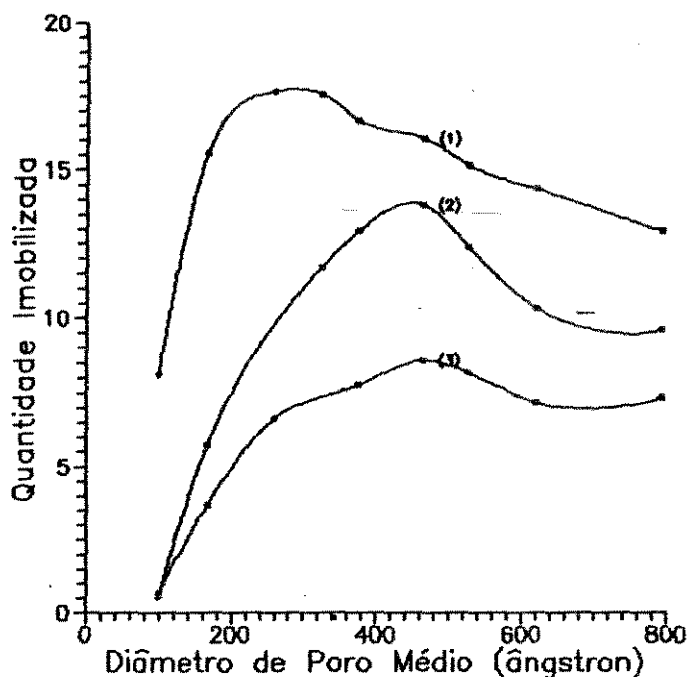


Figura 6.24 - (1)Proteína (mg/g de sup.), (2)Atividade (U/10mg de sup.) e (3)Atividade específica (U/0,1mg de prot) imobilizadas em função do diâmetro médio de poro para a enzima invertase.

O máximo de proteína imobilizada para a invertase ocorreu em 260-324 Å, embora o pico de atividade estivesse em 464 Å. A explicação para esta grande diferença pode ser a presença de impurezas protéicas no preparado enzimático, com pesos moleculares menores que da própria enzima. Esta justificativa se baseia no fato de que a invertase utilizada apresentava inclusive material insolúvel, tendo-se que extrair a parte solúvel por filtração ou centrifugação e utilizar o sobrenadante na imobilização.

O comportamento da curva de atividade em função do tamanho de partícula (Fig.6.25) também foi semelhante ao das enzimas anteriores (Figs. 6.19 e 6.23).

As atividades totais obtidas para a invertase imobilizada na sílica 464A foram superiores aos dados encontrados na literatura, como mostrado na Tab.6.13. A grande diferença entre as atividades das enzimas livres devem-se ao fato de serem expressas em função da quantidade de proteína ou de enzima sólida, o que às vezes não é deixado claro nos trabalhos consultados. Como o teor de proteína dessa enzima é normalmente baixo (50% para invertase pura), os valores expressos em U/mg de proteína são bem mais altos que os dados em U/mg de sólido. Independentemente dessa observação, o valor da atividade imobilizada, em U/g de suporte, pode ser utilizado para comparação dos resultados.

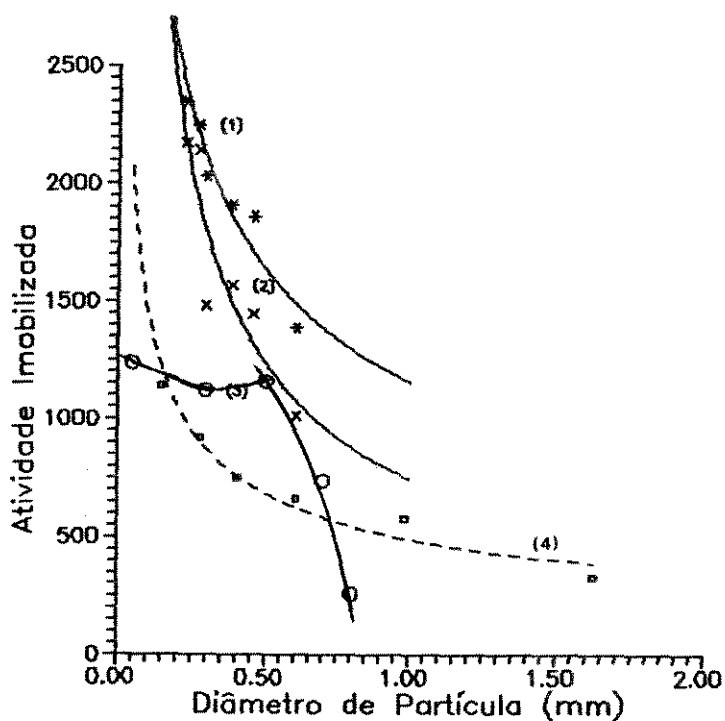


Figura 6.25 - (1)Atividade (U/g de sup.) e (2)Atividade específica (U/10 mg de prot.) da invertase imobilizada em função do tamanho de partícula. Atividade total imobilizada (U/g de sup.) por (3)Mansfeld & Schellenberger (1987) e por (4)Hasal et al. (1992).

Tabela 6.13 - Atividades da Enzima Invertase Imobilizada

Suporte	Método de Imobilização	A.E.L. (U/mg)	Pr.Im. (mg/g)	A.E.Máx. (U/mg)	A.T.Máx. Im. (U/g)	Referência
DEAE-celulose	lig. iônica	--	--	--	106	Abdellah et al. (1992)
células	cov.(glut.)	20-26*	--	--	1440	Hasal et al. (1992)
silica em níquel	cov.(glut.)	4300	0,2	2350	469	Goetz et al. (1991)
--	encapsulação	180	--	36	--	Mansfeld et al. (1991)
algodão-polietileno imina	adsorção + glut.	400 / sólido	--	160 / sólido	--	Godbole et al. (1990)
trocadores de ions básicos (fracos)	iônica	7,25	204	6,17	1367	Maxim et al. (1988)
	covalente	7,25	199	6,13	1220	
poliestireno	covalente	300	6,9	191	1321	Mansfeld & Schellenberger (1987)
tubo de nylon	cov. (glut.)	185	--	87	--	Onyezili (1987)
gelatina	aprision.	122	0,2/ml	48-73	10-15/ml	De Alteriis et al. (1985)
metacrilato de glicidila copolímero (estireno divinilbenzeno celulose	covalente	61,8	--	--	5,55	Marek et al. (1984)
	covalente	61,8	--	--	5,56 (3330/g)	
	covalente	61,8	--	--	3,42	
amberlite IRA-93	adsorção	--	26	--	707	Annesini et al. (1983)
concanavalin A sepharose	quelação	--	--	--	420	Ikbali & Saleemuddin (1983)
sílica 464A, 0,60 mm 464A, 0,23 mm	covalente (glut.)	2837	13,7	101	1387	Este
		2837	13,7	218	2348	

* U/mg de células

2.5 - IMOBILIZAÇÃO DE LACTASE

A lactase foi imobilizada via glutaraldeído, segundo o Método 6.1.

Para a lactase, o máximo de proteína imobilizada ocorreu em 526 Å, embora a quantidade fosse praticamente constante em 464-619 Å (Fig.6.26). O pico de atividade ocorreu em 464Å.

A curva de atividade em função do tamanho de partícula (Fig.6.27) foi semelhante à obtida para as outras enzimas (Figs. 6.19, 6.23 e 6.25).

A comparação da atividade imobilizada com dados da literatura mostra que os resultados são melhores que os publicados, embora utilizando outros tipos de suporte (Tab.6.14).

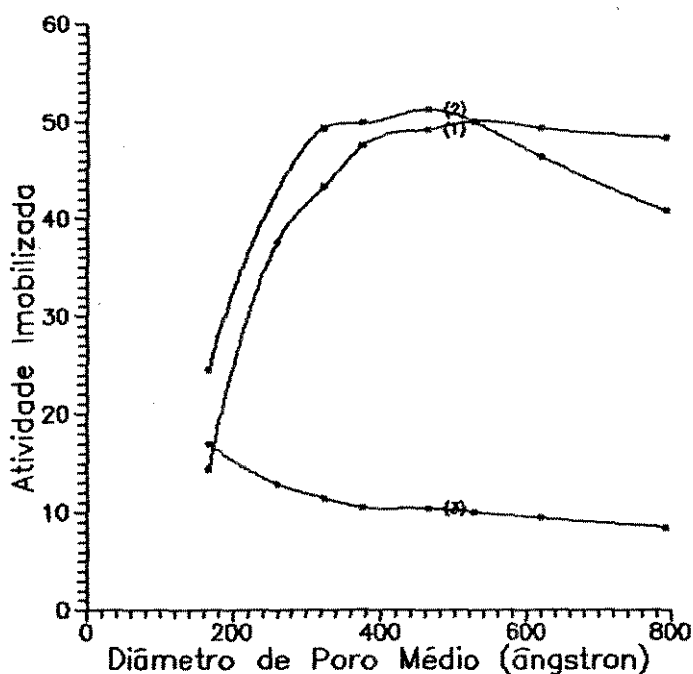


Figura 6.26 - (1)Proteína (mg/g de sup.), (2)Atividade (U/100mg de sup.) (3)Atividade específica (U/mg de prot.) imobilizada em função do diâmetro médio de poro para a enzima lactase.

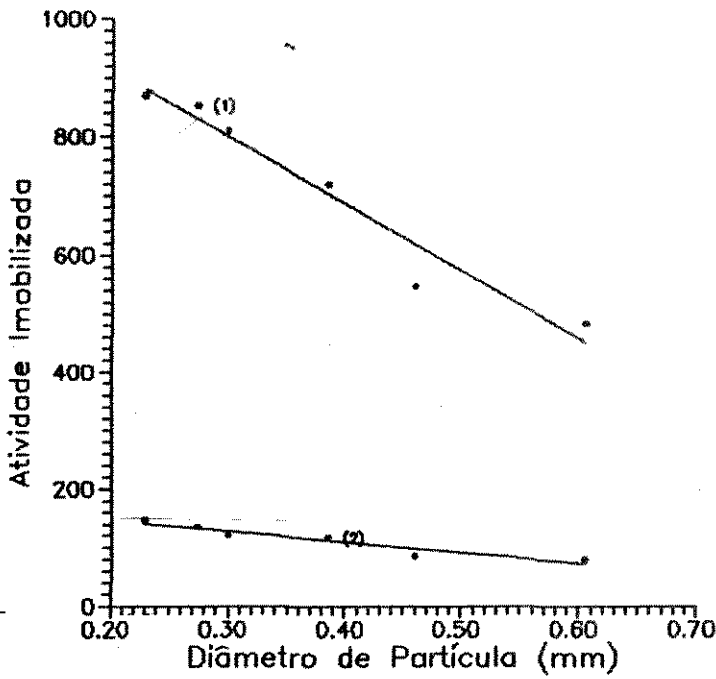


Figura 6.27 - (1)Atividade (U/g de sup.) e (2) Atividade específica (U/10 mg de prot.) da lactase imobilizada em função do tamanho de partícula, sílica 464A.

Tabela 6.14 - Atividades da Enzima Lactase Imobilizada						
Suporte	Método de I-mobilização	A.E.L. (U/mg)	Pr.Im. (mg/g)	A.E.Máx. (U/mg)	A.T.Máx. Im.(U/g)	Referência
cerâmica porosa CP6	covalente (glut.)	161 ONPG*	8,5 45,5	91,8 64,4	780 2930	Suzuki et al. (1991)
"albumina"	agrg.(glut.)	--	--	64% E.L.	--	Khare & Gupta (1990)
silicico	cov.(glut.)	--	--	--	86	Sorensen & Emborg (1989)
copolímero (álcool vinílico)	covalente	1140	0,2/ml	236	51,2/ml	Narinesingh et al. (1988)
silica 350 A	cov.(glut.)	--	--	--	400-500	Baret (1987)
vidro poroso	cov.(glut.)	3,5	100	0,89	89	Wierzbicki et al. (1974)
silica 464A, 0,60 mm	covalente	46	60,7	8	483	Este
464A, 0,23 mm	(glut.)	46	59,6	14,7	870	

* o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (atividade 5-6 vezes maior que com lactose)

2.6 - IMOBILIZAÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO

A albumina foi imobilizada via glutaraldeído, segundo o Método 6.1.

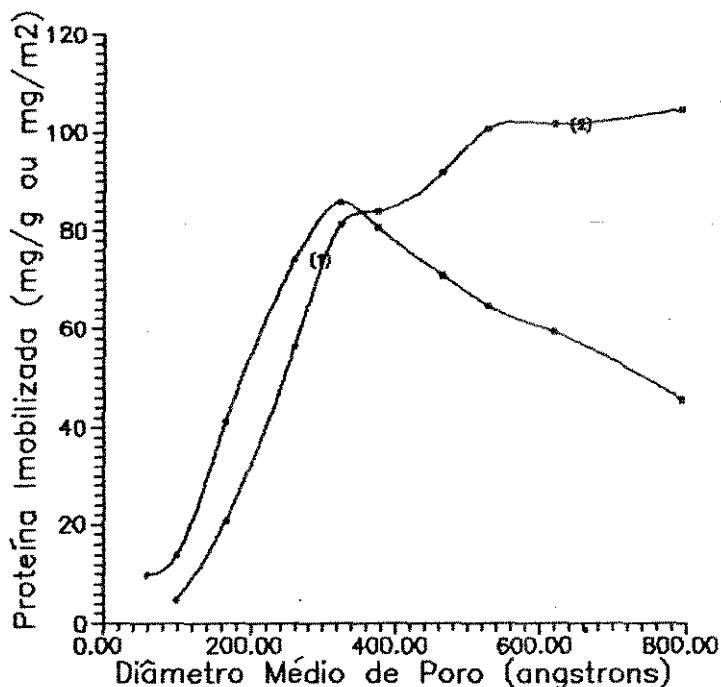


Figura 6.28 - Imobilização de albumina em NaCl 0,9%, em função do diâmetro médio de poro: (1) mg albumina/g de sílica e (2) mg albumina/100 m² de superfície

Considerando um estudo de adsorção de albumina em sílica publicado por Kondo *et al.* (1989), onde o diâmetro de poro para máxima adsorção em solução aquosa foi diferente do obtido em solução de NaCl 0,9%, resolveu-se fazer os testes de imobilização nessas mesmas condições.

Para a imobilização em NaCl 0,9% (Fig.6.28), o máximo de proteína imobilizado foi para a sílica de 324 Å (85,9 mg/g) e, em tampão sem NaCl (Fig.6.29), o máximo foi para a sílica de 464-526 Å (69,0 mg/g). Segundo Kondo *et al.* (1989), Fig.6.30(1), o máximo de albumina adsorvida ocorreu, em termos de mg/g de suporte, em 100 Å e, em termos de mol/m² de superfície, em 269 Å. Os patamares das curvas (2) nas Figs.6.28 e 6.29 tendem ambos para um valor

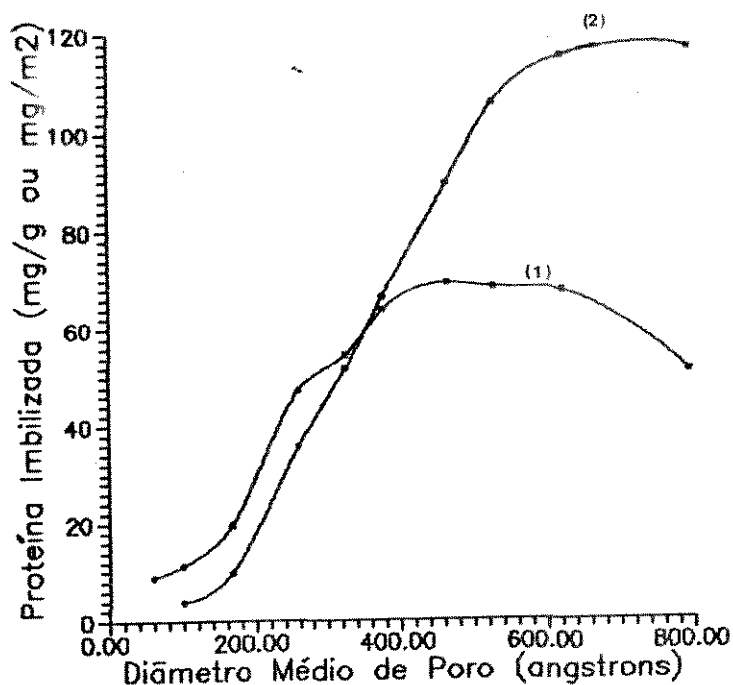


Figura 6.29 - Imobilização de albumina em água, em função do diâmetro médio de poro: (1) mg albumina/g de sílica e (2) mg albumina/100 m² de superfície

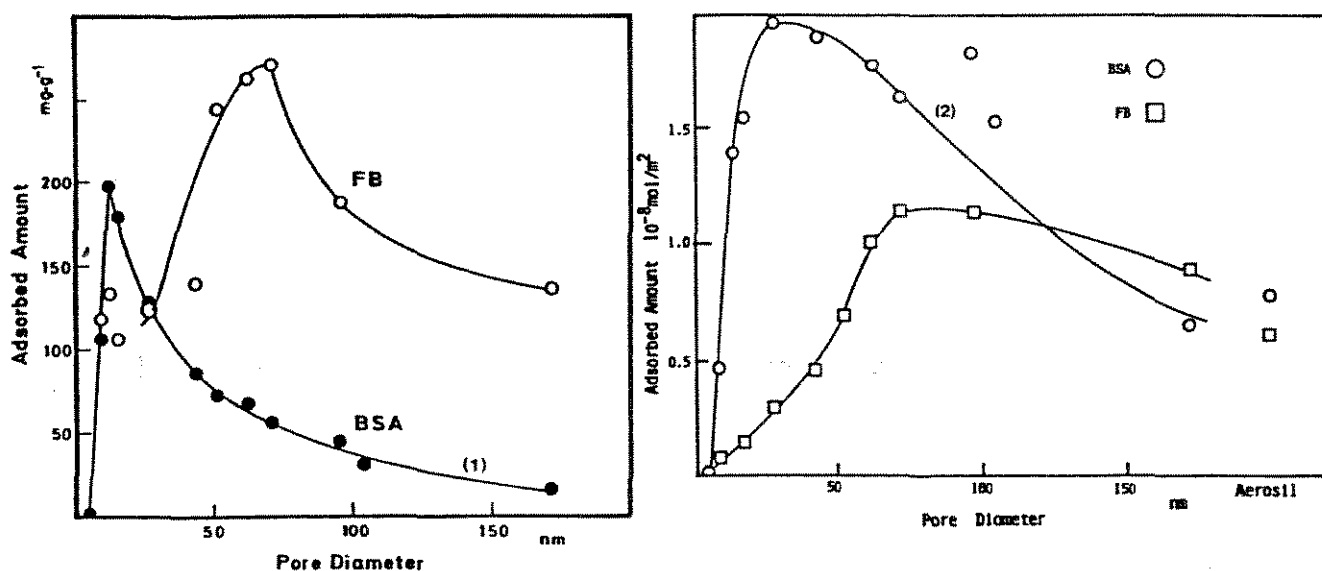


Figura 6.30 - Imobilização de albumina em NaCl 0,9%, em função do diâmetro médio de poro: (1) mg albumina/g de sílica e (2) 10⁻⁸ mol de albumina/m² de superfície

aproximado de 1,10 mg/m², ou 1,67x10⁻⁸ mol/m², indicando que apesar da molécula de albumina assumir uma forma expandida na ausência de NaCl (refletindo num aumento no diâmetro de poro ótimo para imobilização), a área ocupada pela molécula imobilizada na superfície é a mesma. O valor de 1,67x10⁻⁸ mol/m² obtido é concordante com o obtido por Kondo *et al.* (1989), para a faixa de diâmetros de

poro estudada. Os picos máximos de albumina imobilizada (em mg/g) são nos mesmos diâmetros de poro encontrados por Kondo *et al.* em termos de mol/m^2 . O fato dos picos de adsorção ocorrerem em diâmetros menores (Fig.6.30(1)), pode ser explicado, segundo Kondo *et al.* (1989), por um preenchimento dos microporos similar ao que ocorre nas isotermas de adsorção de N_2 .

3 - SINOPSE DOS RESULTADOS

Considerando-se o peso molecular de cada uma das enzimas estudadas e um valor ponderado do diâmetro ótimo de poro, levando-se em conta a quantidade de proteína e atividade imobilizadas nos suportes, tentou-se estabelecer uma relação entre o peso molecular da enzima e o diâmetro de poro ótimo para imobilizá-la. O resultado a que se chegou está mostrado na Fig.6.31. A reta (1) representa a relação entre o peso molecular e o diâmetro de uma molécula

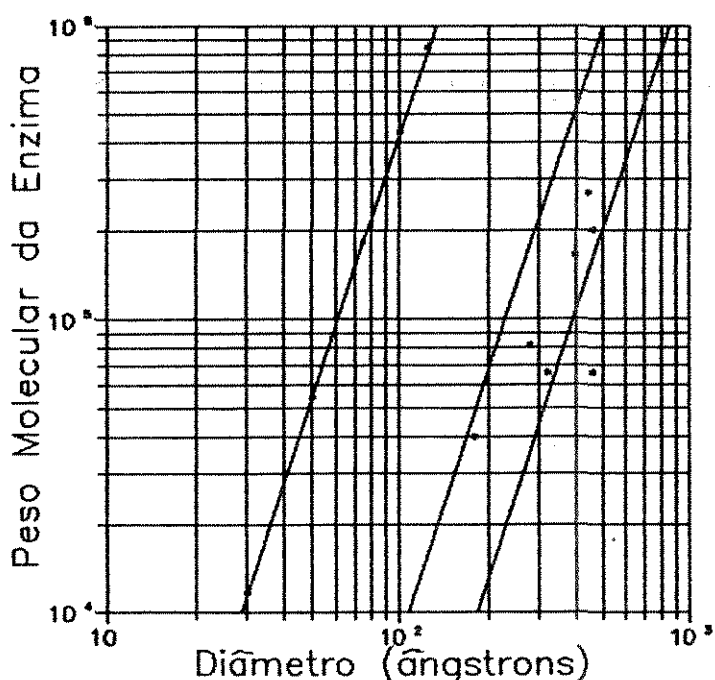


Figura 6.31 - (1) Diâmetro médio de uma proteína, calculado em função do peso molecular, considerando-se uma esfera de massa específica $1,33 \text{ cm}^3/\text{g}$; (2) Retas paralelas à (1), incluindo no seu interior os dados experimentais para as enzimas estudadas.

la de proteína, considerada como uma esfera de massa específica 1,33 g/cm³ (Segel, 1976), ou seja:

$$V = \frac{PM}{d \cdot N} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{D^3}{8} = \text{volume da molécula}$$

onde:

PM = peso molecular da proteína

d = 1,33 g/cm³

N = 6,023.10²³ moléculas/mol

r = raio da molécula

D = diâmetro da molécula

De acordo com a Fig.6.31, o diâmetro de poro ótimo para imobilização é 4 a 6 vezes o valor obtido pela reta (1). Embora essa correlação seja apenas aproximada, principalmente pelo fato das moléculas não serem esféricas, pode ser utilizada como uma estimativa com o objetivo de se reduzir o número de testes de imobilização em busca do diâmetro de poro ótimo para determinada enzima cujo peso molecular seja conhecido.

CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES

Quanto à preparação da sílica:

- Pode-se comprovar o aumento da área superficial com o volume de poros, para um mesmo tamanho de poro. Embora essa área possa ser aumentada ainda mais, pelo prolongamento do tempo de envelhecimento, considerou-se os resultados obtidos para a sílica Série V satisfatórios, pois as condições utilizadas poderiam resultar em poros muito grandes e/ou maior fragilidade da sílica (Messing, 1974);

- Comparando-se a SPC da Corning, com poro médio de 500 Å, com as sílicas Série V de 464 e 526 Å, obteve-se curvas semelhantes de distribuição por volume de intrusão (Fig.6.7) e área superficial (Fig.6.9), sendo que os valores máximos foram maiores para a Sílica Série V. Como reflexo dessa maior área, conseguiu-se imobilizar 10-15% a mais de proteína em invertase e amiloglicosidase na sílica Série V com o mesmo tamanho de poro da SPC;

- A relação linear entre o tamanho de poro e a pressão do tratamento hidrotérmico depende das condições de preparo da sílica microporosa, sendo diferente para a Sílica Série I e Gessy (Fig.6.5) e para a Sílica Série V (Fig.6.15). Na prática, pode-se padronizar o método de obtenção da sílica microporosa, utilizando-se como base os dados apresentados nesse trabalho, submetê-la ao tratamento em várias temperaturas e determinar-se experimentalmente a condição ótima para se obter o suporte para se imobilizar determinada proteína, sem a análise da sua distribuição porosimétrica;

- As sílicas obtidas pelo processo sol-gel a partir de silicato de sódio (Fig.6.13) ou de tetraetóxido de silício (Fig.6.14a) e mesmo o vidro de porosidade controlada, obtido a partir da remoção da fase alcalina de vidro borossilicato tratado termicamente

(Fig. 6.14), possuem estruturas similares, formadas por poros interconectados que garantem a grande área superficial.

Quanto à imobilização das enzimas:

- Quando se compara as curvas de atividade e de proteína imobilizada (Figs. 6.16, 6.18, 6.24 e 6.26), observa-se que em alguns casos o ponto máximo de proteína ou atividade é bem acentuado, embora nem sempre coincidentes. Entre as razões que possam gerar esses efeitos citam-se:

i) a presença de contaminantes protéicos na enzima com vários pesos moleculares. A presença desse tipo de impurezas pode resultar em curvas como as obtidas para a invertase (Fig. 6.24). Para um suporte de poro menor a enzima seria excluída, resultando na imobilização de uma grande quantidade de proteína sem atividade enzimática. Aumentando-se o tamanho de poro, a quantidade de enzima excluída diminui, aumentando-se a atividade até um valor máximo, que depois decresce devido à redução da área superficial;

ii) a presença de proteínas contaminantes com pesos moleculares próximos e maiores que o da enzima. Esse tipo de enzima pode ser obtido a partir de uma purificação por ultrafiltração, onde as proteínas de até determinado peso molecular são eliminadas. As curvas para a glicose oxidase (Fig. 6.22) parecem representar esse tipo de comportamento, onde se tem, para poros pequenos, pouca proteína e atividade imobilizadas. À medida que o poro aumenta, a quantidade de proteína também aumenta, sem a definição de um pico de máximo, pois as impurezas de maior peso molecular, excluídas para os poros menores, começam a ser imobilizadas. O resultado é um máximo da atividade no ponto em que a exclusão dos contaminantes faz com que a quantidade de enzima imobilizada predomine;

iii) o formato da molécula de enzima, que por não ser

esférica pode penetrar em poros de vários tamanhos, resultando no achatamento do pico de máximo de proteína imobilizada;

iv) a dispersão dos poros do suporte, principalmente nos diâmetros médios de poro maiores, ocasionando um achatamento dos picos de atividade e/ou proteína imobilizadas;

v) a resistência à difusão de substrato e/ou produto durante a reação, que pode implicar num aumento de atividade em proporção menor ao aumento da quantidade de enzima imobilizada;

vi) a presença de isoenzimas com diferentes pesos moleculares e atividades específicas.

Considerando-se o objetivo de se preparar sílica de porosidade controlada para imobilização de enzimas e obter os diâmetros ótimos de poro para imobilização de várias delas, pode-se dizer que ele foi plenamente cumprido. Através do trabalho realizado conseguiu-se produzir sílicas de porosidade controlada e ficaram estabelecidas as condições para se chegar ao suporte com o tamanho de poro desejado. O suporte obtido possui qualidade superior ao da Corning Glass Works, em termos de capacidade de imobilização, embora sua geometria não seja esférica, como a do produto importado. É importante ressaltar que com o desenvolvimento desse suporte fica preenchida uma grande lacuna na tecnologia de imobilização e utilização de enzimas imobilizadas em processos, já que não dispunhamos, a nível nacional, desse tipo de material, já utilizado em processos industriais.

Quanto ao estudo da imobilização das enzimas, no caso da HRP os resultados não foram satisfatórios, mas provavelmente devido ao fato do método de ligação da enzima ao suporte não ser adequado, já que nenhuma das referências que tratavam da imobilização de HRP em sílica forneciam resultados para comparação. Com relação às demais enzimas, conseguiu-se estabelecer para todas elas uma faixa ótima de tamanho de poro para imobilização, resultando em

atividades sempre maiores ou pelo menos semelhantes às apresentadas na literatura. O estudo da atividade imobilizada em função do tamanho de partícula, além de permitir uma avaliação qualitativa dos efeitos difusionais, ressalta a importância de se utilizar o menor tamanho de partícula possível para se conseguir maior atividade enzimática, ficando esse parâmetro sujeito às características fluidodinâmicas do processo.

Finalmente, em função das enzimas estudadas, ficou estabelecido como critério de seleção para o tamanho ótimo de poro para imobilização a escolha de um suporte com diâmetro de poro 4 a 6 vezes o diâmetro da molécula de proteína, considerada com esférica. Embora não se espere que essa relação seja rígida, não funcionando para o caso da albumina em tampão sem NaCl, pelo menos ela deve servir de base para uma minimização do número de testes com o objetivo de se determinar o tamanho ótimo de poro.

CAPÍTULO VIII - RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS

Com relação ao método de preparação da sílica da porosidade controlada, pode-se sugerir que se realizem novos testes, com o objetivo de se tentar aumentar ainda mais o volume de poros e, conseqüentemente, a sua área específica. Como esse aumento poderia acarretar numa maior fragilidade do material, tanto o suporte já obtido como outros deveriam ser submetidos também a testes mecânicos estáticos ou em condições de trabalho, de forma a se estabelecer a sua estabilidade mecânica e química.

Durante os testes de imobilização da amiloglicosidase verificou-se que quando a quantidade de proteína ou o tamanho da partícula eram reduzidos, a atividade tendia à da enzima livre, chegando a 78% da sua atividade específica. Seria interessante se estender esse tipo de estudo para partículas e quantidades de pro-

teínas menores ainda, com o objetivo de se verificar qual é realmente o efeito da imobilização sobre a atividade enzimática, sem a presença de resistências difusionais. Assim como no caso da amiloglicosidase a atividade de enzima imobilizada parece ser próxima da livre, na ausência de efeitos difusionais, indicando que o método de imobilização é adequado, no caso de uma outra enzima qualquer pode-se concluir que a atividade tenda a uma pequena fração da enzima livre, na ausência de efeitos difusionais, indicando que outro método de imobilização ou tipo de suporte deva ser testado.

Complementando esse trabalho deve-se agora passar ao teste das enzimas imobilizadas em reatores, variando-se principalmente o tamanho de partícula, de forma a se operar em condições mais próximas possíveis às requeridas em processos. Outro estudo que está se pensando em fazer é o da possibilidade de se utilizar esse suporte na purificação de enzimas antes da imobilização, adsorvendo as impurezas de baixo peso molecular imobilizáveis em sílica de tamanho de poro bem menor que o ótimo para a enzima. Além do uso como adsorvente, esse material poderia substituir fases estacionárias na cromatografia de exclusão em gel, já que possui poros de tamanho fixo e definidos.

CAPÍTULO IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellah, H.A., Baker, T.M.A., Shekib, L.A. & El-Iraqi, S.M., Characteristics of invertase immobilized on three different types of supports, *Food Biochem.* 43:369-375 (1992)
- Aboutboul, H.A., Krekeler, J.H., Kirch, W., Preparation of silica gels, US Patent 3,652,214 (28.03.1972)
- Annesini, M.C., Gaudiso, D. & Toro, L., Inversion of sucrose by immobilized β -fructoosidase in an integral reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 25:1435-1439 (1983)
- Aubel, M. & Rogers, L.B., Effects of pretreatment on the enantioselectivity of silica-bound bovine serum albumine used as high-performance liquid chromatographic stationary phases, *J.Chromatogr.* 392: 415-420 (1987)
- Aubel, M. & Rogers, L.B., Effects of pretreatment on the enantioselectivity of silica-bound proteins used as high-performance liquid chromatographic stationary phases, *J.Chromatogr.* 408: 99-113 (1987a)
- Bacon, J.S.D., Oligosaccharides produced by the action of yeast invertase preparations on sucrose, *Biochem.J.* 57:320-328 (1954)
- Bailey, J.E. & Ollis, D.F., "Biochemical Engineering Fundamentals", p. 180-222, 2nd edition, McGraw-Hill (1986)
- Bailey, J.E. & Cho, Y.K., Immobilization of glucoamylase and glucose oxidase in activated carbon: effects of particle size and immobilization conditions on enzyme activity and effectiveness, *Biotechnol.Bioeng.* 25:1923-1935 (1983)
- Baret, J.L., Large-scale production and application of immobilized lactase, *Methods in Enzymology* 136:411-423 (1987)
- Bartling, G.J., Chattopadhyay, S.K., Barker, C.W. & Brown, H.D., Preparation and properties of matrix-supported horseradish peroxidase, *Can. J.Biochem.* 53:868-874 (1975)
- Bartling, G.J., Chattopadhyay, Brown, H.D., Barker, C.W. & Vincent, J.K., A convenient new method of enzyme immobilization, *Biotechnol.Bioeng.* 16:1425-1429 (1974)
- Boonstra, A.H., Meeuwsen, T.P.M., Baken, J.M.E. & Aben, G.U. A., A

two-step silica-sol process investigated with static and dynamic light-scattering measurements, *J.Non-Cryst. Solids* 109(2-3): 153-63 (1989)

Bouin, J.C., Atallah, M.T., Hultin, H.O., The glucose oxidase catalase system, *Methods in Enzymology* 44(Immobilized Enzymes): 478-88, Mosbach, K., Ed., Academic Press, NY (1976)

Bouin, J.C. & Hultin, H.O., Stabilization of glucose oxidase by immobilization/modification as a function of pH, *Biotechnol. Bioeng.* 24:1225-1231 (1982)

Bovaird, J.H., Ngo, T.T. & Lenhoff, H.M., Optimizing the *O*-phenylenediamine assay for HRP: effects of phosphate and pH, substrate and enzyme concentrations, and stopping reagents, *Clin.Chem.* 28(12):2423-2426 (1982)

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* 72:248- 254 (1976)

Broecker, F.J., Heckmann, W., Fischer, F., Schoroeder, J. & Stange, A., Structural analysis of granular silica gel, *Springer Proc.Phys.* 6(Aerogels): 160-6 (1986)

Bucke, C., Enzymes capable of hydrolysing maltose, em: Lee, C.K. & Lindley M.G., Ed., *Developments in food carbohydrate-3-di-saccharides*, London, Applied Science Publishers, p.49-80 (1982)

Cabral, J.M.S., Novais, J.M. & Cardoso, J.P., Coupling of gluco-
amylase on alkylamine derivative of titanium (IV) activated controlled pore glass with tannic acid, *Biotechnol. Bioeng.* 27: 386-388 (1984)

Cardoso, V.L., "Tese de Mestrado: Estudo de Processos de Ligação de Proteínas em Superfícies Sólidas e Aplicações", Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (1988)

Chemical and Engineering News, August 15, 22-41 (1975)

Chibata, I., "Immobilized Enzymes, Research and Development", Halsted Press, NY (1978)

Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. & Matsuo, Y., "Fermentation Technology Today", Soc.Ferm.Tech.Japan, G.Terni Ltd., p. 383-391 (1972)

- Cho, Y.K. & Bailey, J.E., Immobilization of enzymes on activated carbon: properties of immobilized glucoamylase, glucose oxidase and gluconolactonase, *Biotechnol.Bioeng.* 20: 1651-1665 (1978)
- Cooper, G.R. & McDaniel, V., The determination of glucose by the *o*-toluidine method, *Clin.Chem.* 6:159-170 (1970)
- Cremonesi, P. & D'Angiuro, L., Kinetic and thermal characteristics of enzyme-graft copolymers, *Biotechnol.Bioeng.* 25:735-744 (1983)
- D'Angiuro, L., Galliani, S. & Cremonesi, P., Structure and properties of enzyme graft copolymers: effects of using dissolved agarose on horseradish peroxidase immobilization, *Biotechnol. Appl.Biochem.* 9:197-208 (1987)
- D'Angiuro, L., De Lalla, C. & Cremonesi, P., Structure and properties of enzyme graft copolymers: temperature effects on HRP immobilization mechanism, *Biotechnol.Bioeng.* 27:1548-53 (1985)
- D'Angiuro, L., Cremonesi, P., Mazzola, G., Focher, B. & Vecchio, G., Preparation and characterization of enzymes immobilized by graft copolymerization to different polysaccharides, *Biotechnol. Bioeng.* 22:2251-2272 (1980)
- De Alteriis, E., Parascandola, P., Salvatore, S. & Scardi, V., Enzyme immobilization within insolubilised gelatin, *J. Chem. Technol.Biotechnol.* 35B:60-64 (1985)
- De la Rosa-Fox, N., Esquivias, L. & Zarzycki, J., Glasses from sonogels, *Diffus. Defect Data* 53-54: 363-373 (1987)
- Dennis, K.E., Clark, D.S., Bailey, J.E., Cho, Y.K. & Park Y.H., Immobilization of enzymes in porous supports: effects of support-enzyme solution contacting, *Biotechnol.Bioeng.* 26: 892-900 (1984)
- Dezotti, M., Ferrer, I., Trevisan, H.C., Mei, L.H.I. & Duran, N., Descoloração do efluente kraft pela lignina peroxidase solúvel e imobilizada, Resumos da 14ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Resumo QB-12 (1991)
- Dixon, M. & Weeb, E.C., "Enzymes", 3rd Ed., London, Longman Group Ltd., cap.2 (1979)
- Dolmanova, I.F., Shekhovtsova, T.N. & Kutcheryaeva, V.V., Assay of

- enzyme effectors, *Talanta* 34(1):201-205 (1987)
- Dove III, G.B, Wilke, C.R. & Blanch, H.W., "Process development studies for the enhanced recovery of cellulase in cellulose hydrolysis", MSc. Thesis, Lawrence Laboratory, University of California, Berkeley (1981)
- Dunford, H.B. & Stillman, J.S., On the function and mechanism of action of peroxidases, *Coordination Chem. Rev.* 19: 187-251 (1976)
- Dwivedi, R.K., Drying behavior of alumina gels, *J.Mat.Sci.Lett.* 5(4): 373-6 (1986)
- Eaton, D. L., Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, 42(Advances in Experimental Medicine and Biology): 241-258 (1974)
- Fiedurek, J., Lobarzewski, J., Wójcik, A. & Wolski, T., Optimization of enzyme immobilization on keratin- or polyamide-coated bead-shaped polymeric matrix, *Biotechnol.Bioeng.* 28: 747-750 (1986)
- Gascon, S., Neumann, N.P. & Lampen, J.O., Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast, *J.Biol.Chem.* 243(7): 1573-7 (1967)
- Gekas, V. & Lopez-Leiva, M., Hydrolysis of lactose: a literature review, *Process Biochem.* 20:2-12 (1985)
- George, P., *Advances in Catalysis* 4:367 (1952)
- Godbole, S.S., Kubal, B.S. & D'Souza, S.F., Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread, *Enzyme Microb.Technol.* 12:214- 217 (1990)
- Goetz, V., Remaud, M. & Graves, D.J., A novel magnetic silica support for use in chromatographic and enzymatic bioprocessing, *Biotechnol.Bioeng.* 37:614-626 (1991)
- Goldstein, L., Levin, Y. & Katchalski, E., A water insoluble polyanionic derivative of trypsin.II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin, *Biochemistry* 3:1913-1919 (1964)

- Gould, B.J., Enzyme Data, em: Wiseman, A., Ed., Handbook of Enzyme Biotechnology, John Wiley & Sons (1975)
- Grubhofer, N. & Schleith, L., Modified ion exchangers as specific adsorbents, *Naturwissenschaften* 40: 508 (1953)
- Gruchka, E., & Kikta, E.J.Jr., Chemically bonded stationary phases in chromatography, *Anal.Chem.*49(12):1004A-1014A (1977)
- Haller, W., Rearrangement kinetics of the liquid-liquid immiscible microphases in alkali borosilicate melts, *J.Chem.Phys.* 42(2): 686-693 (1965)
- Hasal, P., Vojtišek, V., Čejková, A., Kleczek, P. & Kofronová, O., An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis, *Enzyme Microb.Technol.* 14:221-229 (1992)
- Hawcroft, D., "Diagnostic enzymology-analytical chemistry by open learning", James, A.M., Ed., Chichester, John Wiley & Sons, cap.2 (1987)
- Hench, L.L. & West, J.K., The sol-gel process, *Chem.Rev.* 90: 33-72 (1990)
- Herzog, V. & Fahimi, H.D., A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor, *Anal. Biochem.* 55: 554-562 (1973)
- Hitachi Ltd., Fabrication of porous glass, CA 103:41380n, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 85 60,931 (08.04 1985)
- Huang Xihuai, Manufacture of porous glass, *J.Non-Cryst. Solids* 112:58-63 (1989)
- Iler, R.K., "Science of Ceramic Chemical Processing"; Hench, L.L., Ulrich, D.R., Eds.; Wiley: New York, p 3 (1986)
- Iqbal, J. & Saleemuddin, M., Activity and stability of glucose oxidase and invertase immobilized on concanavalin A sepharose: influence of lectin concentrations, *Biotechnol.Bioeng.* 25: 3191-3195 (1983)
- Kakuta, N., Ohashi, R. & Ueno, A., Preparation of spherical silica by fume pyrolysis, CA 112: 39142d, *Kagaku Kogyo* 40(12): 1030-4 (1989)
- Kamal, A., Ramalingam, T. & Venugopal, N., Enantioselective

- hydrolysis of aryloxypropionic esters by bovine serum albumin: enhancement in selectivity by β -cyclodextrin, *Tetrahedron: Asymmetry* 2(1): 39-42 (1991)
- Karube, I., Hirano, K.-I. & Suzuki, S., Glucose oxidase pellets, *Biotechnol. Bioeng.* 19:1233-1238 (1977)
- Katwa, L.C. & Raghavendra Rao, M.R., Immobilization of α -amylase, glucoamylase and glucose isomerase on CNBr activated sepharose-6MB, *Biotechnol. Lett.* 3(5):191-196 (1983)
- Kawaguchi, T., Iura, J., Taneda, N., Hishikura, H. & Kokubu, Y., Structural changes of monolithic silica gel—during the gel-to-pass transition, *J. Non-Cryst. Solids* 82(1-3): 50-56 (1986)
- Keilin, D. & Hartree, E.F., Properties of glucose oxidase (notatin), *Biochem. J.* 42:221-229 (1948)
- Kennedy, J.F. & White, C.A., Principles of Immobilization of Enzymes. Em: Wiseman, A., Ed.; "Handbook of Enzyme Biotechnology", 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons (1985)
- Kent, C., Rosevear, A. & Thomson, A. R., Enzyme immobilization on inorganic supports, em: Wiseman, A., "Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology", vol.2, 12-119 (1978)
- Khare, S.K. & Gupta, M.N., An active insoluble aggregate of *E. coli* β -galactosidase, *Biotechnol. Bioeng.* 35:94-98 (1990)
- Kiselev, A.V., Kustova, G.L., Lipkind, B.A. & Mikitin, Y.S., Absorbent with high porosity for chromatography, US Patent 3,888,972 (10.06.1975)
- Klein, L.C., Sol-gel processing of silicates, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 15: 227-48, Huggins, R.A., Ed., Annual Reviews Inc., Palo Alto, California (1985)
- Klibanov, A.M., Enzymatic removal of hazardous pollutants from industrial aqueous effluents, em: Chibata, I., Fukui, S. & Wingard Jr., L.B., Ed., Enzyme Engineering, Vol. 6, Plenum Press (1982)
- Klibanov, A.M. & Morris, E.D., Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water, *Enzyme Microb. Technol.* 3:119-122 (1981)

- Klibanov, A.M., Berman, Z. & Albertim B.N., Preparative hydroxylation of aromatic compounds catalyzed by peroxidase, *J.Am.Chem.Soc.* 103:6263-6264 (1981)
- Kojuharova, A., Popova, N., Kirova, N., Klissurski, D & Spasov, D.S.L., Characterization and application of glucose oxidase immobilized in silica hydrogel, *J.Chem.Technol. Biotechnol.* 42: 95-104 (1988)
- Kondo, S., Amano, E. & Kurimoto, M., Effect of pore size of silica for adsorption of proteins, *Pure & Appl.Chem.* 61(11): 1897-1901 (1989)
- Kvesitadze, G.I. & Dvali, M.SH., Immobilization of mold and bacterial amylases on silica carriers, *Biotechnol.Bioeng.* 24: 1765-1772 (1982)
- Le Page, M., Macroporous silica gel spheres, British Patent 1,334,606 (24.10.1973)
- Le Page, M., Siliceous gels particles having large pores, British Patent 1,334,606 (03.06.1971)
- Le Page, M., Duchene, R.B.J. & deVries, A., Porous silica grains, British Patent 1,171,651 (27.01.1967)
- Lobarzewski, J. & Paszczynski, A., Catalytic properties of immobilized crude and pure glucoamylase from *Aspergillus niger* C., *Biotechnol.Bioeng.* 25:3207-3212 (1983)
- Lundquist, I. & Josefsson, J.-O., Sensitive method for determination of peroxidase activity in tissue by means of coupled oxidation reaction, *Anal.Biochem.* 41: 567-577 (1971)
- Mackenzie, J.D., "Science of Ceramic Chemical Processing"; Hench, L.L., Ulrich, D.R., Eds.; Wiley, New York, p 113 (1986)
- Maehly, A.C., Plant peroxidase, *Methods in Enzymology*, 2:801-813 (1955)
- Maehly, A.C. & Chance, B., The assay of catalases and peroxidases, in: *Biochemical Analysis*, Vol 1, Glick, D., Ed., p. 357, Interscience, NY, London (1954)
- Mahoney, R.R & Adamchuk, C., Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose from *Kluyveromyces fragilis*, *J. Biol.*-

Chem. 193:265-275 (1980)

Mahoney, R. & Whitaker, J.R., Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *J. Food Sci.* 43:584-591 (1978)

Mahoney, R. & Whitaker, J.R., Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *J. Food Biochem.* 1(4):327-350 (1977)

Mäkinen, K.K. & Tenovuo, J., Observations on the use of guaiacol and 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates, *Anal. Biochem.* 126:100-108 (1982)

Malikkides, C.O. & Weiland, R.H., On the mechanism of immobilized glucose oxidase deactivation by hydrogen peroxide, *Biotechnol. Bioeng.* 24:2419-2439 (1982)

Mansfeld, J., Förster, M., Schellenberger, A. & Dautzenberg, H., Immobilization of invertase by encapsulation in polyelectrolyte complexes, *Enzyme Microb. Technol.* 13:240-244 (1991)

Mansfeld, J., & Schellenberger, A., Invertase immobilized on macroporous polystyrene: properties and kinetic characterization, *Biotechnol. Bioeng.* 29:72-78 (1987)

Marek, M., Valentová, O. & Kás, J., Invertase immobilized via its carbohydrate moiety, *Biotechnol. Bioeng.* 26:1223-1226 (1984)

Markey, P.E., Greenfield, P.F. & Kittrell, J.R., Immobilization of catalase and glucose oxidase on inorganic supports, *Biotechnol. Bioeng.* 17:285-289 (1975)

Marsh, D.R. & Tsao, G.T., A heat transfer study on packed bed reactors of immobilized glucoamylase, *Biotechnol. Bioeng.* 18(3):349-362 (1976)

Marshall, D.L., ATP regeneration using immobilized carbamyl phosphokinase, *Biotechnol. Bioeng.* 15:447-453 (1973)

Marshall, M. & Chism, G.W., A comparison of the suitability of three hydrogen donors in the determination of peroxidase activity, *J. Food Sci.* 44:942-943 (1979)

Mason, R.D., Detar, C.C. & Weetall, H.H., Protease covalently coupled to porous glass. Preparation and characterization,

Biotechnol. Bioeng. 17:1019-1027 (1975)

Matioli, G., Tese de Mestrado: Hidrólise da lactose com a enzima β -galactosidase - Modelagem cinética, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR (1991)

Maxim, S., Flondor, A., Bunia, I. & Stoica, M., Immobilized enzymes on acrylic supports, *J. Mol. Catalysis* 43:259-266 (1988)

The Merck Index, tenth edition, Merck & Co. INC., New Jersey, USA (1983)

Messing, R.A., Carriers for immobilized biologically active systems, *Adv. Biochem. Eng.* 10(Immobilized Enzymes. I): 52-73, Ghose, T.K., Fiechter, A. & Blakebrough, N., Ed., Springer-Verlag (1978)

Messing, R.A., Carriers, "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors", Messing, R.A., Ed., Academic Press, NY, (1975)

Messing, R.A., Porous inorganic bodies using water soluble zirconium compounds, US Patent 3,910,851 (07.10.1975a)

Messing, R.A., Carriers for immobilized enzymes, *Process Biochem.* 9(9): 26-28 (1974)

Messing, R.A., Porous mineral bodies, Fr Demande 222 3324 (25.10.1974a)

Miles, B.J. & Thomson, A.R., Improvements in or relating to the separation of molecules and materials thereof, British Patent 1,421,531 (21.01.1976)

Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* 31:426- (1959)

Miyazaki Prefecture, Porous glass, CA 98: 112466m, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 82 140,334 (30.08.1982)

Myrbäck, K., Inhibition of yeast invertase (saccharase) by metal ions. III. Inhibition by Ag^+ and the complex formation between Ag^+ and imidazole derivatives, *Archiv. Kemi* 11:47-55 (1957)

Nakajima, T., Kono, M. & Shimizu, M., Manufacture of porous glass, CA 105: 28646a, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 86 40,841 (27.02.-1986)

- Nakanishi, K. & Soga, N., Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid. I. Gel formation behavior and effect of solvent composition, *J. Non-Crystal. Solids* 139: 1-13 (1992)
- Narinesingh, D., Stoute, V.A. & Davis, G., β -Galactosidase covalently immobilized on fractogel derivative: preparation, bio-reactor flow kinetics, solvent effects and stability, *J. Mol.-Catalysis* 45:285-304 (1988)
- Nelson, J.M. & Griffin, E.G., Adsorption of invertase, *J.Am. Chem. Soc.* 38: 1109-15 (1916)
- Ngo, T.T. & Lenhoff, H.M., A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, *Anal.-Biochem.* 105: 389-397 (1980)
- Novak, I. & Berek, D., Gel chromatography with silica gels. i. column systems for conventional polymer separation extended towards lower molar masses, *J.Liq.Chromatogr.* 7(9): 1831-40 (1984)
- Nunhez, J.R., Damasceno, C.T.M., Forgaci, M.A. & Mori, M., Método Spline: software desenvolvido na laboratório de modelagem e simulação de processos químicos, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas (1990)
- Olsson, B., A flow injection system using immobilized horseradish peroxidase and chromogenic reagents for possible determination of hydrogen peroxide, *Mikrochim. Acta [Wien]* 1985 II:211-221 (1985)
- Olsson, B., Ögren, L. & Johansson, G., An enzymatic flow injection method for the determination of oxygen, *Anal.Chim. Acta* 145: 101-108 (1983)
- Onyezili, F.N., Glutaraldehyde activation step in enzyme immobilization on nylon, *Biotechnol.Bioeng.* 29:399-402 (1987)
- Ota, Y., Manufacture of high-purity silicic acid hydrate, CA 107: 157623f, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 87 59,515 (16.03. 1987)
- Paice, M.G. & Jurasek, L., Peroxidase-catalyzed color removal from bleach plant effluent, *Biotechnol.Bioeng.* 26:447-480 (1984)
- Pak, C.U. & Chu, D.Z., The Study on the adjustment of porosity of

- the silica packing for gel permeation chromatography by pressed hydrothermal treatment method, *CA* 112: 12425m, *Choson Minjujuui Inmin Konghwaguk Kwahaguk Togbo* 6: 33-6 (1988)
- Pal, I.B., Saran, T., Ramachandran, V.L. & Mukherjee, P.N., Effect of reaction variables on the pore structure of silica gel, *Fuel Sci.Technol.* 3(1): 23-7 (1984)
- Pazur, J.H., Marsh, J.M. & Tipton, C.L., Reversible transgalactosylation, *J.Am.Chem.Soc.* 80:1433-1435 (1958)
- Peres, L., "Tese de Mestrado: Desenvolvimento e Caracterização de Imunosorventes e Avaliação de Desempenho em Ensaios Imunológicos", (1986)
- Porath, J. & Axén, R., Immobilization of enzymes to agar, agarose and sephadex supports, em: Mosbach, K., Ed., *Methods in Enzymology* 44:19-20 (1976)
- Reilly, P.J., Enzymic degradation of starch, em: Van Beynum, G.M. & Roels, J.A., Eds., "Starch conversion technology", New York, Marcel Dekker (1985)
- Reisner, A.H., Nemes, P. & Bucholtz, C., Use of coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels, *Anal.Biochem.* 64:509 (1975)
- Richter, G. & Heinecker, H., Conversion of glucose into gluconic acid by means of immobilized glucose oxidase, *Starch/Stärke* 31(12):418-422 (1979)
- Robinson, P.J., Dunnill, P. & Lilly, M.D., Properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors, *Biotechnol Bioeng.* 15: 603-606 (1973)
- Rosevear, A., Immobilized biocatalysts - A Critical Review, *J.-Chem.Technol.Biotechnol.* 34B(3): 127-150 (1984)
- Sakubana, S. & Yukitsuka, H., Manufacture of porous silica gel, *CA* 112: 9487c, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 89 148,766* (12.06.1989)
- Sastry, Ch.S., Murty, K.V.S.S. & Rao, M.V., Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and peroxidase activity of food stuffs, *J.Food Sci.Technol.* 22:420-422 (1985)

- Scherer, G.W., "Better Ceramics Through Chemistry III"; Brinker, C.J., Clark, D.E., Ulrich, D.R., Eds.; Materials Research Society: Pittsburg, PA, Vol. 121, p 179 (1988)
- Scherer, G.W., Aging and drying of gels, *J.Non-Cryst.Solids* 100 (1-3): 77-92 (1988)
- Scherer, G.W., Drying gels. III. Warping plate, *J.Non-Cryst. Solids* 91(1): 83-100 (1987)
- Scherer, G.W., Drying gels. IV. Cylinder and sphere, *J.Non-Cryst. Solids* 91(1): 101-21 (1987a)
- Scherer, G.W., Drying gels. V. Rigid gels, *J.Non-Cryst.Solids* 92(1): 122-44 (1987b)
- Scherer, G.W., Drying gels. II. Film and flat plate, *J.Non-Cryst. Solids* 89(1-2): 217-38 (1987c)
- Scherer, G.W., Drying gels. I. General theory, *J.Non-Cryst. Solids* 87(1-2): 199-225 (1986)
- Scouten, W.H., *Chemical Analysis* 66(Solid Phase Biochemistry), Jonh Wiley & Sons (1976)
- Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E., A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250, *Anal.-Biochem.* 79:544-52 (1977)
- Segel, I.H., "Biochemical Calculations", John Wiley & Sons, N.Y. (1976)
- Shimadzu Corp., Porous gel carriers, CA 101: 154243x, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 84 128,205 (24.07.1984)
- Sigma Chemical Company Catalog, Biochemicals, organic compounds for research and diagnostic reagents (1992)
- Silman, R.W., Black, L.T. et al., Hydrolysis of raffinose in a hollow-fiber reactor using an unrefined mixture of α -galactosidase and invertase, *Biotechnol.Bioeng.* 22:533- (1980)
- da Silva, M.A., Gil, M.H., Redinha, J.S., Brett, A.M.O. & Pereira, J.L.C., Immobilization of glucose oxidase on nylon membranes and its application in a flow-through glucose reactor, *J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem.* 29:275-279 (1991)

- Sorensen, J.E. & Emborg, C., Influence of immobilization technique on the quality of immobilized enzyme products based on a porous SiO_2 carrier, *Enzyme Microb. Technol.* 11:26-28 (1989)
- Stimpson, E.G. & Stamberg, O.E., Conversion of lactose to glucose, galactose, and other sugars in the presence of lactase activators, U.S. Patent 2,749,242 (1956)
- Sumitomo Electric Industries Ltd., Porous glass, CA 96: 56781e, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81 114,845 (09.09.1981)
- Sumitomo Electric Industries Ltd., Glass leaching for porous bars, CA 95: 85015t, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81 05,360 (20.01.-1981a)
- Sumitomo Electric Industries Ltd., Manufacture of porous glass, CA 95: 224336p, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81 88,847 (18.07.1981b)
- Summer, J.B., Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine, *J. Biol. Chem.* 47:5- (1921)
- Sumner, J.B., *Science* 108: 410 (1948)
- Suwa Seikosha Co. Ltd., Microporous glasses, CA 100: 117187r, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 83 194,748 (12.11.1983)
- Suzuki, T., Toriyama, M., Hosono, H. & Abe, Y., Application of a microporous glass-ceramics with a skeleton of $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to carriers for immobilization of enzymes, *J. Ferment. Bioeng.* 72(5): 384-391 (1991)
- Tamenori, H. & Yoshigawa, M., Preparation of high-purity silica gel, CA 104: 170925p, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 85 204,613 (16.10.1985)
- Tanaka, H., Control of characteristics of porous silica glass and its practical application, CA 108: 155129w, *Osaka Kogyo Gijutsu Shikensho Hokoku* 373: 1-224 (1987)
- Tate & Lyle Ltd. & De Whalley, H.C.S., Inversion of sugar liquors, British Patent 564,270 (20.09.1944)
- Thompson, R.A., Andersson, S. & Allenmark, S., Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized stationary phases. VII. Sorbents obtained by entrapment of cross-linked

- bovine serum albumine in silica, *J.Chromatogr.* 465: 263-270 (1989)
- Toldrá, F., Jansen, N.B. & Tsao, G.T., Use of porous glass as a support for biocatalyst immobilization, *Biotechnol.Lett.* 8(11): 785-790 (1986)
- Tomb, W.H. & Weetall, H.H., Enzyme bound to carriers having a metal oxide surface layer, US Patent 3,783,101 (01.01.1974)
- Trevisan, H.C., "Tese de Mestrado: Imobilização de Glicose Oxidase em Suportes Silícicos", Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade de Campinas (1990)
- Vindevogel, J., Van Dijck, J. & Verzele, M., Micro-liquid chromatography and the chiral recognition mechanism on albumin-coated silica gel. Large selectivity changes with sample size, *J.Chromatogr.* 447: 297-303 (1988)
- Wasserman, B.P., Hultin, H.O. & Jacobson, B.S., High-yield method for immobilization of enzymes, *Biotechnol.Bioeng.* 22: 271-287 (1980)
- Weetall, H.H., Covalent coupling methods for inorganic support materials, *Methods in Enzymology* 44(Immobilized Enzymes): 134-148 Mosbach, K., Ed., Academic Press, NY (1976)
- Weetall, H.H., Vann, W.P., Pitcher Jr., W.H., Lee, D.D. & Tsao, G.T., Scale-up studies on immobilized, purified glucoamylase, covalently coupled to porous ceramic support, em: Mosbach, K., Ed., *Methods in Enzymology* 44:776-792 (1976)
- Weetall, H.H., Immobilization by covalent attachment and by entrapment, "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors"; Messing, R.A., Ed., Academic Press, New York (1975)
- Weetall, H.H. & Detar, C.C., *Biotechnol.Bioeng.* 16:1095-1102 (1974)
- Weetall, H.H. & Filbert, A.M., *Methods in Enzymol.* 34: 59-72 (1974a)
- Weetall, H.H. & Filbert, A.M., Porous glass for affinity chromatography applications, *Methods in Enzymology* 34(Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B): 29-72, Jakoby, W.B.,

- Wilchek, M., Ed., Academic Press, NY (1974)
- Wierzbicki, L.E., Edwards, V.H. & Kosikowski, F.V., Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on porous glass particles: preparation and characterization of a reusable catalyst for the production of low-lactose dairy products, *Biotechnol. Bioeng.* 16:397-411 (1974)
- Wiseman, A., Enzyme utilization in industrial processes, em: Wiseman, A., Ed., Handbook of enzyme biotechnology, John Wiley and Sons (1975)
- Woodward, J., "Immobilised Cells and Enzymes, a practical approach", Irl Press, Oxford (1985)
- Wójcik, A., Lobarzewski, J. & Blaszczyńska, T., Immobilization of enzymes to porous-bead polymers and silica gels activated by graft polymerization of 2,3-epoxypropyl methacrylate, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 48:287-301 (1990)
- Wójcik, A., Lobarzewski, J., Blaszczyńska, T. & Fiedurek, J., Silica gels activated by BCl_3 and aliphatic diamines as supports for glucoamylase immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 30:983-986 (1987)
- Yamauchi, H. & Nomura, H., Manufacture of silica gel, CA 106: 52681z, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 86 227,915 (1986)
- Yang, X. & Huang, X., Preparation of porous glass, CA 112:123728g, *Wuji Cailiao Xuebao* 4(3): 205-210 (1989)
- Yoldas, B.E., Hydrolysis of titanium alkoxide and effects of hydrolytic polycondensation parameters, *J. Mater. Sci.* 21(3): 1087-92 (1986)
- Zaborsky, O.R. , "Immobilized Enzymes", CRC Press, Cleveland (1973)
- Zanin, G. M., "Tese de Doutorado: Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada", Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP (1989)
- Zorya, L.N., Onaiko, V.A., Panasyuk, G.P. & Lazarev, V.B., Preparation of spherical silica gel, CA 112: 47465b, *Zh. Neorg. Khim.* 34(8): 1953-7 (1989)

ANEXOS

ANEXO I

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA

As análises de proteína foram realizadas como descrito no Método 1.1 utilizando Coomassie Brilliant Blue G250 como reagente. Os resultados obtidos para uma das curvas estão mostrados na Tab. I e na Fig. I. Os pontos representam médias de duplicatas, com desvios de no máximo 2% em relação à média. Como a correlação dos dados não é linear para toda a faixa do método, a interpolação dos dados foi feita através da melhor curva ajustada pelo método Spline Extendido (Nunhez *et al.*, 1990), cujo resultado está na Fig. I.

Tabela I - Absorbâncias (Abs) obtidas para quantidades padrões de albumina (μg de albumina)

μg de Albumina	6.138	12.275	18.413	24.550	30.688
Abs (620 nm)	0.033	0.069	0.111	0.145	0.179
μg de Albumina	36.825	42.963	49.100	55.238	61.375
Abs (620 nm)	0.218	0.250	0.277	0.310	0.338
μg de Albumina	67.5125	73.650	79.788	85.925	92.063
Abs (620 nm)	0.361	0.380	0.400	0.414	0.435

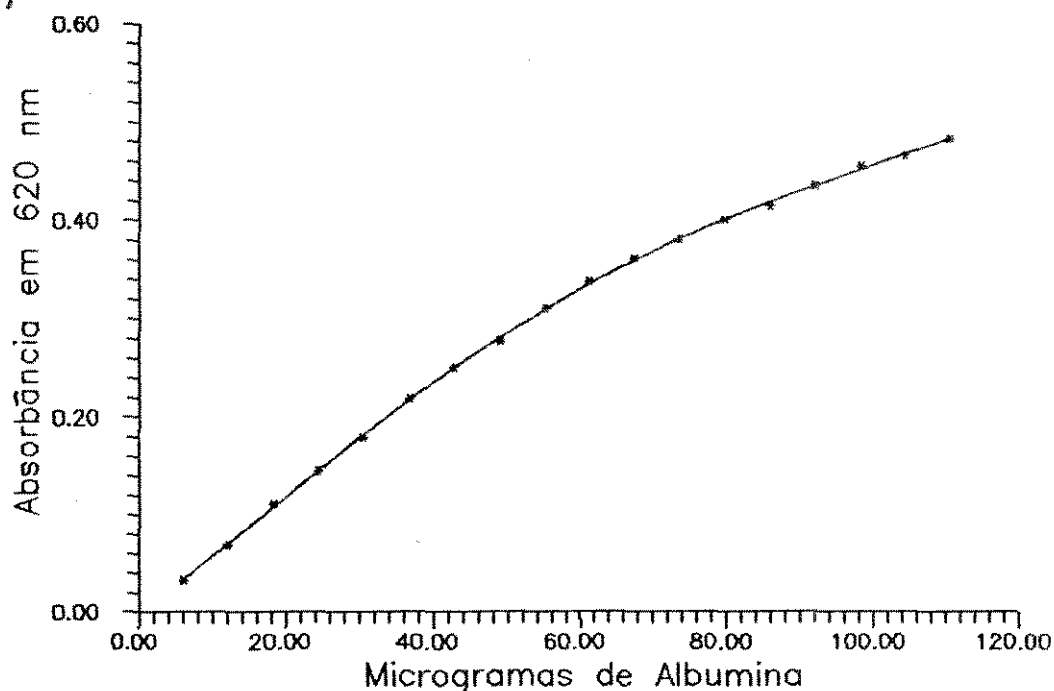


Figura I - Curva de calibração para determinação de proteína pelo método do Coomassie

ANEXO II

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE GLICOSE

MÉTODO DA *o*-TOLUIDINA

As análises de glicose pelo método da *o*-toluidina foram realizadas como descrito no Método 1.2.1. Os resultados obtidos para uma das curvas estão mostrados na Tab. II e na Fig. II. Os pontos representam médias de duplicatas, com desvios de no máximo 2% em relação à média. A reta ajustada por regressão linear entre a absorbância (Abs) e a concentração de glicose [Glic.] foi:

$$\text{Abs}(625 \text{ nm}) = 0,014667 + 0,637152 \cdot [\text{Glic.}] \quad r = 0,9998$$

Tabela II - Absorbâncias (Abs) obtidas para concentrações padrões de glicose [Glic.] pelo método da *o*-toluidina

[Glic.] (mg/ml)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Abs (625 nm)	0.079	0.140	0.204	0.272	0.332
[Glic.] (mg/ml)	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
Abs (625 nm)	0.402	0.462	0.524	0.580	0.656

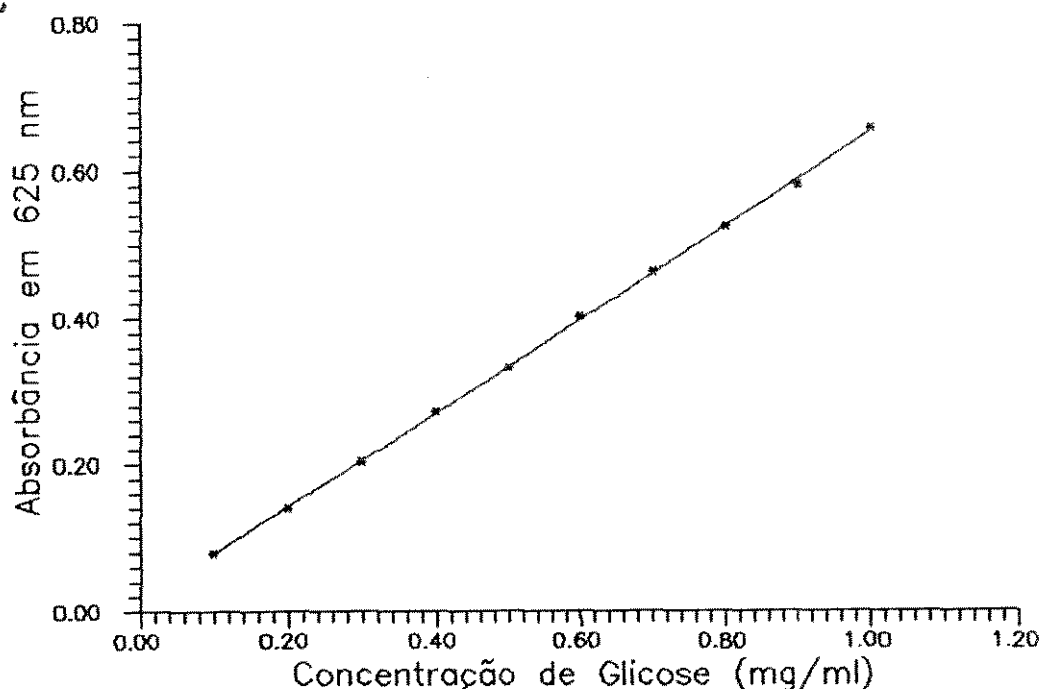


Figura II - Curva de calibração para determinação de glicose pelo método da *o*-toluidina

ANEXO III

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE GLICOSE

MÉTODO GOD-PAP (Glicose Oxidase-Peroxidase)

As análises de glicose pelo método GOD-PAP foram realizadas como descrito no Método 1.2.2. Os resultados obtidos para uma das curvas estão mostrados na Tab. III e na Fig. III. Os pontos representam médias de duplicatas, com desvios de no máximo 2% em relação à média. A reta ajustada por regressão linear entre a absorbância (Abs) e a concentração de glicose [Glic.] foi:

$$\text{Abs}(525 \text{ nm}) = 0,002286 + 1,330952.[\text{Glic.}] \quad r = 0,9998$$

Tabela III - Absorbâncias (Abs) obtidas para concentrações padrões de glicose [Glic.] pelo método GOD-PAP

[Glic.] (mg/ml)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
Abs (525 nm)	0.066	0.136	0.202	0.270	0.336
[Glic.] (mg/ml)	0.30	0.35	0.40		
Abs (525 nm)	0.408	0.462	0.534		

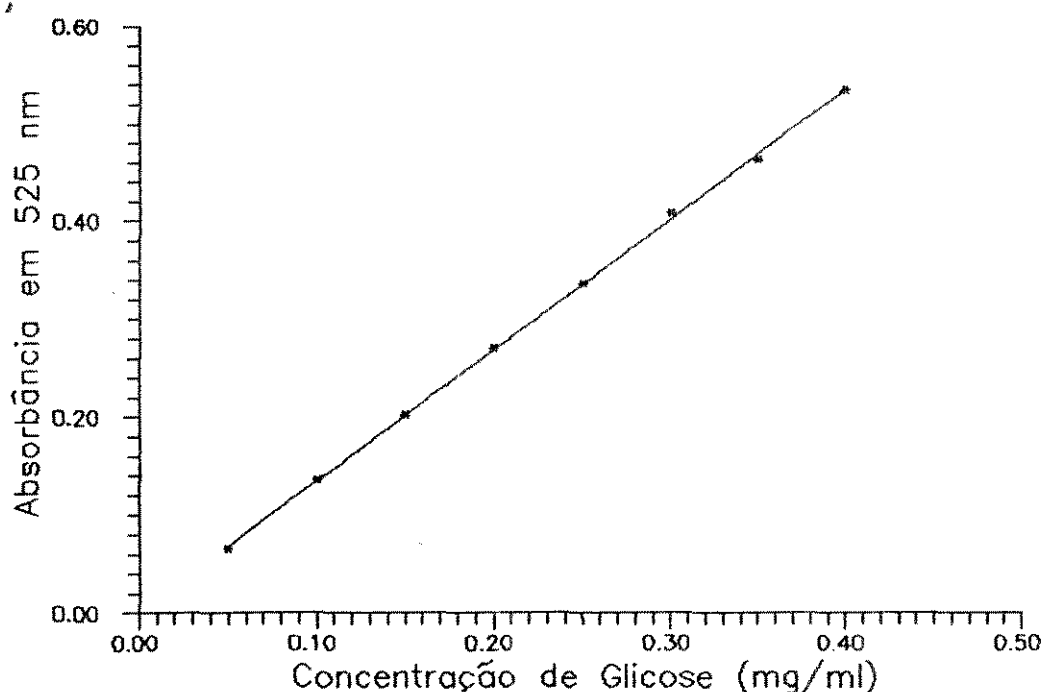


Figura III - Curva de calibração para determinação de glicose pelo método GOD-PAP

ANEXO IV

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE GLICOSE

MÉTODO DO DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico)

As análises de glicose pelo método do DNS foram realizadas como descrito no Método 1.2.3 . Os resultados obtidos para uma das curvas estão mostrados na Tab. IV e na Fig. IV. Os pontos representam médias de duplicatas, com desvios de no máximo 2% em relação à média. A reta ajustada por regressão linear entre a absorbância (Abs) e a concentração de glicose [Glic.] foi:

$$\text{Abs}(600 \text{ nm}) = -0,044933 + 0,6306060.[\text{Glic.}] \quad r = 0,9997$$

Tabela IV - Absorbâncias (Abs) obtidas para concentrações padrões de glicose + frutose [G.+F.] pelo método do DNS

[G.+F.] (mg/ml)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Abs (600 nm)	0.023	0.086	0.145	0.200	0.266
[G.+F.] (mg/ml)	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
Abs (600 nm)	0.330	0.391	0.462	0.526	0.590

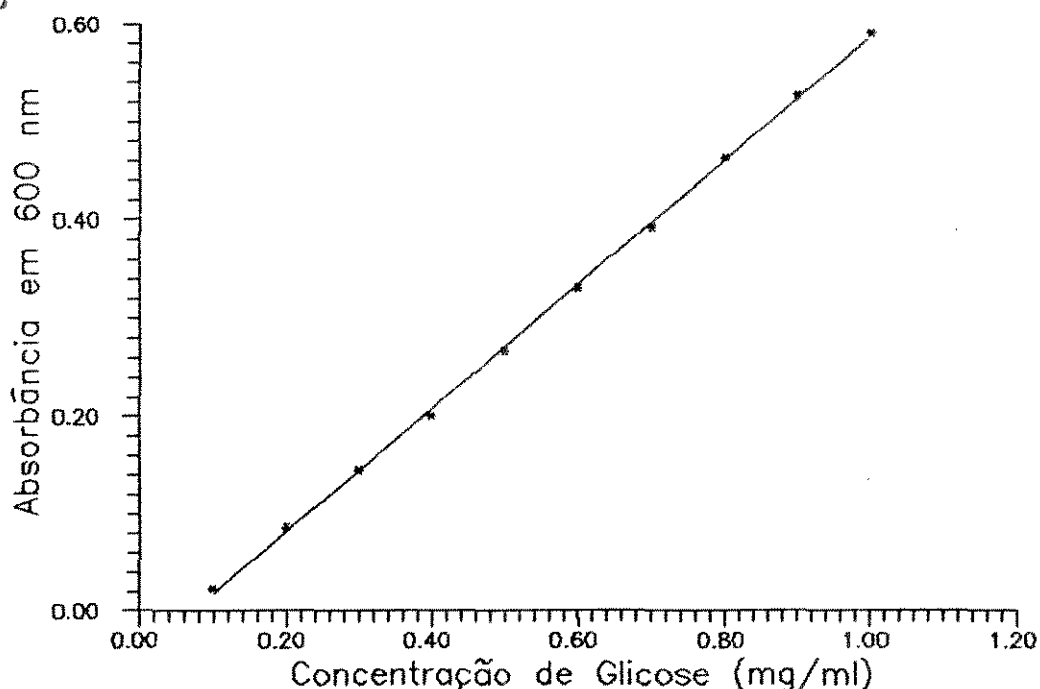


Figura IV - Curva de calibração para determinação de (glicose + frutose) pelo método do DNS

ANEXO V

AMILOGLICOSIDASE IMOBILIZADA NAS SÍLICAS SÉRIE I, GESSY E MERCK

Curva para glicose: $Abs(625\text{ nm}) = 0,009294 + 0,50608[Glic.]$

Cálculos segundo Método 2.1

Amostra: Sílica Série I (sem tratamento)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 101 mg
0	20,0	0,158	1,763	195,9	Diluição da Amostra: 1/6
3	19,5	0,208	2,356	255,2	
6	19,0	0,261	2,984	315,0	Taxa de Reação: 16,47 µmol/min
9	18,5	0,295	3,387	348,1	
12	18,0	0,360	4,158	415,8	Atividade Total: 163 U/g síl.
15	17,5	0,400	4,632	450,3	
18	17,0	0,450	5,225	493,5	

Amostra: Sílica Série I (tratada a 213°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 106 mg
0	20,0	0,044	1,372	152,4	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,104	3,743	405,5	
6	19,0	0,151	5,600	591,1	Taxa de Reação: 67,22 µmol/min
9	18,5	0,225	8,525	876,2	
12	18,0	0,274	10,46	1046	Atividade Total: 634 U/g síl.
15	17,5	0,323	12,40	1205	
18	17,0	0,377	14,53	1350	

Amostra: Sílica Série I (tratada a 243°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 116 mg
0	20,0	0,045	1,411	156,8	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,084	2,952	319,8	
6	19,0	0,126	4,612	486,8	Taxa de Reação: 61,95 µmol/min
9	18,5	0,190	7,140	733,8	
12	18,0	0,244	9,275	927,5	Atividade Total: 534 U/g síl.
15	17,5	0,281	10,74	1045	
18	17,0	0,347	13,35	1261	

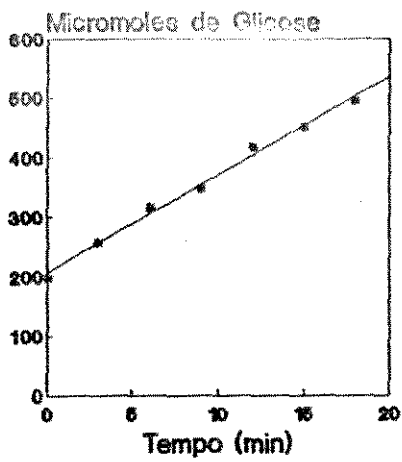
Amostra: Sílica Série I (tratada a 265°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 113 mg
0	20,0	0,041	1,253	139,2	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,086	3,031	328,4	
6	19,0	0,125	4,573	482,7	Taxa de Reação: 54,20 µmol/min
9	18,5	0,174	6,509	668,9	
12	18,0	0,217	8,208	820,8	Atividade Total: 480 U/g síl.
15	17,5	0,271	10,34	1005	
18	17,0	0,302	11,57	1093	

Amostra: Sílica Série I (tratada a 281°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 118 mg
0	20,0	0,105	1,702	189,1	Diluição da Amostra: 1/9
3	19,5	0,200	3,391	367,4	
6	19,0	0,276	4,743	500,6	Taxa de Reação: 41,59 µmol/min
9	18,5	0,347	6,001	616,8	
12	18,0	0,458	7,980	798,0	Atividade Total: 352 U/g síl.
15	17,5	0,499	8,709	846,7	
18	17,0	0,566	9,900	935,0	

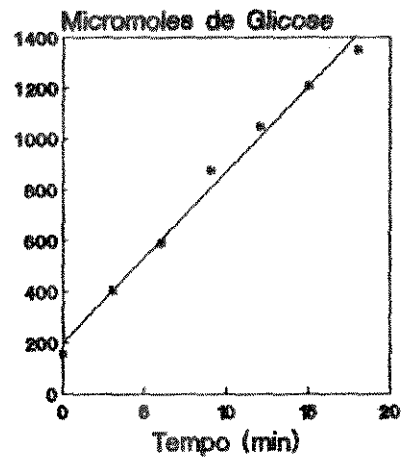
Amostra: Sílica Série I (tratada a 296°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 119 mg
0	20,0	0,084	1,476	164,0	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,156	2,899	314,0	
6	19,0	0,228	4,322	456,2	Taxa de Reação: 44,02 µmol/min
9	18,5	0,302	5,784	594,4	
12	18,0	0,373	7,187	718,7	Atividade Total: 370 U/g síl.
15	17,5	0,442	8,550	831,3	
18	17,0	0,526	10,21	964,3	

Amostra: Sílica Gessy (sem tratamento)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 124 mg
0	20,0	0,087	1,535	170,6	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,087	1,535	"	
6	19,0	0,083	"	"	Taxa de Reação: 00,00 µmol/min
9	18,5	0,082	"	"	
12	18,0	0,085	"	"	Atividade Total: 000 U/g síl.
15	17,5	0,086	"	"	
18	17,0	0,082	"	"	

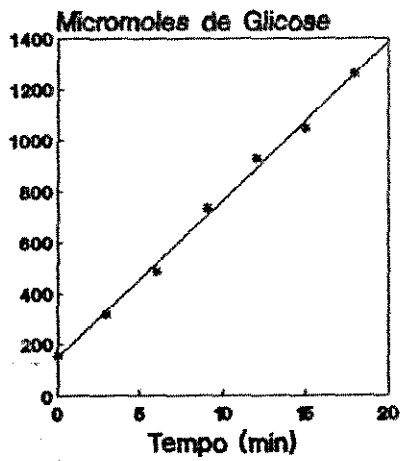
Serie I (sem tratamento)



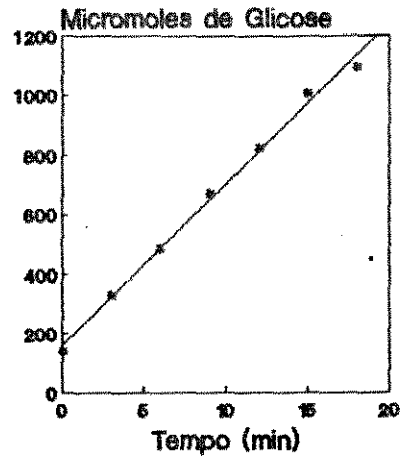
Serie I (tratada a 213°C)



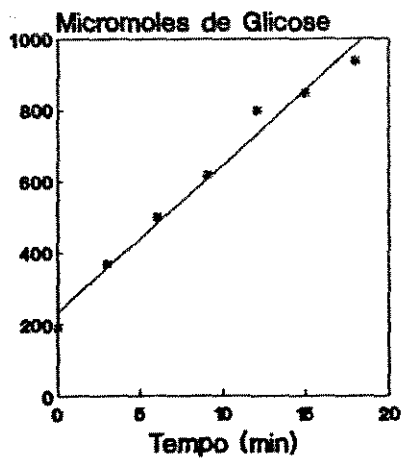
Serie I (tratada a 243°C)



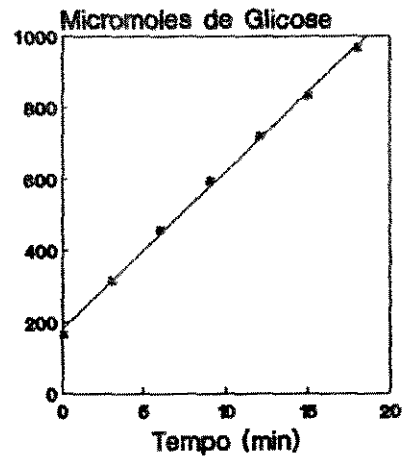
Serie I (tratada a 265°C)



Serie I (tratada a 281°C)



Serie I (tratada a 296°C)



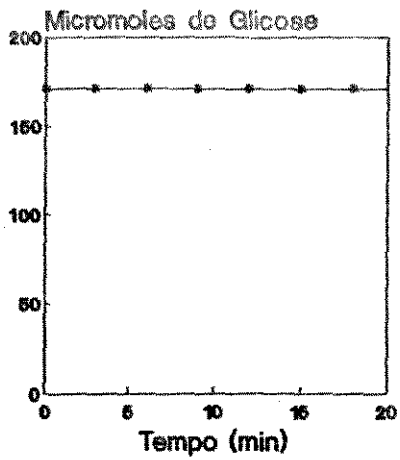
Amostra: Sílica Gessy (tratada a 213°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 125 mg
0	20,0	0,083	1,456	161,8	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,114	2,069	229,1	
6	19,0	0,160	2,978	314,3	Taxa de Reação: 21,89 μmol/min
9	18,5	0,193	3,630	373,1	
12	18,0	0,230	4,361	436,1	Atividade Total: 175 U/g síl.
15	17,5	0,271	5,171	502,7	
18	17,0	0,305	5,843	551,8	

Amostra: Sílica Gessy (tratada a 243°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 104 mg
0	20,0	0,084	1,476	164,0	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,108	1,950	211,3	
6	19,0	0,126	2,306	243,4	Taxa de Reação: 14,38 μmol/min
9	18,5	0,170	3,176	326,4	
12	18,0	0,179	3,353	335,3	Atividade Total: 138 U/g síl.
15	17,5	0,212	4,005	389,4	
18	17,0	0,233	4,420	417,4	

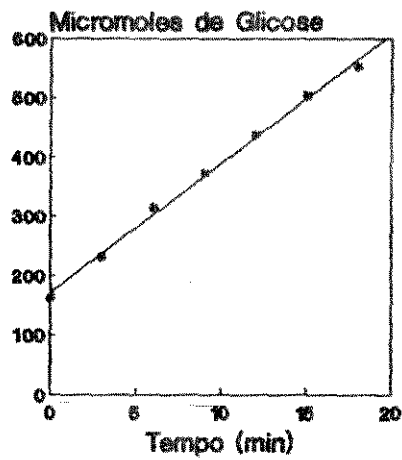
Amostra: Sílica Gessy (tratada a 265°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 121 mg
0	20,0	0,087	1,535	170,6	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,114	2,069	224,1	
6	19,0	0,141	2,602	274,7	Taxa de Reação: 16,72 μmol/min
9	18,5	0,168	3,136	322,3	
12	18,0	0,194	3,650	365,0	Atividade Total: 138 U/g síl.
15	17,5	0,230	4,361	424,0	
18	17,0	0,264	5,033	475,3	

Amostra: Sílica Gessy (tratada a 281°C)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 123 mg
0	20,0	0,084	1,476	164,0	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,105	1,891	204,9	
6	19,0	0,130	2,385	251,8	Taxa de Reação: 13,92 μmol/min
9	18,5	0,149	2,761	283,8	
12	18,0	0,181	3,393	339,3	Atividade Total: 113 U/g síl.
15	17,5	0,204	3,847	374,0	
18	17,0	0,230	4,361	411,9	

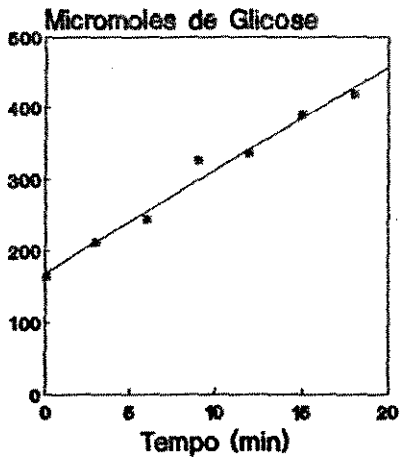
Gessy (sem tratamento)



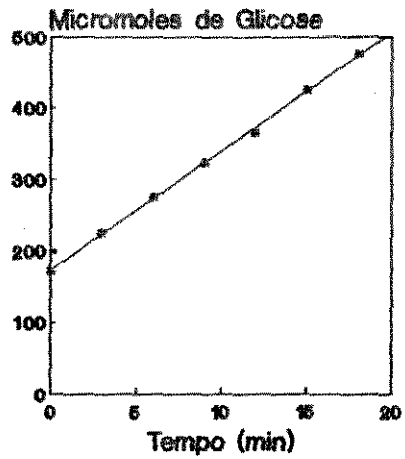
Gessy (tratada a 213°C)



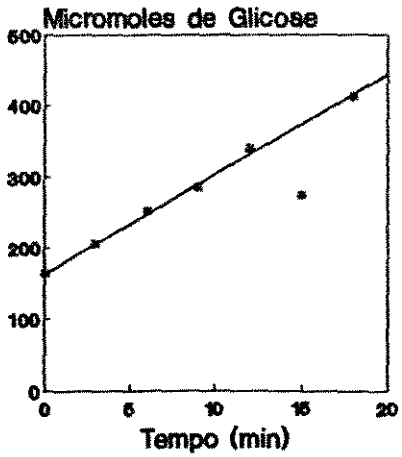
Gessy (tratada a 243°C)



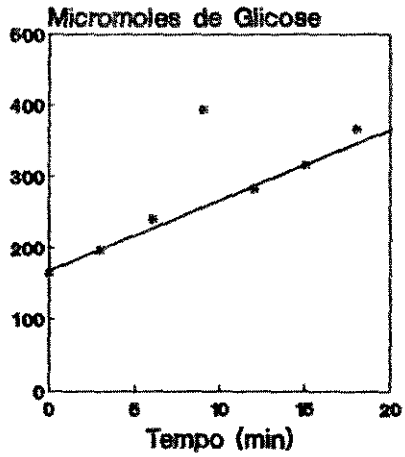
Gessy (tratada a 265°C)



Gessy (tratada a 281°C)



Gessy (tratada a 296°C)



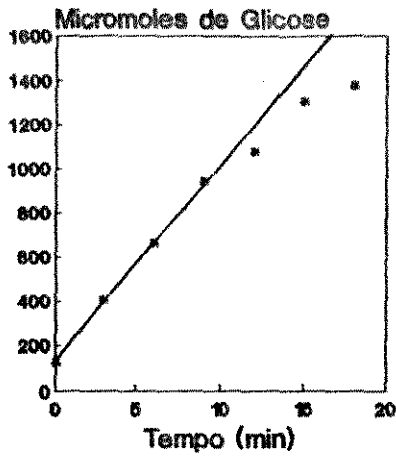
Amostra: Sílica Gessy (tratada a 296°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 106 mg
0	20,0	0,084	1,476	164,0	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,101	1,812	196,3	
6	19,0	0,124	2,267	239,3	Taxa de Reação: 10,51 µmol/min
9	18,5	0,203	3,828	393,4	
12	18,0	0,152	2,820	282,0	Atividade Total: 99 U/g síl.
15	17,5	0,173	3,235	314,5	
18	17,0	0,205	3,867	365,2	

Amostra: Sílica Merck (sem tratamento)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 115 mg
0	20,0	0,038	1,134	126,0	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,104	3,743	405,5	
6	19,0	0,168	6,272	662,0	Taxa de Reação: 70,80 µmol/min
9	18,5	0,241	9,157	941,1	
12	18,0	0,282	10,78	1078	Atividade Total: 615 U/g síl.
15	17,5	0,348	13,39	1302	
18	17,0	0,377	14,53	1372	

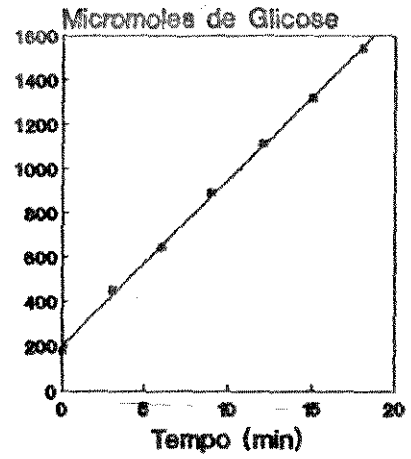
Amostra: Sílica Merck (tratada a 213°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 104 mg
0	20,0	0,050	1,609	178,8	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,114	4,138	448,3	
6	19,0	0,163	6,074	641,1	Taxa de Reação: 74,67 µmol/min
9	18,5	0,228	8,643	888,3	
12	18,0	0,290	11,09	1109	Atividade Total: 712 U/g síl.
15	17,5	0,351	13,50	1313	
18	17,0	0,421	16,27	1537	

Amostra: Sílica Merck (tratada a 243°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 116 mg
0	20,0	0,042	1,293	143,7	Diluição da Amostra: 1/20
3	19,5	0,066	2,241	242,8	
6	19,0	0,105	3,782	399,2	Taxa de Reação: 58,34 µmol/min
9	18,5	0,190	7,141	733,9	
12	18,0	0,220	8,327	832,7	Atividade Total: 503 U/g síl.
15	17,5	0,256	9,750	947,9	
18	17,0	-	-	-	

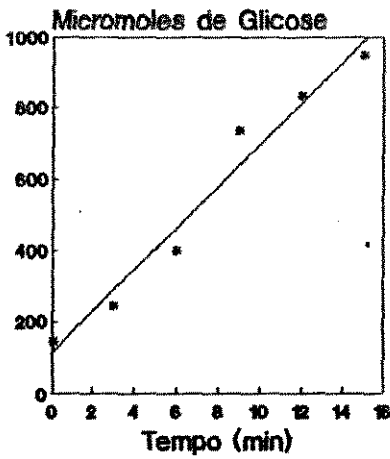
Merck (sem tratamento)



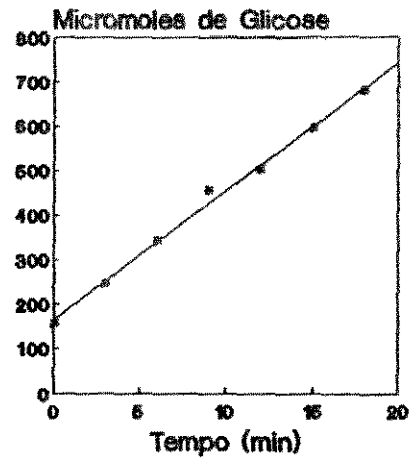
Merck (tratada a 213°C)



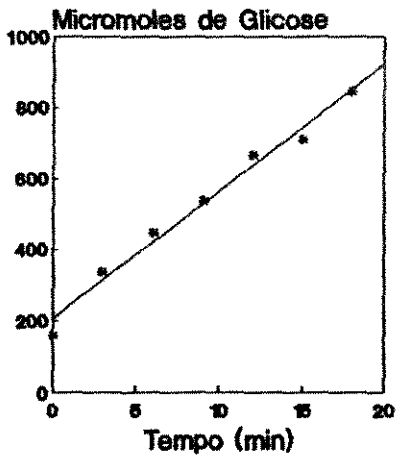
Merck (tratada a 243°C)



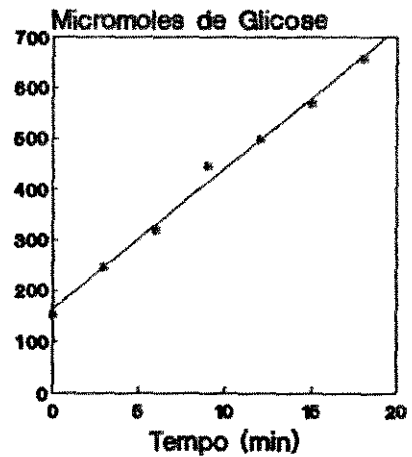
Merck (tratada a 265°C)



Merck (tratada a 281°C)



Merck (tratada a 296°C)



Amostra: Sílica Merck (tratada a 265°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 118 mg
0	20,0	0,080	1,397	155,2	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,124	2,267	245,6	
6	19,0	0,174	3,255	343,6	Taxa de Reação: 28,92 μmol/min
9	18,5	0,233	4,420	454,3	
12	18,0	0,263	5,013	501,3	Atividade Total: 245 U/g síl.
15	17,5	0,318	6,100	593,1	
18	17,0	0,374	7,207	680,7	

Amostra: Sílica Merck (tratada a 281°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 126 mg
0	20,0	0,082	1,437	159,7	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,167	3,116	337,6	
6	19,0	0,224	4,242	447,8	Taxa de Reação: 35,89 μmol/min
9	18,5	0,273	5,211	535,6	
12	18,0	0,346	6,653	665,3	Atividade Total: 282 U/g síl.
15	17,5	0,378	7,286	708,4	
18	17,0	0,462	8,945	844,8	

Amostra: Sílica Merck (tratada a 296°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 118 mg
0	20,0	0,075	1,377	153,0	Diluição da Amostra: 1/10
3	19,5	0,124	2,267	245,6	
6	19,0	0,163	3,037	320,6	Taxa de Reação: 27,74 μmol/min
9	18,5	0,228	4,322	444,2	
12	18,0	0,260	4,954	495,4	Atividade Total: 235 U/g síl.
15	17,5	0,305	5,843	568,1	
18	17,0	0,361	6,950	656,4	

ANEXO VI

IMOBILIZAÇÃO DE AMIOGLICOSIDASE NA SILICA SÉRIE III

Enzima: Amiloglicosidase a 9.78 mg prot./ml

Tempo de Imobilização: 40 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = 0,0024 + 0,527429 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg ₇ ml)	[Prot] cor. (mg ₇ ml)	Imob (mg ₇ g)
TA	9453	88	9641	100	10046	405	,356	7,72	9,63	0,69
152	9304	85	9498	109	9905	407	,289	6,24	7,91	8,90
180	9569	85	9751	97	10163	412	,223	4,80	5,92	18,7
200	9410	92	9606	104	10008	402	,177	3,79	4,76	21,9
213	9424	86	9608	98	10020	412	,206	4,43	5,49	20,5
224	9381	89	9570	100	9985	415	,208	4,47	5,55	19,7
234	9397	88	9585	100	10000	415	,213	4,57	5,67	19,4
243	9444	90	9635	101	10042	407	,221	4,75	5,93	17,4
250	9425	90	9613	98	10018	405	,238	5,13	6,38	15,4
258	9372	90	9568	106	9568	414	,254	5,49	6,89	13,3

Amostra: Sílica Série III (sem tratamento = TA)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 88 mg
0	50,0	0,090	1,66	461,0	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,092	"	"	
4	49,0	0,089	"	"	Taxa de Reação: 00,00 µmol/min
6	48,5	0,090	"	"	
8	48,0	0,090	"	"	Atividade Total: 0 U/g síl.
10	47,5	0,092	"	"	
12	47,0	0,093	"	"	
14	46,5	0,087	"	"	

Amostra: Sílica Série III (tratada a 152°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 85 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,105	1,95	536	Taxa de Reação: 29,05 μmol/min
4	49,0	0,120	2,23	607	Atividade
6	48,5	0,128	2,38	641	Total: 342 U/g síl.
8	48,0	0,150	2,80	747	Específica:
10	47,5	0,155	2,89	763	38 U/mg prot.
12	47,0	0,163	3,04	794	
14	46,5	0,182	3,41	881	

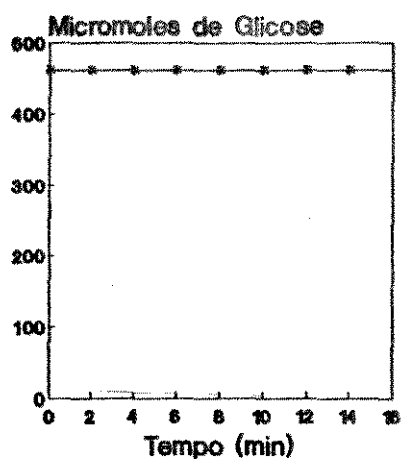
Amostra: Sílica Série III (tratada a 180°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 85 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,102	1,89	520	Taxa de Reação: 47,79 μmol/min
4	49,0	0,126	2,34	637	Atividade
6	48,5	0,139	2,59	698	Total: 562 U/g síl.
8	48,0	0,166	3,10	827	Específica:
10	47,5	0,183	3,42	903	30 U/mg prot.
12	47,0	0,206	3,86	1008	
14	46,5	0,230	4,32	1160	

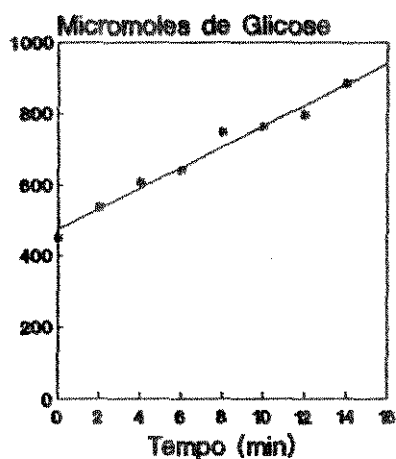
Amostra: Sílica Série III (tratada a 200°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 92 mg
0	50,0	0,090	1,66	461	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,111	2,06	567	Taxa de Reação: 49,11 μmol/min
4	49,0	0,126	2,34	637	Atividade
6	48,5	0,149	2,78	749	Total: 534 U/g síl.
8	48,0	0,174	3,26	869	Específica:
10	47,5	0,189	3,54	934	24 U/mg prot.
12	47,0	0,208	3,90	1018	
14	46,5	0,242	4,54	1173	

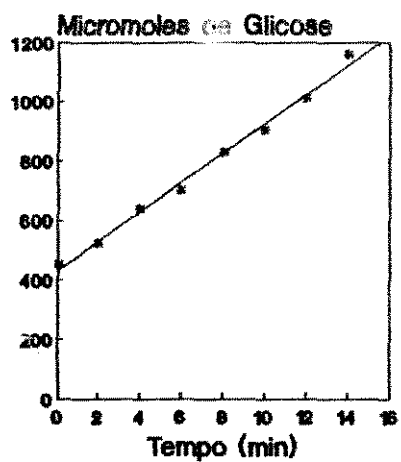
Serie III (sem tratamento)



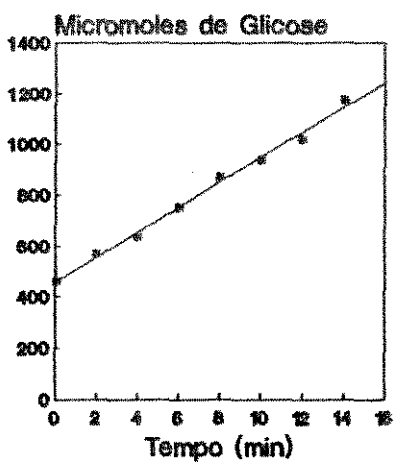
Serie III (tratada a 152°C)



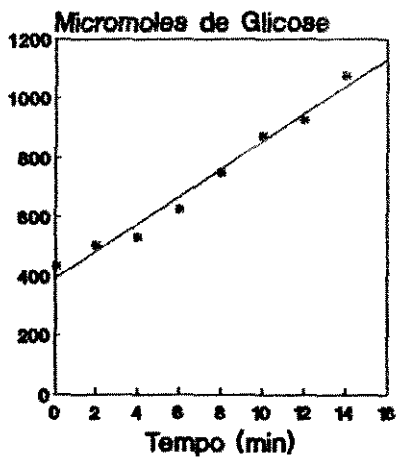
Serie III (tratada a 180°C)



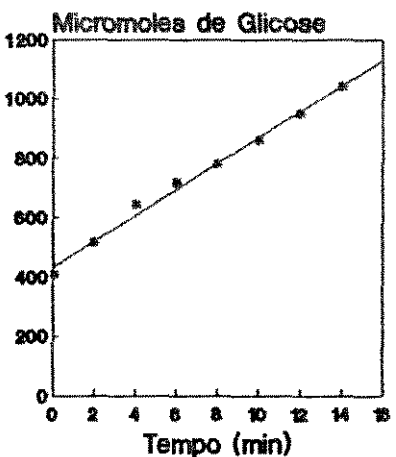
Serie III (tratada a 200°C)



Serie III (tratada a 213°C)



Serie III (tratada a 224°C)



Amostra: Sílica Série III (tratada a 213°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 86 mg
0	50,0	0,084	1,55	431	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,099	1,83	503	
4	49,0	0,105	1,95	531	Taxa de Reação: 46,07 μ mol/min
6	48,5	0,125	2,32	625	
8	48,0	0,150	2,80	747	Atividade
10	47,5	0,176	3,29	868	Total: 536 U/g síl.
12	47,0	0,189	3,54	924	Específica:
14	46,5	0,222	4,16	1074	26 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série III (tratada a 224°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 89 mg
0	50,0	0,080	1,47	408	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,101	1,87	514	
4	49,0	0,127	2,36	642	Taxa de Reação: 43,50 μ mol/min
6	48,5	0,143	2,66	717	
8	48,0	0,156	2,91	776	Atividade
10	47,5	0,174	3,25	858	Total: 489 U/g síl.
12	47,0	0,194	3,63	948	Específica:
14	46,5	0,215	4,03	1041	25 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série III (tratada a 234°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 88 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,105	1,95	536	
4	49,0	0,132	2,46	670	Taxa de Reação: 46,51 μ mol/min
6	48,5	0,146	2,72	733	
8	48,0	0,166	3,10	827	Atividade
10	47,5	0,186	3,48	918	Total: 528 U/g síl.
12	47,0	0,213	3,99	1042	Específica:
14	46,5	0,224	4,20	1085	27 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série III (tratada a 243°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 90 mg
0	30,0	0,088	1,62	360	Diluição da Amostra: 1/10
2	39,5	0,108	2,00	444	Taxa de Reação: 30,91 μmol/min
4	39,0	0,123	2,28	500	Atividade
6	38,5	0,137	2,55	553	Total: 343 U/g síl.
8	38,0	0,155	2,89	618	Específica:
10	37,5	0,168	3,14	663	20 U/mg prot.
12	37,0	0,193	3,61	752	
14	-	-	-	-	

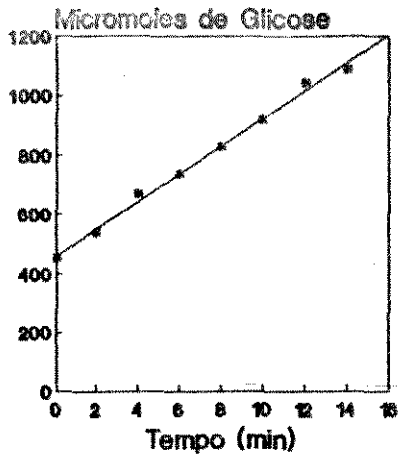
Amostra: Sílica Série III (tratada a 250°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 90 mg
0	50,0	0,088	1,62	460	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,102	1,89	520	Taxa de Reação: 29,27 μmol/min
4	49,0	0,115	2,13	580	Atividade
6	48,5	0,123	2,29	617	Total: 325 U/g síl.
8	48,0	0,137	2,55	680	Específica:
10	47,5	0,150	2,80	739	21 U/mg prot.
12	47,0	0,164	3,06	799	
14	46,5	0,181	3,39	876	

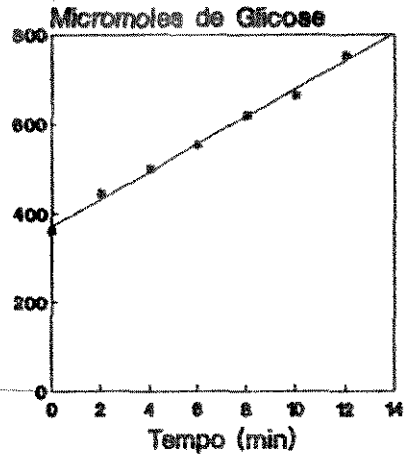
Amostra: Sílica Série III (tratada a 258°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 90 mg
0	50,0	0,098	1,81	431	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,110	2,04	503	Taxa de Reação: 22,52 μmol/min
4	49,0	0,117	2,17	531	Atividade
6	48,5	0,127	2,36	625	Total: 250 U/g síl.
8	48,0	0,134	2,50	747	Específica:
10	47,5	0,142	2,65	868	19 U/mg prot.
12	47,0	0,161	3,01	924	
14	46,5	0,172	3,22	1074	

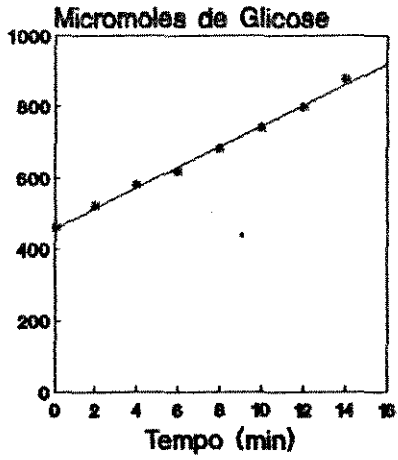
Serie III (tratada a 234°C)



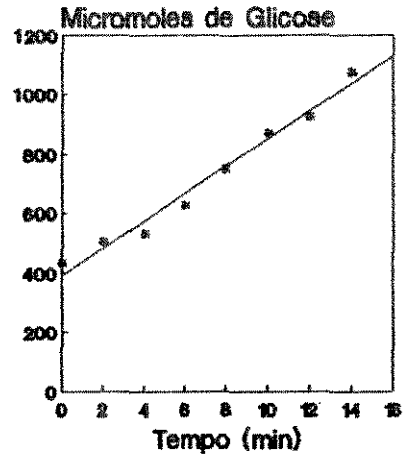
Serie III (tratada a 243°C)



Serie III (tratada a 250°C)



Serie III (tratada a 258°C)



ANEXO VII

IMOBILIZAÇÃO DE AMIOGLICOSIDASE NA SÍLICA SÉRIE IV

Enzima: Amiloglicosidase a 10,49 mg prot./ml

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Amostras TA, 130 e 152: 5 µl

Condições: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = 0,0024 + 0,527429 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra	Tara (mg)	Síl. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
TA	9399	95	9610	116	10136	526	,210	9,04	11,03	0,00
130	9333	96	9566	137	10088	522	,206	8,86	11,19	0,00
152	9425	102	9667	140	10189	522	,188	4,04	5,12	27,5
192	9474	98	9724	152	10245	521	,114	2,41	3,11	39,2
215	9304	98	9542	140	10065	523	,089	1,86	2,35	43,4
240	9439	99	9698	160	10212	514	,169	3,46	4,54	30,9
SPC	9452	98	9690	140	10207	517	,100	2,10	2,67	41,3

Amostra: Sílica Série IV (tratada a 152°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 102 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,103	1,91	525	Taxa de Reação: 21,41 µmol/min
4	49,0	0,107	1,98	539	Atividade
6	48,5	0,119	2,21	595	Total: 210 U/g síl.
8	48,0	0,127	2,36	629	Específica:
10	47,5	0,137	2,55	673	7,64 U/mg prot.
12	47,0	0,148	2,76	721	

Amostra: Sílica Série IV (tratada a 192°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 98 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,108	2,00	550	Taxa de Reação: 66,29 µmol/min
4	49,0	0,135	2,51	683	Atividade
6	48,5	0,158	2,95	795	Total: 676 U/g síl.
8	48,0	0,189	3,54	944	Específica: 17,24 U/mg prot.
10	47,5	0,222	4,16	1098	
12	47,0	0,252	4,73	1235	

Amostra: Sílica Série IV (tratada a 215°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 98 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,109	2,02	556	Taxa de Reação: 64,98 µmol min
4	49,0	0,141	2,63	716	Atividade
6	48,5	0,171	3,20	862	Total: 663 U/g síl.
8	48,0	0,203	3,80	1013	Específica: 15,30 U/mg prot.
10	47,5	0,224	4,20	1108	
12	47,0	0,244	4,58	1196	

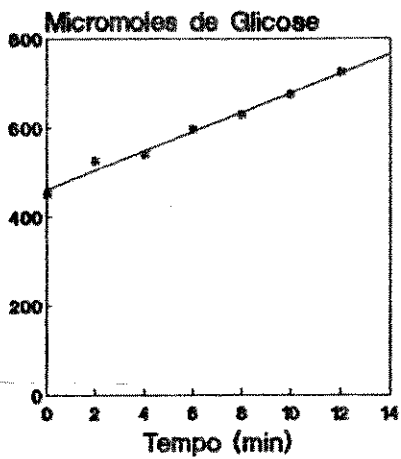
Amostra: Sílica Série IV (tratada a 240°C)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 99 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,110	2,04	561	Taxa de Reação: 55,54 µmol/min
4	49,0	0,136	2,53	689	Atividade
6	48,5	0,166	3,10	835	Total: 561 U/g síl.
8	48,0	0,188	3,52	939	Específica: 18,15 U/mg prot.
10	47,5	0,207	3,88	1013	
12	47,0	0,225	4,22	1102	

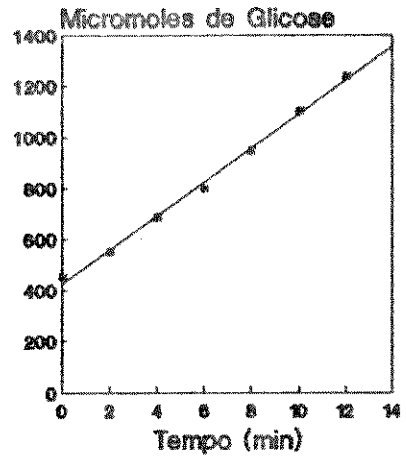
Amostra: Sílica SPC da Corning

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 98 mg
0	50,0	0,088	1,62	450	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,118	2,19	602	Taxa de Reação: 87,18 µmol/min
4	49,0	0,155	2,89	787	Atividade
6	48,5	0,192	3,59	967	Total: 890 U/g síl.
8	48,0	0,229	4,30	1146	Específica: 21,50 U/mg prot.
10	47,5	0,265	4,98	1314	
12	47,0	0,302	5,68	1483	

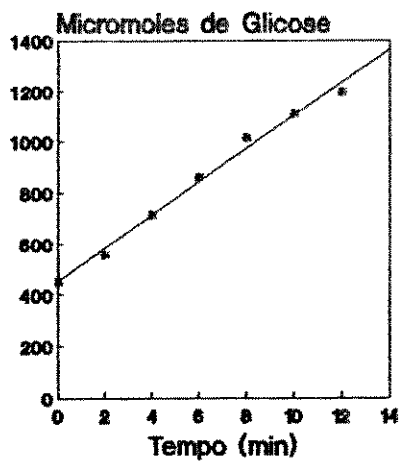
Serie IV (tratada a 152°C)



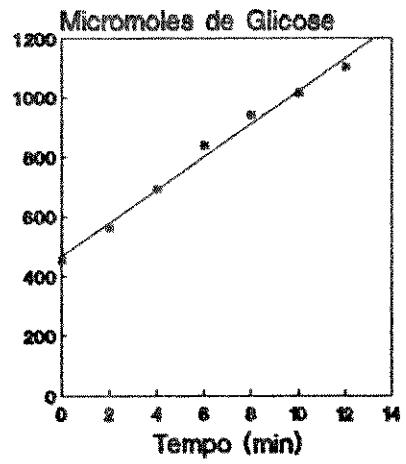
Serie IV (tratada a 192°C)



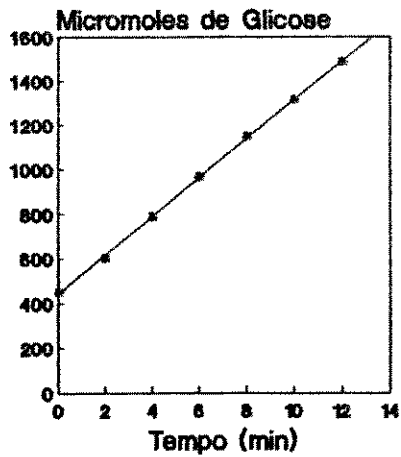
Serie IV (tratada a 215°C)



Serie IV (tratada a 240°C)



SPC da Corning



ANEXO VIII

IMOBILIZAÇÃO DE HRP NA SILICA SÉRIE V

Enzima: HRP a 4,64 mg proteína/ml

Quantidade adicionada: 200 µl = 0,928 mg de proteína

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para análise de proteína: 15 µl

Condições de Atividade: 25°C, pH 6,0, pirogalol (Método 2.5)

Amostra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Sobrenadante (pesagem) (mg)	Sobrenadante (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	Proteína (mg)	Imob (mg/g)
151	9470,9	18,8	9805-9410	395	0,131	1,474	0,582	18,4
181	9451,7	24,4	9832-9433	399	0,061	0,719	0,287	26,3
203	9332,0	22,1	9821-9408	413	0,088	1,010	0,417	23,1
215	9303,3	26,2	9836-9438	398	0,090	1,031	0,410	19,8
225	9387,3	24,9	9777-9375	402	0,103	1,170	0,470	18,4
236	9431,2	21,1	9783-9384	399	0,119	1,343	0,536	18,6
245	9423,3	23,0	9806-9413	393	0,123	1,387	0,545	16,6
255	9397,2	23,7	9927-9529	398	0,127	1,430	0,569	15,1

Amostra: Enzima HRP Livre

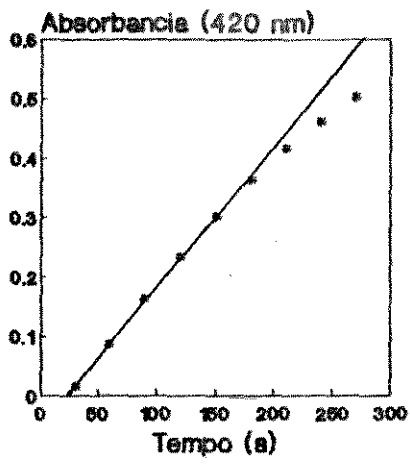
Tempo (s)	V _R (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	concentração da enzima na reação: 8E-3 µg/ml
30	29,0	0,015		inclinação da reta
60	28,0	0,087		(ΔAbs/Δt): 2,392E-3
90	27,0	0,162		
120	26,0	0,233		Atividade (20.ΔA/12):
150	25,0	0,301		Total: 3,988E-3 U/ml
180	24,0	0,362		Específica:
210	23,0	0,416		498,5 U/mg proteína
240	22,0	0,462		
270	21,0	0,502		

Amostra: Sílica Série V (tratada a 151°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 6,2 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t)x1000: 1,873
30	29,0	-0,030	-0,030	Atividade (20.ΔA.29/12.m): Total: 14,60 U/g sílica Específica: 0,793 U/mg proteína
60	28,0	0,027	0,026	
90	27,0	0,090	0,084	
120	26,0	0,154	0,138	
150	25,0	0,218	0,188	
180	24,0	0,275	0,228	
210	23,0	0,330	0,262	
240	22,0	0,382	0,290	

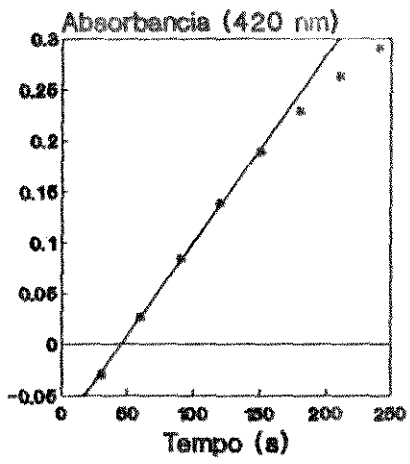
Amostra: Sílica Série V (tratada a 181°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 3,8 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t)x1000: 1,242
30	29,0	-0,035	-0,035	Atividade (20.ΔA.29/12.m): Total: 15,80 U/g sílica Específica: 0,600 U/mg proteína
60	28,0	0,006	0,006	
90	27,0	0,043	0,040	
120	26,0	0,086	0,077	
150	25,0	0,133	0,115	
180	24,0	0,185	0,153	
210	23,0	0,238	0,189	
240	22,0	0,294	0,223	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 203°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 5,0 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t)x1000: 1,596
30	29,0	-0,035	-0,035	Atividade (20.ΔA.29/12.m): Total: 15,43 U/g sílica Específica: 0,668 U/mg proteína
60	28,0	0,012	0,012	
90	27,0	0,064	0,060	
120	26,0	0,120	0,108	
150	25,0	0,182	0,157	
180	24,0	0,245	0,203	
210	23,0	0,311	0,247	
240	22,0	0,394	0,300	
270	21,0	0,484	0,350	

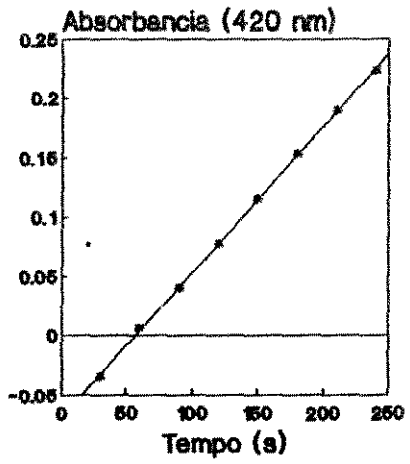
HRP Livre



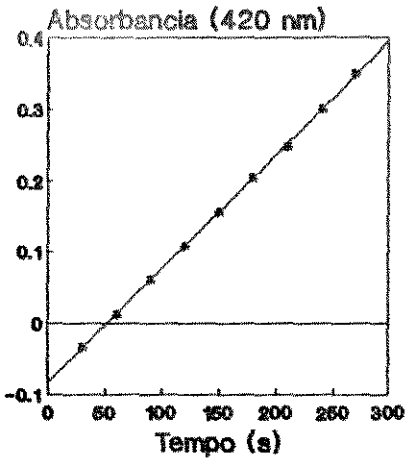
Serie V (151°C)



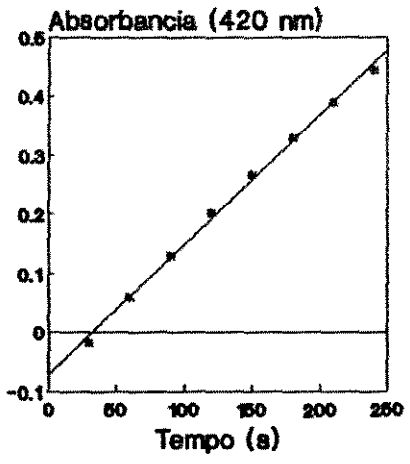
Serie V (181°C)



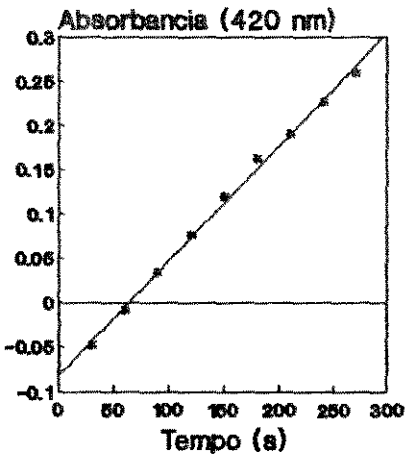
Serie V (203°C)



Serie V (215°C)



Serie V (225°C)

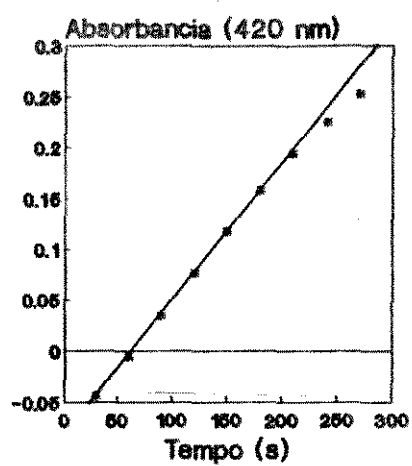


Amostra: Sílica Série V (tratada a 215°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	
30	29,0	-0,019	-0,019	massa de sílica: 7,4 mg
60	28,0	0,060	0,058	inclinação da reta
90	27,0	0,139	0,129	($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 2,380
120	26,0	0,225	0,202	Atividade (20. ΔA .29/12.m):
150	25,0	0,308	0,266	Total: 15,55 U/g sílica
180	24,0	0,398	0,329	Específica:
210	23,0	0,489	0,388	0,785 U/mg proteína
240	22,0	0,584	0,443	

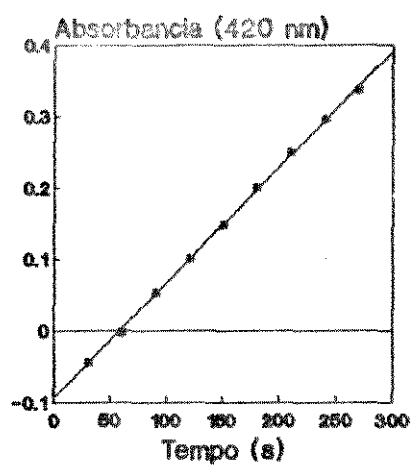
Amostra: Sílica Série V (tratada a 225°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	
30	29,0	-0,019	-0,049	massa de sílica: 4,8 mg
60	28,0	0,060	-0,009	inclinação da reta
90	27,0	0,139	0,034	($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,325
120	26,0	0,225	0,076	Atividade (20. ΔA .29/12.m):
150	25,0	0,308	0,119	Total: 13,34 U/g sílica
180	24,0	0,398	0,162	Específica:
210	23,0	0,489	0,190	0,725 U/mg proteína
240	22,0	0,584	0,225	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 236°C)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	
30	29,0	-0,044	-0,044	massa de sílica: 4,6 mg
60	28,0	-0,006	-0,006	inclinação da reta
90	27,0	0,037	0,034	($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,266
120	26,0	0,085	0,076	Atividade (20. ΔA .29/12.m):
150	25,0	0,136	0,117	Total: 13,30 U/g sílica
180	24,0	0,190	0,157	Específica:
210	23,0	0,245	0,194	0,715 U/mg proteína
240	22,0	0,297	0,225	
270	21,0	0,348	0,252	

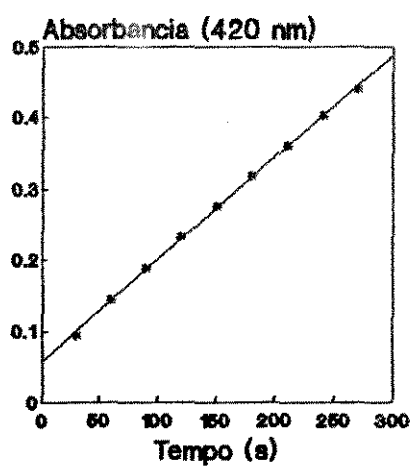
Serie V (236°C)



Serie V (245°C)



Serie V (255°C)



Amostra: Sílica Série V (tratada a 245°C)				
Tempo (s)	V _R (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 4,7 mg inclinação da reta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,606 Atividade (20. ΔA .29/12.m): Total: 16,52 U/g sílica Específica: 0,995 U/mg proteína
30	29,0	-0,044	-0,044	
60	28,0	0,003	0,003	
90	27,0	0,056	0,052	
120	26,0	0,112	0,100	
150	25,0	0,171	0,147	
180	24,0	0,241	0,200	
210	23,0	0,314	0,249	
240	22,0	0,289	0,295	
270	21,0	0,465	0,336	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 255°C)				
Tempo (s)	V _R (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 4,2 mg inclinação da reta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,438 Atividade (20. ΔA .29/12.m): Total: 16,50 U/g sílica Específica: 1,096 U/mg proteína
30	29,0	0,094	0,094	
60	28,0	0,148	0,143	
90	27,0	0,202	0,188	
120	26,0	0,259	0,232	
150	25,0	0,319	0,275	
180	24,0	0,384	0,318	
210	23,0	0,454	0,360	
240	22,0	0,528	0,401	
270	21,0	0,607	0,440	

IMOBILIZAÇÃO DE HRP NA SÍLICA SÉRIE V TRATADA A 181°C

VARIANDO-SE O TAMANHO DE PARTICULA

Enzima: HRP a 2,78 mg proteína/ml

Quantidade adicionada: 200 μ l = 0,556 mg de proteína

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para análise de proteína: 25 μ l

Condições de Atividade: 25°C, pH 6,0, pirogalol (Método 2.5)

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Sobrenadan- te(pesagem) (mg)	Sobre- nadan- te(mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg ml)	Protei- na (mg)	Imob (mg g)
24-32	9394,8	17,8	10049-9395	654	0,060	0,425	0,278	15,6
32-35	9407,8	20,0	9944-9301	643	0,059	0,418	0,268	14,4
35-42	9412,4	19,4	10046-9422	624	0,058	0,412	0,257	15,4
42-48	9374,2	17,6	10062-9428	634	0,062	0,438	0,278	15,8
48-60	9378,3	19,4	10087-9454	633	0,059	0,418	0,264	15,0
60-65	9477,7	17,5	10099-9450	649	0,063	0,444	0,288	15,3

Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C, 24-32 mesh (0,604 mm)

Tempo (s)	V _R (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	
30	29,0	-0,056	-0,056	massa de sílica: 4,8 mg inclinação da reta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,800 Atividade (20. ΔA .29/12.m): Total: 18,1 U/g sílica Específica: 1,16 U/mg proteína
60	28,0	-0,002	-0,002	
90	27,0	0,057	0,053	
120	26,0	0,120	0,108	
150	25,0	0,185	0,159	
180	24,0	0,250	0,207	
210	23,0	0,315	0,250	
240	22,0	0,383	0,291	

Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C, 32-35 mesh (0,460 mm)

Tempo (s)	V _R (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	
30	29,0	-0,056	-0,056	massa de sílica: 3,9 mg inclinação da reta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 1,444 Atividade (20. ΔA .29/12.m): Total: 17,9 U/g sílica Específica: 1,24 U/mg proteína
60	28,0	-	-	
90	27,0	0,025	0,024	
120	26,0	0,075	0,070	
150	25,0	0,127	0,114	
180	24,0	0,184	0,159	
210	23,0	0,245	0,203	
240	22,0	0,310	0,246	
270	21,0	0,377	0,286	

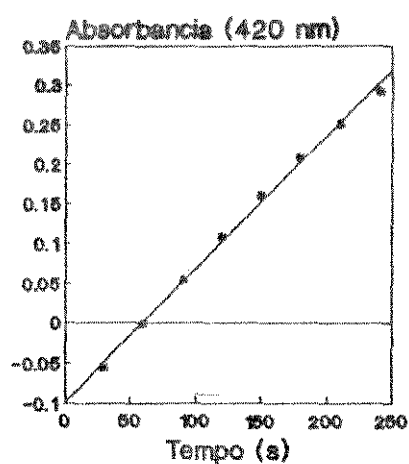
Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C, 35-42 mesh (0,387 mm)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 3,9 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t) $\times$ 1000: 1,607
30	29,0	-0,050	-0,056	Atividade (20. Δ A.29/12.m): Total: 19,9 U/g sílica Específica: 1,29 U/mg proteína
60	28,0	-0,002	-0,002	
90	27,0	0,051	0,047	
120	26,0	0,056	0,086	
150	25,0	0,162	0,140	
180	24,0	0,225	0,186	
210	23,0	0,292	0,232	
240	22,0	0,388	0,294	

Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C, 42-48 mesh (0,326 mm)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 4,2 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t) $\times$ 1000: 2,590
30	29,0	-0,035	-0,056	Atividade (20. Δ A.29/12.m): Total: 29,8 U/g sílica Específica: 1,89 U/mg proteína
60	28,0	0,045	0,043	
90	27,0	0,127	0,118	
120	26,0	0,211	0,189	
150	25,0	0,304	0,262	
180	24,0	0,398	0,329	
210	23,0	0,501	0,397	
240	22,0	0,620	0,470	

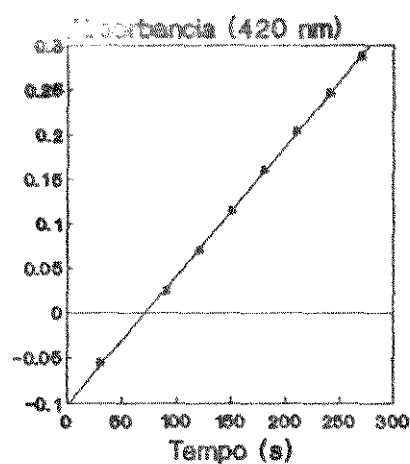
Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C, 48-60 mesh (0,274 mm)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 4,8 mg inclinação da reta (Δ Abs/ Δ t) $\times$ 1000: 4,083
30	29,0	-0,010	-0,010	Atividade (20. Δ A.29/12.m): Total: 36,9 U/g sílica Específica: 2,46 U/mg proteína
60	28,0	0,108	0,104	
90	27,0	0,237	0,221	
120	26,0	0,394	0,353	
150	25,0	0,554	0,478	
180	24,0	0,715	0,592	
210	23,0	0,875	0,694	
240	22,0	-	-	

Amostra: Silica Série V tratada a 181°C, 60-65 mesh (0,230 mm)				
Tempo (s)	V _m (ml)	Abs (420nm)	Abs corrigida	massa de sílica: 3,1 mg inclinação da reta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) $\times 1000$: 3,153 Atividade (20. ΔA .29/12.m): Total: 49,2 U/g sílica Específica: 3,21 U/mg proteína
30	29,0	-0,024	-0,024	
60	28,0	0,078	0,075	
90	27,0	0,188	0,175	
120	26,0	0,298	0,267	
150	25,0	0,410	0,353	
180	24,0	0,516	0,427	
210	23,0	0,629	0,500	
240	22,0	0,740	0,561	

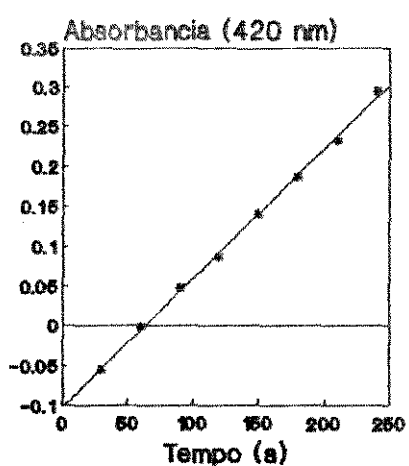
Serie V 24-32 mesh



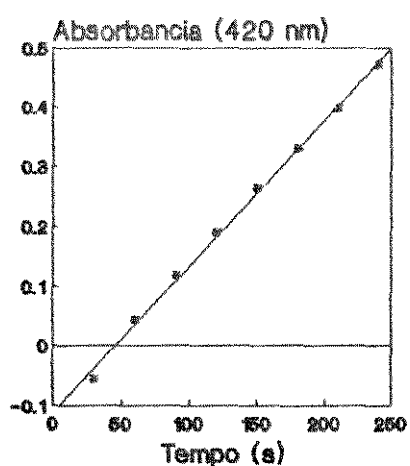
Serie V 32-35 mesh



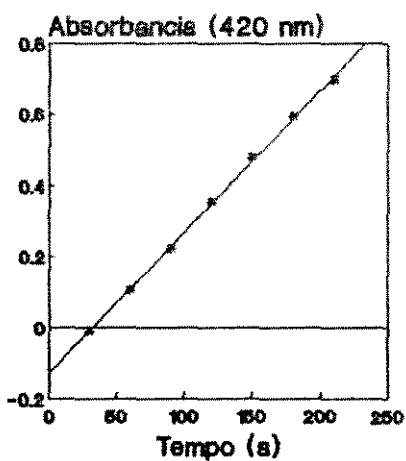
Serie V 34-42 mesh



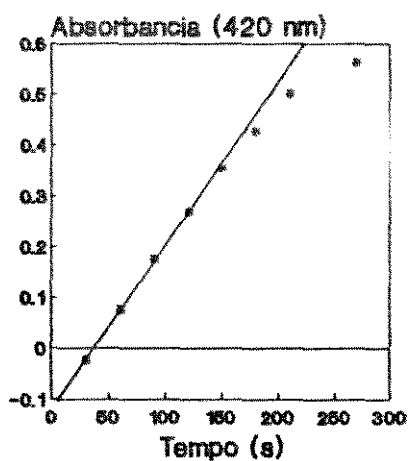
Serie V 42-48 mesh



Serie V 48-60 mesh



Serie V 60-65 mesh



ANEXO IX

IMOBILIZAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SILICA SÉRIE V

Enzima: Amiloglicosidase a 10,965 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 48 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -9,267 \cdot 10^{-3} + 0,4603 \times [\text{Glicose (mg/ml)}]$

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg _{ml})	[Prot] cor. (mg _{ml})	Imob (mg _g)
SPC	9398	73	9578	107	10118	610	,274	4,803	5,645	44,45
151	9396	108	9682	178	10190	608	,336	6,000	7,756	10,09
181	9455	75	9661	131	10270	609	,277	4,863	5,909	41,05
203	9371	71	9569	127	10162	593	,183	3,089	3,751	60,25
215	9434	75	9620	111	10225	605	,175	2,950	3,491	60,29
225	9414	75	9628	139	10228	600	,172	2,900	3,572	59,15
236	9438	71	9632	123	10235	603	,229	3,924	4,724	53,00
245	9410	71	9597	116	10197	600	,252	4,367	5,211	48,62
255	9419	71	9635	115	10246	611	,276	4,843	5,755	44,84
270	9333	75	9538	130	10144	606	,299	5,331	6,450	36,48

Amostra: Enzima Amiloglicosidase Livre

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol/ml	Concentração da en- zima: 27,41 µg/ml
0	50,0	0,075	1,83	10,17	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,111	2,61	14,50	
4	49,0	0,130	3,03	16,83	Taxa de Reação: 1,555 µmol/ml.min
6	48,5	0,164	3,76	20,89	
8	48,0	0,183	4,18	23,22	Atividade Específica 56,7 U/mg prot.
10	47,5	0,207	4,70	26,11	
12	47,0	0,234	5,28	29,33	

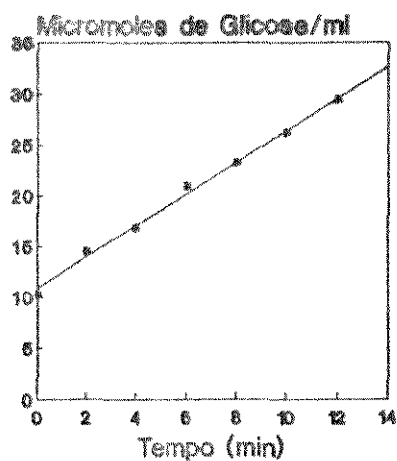
Amostra: Silica SPC da Corning					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 73 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,095	2,27	623	
4	49,0	0,126	2,94	800	Taxa de Reação: 72,90 μmol/min
6	48,5	0,153	3,52	950	
8	48,0	0,183	4,18	1114	Atividade Total: 999 U/g síl. Específica: 22,5 U/mg prot.
10	47,5	0,204	4,63	1223	
12	47,0	0,230	5,20	1357	

Amostra: Silica Série V (tratada a 181°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 75 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,083	2,00	551	
4	49,0	0,110	2,59	705	Taxa de Reação: 60,77 μmol/min
6	48,5	0,127	2,96	798	
8	48,0	0,152	3,50	934	Atividade Total: 810 U/g síl. Específica: 19,7 U/mg prot.
10	47,5	0,175	4,00	1056	
12	47,0	0,196	4,46	1164	

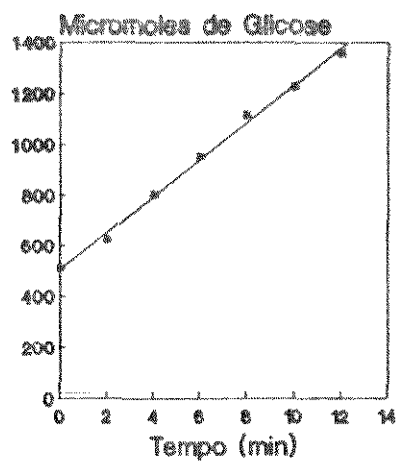
Amostra: Silica Série V (tratada a 203°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 71 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,085	2,05	563	
4	49,0	0,106	2,50	682	Taxa de Reação: 59,49 μmol/min
6	48,5	0,127	2,96	798	
8	48,0	0,150	3,46	923	Atividade Total: 838 U/g síl. Específica: 13,9 U/mg prot.
10	47,5	0,173	3,96	1045	
12	47,0	0,194	4,42	1153	

Amostra: Silica Série V (tratada a 215°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 75 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,092	2,20	605	
4	49,0	0,109	2,57	699	Taxa de Reação: 67,20 μmol/min
6	48,5	0,140	3,24	874	
8	48,0	0,161	3,70	986	Atividade Total: 896 U/g síl. Específica: 14,9 U/mg prot.
10	47,5	0,184	4,20	1108	
12	47,0	0,216	4,89	1278	

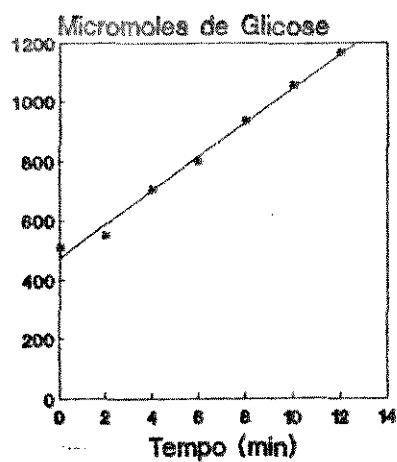
Amiloglicosidase Livre



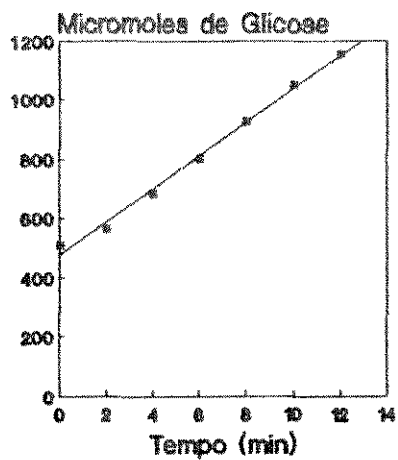
SPC da Corning



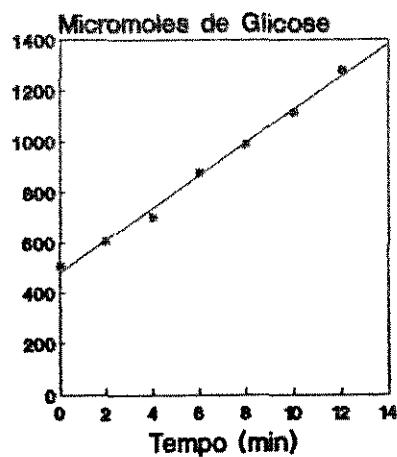
Serie V (181°C)



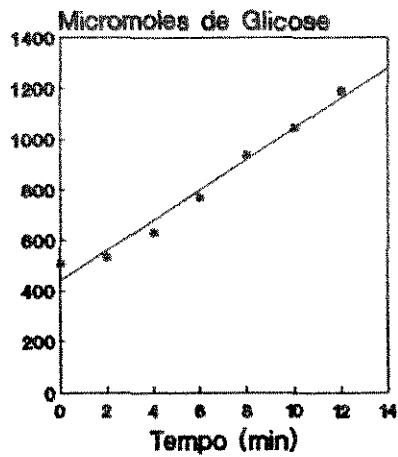
Serie V (203°C)



Serie V (215°C)



Serie V (225°C)



Amostra: Sílica Série V (tratada a 225°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 75 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,080	1,94	533	
4	49,0	0,097	2,30	628	Taxa de Reação: 66,70 μ mol/min
6	48,5	0,122	2,85	768	
8	48,0	0,152	3,50	934	Atividade Total: 889 U/g sil. Específica: 15,0 U/mg prot.
10	47,5	0,172	3,94	1039	
12	47,0	0,200	4,55	1187	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 236°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 71 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,089	2,13	587	
4	49,0	0,107	2,53	688	Taxa de Reação: 61,14 μ mol/min
6	48,5	0,131	3,05	821	
8	48,0	0,156	3,59	957	Atividade Total: 861 U/g sil. Específica: 16,2 U/mg prot.
10	47,5	0,174	3,98	1051	
12	47,0	0,202	4,59	1198	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 245°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 71 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,093	2,22	611	
4	49,0	0,113	2,66	723	Taxa de Reação: 52,37 μ mol/min
6	48,5	0,130	3,03	815	
8	48,0	0,148	3,42	911	Atividade Total: 738 U/g sil. Específica: 15,2 U/mg prot.
10	47,5	0,170	3,89	1028	
12	47,0	0,192	4,37	1142	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 255°C)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μ mol	massa de sílica: 71 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,088	2,11	581	
4	49,0	0,107	2,53	688	Taxa de Reação: 51,87 μ mol/min
6	48,5	0,124	2,90	780	
8	48,0	0,142	3,29	876	Atividade Total: 731 U/g sil. Específica: 16,3 U/mg prot.
10	47,5	0,163	3,74	988	
12	47,0	0,186	4,24	1108	

Amostra: Sílica Série V (tratada a 270°C)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 75 mg
0	50,0	0,075	1,83	508	Diluição da Amostra: 1/10
2	49,5	0,095	2,27	623	
4	49,0	-	2,57	699	Taxa de Reação: 46,56 μmol/min
6	48,5	0,126	2,94	792	
8	48,0	0,144	3,33	888	Atividade Total: 621 U/g síl. Específica: 17,0 U/mg prot.
10	47,5	0,159	3,66	965	
12	47,0	0,184	4,20	1096	

IMOBILIZAÇÃO DE AMIOGLICOSIDASE NA SÍLICA SÉRIE V TRATADA A 215°C
VARIANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULA

Enzima: Amiloglicosidase a 11,575 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

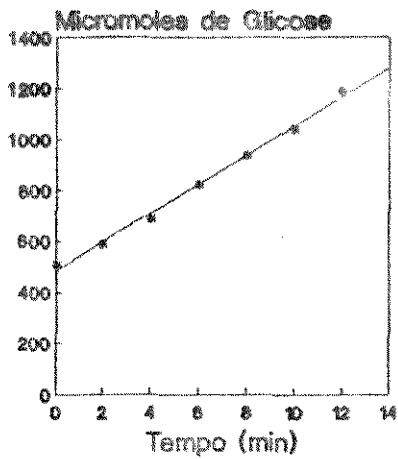
Volume de amostra para análise de proteína: 10 μl

Condições de Atividade: 4 5°C, pH 4,50, amido 5% (Método)

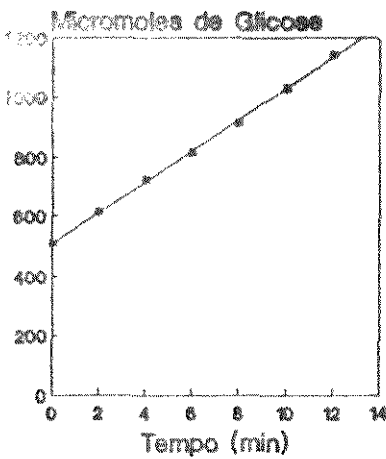
Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Síl. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	94725	21,3	95054	32,9	206	0,292	5,168	5,993	54,0
32-35	94689	20,6	95015	32,6	201	0,299	5,311	6,177	52,7
35-42	94335	21,0	94663	32,8	201	0,281	4,944	5,751	55,7
42-48	94442	21,6	94834	39,2	205	0,286	5,045	6,010	52,8
48-60	94574	20,0	94953	37,9	201	0,298	5,290	6,288	53,1
60-65	94993	21,1	95438	44,5	202	0,267	4,663	5,690	56,3

Amostra: Enzima Amiloglicosidase Livre					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol/ml	Concentração da en- zima: 16,54 μg/ml
2	35,0	0,170	2,382	13,23	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,202	2,840	15,78	
6	34,0	0,232	3,270	18,17	Taxa de Reação: 1,118 μmol/ml.min
8	33,5	0,255	3,600	20,00	
10	33,0	0,284	4,015	22,30	Atividade Específica 67,6 U/mg prot.
12	32,5	0,313	4,430	24,61	

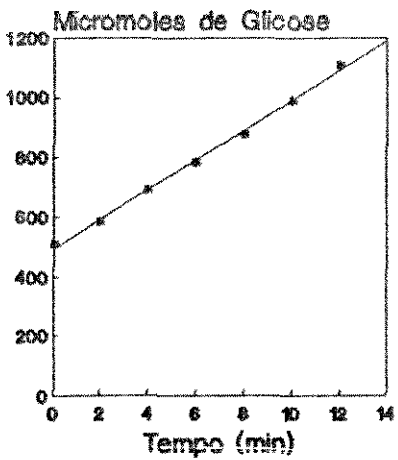
Serie V (236°C)



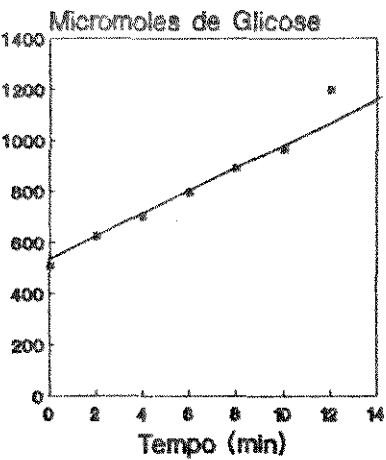
Serie V (245°C)



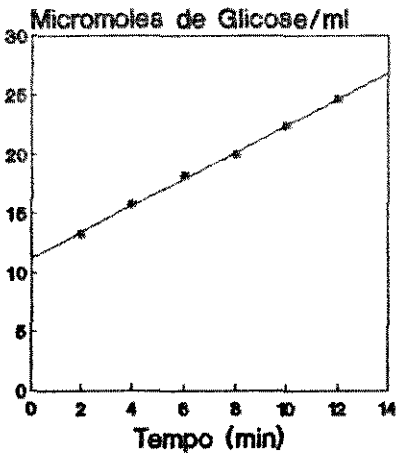
Serie V (255°C)



Serie V (270°C)



Amiloglicosidase Livre



Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (Ø,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 21,3 mg
2	35,0	0,265		337,9	Diluição da Amostra: 1/4
4	34,5	0,290		354,7	
6	34,0	0,340	2,406	477,6	Taxa de Reação: 21,82 µmol/min
8	33,5	0,362	2,566	522,9	Atividade Total: 1024 U/g
10	33,0	0,402	2,852	577,1	
12	32,5	0,450	3,196		Específica: 19,0 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (Ø,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 20,6 mg
2	35,0	0,130	1,809	351,7	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,145	2,024	387,9	
6	34,0	0,167	2,339	441,8	Taxa de Reação: 23,91 µmol/min
8	33,5	0,183	2,568	478,0	Atividade Total: 1161 U/g
10	33,0	0,206	2,898	531,2	
12	32,5	0,236	3,327	600,7	Específica: 22,0 U/mg prot.

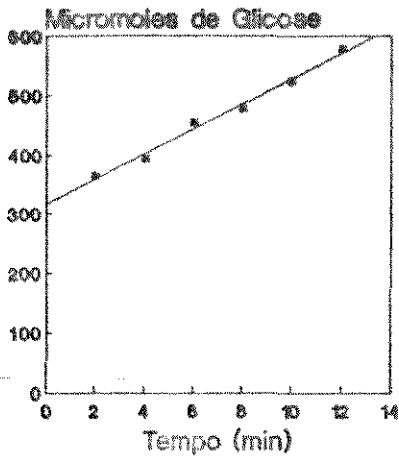
Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (Ø,387 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 21,0 mg
2	35,0	0,135	1,881	365,7	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,160	2,239	429,1	
6	34,0	0,184	2,582	487,8	Taxa de Reação: 21,12 µmol/min
8	33,5	0,208	2,926	544,6	Atividade Total: 1482 U/g
10	33,0	0,236	3,327	610,0	
12	32,5	0,268	3,786	683,5	Específica: 26,6 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 42-48 mesh (Ø,326 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 21,6 mg
2	35,0	0,145	2,024	393,5	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,172	2,411	462,0	
6	34,0	0,203	2,855	539,2	Taxa de Reação: 38,12 µmol/min
8	33,5	0,236	3,327	619,2	Atividade Total: 1765 U/g
10	33,0	0,266	3,757	688,8	
12	32,5	0,300	4,244	766,3	Específica: 33,4 U/mg prot.

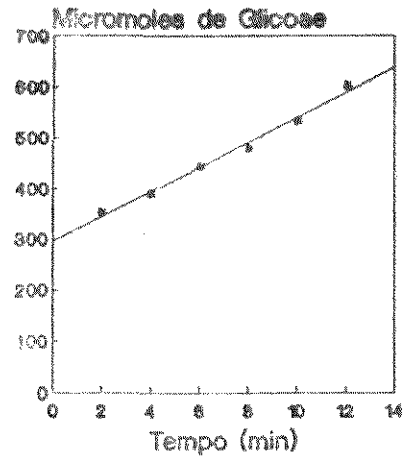
Amostra: Sílica Série V tratada à 215°C, 48-60 mesh (Ø,274 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 20,0 mg
2	35,0	0,144	2,009	390,7	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,171	2,396	459,3	
6	34,0	0,206	2,898	547,3	Taxa de Reação: 36,96 µmol/min
8	33,5	0,229	3,227	600,6	
10	33,0	0,263	3,714	680,9	Atividade Total: 1848 U/g
12	32,5	0,295	4,172	753,3	
				Específica: 34,8 U/mg prot.	

Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 60-65 mesh (Ø,230 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 21,1 mg
2	35,0	0,148	2,067	401,9	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,189	2,654	508,7	
6	34,0	0,232	3,270	617,7	Taxa de Reação: 51,51 µmol/min
8	33,5	0,267	3,771	701,9	
10	33,0	0,318	4,502	825,3	Atividade .Total: 2441 U/g
12	32,5	0,359	5,089	918,8	
				Específica: 43,4 U/mg prot.	

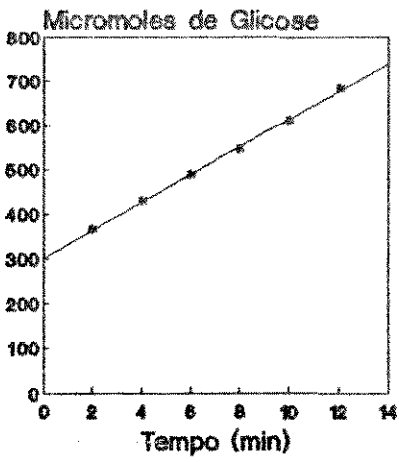
Serie V 24-32



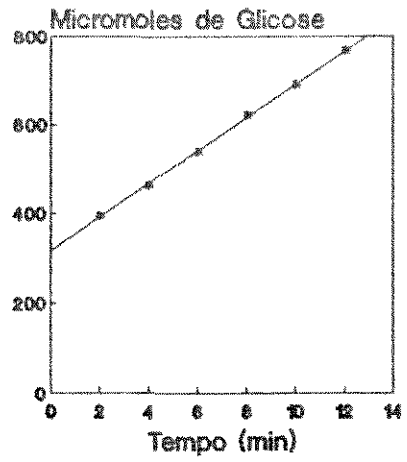
Serie V 32-35



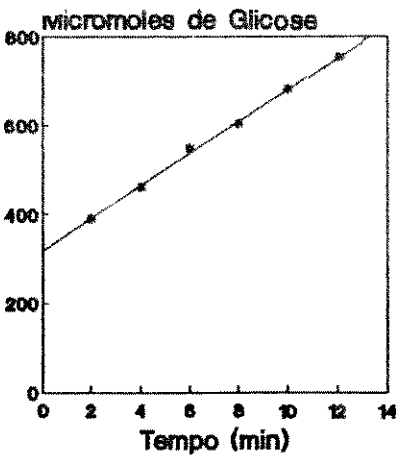
Serie V 35-42



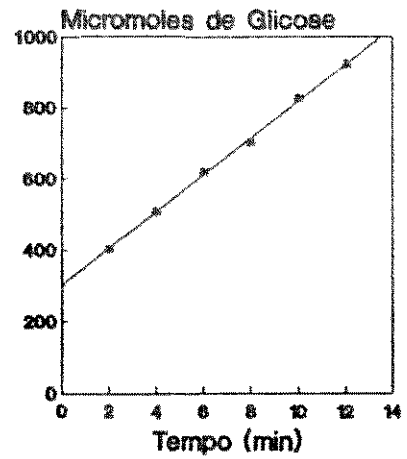
Serie V 42-48



Serie V 48-60



Serie V 40-65



ANEXO X

IMOBILIZAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SÍLICA SÉRIE V TRATADA A 215°C
VARIANDO-SE A QUANTIDADE DE ENZIMA E O TAMANHO DA PARTÍCULA

Enzima: Amiloglicosidase a 1,883 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 17 h

Volume de amostra para análise de proteína: 50 µl

Condições da Atividade: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -4,381 \cdot 10^{-3} + 0,6154 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	9455	52	9583	76	512	0,115	0,393	0,451	14,1
32-35	9430	53	9555	72	509	0,119	0,403	0,460	13,7
35-42	9469	51	9604	84	517	0,118	0,400	0,465	14,4
42-60	9446	49	9586	91	515	0,119	0,403	0,474	14,8
SPC	9409	50	9525	66	503	0,155	0,522	0,624	12,7

Amostra: Enzima Amiloglicosidase Livre					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol/ml	Concentração da en- zima: 23,54 µg/ml
2	35,0	0,113	2,66	14,75	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,133	3,09	17,17	
6	34,0	0,157	3,61	20,07	Taxa de Reação: 1,302 µmol/ml.min
8	33,5	0,177	4,05	22,48	
10	33,0	0,198	4,50	25,02	Atividade Específica 55,31 U/mg prot.
12	32,5	0,221	5,00	27,79	

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (0,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 52 mg
2	35,0	0,134	2,25	350	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,162	2,70	415	
6	34,0	0,185	3,08	465	Taxa de Reação: 27,47 µmol/min
8	33,5	0,214	3,55	528	
10	33,0	0,239	3,95	580	Atividade Total: 528 U/g Específica: 37,5 U/mg prot.
12	32,5	0,261	4,31	623	

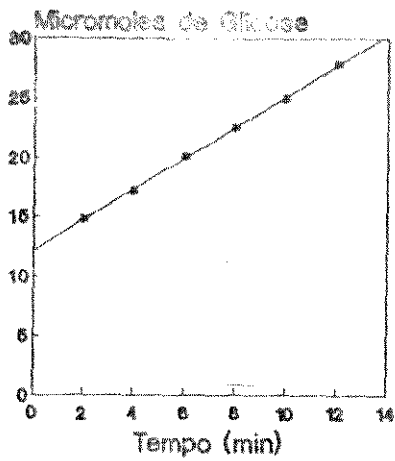
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (Ø,460 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,135	2,26	352	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,162	2,70	415	
6	34,0	0,187	3,11	470	Taxa de Reação: 30,16 µmol/min
8	33,5	0,208	3,45	514	
10	33,0	0,245	4,05	594	Atividade Total: 569 U/g
12	32,5	0,276	4,56	658	
				Específica: 41,5 U/mg prot.	

Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (Ø,387 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 51 mg
2	35,0	0,141	2,36	367	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,165	2,75	422	
6	34,0	0,190	3,16	477	Taxa de Reação: 30,70 µmol/min
8	33,5	0,218	3,61	538	
10	33,0	0,253	4,18	613	Atividade Total: 602 U/g
12	32,5	0,281	4,64	670	
				Específica: 41,8 U/mg prot.	

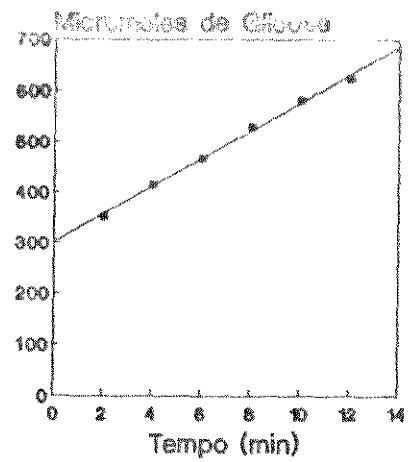
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 42-60 mesh (Ø,298 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 49 mg
2	35,0	0,139	2,33	362	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,165	2,75	422	
6	34,0	0,193	3,21	478	Taxa de Reação: 30,96 µmol/min
8	33,5	0,218	3,61	538	
10	33,0	0,252	4,17	611	Atividade Total: 632 U/g
12	32,5	0,281	4,64	670	
				Específica: 42,7 U/mg prot.	

Amostra: SPC da Corning (Ø,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,125	2,10	327	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,147	2,46	377	
6	34,0	0,173	2,88	436	Taxa de Reação: 24,24 µmol/min
8	33,5	0,194	3,22	480	
10	33,0	0,217	3,60	528	Atividade Total: 485 U/g
12	32,5	0,237	3,92	567	
				Específica: 38,2 U/mg prot.	

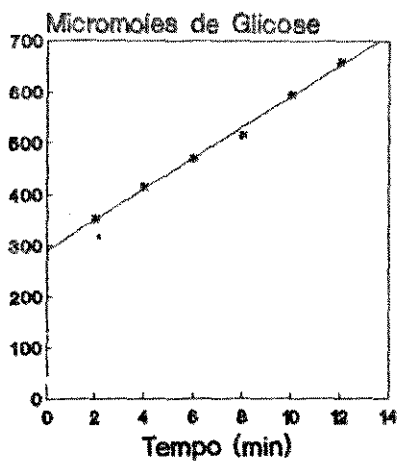
Amiloglucosidase Livre



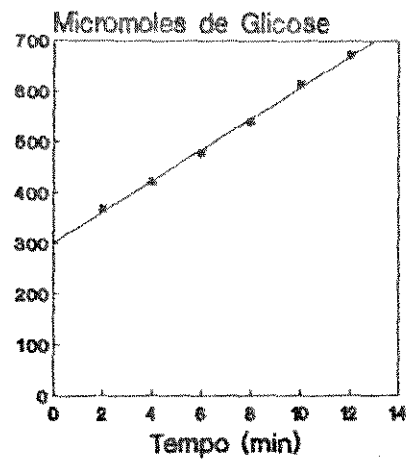
Serie V 24-32



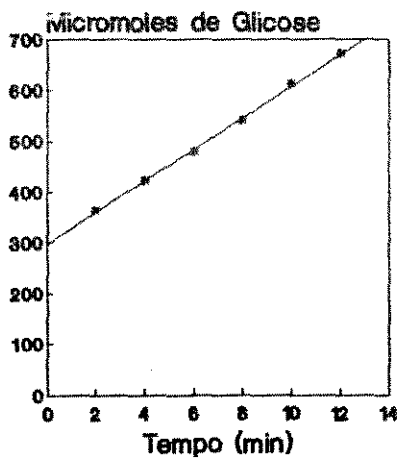
Serie V 32-35



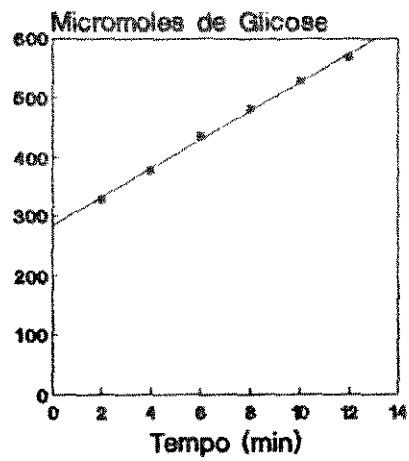
Serie V 35-42



Serie V 42-60



SPC



Enzima: Amiloglicosidase a 3,767 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 17 h

Volume de amostra para análise de proteína: 30 µl

Condições da Atividade: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -4,381 \cdot 10^{-3} + 0,6154 \times [\text{Glicose (mg/ml)}]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	9371	50	9500	79	520	0,160	0,898	1,03	28,5
32-35	9380	50	9515	85	515	0,163	0,915	1,07	27,8
35-42	9431	51	9580	98	512	0,168	0,943	1,12	26,6
42-60	9479	53	9630	98	510	0,150	0,822	0,980	26,8
SPC	9367	51	9494	76	511	0,189	1,07	1,23	25,4

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (0,604 mm)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50. mg
2	35,0	0,163	2,72	423	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,195	3,24	497	
6	34,0	0,228	3,78	571	Taxa de Reação: 33,70 µmol/min
8	33,5	0,258	4,26	635	
10	33,0	0,290	4,78	702	Atividade Total: 674 U/g
12	32,5	0,319	5,25	759	
Específica: 23,6 U/mg prot.					

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (0,460 mm)

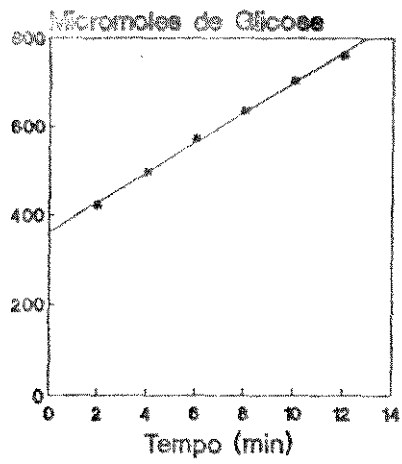
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,162	2,70	421	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,197	3,27	502	
6	34,0	0,234	3,87	584	Taxa de Reação: 39,77 µmol/min
8	33,5	0,262	4,33	644	
10	33,0	0,302	4,98	730	Atividade Total: 795 U/g
12	32,5	0,349	5,74	829	
Específica: 28,6 U/mg prot.					

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (0,387 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625 m)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 51 mg
2	35,0	0,119	2,64	410	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,193	3,21	492	
6	34,0	0,244	4,04	610	Taxa de Reação: 46,70 μmol/min
8	33,5	0,279	4,60	686	
10	33,0	0,318	5,24	768	Atividade Total: 916 U/g
12	32,5	0,372	6,11	883	
				Específica: 34,4 U/mg prot.	

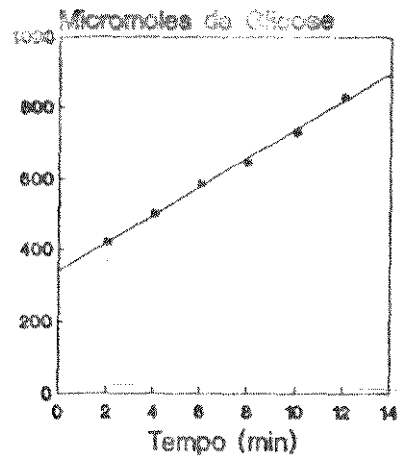
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 42-60 mesh (0,298 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,164	2,74	426	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,209	3,47	532	
6	34,0	0,263	4,34	657	Taxa de Reação: 54,66 μmol/min
8	33,5	0,304	5,01	746	
10	33,0	0,361	5,94	871	Atividade Total: 1031 U/g
12	32,5	0,409	6,72	970	
				Específica: 38,5 U/mg prot.	

Amostra: SPC da Corning (0,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 51 mg
2	35,0	0,147	2,46	383	Diluição da Amostra: 1/8
4	34,5	0,185	3,08	472	
6	34,0	0,222	3,68	556	Taxa de Reação: 37,95 μmol/min
8	33,5	0,259	4,28	637	
10	33,0	0,286	4,72	692	Atividade Total: 744 U/g
12	32,5	0,322	5,30	766	
				Específica: 29,3 U/mg prot.	

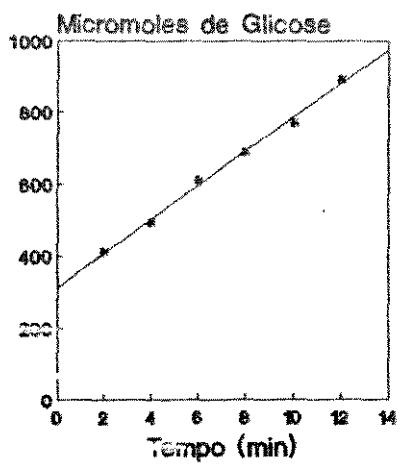
Serie V 24-32



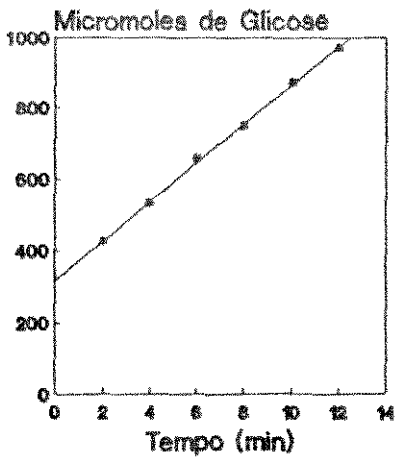
Serie V 32-35



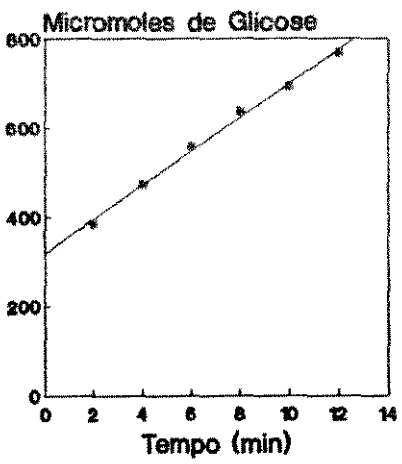
Serie V 35-42



Serie V 42-60



SPC



Enzima: Amiloglicosidase a 5,650 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 17 h

Volume de amostra para análise de proteína: 20 µl

Condições da Atividade: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -4,381 \cdot 10^{-3} + 0,6154 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	9414	50	9540	76	525	0,205	1,74	1,99	38,4
32-35	9375	51	9509	83	519	0,184	1,55	1,80	39,2
35-42	9384	53	9528	91	516	0,168	1,42	1,67	38,7
42-60	9332	53	9481	99	510	0,191	1,62	1,93	37,9
SPC	9398	53	9533	82	515	0,217	1,85	2,14	34,1

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (0,604 mm)

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,094	2,24	437	Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 41,44 µmol/min Atividade Total: 829 U/g Específica: 21,6 U/mg prot.
4	34,5	0,122	2,85	547	
6	34,0	0,140	3,24	612	
8	33,5	0,162	3,72	692	
10	33,0	0,190	4,33	794	
12	32,5	0,208	4,72	582	

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (0,460 mm)

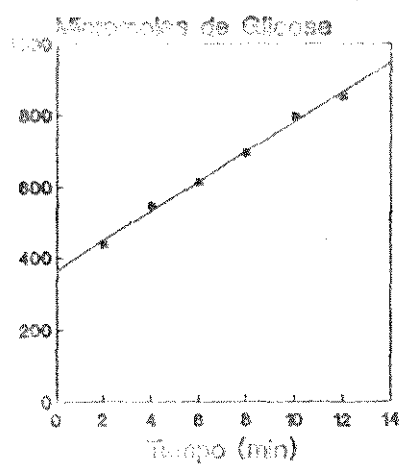
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 51 mg
2	35,0	0,098	2,33	453	Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 46,94 µmol/min Atividade Total: 920 U/g Específica: 23,3 U/mg prot.
4	34,5	0,119	2,79	534	
6	34,0	0,148	3,42	645	
8	33,5	0,172	3,94	733	
10	33,0	0,199	4,52	830	
12	32,5	0,224	5,07	915	

Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (Ø,387 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,098	2,33	453	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,128	2,98	572	
6	34,0	0,159	3,66	691	Taxa de Reação: 58,14 µmol/min
8	33,5	0,188	4,29	798	
10	33,0	0,220	4,98	913	Atividade Total: 1097 U/g
12	32,5	0,256	5,76	1041	
				Específica: 28,3 U/mg prot.	

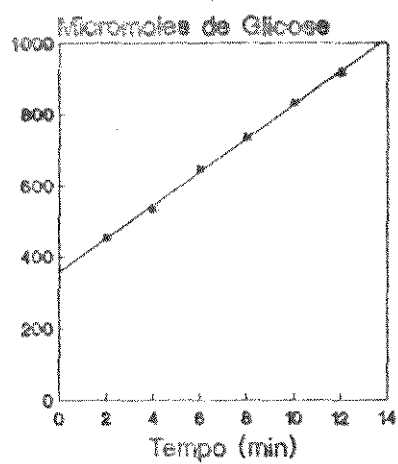
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 42-60 mesh (Ø,298 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,101	2,40	466	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,132	3,07	588	
6	34,0	0,166	3,81	719	Taxa de Reação: 62,34 µmol/min
8	33,5	0,201	4,57	850	
10	33,0	0,234	5,28	969	Atividade Total: 1247 U/g
12	32,5	0,267	6,00	1084	
				Específica: 32,9 U/mg prot.	

Amostra: SPC da Corning (Ø,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,098	2,33	453	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,120	2,81	538	
6	34,0	0,142	3,29	621	Taxa de Reação: 36,44 µmol/min
8	33,5	0,160	3,68	684	
10	33,0	0,180	4,11	754	Atividade Total: 688 U/g
12	32,5	0,200	4,55	821	
				Específica: 20,2 U/mg prot.	

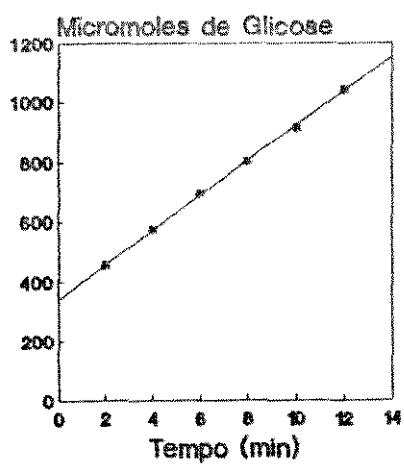
Serie V 24-32



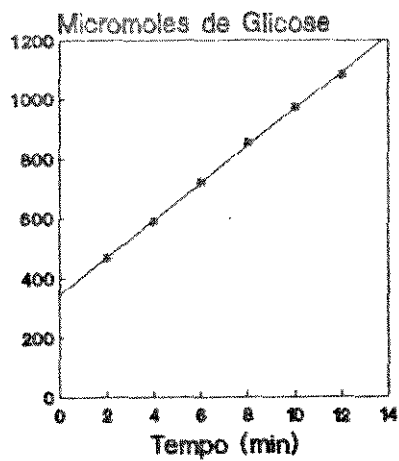
Serie V 32-35



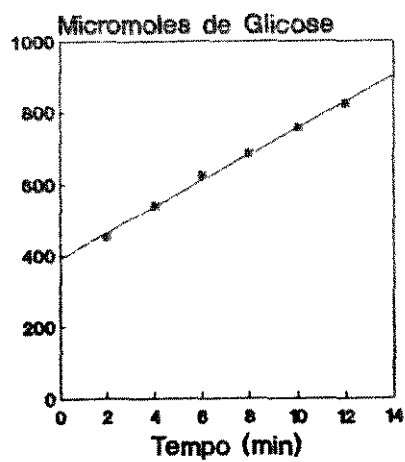
Serie V 35-42



Serie V 42-60



SPC



Enzima: Amiloglicosidase a 7,534 mg proteína/ml.

Tempo de Imobilização: 17 h

Volume de amostra para análise de proteína: 15 µl

Condições da Atividade: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -4,381.10^{-3} + 0,6154 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg _{7ml})	[Prot] cor. (mg _{7ml})	Imob (mg _{9g})
24-32	9449	53	9582	80	521	0,226	2,58	2,98	44,8
32-35	9395	51	9525	80	519	0,204	2,29	2,64	49,8
35-42	9304	52	9446	90	519	0,202	2,28	2,68	48,4
42-60	9566	50	9700	84	517	0,219	2,49	2,89	48,0
SPC	9473	50	9592	69	517	0,271	3,16	3,58	40,9

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (0,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,100	2,37	462	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,123	2,87	551	
6	34,0	0,153	3,53	666	Taxa de Reação: 47,74 µmol/min
8	33,5	0,182	4,16	773	
10	33,0	0,202	4,59	841	Atividade Total: 901 U/g
12	32,5	0,229	5,18	935	
				Específica: 20,1 U/mg prot.	

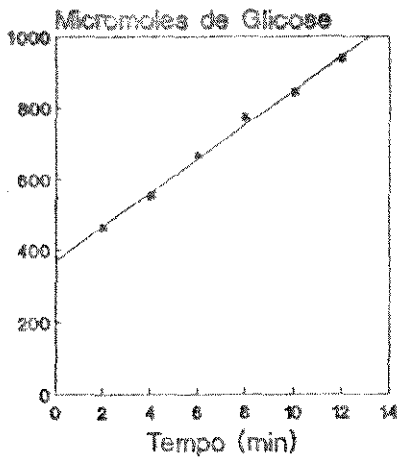
Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (0,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 51 mg
2	35,0	0,099	2,35	437	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,122	2,85	547	
6	34,0	0,151	3,48	658	Taxa de Reação: 55,00 µmol/min
8	33,5	0,180	4,11	756	
10	33,0	0,215	4,87	893	Atividade Total: 1078 U/g
12	32,5	0,240	5,41	978	
				Específica: 21,7 U/mg prot.	

Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (0,387 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 52 mg
2	35,0	0,108	2,55	495	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,148	3,42	655	
6	34,0	0,188	4,29	810	Taxa de Reação: 61,87 μmol/min
8	33,5	0,214	4,85	903	
10	33,0	0,242	5,46	1001	Atividade Total: 1190 U/g
12	32,5	0,280	6,28	1135	
				Específica: 24,6 U/mg prot.	

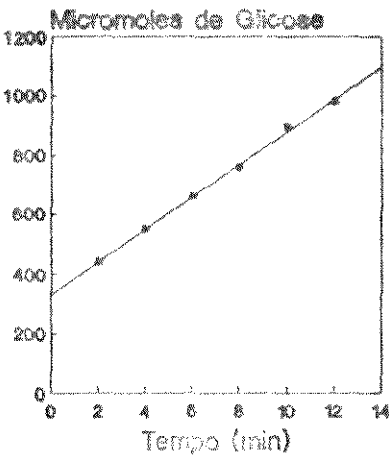
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 42-60 mesh (0,298 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)-	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,117	2,74	533	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,154	3,55	680	
6	34,0	0,200	4,55	859	Taxa de Reação: 73,60 μmol/min
8	33,5	0,242	5,46	1016	
10	33,0	0,282	6,33	1160	Atividade Total: 1472 U/g
12	32,5	0,313	7,00	1264	
				Específica: 30,7 U/mg prot.	

Amostra: SPC da Corning (0,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,099	2,35	457	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,123	2,87	551	
6	34,0	0,158	3,63	686	Taxa de Reação: 47,81 μmol/min
8	33,5	0,174	3,98	741	
10	33,0	0,203	4,61	845	Atividade Total: 956 U/g
12	32,5	0,230	5,20	939	
				Específica: 23,4 U/mg prot.	

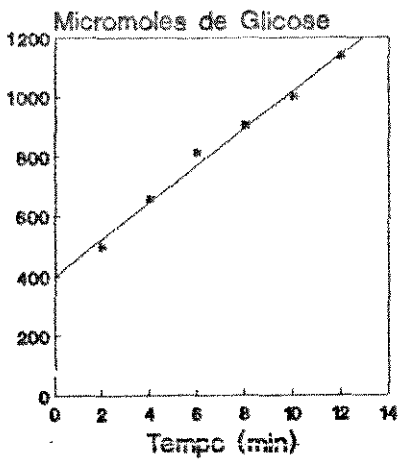
Serie V 24-32



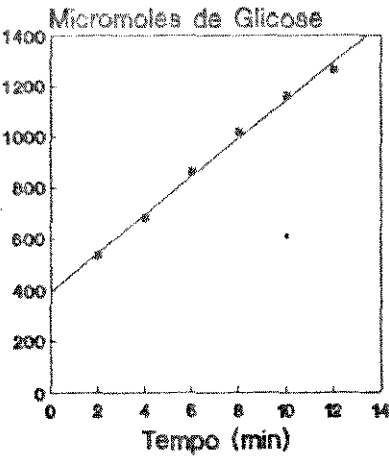
Serie V 32-35



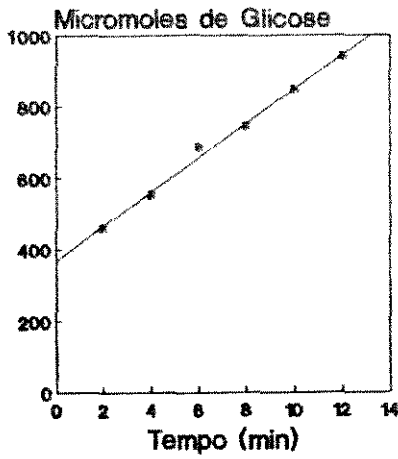
Serie V 35-42



Serie V 42-60



SPC



Enzima: Amiloglicosidase a 9,417 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 17 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições da Atividade: 45°C, pH 4,5, amido 5%

Glicose: $Abs(625\text{ nm}) = -4,381.10^{-3} + 0,6154 \times [Glicose\text{ (mg/ml)}]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	9439	52	9572	81	525	0,204	3,83	4,42	50,5
32-35	9424	50	9555	81	522	0,208	3,53	4,08	55,7
35-42	9452	53	9598	93	520	0,199	3,37	3,97	53,4
42-60	9410	50	9554	94	525	0,215	3,66	4,32	53,5
SPC	9387	53	9516	76	506	0,250	4,33	4,98	42,4

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 24-32 mesh (0,604 mm)

Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 52 mg
2	35,0	0,087	2,09	407	Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 49,74 µmol/min Atividade Total: 958 U/g Específica: 19,1 U/mg prot.
4	34,5	0,125	2,92	559	
6	34,0	0,153	3,53	666	
8	33,5	0,182	4,16	773	
10	33,0	0,203	4,61	845	
12	32,5	0,223	5,05	911	

Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C, 32-35 mesh (0,460 mm)

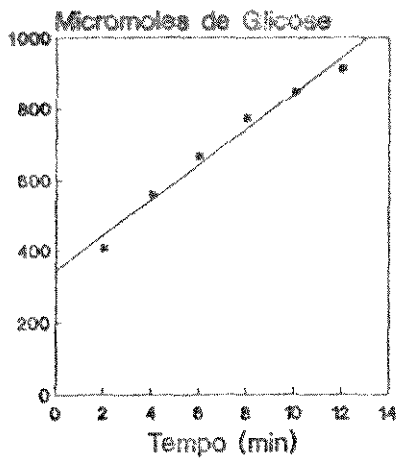
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	Massa de sílica: 50 mg
2	35,0	0,096	2,29	445	Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 57,67 µmol/min Atividade Total: 1153 U/g Específica: 20,7 U/mg prot.
4	34,5	0,127	2,96	567	
6	34,0	0,162	3,72	703	
8	33,5	0,196	4,46	830	
10	33,0	0,226	5,11	937	
12	32,5	0,247	5,56	1005	

Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 35-42 mesh (0,387 mm)					
Tempo (min)	V _{ex} (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,103	2,44	474	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,137	3,18	609	
6	34,0	0,169	3,87	731	Taxa de Reação: 67,71 μmol/min
8	33,5	0,206	4,68	870	
10	33,0	0,246	5,54	1016	Atividade Total: 1287 U/g
12	32,5	0,284	6,37	1150	
				Específica: 23,9 U/mg prot.	

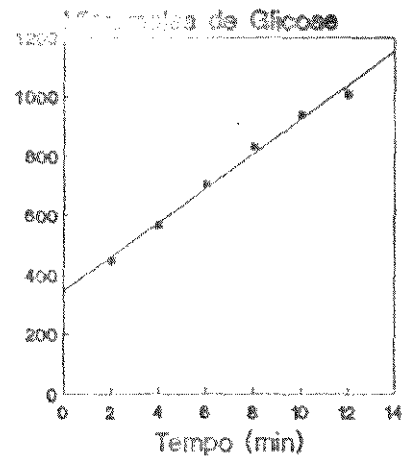
Amostra: Silica Série V tratada a 215°C, 42-60 mesh (0,298 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: - 50 mg
2	35,0	0,104	2,46	478	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,143	3,30	634	
6	34,0	0,181	4,13	781	Taxa de Reação: 81,96 μmol/min
8	33,5	0,231	5,22	971	
10	33,0	0,269	6,04	1108	Atividade Total: 1639 U/g
12	32,5	0,323	7,22	1303	
				Específica: 30,6 U/mg prot.	

Amostra: SPC da Corning (0,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (625nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	Massa de sílica: 53 mg
2	35,0	0,099	2,35	457	Diluição da Amostra: 1/10
4	34,5	0,128	2,98	572	
6	34,0	0,148	3,42	645	Taxa de Reação: 47,87 μmol/min
8	33,5	0,181	4,13	769	
10	33,0	0,206	4,68	857	Atividade Total: 903 U/g
12	32,5	0,228	5,15	931	
				Específica: 21,3 U/mg prot.	

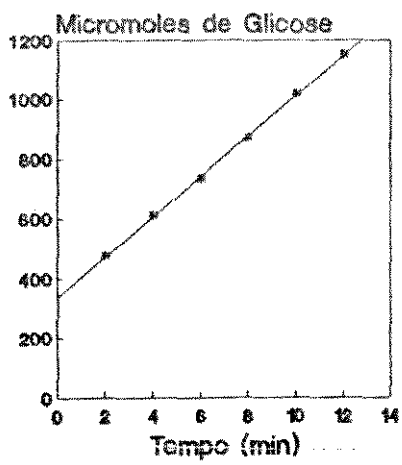
Serie V 24-32



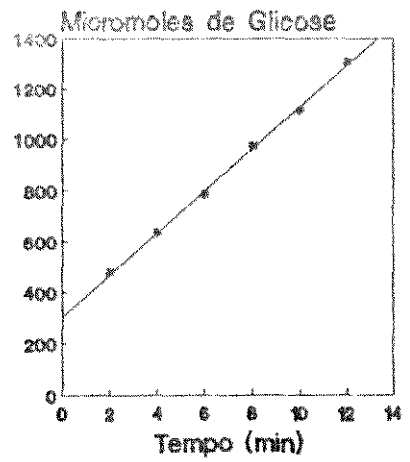
Serie V 32-35



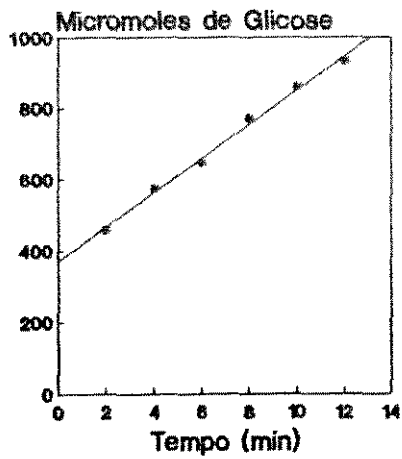
Serie V 35-42



Serie V 42-60



SPC



ANEXO XI

IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE NA SILICA SÉRIE V

XI.1 - IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE SIGMA

Enzima: Glicose Oxidase Sigma a 8,10 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para proteína: 5 µl (151, 181 e 203)

10 µl (outras)

Condições: 25°C, pH 5,5, glicose 13,9 mM, saturada com O₂, 10 ml

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)-	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg ml)	[Prot] cor. (mg ml)	Imob (mg g)
151	9471	84	9683	128	10189	506	,209	7,11	8,91	0,0
181	9433	88	9683	162	10180	497	,157	5,29	7,01	6,13
203	9450	79	9677	148	10170	493	,090	3,09	4,02	25,5
215	9423	84	9650	142	10146	496	,101	1,72	2,22	34,7
225	9479	87	9744	178	10242	498	,070	1,22	1,66	36,9
236	9388	80	9598	130	10094	496	,079	1,37	1,73	39,5
245	9439	86	9661	136	10160	499	,057	1,01	1,29	39,5
255	9413	83	9655	159	10148	493	,066	1,16	1,53	39,0

Amoc- tra	Massa de Enz.Imob. (mg)	Proteína Imob. (mg/g)	Taxa Reação (%/min)	Atividade Calculada (U)	Ativ. Total (U/g)	Ativ. Espec. (U/mg)
EL	8,10 µg	--	26,0	0,6500	-	80,2
S151	18,3	~ 0	10,5	0,2625	14,3	-
S181	18,0	6,13	30,5	0,7625	42,4	6,92
S203	9,3	25,5	20,5	0,5125	55,1	2,16
S215	8,7	34,7	23,5	0,5875	67,5	1,95
S225	7,0	36,9	21,5	0,5375	76,8	2,08
S236	7,7	39,5	20,5	0,5125	66,7	1,69
S245	10,8	39,5	26,0	0,6500	60,2	1,52
S255	11,1	39,0	23,0	0,5750	51,8	1,33

S265

S245

S236

S225

S215

S203

S181

S151

EL

Tempo (1 cm = 1 min)

50 % O₂

100 % O₂

10

9

8

6

5

XI.2 - IMOBILIZAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE MILES

Enzima: Glicose Oxidase Miles a 5,04 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para proteína: 5 µl (151, 181 e 203)

10 µl (outras)

Condições: 25°C, pH 5,5, glicose 13,9 mM, saturada com O₂, 10 ml

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg _{ml})	[Prot] cor. (mg _{ml})	Imob (mg _g)
151	9396	86	9631	149	10176	545	,124	4,19	5,33	0,0
181	9384	90	9621	147	10120	499	,094	3,22	4,17	4,83
203	9474	82	9715	159	10214	499	,062	2,19	2,89	13,1
215	9567	86	9783	130	10284	501	,095	1,63	2,05	17,4
225	9371	81	9616	158	10105	495	,083	1,43	1,89	19,3
236	9455	84	9684	145	10181	497	,073	1,27	1,64	20,1
245	9409	85	9640	146	10138	498	,063	1,11	1,44	21,1
255	9304	82	9534	148	10030	496	,061	1,08	1,40	22,0

Amos- tra	Massa de Enz.Imob. (mg)	Proteína Imob. (mg/g)	Taxa Reação (%/min)	Atividade Calculada (U)	Ativ. Total (U/g)	Ativ. Espec. (U/mg)
EL	20,16 µg	--	24,5	0,6125	-	30,4
M151	14,0	~ 0	5,8	0,1450	10,4	-
M181	20,0	4,83	22,0	0,5500	27,5	5,70
M203	13,0	13,1	20,5	0,5125	39,4	3,00
M215	10,0	17,4	18,25	0,4563	45,6	2,62
M225	12,3	19,3	22,5	0,5625	45,7	2,37
M236	10,6	20,1	20,5	0,5125	48,3	2,40
M245	13,2	21,1	22,5	0,5625	42,6	2,02
M255	12,1	22,0	15,75	0,3938	32,5	1,48

Tempo (1 cm = 1 min)

50 % O₂

100 % O₂

M255

M245

M236

M225

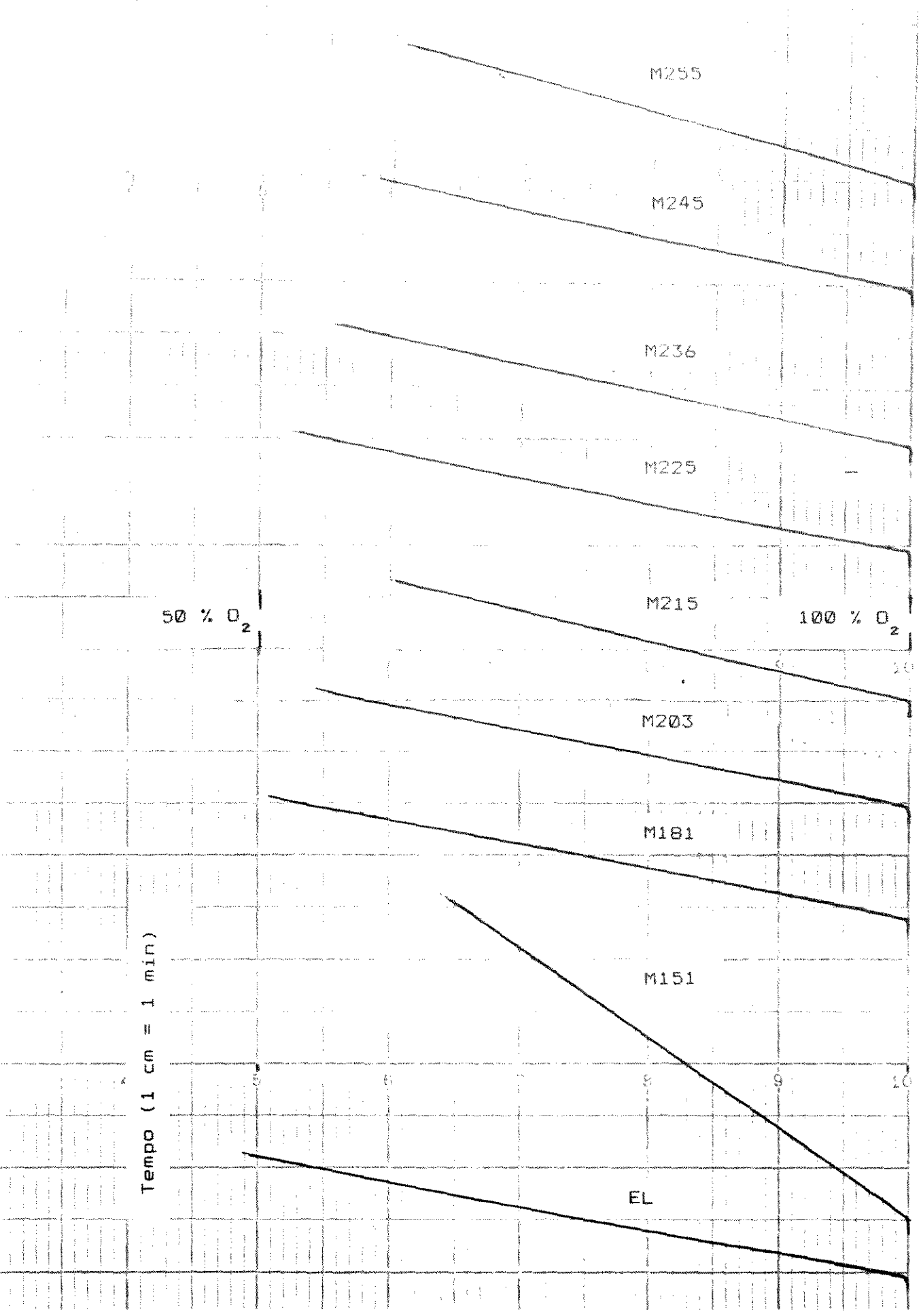
M215

M203

M181

M151

EL



XI.3 - IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE SIGMA VARIANDO-SE
O TAMANHO DA PARTÍCULA (Silica 225°C)

Enzima: Glicose Oxidase Sigma a 6,27 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 24 h

Volume de amostra para análise de proteína: 15 µl

Condições: 25°C, pH 5,5, glicose 13,9 mM, saturada com O₂, 10 ml

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg _{ml})	[Prot] cor. (mg _{ml})	Imob (mg _g)
24-32	9455	53	9600	92	343	0,076	0,881	1,12	33,3
32-35	9410	52	9566	104	347	0,092	1,052	1,37	32,7
35-42	9371	57	9549	121	342	0,053	0,053	0,63	32,5
42-48	9384	52	9549	113	335	0,057	0,675	0,90	34,6
48-60	9414	53	9589	122	342	0,050	0,600	0,81	35,2
60-65	9438	55	9617	124	331	0,042	0,511	0,70	33,5

Amos- tra	Massa de Enz.Imob. (mg)	Proteína Imob. (mg/g)	Taxa Reação (%/min)	Atividade Calculada (U)	Ativ. Total (U/g)	Ativ. Espec. (U/mg)
24-32	11,8	33,3	23,0	0,5750	48,7	1,46
32-35	8,1	32,7	22,5	0,5625	69,4	2,12
35-42	10,3	32,5	29,5	0,7375	71,6	2,20
42-48	10,8	34,6	33,5	0,8375	77,5	2,24
48-60	8,3	35,2	33,0	0,8250	99,4	2,82
60-65	7,8	33,5	34,0	0,8500	109,0	3,25

60-65 mesh

10

48-60 mesh

42-48 mesh

35-42 mesh

100 % O_2

50 % O_2

24-32 mesh

9

10

32-35 mesh

Tempo (1 cm = 1 min)

IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE NA SILICA SÉRIE V

Enzima: Invetase a 7,530 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições: 45°C, pH 4,5, sacarose 5%

Glicose: $Abs(600\text{ nm}) = -0,047 + 0,6357 \times [Glic.+Frut.(mg/ml)]$

Amos- tra	Tara (mg)	Síl. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg /ml)	[Prot] cor. (mg /ml)	Imob (mg /g)
SPC	9455	70	9628	163	10229	601	,283	4,985	5,84	14,5
151	9470	73	9661	118	10270	609	,308	5,496	6,56	8,08
181	9566	73	9774	135	10381	607	,265	4,623	5,65	15,6
203	9381	71	9576	124	10180	604	,260	4,524	5,45	17,7
215	9366	72	9560	122	10169	609	,261	4,544	5,45	17,6
225	9409	75	9601	117	10207	606	,263	4,584	5,47	17,6
236	9430	72	9632	126	10238	610	,267	4,663	5,63	16,1
245	9410	74	9606	122	10217	611	,271	4,743	5,69	15,2
255	9584	73	9567	110	10168	601	,278	4,884	5,78	14,4
270	9530	73	9712	109	10315	603	,286	5,045	5,96	13,0

Amostra: Enzima Invertase Livre					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F µmol/ml	Concentração da en- zima: 1,506 µg/ml
0	50,0	0,000	0,00	00,00	Diluição da Amostra: 1/40
2	49,5	0,047	5,91	16,43	
4	49,0	0,104	9,50	26,39	Taxa de Reação: 4,451 µmol/ml.min
6	48,5	0,154	12,65	35,13	
8	48,0	0,202	15,67	43,52	Atividade Específica 2956 U/mg prot.
10	47,5	0,254	18,94	52,61	
12	47,0	0,308	22,23	62,05	
14	46,5	0,353	25,17	69,91	
16	46,0	0,386	27,24	75,68	
18	45,5	0,428	29,89	83,02	
20	45,0	0,472	32,66	90,71	

Amostra: Silica SPC da Corning

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 62,6 mg Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 90,74 μmol/min Atividade Total: 1450 U/g síl. Específica: 100 U/mg prot.
2	50,0	0,066	1,78	246,8	
4	49,5	0,149	3,08	419,6	
6	49,0	0,241	4,53	604,0	
8	48,5	0,340	6,09	794,8	
10	48,0	0,428	7,47	954,7	
12	47,5	0,542	9,27	1158	

Amostra: Silica Série V tratada a 151°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 61,5 mg Diluição da Amostra: 1/4 Taxa de Reação: 3,306 μmol/min Atividade Total: 53,8 U/g síl. Específica: 6,65 U/mg prot.
2	50,0	0,074	0,76	105,7	
4	49,5	0,089	0,86	116,5	
6	49,0	0,101	0,93	124,1	
8	48,5	0,111	0,99	129,8	
10	48,0	0,122	1,06	135,9	
12	47,5	0,130	1,11	139,2	

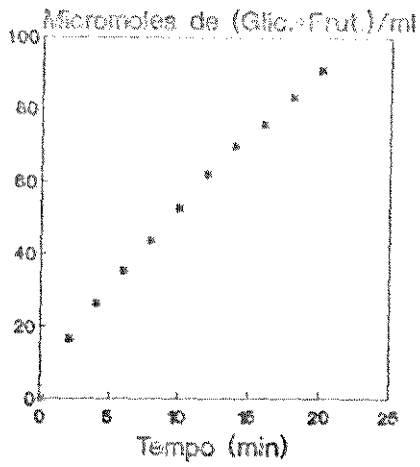
Amostra: Silica Série V tratada a 181°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 64,6 mg Diluição da Amostra: 1/4 Taxa de Reação: 37,20 μmol/min Atividade Total: 576 U/g síl. Específica: 36,9 U/mg prot.
2	50,0	0,134	1,14	158,2	
4	49,5	0,225	1,71	232,9	
6	49,0	0,334	2,40	319,6	
8	48,5	0,433	3,02	394,3	
10	48,0	0,517	3,55	453,4	
12	47,5	0,629	4,25	531,7	

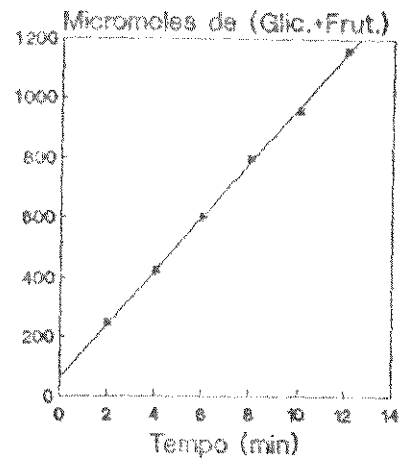
Amostra: Silica Série V tratada a 203°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 63,8 mg Diluição da Amostra: 1/10 Taxa de Reação: 74,99 μmol/min Atividade Total: 1175 U/g síl. Específica: 66,4 U/mg prot.
2	50,0	0,091	2,17	301,5	
4	49,5	0,131	2,80	381,1	
6	49,0	0,207	4,00	532,7	
8	48,5	0,284	5,20	679,7	
10	48,0	0,371	6,58	840,2	
12	47,5	0,450	7,82	977,2	

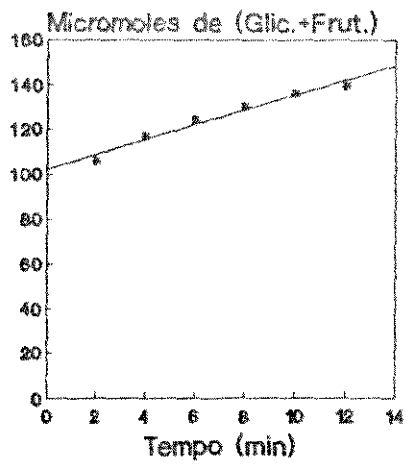
Invertase Livre



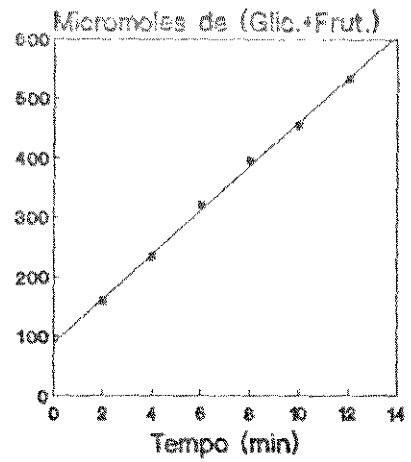
SPC



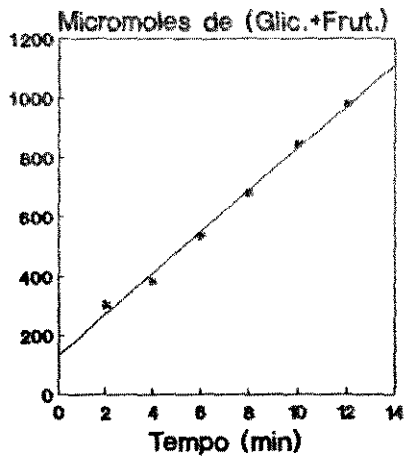
Serie V (151°C)



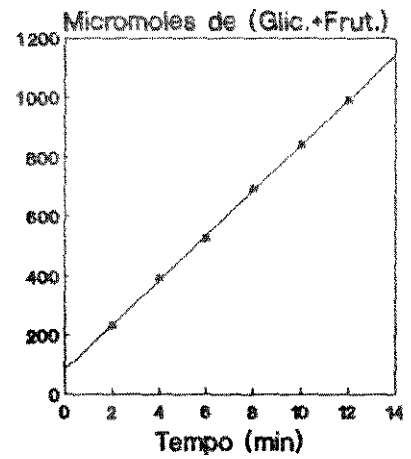
Serie V (181°C)



Serie V (203°C)



Serie V (215°C)



Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 64,7 mg
2	50,0	0,059	1,67	231,5	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,135	2,86	389,6	Taxa de Reação: 77,77 μmol/min
6	49,0	0,203	3,93	524,3	Atividade
8	48,5	0,290	5,30	692,1	Total: 1171 U/g síl.
10	48,0	0,372	6,59	842,2	Específica:
12	47,5	0,455	7,90	987,1	66,5 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 225°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 68,3 mg
2	50,0	0,073	1,89	262,1	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,150	3,10	421,8	Taxa de Reação: 88,53 μmol/min
6	49,0	0,247	4,62	616,6	Atividade
8	48,5	0,328	5,90	770,1	Total: 1296 U/g síl.
10	48,0	0,448	7,79	994,9	Específica:
12	47,5	0,526	9,01	1127	77,6 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 236°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 62,7 mg
2	50,0	0,067	1,79	249,0	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,150	3,10	421,8	Taxa de Reação: 86,83 μmol/min
6	49,0	0,242	4,55	606,1	Atividade
8	48,5	0,322	5,80	737,8	Total: 1385 U/g síl.
10	48,0	0,426	7,44	950,7	Específica:
12	47,5	0,521	8,93	1172	86,0 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 245°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 66,1 mg
2	50,0	0,074	1,90	264,3	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,140	2,94	400,3	Taxa de Reação: 82,15 μmol/min
6	49,0	0,229	4,34	578,8	Atividade
8	48,5	0,308	5,58	729,0	Total: 1243 U/g síl.
10	48,0	0,405	7,11	908,5	Específica:
12	47,5	0,503	8,65	1081	81,8 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 255°C					
Tempo (min)	V _{re} (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 64,9 mg
2	50,0	0,048	1,49	207,5	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,094	2,22	301,9	Taxa de Reação: 67,31 μmol/min
6	49,0	0,173	3,46	461,4	Atividade
8	48,5	0,247	4,62	603,8	Total: 1037 U/g síl.
10	48,0	0,319	5,76	735,6	Específica:
12	47,5	0,391	6,89	865,1	72,0 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 270°C					
Tempo (min)	V _{re} (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 67,0 mg
2	50,0	0,055	1,60	222,8	Diluição da Amostra: 1/10
4	49,5	0,112	2,50	340,4	Taxa de Reação: 64,04 μmol/min
6	49,0	0,168	3,38	450,9	Atividade
8	48,5	0,232	4,39	572,9	Total: 956 U/g síl.
10	48,0	0,313	5,66	723,6	Específica:
12	47,5	0,393	6,92	865,1	73,5 U/mg prot.

IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE NA SÍLICA SÉRIE V TRATADA A 234°C

Enzima: Invertase a 7,981 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

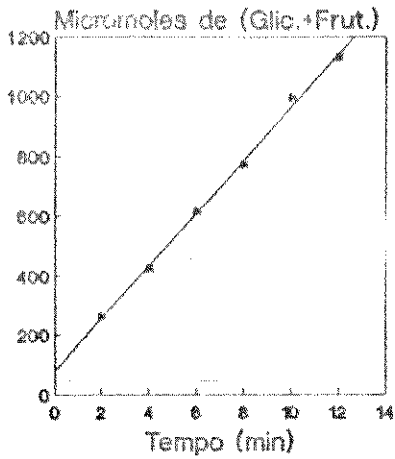
Volume de amostra para análise de proteína: 10 μl

Condições: 45°C, pH 4,5, sacarose 5%

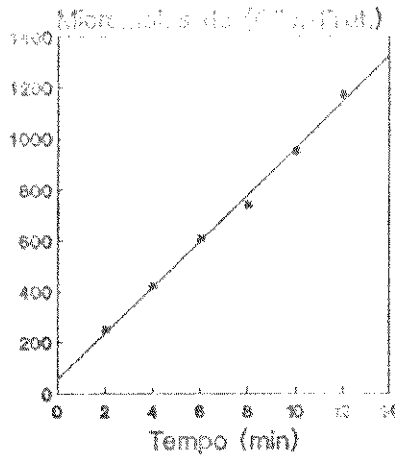
Glicose: $Abs(600\text{ nm}) = -0,047 + 0,6357 \times [Glic.+Frut. (mg/ml)]$

Amos- tra (mesh)	Tara (mg)	Síl. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg _{ml})	[Prot] cor. (mg _{ml})	Imob (mg _g)
24-32	9370,6	21,6	9429,8	37,6	206	0,310	5,537	6,54	13,7
32-35	9432,8	21,4	9489,5	35,3	207	0,317	5,682	6,65	12,9
35-42	9395,4	22,2	9455,6	38,0	205	0,314	5,620	6,66	12,2
42-48	9379,2	19,9	9432,6	33,5	208	0,320	5,745	6,67	13,7
48-60	9387,0	24,0	9455,6	44,6	206	0,311	5,559	6,76	10,5
60-65	9383,6	20,4	9441,4	37,4	206	0,325	5,852	6,91	10,8

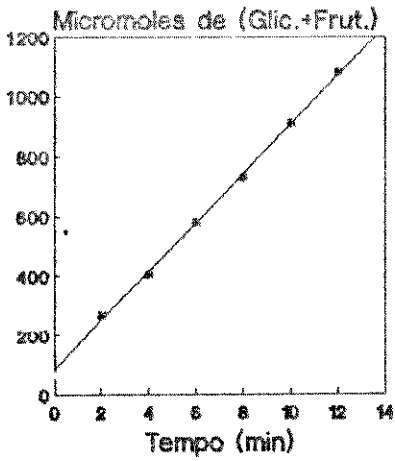
Serie V (225°C)



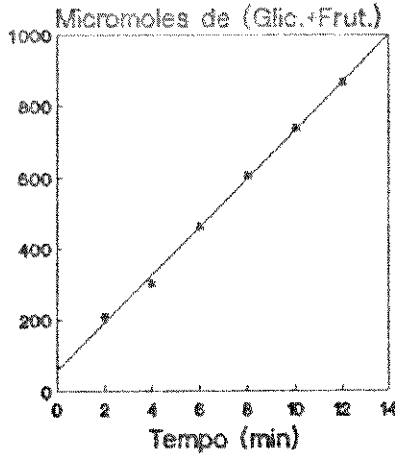
Serie V (230°C)



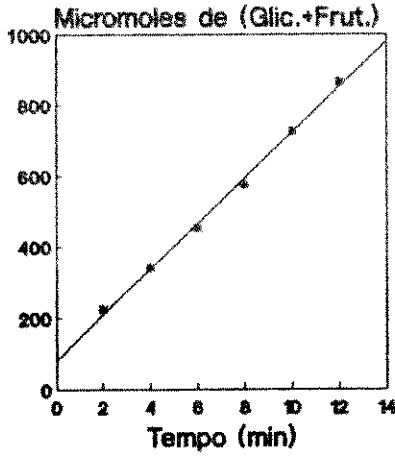
Serie V (245°C)



Serie V (255°C)



Serie V (270°C)



Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 24-32 mesh (0,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 21,6 mg
2	35,0	0,032	0,74	72,5	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,079	1,19	113,9	Taxa de Reação: 28,76 μmol/min
6	34,0	0,143	1,79	169,3	Atividade
8	33,5	0,207	2,40	223,1	Total: 1331 U/g síl.
10	33,0	0,280	3,08	282,9	Específica: 97,2 U/mg prot.
12	32,5	0,379	4,02	362,9	

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 32-35 mesh (0,460 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 21,4 mg
2	35,0	0,056	0,97	94,5	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,127	1,64	157,4	Taxa de Reação: 38,23 μmol/min
6	34,0	0,209	2,42	228,2	Atividade
8	33,5	0,299	3,26	303,9	Total: 1786 U/g síl.
10	33,0	0,403	4,25	389,3	Específica: 138,6 U/mg prot.
12	32,5	0,511	5,27	475,4	

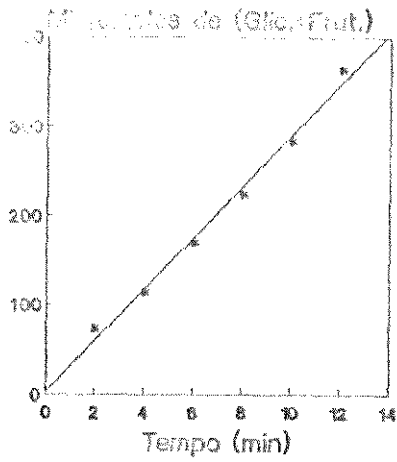
Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 35-42 mesh (0,387 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 22,2 mg
2	35,0	0,053	0,94	91,7	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,135	1,72	164,6	Taxa de Reação: 40,73 μmol/min
6	34,0	0,233	2,64	249,6	Atividade
8	33,5	0,324	3,50	325,9	Total: 1835 U/g síl.
10	33,0	0,429	4,49	411,8	Específica: 150,6 U/mg prot.
12	32,5	0,538	5,52	498,4	

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 42-48 mesh (0,326 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 19,9 mg
2	35,0	0,060	1,01	98,2	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,141	1,78	170,0	Taxa de Reação: 38,83 μmol/min
6	34,0	0,232	2,63	248,7	Atividade
8	33,5	0,318	3,44	320,6	Total: 1951 U/g síl.
10	33,0	0,416	4,37	400,6	Específica: 143,4 U/mg prot.
12	32,5	0,527	5,42	489,1	

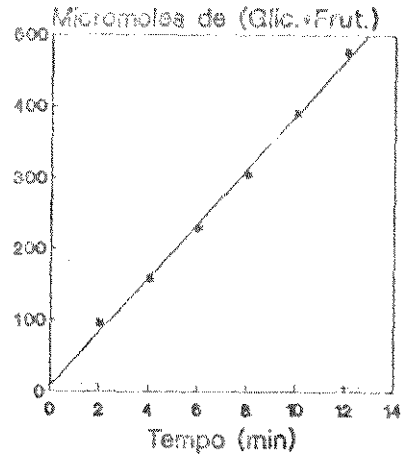
Amostra: Silica Série V tratada a 234°C, 48-60 mesh (0,274 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 24,0 mg
2	35,0	0,089	1,28	121,8	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,189	2,23	213,4	Taxa de Reação: 51,82 μmol/min
6	34,0	0,313	3,40	320,9	Atividade
8	33,5	0,447	4,66	433,9	Total: 2159 U/g sil.
10	33,0	0,573	5,85	536,4	Específica:
12	32,5	0,697	7,02	633,9	205,8 U/mg prot.

Amostra: Silica Série V tratada a 234°C, 60-65 mesh (0,230 mm)					
Tempo (min)	V _m (ml)	Abs (600nm)	[G + F] (mg/ml)	G + F μmol	massa de sílica: 20,4 mg
2	35,0	0,085	1,25	121,1	Diluição da Amostra: 1/6
4	34,5	0,171	2,06	197,2	Taxa de Reação: 46,00 μmol/min
6	34,0	0,278	3,07	289,7	Atividade
8	33,5	0,390	4,12	383,8	Total: 2255 U/g sil.
10	33,0	0,504	5,20	476,7	Específica:
12	32,5	0,632	6,41	578,5	208,8 U/mg prot.

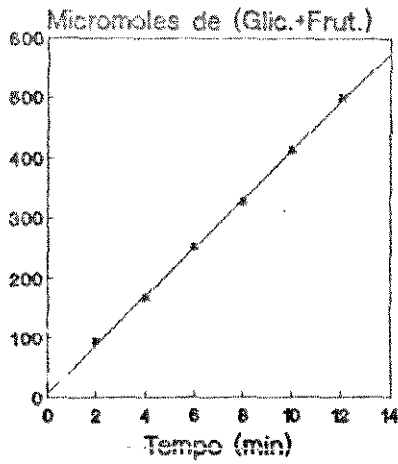
Serie V 24-32 mesh



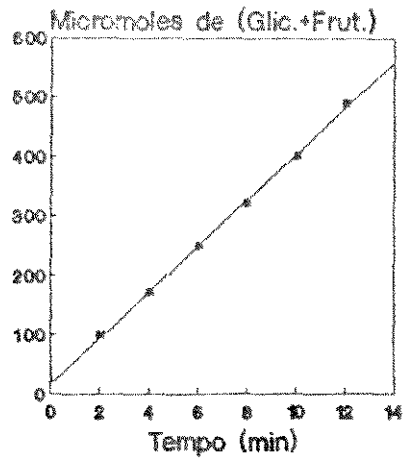
Serie V 32-35 mesh



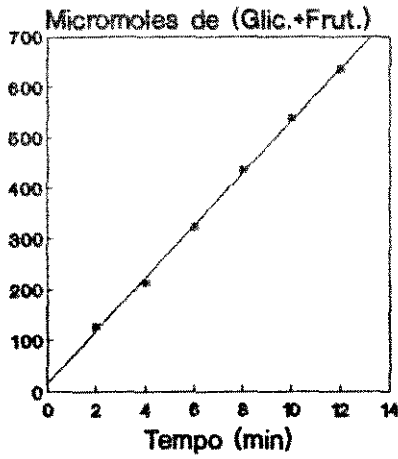
Serie V 35-42 mesh



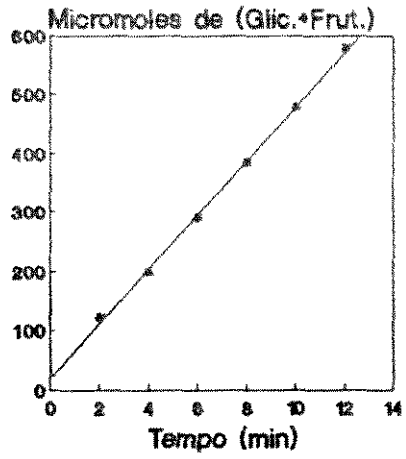
Serie V 42-48 mesh



Serie V 48-60 mesh



Serie V 60-65 mesh



ANEXO XIII

IMOBILIZAÇÃO DE LACTASE NA SÍLICA SÉRIE V

Enzima: Lactase a 9,33 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições: 40°C, pH 6,5, lactose 4,5%

Glicose: $Abs(525\text{ nm}) = 0,001422 + 1,334 \times [Glic.(mg/ml)]$

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Bruto enzima (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
181	9409	82	9638	147	10165	526	,310	5,54	7,08	14,4
203	9455	80	9660	125	10187	532	,174	2,93	3,62	37,6
215	9566	79	9767	122	10299	532	,140	2,36	2,90	43,3
225	9431	81	9646	134	10174	528	,095	1,63	2,04	47,5
236	9383	80	9586	123	10110	524	,085	1,47	1,82	49,2
245	9366	82	9554	106	10086	532	,078	1,35	1,62	50,0
255	9380	80	9584	124	10103	519	,080	1,39	1,72	49,3
270	9410	82	9646	154	10164	518	,075	1,30	1,69	48,3

Amostra: Enzima Lactase Livre					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol/ml	Concentração da en- zima: 13,33 µg/ml
2	35,0	0,048	0,244	1,358	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,093	0,481	2,670	
6	34,0	0,138	0,707	3,982	Taxa de Reação: 0,611 µmol/ml.min
8	33,5	0,173	0,900	5,002	
10	33,0	0,210	1,094	6,080	Atividade Específica 45,8 U/mg prot.
12	32,5	0,258	1,346	7,480	

Amostra: Sílica Série V tratada a 181°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 82 mg
2	35,0	0,041	0,208	40,4	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,084	0,433	83,1	Taxa de Reação: 20,12 µmol/min
6	34,0	0,130	0,675	127,4	Atividade
8	33,5	0,172	0,895	166,6	Total: 245 U/g sil.
10	33,0	0,214	1,115	204,5	Específica: 17,0 U/mg prot.
12	32,5	0,253	1,320	238,4	

Amostra: Sílica Série V tratada a 203°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 80 mg
2	35,0	0,086	0,444	86,3	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,163	0,848	162,5	Taxa de Reação: 38,67 µmol/min
6	34,0	0,245	1,278	241,4	Atividade
8	33,5	0,318	1,661	309,2	Total: 483 U/g sil.
10	33,0	0,387	2,023	370,9	Específica: 12,9 U/mg prot.
12	32,5	0,455	2,380	429,7	

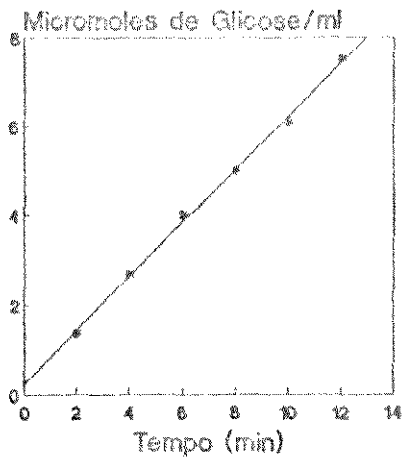
Amostra: Sílica Série V tratada a 215°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 79 mg
2	35,0	0,083	0,428	83,2	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,168	0,874	167,5	Taxa de Reação: 38,97 µmol/min
6	34,0	0,254	1,325	250,3	Atividade
8	33,5	0,322	1,682	313,1	Total: 493 U/g sil.
10	33,0	0,408	2,133	391,1	Específica: 11,4 U/mg prot.
12	32,5	0,469	2,454	443,0	

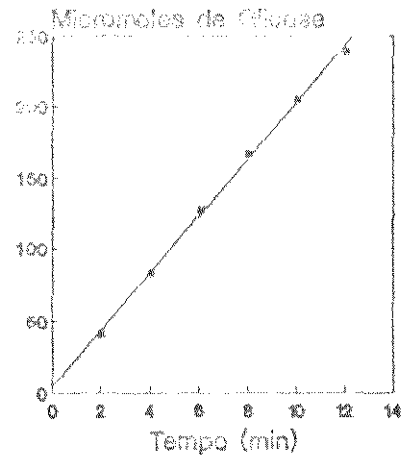
Amostra: Sílica Série V tratada a 225°C

Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 81 mg
2	35,0	0,084	0,433	84,3	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,165	0,858	164,5	Taxa de Reação: 40,37 µmol/min
6	34,0	0,246	1,283	242,4	Atividade
8	33,5	0,319	1,666	310,1	Total: 498 U/g sil.
10	33,0	0,386	2,018	370,0	Específica: 10,5 U/mg prot.
12	32,5	0,462	2,417	436,4	

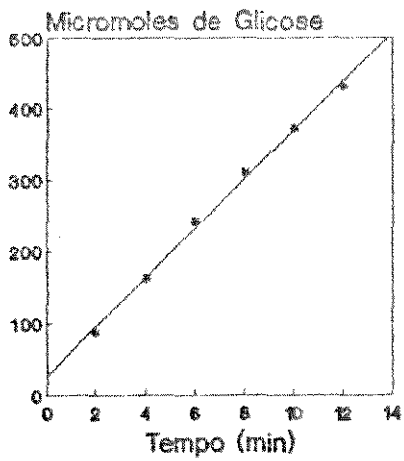
Lactase Livre



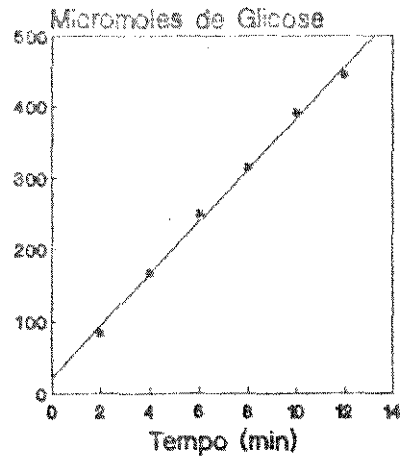
Série V (181°C)



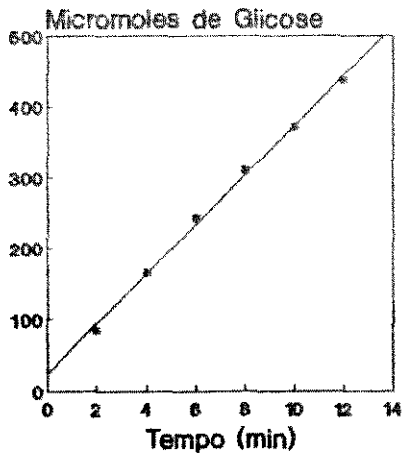
Série V (203°C)



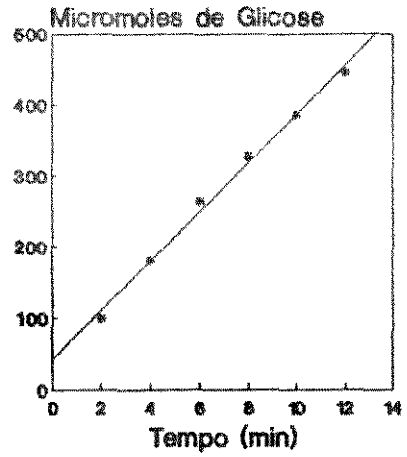
Série V (215°C)



Série V (225°C)



Série V (236°C)



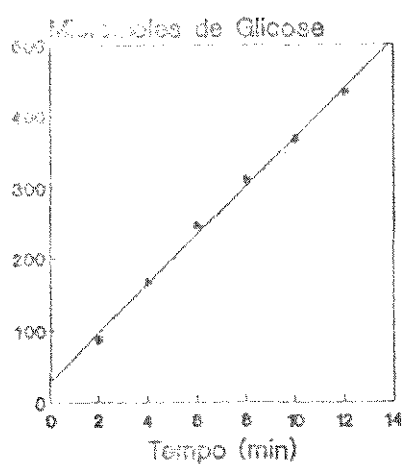
Amostra: Sílica Série V tratada a 236°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 80 mg
2	35,0	0,078	0,207	98,5	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,180	0,937	179,6	Taxa de Reação: 40,92 µmol/min
6	34,0	0,266	1,388	262,2	Atividade
8	33,5	0,335	1,750	329,8	Total: 512 U/g sil.
10	33,0	0,402	2,102	385,4	Específica: 10,4 U/mg prot.
12	32,5	0,471	2,464	444,9	

Amostra: Sílica Série V tratada a 245°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 82 mg
2	35,0	0,085	0,439	85,3	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,168	0,874	167,5	Taxa de Reação: 40,92 µmol/min
6	34,0	0,249	1,299	245,4	Atividade
8	33,5	0,319	1,666	310,1	Total: 499 U/g sil.
10	33,0	0,383	2,002	367,1	Específica: 9,98 U/mg prot.
12	32,5	0,457	2,391	431,6	

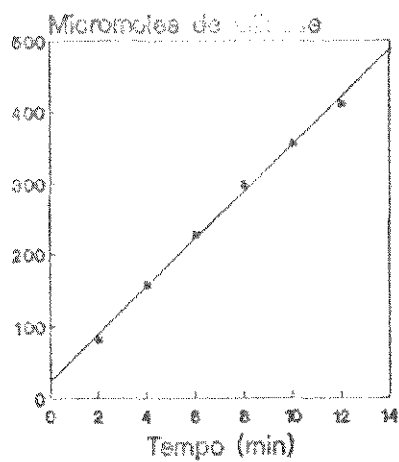
Amostra: Sílica Série V tratada a 255°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 80 mg
2	35,0	0,080	0,412	80,2	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,158	0,822	157,5	Taxa de Reação: 37,11 µmol/min
6	34,0	0,321	1,205	227,6	Atividade
8	33,5	0,306	1,598	297,4	Total: 464 U/g sil.
10	33,0	0,370	1,934	354,6	Específica: 9,41 U/mg prot.
12	32,5	0,435	2,275	410,8	

Amostra: Sílica Série V tratada a 270°C					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 82 mg
2	35,0	0,069	0,355	69,0	Diluição da Amostra: 1/7
4	34,5	0,140	0,727	139,4	Taxa de Reação: 33,51 µmol/min
6	34,0	0,208	1,084	204,8	Atividade
8	33,5	0,275	1,436	267,2	Total: 408 U/g sil.
10	33,0	0,337	1,761	322,8	Específica: 8,46 U/mg prot.
12	32,5	0,400	2,091	377,6	

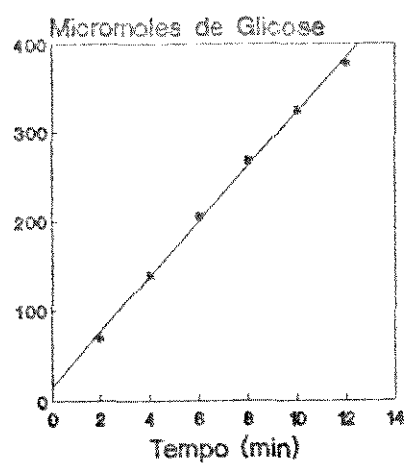
Série V (245°C)



Série V (255°C)



Série V (270°C)



IMOBILIZAÇÃO DE LACTASE NA SÍLICA SÉRIE V TRATADA A 234°C

Enzima: Lactase a 10,355 mg proteína/ml

Tempo de Imobilização: 48 h

Volume de amostra para análise de proteína: 10 µl

Condições: 40°C, pH 6,5, lactose 4,5%

Glicose: $Abs(525\text{ nm}) = 0,001422 + 1,334 \times [Glic. (mg/ml)]$

Amostra (mesh)	Tara (mg)	Síl. (mg)	Bruto úmido (mg)	Água (mg)	Sol. Enz. (mg)	Abs. 620 nm	[Prot] (mg/ml)	[Prot] cor. (mg/ml)	Imob (mg/g)
24-32	9374,7	20,7	9423,6	28,2	212	0,227	3,89	4,40	60,7
32-35	9397,0	20,2	9449,3	32,1	210	0,212	3,61	4,16	64,2
35-42	9442,1	22,8	9498,7	33,8	212	0,188	3,18	3,68	61,8
42-48	9469,4	19,9	9525,4	36,1	212	0,202	3,43	4,01	67,4
48-60	9565,5	23,3	9630,4	41,6	210	0,164	2,76	3,31	63,3
60-65	9527,8	24,0	9594,2	42,4	210	0,174	2,93	3,53	59,6

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 24-32 mesh (0,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 20,7 mg
2	35,0	0,072	0,106	20,6	Diluição da Amostra: 1/2
4	34,5	0,150	0,223	42,7	Taxa de Reação: 10,05 µmol/min
6	34,0	0,216	0,321	60,8	Atividade
8	33,5	0,291	0,434	80,8	Total: 486 U/g síl.
10	33,0	0,359	0,536	98,3	Específica:
12	32,5	0,456	0,682	123,1	8,00 U/mg prot.

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 32-35 mesh (0,604 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. µmol	massa de sílica: 20,2 mg
2	35,0	0,085	0,125	24,4	Diluição da Amostra: 1/2
4	34,5	0,172	0,256	49,0	Taxa de Reação: 11,09 µmol/min
6	34,0	0,256	0,382	72,1	Atividade
8	33,5	0,327	0,488	90,9	Total: 549 U/g síl.
10	33,0	0,413	0,617	113,1	Específica:
12	32,5	0,496	0,742	133,9	8,55 U/mg prot.

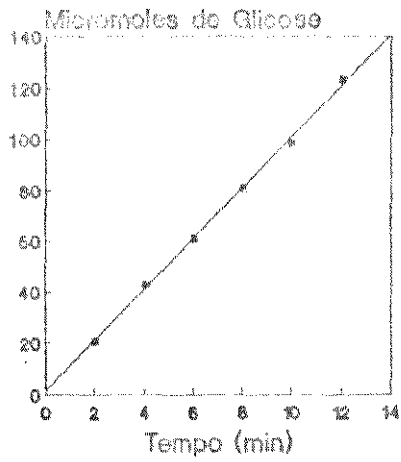
Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 35-42 mesh (0,385 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 22,8 mg
2	35,0	0,052	0,152	29,5	Diluição da Amostra: 1/4
4	34,5	0,114	0,338	64,7	Taxa de Reação: 16,48 μmol/min
6	34,0	0,177	0,527	99,5	Atividade
8	33,5	0,234	0,698	129,8	Total: 723 U/g síl.
10	33,0	0,283	0,845	154,8	Específica: 11,7 U/mg prot.
12	32,5	0,332	0,991	179,0	

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 42-48 mesh (0,324 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 24,2 mg
2	35,0	0,054	0,158	30,7	Diluição da Amostra: 1/4
4	34,5	0,117	0,347	66,4	Taxa de Reação: 16,22 μmol/min
6	34,0	0,158	0,530	100,0	Atividade
8	33,5	0,230	0,686	127,6	Total: 815 U/g síl.
10	33,0	0,287	0,857	157,0	Específica: 12,1 U/mg prot.
12	32,5	0,340	1,015	183,3	

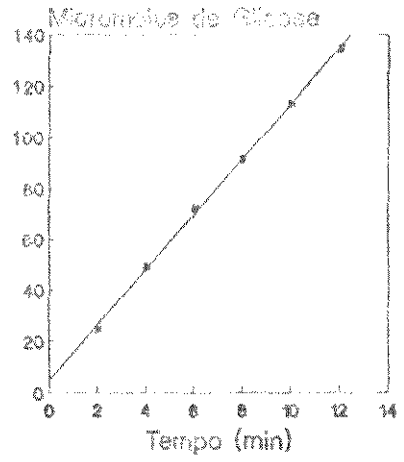
Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 48-60 mesh (0,274 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 23,3 mg
2	35,0	0,067	0,197	38,2	Diluição da Amostra: 1/4
4	34,5	0,139	0,413	79,1	Taxa de Reação: 19,97 μmol/min
6	34,0	0,217	0,647	122,1	Atividade
8	33,5	0,284	0,848	157,7	Total: 857 U/g síl.
10	33,0	0,347	1,036	190,0	Específica: 13,6 U/mg prot.
12	32,5	0,409	1,222	220,7	

Amostra: Sílica Série V tratada a 234°C, 60-65 mesh (0,230 mm)					
Tempo (min)	V _R (ml)	Abs (525nm)	[Glic.] (mg/ml)	Glic. μmol	massa de sílica: 24,0 mg
2	35,0	0,073	0,215	41,7	Diluição da Amostra: 1/4
4	34,5	0,151	0,449	86,0	Taxa de Reação: 20,97 μmol/min
6	34,0	0,229	0,683	128,9	Atividade
8	33,5	0,299	0,893	166,1	Total: 874 U/g síl.
10	33,0	0,369	1,102	202,1	Específica: 14,7 U/mg prot.
12	32,5	0,430	1,285	232,1	

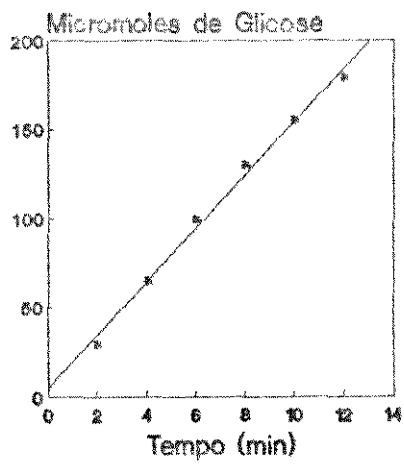
Serie V 24-32 mesh



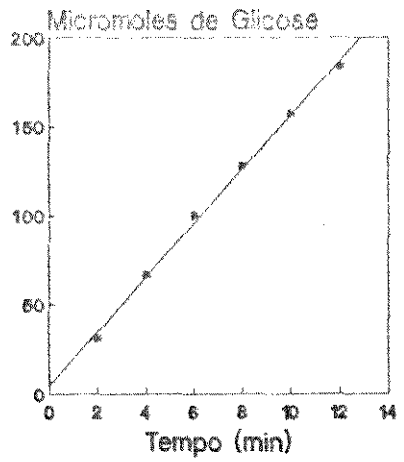
Serie V 32-35 mesh



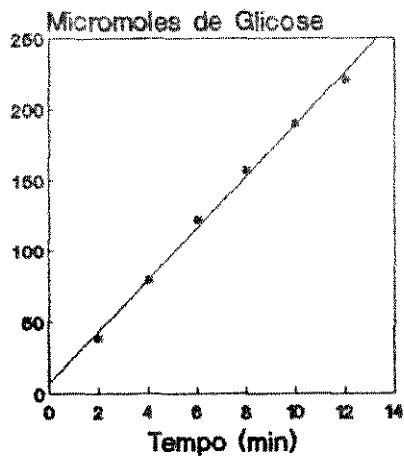
Serie V 35-42 mesh



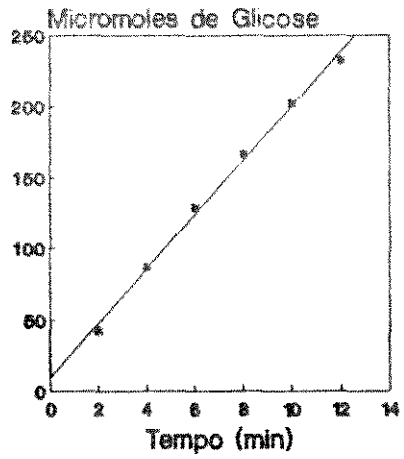
Serie V 42-48 mesh



Serie V 48-60 mesh



Serie V 60-65 mesh



ANEXO XIV

IMOBILIZAÇÃO DE ALBUMINA NA SILICA SÉRIE V

XIV.1 - IMOBILIZAÇÃO EM TAMPÃO 0,05 M, pH 7,0

Proteína: Albumina de Soro Bovino a 21,00 mg de proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

Volume de amostra para proteína: 20 µl

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Bruto Albumi- na (mg)	Sol. Alb. (mg)	Abs. 620 nm	Sobre- nadan- te (mg)	Prot. (mg)	Imob (mg/g)
SPC	9397	100	9644	10151	507	,089	5342	4,802	65,60
TA	9396	110	9678	10192	514	,224	5124	9,570	8,92
151	9409	100	9608	10199	519	,208	5528	9,792	11,31
181	9414	106	9704	10229	525	,198	5339	6,866	19,54
203	9480	98	9759	10286	527	,141	5419	2,978	47,24
215	9380	110	9698	10200	502	,103	5167	1,814	54,60
225	9453	107	9759	10282	523	,090	5409	2,856	63,56
236	9424	105	9747	10273	524	,082	5308	3,345	68,97
245	9455	112	9794	10319	525	,072	5428	3,535	68,00
255	9304	96	9568	10069	501	,093	5096	4,630	67,27
270	9431	114	9740	10137	397	,054	5273	5,449	50,48

XIV.2 - IMOBILIZAÇÃO EM TAMPÃO 0,05 M, pH 7,0 com NaCl 0,9%

Proteína: Albumina de Soro Bovino a 21,924 mg de proteína/ml

Tempo de Imobilização: 40 h

Volume de amostra para proteína: 25 µl

Amos- tra	Tara (mg)	Sil. (mg)	Bruto úmido (mg)	Bruto Albumi- na (mg)	Sol. Alb. (mg)	Abs. 620 nm	Sobre- nadan- te (mg)	[Prot] (mg/ ml)	Imob (mg/g)
SPC	9398	104	9637	10109	472	,132	5390	0,765	53,60
TA	9396	124	9700	10191	491	,258	5335	1,915	9,87
151	9408	104	9660	10171	511	,264	5318	1,767	13,86
181	9413	99	9693	10191	498	,185	5454	1,677	41,23
203	9480	108	9790	10290	500	,081	5313	1,188	74,20
215	9380	103	9667	10152	485	,045	5556	0,878	85,90
225	9452	94	9719	10194	475	,076	5406	0,773	80,70
236	9424	100	9708	10183	475	,092	5298	0,709	70,79
245	9455	108	9740	10219	479	,097	5327	0,628	64,77
255	9304	100	9567	10048	481	,132	5197	0,797	59,44
270	9430	115	9726	10213	487	,146	5540	0,482	45,71