

Este parecer corresponde
à redação final da Tese defendida
por Viciema Lwin Cardoso e aprovada
pela Comissão Julgadora em 07/11/88.

[Handwritten Signature]
Prof. Dr. EDISON BITTENCOURT
(ORIENTADOR)

SÍNTESE E ESTUDO DO DESEMPENHO DE
SUPORTES POLIMÉRICOS NA IMOBILIZAÇÃO
DE ENZIMAS

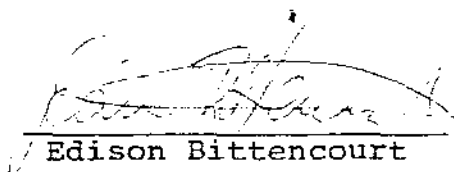
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Campinas
Engenharia Química

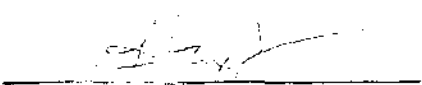
"SÍNTESE E ESTUDO DO DESEMPENHO DE
SUPORTES POLIMÉRICOS NA IMOBILIZAÇÃO
DE ENZIMAS"

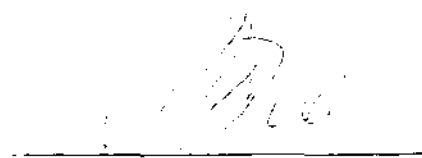
Autora: Vicelma Luiz Cardoso

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

Aprovado por:


Edison Bittencourt
(Orientador)


Eli Hage Jr.


Lúcia Helena I. Mei

Campinas - SP - Brasil
7 de novembro de 1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,
Maria Izabel e Eurípedes,
pelo apoio, dedicação e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Edison Bittencourt, pela valiosa e dedicada orientação prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor João Jorge Ribeiro Damasceno, pela grande ajuda dada através de discussões, sugestões e estímulo.

À Professora e amiga Sandra Helena Milagre, pela ajuda na revisão ortográfica deste trabalho.

Ao amigo Jeová Kardec Soares Bailão, pela elaboração das figuras que compõem este trabalho.

A Cláudia de Oliveira, pelo excelente trabalho de datilografia.

A Humberto Belo e Silva, pelo auxílio na execução dos equipamentos utilizados na montagem experimental.

A Zuleide Ferreira da Costa e a Maria de Fátima Souza, pelo auxílio na montagem e na determinação de dados experimentais.

A Michel Jorge Chueiri Filho, pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos professores do curso de Engenharia Química da Unicamp e da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio e colaboração.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para que a realização deste trabalho se tornasse possível.

RESUMO

A técnica de imobilização de enzimas vem sendo muito pesquisada atualmente, devido à possibilidade de sua utilização em processos enzimáticos que requerem alto custo na recuperação deste catalisador do meio reacional.

As enzimas utilizadas nesse estudo foram a invertase e a amiloglicosidase imobilizadas nas resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído na forma pulverizada e impregnadas em microcamadas sobre malhas de poliéster

Neste trabalho foram estudadas a síntese e a caracterização das resinas, a preparação dos suportes, a caracterização das enzimas em fase líquida, e a influência de parâmetros importantes no desempenho das enzimas imobilizadas e no processo de imobilização, tais como: temperatura, pH, força iônica da solução tampão, estabilidade do catalisador após uso prolongado, agitação, concentração de enzimas nos suportes, grau de retenção das resinas nos tecidos, tempo de estocagem, estabilidade térmica e a conversão em função do tempo de reação.

Foi desenvolvido ainda um estudo cinético das enzimas imobilizadas em reator de leito fixo e um estudo da estabilidade operacional em reatores de leito fixo e de leito fluidizado.

Os resultados experimentais conduziram à determinação de condições ótimas de operação, e mostraram um compor-

tamento cinético segundo a equação de Michaelis-Menten, para ambas as enzimas em fase líquida e imobilizadas. O reator de leito fixo comportou-se, aproximadamente, como um reator tubular ideal.

A estabilidade operacional mostrou um tempo de meia-vida para as enzimas imobilizadas, um pouco superior aos valores obtidos em outros trabalhos.

De maneira geral, apesar de se verificar uma queda significativa na atividade catalítica das enzimas imobilizadas, relativa às enzimas livres, os resultados obtidos com esses suportes mostraram-se superiores aos encontrados por vários pesquisadores.

ABSTRACT

Enzyme immobilization is presently being investigated widely due to the possibility of its application in enzymatic processes with high cost of catalyst recuperation from the reaction medium.

In this study, invertase and amiloglicosidase were immobilized in N-metilolacrylamide and urea-formaldehyde resins impregnated in microlayers on polyester lattice, and polymerized resins pulverized by ball milling.

Items studied were synthesis, resin characterization, lattice preparation, enzyme characterization in the liquid phase, and the influence of parameters important to immobilized enzyme performance and the immobilization process, such as temperature, pH, ionic force of the buffer solution, catalyst stability after prolonged use, agitation, enzyme concentration, level of retention of enzyme, storage time, thermal stability and conversion as function of reaction time.

Also studied were kinetics of immobilized enzymes in a fixed bed reactor and operational stability in fixed and fluidized beds reactors.

Optimum operating conditions were determined. Kinetic behavior of both enzymes in the liquid and immobilized phases was according to the Michaelis-Menten equation. The fixed bed reactor performed approximately like an ideal tubular reactor.

The half life of immobilized enzymes was found to be slightly superior to that obtained by other workers.

In general, the catalytic activity of immobilized enzymes is significantly lower than that of free enzymes. Results obtained were superior to those obtained by other workers.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 - Imobilização de Enzima.....	7
2.1.1 - Histórico e Aplicação da Enzima Imobilizada...	7
2.1.2 - Métodos de Imobilização de Enzimas.....	15
2.1.3 - Cinética de Michaelis-Menten.....	23
2.1.4 - Reatores para Enzimas Imobilizadas.....	26
2.1.5 - Enzimas Invertase e Amiloglicosidase.....	32
2.2 - Resina Uréia-Formaldeído.....	39
2.3 - Resina N-metilolacrilamida.....	45
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS ANALÍTICOS.....	52
3.1 - Síntese das Resinas.....	53
3.1.1 - Resina N-metilolacrilamida.....	53
3.1.1.1 - Materiais.....	53
3.1.1.2 - Equipamentos.....	53
3.1.1.3 - Procedimento Experimental.....	55
3.1.2 - Resina Uréia-Formaldeído.....	57
3.1.2.1 - Materiais.....	57
3.1.2.2 - Equipamentos.....	58
3.1.2.3 - Procedimento Experimental.....	58
3.2 - Padronização dos Reagentes Principais.....	60
3.2.1 - Determinação da Concentração de Monômeros na So lução de Acrilamida.....	62

	Pág.
3.2.2 - Dosagem da Solução de Formaldeído Comercial...	62
3.2.2.1 - Materiais.....	62
3.2.2.2 - Procedimento Experimental.....	62
3.3 - Caracterização das Resinas.....	63
3.3.1 - Espectro de Infravermelho.....	63
3.3.2 - Determinação do Formaldeído Livre.....	64
3.3.2.1 - Materiais.....	64
3.3.2.2 - Procedimento Experimental.....	65
3.3.3 - Densidade.....	66
3.3.4 - Sólidos Totais.....	66
3.3.4.1 - Resina N-metilolacrilamida.....	66
3.3.4.1.1 - Materiais.....	66
3.3.4.1.2 - Equipamentos.....	67
3.3.4.1.3 - Procedimento Experimental.....	67
3.3.4.2 - Resina Uréia-Formaldeído.....	70
3.4 - Preparação dos Suportes-Resinas.....	71
3.4.1 - Preparação dos Suportes na Forma de Partículas.	71
3.4.1.1 - Materiais.....	71
3.4.1.2 - Procedimento Experimental.....	71
3.4.2 - Moagem e Separação das Resinas.....	72
3.4.2.1 - Procedimento Experimental.....	72
3.4.3 - Preparação dos Suportes na Forma de Resina po limerizada sobre Tecido.....	72
3.4.3.1 - Materiais.....	73
3.4.3.2 - Equipamentos.....	73
3.4.3.3 - Procedimento Experimental.....	74

	Pág.
3.5 - Preparação dos Reagentes Utilizados na Caracteri- zação das Enzimas.....	75
3.5.1 - Preparação das Soluções Tampão.....	75
3.5.1.1 - Materiais.....	76
3.5.1.2 - Procedimento Experimental.....	76
3.5.2 - Preparação do Reativo de Folin Ciocalteau.....	76
3.5.2.1 - Materiais.....	77
3.5.2.2 - Procedimento Experimental.....	77
3.5.3 - Dosagem de Glicose.....	78
3.5.3.1 - Equipamentos.....	79
3.5.3.2 - Procedimento Experimental.....	79
3.6 - Caracterização das Enzimas na Fase Líquida.....	80
3.6.1 - Materiais.....	80
3.6.2 - Equipamentos.....	81
3.6.3 - Procedimento Experimental.....	81
3.6.3.1 - Determinação da Atividade contra Temperatura e pH para Enzima Amiloglicosidase.....	81
3.6.3.2 - Curvas de Conversão para a Enzima Amiloglico- sidase.....	83
3.6.3.3 - Determinação da Atividade contra a Temperatu- ra e o pH para a Enzima Invertase.....	83
3.6.3.4 - Curvas de Conversão para Enzima Invertase....	84
3.6.3.5 - Determinação dos Parâmetros Cinéticos em Rea- tor Batelada.....	84
3.7 - Processo de Imobilização.....	85
3.7.1 - Determinação da Quantidade de Enzima Fixada....	87

	Pág.
3.7.1.1 - Equipamentos.....	87
3.7.1.2 - Procedimento Experimental	87
3.7.2 - Influência da Temperatura e do Tempo de Imobilização na Atividade Enzimática.....	88
3.7.3 - Influência da Agitação e do Tempo de Imobilização na Atividade Enzimática.....	89
3.7.4 - Influência do pH da Solução de Imobilização na Atividade Enzimática.....	89
3.8 - Caracterização da Enzima Imobilizada.....	90
3.8.1 - Influência do pH da Solução Substrato na Atividade das Enzimas Imobilizadas.....	92
3.8.2 - Influência da Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada.....	92
3.8.3 - Influência da Força Iônica da Solução Substrato na Atividade da Enzima Imobilizada.....	93
3.8.4 - Estabilidade Térmica.....	94
3.8.5 - Quantificação da Atividade das Enzimas liberadas do seu Suporte em Função do Número de Batelada e Influência das Bateladas na Atividade das Enzimas Imobilizadas.....	94
3.8.6 - Conversão do Substrato por Enzima Imobilizada em Função do Tempo.....	96
3.8.7 - Influência do Grau de Retenção da Resina no Tecido em Relação a Atividade Enzimática.....	96
3.8.8 - Influência do Tempo de Estocagem na Atividade da Enzima Imobilizada.....	96

	Pág.
3.9 - Cálculo dos Parâmetros Cinéticos Aparentes para Enzimas Imobilizadas, Utilizando Reator Tipo <u>Ba</u> telada.....	97
3.10 - Montagem Operacional com Microreator de Leito Fixo e de Leito Fluidizado.....	97
3.11 - Caracterização do Microreator de Leito Fixo em Função da Distribuição do Tempo de Residência...	102
3.12 - Estudo da Conversão em Função da Velocidade Superficial de Fluxo.....	103
3.13 - Estabilidade Operacional em Microreator de Leito Fixo e de Leito Fluidizado.....	104
3.14 - Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose e da Sa-carificação do Amido em Reator Tubular de Leito Fixo, Utilizando Enzimas Imobilizadas.....	105
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	106
4.1 - Síntese e Caracterização das Resinas N-metilolacrilamida e Uréia-Formaldeído.....	107
4.2 - Preparação dos Suportes para Fixação das Enzi-mas.....	112
4.3 - Caracterização das Enzimas em Fase Líquida.....	114
4.4 - Desenvolvimento do Processo de Imobilização....	118
4.5 - Caracterização das Enzimas Imobilizadas.....	136

	Pág.
1.5 - Caracterização do Microreator de Leito Fixo em Função da Distribuição do Tempo de Residência..	162
4.7 - Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose e da Sacarificação do Amido, Utilizando um Microrea- tor de Leito Fixo, com as Enzimas Imobilizadas.	165
4.8 - Estabilidade Operacional das Enzimas Imobili- zadas num Reator de Leito Fixo e de Leito Flui- dizado.....	181
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	193
5.1 - Conclusões.....	194
5.2 - Sugestões.....	197
NOMENCLATURA DAS VARIÁVEIS.....	199
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	202

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os crescentes progressos alcançados na área biomédica têm exigido o desenvolvimento de materiais adequados para utilização em seus diversos ramos. Isto tem provocado uma interação cada vez maior entre esta área e a de Desenvolvimento de Materiais.

Como exemplo, pode-se citar os frequentes estudos visando encontrar suportes, insolúveis em água, capazes de imobilizar imunoproteínas, a fim de fornecer um imunosorvente de alta reatividade e estabilidade e com sensibilidade e reprodutividade superiores às do Teste Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), quando realizados em placas de poliestireno³⁰⁻³¹⁻⁸⁴.

Esse trabalho se originou dos bons resultados obtidos com um novo suporte, desenvolvido para a imobilização de antígenos, e que vem sendo utilizado em Teste Elisa³¹⁻⁸⁴. Assim, pensou-se na possibilidade de utilizá-lo na imobilização de enzimas.

Enzimas são catalisadores biológicos formados por proteínas, que participam da maioria das reações bioquímicas que ocorrem nas células vivas. Uma característica fundamental que distingue as enzimas dos catalisadores químicos é a capacidade que elas têm de exercer sua atividade com grande especificidade e sob condições suaves de temperatura, pressão e pH. Além disso, sua atuação ocorre dentro de pequenas faixas de temperatura e pH, sendo que, na maioria dos casos, elas apresentam "pequenas faixas" operacionais ótimas²⁰⁻¹¹⁷.

O uso de enzimas tem-se estendido gradualmente a vá-

rios campos, como na fabricação de bebidas, na produção de alimentos, na conversão de resíduos celulósicos e nas análises clínicas. Porém, salvo alguns processos de hidrólise que atualmente empregam catalisadores enzimáticos, seu uso industrial é limitado pelo alto custo e instabilidade⁸⁶. Outra dificuldade para utilização industrial, é o fato de ser difícil recuperá-las da mistura reacional, ainda na forma ativa.

Para contornar as dificuldades inerentes à sua recuperação nos sistemas reacionais, desenvolveram-se técnicas que permitem que as enzimas sejam colocadas na forma imobilizada (fixadas a suportes orgânicos e inorgânicos insolúveis em água, polimerizadas em um gel insolúvel em água, entrelaçadas dentro de uma matriz gel insolúvel ou mesmo dentro de microcápsulas insolúveis), sem a perda de sua atividade^{20,86}.

A imobilização baseia-se na limitação dos movimentos da enzima mantendo-a numa região relativamente definida do espaço e conservando sua atividade catalítica²⁰.

As principais vantagens no uso de enzimas imobilizadas são:

- . Contornar o problema de sua recuperação do meio reacional;
- . Aumentar, em alguns casos, a estabilidade da enzima quanto a temperatura, pH e concentração do substrato;
- . Permitir a reutilização da enzima;
- . Permitir a utilização de grande variedade de reatores, que inclusive podem operar em regime contínuo.

O novo suporte desenvolvido é de baixo custo e de fácil preparação, sendo composto de resina reticulada, que apresenta grupos funcionais N-metilol ($-N-CH_2O$), capazes de reagir com vários grupos presentes nas proteínas.

Fundamentado no estudo de Bittencourt e outros¹⁰, Peres⁸⁴ e Ferreira⁹¹, que desenvolveram e caracterizaram preliminarmente este sistema, sintetizou-se as resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído, impregnando-as em microcamadas no tecido de poliéster e cortando-o na forma de discos. Para desenvolver um estudo comparativo do comportamento do novo suporte, utilizou-se também as resinas polimerizadas e trituradas na forma de pó.

Esse trabalho tem como objetivo principal o estudo do desempenho das enzimas Amiloglicosidase e Invertase, imobilizadas em suportes preparados a partir das resinas previamente sintetizadas e caracterizadas. Com essa finalidade foram investigados os seguintes aspectos:

1. Síntese e caracterização das resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído, quanto aos grupos funcionais por absorção no infravermelho, ao formaldeído livre, à concentração de sólidos e à densidade;
2. Preparação dos suportes usados para imobilizar as enzimas;
3. Caracterização do desempenho das enzimas dissolvidas em fase líquida, com a finalidade de comparar estes resultados com os obtidos no caso da enzima imobilizada;

4. Estudo dos parâmetros que podem influenciar o processo de imobilização;
5. Caracterização das enzimas imobilizadas, verificando-se variáveis que afetam a atividade enzimática;
6. Determinação da estabilidade das enzimas imobilizadas, em relação ao tempo de estocagem;
7. Estudo preliminar da cinética das reações catalisadas por enzimas imobilizadas, em processo descontínuo e em processo contínuo em reator de leito fixo;
8. Estudo preliminar da estabilidade operacional das enzimas imobilizadas em microreator de leito fixo e de leito fluidizado.

Devemos ressaltar que os suportes sólidos e reativos utilizados neste trabalho são inovadores e os resultados destes estudos são inéditos, considerando-se a natureza dos referidos suportes.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

2.1.1. Histórico e Aplicações das Enzimas Imobilizadas

O alcance do método de ligação química usando polímeros é imenso. São descritos nesse trabalho somente alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos.

O primeiro trabalho nessa área, que se tem notícia foi realizado em 1916, quando Nelson e Griffin observaram que a invertase adsorvida em carvão e em alumina apresentava atividade catalítica⁷⁷. Em 1921, Nelson e Hitchcok⁷⁸ verificaram que a atividade da invertase na presença desses adsorventes era menor do que na ausência dos mesmos.

Pode-se afirmar que a técnica de imobilização de enzimas surgiu nos anos 40¹⁰¹. Em 1949, Michael e Ewers utilizaram o derivado ácido de carboximetilcelulose para imobilizar uma grande variedade de proteínas. Entretanto, a primeira tentativa de imobilização de enzimas com o objetivo de melhorar suas propriedades, ocorreu em 1953, quando Grubhofer e Shleith, realizando um número expressivo de experimentos, imobilizaram pepsina, amilase e carboxipeptase, utilizando a resina de poliestireno como suporte²⁰.

Um dos problemas da época era a escassez de polímeros comerciais que pudessem ser testados como suportes para imobilização de enzimas, assim a maioria das resinas hidrofóbicas utilizadas era sintetizada em laboratório. Por outro lado, de

ve-se considerar os poucos conhecimentos existentes na época sobre a estrutura química das proteínas.

Segundo Trevan¹⁰¹, o maior problema da época era a falta de conhecimentos; por exemplo, em meados dos anos 50, MacLaren estudou a adsorção de enzimas em caulinita, e publicou trabalhos em revistas e periódicos como o Annual Proceedings of the Society of Soil Science, periódico geralmente não consultado por biotecnólogos.

Segundo Chibata²⁰, nos anos 50, menos de dez trabalhos foram publicados na área de enzimas imobilizadas. Porém, deve-se enfatizar que A. D. MacLaren e Zittle foram dois grandes pesquisadores da técnica de imobilização de enzimas no período de 1954 a 1961, fase em que eles se preocuparam com a adsorção de enzimas em suportes inorgânicos^{68, 118}. Por outro lado, Katchalski, em 1960, publicou um trabalho na área de imobilização de enzimas através de ligação covalente em polímeros orgânicos⁵⁰.

Em 1961, Mitz e Summaria⁷² noticiaram a ligação de tripsina e chimotripsina em copolímeros orgânicos à base de celulose como o aminobenzil celulose diazotado e derivados de carboximetilcelulose. Os métodos propostos por estes pesquisadores são utilizados até hoje.

Em 1962, Manecke¹⁰¹ observou que a atividade de uma enzima imobilizada depende do grau de hidratação da matriz polimérica e utilizou outros polímeros além dos celulósicos, como suportes para imobilização de enzimas através de ligação

covalente. Nesse mesmo ano, Manecke utilizando copolímero acrilado imobilizou pepsina, amilase, invertase e álcool desidrogenase. Esta última foi a primeira enzima do tipo Óxido-reductase a ser imobilizada com sucesso, visto que, até então, apenas enzimas do tipo hidrolases haviam sido imobilizadas

Os trabalhos pioneiros nesta área, utilizaram o processo de adsorção para suportes inorgânicos e ligação covalente para os suportes orgânicos⁷¹.

A popularidade do uso de derivados celulósicos como suportes para a imobilização de enzimas, nos anos 50 e 60, deveu-se a diversas vantagens, tais como, sua alta hidrofiliidade, a facilidade de ser encontrada no comércio e seu potencial de reação produzindo derivações químicas variadas, ou seja, é relativamente fácil sintetizar outros polímeros na forma de pó ou de membrana, usando como base a celulose.

Atualmente, sabe-se que os polissacarídeos não são suportes ideais para a imobilização de enzimas por apresentarem dois sérios inconvenientes: o primeiro, consiste na sua suscetibilidade ao ataque microbiano; o segundo inconveniente é sua baixa especificidade, isto é, a celulose adsorve em alto grau proteínas não específicas. Conseqüentemente, a enzima imobilizada deve ser muito bem lavada em solução com alta força iônica. Este processo frequentemente inativa a enzima, especialmente sendo ela um polímero na sua forma ativa¹⁰¹.

A utilização de reagentes multifuncionais na imobiliz

zação, como moléculas que promovem ligação entre o suporte e a enzima, foi iniciada nos anos 60. Estes reagentes devem ser constituído por moléculas pequenas e somente reagir com o suporte e com a enzima específicos.

Em 1967 Kay e Crook⁵² e em 1968 Kay e outros⁵³, utilizando o reagente multifuncional triclorotriazina, imobilizaram galactase, lactase, desidrogenase, piruvato quinase e creatinina quinase em celulose na forma de papel de filtro. Esse reagente apresenta 3 grupos reativos C-Cl: o primeiro reage rapidamente com a celulose; o segundo, com a enzima e o terceiro pode reagir com algum composto conveniente. A vantagem no uso deste reagente multifuncional é que a natureza iônica do complexo enzima-celulose depende da carga iônica desse reagente, que pode ser neutra, catiônica ou aniônica, dependendo da natureza do composto presente na terceira ligação.

Outro reagente multifuncional é o glutaraldeído, que contém dois grupos aldeído nos extremos da molécula. Como o grupo aldeído reage, em pH neutro, com grupos aminos livres, um desses grupos finais da molécula de glutaraldeído pode ser ligado ao suporte e o outro a enzima.

Um método de ativação bastante comum usado atualmente é aquele que envolve o grupo brometo de cianogênio (Ascen e outros 1967; Porath⁸⁵ 1974). A forma exata da reação de ligação desse reagente com a molécula de celulose não é bem conhecida, mas em pH elevado, aparentemente, ocorre reação rápida com grupo hidroxila dos polissacarídeos e seu derivado reage com o grupo amino livre da enzima em meio alcalino. O brometo de cianogênio é extremamente tóxico, devendo ser toma

das precauções para o seu manuseio. Deve-se enfatizar, que apesar desse reagente ser conveniente para ligação de pequenas moléculas, ele apresenta instabilidade química¹⁰¹.

Os reagentes multifuncionais podem ser usados não somente para ligar moléculas de enzimas em celulose ou outro suporte polimérico, mas também, para ligar moléculas de enzimas umas nas outras.

Em alguns casos, é interessante economicamente a copolimerização da enzima com uma proteína inerte, como a albumina, a fim de aumentar a quantidade de produto final¹⁰¹.

Outros materiais que são empregados como suportes e têm apresentado relativo sucesso são: o vidro (Weetall, 1969), o Nylon (Inman e Hornby, 1972), e os derivados de poliacrilamida, que surgiram em 1969 a partir de um trabalho pioneiro de Inman e Durtzis. Atualmente uma variedade de copolímeros acrilados são comercialmente disponíveis, apresentando geralmente alguns grupos reativos como: diazo, aldeídos e hidrocianatos. Um derivado interessante, deste grupo de polímeros, são os solúveis em água que são utilizados nos processos de preparação de enzimas imobilizadas solúveis¹⁰¹.

A possibilidade de utilização da enzima imobilizada como um catalisador reutilizável tem provocado uma intensa investigação nessa área. As aplicações práticas das enzimas imobilizadas podem ser divididas em 3 categorias: uso analítico, uso terapêutico e uso industrial^{16, 20, 101}.

A aplicação analítica pode ser observada através de duas técnicas: os eletrodos enzimáticos e as análises automá-

licas. Os eletrodos enzimáticos consistem de uma célula capaz de gerar um potencial elétrico através de uma reação catalisada por enzimas imobilizadas que estão fixadas ao redor da célula. Atualmente, tem-se procurado usar enzimas imobilizadas em processos contínuos de auto-análise de pequenas amostras, como por exemplo do sangue¹⁰¹.

Como agente terapêutico, enzimas imobilizadas, contidas em cápsulas de polímeros não alérgicos, podem ser ingeridas por indivíduos que apresentam problemas de mau funcionamento de determinada enzima ou até ausência da mesma no organismo. A injeção intravenosa de enzimas imobilizadas em cápsulas de polímero anti-alérgico, semelhantes às hemácias artificiais, resulta num rápido acúmulo destas, no fígado e no baço, onde as cápsulas são rapidamente degradadas, liberando as enzimas¹⁰¹.

As aplicações biomédicas das enzimas imobilizadas ainda se situam num estado de estudos básicos, devido a necessidade de pré-requisitos, tais como: ausência de toxicidade, de hemólise e de alergia, assim como de estabilidade química "in vivo" e reações imunológicas¹⁶.

As aplicações industriais existem em número limitado, devido a vários fatores principalmente de natureza técnico-econômica, relacionados com os elevados custos do processo de imobilização, com a relativa baixa eficiência da enzima após a imobilização e com a baixa estabilidade operacional.

A utilização de enzimas imobilizadas em processos con

tínuos surgiu no Japão em 1969. Segundo Basta⁵, em 1971, iniciou-se nos Estados Unidos a produção de xaropes com alto teor de frutose, a partir do amido de milho, utilizando enzimas imobilizadas. A partir dessa instalação, surgiram outras fábricas de xaropes com alto teor de frutose na Alemanha Ocidental, em 1980. Em 1982, entrou em funcionamento uma planta para produção de adoçantes e uma outra para produção de glicose e galactose, ambas partindo do soro de leite e utilizando técnicas de imobilização de enzima⁵.

O futuro domínio da aplicação industrial das enzimas imobilizadas deverá verificar-se em processos mais complexos de síntese e na obtenção de produtos de custo elevado, nomeadamente de química fina para os quais se torne desvantajosa, economicamente, a utilização de enzimas solúveis¹⁶.

A atividade específica das enzimas imobilizadas pode ser substancialmente menor que a das enzimas livres. Alguns fatores podem provocar a inativação das enzimas, tais como: pH, presença de radicais livres, ou de agentes oxidantes, temperatura elevada e agitação. A figura 2.1 proposta por Trevan¹⁰¹, mostra os possíveis mecanismos de inativação que podem ocorrer no processo de imobilização de enzima em matrizes poliméricas.

Segundo Trevan¹⁰¹, o critério inicial de escolha do método de imobilização é puramente empírico, porém deve-se levar em consideração a manutenção da atividade enzimática. Ele propõe alguns fatores que podem auxiliar para o sucesso de uma imobilização.

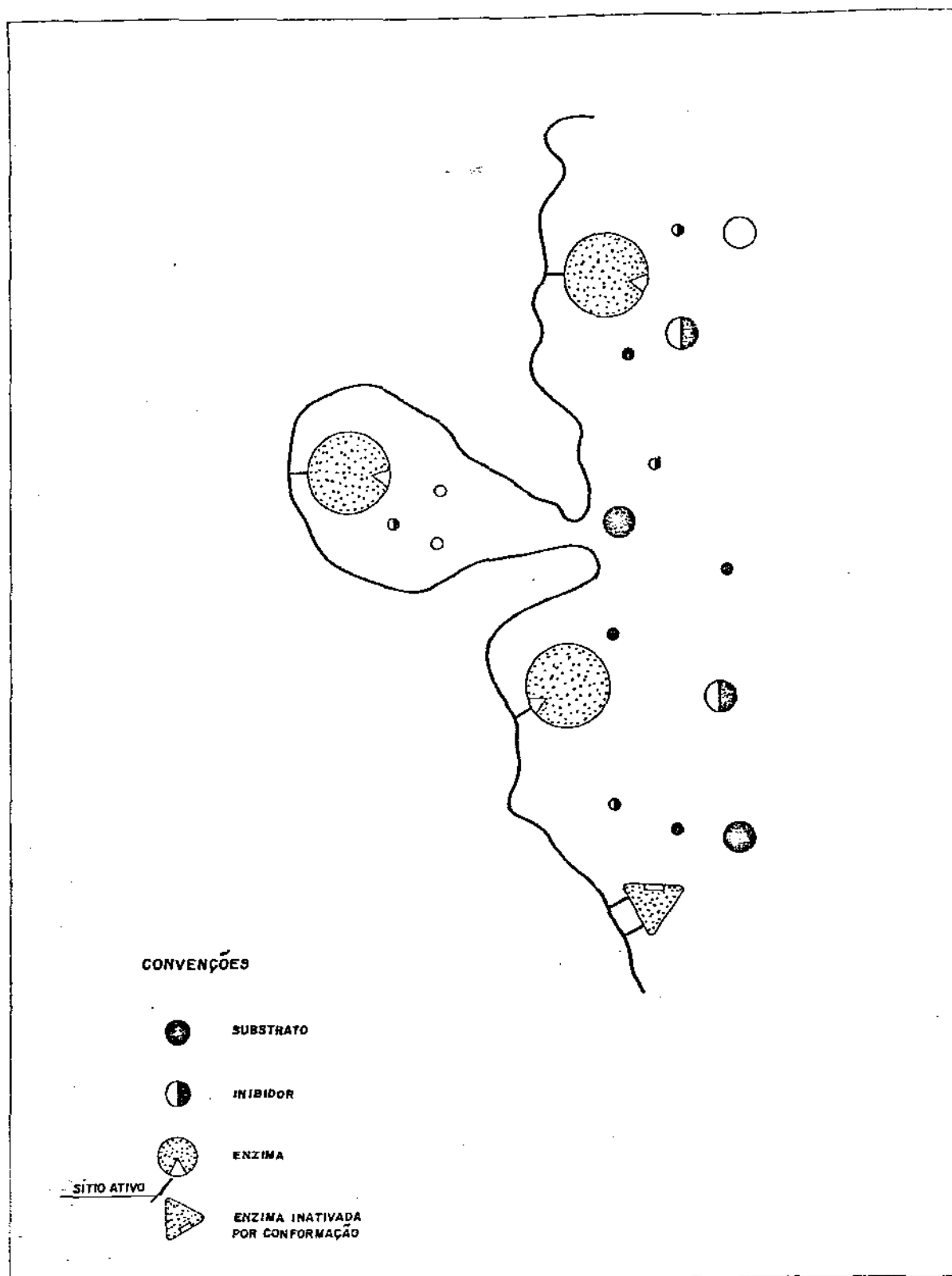


FIGURA 2.1.

POSSÍVEIS MECANISMOS DE INATIVAÇÃO QUE PODEM OCORRER NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATRIZES POLIMÉRICAS¹⁰¹.

2.1.2. Métodos de Imobilização de Enzimas

Atualmente, existe uma grande variedade de métodos para imobilização de enzimas, sendo os mesmos, geralmente, combinações de duas ou mais técnicas de ligação. Na primeira conferência sobre a "Engenharia de Enzima", realizado em 1971^{16, 113}, foi proposto a seguinte classificação para as enzimas imobilizadas:

1. Enzimas Ligadas
 - . adsorção
 - . Ligação Covalente

2. Enzimas Entrelaçadas
 - . em Matrizes
 - . em Cápsulas

Chibata²⁰ propôs mais um grupo de classificação que entraria como item 3: ligação cruzada.

A figura 2.2 proposta por Trevan¹⁰¹, mostra os métodos de ligação das enzimas nos suportes.

A adsorção potencialmente representa o processo mais econômico e o mais antigo. Esse método de imobilização consiste na adsorção das enzimas em matrizes poliméricas sem ligação covalente. Essa técnica é extremamente fácil, basta agitar juntamente enzima e adsorvente. Porém, o rendimento (massa de enzima ligada por unidade de massa de adsorvente) é baixo e grande quantidade de enzima é frequentemente desativada

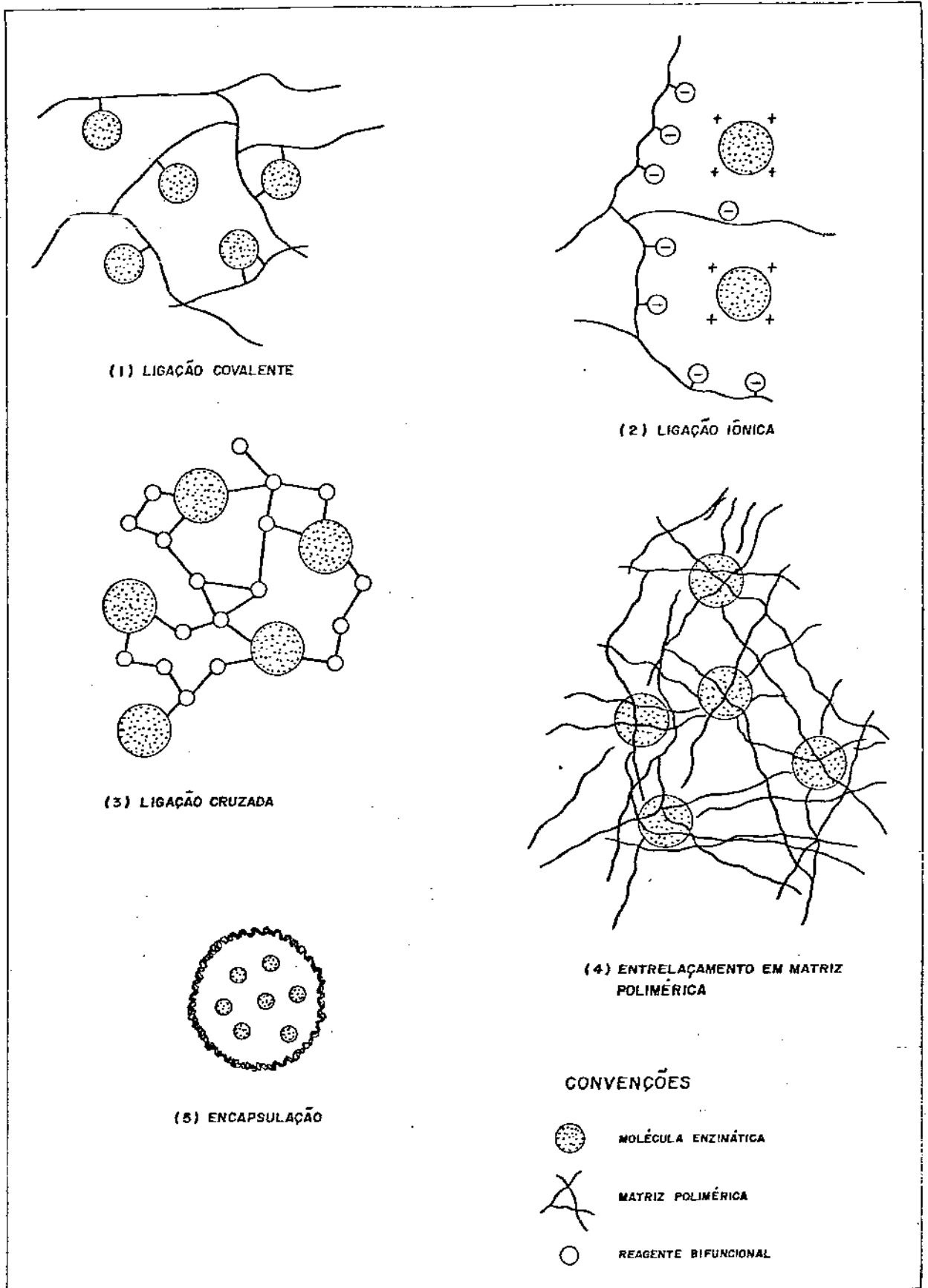


FIGURA - 2.2

MECANISMOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS¹⁰¹

de maneira parcial ou total. Apesar da simplicidade do método, as reações envolvidas na adsorção são complexas e envolvem vários tipos de ligações. A enzima adsorvida pode desprender do suporte durante sua utilização devido a pequenas flutuações de algumas variáveis como pH, temperatura e força iônica, isto porque a força de ligação entre a enzima e o suporte é fraca²⁰. Pode-se enumerar alguns tipos de ligação que atuam na adsorção, tais como: forças de van der Waals, pontes de hidrogênio, quimissorção e troca iônica⁷¹. Esse último tipo de ligação foi detalhado por Zittle¹¹⁸, MacLaren e Packer⁶⁹, Hair⁴⁰ e Janes e Angenstein⁴⁷.

Apesar destas limitações, esse método foi o primeiro a ser usado em escala industrial em 1969. O processo comercial consiste na imobilização por adsorção da enzima aminocilase em DEAE (dietil amino etil), e DEAE celulose. Este processo foi empregado no Japão, devido a esforços de Tosa, Mori, Fusi e Chibata. A partir daí, vários trabalhos, utilizando estes suportes foram desenvolvidos com relativo sucesso, como a imobilização da glicose isomerase⁷¹.

Os derivados de celulose como carboximetilcelulose e DEAE celulose, são bastante utilizados como resinas de troca iônica, devido a sua alta capacidade adsorvente (acima de 15% em peso, proteína/celulose). Outros materiais frequentemente usados com capacidade bastante inferior são: resinas de poliestireno, caulinita, colágeno, alumínio, sílica gel, vidro e óxidos metálicos¹⁰¹.

Em 1975 Messing⁷¹ realizou estudos de revisão sobre

a adsorção de enzimas em partículas de cerâmica porosa, carvão, alumina, colágeno, DEAE-celulose e dióxido de titânio, bem como sobre a utilização de sais de metais de transição para a fixação das enzimas aos suportes. Messing também descreveu a imobilização de urease sobre dióxido de titânio por meio de uma ponte com sais de estanho; possivelmente, esse método esteja relacionado com o processo de ligação com metais de transição. Esse método foi aplicado com relativo sucesso para a celulose, porém, nas aplicações com suportes inorgânicos tem apresentado resultados imprevisíveis.

O método da ligação covalente, consiste em promover esse tipo de ligação entre enzimas e suportes insolúveis em água. As moléculas das enzimas se ligam covalentemente através de grupos nucleófilos funcionais das enzimas ($-NH_2$, $-SH$ e $-OH$), aos suportes contendo grupos reativos, tais como, aldeído, amino, diazônico, azida, ácido, isocianatos e haletos. As condições de reações necessárias para formação dessas ligações são normalmente drásticas. Em alguns casos, a ligação covalente altera a estrutura conformacional, provocando, conseqüentemente, a redução da atividade enzimática, bem como, podendo acarretar uma mudança de sua especificidade. Entretanto a enzima mantém-se firmemente ligada ao suporte, pois a energia de ligação é alta²⁰.

A seleção das condições de imobilização por ligação covalente é a mais difícil em relação aos outros métodos. Por outro lado, a imobilização com este tipo de ligação em políme-

ros é provavelmente o método mais usado, já que ele proporciona uma firme imobilização da enzima no suporte²⁰.

Segundo Weetall¹⁰⁹, Filbert e Pitcher³² a ligação covalente é comumente usada, por ser um método de imobilização muito versátil e produzir derivados imobilizados estáveis.

O método de imobilização por ligação cruzada se baseia na formação de ligações químicas, mas sem usar suportes insolúveis em água. A imobilização é realizada pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzimas por meio de reagentes bi ou multifuncionais.

Um fato interessante a ser registrado foi a observação de Baker, em 1910, que notou a formação de gel de proteína sob ação de aldeídos. Essa informação é útil ainda hoje, por possibilitar a obtenção de um precipitado enzimático usando reagentes multifuncionais, como o glutaraldeído¹⁰¹.

A reticulação intermolecular de enzimas, através de reagentes multifuncionais, provoca um aumento no tamanho das moléculas e a redução da distância intermolecular das enzimas. Usando tal propriedade, Richard (1964), Ogata (1968), Jasen (1969) e Habeeb (1967) promoveram a ligação cruzada das enzimas carboxipeptase, papaína e tripsina sob a forma de precipitados a partir de soluções enzimáticas¹⁰¹.

Em 1968, Goldman e outros³⁸ prepararam uma membrana enzimática, através da ligação cruzada das enzimas adsorvidas na superfície de uma membrana de nitrato de celulose, pela ação de glutaraldeído e posterior dissolução da membrana celulósica pela adição de metanol.

Embora, muitos outros reagentes multifuncionais possam ser usados como agentes de ligação cruzada, como por exemplo, o 2,4-dinitro 3,5-difluor benzeno, somente o glutaraldeído tem sido frequentemente utilizado, provavelmente, porque ele reage com as proteínas sob condições amenas de pH e temperatura e porque, talvez seja atualmente, o reagente multifuncional menos tóxico¹⁰¹.

O agente de ligação cruzada deve ser escolhido de modo a se ligar especificamente a grupos funcionais que não estejam envolvidos no sítio ativo da proteína.

O aspecto mais favorável no uso de reagentes multifuncionais como agentes de imobilização de enzimas, é que eles podem produzir tipos bastante diferentes de derivados enzimáticos, tais como géis enzimáticos entrelaçados, membranas enzimáticas, derivados adsorvidos em monocamadas e conjugados insolúveis em água, ligados a polímeros. A preparação de derivados enzimáticos insolúveis em água, usando reagentes multifuncionais, é simples e fornece produtos que são proteínas praticamente puras. Porém, pode-se citar algumas desvantagens desse método, tais como a necessidade de um rígido controle de pH, concentração, a necessidade de um grande volume de proteína ou coproteína e a frequente inativação das enzimas causada pelo ataque dos seus sítios ativos¹¹⁵.

Weetall¹⁰⁹ também afirma que as enzimas imobilizadas por ligação cruzada, apresentam uma natureza gelatinosa tornando difícil usá-las em algumas operações em coluna.

O entrelaçamento em matrizes, consiste no aprisionamento das moléculas dentro de uma matriz polimérica, isto é,

a enzima permanece retida dentro dos espaços intersticiais do polímero. Assim, as moléculas enzimáticas são fisicamente aprisionadas dentro de uma matriz polimérica, de onde não podem sair. Porém, as moléculas do substrato e produto podem se transferir através dessa rede, assegurando, desde que apresentem tamanhos apropriados, uma contínua transformação^{20, 115}.

O procedimento experimental consiste na polimerização de monômeros em uma solução aquosa, contendo enzima. O produto enzimático polimerizado pode ser mecanicamente disperso em partículas que podem ser liofilizadas⁴⁹.

A simplicidade experimental e a necessidade de pequenas quantidades de enzimas para a imobilização, além do fato de ser um processo físico, que não envolve nenhum problema de modificação química da enzima e nenhuma mudança nas suas propriedades intrínsecas, já que não há ligação covalente ou eletrostática das enzimas com polímeros, são responsáveis pelas grandes vantagens da utilização dessa técnica. Porém pode ocorrer inativação química ou térmica das enzimas durante a formação da matriz. Pode-se citar, também, outras desvantagens como a perda da enzima através dos interstícios poliméricos, a dificuldade de controle dos fatores experimentais e a limitação do uso apenas para substratos e produtos de baixo peso molecular¹¹⁵.

Em 1963 e 1968, Bernfield e co-autores^{7, 8}, obtiveram sucesso entrelaçando diversas enzimas em gel de poliacrilamida.

O método de entrelaçamento em microcápsula consiste

na imobilização de proteína dentro de microcápsulas semipermeáveis, porosas e de tamanho bem definido, obtidas a partir de polímeros orgânicos, de maneira que, as moléculas não possam escapar. Porém, soluções de baixos pesos moleculares podem entrar e sair da cápsula por difusão, através da membrana⁷¹.

Assim, como o entrelaçamento em matrizes, esse método tem a grande vantagem de ser um processo físico, por outro lado, essa técnica requer condições experimentais controladas em comparação com a microencapsulação de outros produtos químicos²⁰. As microcápsulas de enzimas imobilizadas podem ser preparadas desde o tamanho de 1 micron até vários microns¹⁰⁹.

Existem dois processos para a formação das microcápsulas: o primeiro consiste basicamente num processo de emulsificação, semelhante à homogeneização de água em óleo. Uma fase não é miscível na outra, mas formam cápsulas ou coaservados, quando misturadas uma com a outra⁷¹.

O segundo processo consiste na polimerização química de uma membrana insolúvel em água na interface de uma microgotas. A proteína em fase líquida é, inicialmente, emulsificada com um composto orgânico, dissolvido em um solvente orgânico. Logo após a formação das gotas ocorre a polimerização da porção orgânica⁷¹.

As membranas, mais comumente usadas, utilizam o Nylon e Acetato de Celulose¹⁰¹.

De fato, todos estes processos não ocorrem isolada-

mente, pois durante o processo de ligação com o suporte, ocorre alguma adsorção na superfície do mesmo. Durante a ligação covalente da enzima na superfície do suporte, pode ocorrer a adsorção e ainda, a ligação cruzada entre moléculas de enzimas. É possível também, que durante uma imobilização por adsorção, adicionalmente, ocorra a ligação cruzada entre as moléculas de enzimas bem como algumas ligações covalentes na superfície do suporte. O encapsulamento e entrelaçamento podem envolver, não somente adsorção física e química, bem como, a ligação cruzada e o ataque covalente da superfície do suporte⁷¹.

Portanto, quando se descreve uma técnica particular de imobilização de enzimas, está se analisando o tipo predominante de ligação.

2.1.3 Cinética de Michaelis-Menten

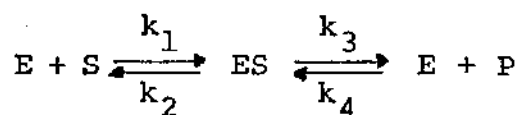
Como com qualquer catalisador, a velocidade de reação catalisada enzimaticamente depende diretamente da concentração de enzima, sendo proporcional a esta concentração quando em presença de excesso de substrato. Para uma dada concentração de enzima (E_0) a velocidade inicial de uma reação simples de transformação de um substrato aumenta no início linearmente com o aumento da sua concentração inicial (reação de primeira ordem). Contudo, com o aumento da concentração do substrato o aumento da velocidade começa a diminuir até que, para uma grande concentração de substrato, se torna independente desta (reação de ordem zero)¹⁶.

Henri observou este comportamento e em 1902 propôs a equação de velocidade¹⁶:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

onde $V_{m\acute{a}x} = \alpha \times E_0$

Embora Henri tivesse proposto uma explicação teórica para esta equação utilizando um mecanismo de reação hipotético, a sua derivação foi obtida em 1913, por Michaelis e Menten para uma reação enzimática simples^{14,71}:



onde:

E = enzima

S = substrato

k = velocidade específica de reação
(constante de reação)

P = produto

ES = complexo enzima-substrato

Cada parâmetro da Equação 2.1 tem o seguinte significado físico⁷¹:

v = é a velocidade de reação, e tem a unidade da taxa. Ela é função das constantes cinéticas e da concentração do complexo enzima-substrato.

$V_{m\acute{a}x}$ = é a velocidade máxima de reação e tem a unidade da taxa. É uma propriedade intrínseca da enzima, visto que ela é proporcional à concentração de enzima. Para sua determinação, assume-se que todas as enzimas estão na forma do complexo enzima-substrato.

S = concentração do substrato, comumente dada em moles por litro (M).

K_m = é a constante de Michaelis e tem a mesma unidade da concentração de substrato. K_m é uma propriedade intrínseca da enzima, sendo constante somente, para condições bem específicas. Ela é definida como a concentração do substrato, onde a velocidade da reação é a metade da máxima. A comparação de K_m , para diferentes enzimas sob condições idênticas, fornece algumas informações a respeito da identidade das enzimas.

A equação cinética de Michaelis-Menten é válida apenas para instantes iniciais da reação quando é desprezível a concentração do produto, e na condição de estado estacionário para a formação reversível do complexo enzima-substrato¹⁶.

Os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), podem ser estimados a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação 2.1), pois sendo $V_{m\acute{a}x}$ conhecido, a constante de Michaelis é igual à concentração de substrato, S , quando $v = V_{m\acute{a}x}/2$.

Para facilitar a análise e a determinação dos parâme

tros da Equação 2.1, pode ser usado o diagrama de Lineweaver e Burk, que se baseia na representação gráfica da referida equação^{16, 14, 71}. Rearranjando a Equação 2.1, obtêm-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2.2)$$

2.1.4. Reatores para Enzimas Imobilizadas

Os reatores de enzimas imobilizadas têm muito em co mum com outros reatores que utilizam catálise heterogênea.

Segundo Filbert e Pitcher³², não há um suporte ou méto do universal para imobilizar enzimas, e nenhum reator perfeito que possa ser recomendado para todos os sistemas. Somente quan do a aplicação ou o uso dos sistemas forem claramente defini dos, pode o suporte, o método de ligação e o projeto do rea tor ser apropriadamente escolhidos.

Para Weetall¹⁰⁹, existem dois tipos básicos de sistemas de reatores aplicáveis à tecnologia de enzimas imobilizadas: O reator de tanque agitado, que pode ser operado contínuo ou des contínuamente, e o reator tubular de leito fixo. O reator de leito fixo é usado para substratos de baixa viscosidade e alta solubilidade e, geralmente, apresenta maior eficiência que o reator tanque agitado. Uma adaptação desse reator é o de leito fluidizado.

Para Messing⁷¹, também não há um reator ideal ou univer

sal para enzima imobilizada. Três configurações básicas de reatores são adequadas para utilização de enzimas imobilizadas em processamento contínuo: o reator contínuo de tanque agitado ou CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), o reator de leito fluidizado e o reator de leito fixo. A decisão com respeito ao tipo de reator, deve também considerar as condições de temperatura, vazão, controle e ajuste do pH, força iônica, concentração do substrato, efeitos de difusão, etc..

Filbert e Pitcher³² afirmam que o reator de leito fixo ou reator de coluna recheada é o mais difundido e melhor conhecido para enzimas imobilizadas. Os reatores descontínuos são usados geralmente para pequenas escalas, e o de leito fluidizado está merecendo algumas atenções.

Conforme Lilly e Dunnell⁵⁶, a escolha do reator depende da cinética da reação e de variáveis operacionais. Teoricamente o CSTR apresenta menor eficiência (massa de produto formado por unidade de massa de enzima) que o tubular. Se ocorrer inibição da reação pela concentração do produto, então o CSTR se torna menos eficiente, ainda relativamente ao reator tubular. Por outro lado, se ocorrer inibição pelo reagente, o CSTR torna-se mais favorável.

Para Chibata²⁰, o reator de tanque agitado deve ser usado quando a solução de substrato apresenta alta viscosidade e quando a atividade enzimática é relativamente baixa, isto tanto para processo contínuo como para descontínuo. Para enzima e células imobilizadas, os reatores de leito fixo são os mais uti

lizados, sendo encontrados com fluxos descendentes, ascendentes ou com ciclos. O fluxo descendente causa compressão no leito, sendo preferível o ascendente. O reator de leito fluidizado é indicado para soluções de substrato de alta viscosidade, e quando um substrato ou um produto gasoso está envolvido. Outros tipos de reatores, como o de membrana de ultrafiltração, tubos de enzimas e filme de enzimas são ainda pouco estudados.

Segundo Basta⁵, todos os processos industriais com enzimas imobilizadas utilizam reatores de leito fixo. Por outro lado, o reator de leito fluidizado apresenta inúmeras vantagens, quando comparado com outros reatores como mostra a tabela 2.1¹¹⁶.

Lortie⁵⁷, em 1981, propôs um modelo cinético unidimensional, para reatores de leito fixo, levando em conta a difusão do substrato entre a fase líquida e o suporte sólido.

Nesse trabalho, foram utilizados os reatores de leito fixo e de leito fluidizado.

Nos reatores de leito fluidizado a diferença de densidade entre o sólido e o líquido é um fator importante, pois uma maior diferença destas densidades permite a utilização de maior velocidade de fluidização, sem que seja excedida a velocidade terminal das partículas. Porém, a diferença das densidades entre o sólido e o líquido não deve ser excessiva, pois pode comprometer a qualidade da fluidização¹¹⁶.

Variável	Reator de Leito Fluidizado	Reator de Leito Fixo	Reator de Leito de Lama
Diâmetro da partícula (dp)	Opera com partículas pequenas $0,1 < dp < 3 \text{ mm}$	Partículas relativamente grandes $dp > 6 \text{ mm}$	Partículas muito pequenas $dp < 0,1 \text{ mm}$
Queda de pressão para mesma vazão	Baixa	Alta	---
Distribuição de temperatura no leito	Temperatura constante e uniforme, fácil controle	Maiores gradientes de temperatura, difícil de controlar	Distribuição e controle razoável
Fluxo de calor e massa no leito	Eficiente para uma dada razão altura/vazão	Ineficiente	Razoável
Destruição do catalisador por atrito	Negligenciável	Não existente	Problemas sérios
Regeneração contínua no catalisador	Fácil	Impossível	Possível
Sólidos em suspensão no substrato	Não causa problemas	Problemas sérios de entupimento	Problemas para operação contínua
Área superficial relativa/unidade de volume de reator	Alta	Baixa	Alta
Altas taxas de conversão implicam	Os menores volumes	Volumes intermediários	Os maiores volumes
Controle de pH	Fácil	Difícil	Fácil
Investimento no reator	O menor	Intermediário	O maior
Custo Operacional	Baixo	Alto	Alto

Tabela 2.1 - Comparação dos reatores de Leito Fluidizado, Leito Fixo e de Leito de Lama¹¹⁶

Em alguns processos, os reatores de leito fixo podem alcançar o comportamento dos reatores tubulares ideais. Abaixo, encontra-se determinada a equação do modelo cinético de um reator tubular ideal com a cinética de Michaelis-Menten.

Dois parâmetros importantes num sistema reacional são: a fração de conversão (f_a) e a taxa de fluxo (Q em $\text{cm}^3/\text{minuto}$). A fração de conversão pode ser definida como²³:

$$f_a = (S_o - S)/S_o$$

onde:

S_o = concentração molar de substrato na entrada do reator (moles/l)

S = concentração molar de substrato na saída do reator (moles/l)

A relação entre a taxa de fluxo e a fração de conversão foi estabelecida integrando a equação de balanço de massa em um elemento de volume do reator tubular ideal e utilizando a equação de Michaelis-Menten^{23, 86}.

Fazendo um balanço de massa num elemento de volume do leito catalítico, temos:

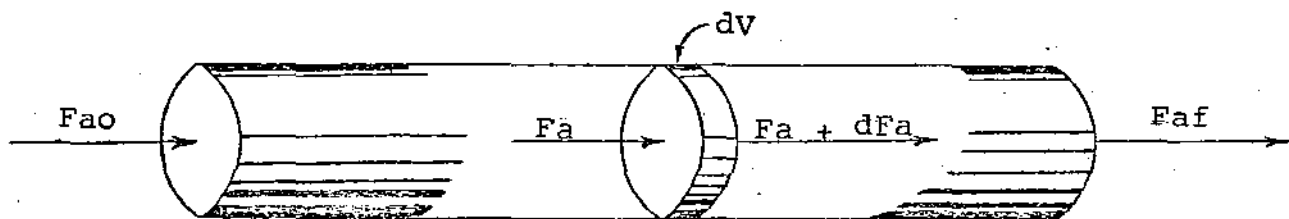


Figura 2.3 - Balanço de massa num elemento de volume de um reator tubular

$$F_a - (F_a + dF_a) = v \cdot dV' \quad (2.4)$$

onde:

F_a = vazão molar [moles/minuto]

v = taxa específica da reação [(mol/(minuto x ml de líquido no leito))]

dV' = volume de líquido no elemento do volume dV do reator [cm³]

$$dV' = a \cdot \epsilon \cdot dl \quad (2.5)$$

$$F_a = F_{a0} \cdot (1 - f_a) \quad (2.6)$$

onde:

F_{a0} = vazão molar de alimentação

ϵ = porosidade do leito catalítico

a = área da seção transversal do leito catalítico

dl = elemento de comprimento do leito catalítico

Substituindo a equação (2.5) na (2.4), temos:

$$-dF_a = v \cdot a \cdot \epsilon \cdot dl \quad (2.7)$$

Derivando a equação (2.6) e substituindo-a na equação (2.7), temos:

$$F_{a0} \cdot dfa = v \cdot a \cdot \epsilon \cdot dl \quad (2.8)$$

$$\text{como, } F_{a0} = Q \cdot S_0, \text{ temos} \quad (2.9)$$

$$v = \frac{Q \cdot S_0 \cdot dfa}{a \cdot \epsilon \cdot dl} \quad (2.10)$$

Substituindo a equação (2.10) na equação de Michaelis-Menten (2.1), rearranjando e integrando a expressão resultante entre os limites (0 a l) para o comprimento, e de (0 a f_a) para a conversão, obtemos:

$$So \cdot f_a = Km \cdot \ln (1 - f_a) + \frac{Vm_{\max} \cdot l}{V_l} \quad (2.11)$$

V_l é a velocidade superficial de fluxo, dada por:

$$V_l = Q / (a \cdot \epsilon) \quad (2.12)$$

2.1.5. Enzimas Invertase e Amiloglicosidase

A invertase, sacarase ou β frutofuranosidase, é uma das enzimas mais conhecidas, sendo encontrada em muitas plantas e microrganismo. A invertase, que também pode ser obtida a partir de levedura, catalisa a hidrólise de sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose (açúcar redutor).

Existem duas formas de invertase, a extracelular e a intracelular. A forma extracelular é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a intracelular é destituída dos mesmos¹¹⁰.

A invertase é bastante aplicada na indústria de alimentos, pois a hidrólise enzimática de soluções concentradas de sacarose origina xaropes mais doces e provoca a formação de monossacarídeos mais solúveis e mais difíceis de

serem cristalizados^{28, 110}.

Segundo Draetta²⁸, as invertases intra ou a extracelular apresentam atividades ótimas na faixa de pH entre 3,5 e 5,5 e temperatura ótima na faixa de 23 a 55°C, dependendo do grau de purificação da enzima, assim como da concentração do substrato.

A invertase foi inicialmente imobilizada por adsorção em carvão e em hidróxido de alumínio⁷⁷. Nos últimos anos, tem-se imobilizado a invertase através de vários métodos e utilizando vários suportes^{62, 86}, tais como, a imobilização por ligação covalente em vidro poroso^{66, 81}, em sabugo de milho⁷³, em matriz de poliestireno³³ ou em outros suportes^{34, 79, 100}, copolimerização com acrilamida⁵¹, o entrelaçamento em fibras^{27, 62}, a adsorção em quitina, caulinita e outros suportes⁹⁸, além da imobilização em resinas de DEAE-celulose e amberlite^{97, 103} e outras resinas trocadoras de iões^{15, 80, 86}.

Kobayashi e Moo-Yong⁵⁵ imobilizaram invertase covalentemente em resinas do tipo poliamida e constataram uma retenção de 38% da atividade catalítica relativa à fase líquida. Verificaram também que os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten não eram constantes em reator tubular de leito fixo.

Usami, Noda e Goto¹⁰⁴, usando invertase ligada a resinas DEAE-celulose, observaram uma manutenção de 31% da atividade catalítica relativa à fase líquida, na temperatura de 50°C para enzima livre, e 35 centígrados para enzima imo

bilizada. Susuki et alli, utilizando o mesmo suporte, obtiveram 50% de retenção da atividade para enzima imobilizada, adotando a temperatura de 40°C e pH 5,5 para a enzima livre e 3,4 para a imobilizada.

Filipulson e Hornby³³ ligaram invertase covalentemente a uma matriz de poliestireno, estabeleceram um pH ótimo para a enzima imobilizada entre 4,5 e 5,0 e uma elevação do valor de Km em relação à enzima solúvel. Eles também verificaram uma manutenção de atividade catalítica relativa à fase líquida para a enzima imobilizada de aproximadamente 35%.

Usami, Hasegawa e Karasawa¹⁰³ imobilizaram invertase por vários métodos e, utilizando diferentes suportes, obtiveram melhor resultado com DEAE-celulose, com 31% de atividade relativa à fase líquida.

Ribeiro⁸⁶ imobilizou invertase, usando resinas de troca iônica, como a duolite s-761, amberlite ira-400 e reyn 101, obtendo uma retenção de atividade relativa à fase líquida de 70,43%, 32,61% e 43,48% respectivamente. A resina dowex 1-x4 testada não apresentou retenção de atividade para a invertase imobilizada nesse suporte.

Uma das principais enzimas amilolíticas utilizadas industrialmente na produção de glicose é a amiloglicosidase que tem sido estudada por numerosos grupos de investigação no campo de Tecnologia Enzimática e Bioquímica¹⁶.

A amiloglicosidase (glucoamilase) tem sido isolada

principalmente de vários fungos e designada por nomes diferentes desde meados da década de quarenta até aos princípios da década de sessenta, tais como: enzima glucogênica do *Rhizopus tonkinensis* (Corman e Langly Kke, 1948), α -amilase do *Aspergillus usami*, glucoamilase do *Rhizopus delemar* (Phillips e Caldwell, 1951), do *Aspergillus niger* (Barker et al, 1957), e do *Saccharomyces dastaticus* (Hopkins e Kulka, 1957), amiloglicosidase do *Aspergillus niger* (Pazur e Ando, 1959) e do *Endomyces sp.* (Hattori e Takeuchi, 1962) e taka-amilase B do *Aspergillus oryzae* (Okazaki, 1954). Contudo as designações mais utilizadas são a de glucoamilase e amiloglicosidase¹⁶.

A produção de amiloglicosidase concentrada pode ser obtida pela precipitação das enzimas solubilizadas no filtrado de fermentação do *Aspergillus niger* NRR L 3122, em presença de álcool etílico⁸³. Essa enzima apresenta uma faixa ótima de pH entre 3,5 e 5,0 e temperatura entre 40 e 65°C dependendo do grau de purificação da enzima e do processo adotado.

Wilson e Lilly em 1969¹¹² ligaram quimicamente a enzima amiloglicosidase em DEAE - celulose, usando como reagente bifuncional 2-amino 4-6-dicloro triazina. Em 1970, Bacherler e outros⁴ ligaram amiloglicosidase em DEAE - Celulose. Em 1974, essa enzima foi imobilizada na resina de troca iônica amberlite, sendo observado uma queda de atividade catalítica quando eram utilizadas soluções tampão com concentrações acima de 0,3M⁸².

Existem várias publicações relativas a trabalhos

que utilizam métodos de adsorção para imobilizar amiloglicosidase em vários suportes. Em 1970, Usami e Shirasaki¹⁰⁵ estudaram a cinética de adsorção dessa enzima adsorvida em argila ácida e carvão ativo. Em 1975, foram utilizados como suporte para adsorção, a alumina ativada e o sódio silicato de alumínio ativado⁹⁶.

Maeda e Suzuki, em 1974⁶⁰, imobilizaram amiloglicosidase e invertase, através do método de entrelaçamento em matriz polimérica de N-vinil pirolidina com radiação γ obtendo uma retenção de atividade para as enzimas imobilizadas relativa à fase líquida entre 50 - 55%. Para a amiloglicosidase a constante cinética de Michaelis-Menten foi 2,6 vezes maior para a enzima imobilizada relativa à enzima livre, em pH 4 e temperatura 37°C.

Em 1974, Kawashima e Umeda⁵¹ imobilizaram amiloglicosidase e invertase, através do método de entrelaçamento em matriz de acrilamida por radiopolimerização, obtendo uma retenção de atividade para as enzimas imobilizadas relativa às enzimas livres de aproximadamente 16% e 53,2%, respectivamente.

Em 1982, Wasserman¹⁰⁷ imobilizou a amiloglicosidase por adsorção eletrostática, utilizando como suporte esferas de vidro não porosas, recobertas com poliestirenoamina, com posterior ligação cruzada através de glutaraldeído. O pesquisador denominou esse suporte como esferas de vidro catiônicas, obtendo um tempo de meia-vida menor que uma semana.

Cabral e outros imobilizaram amiloglicosidase através de ligação covalente em vários suportes inorgânicos, como o vidro ativado com $TiCl_4$ e aminado com hexametilenodiamina¹⁷, e sílica porosa ativada com titânio IV. Obtiveram uma retenção de atividade de 12% para as enzimas imobilizadas relativa à livre. Em 1982, esses mesmos autores publicaram um trabalho, onde amiloglicosidase e invertase eram imobilizadas em vidro poroso ativado com outros metais de transição com o ferro II, vanádio III e zircônio IV, obtendo um tempo de meia-vida para amiloglicosidase de 473 h, 893 h e 1709 h, respectivamente. Foi utilizado também, como suporte, sílica porosa ativada com titânio IV, obtendo uma vida média de 980 h, para invertase. A retenção da atividade foi de aproximadamente 13,2% para a invertase e de 16,7% para a amiloglicosidase^{16,18}.

Em 1984, Dennis e outros²⁶ imobilizaram a amiloglicosidase, também pelo método de ligação covalente em carbodiamida tratada com carbono ativo, utilizando um reator de leito fixo com reciclo.

Outro suporte que foi testado para imobilizar amiloglicosidase, através de ligação covalente, foi a base de esferas macroreticulares de poliestireno (MP). Esse suporte apresentou resultados semelhantes ao obtido com o vidro poroso. Para o vidro poroso a constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) foi 2,5 vezes maior para a enzima imobilizada relativa à livre, para as esferas MP foi de aproximadamente 4 vezes maior, e o tempo de meia-vida foi de aproxima

damente 3 dias.

Chibata e outros²⁰ testaram o vidro poroso como suporte de imobilização para 1210 enzimas, sendo que 525 enzimas foram imobilizadas nesse suporte, mantendo suas atividades catalíticas.

Imai e outros, em 1986^{43, 44}, imobilizaram amiloglicosidase e invertase por entrelaçamento dentro da membrana de álcool polivinílico, através de irradiação com luz ultra violeta, obtendo uma retenção de atividade de 12% para a enzima imobilizada relativa à livre. A constante cinética Km foi aproximadamente 2,2 vezes maior para amiloglicosidase e invertase imobilizadas em relação ao valor para as enzimas livres. Foi observado, também, um aumento na velocidade máxima de reação; esses resultados também foram encontrados por Usami e Kuratsu¹⁰⁴. Estes mesmos autores imobilizaram invertase em membrana de álcool polietileno vinílico cationizada por aminoacetalização, com dimetilacetal 2-Dimetilaminoacetaldeído e com dimetilacetal propionaldeído, obtendo um aumento da constante cinética (Km) para a invertase imobilizada de 5,9 vezes e de 2,8 vezes. Foi observado, também, uma diminuição da velocidade máxima de reação para a enzima imobilizada relativa à livre⁴⁵.

Zanim e Moraes, em 1983¹¹⁶, imobilizaram amiloglicosidase em suportes inorgânicos, como alumina ativada com titânio e microesferas de vidro silanizadas, e estudaram a estabilidade operacional da enzima fixada nesses suportes em

microreator de leito fluidizado. A conversão específica para a enzima imobilizada em relação à enzima livre foi aproximadamente 14 vezes menor. O tempo de meia-vida no microreator de leito fluidizado, foi de 5 a 6 dias, semelhante aos resultados obtidos por Chibata²⁰, Zaborsky¹¹⁵, Weetall¹⁰⁹ e Ryn⁸⁷.

A potencial utilização industrial da amiloglicosidase imobilizada está dependente do custo do processo de imobilização e do melhoramento das características, principalmente da estabilidade operacional e das preparações enzimáticas imobilizadas a temperatura elevada (60°C)¹⁶.

Nagamoto e outros, em 1986⁷⁶, estudaram o efeito de alguns solventes orgânicos (metanol, etanol, etilenoglicol e 1,4 - diohexano) na atividade catalítica da amiloglicosidade, através da análise cinética da reação e concluíram que há um aumento na constante de Michaelis (Km), para os quatro solventes testados.

2.2. RESINA URÉIA - FORMALDEÍDO

Holzer⁴², em 1884, e Ludy⁵⁹, em 1889, isolaram um precipitado branco da reação de uréia com formaldeído sob condições ácidas.

Goldschmidt, em 1896³⁹, estudou a reação de uréia com formaldeído em soluções ácidas variadas e obteve um precipitado granular branco com a fórmula empírica $C_5H_{10}N_4O_3$.

Em 1908, Einhorn e Hamburger estudaram a mesma reação na presença de íons hidroxila, e dependendo da proporção de formaldeído utilizada em relação à uréia, isolaram a mono e dimetiloluréia⁸⁹.

Em 1920, Jahn⁴⁶ estudou o princípio que levou ao moderno desenvolvimento da síntese da uréia-formaldeído.

Scheibler e outros, em 1927⁹¹, observaram que em solução ácida, as metiloluréias são convertidas em substâncias insolúveis semelhantes ao composto obtido por Goldschmidt³⁹.

O processo de formação da resina consiste na conversão inicial dos grupos aminos em grupos N-metilol, através de uma reação de adição, produzindo a resina no estado líquido e solúvel em água⁸⁴.

Em meio ácido e sob ação térmica ocorre a reação de condensação dos grupos N-metilol entre si ou com grupos aminos livres, com a liberação de água, promovendo-se o crescimento da molécula de polímero até sua reticulação completa, como mostra a figura 2.4. O polímero formado é um termo fixo rígido, de peso molecular não mensurável⁸⁹.

Assim, o processo de reticulação ou condensação dessa resina é realizado parte pelo fornecimento de energia térmica e parte por uma substância de caráter ácido, chamada comumente de "catalisador", que na verdade não é recuperado e tem a função de acelerar a transformação do monômero em polímero. Esse "catalisador" passa a compor parte da formulação da resina³.

Nas policondensações, os compostos mais usados como "catalisadores" são alguns sais metálicos de ácidos fortes e bases fracas, como o cloreto de magnésio, o sulfato de amônio, o cloreto de 2 amino-metil-propanol e o nitrato de zinco^{3, 31}. No processo de policondensação, usando um desses catalisadores, a temperatura deve ser em torno de 130°C⁸⁴.

Um fato que é interessante ressaltar, é a presença na uréia de 4 hidrogênios ativos e 3 posições possíveis para a polimerização (-C=O e 2-NH₂) dependendo da relação molar uréia: formaldeído utilizada e das condições de reação adotadas no processo de síntese, como pH, temperatura, tempo de reação e o procedimento na síntese. Pode-se obter resinas com estruturas lineares (monometiloluréia e dimetiloluréia), ramificadas e cíclicas (triazonas e uronas). Esse fato, foi observado por Kadowaki em 1936⁴⁸, que isolou produtos de condensação de uréia-formaldeído com vários pesos moleculares e descreveu suas propriedades. As estruturas cíclicas, conhecidas por URONAS, foram preparadas por Kadowaki⁴⁸. Essas estruturas são obtidas pela substituição total dos hidrogênios da uréia por grupos metilol, provenientes do formaldeído em meio alcalino⁸⁴.

A figura 2.4 mostra alguns dos intermediários formados na síntese da resina sob condições ácidas ou alcalinas. Esse perfil grosseiro mostra que cada faixa de pH favorece a formação de diferentes estruturas. Isso não impede que essas estruturas sejam formadas com igual frequência. Essa figura ainda se mostra incompleta¹¹⁴.

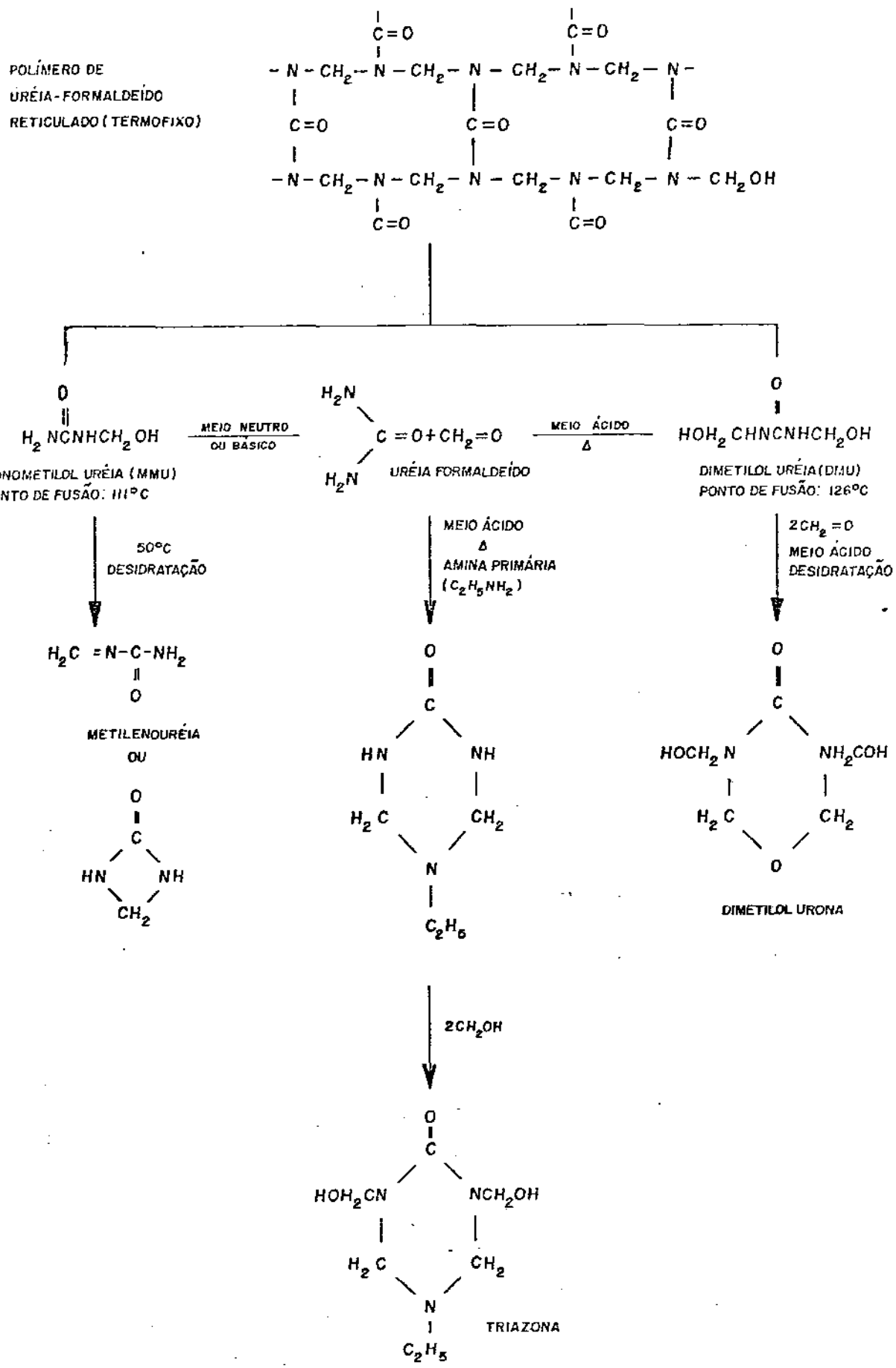


FIGURA - 2.4

Todas as configurações da figura 2.4 podem ser isoladas da mistura reacional e analisadas. Vogel¹⁰⁶, baseando-se em medidas osmóticas, afirma que ocorre a formação de condensados coloidais de uréia-formaldeído de alto peso molecular (10.000 a 20.000). Porém, nenhum mecanismo de reação foi sugerido para a formação de tal polímero.

Cada uma das estruturas representa um composto com aplicações específicas, podendo, inclusive, a resina ser encontrada como polímero totalmente reticulado, mas sempre apresentam grupos N-metilol na sua estrutura, que no caso é o grupo funcional de interesse.

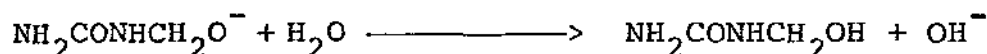
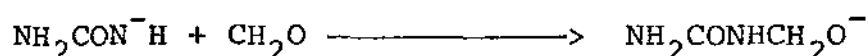
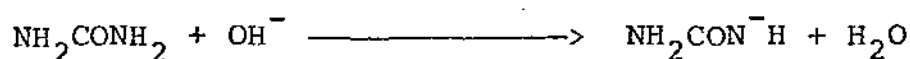
Quando a resina não está ainda polimerizada, é normalmente solúvel em água, podendo ser usada para acabamentos têxteis, recobrimentos de papéis, manufatura de adesivos, acabamentos de laminados e inúmeras outras aplicações⁸⁹.

As resinas amínicas que apresentam grupos N-metilol livres, quando utilizadas em acabamentos têxteis, mostram o inconveniente da liberação destes grupos, na forma de formaldeído livre, quando em contato com a pele, bem como durante a estocagem do tecido. Pode-se diminuir esta liberação reagindo os grupos N-metilol com álcoois, principalmente o metanol e o butanol⁸⁴.

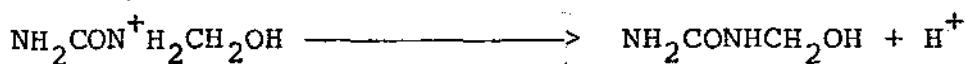
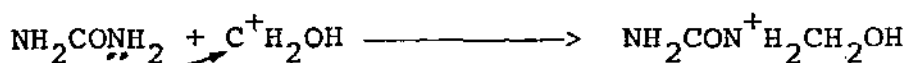
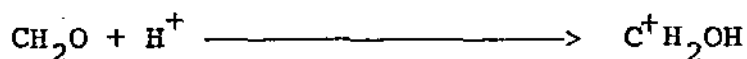
De Jong e De Jonge^{24, 25} estudaram a cinética da reação uréia-formaldeído e concluíram, como Smythe⁹⁵, que a reação é bimolecular, e que a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração de hidroxila ou íons hidrogênio.

Nesse trabalho Jong e De Jonge mostram a influência do pH na constante da reação a 35°C.,concluindo que a pH maiores que 9 e menores que 4, a reação é muito rápida.

Em solução alcalina o mecanismo mais provável da reação entre a uréia e o formaldeído, envolve a abstração de um próton da uréia com formação da uréia ânion⁶³:



Em solução ácida, provavelmente, o formaldeído é protonado, e o íon carbono formado pode reagir mais facilmente com a uréia⁶³:



Saring e outros, em 1978⁹⁰, publicaram um trabalho onde é apresentado um estudo das propriedades mecânicas da uréia-formaldeído, como por exemplo, a capacidade de absorver energia mecânica.

Salzer e outros, em 1978⁸⁸, apresentaram um proces-

so de formação dessa resina em estrutura poro aberto através da técnica de Eletrosíntese.

2.3. RESINA N-METILOLACRILAMIDA

A resina N-metilolacrilamida é obtida a partir da reação entre acrilamida e o formaldeído, sendo normalmente preparada, estocada, transportada e vendida preferencialmente na concentração de 40 a 80% de N-metilolacrilamida¹¹.

A reação de síntese consiste na adição do formaldeído à acrilamida:

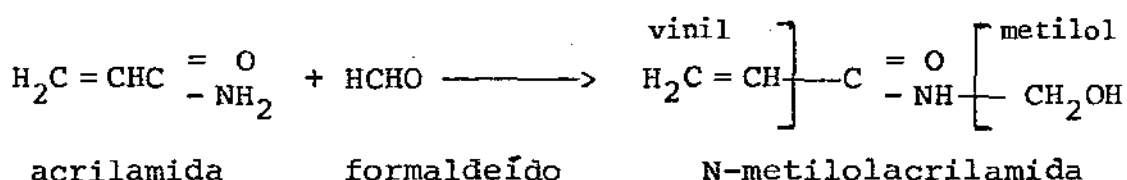


Figura 2.5 - Reação de Síntese da N-metilolacrilamida em meio básico

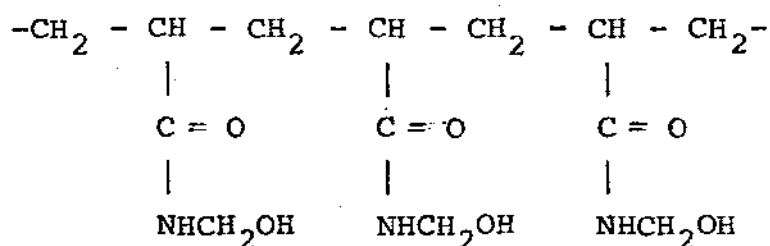
Um aspecto interessante da N-metilolacrilamida (NMA) é que ela possui dois grupos funcionais diferentes: vinil e hidroximetilol ou metilol. Assim essa resina pode ser copolimerizada com monômeros vinílicos ou pode ser polimerizada com um homopolímero pela polimerização em cadeia ou por adição, iniciada por radicais livres, através da função vinílica⁸⁴.

Os radicais livres, formados a partir da molécula de monômero e que darão origem a polimerização, podem ser gerados através da adição de agentes químicos (iniciação quí

mica) ou através de radiações eletromagnéticas, que geram radicais livres diretamente na massa reacional^{9, 61}.

A iniciação química consiste na adição de uma substância, capaz de formar radicais livres por decomposição térmica ou fotoelétrica, numa solução com monômeros da resina que se deseja polimerizar⁸⁴.

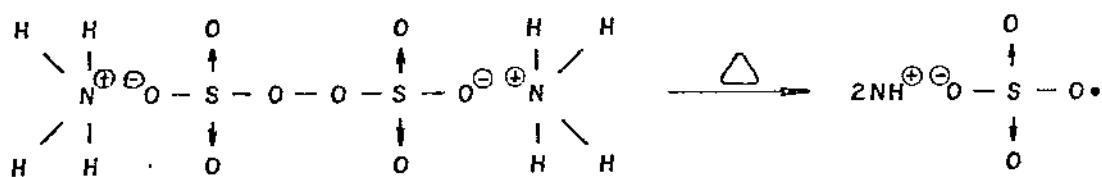
Assim, o processo de polimerização por adição da resina N-metilolacrilamida consiste na quebra das insaturações e na ligação das moléculas, formando cadeias ramificadas, com grupos metilol livres e disponíveis para a polimerização, como mostra a estrutura a seguir¹¹:



Um dos iniciadores químicos, bastante utilizado, é o persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) em temperaturas superiores a 50°C. A figura 2.6 mostra o mecanismo de polimerização da NMA na presença desse iniciador químico⁸⁴.

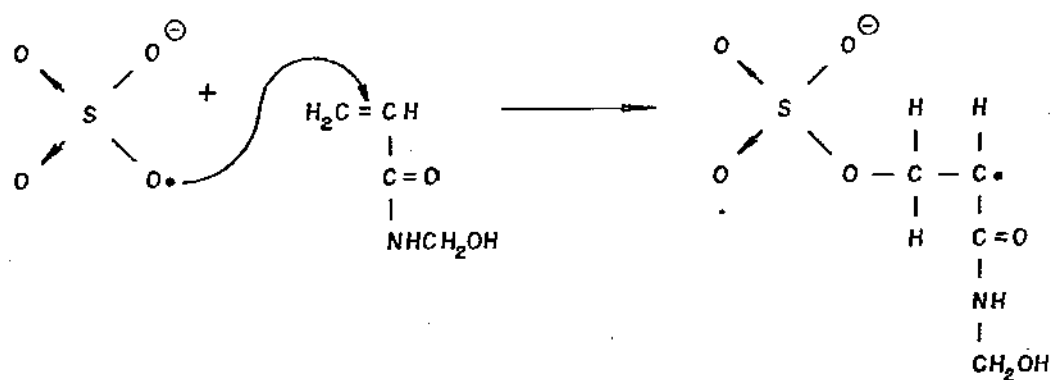
Quando o monômero de N-metilolacrilamida é polimerizado à temperatura de 130°C, provoca a reação entre os grupos metilol, devido a ação do calor, formando um retículo tridimensional insolúvel^{31, 84}, como mostra a figura 2.7.

No processo de polimerização por adição ou em ca



PERSULFATO DE AMÔNIO

RADICAL LIVRE



RADICAL LIVRE REGENERADO

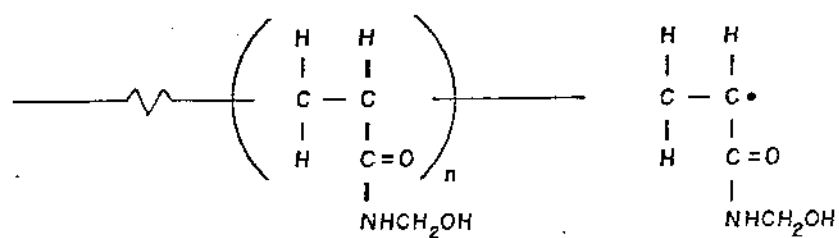
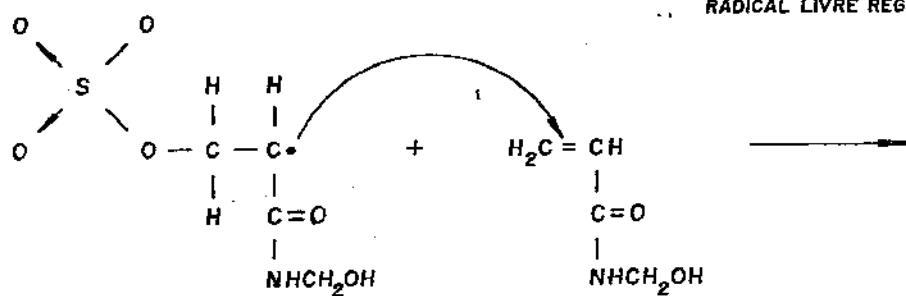


FIGURA - 2.6

POLIMERIZAÇÃO DA NMA COM PERSULFATO DE AMÔNIO 31,84

deia, ocorre apenas a adição de moléculas uma a uma à cadeia em crescimento. Quando não se tem moléculas diferentes do monômero no meio reacional, altos graus de polimerização são alcançados logo no início da reação. Longos tempos de reação proporcionam altas conversões, mas alteram muito pouco o peso molecular^{9,61}.

O monômero da N-metilolacrilamida é extremamente reativo e potencialmente perigoso, sendo aconselhado alguns cuidados na estocagem e no manuseio¹¹.

Alguns cuidados devem ser tomados para maximizar a estabilidade da solução aquosa de N-metilolacrilamida durante a estocagem:

- . Borbulhar continuamente ar com vazão de 0,2 a 0,4 cm³/1000 gal.
- . Evitar a contaminação da solução com cobre, alumínio, ferro, bronze, latão e com agentes oxidantes ou redutores.
- . Controlar a temperatura de estocagem na faixa de 0 - 29°C e o pH entre 5,5 e 7,0.
- . Estocar a resina num tempo inferior a 3 meses à temperatura mencionada.
- . Esvaziar, limpar e inspecionar, de 3 em 3 meses, os recipientes de estocagem.

No manuseio do monômero desta resina, aconselha-se alguns cuidados, tais como: não permitir o contato direto com a pele, olhos ou vestimentas; não respirar o vapor, spray ou pó e conservar as embalagens contendo resina em lu

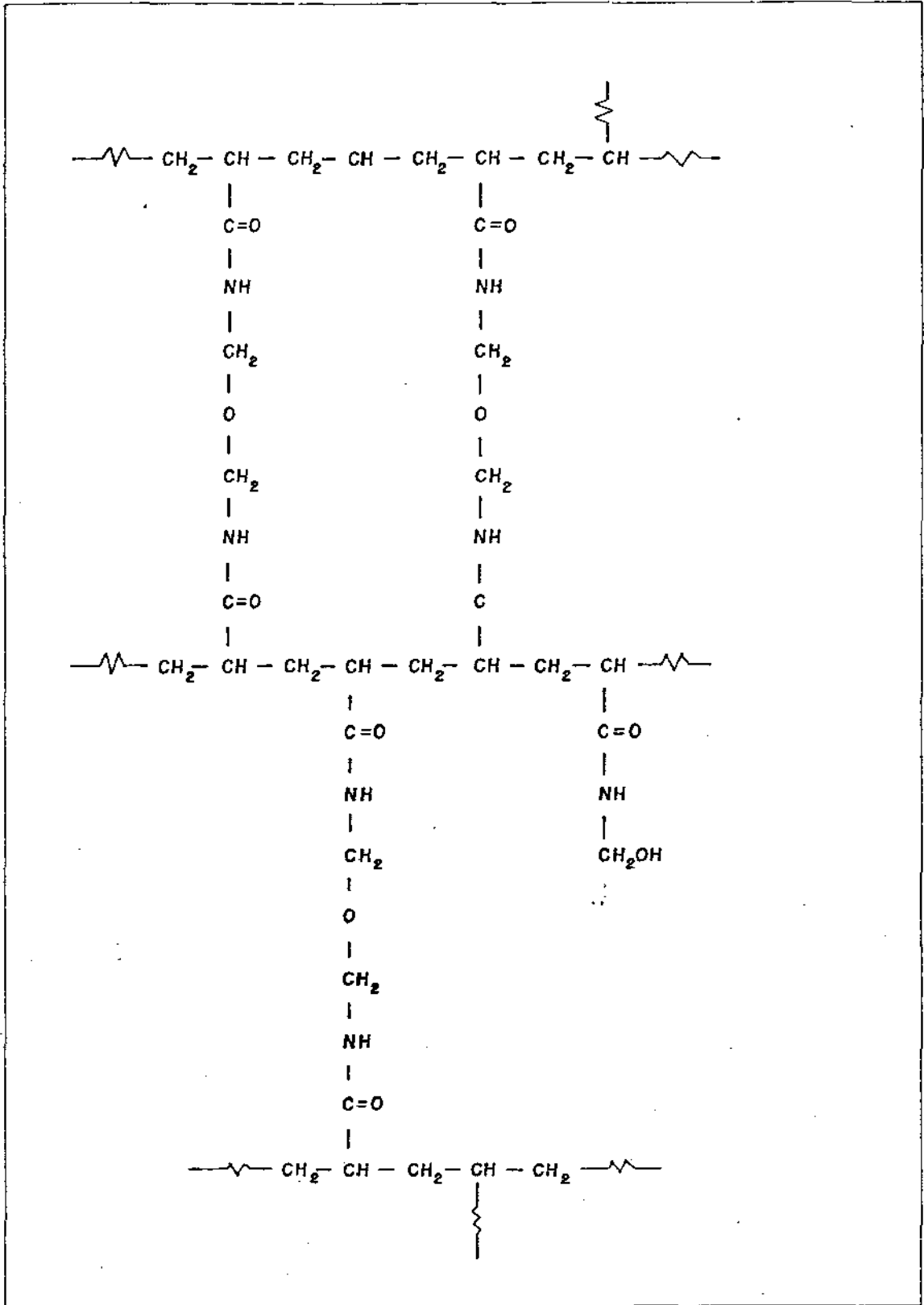


FIGURA - 2.7

gares protegidos.

A N-metilolacrilamida é utilizada como adesivo na forma de homopolímero; como acrílico e como acrílico plástico modificado, semirígido e rígido, quando copolimerizada com outros monômeros e como meio filtrante, quando copolimerizada com etilacrilato somente ou com outros monômeros¹¹.

Através dos grupos metilol livres, o monômero da N-metilolacrilamida pode se fixar quimicamente em suportes como a celulose, podendo ser reticulados através de funções vinílicas pendentes, que podem também reagir com as hidroxilas livres do suporte. Assim essa resina pode ser utilizada como acabamento de materiais têxteis contendo fibras de celulose. Uma das desvantagens dessa utilização é a mudança de coloração (amarelamento) dessas fibras, particularmente quando lavadas em solução alcalina. O amarelamento predomina principalmente quando o catalisador utilizado na polimerização for o nitrato de zinco^{70,111}.

Em 1961, Gardon³⁶ publicou um estudo quantitativo da ligação entre esta resina e materiais têxteis, contendo fibras de celulose.

O cupferron ($C_6H_5-N(NO)-ONH_4$) é o agente estabilizante convencionalmente usado durante a fase de preparação da resina. Porém, não é adequado para evitar a polimerização durante a estocagem da solução de N-metilolacrilamida¹¹¹.

Segundo Weyker¹¹¹, a adição de ácido cítrico na solução, contendo monômeros de N-metilolacrilamida, aumenta a

estabilidade da resina retardando sua polimerização. Por ou
tro lado, quando a resina é utilizada em acabamentos têx-
teis, esse reagente diminui o amarelamento das fibras de ce
lulose.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE DAS RESINAS

Foram sintetizadas duas resinas: a N-metilolacrilamida e a uréia-formaldeído. A seguir será apresentado o procedimento experimental destas sínteses.

3.1.1. Resina N-Metilolacrilamida

3.1.1.1. Materiais

Os seguintes reagentes foram utilizados na síntese desta resina:

- . Acrilamida comercial com 45% de sólidos, fornecida especialmente pela Nalco Produtos Químicos Ltda.
- . Formaldeído 37%, p.a., fornecido pela Reagem.
- . Cupferron, p.a., fornecido pela Quimis, sob licença da Mallinckrodt.
- . Hidróxido de Sódio, p.a., fornecido pela Reagem.
- . Ácido Cítrico Monohidratado, p.a., fornecido pela Ecibra.

3.1.1.2. Equipamentos

As figuras 3.1 e 3.2 mostram o fluxograma do sistema experimental utilizado na síntese da resina N-metilolacrilamida, constituído por um reator de vidro (12), mangueiras de silicone (9), tubo de cobre (3), agitador mecânico (8), termômetro com escala de 0 a 100 centígrados (10), bureta (7), rolhas de vedação (13), cilindro de nitrogênio (1), válvu

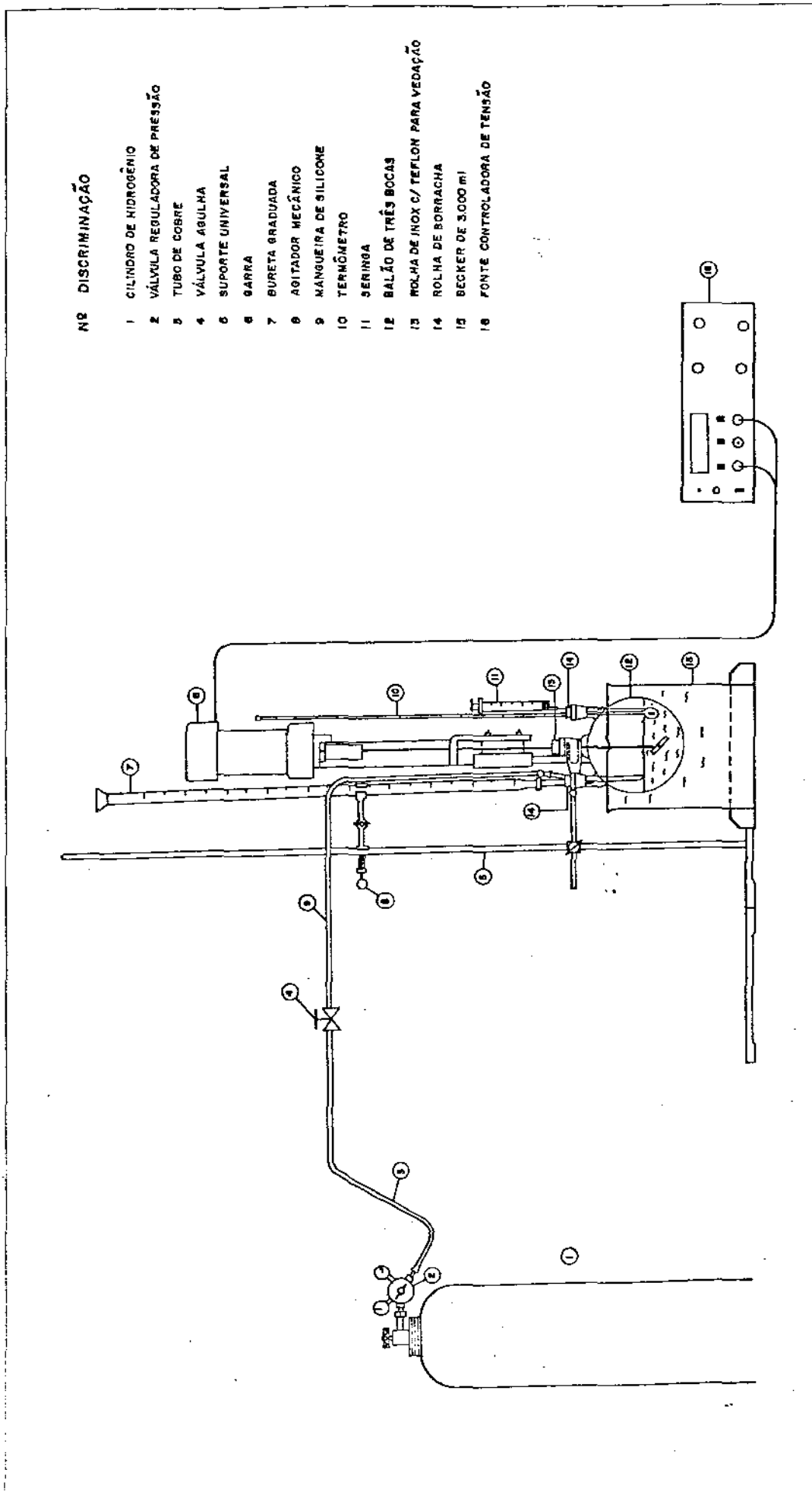


FIGURA - 3.1

FLUXOGRAMA DO SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO NA SÍNTESE DA RESINA N - METILOACRILAMIDA .

la tipo agulha (4), cuba de vidro (15) e fonte controladora de voltagem (16).

O reator de vidro era composto por um balão de 3 bocas, sendo que duas com dimensões 24/40 e a outra com 34/45, com capacidade de 1000 ml.

As mangueiras do tipo silicone com 1/4 de polegadas de diâmetro, e o tubo de cobre, também com o mesmo diâmetro, foram utilizados para realizar as conexões com o torpedo de nitrogênio.

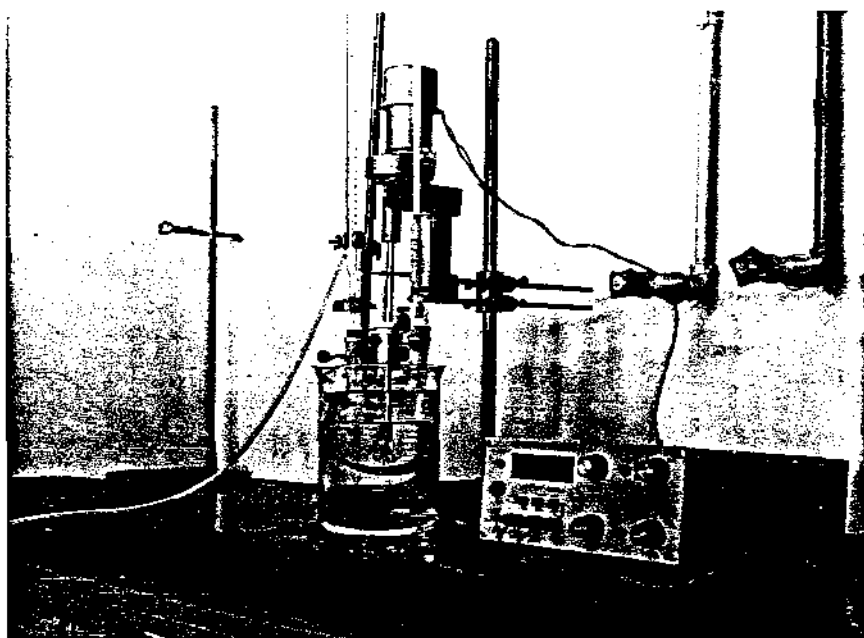
A cuba para controle da temperatura de reação, consistiu de um becker com capacidade de 3000 ml.

Durante o processo reacional, recolhiam-se amostras de resina através de uma seringa, para a análise do formaldeído livre.

A vedação do reator foi feita com duas rolhas laterais com dimensões 24/40, numa se encontrava a entrada de nitrogênio e uma bureta usada para entrada gradual do formaldeído, e na outra o termômetro e a seringa. Na rolha central, constituída de aço inoxidável recheada com teflon, de dimensão 34 / 45, era encaixada a haste de aço inoxidável.

3.1.1.3. Procedimento Experimental

A solução aquosa de N-metilolacrilamida foi preparada de acordo com o método de Weyker et al^{92,111}, utilizando nitrogênio como meio inerte, a fim de manter a pressão do sistema acima da atmosférica local.



- Figura 3.2 - Montagem experimental utilizada na síntese da resina N-metilolacrilamida.

Eram misturados 467g de acrilamida 45% em peso, 268g de formaldeído 37% em peso, 1,5g de solução aquosa de hidróxi-
do de sódio 50% em peso e 0,045g de cupferron (nitrosofenil hi-
droxilamina). O sistema foi mantido agitado a 20-25 centígrados.
Durante a síntese acompanhou-se a percentagem de formaldeído li-
vre, retirando e analisando amostras de resinas em intervalos
regulares de 30 minutos. Quando a concentração de formaldeído
livre na mistura reacional era menor que 3%, encerrava-se a sín-
tese.

Posteriormente, adicionaram-se 16,9g de ácido cítrico
monohidratado, a fim de aumentar a estabilidade da resina du-
rante a estocagem. A seguir ajustava-se o pH para 5,2 com solu-
ção aquosa de hidróxido de sódio 50%.

A resina foi armazenada em vidro âmbar, a temperatura
de aproximadamente 5 centígrados de modo a mantê-la mais está-
vel.

Devido à toxicidade da acrilamida e do formaldeído, ti-
veram que ser tomadas algumas precauções, como uso de luvas,
máscaras, etc.

3.1.2. Resina Uréia-Formaldeído

3.1.2.1. Materiais

Os seguintes reagentes foram utilizados na síntese da
resina:

. Uréia, p.a., fornecido pela Ecibra.

- . Formaldeído, p.a., fornecido pela Reagem.
- . Sulfito de Sódio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Sulfato de Magnésio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Bissulfito de Sódio, p.a., fornecido pela Reagem.
- . Ácido Fôrmico, p.a., fornecido pela Ecibra.

3.1.2.2. Equipamentos

As figuras 3.3 e 3.4 mostram o fluxograma do sistema experimental usado na síntese dessa resina, que era constituído por um reator de vidro, um agitador mecânico (5), seringa (7), rolhas (9,10), manta de aquecimento (17), conexões de vidro (12,8), condensador de vidro (11), bomba à vácuo (15), balaço de fundo chato (14), termômetro com escala de 0 a 100°C (6), mangueira (13) e fonte controladora de voltagem (1).

O reator de vidro, juntamente com as rolhas, foram idênticos aos utilizados na síntese de N-metilolacrilamida.

O condensador de vidro, bem como a bomba de vácuo, eram utilizados na destilação à vácuo, a fim de concentrar a resina.

O potenciômetro digital era utilizado no controle do pH durante a reação.

3.1.2.3. Procedimento Experimental

Na preparação da solução aquosa de uréia-formaldeído,

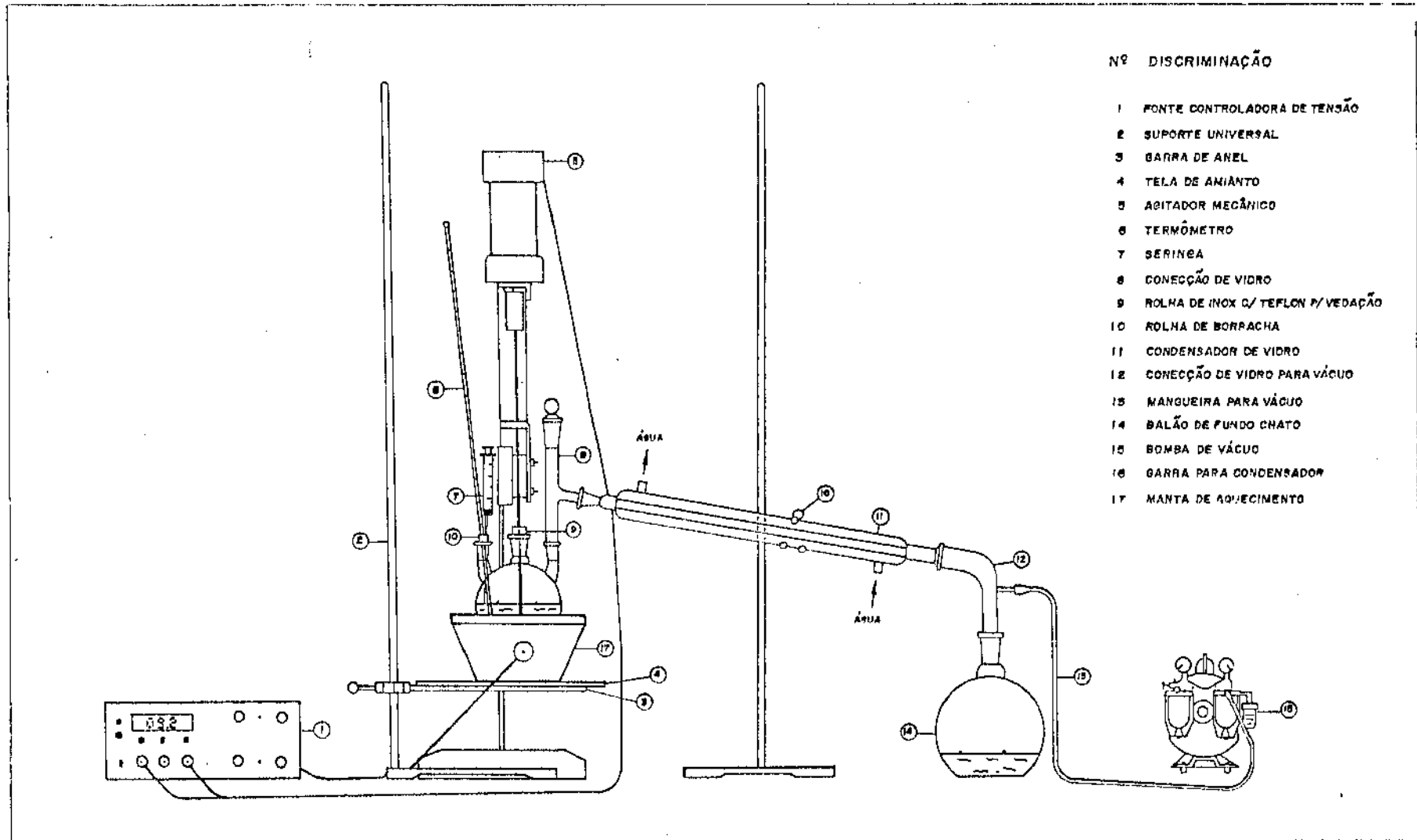


FIGURA - 3.3

FLUXOGRAMA DO SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO NA SÍNTESE DA RESINA URÉIA-FORMALDEÍDO.

utilizou-se a seguinte metodologia:

Eram pesados 632g de formaldeído. 37% em peso e ajustava-se o pH para 8,0 por adição de solução aquosa de hidróxido de sódio 50% em peso, a frio e com agitação contínua. A seguir, adicionaram-se 224g de uréia elevando a temperatura da mistura a 50 centígrados, acrescentando-se 1,2g de sulfito de sódio e 9,4g de bissulfito de sódio.

o pH era então corrigido para valores entre 8,5 e 8,9 com solução de ácido fórmico a 10% em peso ou solução de hidróxido de sódio a 10% em peso.

A temperatura da mistura em reação foi mantida a 80 centígrados por 30 minutos, depois do que ajustou-se o pH para 4,4 a 4,6 com solução de ácido fórmico a 10% em peso, aquecendo o sistema a fim de manter sua temperatura entre 90 - 95 centígrados. Durante a síntese, retiravam-se amostras da mistura em reação, para se fazer o teste de turbidez em solução de sulfato de magnésio a 30% em peso na temperatura ambiente indicando, em caso de resultado positivo, o final da síntese.

Terminada a síntese e ajustado o pH para 7,2 a 7,4 com solução de hidróxido de sódio a 10% em peso, concentrava-se a solução por meio de destilação a vácuo até atingir uma densidade aproximada de 1,270.

3.2. Padronização dos Reagentes Principais

Os principais reagentes utilizados na síntese das resinas foram padronizados a fim de conferir sua concentração.

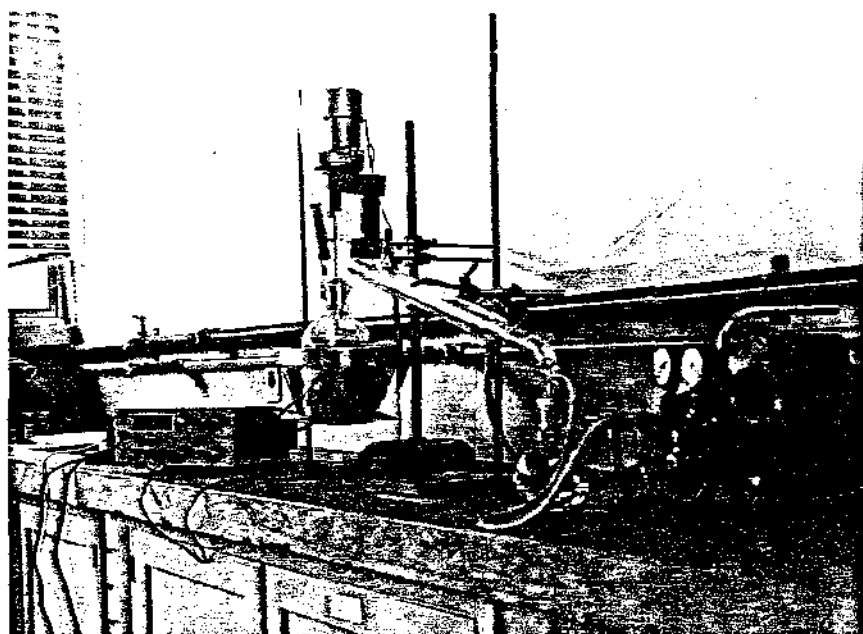


Figura 3.4 - Montagem experimental utilizada na síntese da resina urêia-formaldeído.

3.2.1. Determinação da Concentração de Monômeros na Solução de Acrilamida

Existem diversos processos para a determinação do teor de monômeros de acrilamida na solução comercial. Foi adotado o método da refratometria, a 25 centígrados, por ser mais rápido e preciso, sendo utilizado um refratômetro Abbe¹³.

3.2.2. Dosagem da Solução de Formaldeído Comercial

Esse teste foi realizado segundo a técnica baseada no tiosulfato de sódio². A metodologia encontra-se descrita a seguir:

3.2.2.1. Materiais

- . Iodo, p.a, fornecido pela Rothy.
- . Ácido Clorídrico, p.a, fornecido pela Merck.
- . Tiosulfato de Sódio, p.a, fornecido pela Reagem.

3.2.2.2. Procedimento Experimental

Em um balão de 250ml, colocou-se 1g de amostra de formaldeído, completando o volume com água destilada. Esta solução era então, transferida para um erlenmeyer com capacidade de 250ml, por meio de uma pipeta volumétrica de 20ml.

Após o que, adicionava-se, 10ml da solução hidróxido de sódio a 10% p/v e 50ml de solução de iodo 0,1N. Depois de 5

minutos, acrescentava-se 15ml de ácido clorídrico 2N.

A mistura era então titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1N, usando solução de amido como indicador.

Os cálculos referentes a essa situação podem ser feitos através das seguintes equações:

$$\text{n}^\circ \text{ de Eq-g HCOH} = \text{n}^\circ \text{ de Eq-g I}_2 - \text{n}^\circ \text{ de Eq-g Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad (3.1)$$

$$\text{FL} = \frac{250 \times ((N \cdot V_s) \text{I}_2 - (N \cdot V_s) \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \cdot \text{Eq} - \text{g HCOH} \times 100}{m \cdot 20} \quad (3.2)$$

onde m é a massa da amostra de formaldeído (g), FL é a porcentagem em peso de formaldeído em solução, N é a normalidade da solução e V_s é o volume de solução utilizada (l).

Para ambos os reagentes foram verificadas pequenas diferenças entre a concentração fornecida pelo fabricante e a encontrada no teste.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS RESINAS

As resinas foram caracterizadas segundo diversas propriedades, tais como: espectro no infravermelho, formaldeído livre, sólidos totais e densidade.

3.3.1. Espectro no Infravermelho

A verificação da presença de grupos funcionais foi

feita através de Espectroscopia de Absorção de Infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio^{22, 23}.

As figuras 4.1 e 4.2 mostram os resultados destas análises, que foram semelhantes às encontradas na literatura^{6, 3, 1, 0, 2}.

3.3.2. Determinação do Formaldeído Livre

Os métodos mais usados, na determinação do formaldeído livre, são os que utilizam o sulfito de sódio a frio¹. Foram testadas duas variações desses métodos: a de Morath e Woods⁷⁵ e a proposta por De Jonge e de Jong^{24, 25}. A segunda a apresentou uma maior reprodutibilidade, tendo sido adotada.

3.3.2.1. Materiais

Utilizou-se os seguintes reagentes na dosagem do formaldeído livre:

- . Timolftaleína, p.a., fornecida pela Reidel.
- . Carbonato de sódio, p.a., fornecido pela Quimis.
- . Sulfito de Sódio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Ácido Clorídrico, p.a., fornecido pela Merck.
- . Iodo, p.a., fornecido pela Rothy.
- . Ácido Acético, p.a., fornecido pela Merck.
- . Amido, p.a., fornecido pela Merck.

3.3.2.2. Procedimento Experimental

Eram pesados 1-1,5g de Suporte-Resina e adicionados a 75 ml de água destilada resfriada a 8 centígrados, a seguir, colocava-se de 3 a 4 gotas do indicador timolftaleína, e ajustava-se o pH com solução de carbonato de sódio 2N, até o aparecimento da coloração azul. Após o que, misturou-se 1 ml de sulfito de sódio 2N, ajustando novamente o pH com ácido clorídrico 0,3N, até coloração azul pálido (quase incolor).

Esperados 7 minutos de repouso em banho de gelo (0 centígrado), adicionava-se de 5 ml de ácido acético 1N e algumas gotas de solução de amido 1% (p/v), titulando o excesso de sulfito de sódio com solução padronizada de iodo 0,1N até o aparecimento da coloração azul.

O composto de adição formado entre o formaldeído livre presente e o sulfito: o formaldeído-bissulfito, era decomposto pela adição de 10 ml de carbonato de sódio 2N e o sulfito livre foi titulado com solução padronizada de iodo 0,1N ou 0,01N, até o aparecimento da coloração verde musgo.

O volume de solução de iodo consumido nessa última titulação foi utilizado nos cálculos.

Se durante os 7 minutos de reação, a cor azul se intensificasse novamente, reajustava-se o pH com ácido clorídrico 0,3N.

Para determinar a percentagem mássica de formaldeído livre, utilizou-se a seguinte equação:

$$FL = \frac{N \cdot V_s \cdot 3,003}{2 \cdot m} \quad (3.3)$$

onde N é a normalidade da solução de iodo, Vs o volume da solução de iodo utilizada na segunda titulação (ml) e m a massa da amostra de resina (g).

3.3.3. Densidade

A densidade para as duas resinas foram determinadas por picnometria a 25 centígrados.

3.3.4. Sólidos Totais

3.3.4.1. Resina N-metilolacrilamida

A análise dos sólidos totais foi feita usando o mêtodo da bromometria¹¹.

3.3.4.1.1. Materiais

Utilizou-se os seguintes reagentes para a determinação da concentração de monômeros na solução aquosa da resina N-metilolacrilamida:

- . Bromato de potássio, p.a., fornecido pela Reidel.
- . Brometo de potássio, p.â., fornecido pela Ecibra.
- . Ácido Sulfúrico, p.a., fornecido pela Reagem.
- . Amido, p.a., fornecido pela Merck.

- . Iodeto de potássio, p.a, fornecido pela Carlo Erba.
- . Tiosulfato de Sódio, p.a, fornecido pela Reagem.
- . Graxa de silicone, p.a, fornecido pela QEEL.

3.3.4.1.2. Equipamentos

As figuras 3.5 e 3.6 mostram o fluxograma da montagem experimental, constituído de bomba à vácuo (7), agitador magnético (2), balão de fundo chato (1), bureta (8) e funil de separação (3).

3.3.4.1.3. Procedimento Experimental

Era preparada uma solução bromato-brometo de potássio 0,1N, dissolvendo-se 10g de bromato de potássio e 2,79 g de brometo de potássio em 1 litro de água destilada.

Paralelamente, diluía-se 2,5 a 3,0g de amostra de resina com água destilada num balão volumétrico de 500 ml.

Preparadas as soluções, transferia-se 25ml da solução bromato-brometo de potássio para um balão de 250 ml conectado a um funil de separação. Vedava-se o sistema com graxa de silicone, e a seguir evacuava-o. O balão, era então, selado por meio da torneira do funil de separação. No balão, evacuado, foram adicionados 5 ml de ácido sulfúrico 5N, através do funil de separação, cautelosamente, de modo a não quebrar o vácuo, deixando a solução repousar por 3 minutos. Posteriormente, misturaram-se 25 ml de solução de resina no balão, sem quebrar o vácuo. A seguir, lavava-se o funil de separação por 3 vezes

Nº DISCRIMINAÇÃO

- 1 BALÃO DE FUNDO CHATO
- 2 ABITADOR MAGNÉTICO
- 3 FUNIL DE SEPARAÇÃO
- 4 ROLHA DE BORRACHHA
- 5 TUBO DE VIDRO
- 6 MANGUEIRA PARA VÁCUO
- 7 BOMBA DE VÁCUO
- 8 BURETA GRADUADA
- 9 SUPORTE
- 10 BARRA PARA BURETA

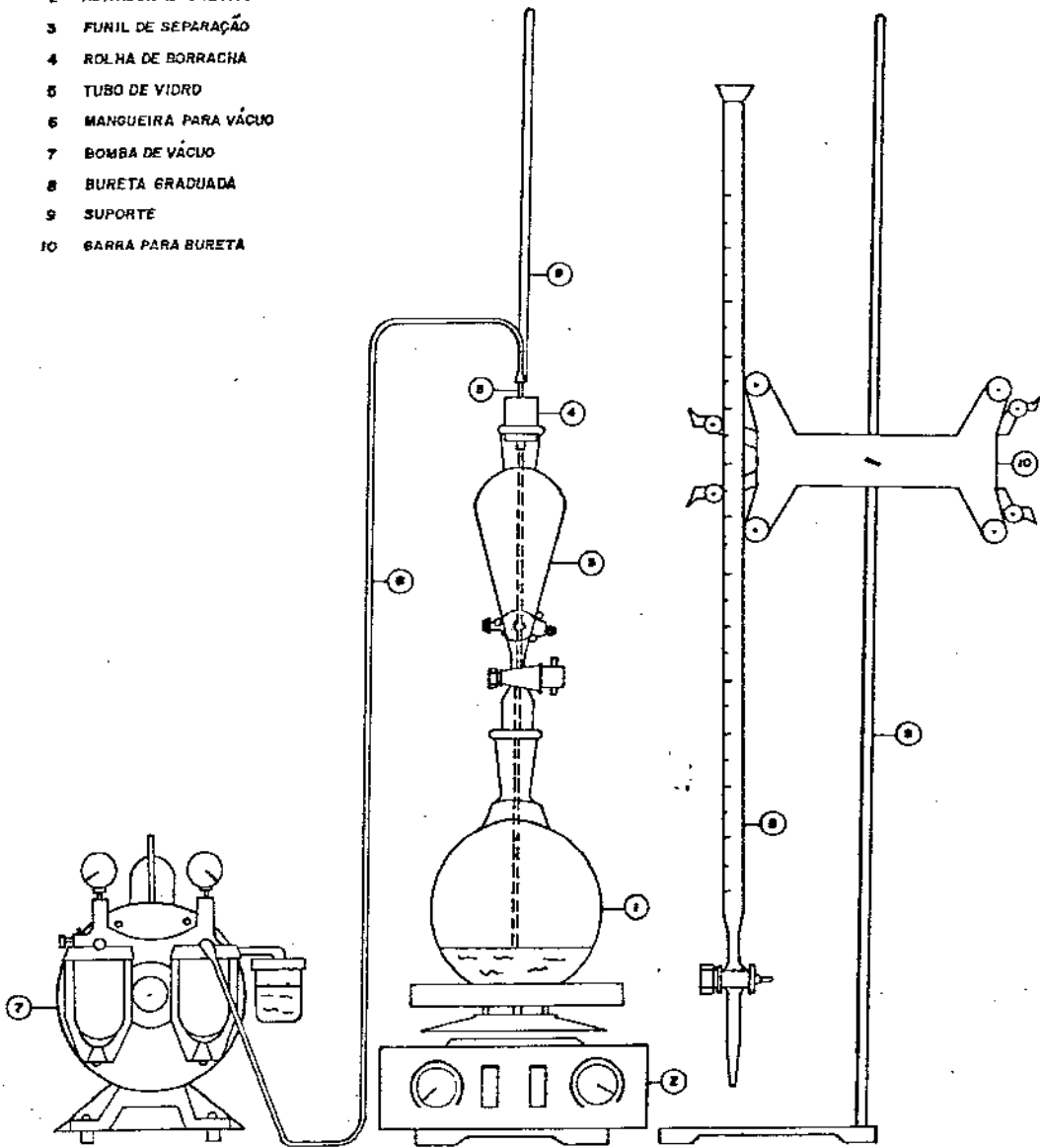


FIGURA - 3.5

FLUXOGRAMA DA MONTAGEM EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO
DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA RESINA N-METILOLACRILAMIDA.

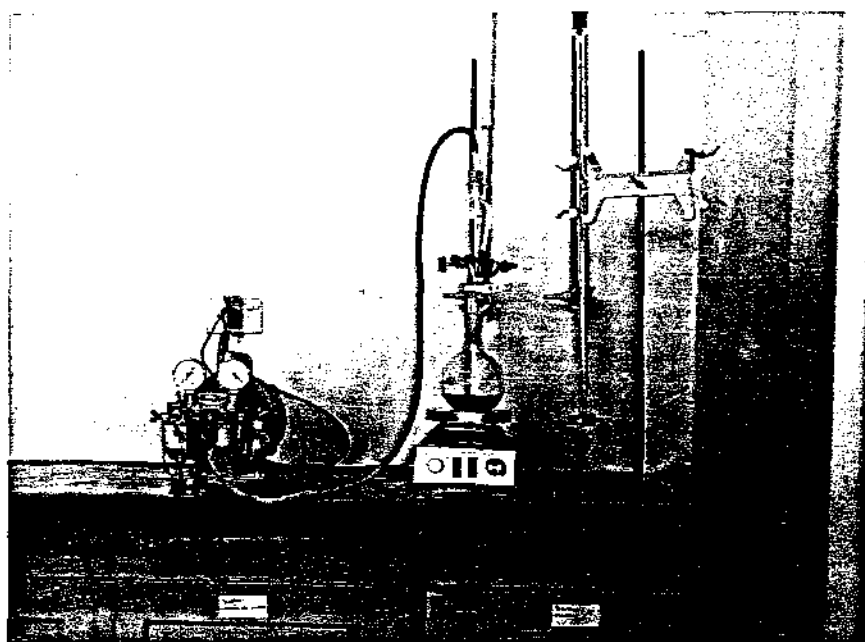


Figura 3.6 - Montagem experimental utilizada na determinação da concentração de sólidos da resina N-Metilolacrilamida.

com 5 ml de água destilada, transferindo-a para o balão, cuidadosamente, sem quebrar o vácuo.

O balão era envolvido com papel alumínio e agitado constantemente por 20 minutos.

Terminada a reação de bromação, foram adicionados no balão 15 ml de iodeto de potássio 20% em peso, sem quebrar o vácuo. Lavava-se, novamente, o funil de separação com água destilada, transferindo-a para o balão, quebrando o vácuo. Titulava-se a solução com tiosulfato de sódio 0,1N, usando amido como indicador.

Paralelamente era feito o branco, com o mesmo procedimento anterior, omitindo apenas a amostra.

Os cálculos referentes a essa determinação foram feitos através das seguintes equações:

$$VTS = VTS \text{ (BRANCO)} - VTS \text{ (AMOSTRA)} \quad (3.4)$$

$$\% \text{ SÓLIDOS TOTAIS} = \frac{VTS.N.0,05055.500.100}{\text{MASSA DE AMOSTRA (G)}.25} \quad (3.5)$$

onde VTS é o volume de solução de tiosulfato de sódio (ml) e N a normalidade da solução de tiosulfato de sódio.

3.3.4.2. Resina Uréia-Formaldeído

A concentração de monômeros, na solução aquosa de uréia-formaldeído, era determinada pela policondensação da resina.

Em pequenas formas moldadas em papel alumínio, adicionou-se 1g de resina, colocando-as em estufa por 2h, a temperatura de aproximadamente 130 centígrados. Terminada a polimerização, pesava-se as amostras.

Para calcular a percentagem de sólido em solução, utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ SÓLIDOS TOTAIS} = \frac{\text{massa de resina polimerizada}}{\text{massa da solução de resina}} \quad (3.6)$$

3.4. PREPARAÇÃO DOS SUPORTES - RESINAS

3.4.1. Preparação dos Suportes na forma Pulverizada

As resinas eram polimerizadas e, posteriormente, trituradas na forma de pó, com aproximadamente 0,1mm de diâmetro.

3.4.1.1. Materiais

Os catalisadores utilizados foram persulfato de amônia na polimerização da resina N-metilolacrilamida e o sulfato de amônia na uréia-formaldeído^{3, 31, 84}.

3.4.1.2. Procedimento Experimental

Foram pesados 4g de resina em placas de petri e adicionado 1 ml da solução de catalisador com massa correspondente a 5% da massa de sólidos da resina. Homogeneizava-se a

mistura, polimerizando-a em estufa a 130 centígrados por 15 minutos.

3.4.2. Moagem e Separação das Resinas

Foi adotado o mesmo procedimento experimental para as duas resinas.

3.4.2.1. Procedimento Experimental

As resinas polimerizadas eram colocadas em moinho com bolas de porcelanas, utilizando 12 bolas de diâmetro médio de 20 mm e 6 bolas de diâmetro médio 50 mm. Em intervalos regulares de duas horas, separava-se as resinas através de peneiras com 80, 100, 150, 170 e 200 mesh. As amostras de cada peneira eram pesadas e armazenadas em vidros numerados. Posteriormente, essas resinas foram lavadas várias vezes com água destilada e secadas à temperatura ambiente.

3.4.3. Preparação dos Suportes na Forma de Resinas Polimerizadas sobre Tecidos.

As resinas utilizadas na preparação desses suportes eram uréia-formaldeído e N-metilolacrilamida, sintetizadas pelos métodos apresentados nos itens 3.1.2 e 3.1.1. respectivamente.

3.4.3.1. Materiais

Como tecido sintético utilizou-se malhas de Poliêster (politereftalato de etileno) com gramatura de 292 g/m², fornecida pela Rhodia S.A., Divisão Têxtil Santo André - São Paulo.

Os catalisadores utilizados para a polimerização, foram os mesmos descritos no item 3.4.1.1.

O agente umectante era o fluidol a 10%, fornecido pela Henkel S.A. Indústrias Químicas.

O tecido foi lavado com detergente Ultravon H. D. fornecido pela Ciba Geigy.

A molhabilidade do tecido foi aumentada utilizando uma mistura de agentes de desarejamento e tensoativos.

3.4.3.2. Equipamentos

Equipamentos utilizados na impregnação da microcamada de resina:

- . Foulard de Laboratório, marca Wuppertal, Modelo FL; largura útil de 40cm e pressão entre os rolos ajustável até 20 Kgf/cm²;
- . Estufa com circulação forçada, marca Fabbe, temperatura 50 a 250 centígrados;
- . Bastidor para distender o tecido, fornecido pelo Instituto Fleury - São Paulo.

. Balança analítica, marca Micronal.

3.4.3.3. Procedimento Experimental

Foi adotado o mesmo método usado na preparação dos discos para ensaios imunoenzimático³¹⁻³⁴.

Cortava-se o tecido em pedaços de tamanho adequado, com a dimensão do bastidor, retirando o acabamento superficial dos mesmos (óleos de fiação e outros), através da lavagem em solução aquosa de detergente na concentração 2 g/l, durante 30 minutos a 50 centígrados. Retirava-se o detergente, através da lavagem em água destilada, e pesava-se os tecidos após a secagem à temperatura ambiente. Eles eram, então, colocados em repouso por 15 minutos em solução aquosa da mistura de agentes de desarejamento e tensoativos, à temperatura ambiente. A seguir, embebia-se cada pedaço de tecido nas soluções das resinas com diferentes concentrações de sólidos. Os tecidos embebidos, eram passados entre rolos de um "Foulard", à pressão de 19 kgf/cm².

Para a cura da resina, estendia-se os tecidos, impregnados com solução de resina, em um bastidor, colocando-os, em seguida, na estufa com circulação forçada a 130 centígrados, durante 15 minutos.

Após a polimerização da resina, lavava-se os tecidos exaustivamente com água destilada para retirada de materiais

que não reagiram como depósitos solúveis, excesso de catalisador, etc.

Os tecidos secos à temperatura ambiente eram novamente pesados, e a percentagem de retenção de sólidos determinada. Feito isto, eram cortados no formato de discos com aproximadamente 9 milímetros de diâmetro, e estocados à temperatura de 5 centígrados.

A percentagem de resina fixada no tecido e a concentração de resina no suporte-resina foram calculadas através das equações apresentadas a seguir:

$$\% \text{ Retenção de Sólidos no Tecido (RST)} = \frac{X - Y}{Y} \times 100 \quad (3.7)$$

onde Y é a massa do tecido original antes da aplicação da resina, X a massa do tecido recoberto com resina polimerizada e RST a percentagem de sólidos retida no tecido.

$$\text{Concentração de Resina no Suporte-Resina} = \text{RST} \times \text{Gt} \text{ (g resina/m}^2\text{)} \quad (3.8)$$

onde Gt é a gramatura de tecido, g/m² (massa por área do tecido).

3.5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

3.5.1. Preparação das Soluções Tampão

Nesse trabalho foram utilizados tampão na faixa de

pH de 3,0 a 8,0.

3.5.1.1. Materiais

Os reagentes utilizados nas preparações das soluções tampão eram os seguintes:

- . Acetato de sódio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Ácido Acético, p.a., fornecido pela Merck.
- . Fosfato Monobásico de potássio, p.a., fornecido pela Merck.
- . Hidróxido de Sódio, p.a., fornecido pela Reagem.

3.5.1.2. Procedimento Experimental

Para valores de pH de 3,0 a 5,5, utilizaram-se tampão acetato-ácido acético 0,05M, preparados conforme Conn e Stunrpf²¹ e no caso de pH de 6,0 a 8,0, tampão a base de fosfatos. Essas soluções foram preparados misturando-se 50 ml de solução 0,1M de fosfato monobásico de potássio, com volume conveniente de solução de 0,1M de hidróxido de sódio e diluído a 100 ml. Sendo os volumes de solução adicionados 5,6; 13,9; e 29,1 ml, respectivamente, para obter tampão com valores de pH iguais a 6,0; 6,5 e 7,0.

3.5.2. Preparação do Reativo de Folin Ciocalteu

Esse reativo foi utilizado na dosagem de proteínas

pelo método de Lowry⁵⁸. O procedimento experimental era o mesmo adotado no Instituto Fleury, cuja descrição encontra-se a seguir.

3.5.2.1. Materiais

Os seguintes reagentes foram utilizados na preparação do Reativo Cromógeno:

- . Tungstato de sódio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Molibdato de Sódio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Ácido Fosfórico, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Ácido Clorídrico, p.a., fornecido pela Merck.
- . Sulfato de Lítio, p.a., fornecido pela Ecibra.
- . Bromo, p.a., fornecido pela Ecibra.

3.5.2.2. Procedimento Experimental

Em um balão, com capacidade de 200 ml, munido de condensador de refluxo, eram adicionados 10g de tungstato de sódio, 2,5g de molibdato de sódio e 70ml de água destilada. Os sais foram dissolvidos por rotação do frasco e a seguir eram acrescentados 5 ml de ácido fosfórico a 85% e 10 ml de ácido clorídrico concentrado.

O condensador com refluxo era conectado, e a mistura fervida suavemente durante 10h. Após a reação, esfriava-se a solução e adicionavam-se 15g de sulfato de lítio, 5 ml de água destilada e algumas gotas de bromo, retirando-se o excesso de bromo através do aquecimento da mistura até a fervura, por 15 minutos. A solução fria era transferida para um balão volumétrico de 100 ml e o volume completado com água destilada.

Para recuperar o reativo preparado, adicionavam-se algumas gotas de bromo à temperatura de 80 centígrados, sempre que sua cor passava de amarelo-dourado, para esverdeada.

O Reativo foi armazenado em frasco âmbar à temperatura de 5 centígrados.

O Reativo Cromôgeno era utilizado com a seguinte formulação:

Reativo de Folin-Cicalteau.....	1 volume
Água Destilada.....	2 volumes

3.5.3. Dosagem de Glicose

A glicose foi dosada pelo método de Orto-Toluidina, utilizando estojo para determinação de glicose enzimática, fornecido pelo Laboratório Labtest (Sistema para Diagnóstico), usando uma formulação em ácido acético com o-toluidina a 7%, es-tilizado com tiocarbamida e ativada com íons borato¹².

3.5.3.1. Equipamento

Foi usado um espectrofotômetro modelo b-280, digital, fabricado pela Micronal.

3.5.3.2. Procedimento Experimental

O método experimental consistia basicamente das seguintes etapas:

Numerava-se os tubos de ensaio e adicionavam-se as seguintes quantidades de reagentes:

REAGENTES	BRANCO	TESTE	PADRÃO
Reativo Cromôgeno	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
Aliquota da Reação		0,05 ml	
Padrão do Teste			0,05 ml
Água destilada	0,05 ml		

Os tubos de ensaio eram colocados em banho-maria a 100 centígrados durante 7 minutos e posteriormente resfriados em água corrente durante 5 minutos.

A absorbância do teste e a padrão foram lidas num comprimento de onda 630 nm e o zero ajustado com o branco. A cor mantinha-se estável por 15 minutos.

Para determinar a concentração de glicose nas amostras utilizou-se as equações:

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{absorbância padrão}} \quad (3.9)$$

$$\text{Glicose (mg/dl)} = \text{absorbância do teste} \cdot F \quad (3.10)$$

3.6. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS NA FASE LÍQUIDA

Para caracterizar as amostras das enzimas utilizadas na forma natural em fase líquida, determinou-se a atividade contra a temperatura e o pH, usando temperaturas na faixa de 30 a 70 centígrados e pH de 3,0 a 7,0. Foram traçadas também as curvas de conversão contra o tempo, usando quantidades variáveis de enzima, sendo também determinadas as constantes cinéticas em reator batelada.

A glicose formada foi dosada através do método descrito no item 3.5.3.

Uma unidade internacional (U) é a quantidade de enzima que libera um micromol de produto por minuto ($\mu\text{moles/minuto}$), nas condições de ensaio. A atividade é o número de unidades por mililitro de preparação enzimática (U/ml). A atividade específica é expressa em termos de unidades por mg de proteína (U/mg).

O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry⁵⁸, que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, e a absorção era lida em 630 nm.

3.6.1. Materiais

Foram utilizados dois tipos de enzimas:

- . Amiloglicosidase (Amilo P-250), lote de fábrica 1001, enzima comercial, fornecida gentilmente pela Pfizer do Brasil - São Paulo.
- . Invertase (β -Frutofuranosidase, β -D Frutofuranosidase, fructohidrolase), lote 36F-0506, enzima usada apenas para laboratório, foi obtida da Sigma Chemical Company.

Utilizou-se amido solúvel, p.a., fornecido pela Merck, como solução substrato para enzima Amiloglicosidase e sacarose, p.a., fornecido pela Ecibra para enzima Invertase.

3.6.2. Equipamentos

- . Banho Termostatizado com agitação, marca Vibrotherm II, tipo LE-204/2 Hungria.
- . Espectrofotômetro modelo B-280, digital, marca Microanal.

3.6.3. Procedimento Experimental

Os procedimentos experimentais dos ensaios realizados para caracterizar as enzimas na fase líquida, encontram-se descritos abaixo na ordem cronológica de suas realizações.

3.6.3.1. Determinação da Atividade contra Temperatura e pH para Enzima Amiloglicosidase.

Inicialmente, era preparada a solução tamponada de

amido 1,6% p/v¹¹⁶, para tal, misturou-se 1 ml de solução tampão no pH do experimento para cada 10 ml da solução de amido que se desejava obter. Em um erlenmeyer, colocava-se 49 ml dessa solução transferindo-o para um banho com agitação constante, na temperatura do teste. Após atingir o equilíbrio térmico, seguia-se a adição de 1 ml de solução de enzima diluída. Depois de 30 minutos, desativava-se a enzima, aquecendo-a até ligeira fervura e a glicose produzida era dosada.

O cálculo da atividade enzimática era efetuado considerando a concentração de glicose obtida no balão de 50 ml, isto é, a quantidade de glicose que era produzida no mesmo a partir da solução substrato.

A atividade específica da enzima na fase líquida foi determinado através da dosagem de proteína pelo método de Lowry⁵⁸.

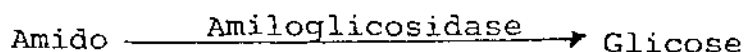
Para calcular a atividade enzimática e a atividade enzimática específica foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{Atividade enzimática (AE)} = \frac{50 \cdot G \cdot D \cdot 10^6}{PM \cdot t \cdot \text{ml de enzima}}, [\text{U/ml de enzima}] \quad (3.11)$$

onde G é a concentração de glicose em g/ml, D a diluição, caso efetuada, da amostra, PM o peso molecular da glicose e t tempo de reação em minutos.

$$\text{AEL} = \frac{\text{AE}}{\text{conc. de proteína}}, (\text{U/mg de proteína}) \quad (3.12)$$

onde, AEL é a atividade enzimática específica.



3.6.3.2. Curvas de Conversão para a Enzima Amiloglicosidase

As curvas de conversão representam a capacidade de produção de glicose pela sacarificação de 200 ml de solução de amido 1,6% p/v, tamponada, como descrito no item 3.6.3.1, com solução de acetato de sódio-ácido acético 0,05M, pH 4,0 na temperatura 60 centígrados, em banho termostaticado, em agitação constante durante 120 minutos; eram usadas quantidades variáveis de enzima diluída 1:500 em cada teste.

Em intervalos de tempo regulares, recolhia-se as amostras, dosando-se a glicose produzida através do método descrito no item 3.5.3.

Foi determinada também a concentração de proteína em cada teste, através do método de Lowry⁵⁸, possibilitando assim o cálculo da conversão específica.

Foram calculados a conversão e a conversão específica através das seguintes equações:

$$\text{conversão (\%)} = \frac{\text{concentração de glicose produzida}}{\text{concentração inicial do substrato}} \quad (3.13)$$

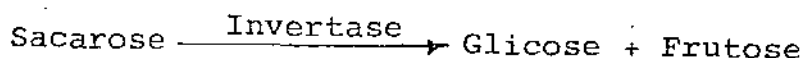
$$\text{conversão específica} = \frac{\text{conversão (\%)}}{\text{mg de proteína}}, \quad [\%/\text{mg de proteína}] \quad (3.14)$$

3.6.3.3. Determinação da Atividade Contra a Temperatura e o pH para Enzima Invertase

A Invertase, fornecida pelo fabricante, encontrava-se no estado sólido, assim foi necessário dissolvê-la em solução

aguosa tamponada, preparando-se as várias concentrações utilizadas a partir dessa solução.

O procedimento experimental adotado foi o mesmo descrito em 3.6.3.1, com exceção do substrato, que no caso, era substituído por solução tamponada de sacarose 0,1M.



3.6.3.4. Curvas de Conversão para Enzima Invertase.

As curvas de conversão foram obtidas através de dosagem de glicose formada pela hidrólise de uma solução de sacarose 0,1M, tamponada com solução de acetato de sódio-ácido acético 0,05M pH 5, na temperatura de 50 centígrados em banho termostatizado com agitação constante, durante 120 minutos. Foi adotado o mesmo procedimento experimental utilizado para amiloglicosidase, descrito no item 3.6.3.2.

3.6.3.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos em Reator Batedada

A constante cinética de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima de hidrólise ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas para ambas enzimas através da metodologia que será descrita a seguir.

Em erlenmeyer de 250 ml, colocaram-se 49 ml de suspensão substrato, nas várias concentrações, em pH 4,5 e temperatura de 40 centígrados. Esses erlenmeyers foram transferidos para um banho termostatizado com agitação contínua e após atingida a estabilidade térmica, adicionou-se 1 ml de enzima

previamente diluída em água destilada.

Decorrido o tempo programado para cada experimento (30, 60, 90, 120 e 150 minutos), retiravam-se os erlenmeyers e interrompia-se a reação com a adição de 4 gotas de solução de hidróxido de sódio 8N; essa interrupção se deve ao aumento do pH da suspensão, para valores entre 10 e 11.

Em seguida, era dosada a quantidade de glicose produzida, segundo o método descrito no item 3.5.3.

Para calcular as velocidades de hidrólises nesses ensaios, os valores dos coeficientes angulares das retas das "equações obtidas na produção de glicose em relação ao tempo", foram multiplicados pelo volume de reação (50ml), para obter a massa, e divididos pelo peso molecular da glicose e pela concentração de proteína, previamente determinada através do método de Lowry⁵⁸, obtendo assim o número de micromoles de glicose formado em 1 minuto por mg de enzima utilizado.

Utilizando o diagrama de Lineweaver-Burk^{14,16,71}, foram determinados os parâmetros cinéticos.

3.7. PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Com o objetivo de determinar as melhores condições para a etapa de imobilização, foram realizados vários testes experimentais, onde analisava-se os efeitos de alguns parâmetros que poderiam influenciar na atividade da enzima imobilizada.

Foram definidos alguns parâmetros com respeito a atividade, como:

$$\text{atividade relativa (AR)} = \frac{\text{AEI}}{\text{AEM}} \cdot 100 \quad (3.15)$$

$$\text{atividade relativa à fase líquida (ARL)} = \frac{\text{AEI}}{\text{AEL}} \cdot 100 \quad (3.16)$$

onde:

AEL = atividade específica da enzima na fase líquida, nas mesmas condições físicas e quantitativas do teste com a enzima imobilizada.

AEI = atividade específica da enzima imobilizada nas condições escolhidas para o teste.

AEM = atividade específica máxima da enzima imobilizada durante os testes para a determinação do parâmetro AEI.

Em todos os testes realizados a quantidade de enzima fixada foi determinada, como descrito no item 3.7.1. na próxima página.

Na ordem cronológica foram testadas as seguintes variáveis:

- . Determinação da quantidade de enzima fixada.
- . Influência da temperatura e do tempo de imobilização na atividade enzimática.
- . Influência da agitação e do tempo de imobilização na atividade enzimática.
- . Influência do pH da solução de imobilização na atividade enzimática.

3.7.1. Determinação da Quantidade de Enzima Fixada

A quantidade de enzima fixada nos diferentes suportes era determinada dosando-se a concentração de proteína, através do método de Lowry⁵⁸, em solução diluída de Amiloglicosidase e Invertase, antes e depois da fixação e assumindo que a diferença de concentração corresponde à quantidade de enzima fixada.

3.7.1.1. Equipamentos

Os aparelhos necessários para o teste foram os seguintes:

- . Incubadora com plataforma de agitação modelo Ética número 430.
- . Espectrofotômetro modelo B 380, digital, marca Micronal

3.7.1.2. Procedimento Experimental

Em erlenmeyer de 125 ml, colocou-se 1g de resina na forma de pó ou 20 unidades na forma de disco. Adicionavam-se, então, 10 ml da solução de enzima a várias concentrações, determinando a concentração de proteína para cada diluição. Os erlenmeyers eram transferidos para a incubadora com agitação constante, à temperatura ambiente. Após 24 h, separava-se a solução de enzima dos suportes por simples decantação, determinando, novamente, a concentração de proteína.

Para calcular a quantidade e a percentagem de enzima

fixada no suporte foram utilizadas as seguintes equações:

$$QEF = PA - PD; \text{ (mg/ml) } \quad \text{ou} \quad (3.17)$$

$$QEF = (PA - PD) \cdot 10; \text{ (mg de proteína) } \quad (3.18)$$

$$\% \text{ Enzima Fixada} = (PA - PD) \cdot 100/PA \quad (3.19)$$

onde QEF é a quantidade de enzima fixada no suporte, PA e PD são as concentrações de proteína na solução enzimática antes e depois da imobilização.

3.7.2. Influência da Temperatura e do Tempo de Imobilização na Atividade Enzimática

Em erlenmeyer, colocou-se 1g de resina em pó ou 20 unidades de discos e adicionavam-se 10 ml de solução de enzima, convenientemente diluída.

Os erlenmeyers eram transferidos para a incubadora com agitação constante, à temperatura do experimento. Decorridos os vários tempos fixados para o teste, os erlenmeyers foram retirados e esperou-se a decantação da resina.

Os suportes foram lavados por 5 vezes com solução tampão de acetato de sódio 0,05M com pH 4,0 para Amiloglicosidase e pH 5,0 para Invertase.

Para a determinação da atividade, adicionavam-se 10 ml da solução de amido 1,6% p/v, tamponada com acetato de sô-

ção 0,05M (pH 4,0), como descrito no item 3.6.3.1, à temperatura de 60 centígrados, e 10 ml de solução de sacarose 0,1M, tamporada com acetato de sódio 0,05M (pH 5,0), à temperatura de 50 centígrados, nos suportes onde se encontravam fixadas as enzimas Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente. Após 30 minutos, eram desativadas as enzimas por ligeira fervura da solução, e a glicose produzida dosada, através do método descrito em 3.5.3. A quantidade de enzima fixada era determinada e a atividade específica calculada.

$$AEI = \frac{10 \cdot G \cdot 10^6}{PM \cdot t \cdot \text{mg de enzima fixada}} \quad (3.20)$$

onde AEI é a atividade específica para enzima imobilizada em $\mu\text{moles}/(\text{minuto} \times \text{mg prote\u00edna})$ ou U/mg prote\u00edna.

3.7.3. Influ\u00eancia da Agita\u00e7\u00e3o e do Tempo de Imobiliza\u00e7\u00e3o na Atividade Enzim\u00e1tica

O procedimento experimental foi o mesmo descrito no item 3.7.2. O processo de imobiliza\u00e7\u00e3o foi realizado na aus\u00eancia de agita\u00e7\u00e3o, sendo adotado 10h de imobiliza\u00e7\u00e3o \u00e0 temperatura ambiente.

3.7.4. Influ\u00eancia do pH da Solu\u00e7\u00e3o de Imobiliza\u00e7\u00e3o na Atividade Enzim\u00e1tica

Em cada erlenmeyer de 125 ml, pesou-se 1g de resina na forma de p\u00f3 e contaram-se 20 discos. A seguir, foram prepara

radas soluções aquosas de enzima, convenientemente diluídas, obtidas a partir de uma solução diluída de 1:500.

Para tamponar a solução enzimática, adicionavam-se nos erlenmeyers 9,0 ml da solução enzimática e 1,0 ml de solução tampão com o pH adotado para cada experimento.

Os erlenmeyers eram, então, transferidos para incubadora sob agitação constante, à temperatura ambiente. Após 10 h de imobilização, os erlenmeyers eram retirados da incubadora, e a atividade específica determinada como descrito no item 3.7.2.

3.8. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Após a etapa de imobilização, procurou-se analisar, também, alguns parâmetros físicos que poderiam influenciar na atividade de enzima fixada nos suportes. Para tal, foi empregado um reator tipo batelada, com o objetivo de encontrar as condições de produtividade máxima da enzima imobilizada, que, posteriormente, seriam usadas em reator de leito fixo e de leito fluidizado.

Assim, foram realizados alguns testes experimentais para analisar os seguintes parâmetros:

- . Influência do pH da solução substrato;
- . Influência da temperatura da solução substrato;
- . Influência do grau de retenção da resina no tecido;

- . Influência da força iônica da solução substrato;
- . Tempo de estocagem;
- . Estabilidade térmica;
- . Conversão da enzima imobilizada em função do tempo;
- . Quantificação da atividade das enzimas liberadas do seu suporte, em função de número de bateladas;
- . Influência do número de bateladas na atividade das enzimas imobilizadas.

Nos testes, em que se calculava a atividade específica, a quantidade de enzima fixada era determinada como descrito no item 3.7.1.

Em todos os testes experimentais para a enzima imobilizada, procedeu-se da seguinte maneira na etapa de imobilização: fixavam-se as enzimas em suportes na forma pulverizada (lg) e de discos (20 unidades), colocando esses suportes em erlenmeyers de 125 ml e adicionando em seguida, 10 ml de solução enzimática, diluída e tamponada com acetato de sódio-ácido acético 0,05M no pH 4,0 e 5,0 para Amiloglicosidase e Invertase respectivamente, sendo incubados por um período de 10h à temperatura ambiente, sob agitação lenta e constante. Posteriormente, os suportes com enzima imobilizadas, eram separados por decantação e lavados por cinco vezes com solução tampão de acetato de sódio 0,05M pH 4,0 e 5,0 para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente.

3.8.1. Influência do pH da Solução Substrato na Atividade das Enzimas Imobilizadas

Após a imobilização das enzimas, adicionava-se 10 ml de solução de amido 1,6% p/v e sacarose 0,1M para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente, ambas tamponadas com 1 ml de solução tampão preparadas como descrito no item 3.5.1.

Os erlenmeyers foram, então, transferidos para um banho térmico com agitação constante na temperatura de 60 a 50 centígrados, para a Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente.

Após 30 minutos, as enzimas eram desativadas e a glicose dosada como descrito nos itens 3.6.3.5 e 3.5.3 respectivamente.

3.8.2. Influência da Temperatura na Atividade da Enzima Imobilizada

No complexo resina-enzima, adicionaram-se 10 ml de solução substrato, convenientemente tamponados, e colocados em banho térmico com agitação constante, na temperatura do experimento.

Após 30 minutos, as enzimas foram desativadas e a glicose produzida dosada e determinada a atividade específica.

3.8.3. Influência da Força Iônica da Solução Substrato na Atividade da Enzima Imobilizada

Após a imobilização, adicionavam-se 10 ml de solução substrato, tamponados com 1 ml de solução acetato de sódio-ácido acético, na concentração molar selecionada para o teste experimental no pH 4,0 e 5,0 e na temperatura 50 a 60 centígrados, para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente. Após 30 minutos, retirava-se uma alíquota da solução substrato para análise da glicose produzida. Posteriormente, separava-se a solução substrato sobrenadante do complexo resina-enzima por filtração à vácuo, retornando-a ao banho termostaticado com agitação constante por mais 30 minutos. Após este período, a glicose produzida era dosada e determinada a atividade específica da enzima na solução sobrenadante.

O cálculo da glicose produzida e da atividade específica da enzima liberada do suporte para a solução substrato sobrenadante foi realizado utilizando-se as seguintes equações:

$$\text{GPS} = \text{GSS} - \text{G}; \quad (\text{g/ml}) \quad (3.21)$$

$$\text{AESSS} = \frac{10 \cdot \text{GPS} \cdot 10^6}{\text{PM} \cdot 30 \cdot \text{mg enzima fixada}}; \quad (\mu\text{moles}/(\text{minuto} \times \text{mg prote\u00edna})) \quad (3.22)$$

onde GSS é a glicose presente na solução substrato sobrenadante, G a glicose presente na solução substrato, GPS a glicose produzida pela enzima liberada para a solução sobrenadante e AESSS é a atividade específica da enzima liberada para a solu

ção sobrenadante.

3.8.4. Estabilidade Térmica

O complexo resina-enzima permanecia por 60 minutos em 10 ml de solução tampão de acetato de sódio-ácido acético 0,05M pH 4,0 e 5,0 para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente, em incubadora com agitação constante na temperatura do teste. Posteriormente, retirava-se esta solução, sendo o erlenmeyer com o complexo resina-enzima, transferido para um banho termostaticado com agitação constante, onde foram adicionados 10 ml de solução substrato, convenientemente tampoados e na temperatura de 60 e 50 centígrados para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente. Após 30 minutos, desativava-se as enzimas, dosando-se a glicose produzida e determinando-se a atividade específica.

3.8.5. Quantificação da Atividade das Enzimas Liberadas do seu Suporte em função do número de Bateladas e Influência das Bateladas na Atividade das Enzimas Imobilizadas.

Os objetivos desse teste foram determinar a queda da atividade da enzima imobilizada com o número de bateladas, bem como quantificar a atividade das enzimas que se desprenderam dos suportes em função do número de bateladas^{43, 44, 45}.

Cada batelada se iniciava com a adição de 10 ml de solução substrato tamponada com acetato de sódio 0,05M pH 4,0

e 5,0 a temperatura de 60 e 50 centígrados para Amiloglicosidase e Invertase, respectivamente. Essa solução era mantida sob agitação constante por 30 minutos.

Os complexos resina-enzimas foram separados por simples decantação; posteriormente, dividia-se a solução sobrenadante igualmente em dois erlenmeyers de 125 ml. As enzimas de um dos erlenmeyers eram desativadas em banho maria por 5 minutos a 100 centígrados e a glicose produzida dosada. A solução sobrenadante do outro erlenmeyer era transferida para um banho termostaticado com agitação constante por 24 h, estando cada enzima em condições ótimas de temperatura e pH; posteriormente dosava-se a glicose produzida.

Os complexos resinas-enzimas eram lavados por 3 vezes, com solução tampão acetato 0,05M no pH conveniente, e nova batelada era iniciada.

O cálculo referente a essa situação foi feito através da seguinte equação:

$$AED = \frac{B}{A} \quad (3,23)$$

onde A é a glicose produzida pela enzima imobilizada, após cada batelada, B a glicose produzida pela enzima imobilizada e pela despreendida do suporte, após 24h de ausência da imobilizada, na temperatura de atividade máxima e AED é a relação entre os dois parâmetros descritos acima.

3.8.6. Conversão do Substrato por enzima Imobilizada em Função do Tempo

O procedimento experimental foi o mesmo descrito no item 3.8.5, com exceção do fato do tempo de reação ser de 120 minutos. Amostras eram retiradas em intervalos de tempo regulares para a dosagem de glicose.

3.8.7. Influência do Grau de Retenção da Resina no Tecido em Relação à Atividade Enzimática

O procedimento experimental foi o mesmo descrito no item 3.8.5, sendo usado para cada batelada 20 unidades de discos, com diferentes percentagens de resina impregnada no tecido na forma de microcamadas, como descrito no item 3.4.3.

3.8.8. Influência do Tempo de Estocagem na Atividade da Enzima Imobilizada

Após a imobilização, os suportes na forma de resina pó e disco foram colocados em vidro âmbar na presença de solução tampão acetato 0,05M no pH 4,0 (Amiloglicosidase) e 5,0 (Invertase), à temperatura aproximada de 5 centígrados.

Em intervalos de tempo regulares, retiravam-se amostras das resinas-enzimas e determinava-se a atividade enzimática.

3.9. CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS, UTILIZANDO REATOR TIPO BATELADA

A velocidade máxima de hidrólise ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis (K_m) foram determinadas através do modelo de Lineweaver-Burk^{14, 16, 71}. Para tal, 1g de pó e 20 discóides de suportes com enzimas imobilizadas eram adicionados a 20 ml de solução substrato. A seguir, foi utilizado o mesmo procedimento experimental, assim como as mesmas condições operacionais de pH, temperatura, concentrações dos substratos e os mesmos tempos de reação, que foram adotados para as enzimas em fase líquida, como descrito no item 3.6.3.5.

O procedimento para determinação da velocidade de hidrólise, assim como da constante K_m , foi o mesmo descrito em 3.6.3.5 na página 84.

3.10. MONTAGEM OPERACIONAL COM MICROREATOR DE LEITO FIXO E DE LEITO FLUIDIZADO

O mesmo microreator foi utilizado como leito fixo e leito fluidizado, invertendo-se, apenas, as posições de entrada e saída do substrato.

As figuras 3.7 e 3.8 mostram o sistema experimental utilizado, sendo constituído basicamente por um microreator de vidro (10), mangueiras de silicone (3), rotâmetro (17), bomba peristáltica (15), banho termostaticado (1), sistema gravitacional de aquecimento (8), manômetro de vidro (14), tanque pulmão (16) e um varivolt (7). O microreator de vidro era cons-

Nº DISCRIMINAÇÃO

- 1 BANHO TERMOSTÁTICO
- 2 TERMÔMETRO
- 3 MANGUEIRAS DE SILICONE
- 4 ERLLENMEYER DE 600 ml
- 5 MOLHA DE BORRACHA
- 6 VALVULA ABULHA
- 7 VARIOLTE
- 8 TANQUE DE AQUECIMENTO
- 9 RESISTÊNCIA ELÉTRICA
- 10 MICROREATOR TUBULAR
- 11 SUPORTE UNIVERSAL
- 12 GARRA PARA BURETA
- 13 TROMPA DE VÁCUO
- 14 MANÔMETRO DE TUBO EM V
- 15 BOMBA PERISTÁLTICA
- 16 TANQUE PULMÃO
- 17 ROTÂMETRO
- 18 CAMISA DE AQUECIMENTO
- 19 GARRA PARA CONDENSADOR
- 20 TUBO CONTROLADOR DE NÍVEL

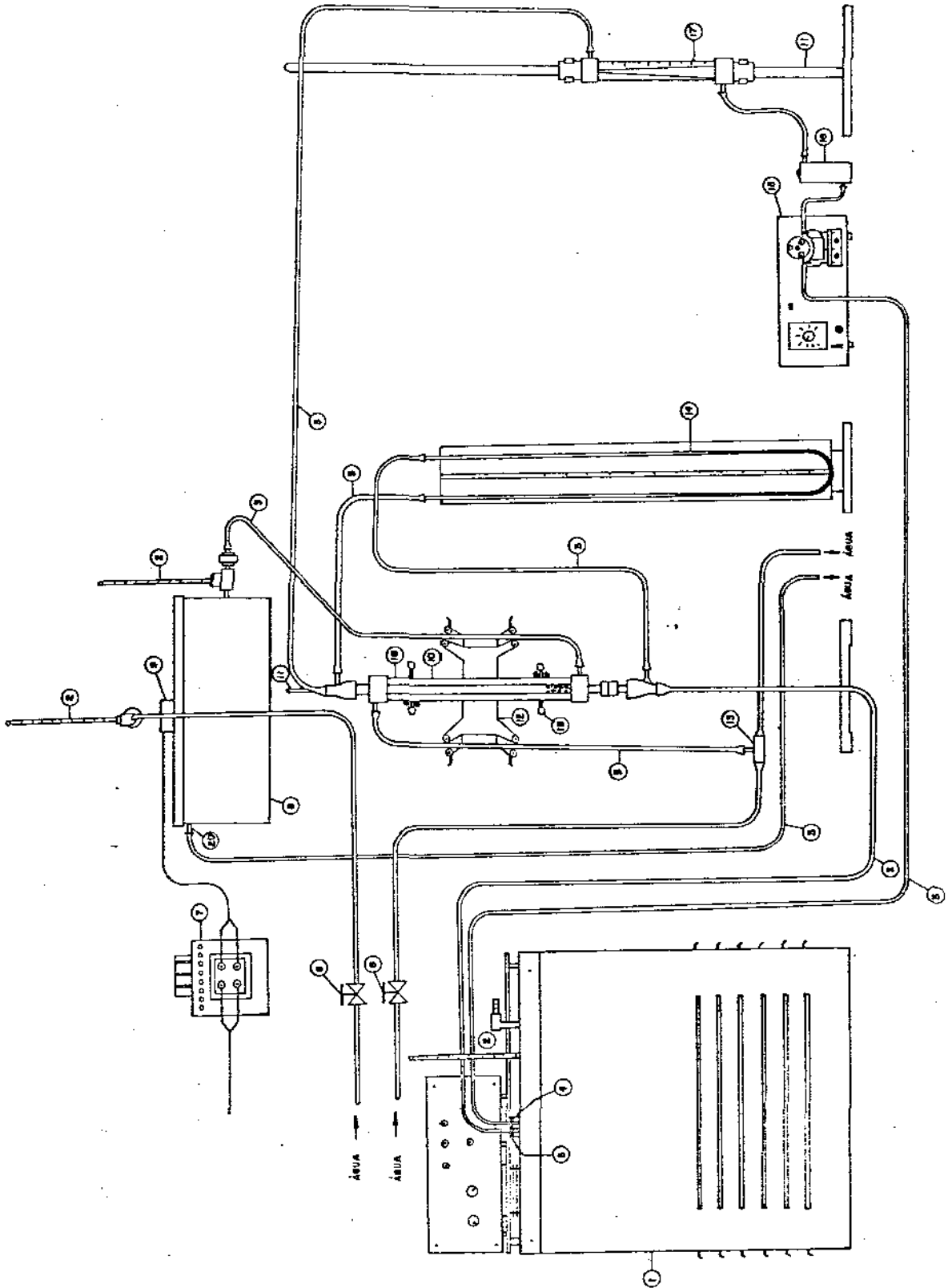


FIGURA - 3.7

FLUXOGRAMA DA MONTAGEM OPERACIONAL COM MICROREATOR DE LEITO FIXO OU FLUIDIZADO.

tituído de um tubo de vidro com 9 mm de diâmetro interno e 400 mm de comprimento, sendo que o seu sistema de distribuição de líquido consistia de uma placa porosa de 15 mm de espessura, construída com esferas de vidro de diâmetro 0,7 mm aglomeradas em araldite. A temperatura do reator foi mantida constante, através de uma camisa de aquecimento de 35 mm de diâmetro externo. O reator ainda apresentava duas saídas para medida da pressão durante a operação.

Para medida da vazão, utilizou-se um rotâmetro do tipo cilíndrico, com alma cônica e flutuador tipo anel, com 20 mm de diâmetro externo e 150 mm de altura.

A bomba peristáltica foi utilizada para se obter vazões controladas e baixas.

Com a finalidade de reduzir a pulsação provocada pela bomba peristáltica, utilizou-se um pulmão construído em PVC.

O tanque de aquecimento era dotado de uma resistência elétrica, e possuía um vertedouro para saída da água, na temperatura desejada para o aquecimento do microreator. Controlava-se a temperatura por um varivolt e através da alimentação de água, sendo esta controlada através de uma válvula agulha.

Para evitar problemas de estagnação na linha de aquecimento, foi feito vácuo através de uma trompa à vácuo.

O banho termostático foi utilizado para manter constante a temperatura da solução substrato, que se encontrava num erlenmeyer de 500 ml.

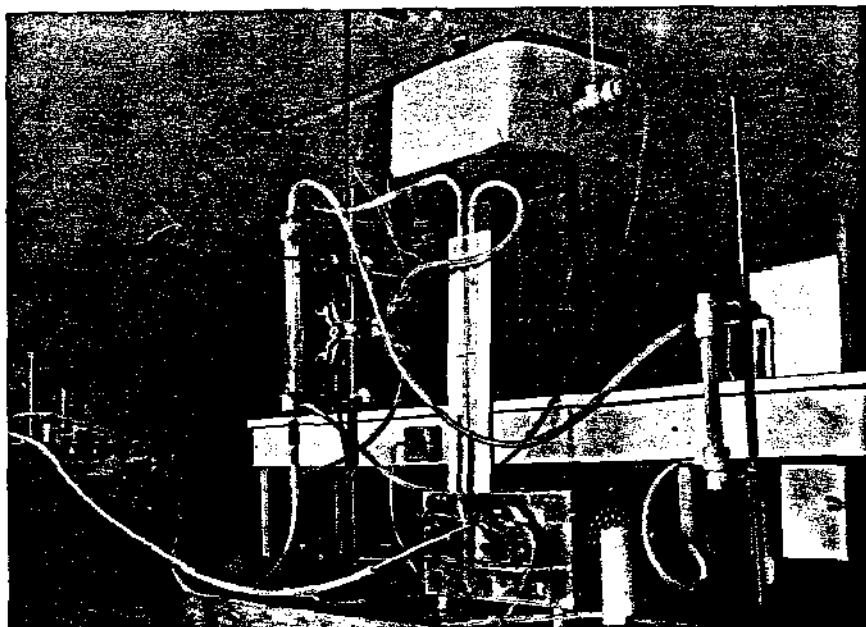


Figura 3.8 - Montagem Operacional com Microreator de
Leito Fixo ou Fluidizado.

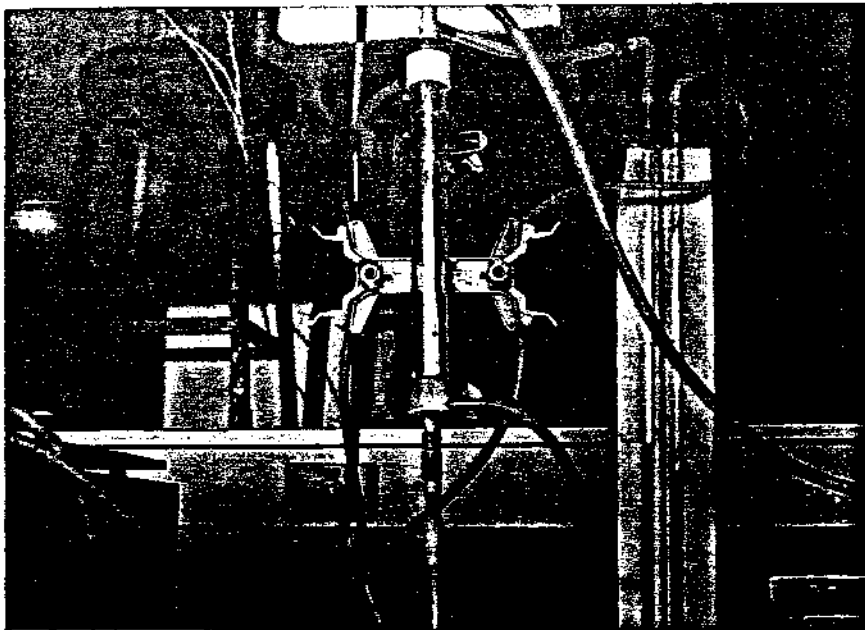


Figura 3.9 - Detalhe do Microreator tubular.

3.11. CARACTERIZAÇÃO DO MICROREATOR DE LEITO FIXO EM FUNÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA

A determinação da distribuição do tempo de residência (RTD) de um elemento de fluido no interior de um reator não é suficiente para determinar separadamente a extensão do grau de segregação do fluxo (o fluido escoava com diferentes velocidades, causando canalizações ou "ponto morto") em um reator, ou a extensão do efeito de difusão na direção do fluxo (micro misturas), em um reator tubular⁴¹.

A informação do tempo de residência não é, geralmente, suficiente para calcular a conversão em um reator não ideal. Por outro lado, através da determinação da distribuição do tempo de residência no microreator, foi possível determinar qual modelo de reator que melhor se aproximou ao microreator utilizado.

Foi utilizada a montagem operacional descrita no item 3.10 desse trabalho, acrescentando apenas um espectrofotômetro na linha operacional, entre o microreator e o rotâmetro.

No microreator, foram colocados 8g de resina na forma pulverizada, ou empilhados 160 unidades de discos. Após a estabilização da altura do leito fixo e da vazão pela passagem de água destilada, injetava-se o reagente colorimétrico, azul de metileno, através de uma bomba peristáltica (perturbação de grau) e acompanhava-se a variação da concentra

ção desse reagente com o tempo, através do espectrofotômetro. A conversão era determinada através do rotâmetro.

3.12. ESTUDO DA CONVERSÃO EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE SUPERFICIAL DE FLUXO

O reator do tipo leito fixo foi escolhido devido a sua simplicidade operacional⁸⁶.

O leito fixo era constituído por 8g do complexo resina-enzima na forma pulverizada ou através do empilhamento de 160 unidades na forma de discos. Os suportes com a enzima imobilizada eram colocados no reator, cuidadosamente, a fim de evitar a formação de bolhas de ar, obtendo assim um leito com aparência bem uniforme.

Após a estabilização da altura do leito fixo, determinava-se sua porosidade. Essa foi obtida pela razão entre o volume de líquido retido no leito fixo e o volume de líquido contido na coluna, no espaço correspondente à altura ocupada pelo leito fixo, na ausência desse. Para garantir que todo o líquido retido no leito era retirado, utilizou-se uma bomba à vácuo⁸⁶.

A conversão foi determinada a várias velocidades superficiais de fluxo através da coluna, utilizando as seguintes concentrações de amido: 0,125, 0,16, 0,25, 0,50, 1,0 e 2,0 mg/ml e de sacarose 0,05M, 0,1M, 0,125M, 0,16M, 0,25M e 0,3M, à temperatura de 40 centígrados e pH 4,5 para ambas as enzimas. Foi seguido o modelo proposto por Gelf e outros³⁷.

Após estabilização da vazão através da coluna, recolhiam-se as amostras em balões volumétricos de 100 ml e a glicose era dosada.

Os gráficos de conversão em função da velocidade superficial de fluxo eram, então, traçados.

Para calcular a velocidade superficial de fluxo utilizou-se a equação 2.12 descrita no capítulo anterior.

3.13. ESTABILIDADE OPERACIONAL EM MICROREATOR DE LEITO FIXO E DE LEITO FLUIDIZADO

O mesmo microreator foi utilizado como leito fixo e fluidizado, invertendo-se apenas as posições de entrada e saída das soluções substratos.

A estabilidade operacional das enzimas imobilizadas era determinada através do acompanhamento da queda de conversão do substrato, obtida a cada ciclo de 24 h de operação contínua no microreator. Esse foi operado com reciclo, pois a conversão obtida em cada passe foi muito baixa.

No microreator de leito fixo e de leito fluidizado, foram utilizados 8g do complexo resina-enzima na forma pulverizada, com diâmetro médio de Sauter de 0,1mm e 0,2mm, respectivamente. Através dele, circulavam em operação contínua, 250 ml de solução substrato de amido 1,6% p/v com pH 4,0 e na temperatura de 60 centígrados, ou sacarose 0,1M com pH 5,0 e na temperatura de 50 centígrados, para a Amiloglicosidase ou Invertase, respectivamente, sendo ambas tamponadas com solução

acetato de sódio-ácido acético 0,05M. As soluções substrato e foram trocadas diariamente, durante 8 a 9 dias consecutivos¹¹⁶.

3.14- ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE E DA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO EM REATOR TUBULAR DE LEITO FIXO, UTILIZANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS

A partir dos dados de conversão em função da velocidade superficial de fluxo, estudou-se a cinética da hidrólise contínua das soluções de sacarose e da sacarificação das soluções de amido, em reator de leito fixo, contendo as enzimas i mobilizadas nos quatro tipos de suportes.

Foram utilizados 8g de suporte resina na forma de pó e 160 unidades na forma de disco, nas seguintes condições operacionais: temperatura de 40 centígrados e pH 4,5. As concentrações das soluções substratos utilizadas foram as mesmas citadas no item 3.12.

Após a estabilização da altura do leito e da vazão volumétrica para uma determinada velocidade superficial de fluxo e uma dada concentração de substrato, recolhia-se uma amostra de 100 ml em um balão volumétrico para análise da glicose produzida. A velocidade superficial de fluxo era alterada e esperava-se uma nova estabilização, repetindo novamente a operação citada acima. Assim, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$, segundo a Equação 2.11, em função das concentrações iniciais das soluções substratos e das conversões para várias velocidades superficiais de fluxo⁸⁶.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo, serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos nesse trabalho, que foi desenvolvido através das seguintes etapas:

- Síntese e caracterização das resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído;
- Preparação dos suportes para fixação das enzimas amiloglicosidase e invertase;
- Caracterização das enzimas amiloglicosidase e invertase em fase líquida;
- Desenvolvimento do processo de imobilização;
- Caracterização das enzimas imobilizadas;
- Caracterização do microreator de leito fixo e de leito fluidizado em função da distribuição do tempo de residência;
- Estudo cinético da hidrólise da sacarose e da sacarificação do amido por enzimas imobilizadas, utilizando reator de leito fixo;
- Estudo da estabilidade operacional em microreator de leito fixo e fluidizado.

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS RESINAS N-METILOLACRILAMIDA E URÉIA-FORMALDEÍDO

Como já citado no item 3.2.2.2, os reagentes de síntese foram padronizados e apresentaram pequenos desvios em rela

ção à concentração fornecida pelo fabricante. A concentração obtida para o reagente acrilamida variou entre 44,0 a 44,5% e do formaldeído entre 36,2 a 36,8%.

As resinas sintetizadas apresentaram-se como um polímero termofixo rígido e transparente, com coloração amarelada e incolor para as resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído, respectivamente.

Durante a síntese da resina N-metilolacrilamida, fez-se o acompanhamento da redução da concentração de formaldeído livre, verificando que após 4 horas de reação, a concentração desse, na mistura reacional, era menor que 3%, geralmente na faixa de 2,4 a 2,8%. A resina uréia-formaldeído apresentou, ao final da síntese, uma concentração de formaldeído livre na faixa de 2,0 a 3,0%.

Segundo Mark⁶³, o espectro de infravermelho de qualquer resina aminoplástica tem duas ou mais bandas na região entre 1500 e 1700 cm^{-1} ; a primeira representa a amida primária e a segunda, entre 1530 e 1600 cm^{-1} , representa a amida secundária. No caso das resinas sintetizadas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído (ver as figuras 4.1 e 4.2, respectivamente) a banda da amida primária encontra-se entre 1640 e 1670 cm^{-1} e a da amida secundária entre 1530 e 1550 cm^{-1} . A atribuição dessas bandas tem sido sujeita a muitas investigações e controvérsias⁶³. A banda da amida primária possui uma forte característica do grupo carbonila, ao passo que a amida secundária possui uma considerável contribuição do grupo C-N.

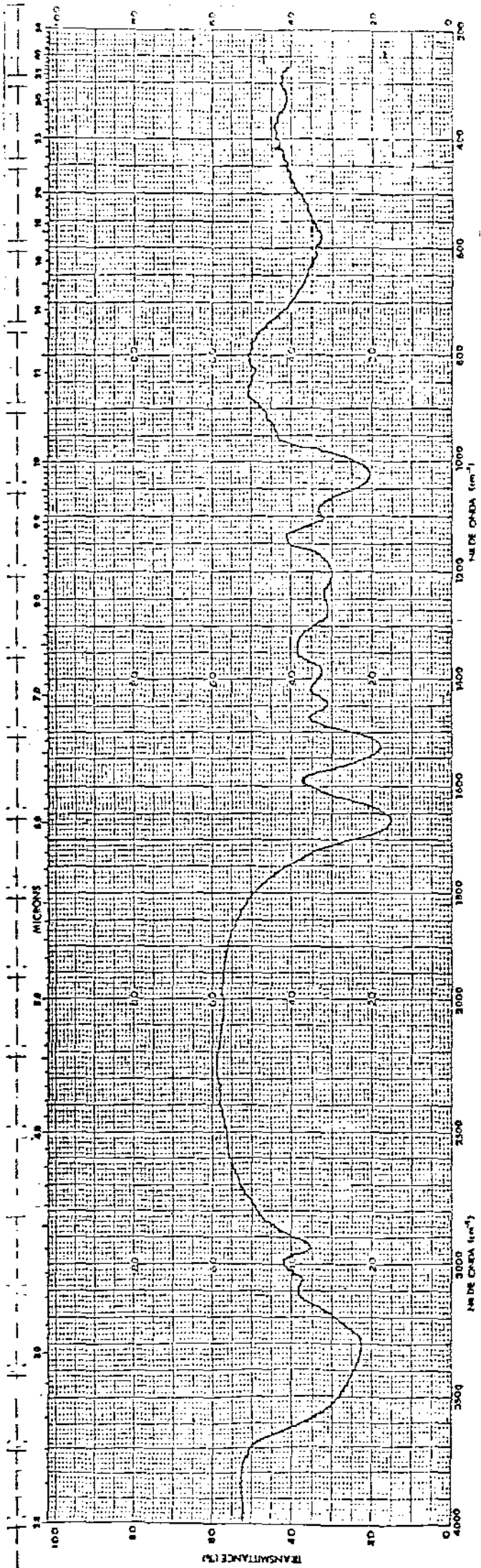


FIGURA 4.1

ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA RESINA N-METILOAGRILAMIDA PÓ.

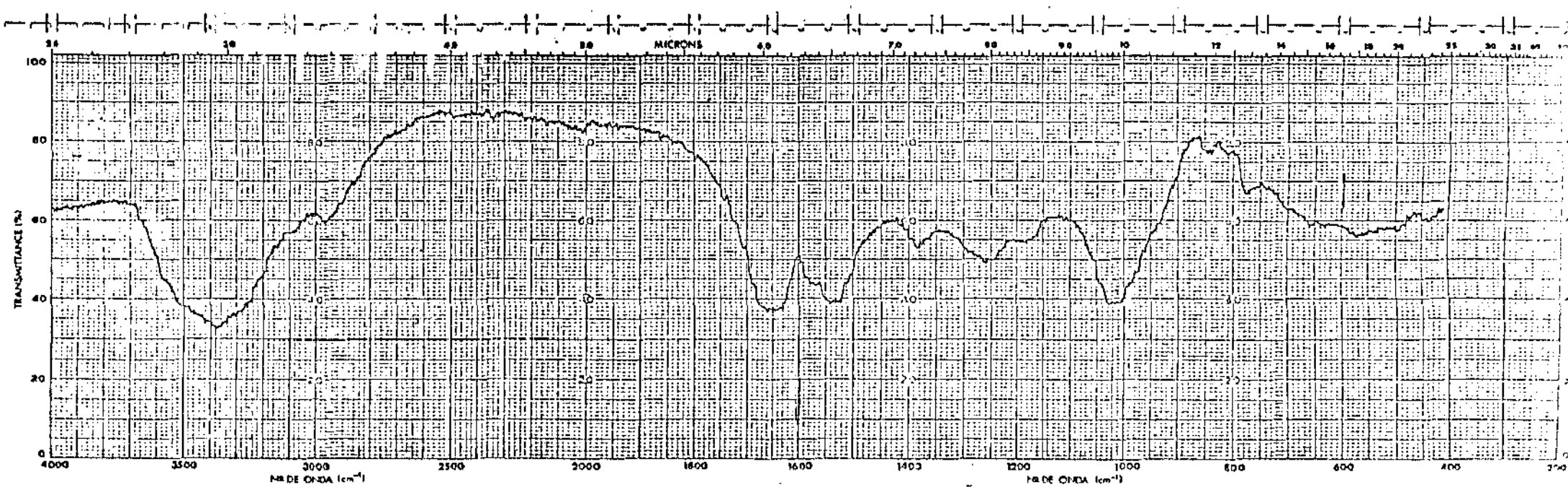


FIGURA 4.2

ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA RESINA URÉIA-FORMALDEÍDO PÓ.

A banda arredondada, entre 3300 e 3500 cm^{-1} , que aparece em ambas as figuras, provavelmente é proveniente das vibrações de estiramento do grupo N-H e do grupo O-H em associação polimérica.

Segundo Dyer²⁹, as bandas localizadas entre 1500 a 1700 e 3300 a 3500 cm^{-1} são características de amidas.

Para Mark⁶³, bandas entre 1370 e 1390 cm^{-1} , para ambas resinas, possivelmente são devido a deformação de vibração do grupo O-H. As bandas de pequenas intensidades, que se encontram em 2920 cm^{-1} para a N-metilolacrilamida e 2930 cm^{-1} para a uréia-formaldeído, provavelmente são provenientes das vibrações de estiramento de grupos C-H.

As bandas de intensidade média que aparecem em torno de 1020 cm^{-1} para ambas as resinas, podem ser causadas pelas vibrações de estiramento de grupos C-O e C-N, podendo ser também devido a presença de radicais de enxofre-oxigênio, pois essa mesma banda foi verificada no espectro de infravermelho dos compostos a base de enxofre, utilizados na síntese da resina uréia-formaldeído e na polimerização da resina N-metilolacrilamida.

Espectro de infravermelho com bandas semelhantes as apresentadas na figura 4.2, para a resina uréia-formaldeído, foi obtido por Urbanski¹⁰² e Mark⁶³.

Assim, todas as bandas analisadas evidenciam características de compostos amida com grupos hidroxila.

A densidade da resina uréia-formaldeído foi de aproximadamente 1,270 e de N-metilolacrilamida de 1,170.

A resina N-metilolacrilamida apresentou uma concentração de monômeros de aproximadamente 42% em peso e a uréia-formaldeído de 50% em peso. As resinas na forma de monômeros foram armazenadas em vidro âmbar na geladeira.

4.2. PREPARAÇÃO DOS SUPORTES PARA FIXAÇÃO DAS ENZIMAS

As resinas pulverizadas, que foram lavadas e colocadas em vidros rotulados segundo seu diâmetro médio, foram pesadas nas quantidades citadas na tabela 4.1, de modo que o diâmetro médio de Sauter das partículas fosse de aproximadamente 0,1mm.

Intervalo de diâmetro (peneira Tyler)	Diâmetro médio da partícula (mm)	Peso das Amostras (g)	Fração Ponderal
80/100	0,1630	2,0	0,2
100/150	0,1270	2,0	0,2
150/170	0,0965	3,0	0,3
170/200	0,0810	3,0	0,3
T O T A L		10,0	1,0

Tabela 4.1 - Quantidade da amostra de resina pesada de cada peneira

A tabela 4.2 apresenta as percentagens de retenção de resina no tecido, em função da diluição da solução de resina a ser aplicada no tecido.

Tipo de Resina	Volume da Solução de resina / volume de H ₂ O	Massa de catalizador utilizada (g)	% resina retida no tecido
N-metilolacrilamida	20/80	0,50	4,71
	30/70	0,70	6,52
	40/60	1,00	8,17
	50/50	1,20	10,26
	60/40	1,50	12,75
	65/35	1,60	13,79
	70/30	1,70	15,12
	80/20	1,97	17,51
	90/10	2,21	19,83
Uréia-formaldeído	20/80	0,64	5,74
	30/70	0,95	7,65
	40/70	1,27	9,28
	50/50	1,59	11,49
	55/45	1,75	12,37
	60/40	1,91	13,51
	70/30	2,22	15,77
	80/20	2,54	18,28
	90/10	2,86	20,39

Tabela 4.2 - Percentagem de resina retida no tecido em função da diluição da solução de resina. Temperatura e tempo de cura: 130°C e 15 minutos.

A percentagem de retenção de resina no tecido é uma variável importante, pois, como será discutido no item 4.5, a quantidade de enzima fixada varia com esse parâmetro. Em todos os ensaios experimentais foram utilizados tecidos com retenção de resina superior a 11%, baseando-se no fato de que, na imobilização de antígenos, o uso de suportes com retenção igual ou superior a mesma, levou a resultados satisfatórios.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS EM FASE LÍQUIDA

Foram utilizadas as enzimas amilo P-250, da Pfizer e a invertase da Sigma, conforme citado no capítulo anterior.

As figuras 4.3 e 4.4 apresentam a atividade enzimática em função da temperatura e do pH, para a amiloglicosidase e invertase, respectivamente. Para a amiloglicosidase verificou-se que as condições ótimas de temperatura e pH foram 60°C e 4,0 e a atividade máxima foi de 3490 unidades/ml de enzima. O teor de proteína foi de 239,0 mg/ml, assim a atividade específica máxima foi de 14,6 unidades/mg de proteína. Para a enzima invertase, as condições ótimas de temperatura e pH foram de 50°C e 5,0 e a atividade máxima de 2240 unidades/ml de enzima. O teor de proteína foi de 192,7 mg/ml, logo a atividade específica máxima foi de 11,6 unidades/mg enzima.

As tabelas 4.3 e 4.4 mostram as concentrações das enzimas em mg de proteína/ml, as conversões máximas dos substratos em produto, após 120 minutos de reação e as conversões específicas máximas para enzimas amiloglicosidase e invertase, res

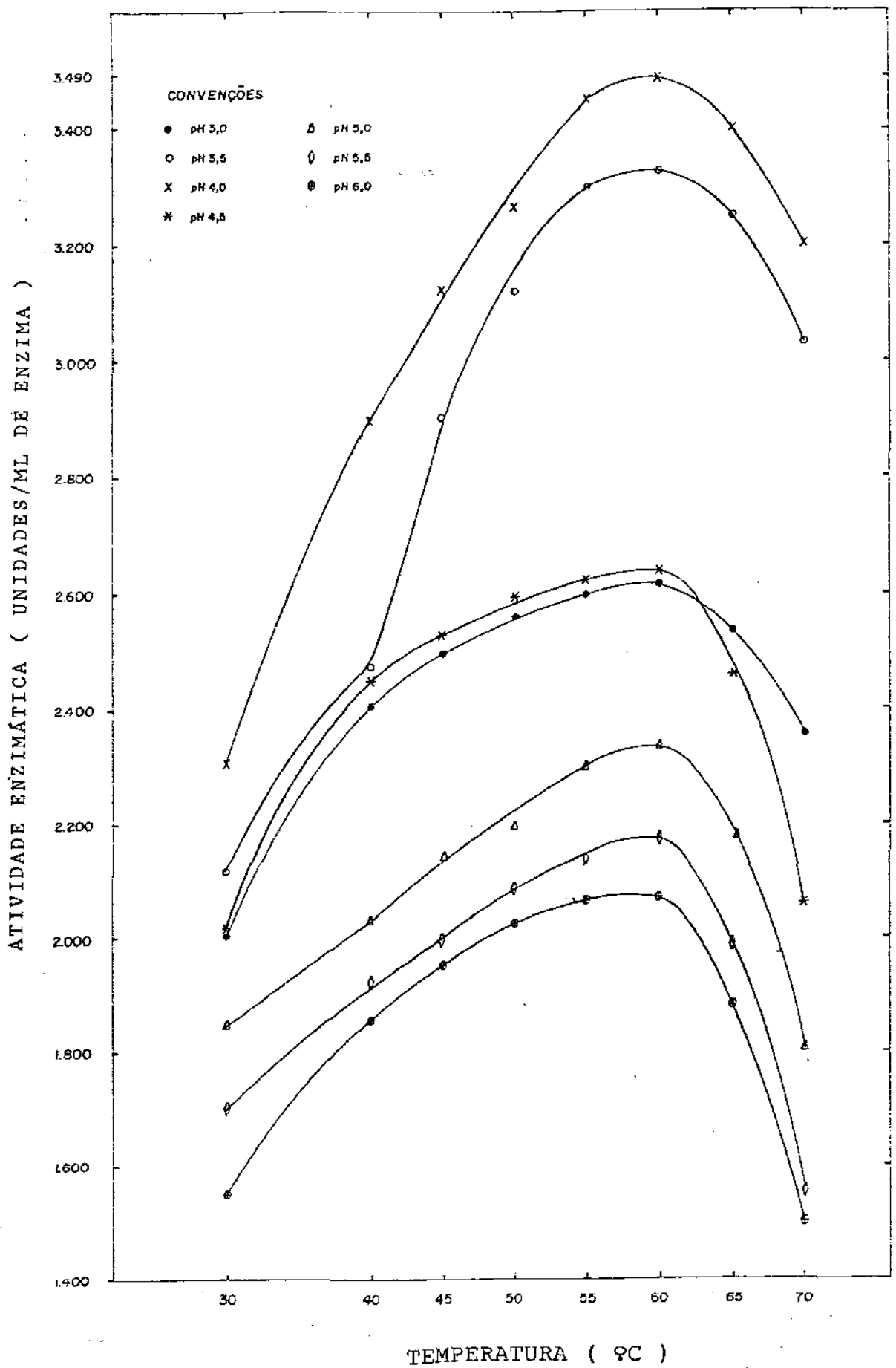
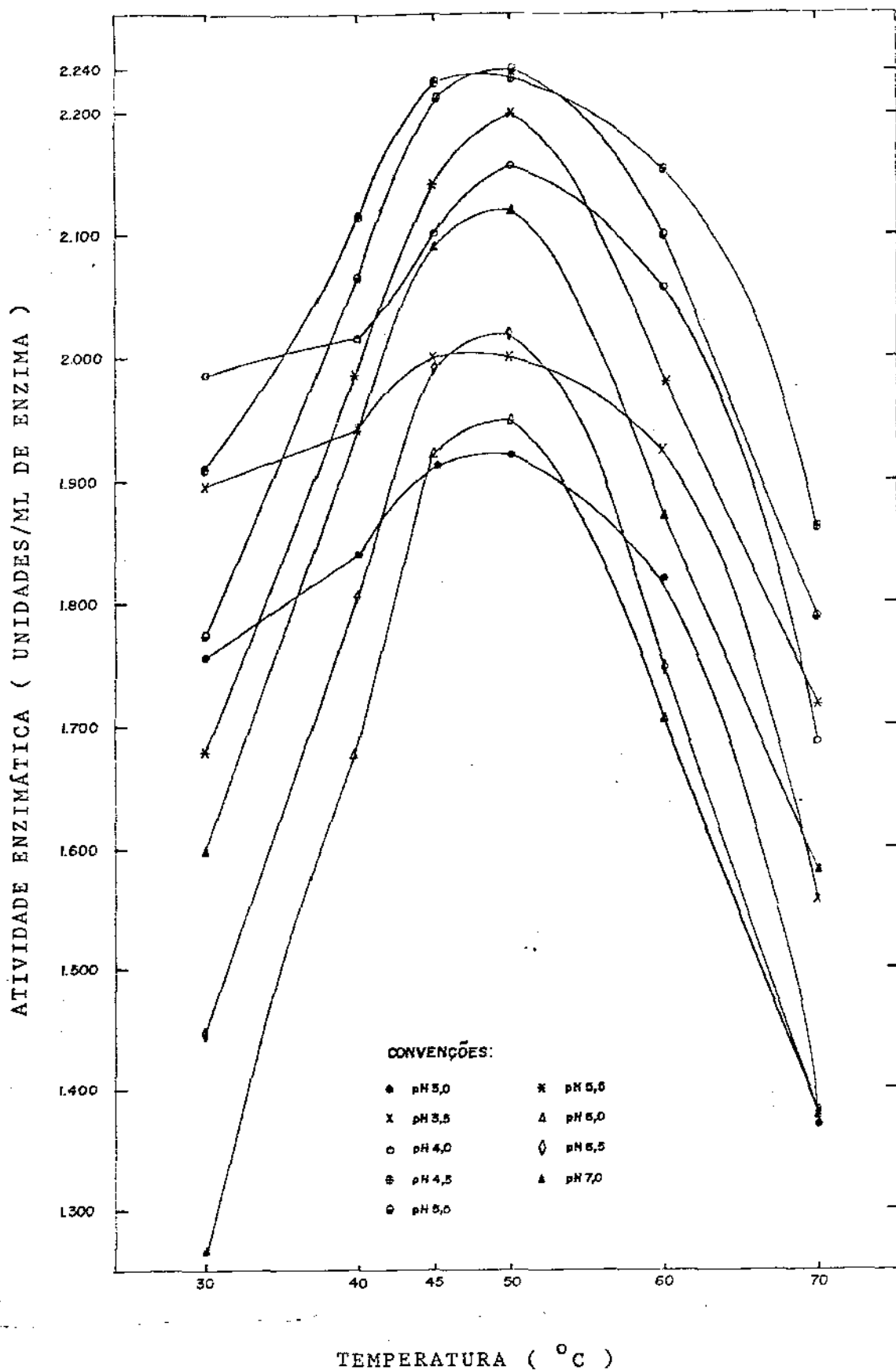


FIGURA 4.3

EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE CATALÍTICA DA ENZIMA AMILOGLICOSIDASE EM FASE LÍQUIDA



A 4.4

EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE CATALÍTICA DA ENZIMA INVERTASE EM FASE LÍQUIDA.

pectivamente. Como pode ser verificado nas tabelas citadas anteriormente, a conversão específica foi aproximadamente constante para ambas enzimas, sendo que para amiloglicosidase o valor médio obtido foi de $5,0 \times 10^3$ %/mg de enzima. Para a invertase o valor médio foi de $3,8 \times 10^3$ %/mg de enzima.

Teste	Concentração enzima (mg/ml) $\times 10^3$	Conversão P/ glicose (%)	Conversão específica (%/mg enzima) $\times 10^{-3}$
1	1,8	9,3	5,2
2	3,0	14,3	4,8
3	5,5	28,7	5,2
4	8,0	39,0	4,9
5	10,2	50,5	5,0

Tabela 4.3. - Conversão de amido em glicose, após 120 minutos de reação (60°C e pH 4,0), utilizando a enzima amilo P-250.

Teste	Concentração enzima (mg/ml) $\times 10^3$	Conversão p/ glicose(%)	Conversão específica (%/mg enzima) $\times 10^{-3}$
1	2,0	8,0	4,0
2	3,9	14,0	3,6
3	7,6	27,5	3,6
4	9,2	35,0	3,8
5	11,9	48,0	4,0

Tabela 4.4. - Conversão de sacarose em glicose, após 120 minutos de reação (50°C e pH 5,0), utilizando a enzima invertase.

Observa-se que os valores da conversão específica per maneceram aproximadamente constantes. Esse comportamento está

associado à dependência, mais ou menos, linear exibida nas figuras 4.5 e 4.6, que mostram o aumento da conversão do substrato em função do tempo de reação; está ainda associado ao resultado, geralmente esperado, da proporcionalidade entre o aumento da conversão do substrato com a elevação da concentração de enzima. Resultados semelhantes foram obtidos por Zanin¹¹⁶ para a amilo P-250 em solução aquosa.

4.4. DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

As tabelas 4.5 e 4.6 mostram as quantidades de enzimas fixadas nos suportes sólidos em função da concentração de enzima em solução. Os resultados que se encontram listados nas tabelas anteriormente citadas, mostram que a quantidade equivalente de enzima fixada aumenta com a elevação da concentração de enzima na solução de imobilização. Porém, verificou-se que acima de uma determinada concentração, a variação da quantidade correspondente de enzima fixada diminui gradativamente, tendendo a um patamar. Isso ocorre, provavelmente, devido à saturação da área superficial do suporte ou à saturação das ligações disponíveis no suporte. Resultados semelhantes foram obtidos por Hanson⁷⁴ na imobilização de invertase em sabugo de milho por ligação covalente.

Os ensaios mostraram também que a quantidade equivalente da invertase fixada no disco e no pó, foi na maioria menor que a da amiloglicosidase, demonstrando uma maior afinidade de ligação da segunda aos suportes testados. Além disso a concentração da invertase na solução "mãe" é menor que da amiloglicosidase.

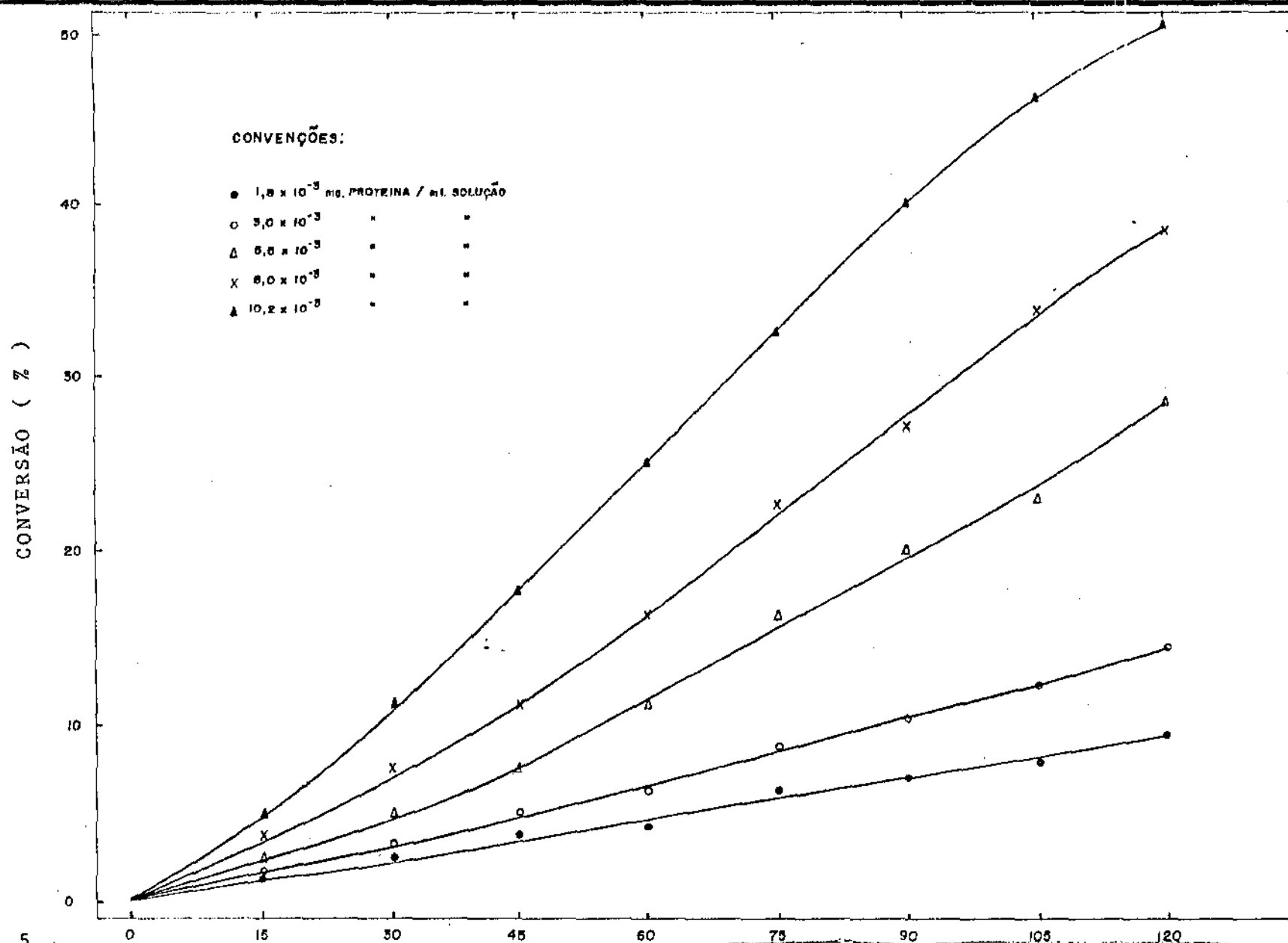


FIGURA 4.5

CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA AMILOGLICOSIDASE EM FASE LÍQUIDA (60°C e $\text{pH } 4,0$). TEMPO DE REAÇÃO (MIN.).

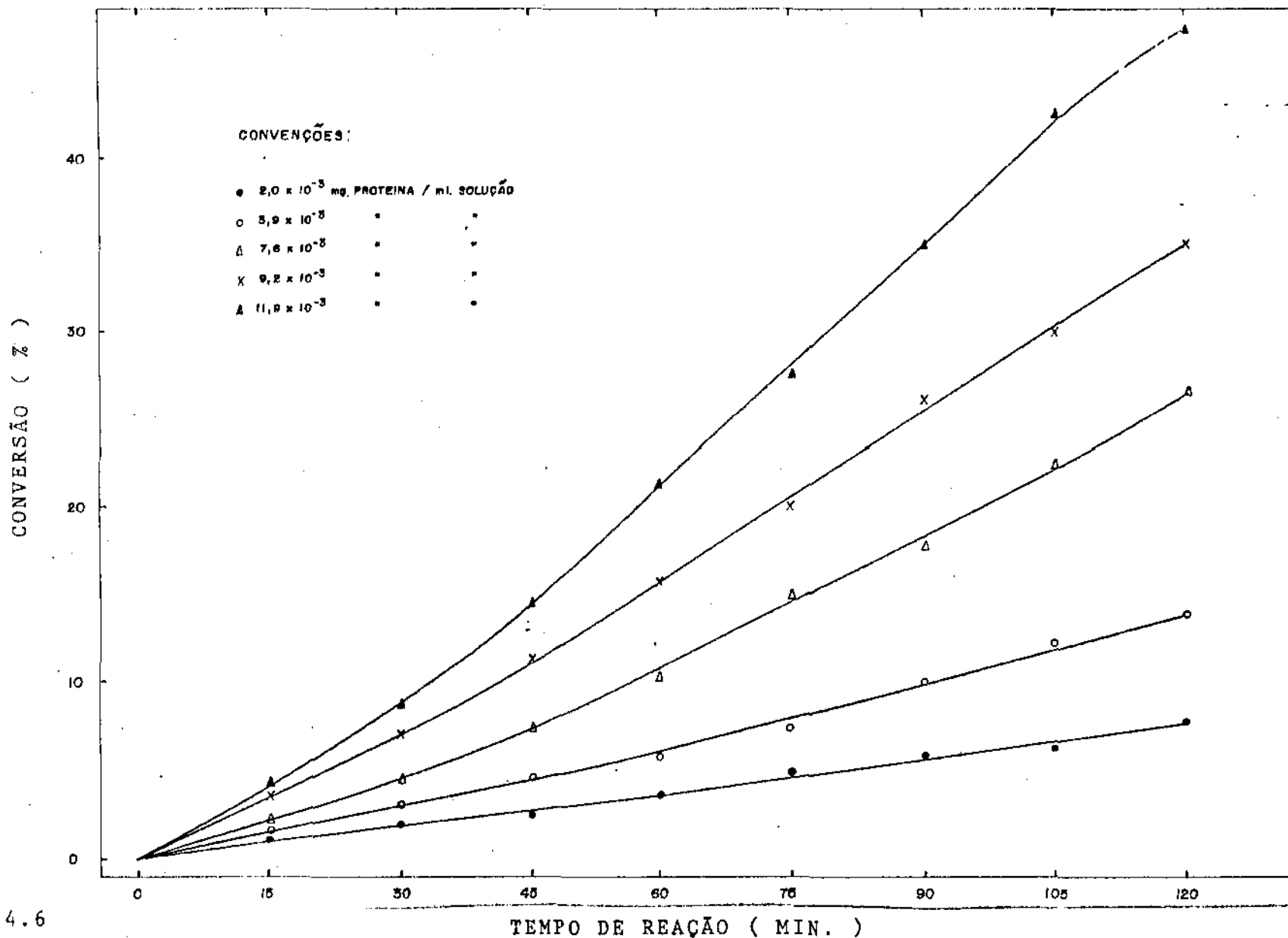


FIGURA 4.6

CONVERSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA INVERTASE EM FASE LÍQUIDA (50°C e pH 5,0).

Tipo de Suporte	Diluição da solução enzimática (VIV)	Concentração de enzima na solução (mg/ml)	Quantidade equivalente enzima fixada (mg/ml)	Quantidade equivalente enzima fixada (mg/mg sólido)	Porcentagem de enzima fixada (%)
NMA na forma de pó	1:5000	0,050	0,010	0,100	20,0
	1:2000	0,120	0,050	0,500	41,7
	1:1000	0,240	0,137	1,370	57,1
	1:500	0,480	0,157	1,570	32,7
	1:300	0,870	0,160	1,600	18,4
	1:150	1,700	0,161	1,610	9,5
NMA na forma de disco	1:5000	0,050	0,009	0,090	18,0
	1:2000	0,120	0,037	0,370	30,8
	1:1000	0,240	0,112	1,120	46,7
	1:500	0,480	0,117	1,170	24,4
	1:300	0,870	0,125	1,250	14,4
	1:150	1,700	0,125	1,250	7,4
Uréia formaldeído na forma de pó	1:5000	0,050	0,017	0,170	34,0
	1:2000	0,120	0,047	0,470	39,2
	1:1000	0,240	0,133	1,330	55,4
	1:500	0,480	0,147	1,470	30,6
	1:300	0,870	0,150	1,500	17,6
	1:150	1,700	0,159	1,590	9,4
Uréia formaldeído na forma de disco	1:5000	0,050	0,007	0,070	14,0
	1:2000	0,120	0,033	0,330	27,5
	1:1000	0,240	0,110	1,100	45,8
	1:500	0,480	0,118	1,180	24,6
	1:300	0,870	0,122	1,220	1,4
	1:150	1,700	0,123	1,230	7,2

Tabela 4.5 - Quantidade de enzima fixada (QEF) nos suportes, em função da concentração de enzima na solução de imobilização. Enzima: Amilo P-250, tempo de imobilização: 24h; pH: 4,0 e temperatura: ambiente. Foi utilizado 1g de sólido em 10 ml de solução enzimática.

Tipo de Suporte	Diluição da solução enzimática (V/V)	Concentração de enzima na solução (mg/ml)	Quantidade equivalente enzima fixada (mg/ml)	Quantidade equivalente enzima fixada (mg/mg sólido)	Porcentagem de enzima fixada (%)
NMA na forma de pó	1:3000	0,065	0,020	0,200	30,7
	1:2000	0,097	0,037	0,370	38,1
	1:1000	0,192	0,080	0,8000	41,7
	1:800	0,237	0,110	1,100	46,4
	1:400	0,470	0,120	1,200	25,5
	1:200	0,980	0,122	1,220	12,4
NMA na forma de disco	1:3000	0,065	0,015	0,150	23,1
	1:2000	0,097	0,030	0,300	30,9
	1:1000	0,192	0,064	0,640	33,3
	1:800	0,237	0,095	0,950	40,0
	1:400	0,470	0,100	1,000	21,3
	1:200	0,980	0,101	1,010	10,3
Uréia formaldeído na forma de pó	1:3000	0,065	0,015	0,150	23,1
	1:2000	0,097	0,029	0,290	29,9
	1:1000	0,192	0,075	0,750	39,1
	1:800	0,237	0,107	1,070	45,1
	1:400	0,470	0,118	1,180	25,1
	1:200	0,980	0,119	1,190	12,1
Uréia formaldeído na forma de disco	1:3000	0,065	0,013	0,130	20,0
	1:2000	0,097	0,032	0,320	33,0
	1:1000	0,192	0,067	0,670	34,9
	1:800	0,237	0,093	0,930	39,2
	1:400	0,470	0,097	0,970	20,6
	1:200	0,980	0,100	1,000	10,2

Tabela 4.6 - Quantidade de enzima fixada (QEF) nos suportes, em função da concentração de enzima na solução de imobilização. Enzima: invertase, tempo imobilização: 24h, temperatura: ambiente e pH: 5,0. Foi utilizado 1g de suporte em 10 ml de solução enzimática.

Verifica-se também, nas tabelas 4.5 e 4.6, que os suportes poliméricos pulverizados apresentam maiores quantidades de enzimas fixadas, provavelmente porque os mesmos possuem maiores áreas superficiais por unidade de massa expostas à imobilização das enzimas.

Optou-se, no processo de imobilização, pela solução enzimática cuja concentração possibilitou a maior porcentagem de fixação de enzimas no suporte. A razão para tal escolha foi a pequena variação na quantidade equivalente de enzima fixada, para as soluções com concentração de enzima acima desse valor, pois como as enzimas são catalisadores de alto custo, provavelmente não seria economicamente viável utilizar uma solução mais concentrada, para se obter um pequeno aumento na quantidade de enzima fixada. Portanto, nos próximos ensaios utilizaram-se as seguintes diluições: 1:1000, que corresponde a concentração da solução enzimática de 0,24 mg/ml, para a enzima amiloglicosidase e 1:800, que corresponde a concentração da solução enzimática de 0,237 mg/ml, para a enzima invertase.

As tabelas 4.7 e 4.8 mostram os resultados do estudo da influência da temperatura e do tempo de imobilização na atividade enzimática, utilizando as seguintes condições de reação: pH 4,0 e temperatura 60°C para a amiloglicosidase e para a invertase pH 5,0 e temperatura 50°C foi adotado como tempo de reação 30 min.. Os resultados, listados nessas tabelas, mostram que para ambas as enzimas, um processo de fixação, com duração de 5 horas, levou a uma atividade relativa à fase líquida bem próxima da máxima. Entretanto, utilizou-se nesse trabalho, sem fazer um balanço econômico, um tempo de fixação de 10h, pois o

valor da atividade enzimática foi o maior possível, para temperatura de imobilização maior ou igual a 15°C. Com relação à temperatura do processo de fixação, adotou-se a ambiente para ambas as enzimas, apesar de se verificar que para temperaturas menores a atividade relativa à fase líquida foi um pouco maior. Tal decisão foi tomada devido ao fato de que para se obter um pequeno aumento da atividade relativa à fase líquida, era necessário um tempo de fixação bem maior, para temperaturas inferiores à ambiente. Assim mesmo sem fazer um balanço econômico, pelas razões citadas anteriormente, adotou-se para as enzimas imobilizadas, nos quatro tipos de imobilização, a temperatura ambiente. Os quatro tipos de suportes são: resina N-metilolacrilamida pulverizada (NMA-PÔ), resina N-metilolacrilamida na forma de disco (NMA-D), resina uréia-formaldeído pulverizada (U/F-PÔ) e na forma de disco (U/F-D).

A necessidade de tempos de imobilização maiores para temperaturas de imobilização menores ou iguais a 15 horas, possivelmente é devida a efeitos de difusão da enzima na fase líquida. Outro fato interessante, que pode ser verificado nas tabelas 4.7 e 4.8, é que a atividade relativa à fase líquida diminui com o aumento do tempo e da temperatura de fixação, para tempos maiores que 20 horas. Possivelmente, esse fenômeno está relacionado com a desnaturação das moléculas enzimáticas, devido a maior agitação dessas moléculas, acarretado tanto pelo aumento da temperatura, quanto pelo maior tempo de agitação do sistema.

Temperatura de Imobilização (°C)	Tempo de Imobilização (h)	Atividade relativa à fase líquida (%) Tipo de Suportes			
		NMA - Põ	NMA - D	U/F - Põ	U/F - D
6 a 8	2	33,3	27,6	32,2	25,3
	5	43,2	35,6	39,7	31,0
	10	49,7	42,1	48,9	40,3
	15	52,0	43,4	50,7	41,8
	20	47,2	41,1	50,6	38,7
	30	40,3	39,7	39,9	36,7
	40	30,6	35,5	29,7	32,1
15	2	36,6	30,1	33,3	27,3
	5	45,7	37,5	42,7	32,2
	10	50,8	42,8	48,0	40,9
	15	49,9	42,7	48,1	41,1
	20	45,2	38,3	43,7	36,6
	30	38,3	34,5	30,9	33,1
	40	27,2	30,5	26,3	29,7
25 a 28	2	35,1	30,0	35,1	28,6
	5	46,7	38,0	45,2	35,3
	10	50,3	42,8	48,0	40,7
	15	49,7	41,9	47,2	40,1
	20	42,3	35,6	40,1	32,1
	30	32,3	29,7	25,7	27,2
	40	21,6	25,7	20,7	23,7
45	2	30,1	25,7	30,2	23,6
	5	40,7	35,6	38,7	29,7
	10	40,2	35,7	37,9	30,1
	15	36,6	35,0	35,0	28,3
	20	29,7	32,0	31,6	25,7
	30	21,9	23,3	20,0	19,9
	40	12,7	17,7	11,1	15,8

Tabela 4.7 - Atividade relativa à fase líquida, em função do tempo e da temperatura de imobilização. Enzima: Amilo P-250. Condições de imobilização: pH = 4,0; diluição da solução de enzima: 1:1000; agitação suave. Condições de reação: pH = 4,0; temperatura: 60°C; solução de amido 1,6% p/V; tempo de reação: 30 minutos.

Temperatura de Imobilização (°C)	Tempo de Imobilização (h)	Atividade relativa à fase líquida (%) Tipo de Suportes			
		NMA - Pô	NMA - D	U/F - Pô	U/F - D
6 a 8	2	27,6	20,3	25,6	19,3
	5	36,0	30,6	33,3	27,7
	10	39,8	36,7	37,3	33,7
	15	45,1	38,2	42,7	37,8
	20	42,7	37,1	40,1	35,4
	30	33,9	33,7	35,2	32,4
	40	29,1	30,5	29,8	29,8
15	2	28,0	26,1	28,2	23,3
	5	38,0	32,7	38,2	30,0
	10	43,1	37,1	41,2	35,7
	15	43,3	37,9	40,5	36,8
	20	39,0	34,3	37,9	32,4
	30	32,4	29,3	32,1	29,5
	40	25,7	27,1	25,1	26,9
25 a 28	2	30,7	27,7	29,4	26,6
	5	39,1	33,4	39,2	32,3
	10	42,7	37,1	41,3	35,9
	15	41,1	36,7	38,7	35,1
	20	35,7	33,3	33,4	31,9
	30	27,7	27,3	25,3	24,2
	40	18,4	23,1	17,4	21,7
45	2	26,7	24,6	25,2	24,7
	5	30,0	27,9	28,1	26,7
	10	35,0	30,1	32,7	28,8
	15	33,7	28,7	30,5	27,3
	20	27,2	24,3	25,6	23,2
	30	21,3	20,2	19,7	20,0
	40	11,7	15,7	10,9	14,9

Tabela 4.8 - Atividade relativa à fase líquida, em função do tempo e da temperatura de imobilização. Enzima: invertase. Condições de imobilização: pH = 5,0; diluição da solução de enzima: 1:800; agitação suave. Condições de reação: pH = 5,0; temperatura: 50°C; solução de sacarose 0,1M; tempo de reação: 30 minutos.

Para verificar a influência da agitação em função do tempo de imobilização, foi feito um experimento sem agitação utilizando temperatura ambiente durante o processo imobilização.

Tempo (h)	Atividade relativa à fase líquida (%)							
	NMA - P \bar{O}		NMA - D		U/F - P \bar{O}		U/F - D	
	com agi tação	sem agi tação	com agi tação	sem agi tação	com agi tação	sem agi tação	com agi tação	sem agi tação
2	35,1	30,3	30,0	20,2	35,1	25,3	28,6	18,7
5	46,7	37,2	38,0	29,7	45,2	35,7	35,3	27,9
10	50,3	42,7	42,8	37,8	48,0	41,9	40,7	35,7
15	49,7	47,9	41,9	40,8	47,2	45,3	40,1	38,1
20	42,3	45,8	35,6	38,2	40,1	42,7	32,1	36,7
30	32,3	39,4	29,7	34,7	25,7	35,9	27,2	32,9
40	21,6	28,1	25,7	30,1	20,7	26,7	23,7	29,2

Tabela 4.9 - Atividade relativa à fase líquida para o processo com e sem agitação, utilizando a enzima amilo P-250 imobilizada.
 Condições de imobilização: pH = 4,0; diluição da solução de enzima: 1:1000; sem agitação.
 Condições de reação: pH 4,0; temperatura 60°C; solução de amido 1,6 p/V; tempo de reação: 30 minutos.

Tempo (h)	Atividade relativa à fase líquida (%)							
	NMA - Pô		NMA - D		U/F - Pô		U/F - D	
	com agi- tação	sem agi- tação	com agi- tação	sem agi- tação	com agi- tação	sem agi- tação	com agi- tação	sem agi- tação
2	30,7	25,5	27,7	22,7	29,4	25,5	26,6	21,7
5	39,1	30,1	33,4	28,2	39,2	31,2	32,3	26,7
10	42,7	37,7	37,1	33,8	41,3	37,7	35,1	32,7
15	41,1	38,9	36,7	35,7	38,7	38,9	31,9	34,2
20	35,7	37,3	33,3	34,2	33,4	35,7	24,2	32,3
30	27,7	30,9	27,3	29,9	25,3	28,9	24,2	27,8
40	18,4	23,2	23,1	27,3	17,1	22,1	21,7	25,2

Tabela 4.10 - Atividade relativa à fase líquida para o processo sem e com agitação. Enzima: invertase. Condições de imobilização: pH 5,0; diluição da solução enzimática: 1:800; sem agitação. Condições de reação: pH 5,0; temperatura: 50°C, solução de sacarose 0,1M; tempo de reação: 30 minutos.

Os resultados das tabelas 4.9 e 4.10, mostram que, para tempos de imobilização inferiores a 20h, a agitação favorece a atividade relativa à fase líquida para as duas enzimas imobilizadas. Para tempos de imobilização iguais ou superiores a 20h, a atividade relativa à fase líquida diminui mais rapidamente no processo com agitação suave do que no sem agitação. Isso sugere que, para tempos de imobilização iguais ou menores que 15h, a agitação suave possibilita um contato maior entre as enzimas e o suporte, favorecendo a fixação de maiores quantidades de enzimas ativas no suporte e conseqüentemente, possibilitando maiores atividades relativas. Por outro lado, no proces

so sem agitação, ocorre apenas a difusão natural da enzima.

Quando o tempo de imobilização torna-se muito grande (igual ou maior que 20h), outro fenômeno relacionado com a agitação, que pode estar ocorrendo, é a desativação das enzimas, pois são moléculas grandes e de forma enovelada. Assim, esse fenômeno pode estar sobrepujando o anteriormente citado.

Concluindo, para o processo de imobilização, foi adotada uma agitação suave com um tempo de imobilização de 10 horas, pois, com essas condições, obteve-se uma atividade relativa à fase líquida maior e um tempo de imobilização com valores máximos dessa atividade, para ambas as enzimas imobilizadas, nos quatro tipos de suporte.

Outro parâmetro analisado no processo de imobilização foi o pH da solução enzimática, pois esses catalisadores são muito sensíveis às flutuações desta variável. As tabelas 4.11 e 4.12 mostram os resultados da média dos valores obtidos experimentalmente para a atividade relativa à fase líquida. Nos ensaios, o pH da solução enzimática variou de 2,0 a 7,0 e o tempo de reação foi de 30 minutos.

pH	Atividade relativa à fase líquida (%)			
	NMA - P \bar{o}	NMA - D	U/F - P \bar{o}	U/F - D
2	19,0	24,0	18,3	23,2
3	40,7	36,0	39,7	34,1
4	50,3	42,8	48,0	40,7
4,5	49,5	42,9	47,7	40,5
5,0	39,2	38,0	38,9	37,1
6,0	32,0	34,0	33,3	33,5
7,0	22,7	28,0	20,7	26,1

Tabela 4.11 - Atividade relativa à fase líquida em função do pH, para amilglicosidade imobilizada. Condições de imobilização: temperatura ambiente; diluição da solução de enzima: 1:1000; agitação suave e tempo: 10h. Condições da reação: pH 4,0; temperatura: 60°C; substrato: solução de amido 1,6% p/V; tempo de reação: 30 minutos e concentração da solução tampão: 0,05M.

pH	Atividade relativa à fase líquida (%)			
	NMA - P \bar{o}	NMA - D	U/F - P \bar{o}	U/F - D
2	12,2	19,2	11,7	17,1
3	20,7	26,0	24,0	22,3
4	33,0	33,1	31,7	29,9
4,5	41,5	36,7	40,1	35,7
5,0	42,7	37,1	41,3	35,9
6,0	36,7	31,7	35,7	30,7
7,0	25,1	23,3	24,8	21,5

Tabela 4.12 - Atividade relativa à fase líquida em função do pH, para invertase imobilizada. Condições de imobilização: temperatura ambiente; diluição da solução de enzima: 1:800; agitação suave e tempo: 10h. Condições de reação: pH 5,0; temperatura: 50°C; substrato: solução de sacarose 0,1M; tempo de reação: 30 minutos e concentração da solução tampão: 0,05M.

Os resultados das tabelas 4.11 e 4.12 mostram que a faixa do pH que apresentou melhores resultados, para as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, foram de 4,0 a 4,5 e de 4,5 a 5,0, respectivamente. Assim, adotou-se pH 4,0 para a enzima amiloglicosidase e 5,0 para a invertase, pois nesses valores de pH, as atividades relativas à fase líquida mostraram-se ligeiramente maiores. Esses números concordam com os resultados de pH obtidos para a enzima em fase líquida.

Os valores máximos obtidos para a atividade relativa à fase líquida (ver tabela 4.11 e 4.12), para as enzimas amiloglicosidase e invertase imobilizadas nos quatro tipos de suportes empregados, apesar de se apresentarem baixos, foram maiores que os encontrados para essas enzimas fixadas em outros suportes, que se mantiveram em torno de 30%^{16,33,51,55,103,104}.

No estudo do processo de imobilização, notou-se uma maior estabilidade no comportamento das enzimas imobilizadas no suporte em forma de disco. Essa estabilidade se apresentou sob a forma de uma menor variação da atividade relativa, quando ocorriam flutuações nos parâmetros analisados, tais como: o tempo para fixação, a temperatura de imobilização, o pH da solução enzimática, a quantidade de enzima fixada em relação à diluição da solução enzimática e a influência da agitação relativo ao tempo de imobilização. Esse fato, pode estar relacionado com uma provável maior abrasão do suporte na forma pulverizada, porém estudos devem ser realizados com o objetivo de encontrar explicações satisfatórias para esse comportamento.

As tabelas 4.13 e 4.14 mostram a conversão específica

das enzimas imobilizadas, após 120 minutos da reação de sacari-
ficação do amido pela amiloglicosidase e de hidrólise de saca-
rose pela enzima invertase. Os resultados mostrados nas tabelas
são a média aritmética dos diversos ensaios realizados, sendo
verificado que esses resultados permaneceram aproximadamente
constantes para várias quantidades de enzimas fixadas.

Tipo de Suporte	Quantidade equivalente de enzima fixada (mg/ml)	Conversão (%)	Conversão específica (%/mg enz.) $\times 10^{-3}$	Nº de vezes que a conversão específica da enzima imobilizada foi menor que a livre
NMA-Põ	0,137	69,7	0,509	9,8
NMA-D	0,112	53,0	0,473	10,5
U/F-Põ	0,133	63,5	0,477	10,5
U/F-D	0,110	49,5	0,450	11,1

Tabela 4.13 - Conversão do amido em glicose para 120 minutos de sacari-
ficação. Condições da imobilização: pH 4,0; temperatura ambiente;
diluição da solução de enzima: 1:1000; tempo de imobilização:
10h. Condições da reação: pH 4,0; temperatura: 60°C; solução
de amido 1,6% p/V.

Tipo de Suporte	Quantidade equivalente de enzima fixada (mg/ml)	Conversão (%)	Conversão específica (%/mg enz.) $\times 10^{-3}$	Nº de vezes que a conversão específica da enzima imobilizada foi menor que a livre
NMA-Põ	0,110	50,9	0,463	8,2
NMA-D	0,095	40,0	0,421	9,0
U/F-Põ	0,107	45,8	0,428	8,9
U/F-D	0,093	38,1	0,409	9,3

Tabela 4.14 - Conversão da sacarose em glicose para 120 minutos de hidróli-
se. Condições da imobilização: pH 4,0; temperatura ambiente;
diluição da enzima: 1:800; tempo de imobilização: 10h. Condi-
ções da reação: pH 5,0; temperatura: 50°C; solução de sacaro-
se 0,1M.

As figuras 4.7 e 4.8 mostram a conversão do amido em glicose e a hidrólise da sacarose em glicose, em função do tempo de reação para as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, respectivamente. Como era de se esperar, verificou-se que os suportes que apresentaram maiores quantidades de enzimas fixadas, também apresentaram maiores conversões.

Nas tabelas 4.13 e 4.14, anteriormente citadas, verifica-se que as conversões específicas foram bastante inferiores àquelas obtidas para as enzimas em fase líquida (ver tabelas 4.3 e 4.4). Essa constatação nos levou a concluir que, para os quatros tipos de suportes testados, há um grande número de moléculas de enzimas que são desativadas pelo próprio processo de fixação. Esse resultado já foi confirmado num grande número de trabalhos já publicados ^{20,62,74,79,87,108,115}. Observou-se também que os suportes na forma de pó, que apresentaram maiores quantidades de enzimas fixadas, mostraram uma maior conversão específica.

A última coluna das tabelas 4.13 e 4.14 mostra que, para o caso da amiloglicosidase imobilizada, a conversão específica foi em torno de 10,5 vezes inferior a apresentada por essa enzima em fase líquida e para a invertase imobilizada esse valor foi em torno de 9,0 vezes inferior. Zanin¹¹⁶ obteve uma conversão específica 14 vezes inferior para a amiloglicosidase imobilizada em esferas de vidro silanizadas. Esses resultados levaram a concluir que é necessário utilizar uma quantidade muito maior de enzima imobilizada, em relação à usada em fase lí-

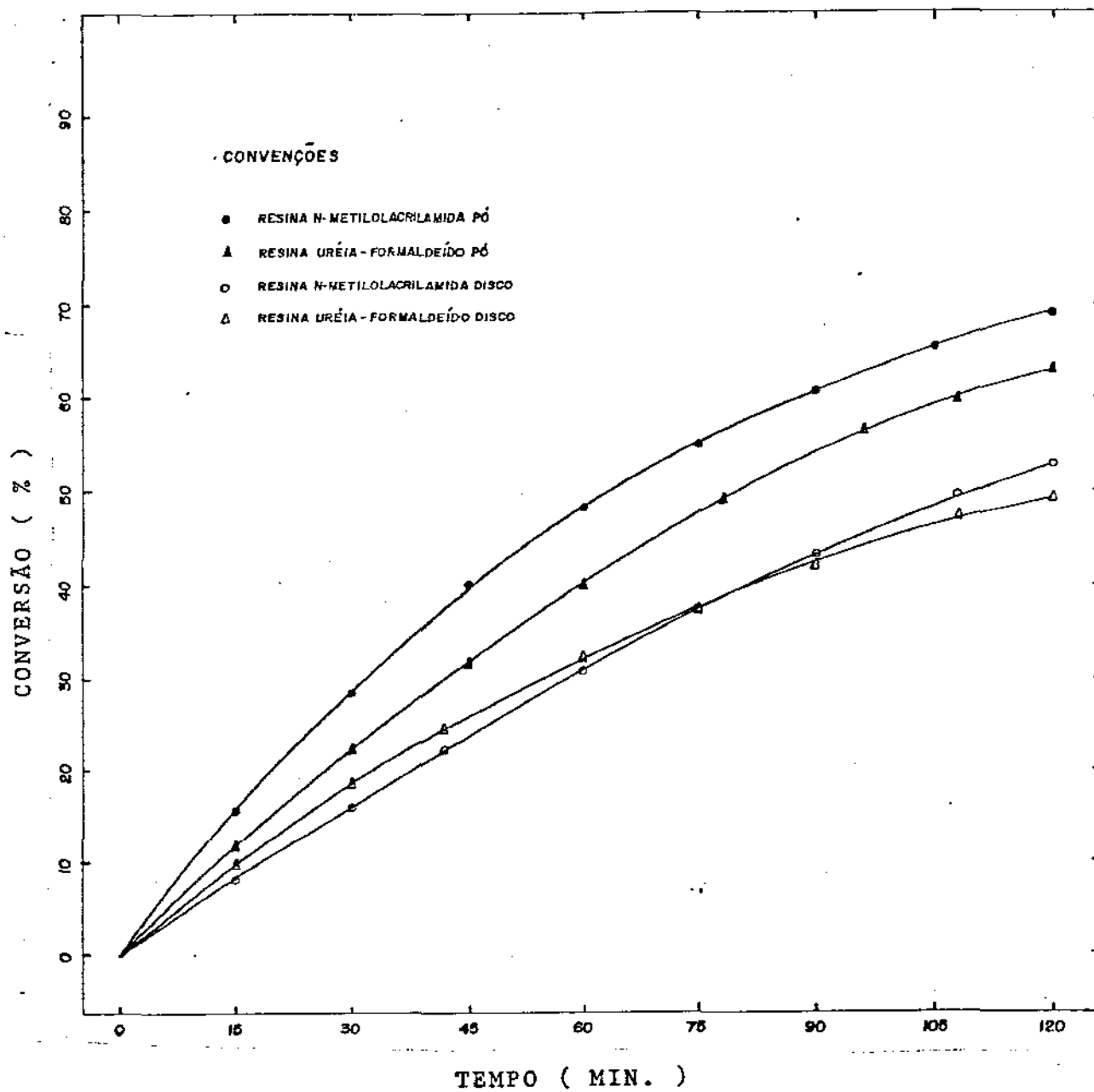


FIGURA 4.7

CONVERSÃO DO AMIDO EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SACARIFICAÇÃO (60°C e pH 4,0). ENZIMA IMOBILIZADA : AMILOGLICOSIDASE.

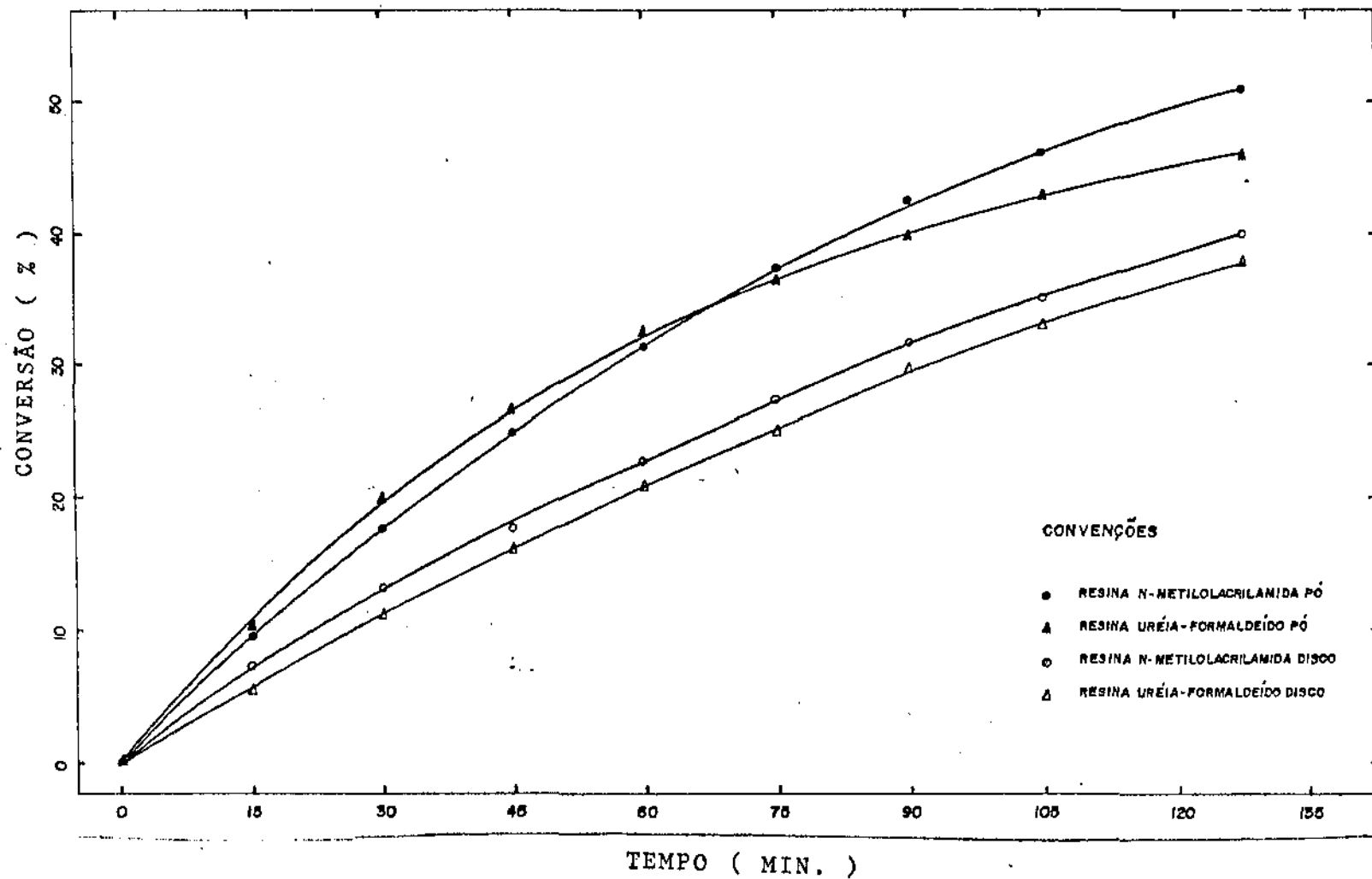


FIGURA 4.8

CONVERSÃO DE SACAROSE EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE
 (50°C e ph 5,0). ENZIMA IMOBILIZADA: INVERTASE.

quida, para obter-se o mesmo grau de conversão. Conseqüentemente deve-se fazer um estudo econômico do processo em questão, para verificar se uma longa estabilidade operacional do complexo suporte-enzima poderá compensar a queda na conversão da enzima imobilizada.

A tabela 4.15 mostra os parâmetros que foram fixados para a fase de imobilização das enzimas.

Parâmetros	Enzima amiloglicosidase	Enzima invertase
temperatura	ambiente (25-28°C)	ambiente (25-28°C)
pH	4,0	5,0
tempo	10h	10h
agitação	com agitação suave	com agitação suave
diluição	1:1000	1:800

Tabela 4.15 - Variáveis Fixadas para a Fase de Imobilização

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

As figuras 4.9 e 4.10 apresentam a influência da temperatura da solução de substrato na atividade enzimática. Verificou-se, para ambas enzimas imobilizadas, a existência de faixa ótima de temperatura, de 55 a 65°C para amiloglicosidase e de 45 - 55°C para a invertase, em contraste com as enzimas em fase líquida que apresentaram praticamente temperaturas ótimas (60°C para a amiloglicosidase e 50°C para a invertase). Isso pode ser explicado pelo fato da enzima, quando ligada ao suporte, ter restrições quanto aos seus movimentos, mantendo uma configuração do sítio ativo aproximadamente constante, o que as tornam menos sensíveis à mudanças de temperatura.

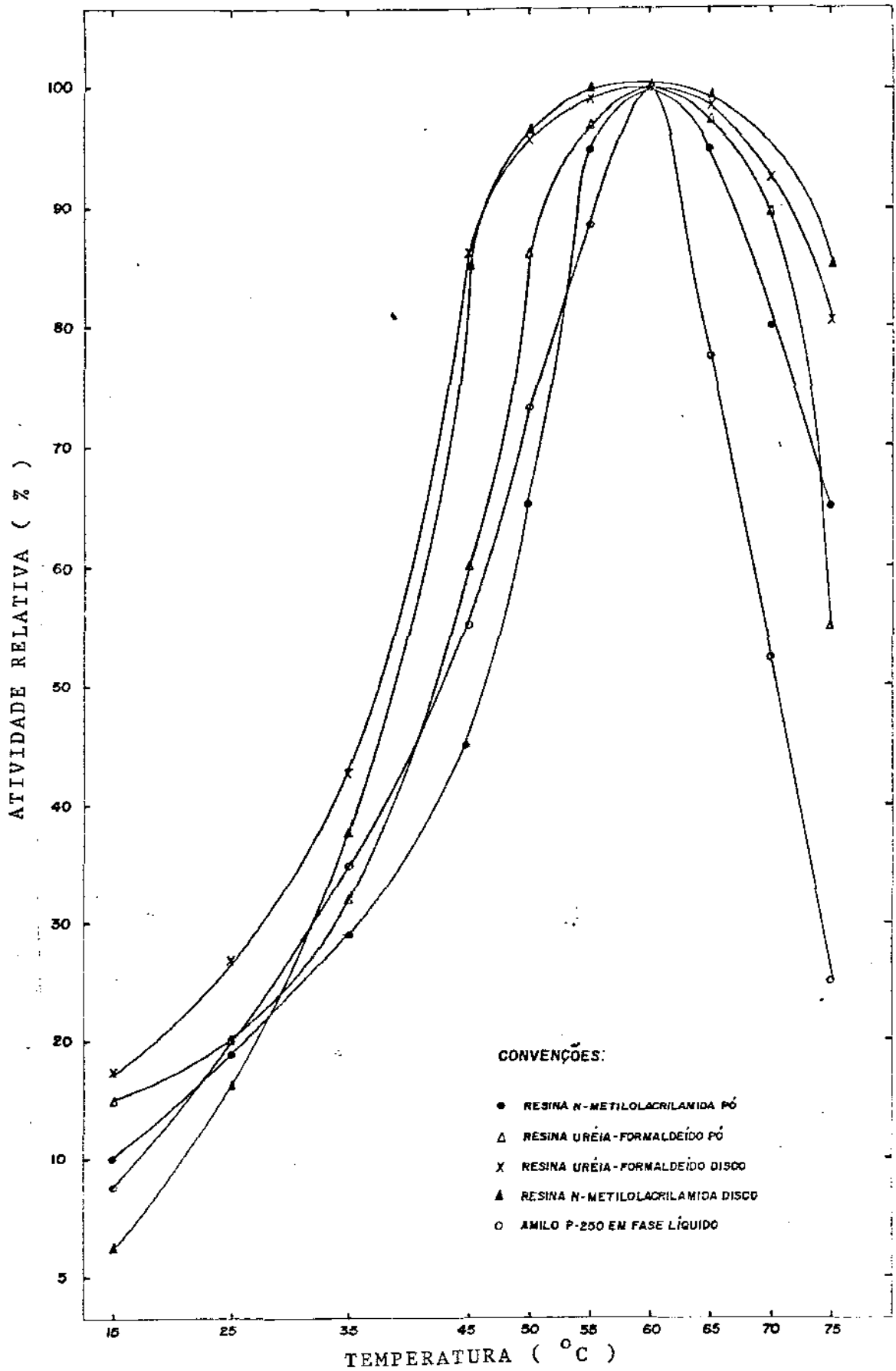


FIGURA 4.9

EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE RELATIVA (%) DA ENZIMA IMOBILIZADA AMILOGLUCOSIDASE. TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: 10h À TEMPERATURA AMBIENTE E pH DE REACÃO 4,0.

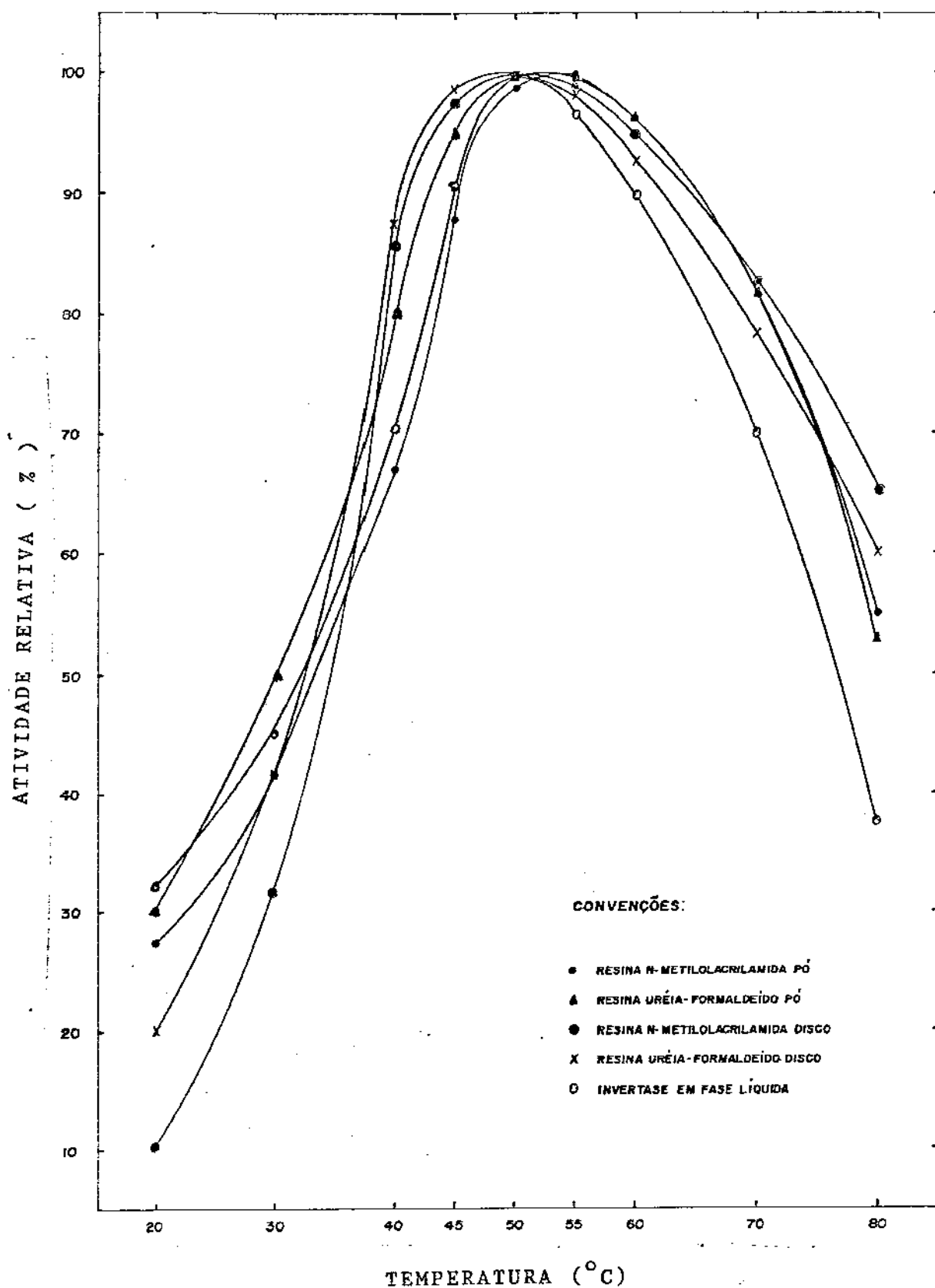


FIGURA 4.10

EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE RELATIVA (%) DA ENZIMA IMOBILIZADA INVERTASE. TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: 10h À TEMPERATURA AMBIENTE E NO pH 5,0.

Por outro lado, segundo Trevan¹⁰¹, esse argumento, embora bastante utilizado, é atualmente discutível, pois deve-se considerar a concentração de proteína e a limitação da difusão do substrato. Esses dois fatores serão discutidos com mais detalhes em item posterior.

As figuras 4.11 e 4.12 apresentam a influência do pH da solução substrato na atividade enzimática. Observou-se que as enzimas imobilizadas são ligeiramente menos sensíveis a mudanças de pH, que as enzimas em fase líquida. Segundo Trevan¹⁰¹, numa preparação com enzimas imobilizadas, onde a quantidade de enzima ativa por unidade de suporte polimérico é grande, pode ocorrer o fenômeno da limitação da difusão do substrato, que é o alargamento da curva de atividade contra o pH. Isso ocorre porque, se a atividade específica for alta, o gradiente da concentração de substrato próximo a partícula será alto e, conseqüentemente, o substrato não atingirá enzimas que estão mais no interior da partícula, por exemplo em um poro. Por outro lado, se ocorrer uma redução na atividade enzimática devido à mudanças no pH, o gradiente de concentração de substrato em torno da partícula torna-se menor, permitindo que o substrato atinja novas enzimas imobilizadas; assim mais enzimas tornam-se disponíveis ao substrato, aumentando aparentemente a concentração de enzima. Concluindo, estes dois fatores (diminuição da taxa de reação e aumento aparente da concentração de enzimas imobilizadas, devido à alterações de pH) agem, concomitantemente, moderando o efeito da mudança de pH.

Os resultados obtidos na análise da estabilidade tér-

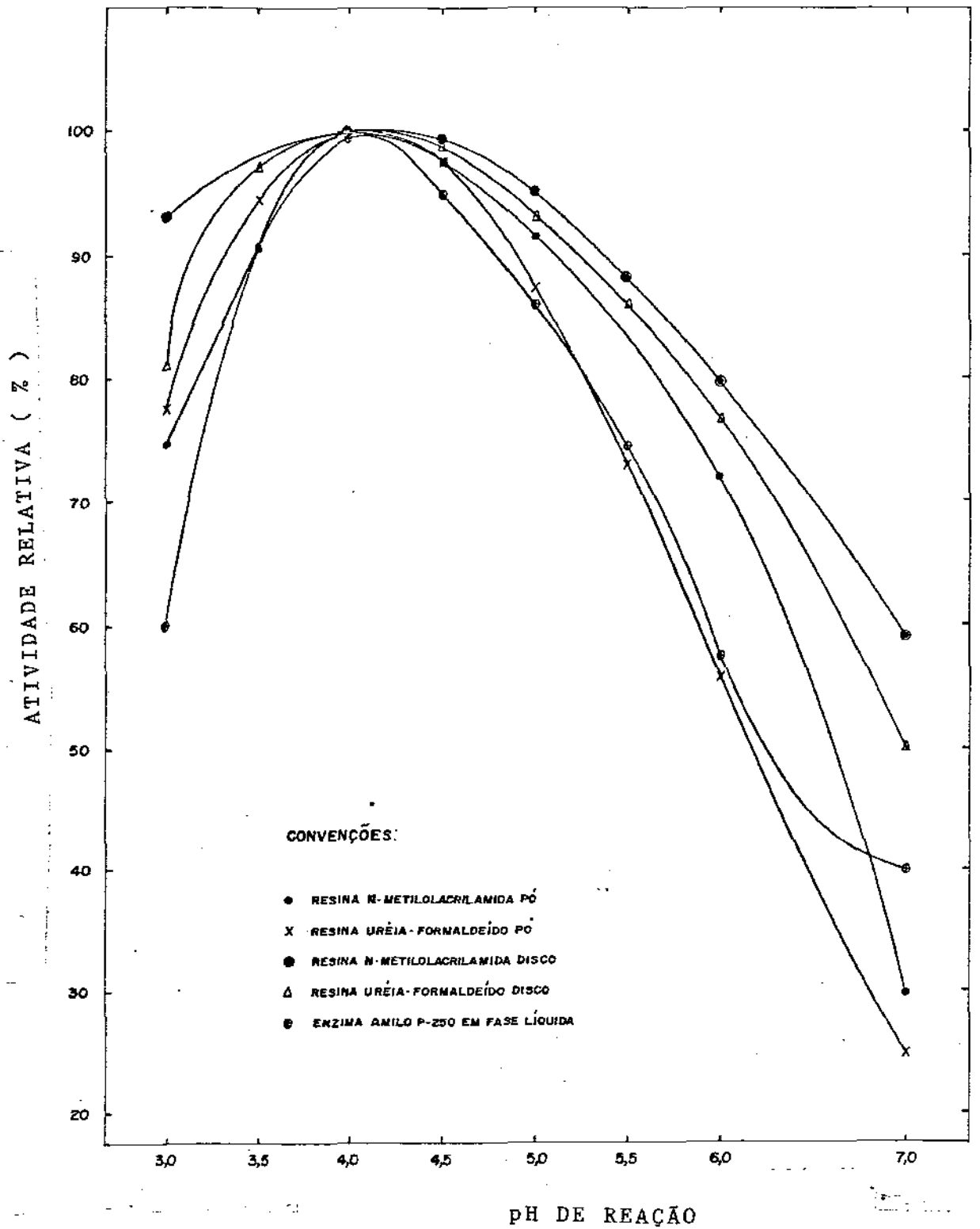


FIGURA 4.11

INFLUÊNCIA DO pH DA SOLUÇÃO SUBSTRATO NA ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA AMILOGLICOSIDASE. TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: 10h À TEMPERATURA AMBIENTE. TEMPERATURA DE REAÇÃO: 60°C.

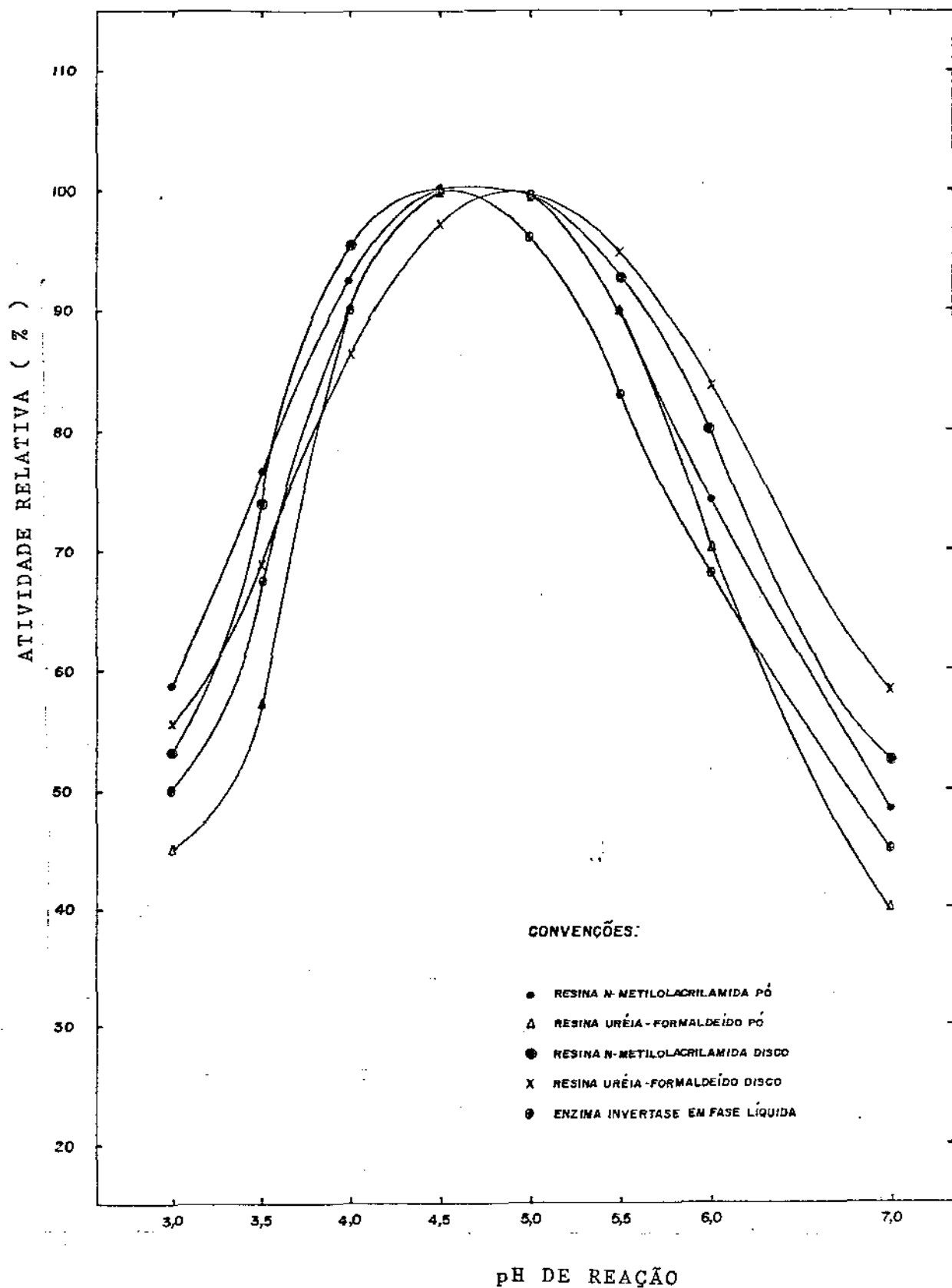


FIGURA 4.12

INFLUÊNCIA DO pH DA SOLUÇÃO SUBSTRATO NA ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA INVERTASE. TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: 10h À TEMPERATURA AMBIENTE. TEMPERATURA DE REAÇÃO: 60°C.

mica das enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, estão apresentados nas figuras 4.13 e 4.14, respectivamente. Observou-se que a 80°C, a atividade relativa para a amiloglicosidase imobilizada em suporte na forma de pó, diminui para aproximadamente 40% e na forma de disco para 50%, enquanto que para essa enzima em fase líquida, diminui para 2% nas mesmas condições. Para a enzima invertase a atividade relativa, na temperatura de 70°C, diminui para 41%, enquanto que para a fixada ela reduz para 65% e 75% nos suportes na forma de pó e disco, respectivamente. Segundo Martinek⁶⁵, Klibanov⁹¹ e Kiyokazy^{45,44}, a menor variação na atividade relativa das enzimas imobilizadas pode ser devida a pouca alterabilidade da conformação da mesma, devido a sua pouca mobilidade. Porém, para Trevan¹⁰¹, essa técnica não é suficiente para concluir que houve um aumento na estabilidade térmica das enzimas imobilizadas, pois, como já citado anteriormente, outros fatores, como concentração de enzimas e os efeitos de difusão, devem ser analisados. Estudos mais recentes¹⁰¹ têm demonstrado que, aumentando-se a concentração de enzima numa solução, pode-se obter um aumento em sua estabilidade. Assim, existem consideráveis dúvidas quanto à validade das comparações entre as estabilidades das enzimas em fase líquida e imobilizadas, pois as primeiras, normalmente, encontram-se em soluções bem diluídas, enquanto que as outras normalmente, apresentam-se numa concentração local relativamente alta. Por outro lado, essa alta concentração local de enzima faz com que as moléculas de substrato sejam convertidas em produto pelas enzimas que estão imobilizadas mais distantes da su-

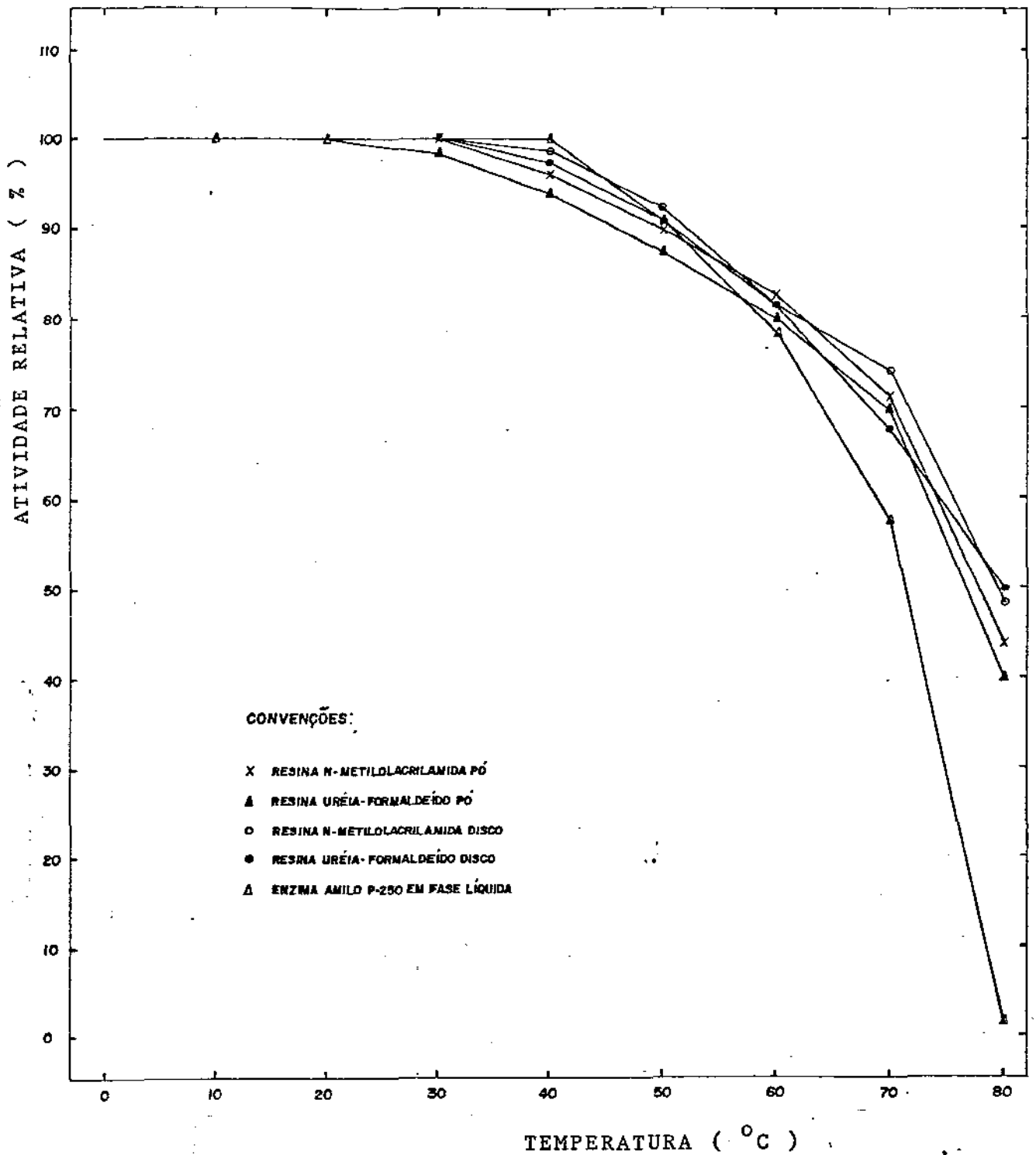


FIGURA 4.13

ESTABILIDADE TÉRMICA. ATIVIDADE RELATIVA (%) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA ENZIMA IMOBILIZADA AMILOGLUCOSIDASE. ENZIMA MANTIDA POR 60 MINUTOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO COM pH 4,0. CONDIÇÕES DE REAÇÃO: 60°C e pH 4,0.

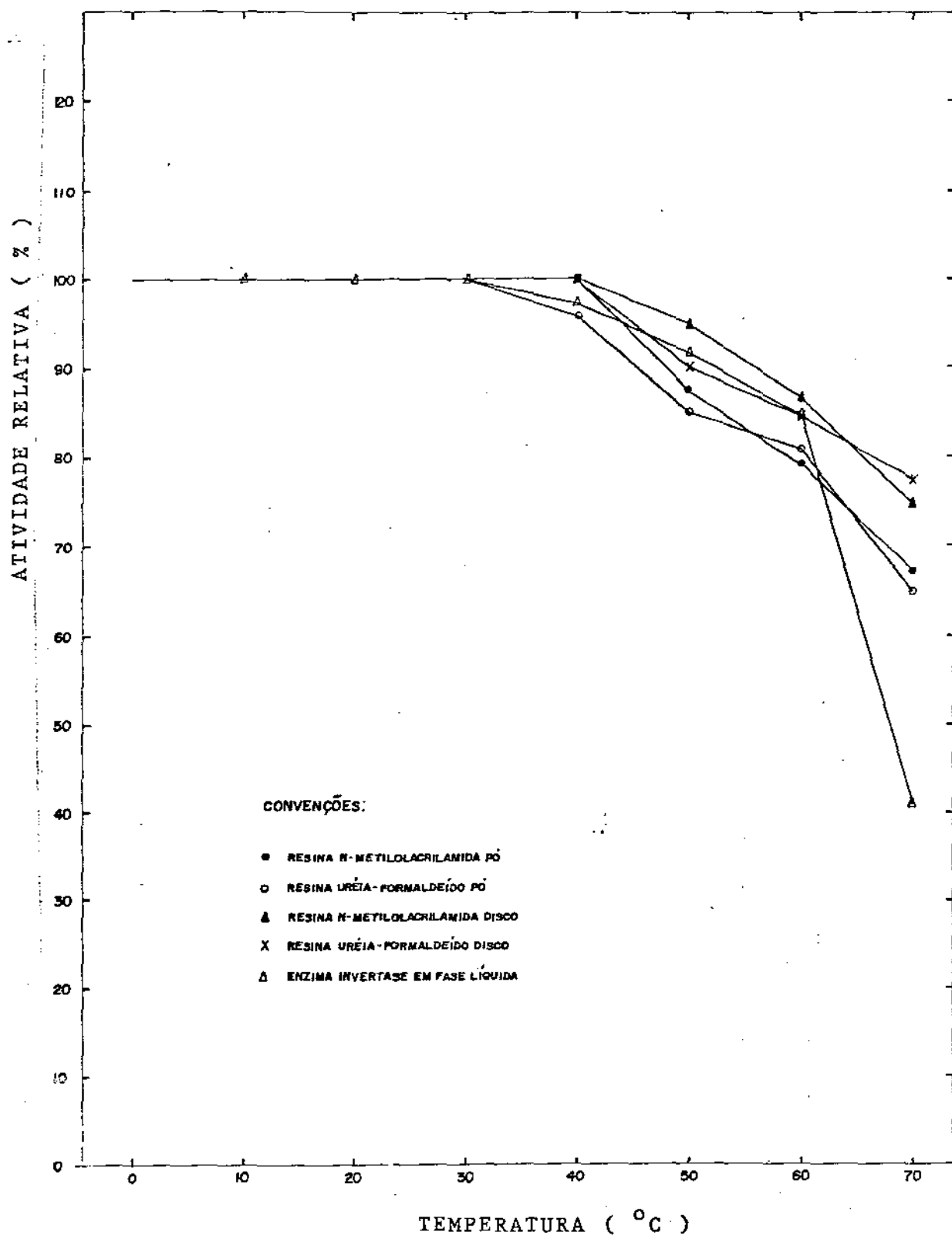


FIGURA 4.14

ESTABILIDADE TÉRMICA. ATIVIDADE RELATIVA (%) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA ENZIMA IMOBILIZADA INVERTASE. ENZIMA MANTIDA POR 60 MINUTOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO COM pH 5,0. CONDIÇÕES DE REAÇÃO: 50°C e pH 5,0.

superfície da partícula. Trevan¹⁰¹ afirma que, mesmo se parte das enzimas immobilizadas fossem inativadas (por exemplo por tratamento térmico), haveria enzimas suficientes no suporte, para converter todo o substrato que se aproximasse da partícula. Desse modo, a cinética da reação passa a ser controlada pela taxa de difusão do substrato no suporte, ao invés de pela atividade catalítica da enzima immobilizada.

As figuras 4.15 e 4.16 mostram a influência da força iônica da solução substrato na atividade da enzima immobilizada. Observa-se que, utilizando solução tampão, acetato de sódio-ácido acético, com concentração acima de 0,6M, a atividade relativa das enzimas immobilizadas diminuiu e a da solução sobrenadante começou a aumentar. Esse fato sugere que enzimas na forma ativa estão sendo liberadas do suporte para a solução sobrenadante. Por outro lado, parte das enzimas estão sendo desativadas, pois esse aumento foi menor que a queda da atividade das enzimas immobilizadas. Esse fato permite imaginar que o mecanismo de ligação da enzima no suporte, provavelmente, seja mais forte que a ligação através de adsorção, pois, em trabalhos que consideram esse mecanismo, as enzimas começaram a se desprender do suporte em valores bem menores de molaridade da solução tampão⁸². Porém, esse fato não indica a inexistência de enzimas ligadas ao suporte pelo mecanismo de adsorção.

As figuras 4.17 e 4.18 mostram a influência do número de bateladas na atividade da enzima immobilizada e quantifica a atividade das enzimas liberadas de seu suporte, em função do número de bateladas. O tempo para cada batelada foi de 30

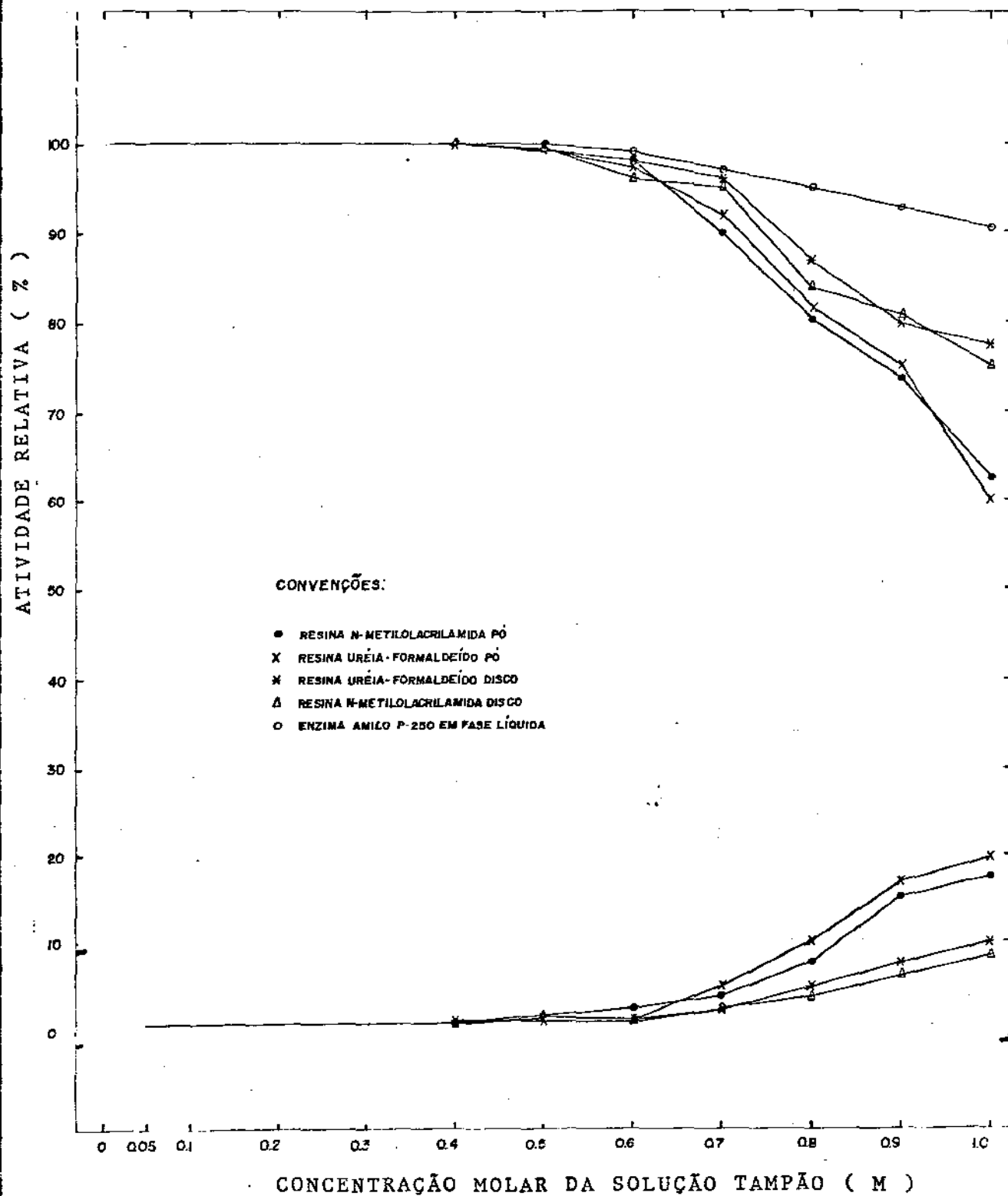


FIGURA 4.15

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DA SOLUÇÃO TAMPÃO NA ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA AMILOGLUCOSIDASE. CONDIÇÕES DE REAÇÃO: 60°C e pH 4,0.

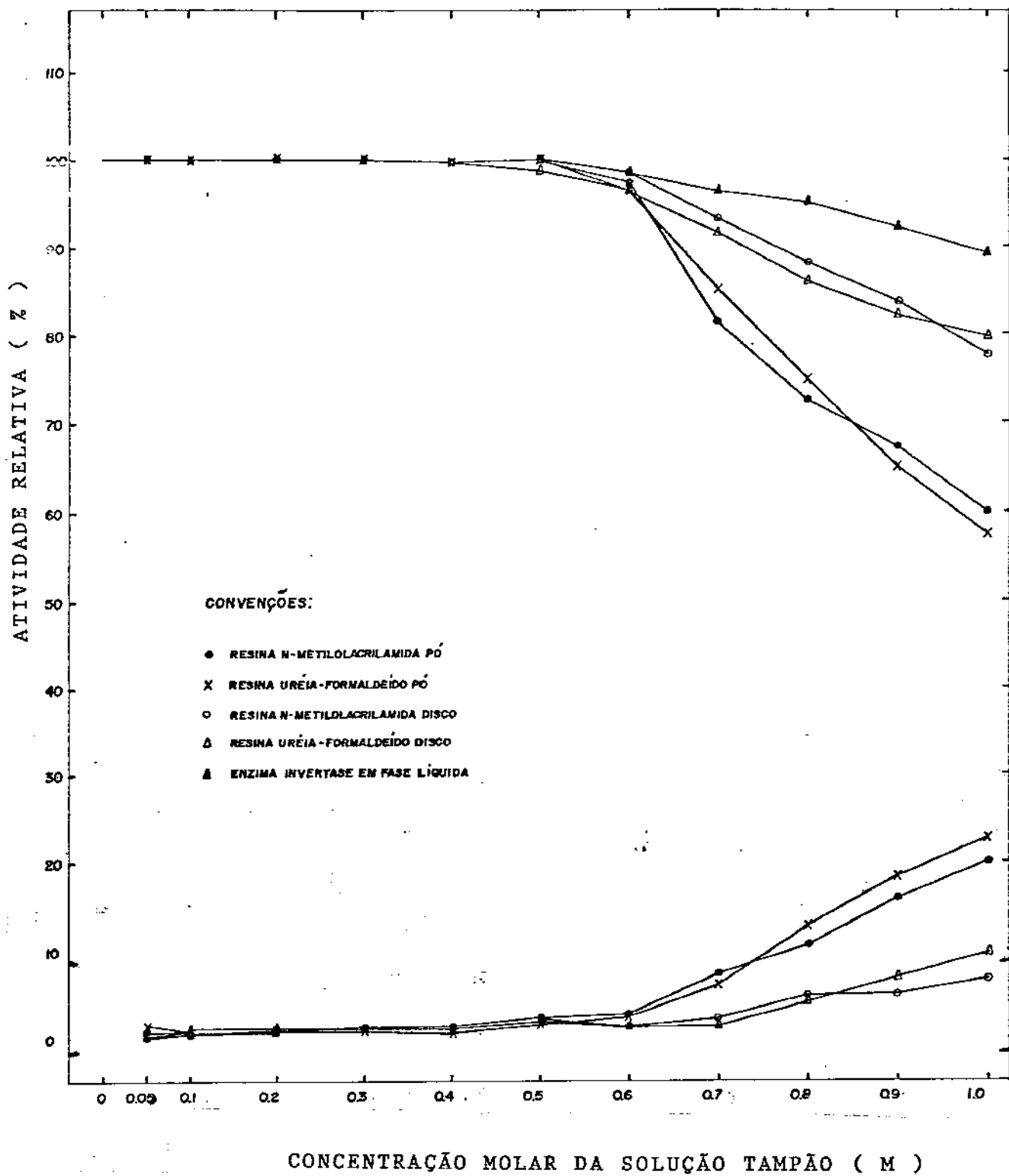


FIGURA 4.16

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DA SOLUÇÃO TAMPÃO NA ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA INVERTASE. CONDIÇÕES DE REAÇÃO: 50°C e pH 5,0.

minutos. Verificou-se que, para a amiloglicosidade imobilizada em suportes pulverizados e de discos, a atividade diminui para aproximadamente 80% e 85%, até a décima segunda e a nona batelada para as enzimas imobilizadas em suporte na forma de pó e de disco, respectivamente. Esses valores permaneceram constantes a partir destas bateladas. A figura 4.17, mostra também a atividade relativa das enzimas liberadas do suporte, expressa por B/A , onde B e A, são as concentrações de glicose presente, após cada ensaio, na mistura reacional isenta de suporte, depois de 24 horas na temperatura de atividade máxima para cada enzima, e depois de 5 minutos a 100°C, respectivamente. Portanto, o valor de B/A igual a unidade, significa que nenhuma enzima foi liberada do suporte. Porém, como pode ser verificado na figura 4.17, o valor da razão B/A foi maior que a unidade até a décima segunda batelada consecutiva, utilizando o suporte na forma de pó e até a nona batelada para o suporte na forma de disco. Esse valor permaneceu constante e igual à unidade a partir de então. Isso sugere que as quedas nas atividades relativas das enzimas imobilizadas nas primeiras bateladas são principalmente devido às liberações das enzimas provavelmente adsorvidas nos suportes.

Para a invertase, como mostra a figura 4.18, as atividades relativas reduziram-se a aproximadamente 90 e 95% e até a nona e a sexta batelada, para esta enzima fixada nos suportes na forma de pó e de disco, respectivamente. A razão B/A foi maior que a unidade para as nove e as seis primeiras bateladas, para a enzima fixada em suportes na forma de pó e de disco, respectivamente. Verifica-se, assim, que para a enzima inver

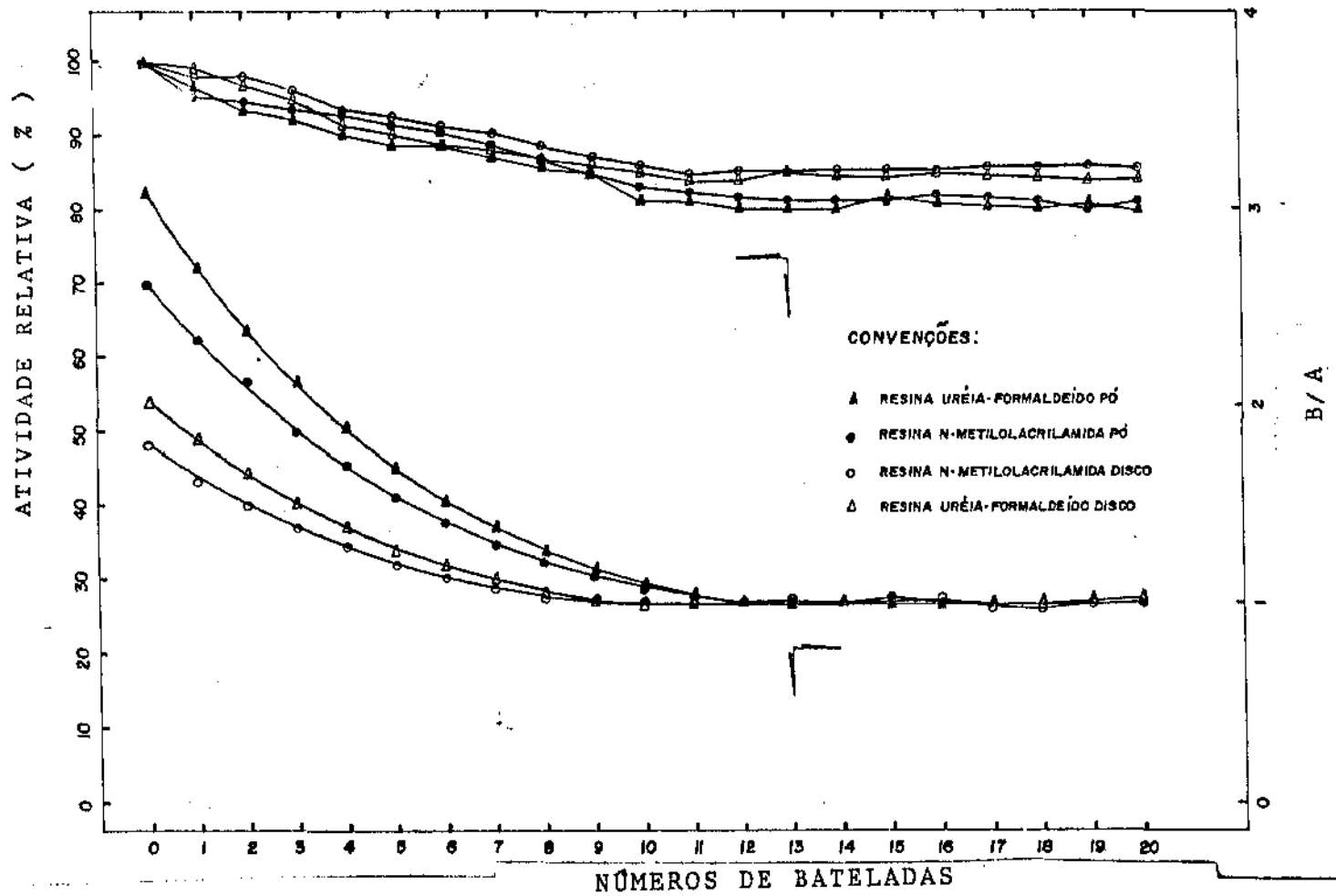


FIGURA 4.17

ESTABILIDADE DA ENZIMA AMILOGLICOSIDASE, RELATIVO AOS REPETIDOS USOS. TEMPO, TEMPERATURA E pH DE REAÇÃO PARA CADA BATELADA FORAM 30min., 60°C E 4,0, RESPECTIVAMENTE. [A] E [B] SÃO AS QUANTIDADES DE GLICOSE PRODUZIDA NA SOLUÇÃO SOBRENADANTE SEM A PRESENÇA DO COMPLEXO RESINA-ENZIMA APÓS 5 min. À 100°C E APÓS 24h À 60°C, RESPECTIVAMENTE.

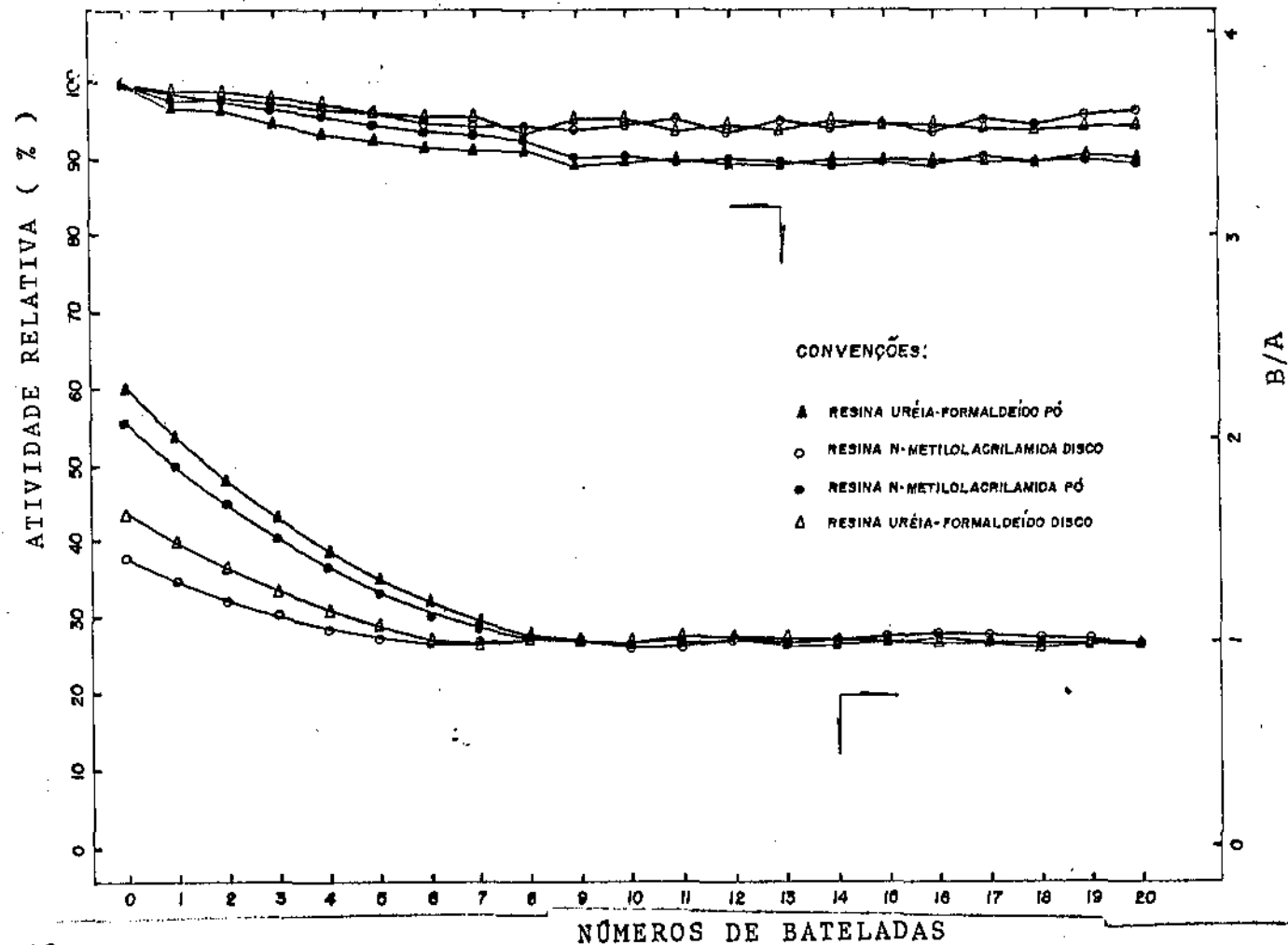


FIGURA 4.18

ESTABILIDADE DA ENZIMA INVERTASE, RELATIVO AOS REPETIDOS USOS. TEMPO, TEMPERATURA E pH DE REAÇÃO PARA CADA BATELADA FORAM 30 min., 50°C E 5,0, RESPECTIVAMENTE. [A] E [B] SÃO AS QUANTIDADES DE GLICOSE PRODUZIDA NA SOLUÇÃO SOBRENADANTE SEM A PRESENÇA DO COMPLEXO RESINA-ENZIMA APÓS 5 min. À 100°C E APÓS 24h À 50°C, RESPECTIVAMENTE.

case, tanto a razão B/A como a atividade relativa, variaram menos que para a amiloglicosidase. Esse fato sugere que a liberação da enzima invertase foi menor que a da amiloglicosidase. Isso, provavelmente, ocorreu devido à diferença de peso molecular da invertase (aproximadamente 27×10^4) e o da amiloglicosidase (em torno de 7×10^4). Imai e outros^{43 e 44} verificaram o mesmo fenômeno para as enzimas invertase e amiloglicosidase immobilizadas em membranas de álcool polivinílico. Esses autores também citam que Kawashima e outros⁵¹ observaram que proteínas de menor peso molecular se liberam mais facilmente dos suportes onde estão fixadas, do que as de alto peso molecular.

As figuras 4.19 e 4.20 mostram a influência da percentagem de retenção da resina no tecido, na atividade enzimática e na quantidade de enzima fixada.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na fixação de antígenos nesses suportes^{31 e 84}, mostrando que acima de 12% de retenção da resina no tecido, a atividade relativa foi máxima e se manteve constante para ambas as enzimas immobilizadas. Esses resultados sugerem que uma camada mais espessa de resina não deverá aumentar a quantidade de radicais livres e nem a área superficial externa, disponíveis à fixação das enzimas.

Os resultados apresentados nas figuras 4.21 e 4.22 mostram as quedas nas atividades das enzimas amiloglicosidase e invertase, respectivamente, immobilizadas nos quatro tipos de suporte em função do tempo de estocagem.

Na figura 4.21 verifica-se que, para a enzima amilo-

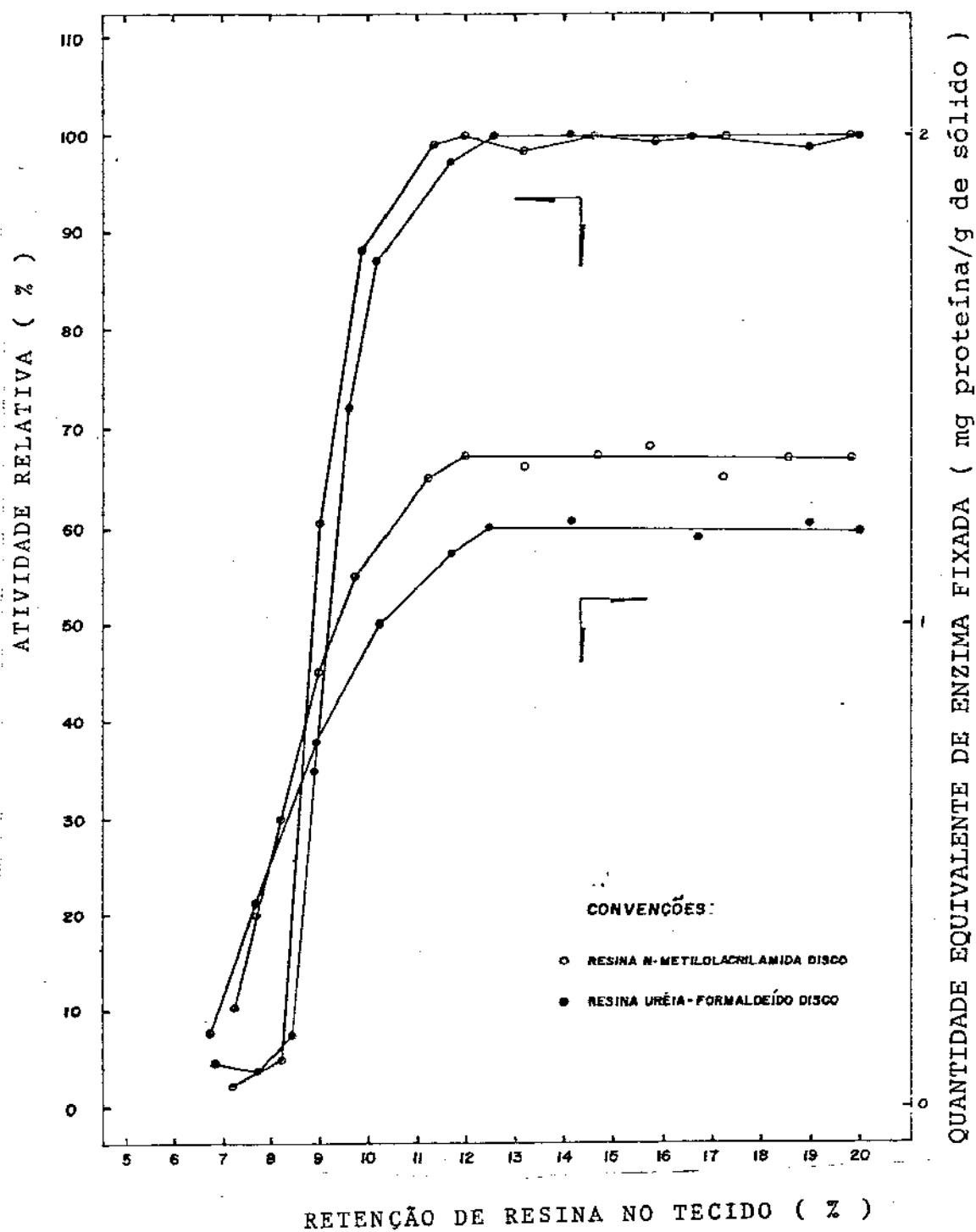


FIGURA 4.19

ATIVIDADE RELATIVA E QUANTIDADE DE ENZIMA FIXADAS NOS SUPORTES EM FUNÇÃO DA % DE RETENÇÃO DE RESINA NO TECIDO. ENZIMA AMILOGLICOSIDASE (60°C e $\text{pH } 4,0$).

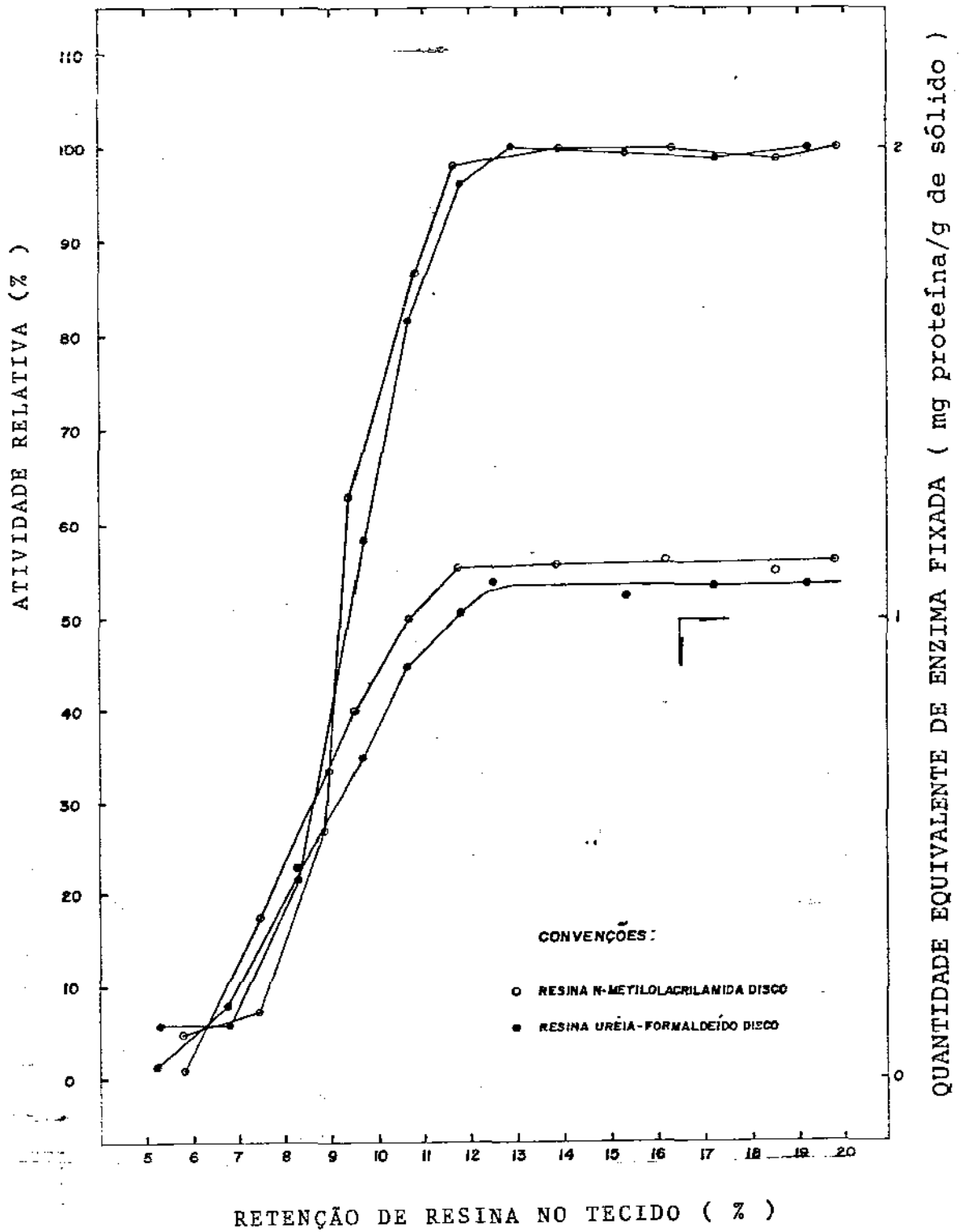


FIGURA 4.20

ATIVIDADE RELATIVA E QUANTIDADE DE ENZIMA FIXADAS NOS SUPORTES EM FUNÇÃO DA % DE RETENÇÃO DE RESINA NO TECIDO. ENZIMA INVERTASE (50°C e pH 5,0).

glicosidase nos suportes na forma de pó, a atividade relativa diminui para aproximadamente 76% até a segunda semana de estocagem, e atinge em torno de 67% na nona semana. Para os suportes na forma de disco as atividades reduzem até a segunda semana para aproximadamente 85% e atinge 73% na nona semana.

A figura 4.22 mostra que, para a invertase imobilizada em suportes pulverizados, as atividades relativas diminuíram para aproximadamente 80%, até a segunda semana, atingindo na nona semana o valor aproximado de 70%. Para os suportes na forma de disco, as atividades relativas atingem 87% na segunda semana e 80% na nona. Atribui-se que as quedas rápidas das atividades relativas sejam devido à liberação de enzimas dos suportes para a solução de estocagem⁴⁴ e ⁴⁵.

Outros trabalhos que estudaram as atividades relativas das enzimas invertase e amiloglicosidase imobilizadas em outros suportes, obtiveram uma redução desta em torno de 60%, para o mesmo período de tempo⁴³, ⁴⁴ e ⁴⁵. Essa redução foi maior que as obtidas nos suportes utilizados nesse trabalho. Por outro lado, como já citado, a enzima invertase, apresentou reduções nas atividades relativas menores do que a amiloglicosidase. Esse fato sugere que a observação de Kawashima⁵¹, anteriormente citada na página 151, foi verificada também no caso da estabilidade das enzimas imobilizadas relativa ao tempo de estocagem.

No estudo da caracterização das enzimas imobilizadas, foi verificado que os suportes na forma de disco apresentaram menor variação no valor da atividade enzimática, quanto às flutuações dos parâmetros analisados, tais como: temperatura, pH,

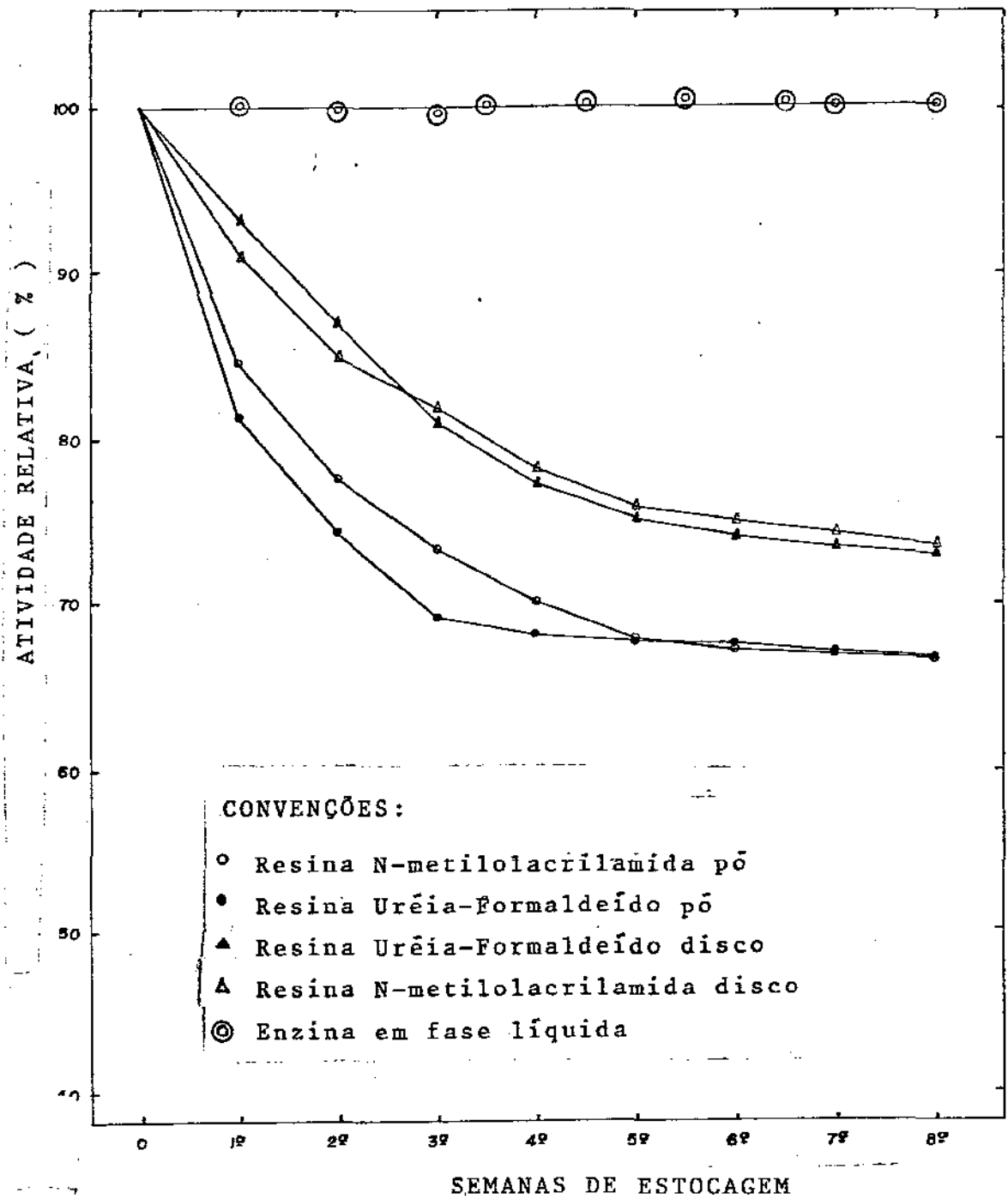


FIGURA 4.21

ATIVIDADE RELATIVA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM, UTILIZANDO AMILOGLICOSIDASE IMOBILIZADA. CONDIÇÕES DA REAÇÃO: 60°C e pH 4,0.

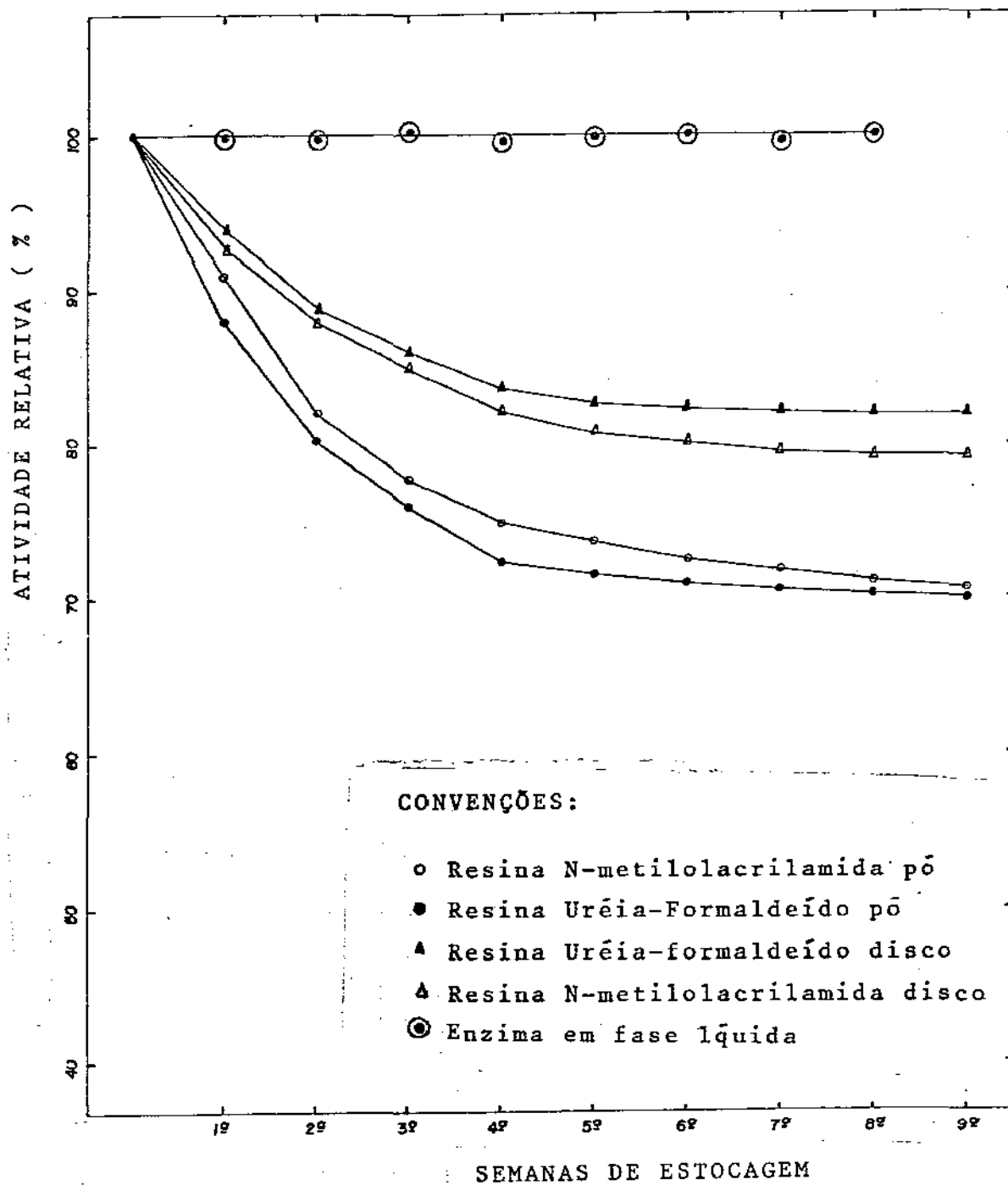


FIGURA 4.22

ATIVIDADE RELATIVA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM, UTILIZANDO INVERTASE IMOBILIZADA. CONDIÇÕES DA REAÇÃO: 50°C e pH 5,0.

estabilidade térmica, força iônica da solução substrato, número de bateladas e tempo de estocagem. Essa mesma observação, foi verificada também no processo de imobilização.

As figuras 4.23 e 4.24 representam os diagramas de Lineweaver-Burk para as enzimas amiloglicosidase e invertase, respectivamente, imobilizadas e em fase líquida. Foram utilizadas soluções de amido e da sacarose, nas faixas de concentrações de 0,125 a 2 mg/ml e de 0,05 a 0,3M, para a amiloglicosidase e invertase, respectivamente. A reação era conduzida à temperatura de 40°C, pH 4,5 em reator batelada, como pode ser visto nas figuras anteriormente citadas. Nessa faixa de concentração das soluções de substrato, os resultados experimentais, quando colocados no diagrama, apresentam um comportamento bastante próximo de uma função linear. Esse comportamento indica que a reação seguiu o mecanismo de Michaelis-Menten. As constantes aparentes de Michaelis K_m e as taxas máximas das reações $V_{m\acute{a}x}$ foram determinadas a partir dos diagramas para as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, e se encontram listadas nas tabelas 4.16 e 4.17, respectivamente.

As constantes aparentes de Michaelis, para as enzimas imobilizadas, apresentaram-se bem maiores do que para as mesmas em fase líquida. Esse fato mostra que a formação do complexo enzima-substrato é menos favorável na enzima imobilizada do que na em fase líquida^{43 e 44}. Segundo Imai^{43 e 44}, a concentração local da enzima imobilizada é maior, assim, a reação é, geralmente, governada pela difusão do substrato, como já discutido.

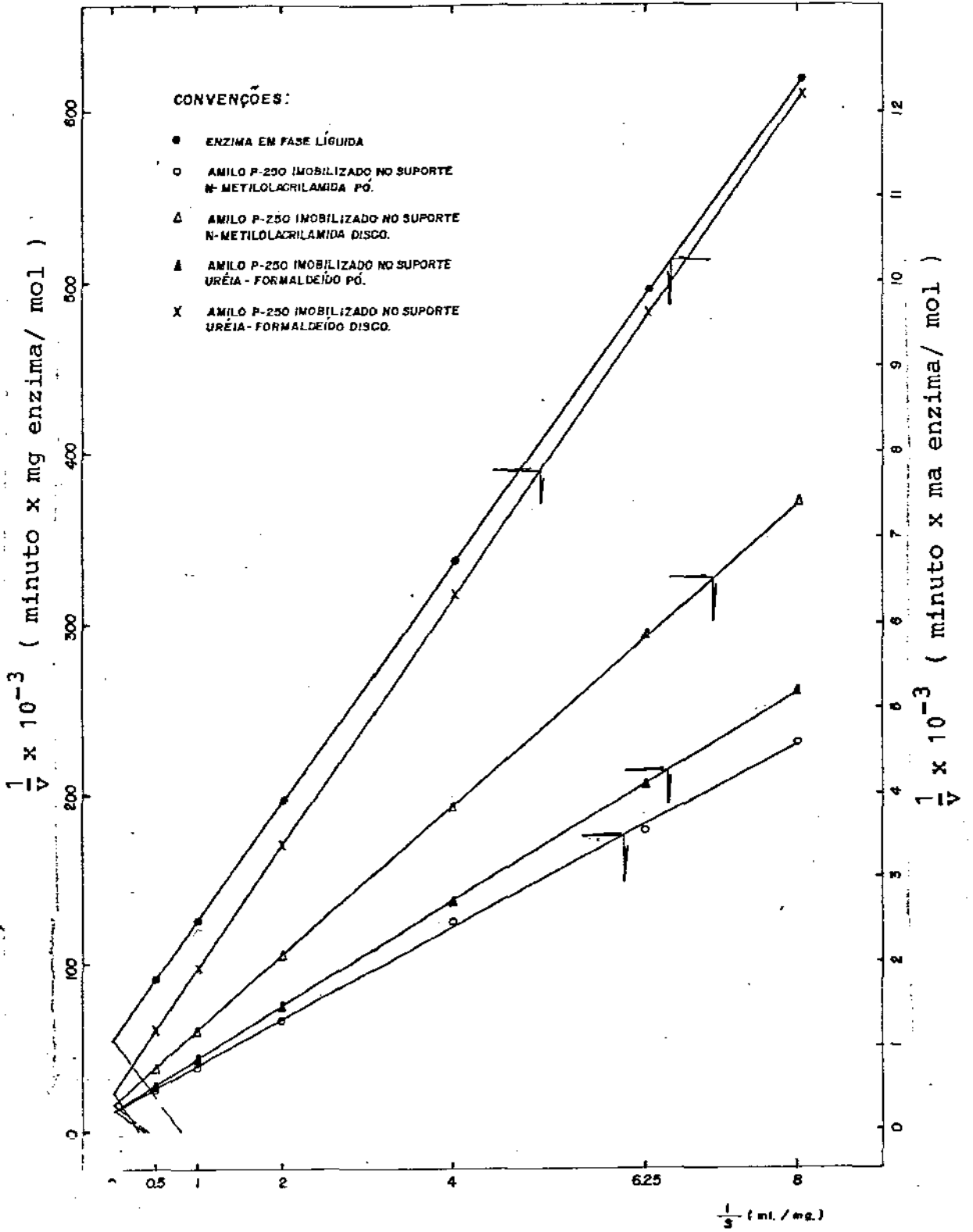


FIG. 4.23

DIAGRAMA DE LINEWEAVER-BURK, SACARIFICAÇÃO DO AMIDO COM A ENZIMA AMILOGLICOSIDASE, UTILIZANDO 30 MINUTOS DE REAÇÃO À TEMPERATURA DE 40°C E pH=4.5.

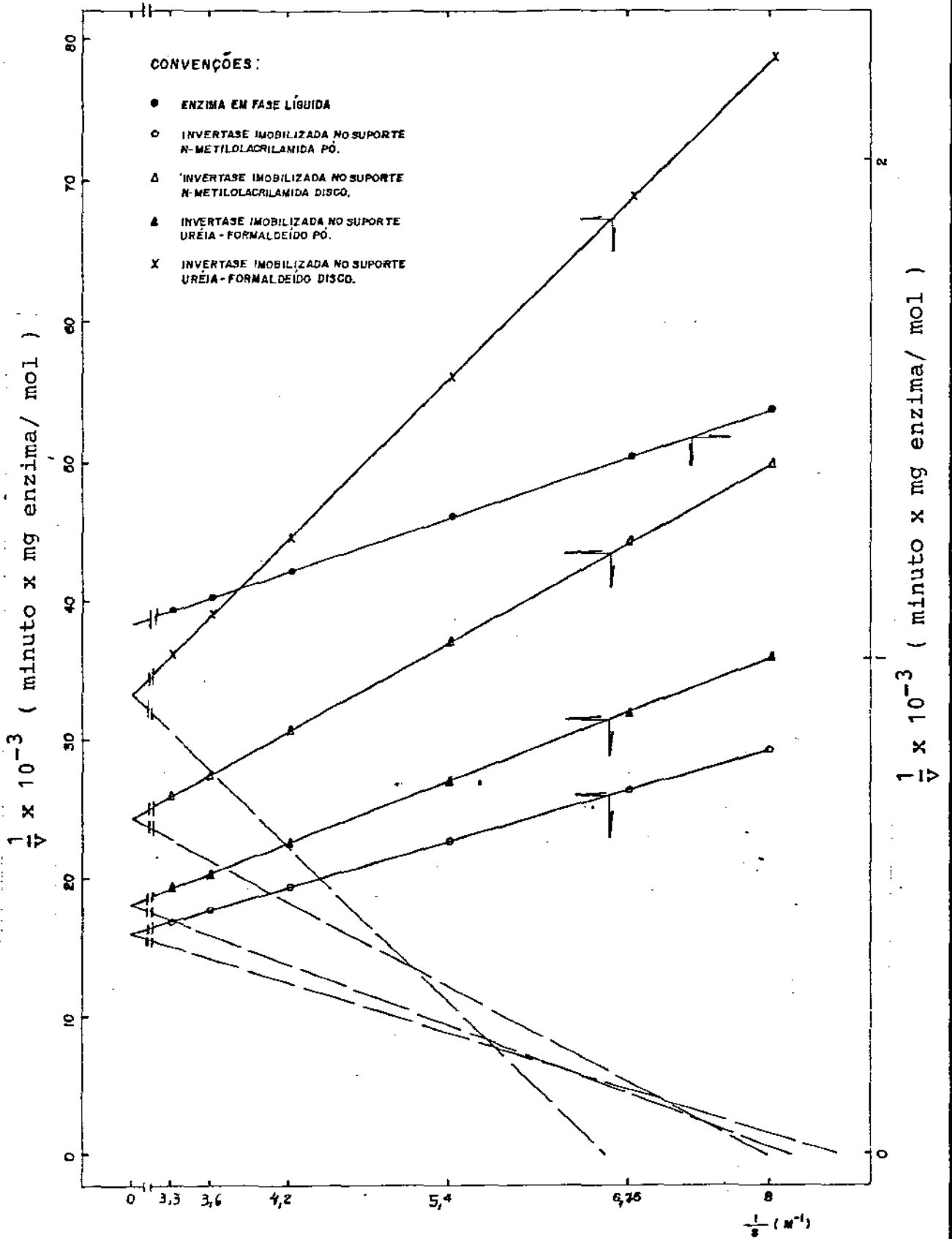


FIGURA - 4.24

DIAGRAMA DE LINEWEAVER-BURK, HIDROLISE DA SACAROSE COM A ENZIMA INVERTASE, UTILIZANDO 30 MINUTOS DE REAÇÃO A TEMPERATURA DE 40°C E pH=4.5.

Isso provoca um gradiente na concentração de substrato próximo ao suporte enzimático que é responsável pela baixa formação de complexo enzima-substrato, elevando assim o valor de K_m para as enzimas imobilizadas. A razão entre os valores de K_m para a enzima imobilizada e K_m para a enzima em fase líquida, no caso de invertase, variou de 2 a 3,4 e para a amiloglicosidase variou de 1,89 a 2,32. Utilizando a invertase fixada em outros tipos de suportes, vários pesquisadores apresentaram valores para a razão anteriormente definida, geralmente maiores que os obtidos nesse trabalho tais como: Imai⁴³ e⁴⁵ obteve 2,4 e 5,8 para dois tipos de suporte; Ribeiro⁸⁶ obteve 5,2; Monsan⁷³ 8,9 e Tanaka⁹⁹ obteve 4,76. Para a enzima amiloglicosidase os valores encontrados foram os seguintes: Imai⁴⁴ obteve 2,14 e 2,7; Maeda⁶⁰ encontrou 2,6; Baum⁶ 36,9 e 32,2; para dois tipos diferentes de suportes.

Enzima amiloglicosidase	K_m (mg / ml)	$V_{m\acute{a}x}$ (mol/minuto x mg de enzima) x 10^4
em fase líquida	1,25	8,89
imobilizada em NM-Pó	2,38	0,902
imobilizada em NMA-D	2,85	0,641
imobilizada em U/F-Pó	2,50	0,81
imobilizada em U/F-D	2,90	0,40

Tabela 4.16 - Parâmetros cinéticos da enzima amiloglicosidase em fase líquida e imobilizada, utilizando reator batelada.
Substrato: solução de amido solúvel; temperatura 40°C e pH 4,5.

Enzima invertase	Km (M)	V _m (mol/minuto x mg de enzima) x 10 ⁴
em fase líquida	0,05	9,30
imobilizada em NMA-Põ	0,10	0,62
imobilizada em NMA-D	0,13	0,41
imobilizada em U/F-Põ	0,12	0,55
imobilizada em U/F-D	0,15	0,30

Tabela 4-17 - Parâmetros cinéticos da enzima invertase em fase líquida e imobilizada, utilizando reator batelada. Substrato: solução de sacarose. Temperatura: 40°C e pH 4,5.

Observa-se, nas tabelas 4.16 e 4.17, que os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten V_m foram menores para as enzimas imobilizadas quando comparados com os das enzimas em fase líquida. Esse resultado também foi obtido por Imai^{43,44e45}, Mon-san⁷³, Maeda⁶⁰, Baum⁶, Tanaka⁹⁹, Usami e Kumatsu¹⁰⁴ e outros pesquisadores. Segundo Messing⁷¹, V_m é uma propriedade intrínseca da enzima e na sua determinação supõe-se que toda enzima se encontre na forma do complexo enzima-substrato. Assim, é possível que a queda de V_m, para as enzimas imobilizadas, seja devido ao fato de haver enzimas inativas que estejam ligadas aos suportes. Por outro lado, Trevan¹⁰¹ afirma que nem toda enzima imobilizada ativa forma o complexo enzima-substrato, devido às limitações da difusão do substrato.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO MICROREATOR DE LEITO FIXO EM FUNÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA

As figuras 4.25 e 4.26 mostram as curvas da razão entre a concentração do traçador na saída do reator para um determinado ponto de análise, e a concentração inicial (C/Co) em função da razão entre o tempo de residência no reator, medido no mesmo ponto, e o tempo de residência médio ($\theta/\bar{\theta}$), para o reator tipo leito fixo.

Os resultados são comparados com os modelos de reator ideal: a do reator tubular ideal (PRF), onde a difusão axial é nula ($Dl/u.l = 0$) e a do reator tanque agitado ideal (CSTR), onde a difusão axial é infinita ($Dl/u.l = \infty$). Dl é o coeficiente de difusão, u é a velocidade superficial de fluxo e l é a altura de leito catalítico.

Os pontos experimentais que se encontram expostos nas figuras, anteriormente citadas, não se adaptam exatamente e nenhum dos dois modelos dos reatores ideais citados. Isso significa que deve haver uma difusão axial finita e diferente de zero ao longo do leito fixo. Através de um programa computacional, foi obtida a curva da razão das concentrações (C/Co) em função da razão dos tempos de residência ($\theta/\bar{\theta}$) para diversos valores de Peclet ($Pe = u.l/Dl$). Verificou-se que as curvas, que mais se aproximaram dos pontos experimentais, foram as referentes a $Pe = 100$, para os suportes pulverizados e a $Pe = 60$ para os suportes discóides. Nota-se que, apesar de ocorrer uma pequena di

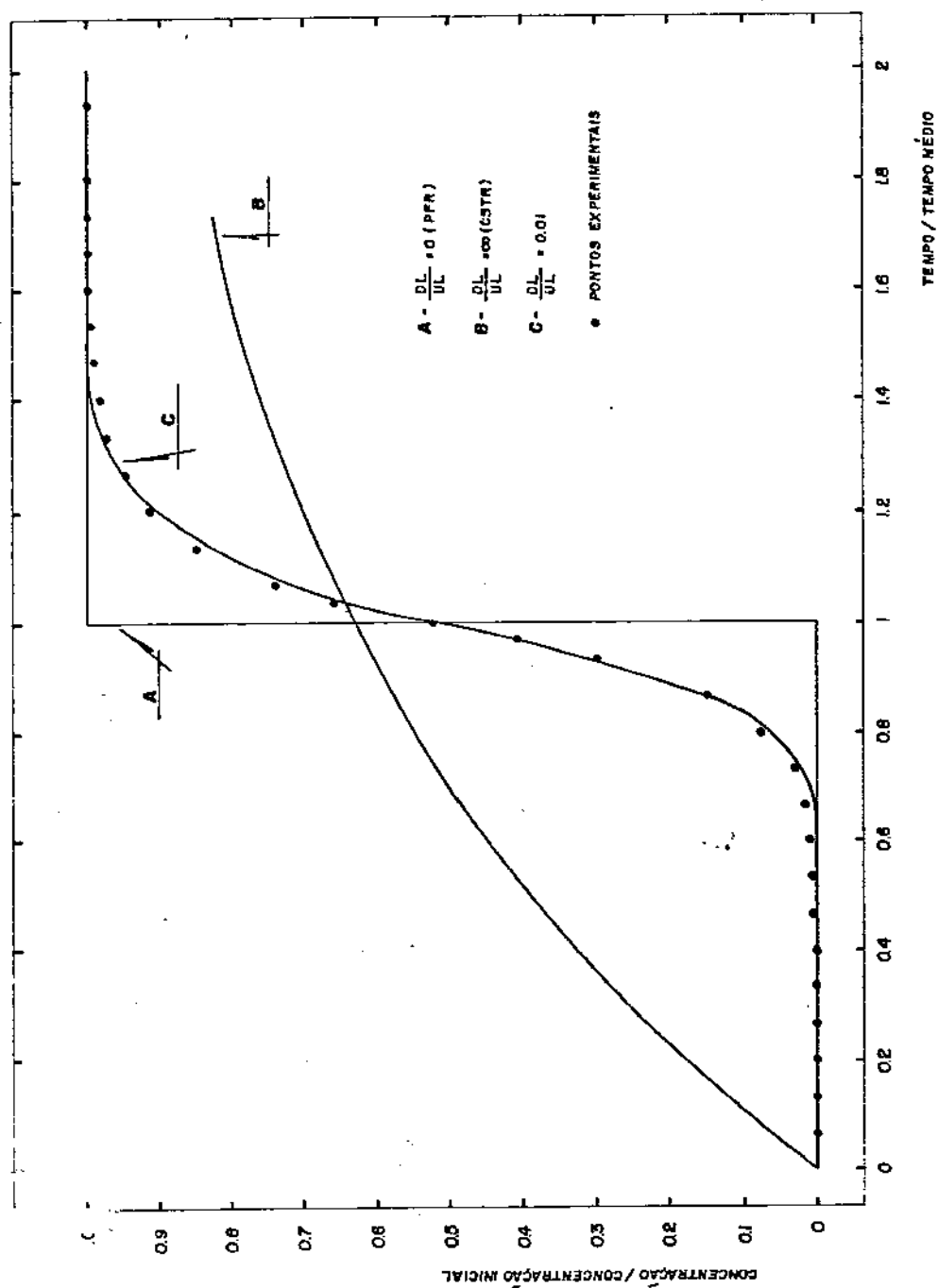


FIGURA - 4.25

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DOS DADOS EXPERIMENTAIS FRENTE AOS MODELOS
TEÓRICOS UTILIZANDO UM REATOR TUBULAR RECHEADO COM RESINA NA FORMA PÓ.

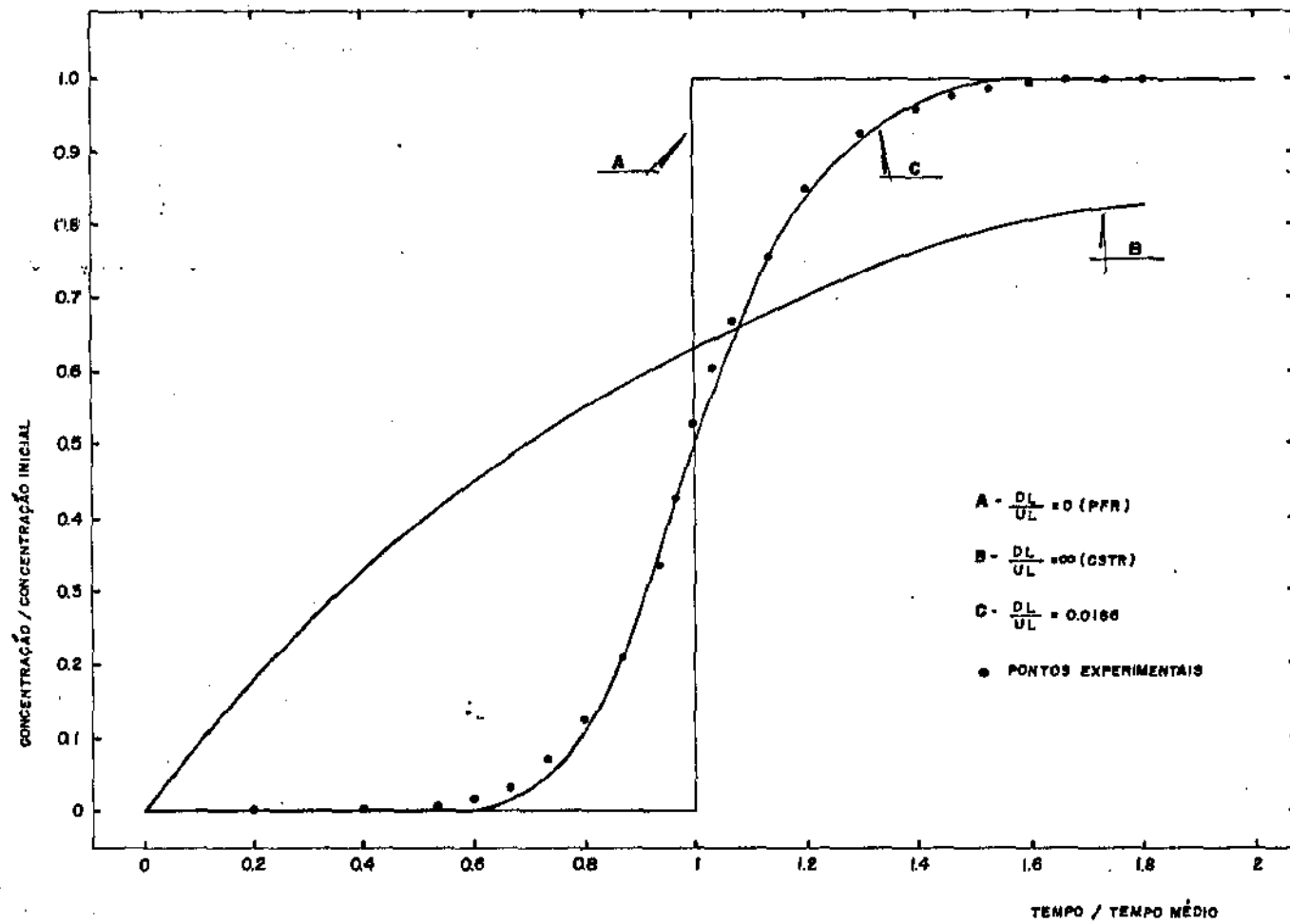


FIGURA - 4.26

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DOS DADOS EXPERIMENTAIS FRENTE AOS MODELOS TEÓRICOS UTILIZANDO UM REATOR TUBULAR RECHEADO COM RESINA NA FORMA DISCO.

fusão axial, o reator se comportou bem mais próximo de um reator tubular ideal do que do reator tanque agitado ideal. Assim, por aproximação, foi adotado o modelo de um reator tubular ideal para se estudar o desempenho do reator usado nos ensaios.

Um fato interessante que é observado nas figuras, mencionadas anteriormente, é que ocorre um maior desvio dos pontos experimentais em relação à curva teórica, nos extremos dessa, isso provavelmente ocorre devido a efeitos de mistura na entrada e saída do leito fixo.

4.7. ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE E DA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO, UTILIZANDO UM MICROREATOR DE LEITO FIXO, COM ENZIMAS IMOBILIZADAS.

Determinou-se a porosidade e a altura do leito fixo para cada suporte, obtendo-se para o suporte na forma de pó uma porosidade de aproximadamente 0,30 e uma altura de 95 mm. Para o suporte na forma de disco a porosidade foi de 0,40 e a altura de leito de 100 mm. O diâmetro interno do reator tubular foi de 9 mm.

As conversões, utilizando várias concentrações iniciais da solução de amido e de sacarose para a amiloglicosidase e invertase immobilizadas, respectivamente, foram determinadas para vários valores de velocidades superficiais de fluxo. Os resultados encontram-se nas tabelas: 4.22; 4.23; 4.24; 4.25; 4.26; 4.27; 4.28 e 4.29.

As figuras 4.27 e 4.28 mostram o aspecto das curvas

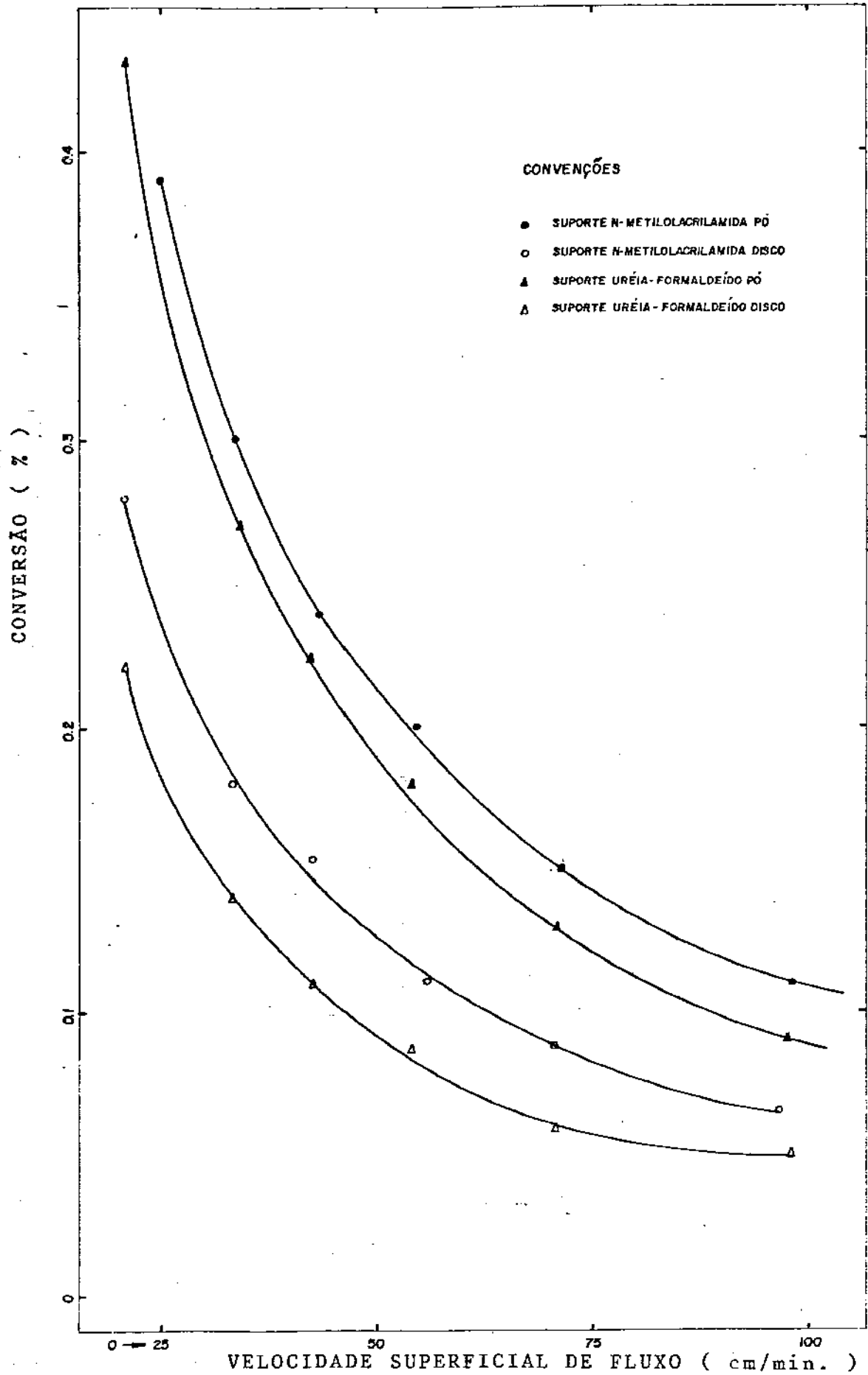


FIGURA 4.27

CONVERSÃO DO AMIDO EM GLICOSE EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE SUPERFICIAL DE FLUXO V_l (cm/min.) A 40°C e pH 4,5, UTILIZANDO SOLUÇÃO DE AMIDO COM CONCENTRAÇÃO DE 1mg/ml.

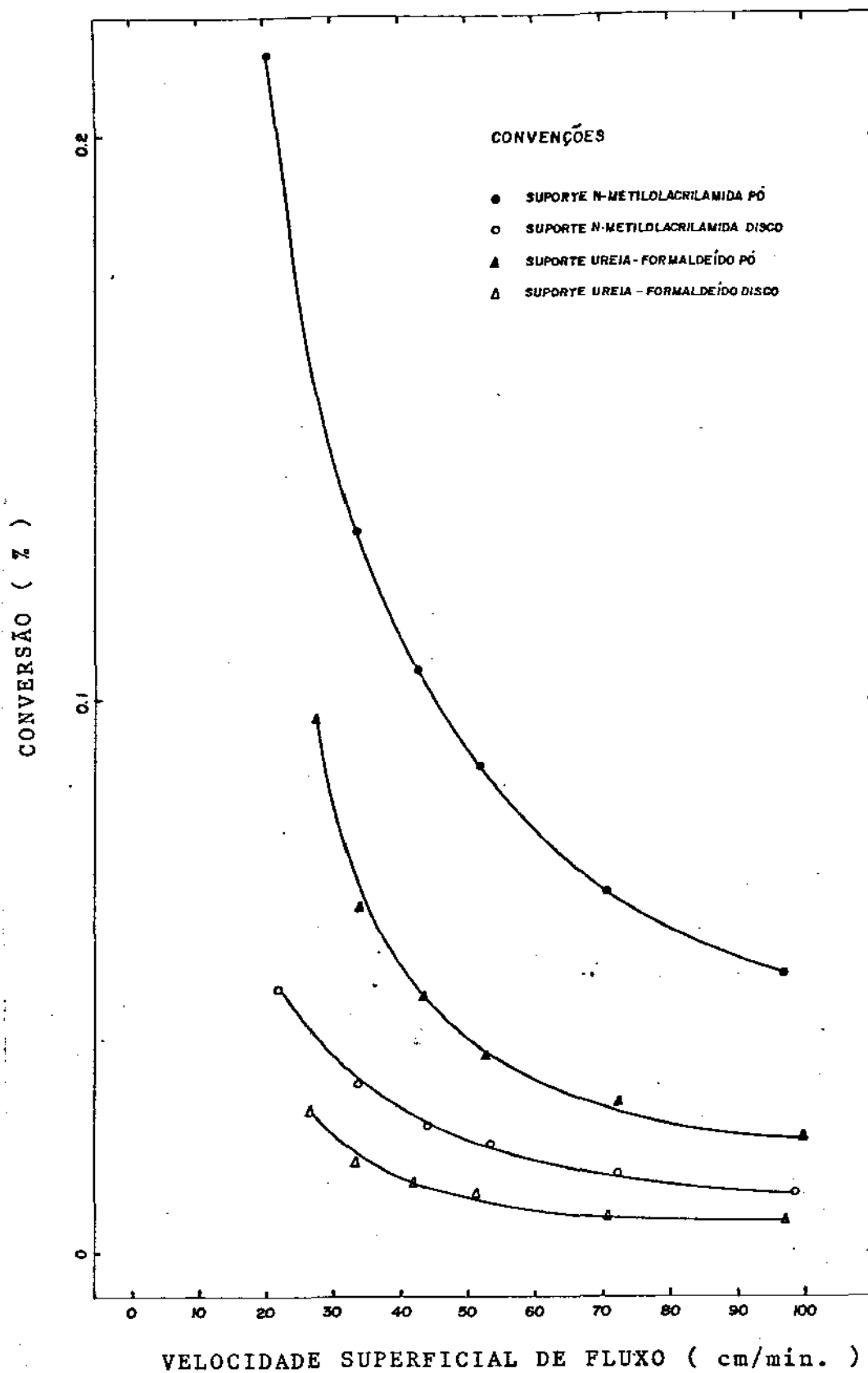


FIGURA 4.28

CONVERSÃO DA SACAROSE EM GLICOSE EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE SUPERFICIAL DE FLUXO v_1 (cm/min.) A 40°C e $\text{pH } 4,5$, UTILIZANDO SOLUÇÃO DE SACAROSE $0,1\text{M}$.

de conversão em função da velocidade superficial de fluxo, para o suporte N-metilolacrilamida pô com as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, respectivamente. Os demais suportes apresentaram o mesmo comportamento do anterior.

Nas tabelas 4.22 a 4.29, verifica-se que em operação contínua, no reator de leito fixo, as conversões dos substratos em produto diminuíram com o aumento da velocidade superficial de fluxo. Esse fato já era esperado, pois ocorreu uma diminuição do tempo de contato substrato-enzima. Verifica-se também que, para os valores de velocidades superficiais de fluxos menores que 55 cm/minuto, houve um aumento acentuado nas conversões, indicando um tempo de residência adequado para atingir maiores conversões. Assim, no estudo da estabilidade operacional procurou-se utilizar uma velocidade superficial em torno de 30 cm/minuto a 35 cm/minuto. Resultados semelhantes foram obtidos por Martesson, utilizando a enzima β -amilase imobilizada em copolímeros acrilados⁶⁴ e por Ribeiro, utilizando invertase em resina duolite⁸⁶.

Como mostrado no capítulo dois, através da Equação 2.11 pode-se determinar a constante cinética de Michaelis - Menten K_m , e a taxa máxima de reação $V_{m\acute{a}x}$, através dos coeficientes angular e linear dividido pela altura do leito fixo e multiplicado pela velocidade superficial de fluxo, da reta da concentração do produto na saída do reator ($S_o.f_a$) em função de $\ln(1-f_a)$.

Os valores de $S_o.f_a$ e de $\ln(1-f_a)$ encontram-se listados nas tabelas 4.22; 4.23; 4.24; 4.25; 4.26; 4.27; 4.28 e 4.29,

Velocidade Superficial de fluxo (cm/minuto)	So (mg/ml)	fa	So.f _a (mg/ml)	ln(1-f _a)	K _m (mg/ml)	V _{máx} (mol/mg x minuto)	Coefficiente de correlação
24,7	0,125	0,338	0,042	-0,412	1,997	$0,947 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,335	0,054	-0,408			
	0,250	0,326	0,082	-0,395			
	0,500	0,300	0,150	-0,357			
	1,000	0,260	0,260	-0,301			
	2,000	0,205	0,410	-0,229			
33,7	0,125	0,237	0,030	-0,270	1,939	$0,815 \times 10^{-4}$	0,985
	0,160	0,234	0,037	-0,267			
	0,250	0,226	0,057	-0,256			
	0,500	0,200	0,100	-0,223			
	1,000	0,178	0,178	-0,196			
	2,000	0,137	0,274	-0,147			
43,1	0,125	0,211	0,026	-0,237	2,027	$0,970 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,208	0,033	-0,233			
	0,250	0,201	0,050	-0,224			
	0,500	0,184	0,092	-0,203			
	1,000	0,157	0,157	-0,171			
	2,000	0,121	0,242	-0,129			
54,7	0,125	0,164	0,021	-0,179	2,159	$0,984 \times 10^{-4}$	0,998
	0,160	0,162	0,026	-0,177			
	0,250	0,156	0,039	-0,170			
	0,500	0,143	0,072	-0,154			
	1,000	0,123	0,123	-0,131			
	2,000	0,095	0,190	0,100			
71,7	0,125	0,136	0,017	-0,146	1,948	$0,922 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,134	0,021	-0,144			
	0,250	0,129	0,032	-0,138			
	0,500	0,116	0,058	-0,123			
	1,000	0,098	0,098	-0,103			
	2,000	0,073	0,146	-0,076			
97,8	0,125	0,102	0,013	-0,108	1,879	$0,942 \times 10^{-4}$	0,998
	0,160	0,101	0,016	-0,106			
	0,250	0,097	0,024	-0,102			
	0,500	0,087	0,044	-0,091			
	1,000	0,072	0,072	-0,075			
	2,000	0,055	0,110	-0,057			

TABELA 4.22

Concentração de glicose, $S_o.f_a$ (mg/ml), na saída de leite, fixo em função de $\ln(1-f_a)$, para vários valores da velocidade superficial de fluxo, V_L (cm/minuto), utilizando a enzima amiloglicosidase imobilizada na resina N-metilolacrilamida pó. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m (mg/ml) e $V_{máx}$ (mol/minuto x mg enzima), em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	So (mg/ml)	fa	So.f _a (mg/ml)	ln(1-f _a)	K _m (mg/ml)	V _m x (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,7	0,125	0,220	0,028	-0,248	2,353	0,628 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,217	0,035	-0,245			
	0,250	0,212	0,053	-0,238			
	0,500	0,196	0,099	-0,218			
	1,000	0,171	0,171	-0,188			
	2,000	0,135	0,270	-0,145			
33,5	0,125	0,143	0,018	-0,154	2,683	0,718 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,141	0,023	-0,152			
	0,250	0,138	0,035	-0,149			
	0,500	0,128	0,064	-0,137			
	1,000	0,112	0,112	-0,119			
	2,000	0,09	0,180	-0,094			
42,5	0,125	0,111	0,014	-0,118	2,440	0,636 x 10 ⁻⁴	0,998
	0,160	0,110	0,018	-0,117			
	0,250	0,107	0,027	-0,113			
	0,500	0,098	0,049	-0,103			
	1,000	0,085	0,085	-0,089			
	2,000	0,066	0,132	-0,068			
55,7	0,125	0,090	0,011	-0,094	2,361	0,645 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,089	0,014	-0,093			
	0,250	0,086	0,022	-0,090			
	0,500	0,079	0,040	-0,082			
	1,000	0,068	0,068	-0,070			
	2,000	0,053	0,106	-0,054			
70,5	0,125	0,068	0,009	-0,070	2,583	0,663 x 10 ⁻⁴	0,998
	0,160	0,067	0,011	-0,069			
	0,250	0,065	0,016	-0,067			
	0,500	0,060	0,030	-0,062			
	1,000	0,052	0,052	-0,053			
	2,000	0,041	0,082	-0,042			
97,8	0,125	0,052	0,007	-0,053	2,505	0,680 x 10 ⁻⁴	0,998
	0,160	0,051	0,008	-0,052			
	0,250	0,050	0,013	-0,051			
	0,500	0,046	0,023	-0,047			
	1,000	0,040	0,040	-0,041			
	2,000	0,031	0,062	-0,031			

TABELA 4.23

Concentração de glicose, $S_o.f_a$ (mg/ml), na saída do reator de leito fixo, em função de $\ln(1-f_a)$, para vários valores de velocidade superficial de fluxo, VL(cm/minuto), utilizando a enzima amiloglicosidase imobilizada na resina N-metilolacrilamida disco. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m (mg/ml) e $V_{m\bar{x}}$ (mol/minuto x mg enzima), em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	So (mg/ml)	fa	So.f _a (mg/ml)	ln(1-f _a)	K _m (mg/ml)	V _m ^{max} (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,7	0,125	0,329	0,041	-0,399	2,391	0,909 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,326	0,052	-0,395			
	0,250	0,319	0,080	-0,384			
	0,500	0,298	0,149	-0,354			
	1,000	0,264	0,264	-0,307			
	2,000	0,213	0,426	-0,240			
34,2	0,125	0,218	0,027	-0,246	2,281	0,882 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,215	0,034	-0,242			
	0,250	0,209	0,052	-0,234			
	0,500	0,193	0,097	-0,214			
	1,000	0,167	0,167	-0,183			
	2,000	0,132	0,264	-0,142			
42,3	0,125	0,180	0,023	-0,198	2,237	0,869 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,178	0,028	-0,196			
	0,250	0,172	0,043	-0,189			
	0,500	0,159	0,080	-0,173			
	1,000	0,137	0,137	-0,147			
	2,000	0,107	0,214	-0,113			
53,7	0,125	0,143	0,018	-0,154	2,330	0,893 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,141	0,023	-0,152			
	0,250	0,137	0,034	-0,147			
	0,500	0,126	0,063	-0,135			
	1,000	0,109	0,109	-0,115			
	2,000	0,085	0,170	-0,089			
70,7	0,125	0,113	0,014	-0,120	2,273	0,887 x 10 ⁻⁴	0,998
	0,160	0,111	0,018	-0,118			
	0,250	0,108	0,027	-0,114			
	0,500	0,098	0,049	-0,103			
	1,000	0,084	0,084	-0,088			
	2,000	0,066	0,132	-0,068			
97,1	0,125	0,081	0,010	-0,084	2,195	0,834 x 10 ⁻⁴	0,999
	0,160	0,080	0,013	-0,083			
	0,250	0,077	0,019	-0,080			
	0,500	0,070	0,035	-0,073			
	1,000	0,060	0,060	-0,062			
	2,000	0,046	0,092	-0,047			

TABELA 4.24

Concentração de glicose, So.f_a (mg/ml), na saída do reator de leito fixo, em função de ln(1-f_a), para vários valores de velocidade superficial de fluxo, VL(cm/minuto), utilizando a enzima amiloglicosidase imobilizada na resina uréia-formaldeído pó. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m(mg/ml) e V_m^{max} (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	S_0 (mg/ml)	f_a	$S_0 \cdot f_a$ (mg/ml)	$\ln(1-f_a)$	K_m (mg/ml)	$V_{m\acute{a}x}$ (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,5	0,125	0,167	0,021	-0,183	2,779	$0,548 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,165	0,026	-0,180			
	0,250	0,161	0,040	-0,176			
	0,500	0,151	0,076	-0,164			
	1,000	0,133	0,133	-0,143			
	2,000	0,107	0,214	-0,113			
33,5	0,125	0,105	0,013	-0,111	2,905	$0,566 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,104	0,017	-0,110			
	0,250	0,101	0,025	-0,106			
	0,500	0,094	0,047	-0,099			
	1,000	0,083	0,083	-0,087			
	2,000	0,067	0,134	-0,069			
42,5	0,125	0,086	0,011	-0,090	2,571	$0,503 \times 10^{-4}$	0,993
	0,160	0,081	0,013	-0,084			
	0,250	0,079	0,020	-0,082			
	0,500	0,073	0,037	-0,076			
	1,000	0,064	0,064	-0,066			
	2,000	0,051	0,102	-0,052			
54,2	0,125	0,069	0,009	-0,071	2,694	$0,547 \times 10^{-4}$	0,999
	0,160	0,068	0,011	-0,070			
	0,250	0,066	0,017	-0,068			
	0,500	0,061	0,031	-0,063			
	1,000	0,053	0,053	-0,054			
	2,000	0,042	0,084	-0,043			
70,7	0,125	0,044	0,006	-0,045	2,822	$0,471 \times 10^{-4}$	0,998
	0,160	0,043	0,007	-0,044			
	0,250	0,042	0,011	-0,043			
	0,500	0,039	0,020	-0,040			
	1,000	0,034	0,034	-0,035			
	2,000	0,027	0,054	-0,027			
97,8	0,125	0,038	0,005	-0,039	2,774	$0,548 \times 10^{-4}$	0,997
	0,160	0,037	0,006	-0,038			
	0,250	0,036	0,009	-0,037			
	0,500	0,033	0,017	-0,034			
	1,000	0,029	0,029	-0,029			
	2,000	0,023	0,046	-0,023			

TABELA 4.25

Concentração de glicose, $S_0 \cdot f_a$ (mg/ml), na saída do reator do leito fixo, em função de $\ln(1-f_a)$, para vários valores de velocidade superficial de fluxo, V_L (cm/minuto), utilizando a enzima amilglicosidase imobilizada na resina uréia-formaldeído disco. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m (mg/ml) e $V_{m\acute{a}x}$ (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	So (M)	fa	So.f _a (M)	ln(1-f _a)	K _m (M)	V _m ^{ax} (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,3	0,0500	0,2100	0,0105	-0,2357	0,0825	5,8138 x 10 ⁻⁴	0,9991
	0,1000	0,1580	0,0158	-0,1720			
	0,1250	0,1390	0,0174	-0,1497			
	0,1600	0,1205	0,0193	-0,1284			
	0,2500	0,0899	0,0225	-0,0942			
	0,3000	0,0770	0,0231	-0,0801			
33,5	0,05000	0,1295	0,0065	-0,1387	0,0853	5,8873 x 10 ⁻⁴	0,9997
	0,1000	0,0966	0,0097	-0,1016			
	0,1250	0,0855	0,0107	-0,0894			
	0,1600	0,0740	0,0118	-0,0769			
	0,2500	0,0540	0,0135	-0,0555			
	0,3000	0,0475	0,0143	-0,0487			
42,7	0,0500	0,1090	0,0055	-0,1154	0,0755	5,8211 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0797	0,0080	-0,0831			
	0,1250	0,0700	0,0088	-0,0726			
	0,1600	0,0600	0,0096	-0,0619			
	0,2500	0,0436	0,0109	-0,0446			
	0,3000	0,0375	0,0113	-0,0382			
51,7	0,0500	0,0887	0,0044	-0,0929	0,0831	5,9903 x 10 ⁻⁴	0,9997
	0,1000	0,0650	0,0065	-0,0672			
	0,1250	0,0575	0,0072	-0,0592			
	0,1600	0,0495	0,0079	-0,0508			
	0,2500	0,0360	0,0090	-0,0367			
	0,3000	0,0315	0,0095	-0,0320			
70,7	0,0500	0,0640	0,0032	-0,0661	0,0891	6,1540 x 10 ⁻⁴	0,9994
	0,1000	0,0474	0,0047	-0,0486			
	0,1250	0,0415	0,0052	-0,424			
	0,1600	0,0360	0,0058	-0,0367			
	0,2500	0,0267	0,0067	-0,0271			
	0,3000	0,0232	0,0070	-0,0235			
96,7	0,0500	0,0510	0,0026	-0,0523	0,0791	6,1944 x 10 ⁻⁴	0,9978
	0,1000	0,0370	0,0037	-0,0377			
	0,1250	0,0320	0,0040	-0,0325			
	0,1600	0,0279	0,0045	-0,0283			
	0,2500	0,0205	0,0051	-0,0207			
	0,3000	0,0175	0,0053	-0,0177			

TABELA 4.26

Concentração de glicose, So.f_a(moles/litro), na saída do reator de leito fixo, em função de ln(1-f_a), para vários valores de velocidade superficial de fluxo, VL (cm/minuto), utilizando a enzima invertase imobilizada na resina N-metilolacrilamida pó. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m(M) e V_m^{ax} (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	So (M)	fa	So.f _a (M)	ln(1-f _a)	K _M (M)	V _m (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
21,7	0,0500	0,0413	0,0021	-0,0422	0,1125	1,5576 x 10 ⁻⁴	0,9999
	0,1000	0,0318	0,0032	-0,0323			
	0,1250	0,0285	0,0036	-0,0289			
	0,1600	0,0249	0,0040	-0,0252			
	0,2500	0,0187	0,0047	-0,0189			
	0,3000	0,0165	0,0050	-0,0166			
33,7	0,0500	0,0269	0,0013	-0,0273	0,1095	1,5406 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0206	0,0021	-0,0208			
	0,1250	0,0185	0,0023	-0,0187			
	0,1600	0,0161	0,0026	-0,0162			
	0,2500	0,0120	0,0030	-0,0121			
	0,3000	0,0106	0,0032	-0,0107			
44,2	0,0500	0,0217	0,0011	-0,0219	0,1114	1,6397 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0166	0,0017	-0,0167			
	0,1250	0,0148	0,0019	-0,0149			
	0,1600	0,0130	0,0021	-0,0131			
	0,2500	0,0097	0,0024	-0,0097			
	0,3000	0,0086	0,0026	-0,0086			
54,7	0,0500	0,0177	0,0009	-0,0179	0,1148	1,6882 x 10 ⁻⁴	0,9997
	0,1000	0,0136	0,0014	-0,0137			
	0,1250	0,0122	0,0015	-0,0123			
	0,1600	0,0106	0,0017	-0,0107			
	0,2500	0,0080	0,0020	-0,0080			
	0,3000	0,0071	0,0021	-0,0071			
72,3	0,0500	0,0118	0,0006	-0,0119	0,1258	1,5784 x 10 ⁻⁴	0,9977
	0,1000	0,0092	0,0009	-0,0092			
	0,1250	0,0081	0,0010	-0,0081			
	0,1600	0,0073	0,0012	-0,0073			
	0,2500	0,0055	0,0014	-0,0055			
	0,3000	0,0049	0,0015	-0,0049			
98,7	0,0500	0,0101	0,0005	-0,0102	0,1163	1,7529 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0073	0,0008	-0,0078			
	0,1250	0,0070	0,0009	-0,0070			
	0,1600	0,0061	0,0010	-0,0061			
	0,2500	0,0045	0,0011	-0,0045			
	0,3000	0,0041	0,0012	-0,0041			

TABELA 4.27

Concentração de glicose, So.f_a (moles/litro), na saída do reator de leito fixo, em função de ln(1-f_a), para vários valores da velocidade superficial de fluxo, VL(cm/minuto), utilizando invertase imobilizada na resina N-metilolacrilamida disco. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_M(M) e V_m (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	So (M)	fa	So,fa (M)	ln(1-fa)	KM (M)	Vm _{ax} (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,5	0,0500	0,0893	0,0045	-0,0935	0,1023	2,8318 x 10 ⁻⁴	0,9999
	0,1000	0,0681	0,0068	-0,0705			
	0,1250	0,0610	0,0076	-0,0629			
	0,1600	0,0530	0,0085	-0,0545			
	0,2500	0,0395	0,0099	-0,0403			
	0,3000	0,0348	0,0104	-0,0354			
33,4	0,0500	0,0540	0,0027	-0,0555	0,1087	2,8757 x 10 ⁻⁴	0,9999
	0,1000	0,0415	0,0042	-0,0424			
	0,1250	0,0372	0,0047	-0,0379			
	0,1600	0,0323	0,0052	-0,0328			
	0,2500	0,0243	0,0061	-0,0246			
	0,3000	0,0213	0,0064	-0,0215			
43,5	0,0500	0,0420	0,0021	-0,0429	0,1045	2,8174 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0319	0,0032	-0,0324			
	0,1250	0,0285	0,0036	-0,0289			
	0,1600	0,0248	0,0040	-0,0251			
	0,2500	0,0185	0,0046	-0,0187			
	0,3000	0,0163	0,0049	-0,0164			
52,7	0,0500	0,0350	0,0018	-0,0356	0,1041	2,8219 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0264	0,0026	-0,0268			
	0,1250	0,0236	0,0030	-0,0239			
	0,1600	0,0205	0,0033	-0,0207			
	0,2500	0,0153	0,0038	-0,0154			
	0,3000	0,0135	0,0041	-0,0136			
72,3	0,0500	0,0258	0,0013	-0,0261	0,1033	2,8387 x 10 ⁻⁴	0,9997
	0,1000	0,0196	0,0020	-0,0198			
	0,1250	0,0174	0,0022	-0,0176			
	0,1600	0,0150	0,0024	-0,0151			
	0,2500	0,0113	0,0028	-0,0114			
	0,3000	0,0099	0,0030	-0,0099			
99,7	0,0500	0,0196	0,0010	-0,0198	0,0996	2,8934 x 10 ⁻⁴	0,9998
	0,1000	0,0147	0,0015	-0,0148			
	0,1250	0,0131	0,0016	-0,0132			
	0,1600	0,0113	0,0018	-0,0114			
	0,2500	0,0084	0,0021	-0,0084			
	0,3000	0,0074	0,0022	-0,0074			

TABELA 4.28

Concentração de glicose, So,fa (moles/litro), na saída do reator de leito fixo, em função de $\ln(1-fa)$, para vários valores da velocidade superficial de fluxo, VL(cm/minuto), utilizando a enzima invertase imobilizada na resina uréia-formaldeído pó. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten Km(M) e Vm_{ax} (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

Velocidade superficial de fluxo (cm/minuto)	S_o (M)	f_a	$S_o \cdot f_a$ (M)	$\ln(1-f_a)$	K_m (M)	$V_{m\bar{x}}$ (mol/mg x minuto)	Coefficiente de Correlação
20,3	0,0500	0,0227	0,0011	-0,0230	0,1237	$0,8698 \times 10^{-4}$	0,9999
	0,1000	0,0177	0,0018	-0,0179			
	0,1250	0,0160	0,0020	-0,0161			
	0,1600	0,0140	0,0022	-0,0141			
	0,2500	0,0106	0,0027	-0,0107			
	0,3000	0,0094	0,0028	-0,0094			
33,5	0,0500	0,0136	0,0007	-0,0137	0,1390	$0,9308 \times 10^{-4}$	0,9997
	0,1000	0,0107	0,0011	-0,0108			
	0,1250	0,0097	0,0012	-0,0097			
	0,1600	0,0086	0,0014	-0,0086			
	0,2500	0,0066	0,0017	-0,0066			
	0,3000	0,0059	0,0018	-0,0059			
41,9	0,0500	0,0105	0,0005	-0,0106	0,1414	$0,9091 \times 10^{-4}$	0,9998
	0,1000	0,0083	0,0008	-0,0083			
	0,12500	0,0076	0,0009	-0,0076			
	0,1600	0,0067	0,0011	-0,0067			
	0,2500	0,0052	0,0013	-0,0052			
	0,3000	0,0046	0,0014	-0,0046			
51,7	0,0500	0,0090	0,0005	-0,0090	0,1220	$0,8667 \times 10^{-4}$	0,9970
	0,1000	0,0070	0,0007	-0,0070			
	0,1250	0,0063	0,0008	-0,0063			
	0,1600	0,0056	0,0009	-0,0056			
	0,2500	0,0041	0,0010	-0,0041			
	0,3000	0,0038	0,0011	-0,0038			
70,7	0,0500	0,0075	0,0004	-0,0074	0,1105	$0,9123 \times 10^{-4}$	0,9999
	0,1000	0,0057	0,0006	-0,0057			
	0,1250	0,0051	0,0006	-0,0051			
	0,1600	0,0045	0,0007	-0,0045			
	0,2500	0,0033	0,0008	-0,0033			
	0,3000	0,0029	0,0009	-0,0029			
97,1	0,0500	0,0050	0,0003	-0,0050	0,1294	$0,9356 \times 10^{-4}$	0,9998
	0,1000	0,0039	0,0004	-0,0039			
	0,1250	0,0035	0,0004	-0,0035			
	0,1600	0,0031	0,0005	-0,0031			
	0,2500	0,0024	0,0006	-0,0024			
	0,3000	0,0021	0,0006	-0,0021			

TABELA 4.29

Concentração de glicose, $S_o \cdot f_a$ (moles/litro), na saída do reator de leito fixo, em função de $\ln(1-f_a)$, para vários valores da velocidade superficial de fluxo, V_L (cm/minuto), utilizando a enzima invertase imobilizada na resina uréia-formaldeído disco. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m (M) e $V_{m\bar{x}}$ (mol/minuto x mg enzima) em processo contínuo.

para as enzimas amiloglicosidase e invertase, respectivamente, imobilizadas nos quatro tipos de suporte, em funções de diferentes velocidades superficiais de fluxo.

As figuras 4.29 e 4.30 mostram a variação da concentração do produto na saída do reator ($S_o \cdot f_a$) em função de $\ln(1-f_a)$, para várias velocidades superficiais de fluxo, para a enzima amiloglicosidase e invertase, respectivamente, imobilizadas no suporte N-metilolacrilamida pulverizados. Os demais suportes apresentaram comportamentos semelhantes.

Os resultados apresentados nas tabelas 4.22 a 4.29 e nas figuras 4.29 e 4.30, como já era de se esperar, mostram que o reator de leito fixo utilizado aproximou-se bastante de um reator tubular ideal com uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 2.11), para a faixa de diluição do substrato utilizado, uma vez que foram obtidas retas com coeficientes de correlações relativamente altos, quando os dados experimentais foram testados nessa equação. Assim também, pode-se concluir que a simplificação feita com relação a difusão axial no reator, não trouxe grandes prejuízos no desvio dos resultados experimentais.

As tabelas 4.18 e 4.19 mostram um resumo dos valores dos parâmetros cinéticos, obtidos no processo contínuo e em bateladas para a amiloglicosidase e invertase imobilizadas e em fase líquida.

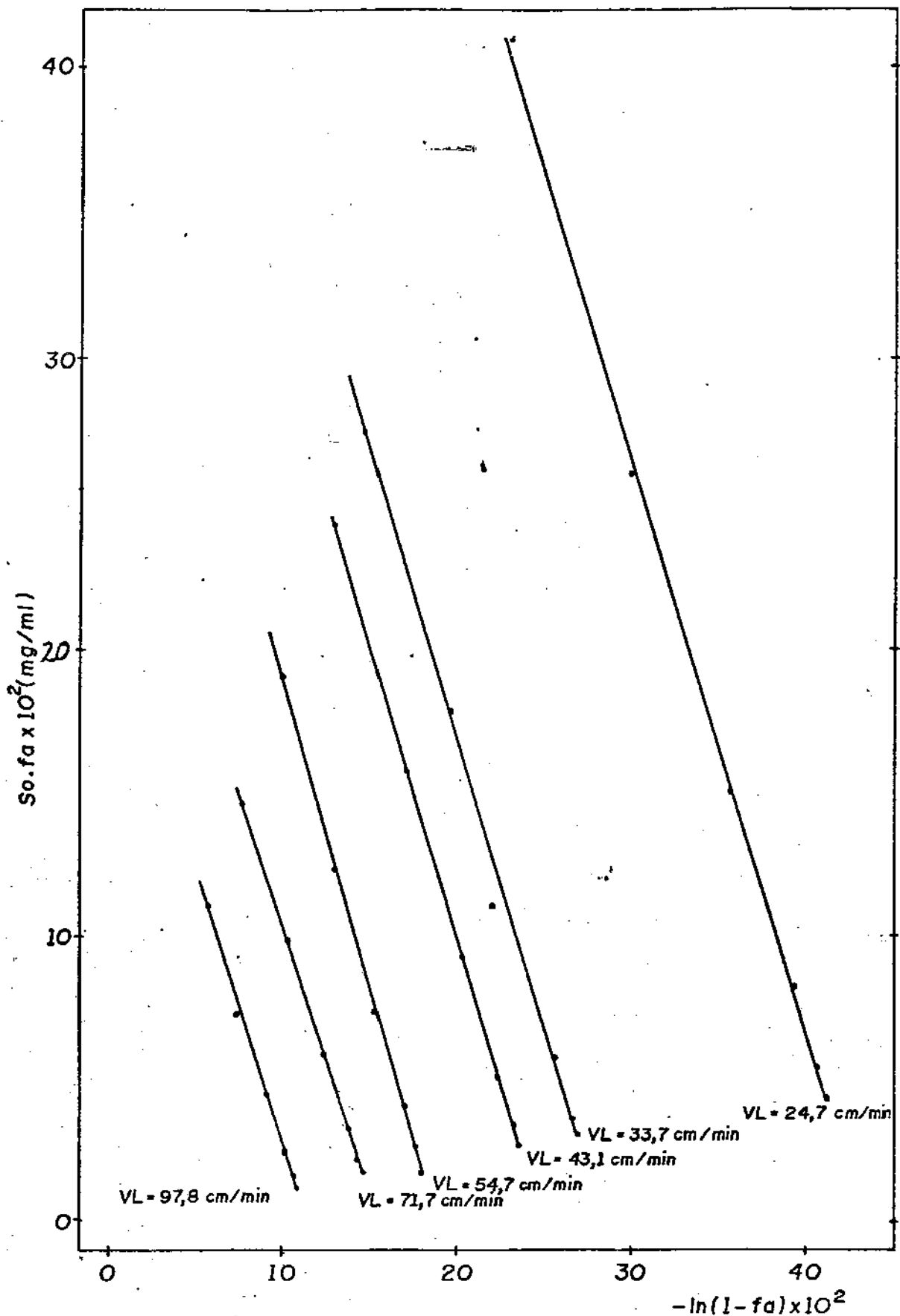


FIGURA - 4.29

Concentração de glicose na saída do reator de leito fixo com enzima amilglicosidase imobilizada na resina N-metilolacrilamida pó, $So. fa$ (mg/ml) em função de $\ln(1-fa)$ para diferentes valores da velocidade superf. de fluxo, v_l (cm/min) a $40^\circ C$ e pH 4,5.

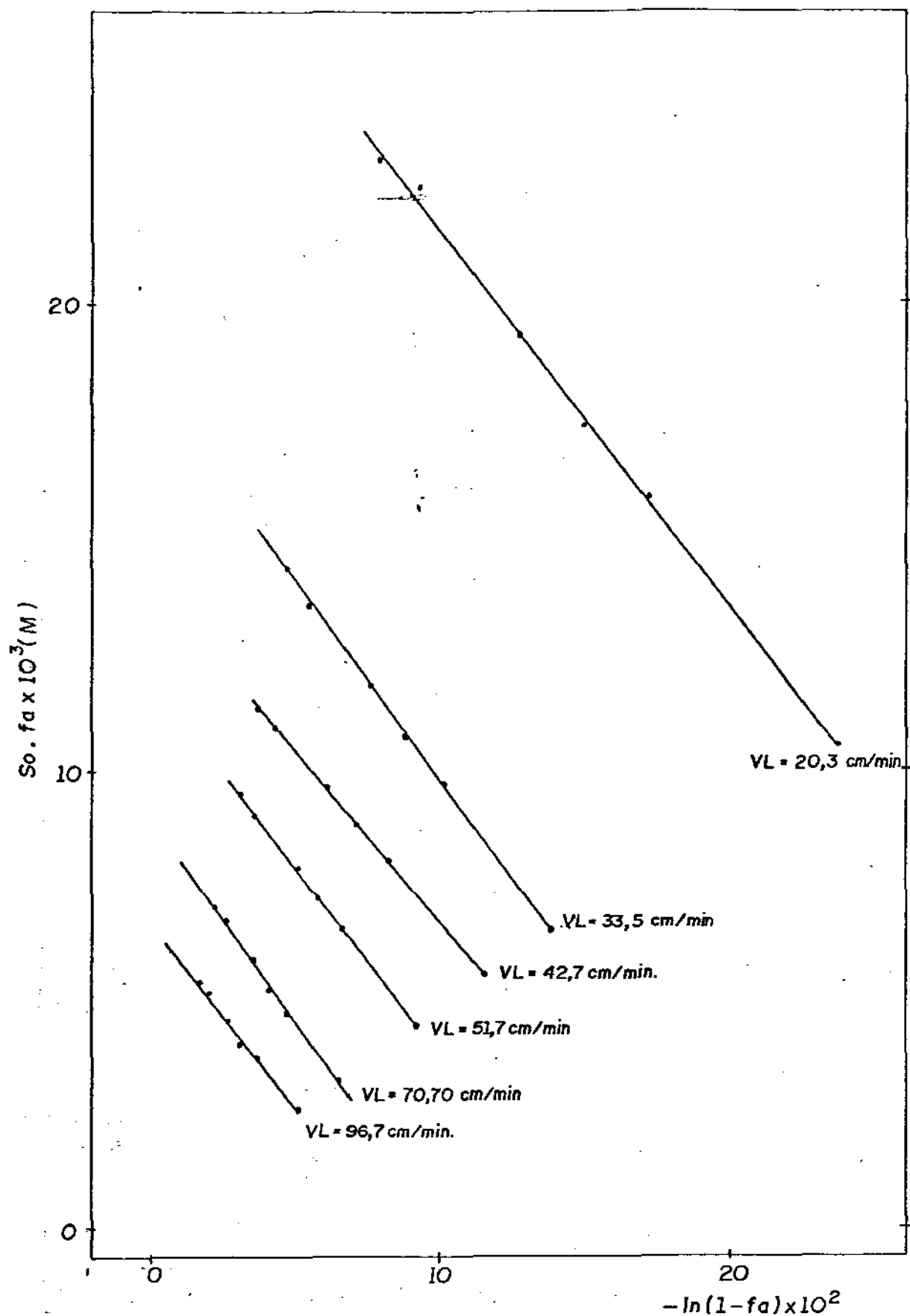


FIGURA - 4.30

Cocentração de glicose na saída do reator de leito fixo com enzima invertase imobilizada na resina N-metilolacrlamida pó, $S_o \cdot f_a$ (moles/litro) em função de $\ln(1-f_a)$, para diferentes valores da velocidade superficial de fluxo V_L (cm/min) a 40°C e pH 4,5.

Enzima Amiloglicosidase	Km (mg/ml)		Vm _{max} (mol/minuto x mg.enz)	
	Contínuo	Batelada	Contínuo	Batelada
em fase líquida	—	1,25	—	8,89 x 10 ⁻⁴
imobilizada NMA-P ₀	2,00	2,37	0,91 x 10 ⁻⁴	0,90 x 10 ⁻⁴
imobilizada NMA-D	2,50	2,85	0,67 x 10 ⁻⁴	0,64 x 10 ⁻⁴
imobilizada U/F-P ₀	2,28	2,50	0,89 x 10 ⁻⁴	0,81 x 10 ⁻⁴
imobilizada U/F-D	2,76	2,90	0,53 x 10 ⁻⁴	0,40 x 10 ⁻⁴

Tabela 4.18 - Parâmetros cinéticos aparentes da enzima amiloglicosidase, utilizando reator batelada e reator de leito fixo, a 40°C e pH 4,5.

Enzima Invertase	Km (M)		Vm _{max} (mol/minuto x mg.enz)	
	Contínuo	Batelada	Contínuo	Batelada
em fase líquida	—	0,05	—	9,30 x 10 ⁻⁴
imobilizada NMA-P ₀	0,082	0,10	5,967 x 10 ⁻⁴	0,62 x 10 ⁻⁴
imobilizada NMA-D	0,115	0,13	1,629 x 10 ⁻⁴	0,41 x 10 ⁻⁴
imobilizada U/F-P ₀	0,103	0,12	2,846 x 10 ⁻⁴	0,55 x 10 ⁻⁴
imobilizada U/F-D	0,127	0,15	0,904 x 10 ⁻⁴	0,30 x 10 ⁻⁴

Tabela 4.19 - Parâmetros cinéticos aparentes da enzima invertase, utilizando reator batelada e reator de leito fixo, a 40°C e pH 4,5

Os valores das constantes aparentes de Michaelis - Menten Km, para ambas enzimas imobilizadas, foram menores no processo contínuo, que no processo batelada, porém maiores que o da enzima em fase líquida. Isso significa, que o contato do complexo enzima-substrato no processo contínuo é mais favorável que no processo batelada, talvez devido a efeitos de difu

são menores no contínuo. Segundo Baum⁶, o maior valor de K_m no processo batelada relativo ao contínuo é resultado de uma mistura menos eficiente no reator batelada. Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores utilizando enzimas imobilizadas, como Ribeiro⁸⁶, utilizando a invertase imobilizada em resina duolite; Baum⁶, utilizando as enzimas amiloglicosidase e papaína imobilizadas em poliestireno macroreticular e Gelf e outros³⁷, utilizando a α -quimiotripsina imobilizada.

Para o parâmetro cinético $V_{m\acute{a}x}$, verifica-se uma diminuição do seu valor na mesma sequência do aumento de K_m , isto é, o processo contínuo apresentou um maior valor de $V_{m\acute{a}x}$ que o processo em batelada, por outro lado menor do que no caso da enzima em fase líquida, como já discutido no item 4.5. Ribeiro⁸⁶ e Gelf e outros³⁷ também obtiveram resultados semelhantes.

4.8. ESTABILIDADE OPERACIONAL DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS NUM REATOR DE LEITO FIXO E DE LEITO FLUIDIZADO

Os resultados obtidos para a estabilidade das enzimas imobilizadas estão apresentados nas tabelas 4.20 e 4.21 que contêm dados de: vazões das soluções de substratos, ml/minuto; alturas dos leitos catalíticos expandidos; temperaturas das soluções de substratos em centígrados e conversões máximas dos substratos em produto, após cada ciclo de 24 horas de operação contínua.

As figuras 4.31; 4.32; 4.33 e 4.34 mostram as variações das conversões em função do tempo de reação para cada ciclo de 24 horas de operação contínua durante 8 a 9 dias consecutivos, em reator de leito fluidizado e de leito fixo, para as enzimas amiloglicosidase e invertase immobilizadas no suporte N-metilolacrilamida pulverizado. Para essas enzimas immobilizadas nos outros suportes, o comportamento foi bastante semelhante, sendo apenas mostrados os resultados finais nas tabelas já mencionadas.

A análise das tabelas 4.20 e 4.21 em conjunto com as figuras 4.31, 4.32, 4.33 e 4.34 demonstram uma perda de atividade das enzimas immobilizadas, sendo essa relativamente mais acentuada nos pulverizados. Por outro lado, observa-se que no leito fluidizado a perda foi maior do que no leito fixo, talvez porque, como já verificado anteriormente, o suporte pulverizado possibilite uma maior liberação das enzimas e a agitação do suporte enzimático promovida pelo processo de fluidização, favoreça a desativação das mesmas e até a liberação dessas.

Observou-se que, para a amiloglicosidase immobilizada nas resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído pulverizadas, houve redução das conversões máximas diárias à metade, após transcorridas aproximadamente 168 horas de operação contínua no leito fixo. O mesmo ocorrendo para o suporte na forma de disco, após aproximadamente 192 horas. Para o leito fluidizado esse período foi de aproximadamente 168 horas, para as duas resinas e enzimas. Para a invertase immobilizada, o período, em que a conversão máxima foi reduzida à metade, foi

de aproximadamente 192 horas no leito fixo, para ambas as resinas nas formas pulverizadas e de disco.

Assim o tempo de meia-vida para a amiloglicosidase e invertase no leito fluidizado, para os dois tipos de suportes pulverizados, encontra-se entre 6 e 7 dias, onde a meia-vida é o tempo necessário para reduzir a conversão máxima à metade. Para o leito fixo, utilizando o suporte na forma de pó, o tempo de meia-vida para a amiloglicosidase localiza-se entre 6 e 7 dias e para a invertase encontra-se entre 7 a 8 dias. Para o suporte na forma de disco, a meia-vida encontra-se entre 7 a 8 dias para as duas enzimas e os dois tipos de resina. Outros trabalhos de imobilização obtiveram resultados na ordem de 5 a 6 dias^{20,87,109,115}. Esses resultados ainda são relativamente baixos para o desenvolvimento industrial da tecnologia de sacarificação do amido ou da hidrólise da sacarose, utilizando as enzimas imobilizadas amilo P-250 e invertase, respectivamente¹¹⁶. Portanto, estudos deverão ser realizados no sentido de aumentar a meia-vida e, conseqüentemente, a estabilidade operacional dessas enzimas.

Tabela 4.20

Tipo de enzima e de suporte utilizado	Dias de Operação	Vazão (ml/minuto)	Altura do leite catalítico (mm)	Temperatura do substrato (°C)	Conv. máx. após 24 horas (%)
Enzima Amilo P-250 imobilizada na resina N-metilolacrilamida pó	1º	5,6	300	57,7	64,8
	2º	5,5	282	60,0	60,4
	3º	5,8	305	58,5	55,6
	4º	5,4	270	57,4	48,8
	5º	5,9	277	60,1	40,8
	6º	6,0	290	59,4	35,6
	7º	6,0	281	59,5	31,9
	8º	6,1	292	60,0	20,8
	9º	6,1	281	57,5	13,6
Enzima Amilo P-250 imobilizada na resina uréia formaldeído do pó	1º	5,7	258	58,7	64,1
	2º	6,0	290	60,0	61,7
	3º	6,2	305	57,9	55,7
	4º	5,9	281	58,5	47,7
	5º	6,0	295	60,0	39,2
	6º	6,0	292	59,8	35,7
	7º	6,0	290	60,1	30,1
	8º	6,1	298	58,9	22,7

Tipo de enzima e de suporte utilizado	Dias de Operação	Vazão (ml/minuto)	Altura do leito catalítico (mm)	Temperatura do substrato (°C)	Conv. máx. após 24 horas (%)
Enzima invertase imobilizada na resina N-metilacrilamida pó	1º	6,0	302	48,1	5,17
	2º	6,2	315	46,7	47,0
	3º	5,8	287	49,0	45,3
	4º	5,9	295	50,0	37,2
	5º	5,8	284	50,1	33,8
	6º	6,1	305	48,2	29,7
	7º	6,0	301	49,3	25,1
	8º	6,0	297	47,8	18,3
	9º	5,9	282	50,0	11,2
Enzima invertase, imobilizada na resina uréia formaldeído pó	1º	5,9	301	47,5	49,2
	2º	5,7	267	49,0	45,1
	3º	6,0	305	48,7	41,2
	4º	6,0	302	50,0	38,2
	5º	6,1	31,1	50,1	32,7
	6º	6,0	304	50,2	28,9
	7º	5,8	287	49,9	20,9
	8º	6,0	300	47,9	16,9
	9º	6,0	297	49,5	9,9

Labela 4.20 - Conversões máximas diárias dos substratos, em produtos, por enzimas imobilizadas, utilizando ciclos de 24 horas de operação contínua em microreator de leito fluidizado. Substratos: solução de amido 1,6% p/V e de sacarose 0,1M para as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, respectivamente

Tabela 4.21

Tipo de enzima e de suporte utilizado	Dias de Operação	Vazão (ml/minuto)	Temperatura do substrato (°C)	Conversão máxima após 24 horas (%)
Enzima Amilo P-250, imobilizado na resina N-metilacrilamida pó	19	6,5	59,2	68,8
	29	6,0	60,0	64,4
	39	6,2	60,1	59,9
	49	6,0	57,7	54,0
	59	5,8	68,9	51,4
	69	6,0	59,5	40,4
	79	6,1	58,7	33,4
	89	5,9	60,1	25,6
	99	6,0	59,9	17,1
Enzima Amilo P-250, imobilizada em N-metilacrilamida disco	19	5,8	58,7	57,5
	29	5,9	60,0	52,6
	39	6,0	60,0	49,7
	49	6,3	56,9	45,8
	59	6,2	57,7	40,2
	69	5,7	59,2	35,7
	79	6,1	58,7	30,9
	89	5,8	59,2	27,1
	99	6,0	60,1	19,4
Enzima Amilo P-250, imobilizada em uréia - formaldeído pó	19	6,2	57,1	64,7
	29	6,0	58,9	60,2
	39	5,9	60,0	55,7
	49	6,0	59,1	48,9
	59	6,0	57,7	40,7
	69	5,7	59,9	37,4
	79	6,1	58,7	30,7
	89	6,0	59,2	20,2

Tabela 4.21

Tipo de enzima e de suporte utilizado	Dias de Operação	Vazão (ml/minuto)	Temperatura do Substrato (°C)	Conversão máxima após 24 horas (%)
Enzima Amilo P-250, imobilizada na resina uréia-formaldeído disco	1º	6,6	58,2	56,7
	2º	6,2	60,1	55,2
	3º	6,0	59,8	51,6
	4º	5,7	59,7	47,3
	5º	5,9	58,7	41,7
	6º	6,0	57,9	35,2
	7º	5,8	60,2	30,7
	8º	5,9	59,5	25,2
	9º	6,0	58,8	18,7
Enzima invertase, imobilizada na resina N-metilolacrilamida pó	1º	6,2	49,2	55,1
	2º	6,3	48,7	54,4
	3º	6,0	47,8	51,1
	4º	6,1	50,0	47,2
	5º	6,2	47,9	40,7
	6º	5,8	46,9	32,0
	7º	5,9	47,7	29,7
	8º	6,1	50,2	22,7
	9º	6,0	49,9	14,7
Enzima invertase, imobilizada na resina N-metilolacrilamida disco	1º	6,2	48,2	48,7
	2º	6,0	50,1	47,7
	3º	5,8	47,3	44,3
	4º	5,9	47,7	40,2
	5º	6,0	48,8	38,8
	6º	5,9	49,7	31,9
	7º	5,8	49,8	27,8
	8º	6,0	50,2	21,7
	9º	6,1	47,9	17,3

Tipo de enzima e do suporte utilizado	Dias de Operação	Vazão (ml/minuto)	Temperatura do Substrato (°C)	Conversão máxima após 24 horas (%)
Enzima invertase imobilizada na resina, uréia-formaldeído pó	1º	6,0	47,1	55,2
	2º	5,8	48,2	51,7
	3º	5,7	49,9	48,9
	4º	6,5	50,0	40,2
	5º	6,2	47,5	37,1
	6º	6,0	48,1	32,4
	7º	5,9	49,5	28,7
	8º	6,1	50,2	23,7
	9º	6,0	49,7	14,4
Enzima invertase imobilizada na resina uréia-formaldeído disco	1º	6,0	47,7	45,2
	2º	6,5	48,2	44,9
	3º	5,8	49,2	39,9
	4º	5,7	47,9	37,7
	5º	6,2	48,8	32,5
	6º	6,1	50,3	27,7
	7º	6,0	48,3	25,3
	8º	5,9	49,1	20,7
	9º	6,0	49,9	15,7

Tabela 4.21 - Conversões máximas diárias dos substratos, em produtos, por enzimas imobilizadas, utilizando ciclos de 24 horas de operação contínua em microreator de leito fixo. Substratos: solução de amido 1,6% p/V e de sacarose 0,1M, para as enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase, respectivamente.

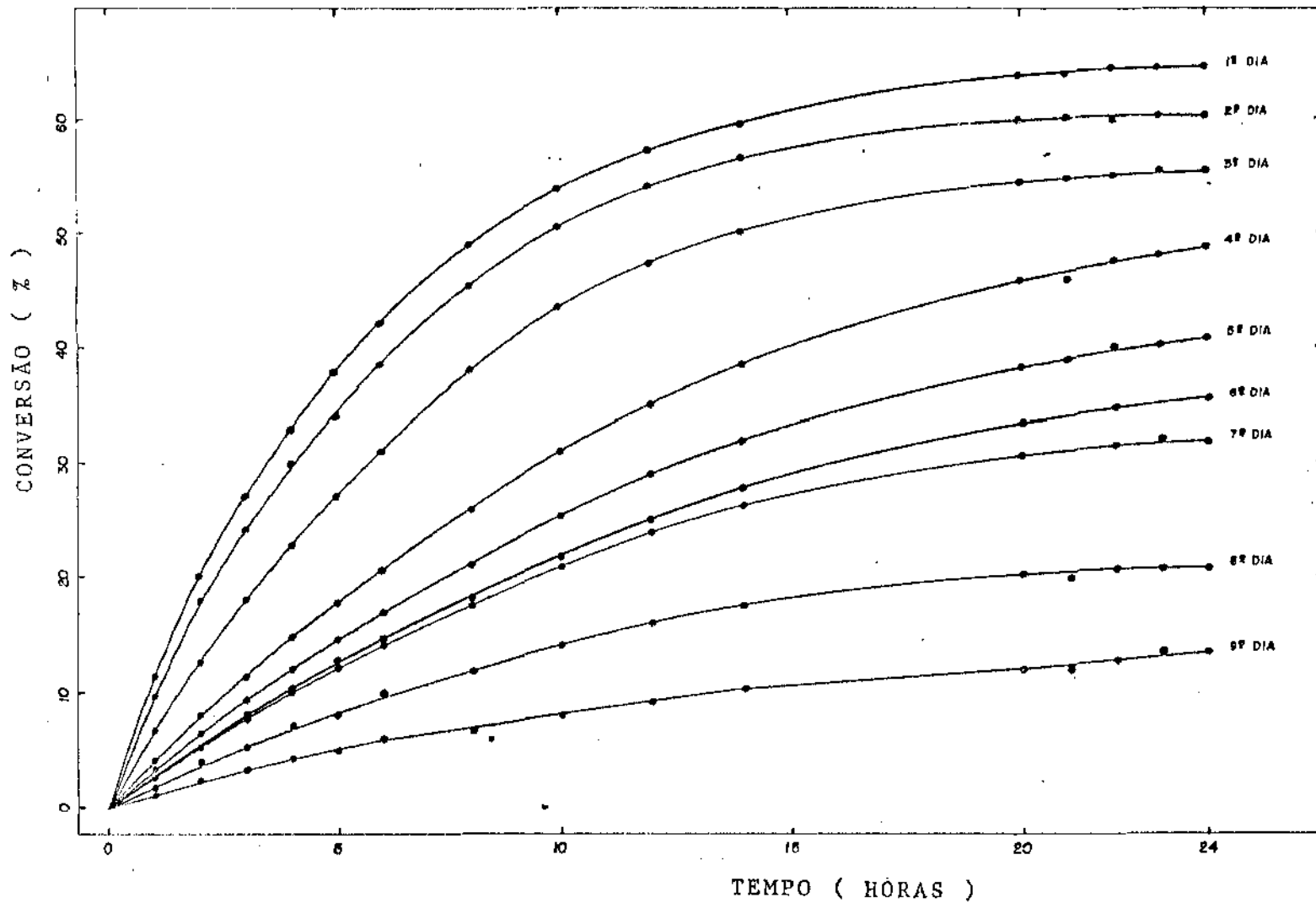


FIGURA 4.31

CONVERSÃO DO AMIDO EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SACARIFICAÇÃO, PARA CICLOS DE 24h DE OPERAÇÃO CONTÍNUA EM MICROREATOR DE LEITO FLUIDIZADO, SUPORTE: N-METILOLACRILAMIDA, SUBSTRATO: SOLUÇÃO DE AMIDO 1,6% p/v. pH 4,0, ENZIMA: AMILOGlicosidase.

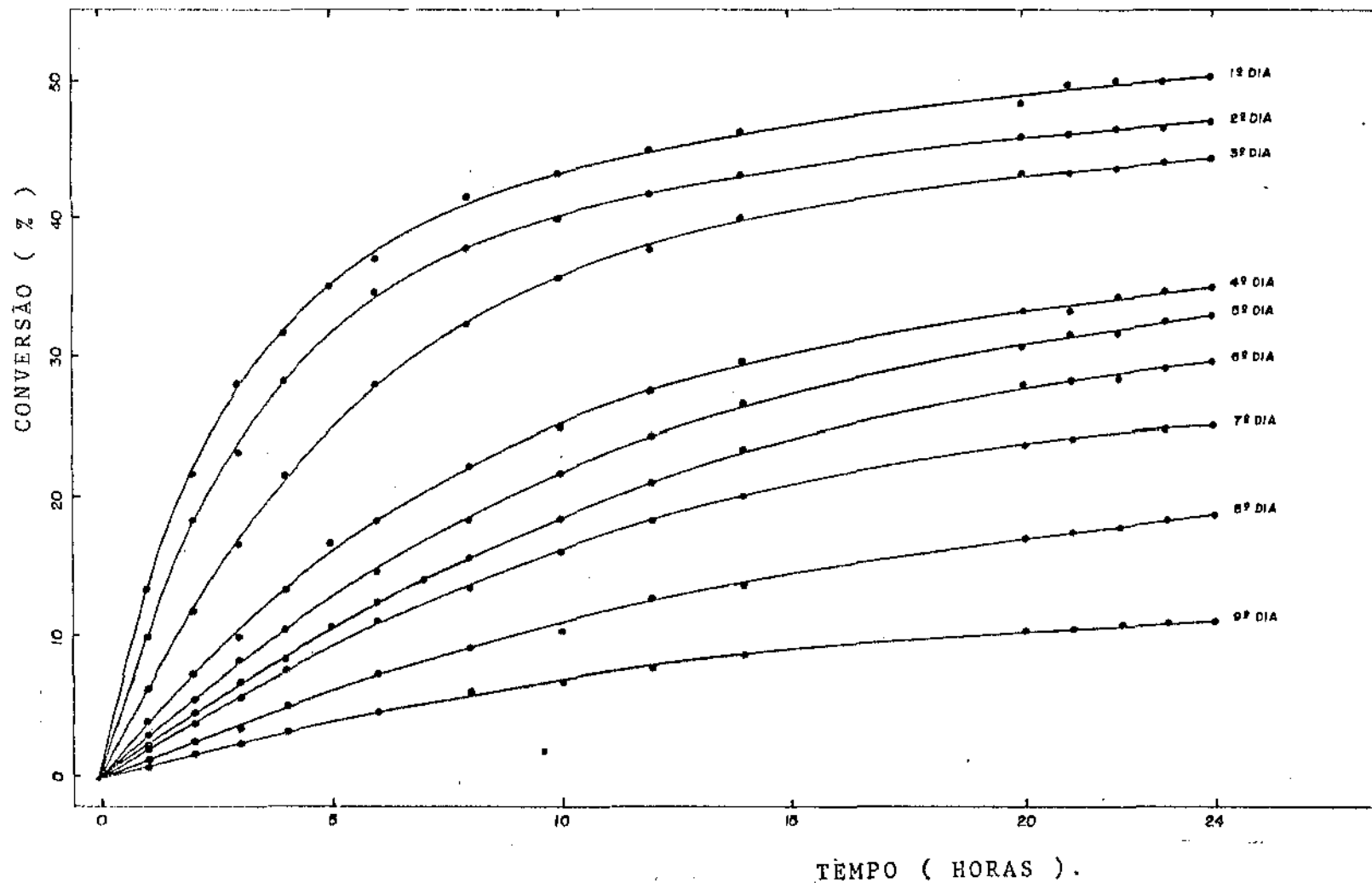


FIGURA 4.32

CONVERSÃO DA SACAROSE EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE, PARA CICLOS DE 24h DE OPERAÇÃO CONTÍNUA EM MICROREATOR DE LEITO FLUIDIZADO. SUPORTE: N-METILOL-ACRILAMIDA, SUBSTRATO: SOLUÇÃO DE SACAROSE 0,1M COM pH 5,0, ENZIMA: INVERTASE.

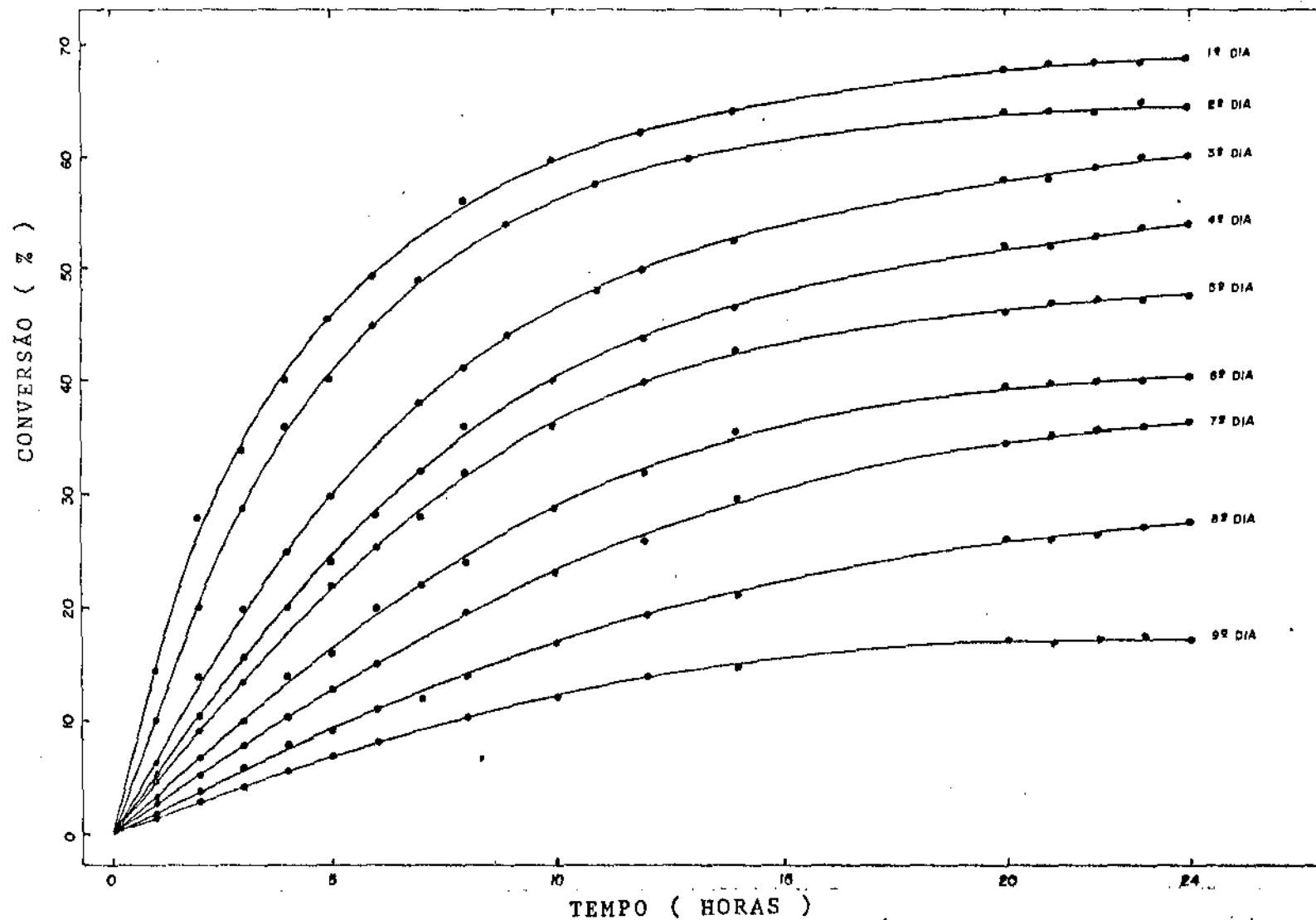


FIGURA 4.33

CONVERSÃO DO AMIDO EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SACARIFICAÇÃO, PARA CICLOS DE 24h DE OPERAÇÃO CONTÍNUA EM MICROREATOR DE LEITO FIXO. SUPORTE: N-METILOLACRILAMIDA PÓ, SUBSTRATO: SOLUÇÃO DE AMIDO 1,6% COM pH 4,0, ENZIMA: AMILOGlicosidase.

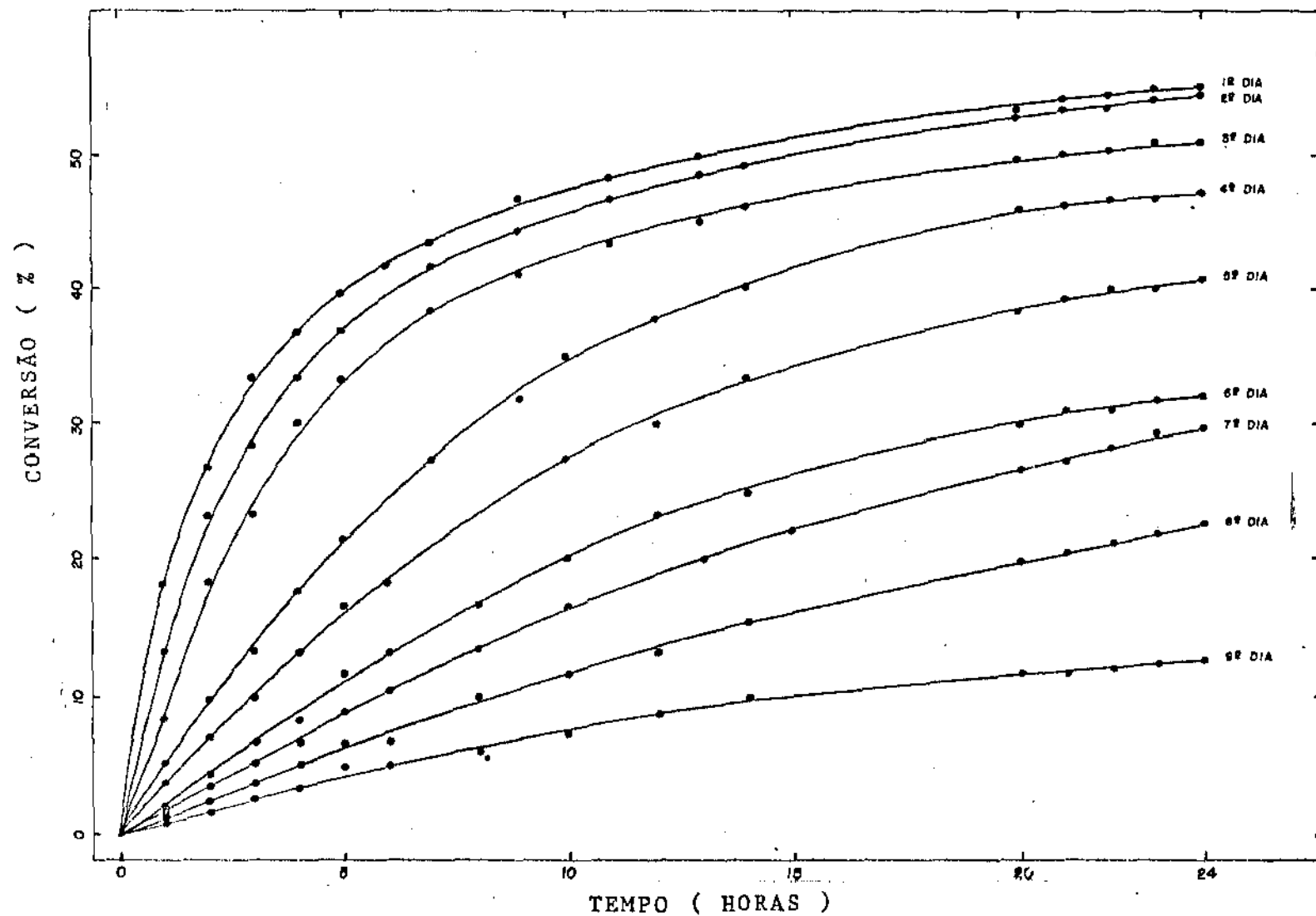


FIGURA 4.34

CONVERSÃO DA SACAROSE EM GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE, PARA CICLOS DE 24h DE OPERAÇÃO CONTÍNUA EM MICROREATOR DE LEITO FIXO. SUPORTE: N-METILOLACRILAMIDA PÓ, SUBSTRATO: SOLUÇÃO DE SACAROSE 0,1M COM pH 5,0, ENZIMA: INVERTASE

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. CONCLUSÕES

Tomando por base os resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, pode-se tirar as seguintes conclusões:

1. Foi possível utilizar as resinas sintetizadas, N-metilolacrilamida e uréia formaldeído, como suporte para fixação das enzimas amiloglicosidase e invertase.
2. As condições ótimas de temperatura, pH e atividade específica para as enzimas em fase líquida foram 60°C pH 4,0 e 14,6 unidades/mg para a Amiloglicosidase e 50°C, pH 5,0 e 11,6 unidades/mg para a invertase. As enzimas imobilizadas apresentaram uma faixa de temperatura e pH ótimos. Para a amiloglicosidase tais condições foram de 55 a 65° e o pH de 4,0 a 5,0. Para a invertase foi de 45 a 55°C e o pH de 4,5 a 5,5.
3. As conversões específicas, para 120 minutos de reação nas condições de atividade máxima para cada enzima em fase líquida, foram aproximadamente constantes, com valores médios de $5,0 \times 10^3$ %/mg de enzima e $3,8 \times 10^3$ %/mg de enzima, para a amiloglicosidase e invertase, respectivamente. As enzimas imobilizadas, nos quatro tipos de suportes testados, possibilitaram conversões específicas bastante inferiores às das em estado líquido. Para as enzimas amiloglicosidase e invertase, os valores das conversões específicas foram em média 10,5 e 9,0 vezes inferiores, respectivamente. Assim, é ne-

cessário utilizar uma quantidade muito maior de enzimas imobilizadas para se obter o mesmo grau de conversão da enzima em fase líquida.

4. Na etapa de imobilização, a agitação suave favoreceu a fixação para tempos de imobilização inferiores à quinze horas. Nessa etapa, a utilização de temperaturas iguais ou inferiores a 15°C proporcionou um pequeno aumento na atividade catalítica das enzimas imobilizadas.
5. As enzimas imobilizadas nos suportes em forma de discos apresentaram menor variação na atividade enzimática, em relação às flutuações das variáveis de processo que foram analisadas, tanto na etapa de imobilização, como na de caracterização das enzimas imobilizadas.
6. As enzimas imobilizadas e em fase líquida estudadas se comportaram segundo o mecanismo de reação de Michaelis - Menten na faixa de diluição adotada, tanto no processo contínuo como no descontínuo.
7. Os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten (K_m) para ambas enzimas imobilizadas, foram menores no processo contínuo, em relação a batelada, porém, maiores que o das enzimas na fase líquida.
8. As razões entre K_m para as enzimas imobilizadas e K_m para as enzimas em fase líquida, para as duas enzimas utilizadas, foram geralmente menores que os obtidos em outros trabalhos.

9. As enzimas imobilizadas amiloglicosidase e invertase perderam rapidamente a atividade catalítica nas quatro primeiras semanas de estocagem. Posteriormente, essa caiu lentamente, tendendo a permanecer constante. Essa queda foi menor para a enzima invertase.
10. A atividade catalítica das enzimas imobilizadas diminuiu com o repetido uso, sendo que essa redução ocorre significativamente nas dez primeiras bateladas para a enzima amiloglicosidase e nas sete primeiras para a invertase. Por outro lado, ocorre liberação das enzimas fixadas, aproximadamente, após o mesmo número de bateladas, anteriormente citado.
11. A liberação de enzimas ativas dos suportes estudados foi menor para a invertase.
12. Os testes de estabilidade operacional no microreator de leito fluidizado conduziram a uma meia-vida de aproximadamente 168 horas para as duas enzimas imobilizadas nos dois tipos de resinas. No reator de leito fixo, essa foi um pouco maior, aproximadamente de 192 horas. Os testes foram realizados a 60°C, pH 4,0 e a 50°C pH 5,0 para amiloglicosidase e invertase imobilizadas, respectivamente.
13. A atividade catalítica das enzimas imobilizadas, amiloglicosidase e invertase, diminuíram quando a concentração de solução tampão ultrapassou a 0,6M. Por outro lado, ocorreu liberação de enzima dos suportes para concentrações da solução tampão acima do valor anteriormente citado.

5.2. SUGESTÕES

Para dar continuidade a esse trabalho e explorar outras possibilidades de uso para os suportes propostos, sugere-se a realização dos seguintes estudos:

1. Utilização dos suportes para a imobilização de outros tipos de enzimas;
2. Verificação da possibilidade de aumento da estabilidade e da conversão específica das enzimas imobilizadas utilizadas nesse trabalho, por exemplo, pela aplicação de reagentes bifuncionais no processo de imobilização;
3. Estudo mais profundo do mecanismo de ligação das enzimas aos suportes testados;
4. Estudo da possibilidade de utilização de um reator de leito fluidizado com recuperação contínua do catalisador biológico, assim como a utilização de outros modelos de reatores;
5. Estudo da possibilidade de utilização de outras formas do suporte tecido-resina;
6. Estudo mais profundo das características dos suportes testados, como por exemplo, sua porosidade e a medida de grupos metilol;
7. Estudo da influência de outros parâmetros na imobilização das enzimas, como a variação da granulometria dos suportes.

8. Estudo das condições operacionais sobre a transferência de massa em reatores com enzimas imobilizadas nos suportes propostos nesse trabalho.

NOMENCLATURA

- a = área da seção transversal do leito catalítico, L^2 .
- A = glicose produzida pela enzima imobilizada após cada batelada.
- AE = atividade enzimática, $M.L^{-3}.T^{-1}$.
- AED = relação entre a glicose produzida pela enzima imobilizada e o somatório da glicose produzida pela enzima desprendida do suporte e pela imobilizada.
- AEI = atividade específica da enzima imobilizada, T^{-1} .
- AEL = atividade específica da enzima em fase líquida, T^{-1} .
- AEM = atividade específica máxima da enzima durante o processo, T^{-1} .
- AESSS = atividade específica na solução substrato sobrenadante, T^{-1} .
- AR = atividade relativa.
- ARL = atividade relativa à fase líquida.
- B = glicose produzida pela enzima imobilizada e pela enzima desprendida do suporte em cada batelada, $M.L^{-3}$.
- D = diluição efetuada.
- dl = elemento de comprimento do leito catalítico, L.
- Dl = coeficiente de difusão, $L^2.T^{-1}$.
- dV = elemento de volume do leito catalítico, L^3 .

- dV' = volume de líquido no elemento de volume dV , L^3 .
 ϵ = porosidade do leito catalítico.
 $Eq-g$ = equivalente - grama, M.
 E_0 = velocidade inicial de reação, $M.L^{-3}.T^{-1}$.
 F = fator determinante da glicose padrão, $M.L^{-3}$.
 F_a = vazão molar do substrato, $M.T^{-1}$.
 f_a = fração de conversão.
 F_{a0} = vazão molar de alimentação do reator, $M.T^{-1}$.
 FL = porcentagem de formaldeído livre.
 G = concentração de glicose em solução, $M.L^{-3}$.
 GPS = glicose produzida na solução substrato sobrenadante, $M.L^{-3}$.
 GSS = glicose presente na solução sobrenadante, $M.L^{-3}$.
 G_t = gramatura do tecido, $M.L^{-2}$.
 K_m = constante de Michaelis-Menten, $M.L^{-3}$.
 l = altura da coluna de leito catalítico, L.
 m = massa de amostra que foi utilizada, M.
 N = normalidade da solução, $M.L^{-3}$.
 PA = concentração de proteína na solução enzimática, antes da imobilização, $M.L^{-3}$.
 PD = concentração de proteína na solução enzimática após a imobilização, $M.L^{-3}$.

- PM = peso molecular da glicose, M.
- Q = vazão volumétrica, $L^3.T^{-1}$.
- QEF = quantidade de enzima fixada, $M.L^{-3}$.
- RST = percentagem de retenção de resina no tecido.
- S = concentração do substrato, $M.L^{-3}$.
- So = concentração do substrato no início da reação, $M.L^{-3}$.
- t = tempo de reação, T^{-1} .
- v = velocidade de reação, $M.L^{-3}.T^{-1}$.
- Vl = velocidade superficial de fluxo, LT^{-1} .
- Vmáx = velocidade de hidrólise, $M.L^{-3}.T^{-1}$.
- Vs = volume de solução, L^3 .
- VTS = volume de solução de tiosulfato de sódio, L^3 .
- X = massa do tecido recoberto com resina polimerizada, M.
- Y = massa do tecido original, sem resina, M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, B.A.K. et alii. Limitations of cold sodium sulfite. Titration methods for free formaldehyde in textiles. Textile Research Journal, 53(11):688, 1983.
2. Apostila de Química Analítica II - SENAI - Centro de Tecnologia da Indústria Química e Têxtil.
3. Associazione Italiana Industriali Stampatori, Tintori Finitori Tessili. II Controllo della formaldeide nei trattamenti de imobilitazione con resine N-metilolliche. Le misure di sicerezza ed un Nuovo metodo di analisi.
4. BACHERLER, M.J. et alii. Starch convensionly immobilized glucoamylase. Biotech. and Bioeng., 12:85, 1970.
5. BASTA, N. Immobilization routes - they're not standing still. Chem. Eng., 19:5-59, April, 1982.
6. BAUM, G. Enzyme immobilization on macroreticular polystyrena. Biotech. and Bioeng., 17:253-270, 1975.
7. BERNFIELD, P.; BIEBER, R. E. & McDONNELL, P.C. Arch. Biochem. Biophys., 127:779, 1968.
8. BERNFIELD, P. & WAN, J. Science, 142:678, 1963.
9. DILLMEYER, Jr. F. W. Textbook of Polymer Science. New York, John Wiley & Sons, 1970, 548p.
10. BITTENCOURT, E. et al. Immunoassays Conduated with Resin Treated Nylon Fabrics. J. of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 21:717, 1983.

11. Boletim informativo. Cyanamid, Industrial Chemicals Division. Bulk Handling and Storage N-methylol-Acrylamide. Wayne, New Jersey.
12. Boletim informativo. Laboratório Labtest - Sistema para Diagnóstico Ltda. Glicose God-Ana. Belo Horizonte. Brasil.
13. Boletim informativo da Nalco B D 2473. Monômero de Acrilamida à 45, em Solução Aquosa, São Paulo.
14. BORZANI, W.; LIMA, U. A. & AQUARONE, E. Biotecnologia Engenharia Bioquímica, vol. 3, Edgard Blücher Ltda, 1975.
15. BOUDRANT, J. & CHEFTEL, C. Continuous hydrolysis of sucrose by invertase adsorbed in a tubular reactor. Biotech. and Bioeng., 17:827-844, 1975.
16. CABRAL, J.M.S. Estudos de Imobilização de Enzimas pelo Método dos Metais de Transição. Tese submetida a provas de doutoramento em Engenharia Química. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Setembro, 1982.
17. CABRAL, J.M.S.; NOVAIS, J. M. & CARDOSO, J. P. Immobilization of amyloglucosidase on alkylamine derivatives of metal - link - activated inorganic supports. Biotech. and Bioeng., 23:2083-2092, 1981.
18. CABRAL, J.M.S.; NOVAIS, J.M.; KENNEDY, J.F. & CARDOSO, J.P. Immobilization of biocatalysts on new route tran

- sition, metal-activated inorganic supports. Enzyme Microb. Technol., 5, January, 1983.
19. CHIBATA, I. et alii. Preparation and industrial application of immobilized aminoacylase. Ferment. Technol. Today., 384-389, 1972.
20. CHIBATA, I. Immobilized Enzymes—Research and Development. New York, John Wiley & Sons, 1978.
21. CONN, E.E. & STUNRPF, P.K. Introdução à Bioquímica. [Outlines of Biochemistry]. 3. ed. São Paulo, E. Blücher, 1977. 447p.
22. COOPER, J.W. Spectroscopic Techniques for Organic Chemists. New York, John Wiley & Sons, 1980.
23. COUGHLIN, R.W.; ALZAWA, M.; ALEXANDER, B.F.; CHARLES, M. Immobilized - enzyme continuous-flow reactor incorporating continuous electrochemical regeneration of NAD. Biotech. and Bioeng., 18:515-529, 1975.
24. DE JONG, J.I. & DE JONGE, H. The reaction between urea and formaldehyde in concentrated solution. Rec. Trav. Chim., 71:890, 1952.
25. ————. The reaction of urea with formaldehyde. Rec. Trav. Chim., 71:643, 1952.
26. DENNIS, E.K.; CHO, Y.K.; PARK Y. H. Immobilization of enzymes in porous Supports: Effects of support - Enzyme solution contacting. Biotech. and Bioeng., 26: 892-900, 1984.

27. DINELLI, D. Fibre - entrapped enzymes. Proc. Bioch.
August, 1972.
28. DRAETTA, I.S. Isolamento, purificação e cinética da invertase de *saccharomyces cerevisiae*. Col. Inst. Tecnol. Alim., 4:23-37, 1971/72.
29. DYER, J. R. Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos. São Paulo, Edgar Blücher Ltda, 1969.
30. ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8(9): 871, 1971.
31. FERREIRA, A. W.; BITTENCOURT, E. & CAMARGO, M. E. Processo de produção de reagentes para testes sorológicos e produtos obtidos. Prêmio Governador do Estado de São Paulo. XI Concurso Nacional do Invento Brasileiro. DECET. Novembro, 1983.
32. FILBERT, A.M. & PITCHER, JNR, W. P. Immobilized enzymes for industrial application. Proc. Bioch. September, 1976.
33. FILIPULSON, H. & HORNBY, W. E. The preparation and properties of yeast β -fructofuranosidase chemically attached to polystyrene. Biochem. J., 120:215-219, 1970.
34. FLYNN, A. & JOHNSON, D.B. The immobilization of invertase on hornblend and on enzacrye-tio: Optimization and

- stability studies. Int. J. Bioch., 8(3): 243-247.
35. FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. Princípios das Operações Unitárias. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1982.
36. GARDON, J.L. A quantitative study crosslinking cotton with N-methylol Acrylamide. J. Appl. Polym. Sci., 18:734-751, 1961.
37. GELF, G. et alii. Water insoluble enzymes columns: kinetic study on study state and transient conditions. Biotech. and Bioeng., 15: 315-322, 1974.
38. GOLDMANN, R.; KEDEM, O.; SILMAN, I.; CAPLAN, S. and KATCHALSKI, E. Biochemistry., 7:486, 1966.
39. GOLDSCHMIDT, C. Ber. Dtsch. Chem., 29: 2438, 1896.
40. HAIR, L. M. The Chemistry of Biosurfaces Dekker, 1 New York, 1971.
41. HILL, L. G, Jr. An Introduction to Chemical Engineering Kinets & Reactor Desing. New York, John Wiley & Sons, 1977.
42. HOLZER, H. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 17: 659, 1884.
43. IMAI, K.; SHIOMI, T.; SATO, K. and FUJISHIMA, A. Preparation of immobilized invertase using poly (vinil alcohol) membrane. Biotech and Bioeng., 25:613-617, 1983.
44. IMAI, K.; SHIOMI, T.; UCHIDA, K. and MIYA, M. Immobiliza tion of enzyme into poly (vinyl alcohol) membrane.

- Biotech. and Bioeng., 28: 1721-1726, 1986.
45. IMAI, K.; SHIOMI, T.; UCHIDA, K. and Miya, M. Immobilization of enzyme onto poly (ethylene-vinyl alcohol membrane). Biotech. and Bioeng., 28:198 - 203, 1986.
 46. JAHN, H. U. S. Patent 1,355,834 (1920).
 47. JANES L. K.; ANGENSTEIN, L.G. Adv. Enzyme, 28: 1, 1966.
 48. KADOWAKI, H. Bull-chem.Soc.Japan, 11, 248, 1936.
 49. KATCHALSKI, E. Application of water-insoluble derivatives in basic and applied research. Ferment. Technol. Today., 353-359, 1972.
 50. KATCHALSKI, E.; BAR-ELI, A. Nature, 188: 856, 1960.
 51. KAWASHINA, K. & UMEDA, K. Immobilization of enzymes by radiopolymerization of acrylamide. Biotech. and Bioeng., 26:609-621, 1974.
 52. KAY, G. & CROOK, E. M. Nature, 216:514, 1967.
 53. KAY, G.; LILLY, M.D.; SHARP, A. K. & WILSON, R. J. H. Nature, 217:642, 1968.
 54. KLIBANOV, A. M. Anal. Biochem., 93:1, 1979.
 55. KOBAYASHI, T. & MOO-YOUNG, M. The Kinetic and mass transfer behavior of immobilized invertase on ion-exchange resin beads. Biotech. and Bioeng., 15: 47-67, 1973.
 56. LILLY, M. D. & DUNNIEL, P. Biochemical Reactors. Proc. Bioch., 29-32, August, 1971.

57. LORTIE, R. & THOMAS D. Heterogeneous one-dimensional model for fixed bed enzyme reactors. Biot. and Bioeng., 28: 1256-1260, 1986.
58. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J. FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenal reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-276, 1951.
58. LUDY, E. J. Chem. Soc., 56:1059, 1889.
60. MAEDA, H. e SUZUKI, H. Preparation of immobilized enzymes by N-vinyl pirolidone and the general properties of the glucoamylase gel. Biotech and Bioeng., 26:1517-1528, 1974.
61. MANO, E. B. Introdução a Polímeros. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, 1985, 111p.
62. MARCONI, W. et alii. Properties and use of invertase entrapped in fibers. Biotech. and Bioeng. 16:501-511, 1974.
63. MARK, H. et alii. Chemical Aftertreatment of Textiles. New York, Wiley-Interscience, 1791, 287p.
64. MARTENSSON, K. Preparation of on immobilized two-enzyme system, β -amylase-pullulanase, to an acrylic copolymer for the conversion of starch to maltose. Process kinetics studies on continuous reactors Biotech and Bioeng., 26: 1567-1587, 1974.
65. MARTINEK, K., MOZAEV, V. V. & BEREZIN, I. V. Enzyme engineering. New York, Plenum Press, 1980.

66. MASON, R. D.; DETAR, C. C. & WEETALL, H. H. Protease covalently compled to porous glass: Preparation and characterization. Biotech. and Bioeng., 27: 1019-1027, 1975.
67. MCCABE, W. L. & SMITH, J. C. Unit Operations of Chemical Enginnering. 3. ed. São Paulo, McGraw-Hill Internatio
nal Book Company, 1976.
68. McLAREN, A. D. J. Phys. Chem., 58: 129, 1954.
69. McCLAREN, A. D. & PACKER, L. Adv. Enzymol., 33: 245, 1970.
70. MEHTA, R. D. Textile Chemist and Colorist. 14(10): 206,
1982.
71. MESSING, R. A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors
New York, Academic Press, 1975.
72. MITZ, M. A.; SUMMARIA, L. Nature, 189:576, 1961.
73. MONSAN, P.; COMBES, D. & ALEMZADEH, I. Invertase covalent
grafting onto corn stover. Biotech.and Bioeng., 26:658-
664, 1984.
74. MONSON, P. & COMBES, D. Application of immobilized inver
tase to continuous hidrolysis of concentrated sucrose
solutions. Biotech. and Bioeng., 26:347-351, 1984.
75. MORATH, J. C. & WOODS, J. T. Analysis of amino-formal-
dehyde resins. Anal. Chem., 30(8):1437, 1958.
76. NAGAMOTO, H., YASUDA, T. & INOWE, H. Effect of Organic
solvents on the activity of glucoamylase. Biotech.
and. Bioeng., 28: 1172-1178, 1986.

77. NELSON, J. M. & GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. J. Am. Chem. Soc., 38:1109-1116, 1916.
78. NELSON, J. M. & HITCHCOK, D. I. The Activity of adsorbed invertase. J. Am. Chem. Soc., 43:1956-1961, 1921.
79. OLSON, A. C. & STANLEY, W. L. Lactase and other enzymes bound to a phenol-formaldehyde resin with glutaraldehyde. J. Agr. food chem., 21(3): 440-445, 1973.
80. OOSHIMA, H. et alii. Characteristics of immobilized invertase. Biotech. and Bioeng., 22:2155-2167, 1980.
81. ————. Kinetic study on thermal stability of immobilized invertase. Biotech. and Bioeng. 22:2169-2178, 1980.
82. PARK, Y. K. Enzymic properties of fungal amyloglucosidase-Resin complex. J. Ferment. Technol., 52(2):140-142, 1974.
83. PARK, Y. K. & LIMA, D.C. Continuous conversion of starch to glucose by an amyloglucosidase-Resin Complex. J. of Food Science, 38, 1973.
84. PERES, L. & BITTENCOURT, E. Desenvolvimento e caracterização de Imunosorventes e Avaliação de Desempenho em Ensaio Imunoenzimáticos. Tese submetida a provas de mestrado em Engenharia Química. UNICAMP, São Paulo, 1986.
85. PORATH, J., JACKOBY, W.B. & WILCHEK, M. Methods in Enzymology, 28. Academic Press, 1974, 13p.

86. RIBEIRO, E. J. & MORAES, I. O. Imobilização de Invertase em Resinas Trocadoras de Íons e Estudo Cinético de Inversão da Sacarose em Reator Tubular. Tese submetida a provas de mestrado em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, São Paulo, 1983.
87. RYN, D. Y. & CHUNG, S. H. Performance of the continuous glucose isomerase reactor system for the production of fructose syrup. Biotechnol., 19:159, 1977.
88. SALYER, I. O. & USMANI, A. M. Eletrosynthesis of open-pore urea/formaldehyde structure. J. of Applied Polymer Science, 22: 3469-3474, 1978.
89. SANDLER, S. R. & KARO, W. Polymer Synthesis Organic Chemistry. A Series of Monographs, 29-II. New York, Academic Press, 1977.
90. SARING, Y.; LHITTLE, R. W. & SEGERLING, L. J. Mechanical properties of ureia-formaldehyde foam. J. of Applied Polymer Science, 22:3469-3473, 1978.
91. SCHEIBLER, H., TROSLER, F. & SCHOLZ, E. Z. Angew. Chem., 41:1305, 1928.
92. SHIH, F. F., BERTORNIERE, N. R. & ROWZAND, S. P. Polymerization-crosslinking of N-methylolmethocrylamide in cotton fabric. Textile Research Journal, 433-439, July, 1980.
93. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.

3. ed. Guanabara Dois, 1979.
94. SMITH, J. M. Chemical Engineering Kinetics. 3.ed. New York, McGraw Hill Book Company, 1981.
95. SMYTHE, L. E. Phys. Colloid Chem., 51:369, 1947.
96. SOLOMON, B. & LEVIN, Y. Adsorption of amyloglucosidase on inorganic carries. Biotech. and Bioeng., 27:1323-1333, 1975.
97. SUZUKI, H. et alii. Studies on the water-insoluble enzyme hydrolysis by insoluble yast invertase. Agr. Biol.Chem., 30(8):807-812, 1966.
98. SYNOWIECKI et alii. Immobilization of invertase on Krill Chitin. Biotech. and Bioeng., 23: 231-233, 1981.
99. TANAKA, A.; YASUHARA, S.; FUKIN, S. & IIDA, T.
Immobilization of invertase by the use of photocrosslinkable resin oligamers and properties of the immobilized enzyme. J. Ferment. Technol., 55(1):71-75, 1977.
100. THORNTON, D. et alii. The preparation and properties of hornblend a support for immobilized invertase. Biotech. and Bioeng., 17:1679-1693, 1975.
101. TREVAN, M.D. Immobilized Enzymes-An Introduction and Applications in Biotechnology. New York, John Wiley, 1980.
102. URBANSKI, J. et alii, Handbook of Analyses of Sintetic Polymers and Plastic. New York, John Wiley & Sons, 1977.

103. USAMI, S.; HASEGAWA, E. & KARASAWA, M. Preparations properties of immobilized saccharase by various methods. Hakko Kyokaeshi, 33:152-159, 1975.
104. USAMI, S.; NODO, J. & GOTO, K. Preparation and properties of water-insoluble saccharase. J. Ferment. Technol., 49(7):598-603, 1971.
105. USAMI, S. and SHIRASAKI, H. Kinetics of enzyme adsorbed on adsorbent. J. of Ferment. Technol., 48: 506, 1970.
106. VOGEL, R. E. Kunststoffe, 31:309, 1941.
107. WASSERMAN, B. P.; BURK, D. & JACOBSON, B. S.
Immobilization of glucoamylase from *Aspergillus Niger* on poly (ethylenimine)-coated non-porous glass beads. Enzyme Microb. Technol., 4, march, 1982.
108. WEETALL, H. H. Immobilized Enzymes: Analytical Applications. Anal. Chemistry, 46:602, 1974.
109. WEETALL, H. H. Immobilized enzymes: and their application in the food and beverage industry. Proc. Bioch., 3-30, July/August, 1975.
110. WESEMAN, A. & WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. Proc. Bioch., 10(6): 24-30, 1975.
111. WEYKER, R. G.; BAITINGER, W. F., Jr. & MARCO, J. C.
N-methylacrylamide textile finish containing citric acid or dicyandiamide, U.S. Pat. 3,669,609, June, 1972.
112. WILSON, R.J.H. & LILLY, M.D. Preparation and use of insolubilized amyloglycosidase for the production of

- sweet glucose liquors. Biotech. and Bioeng., 11:349, 1975.
113. WINGARD Jr., L. B. & PYE, E. K. Enzyme Enginerring. New York, Plenum Press, 1974.
114. WOHNSIEDLER, H. P. Urea-formaldehyde and Melamine-formaldehyde condensation. Ind. and Engineering Chem., 44(11). november, 1952.
115. ZABORSKY, O. Immobilized Enzymes. 1. ed. Cleveland, CRC Press, 1973.
116. ZANIN, G. M. e MORAES, F. F. Amiloglicosidase imobilizada em suportes inorgânicos: Preparação e estabilidade operacional em microreator de leite fluidizado. Rev. Bras. Eng. Quím., 7(1): 47-58, 1983.
117. ZANIN, G. M.; TRINTIN, R.D. e MORAES, F.F. Imobilização de enzima em microesferas de vidro - ANAIS DO 1º SEMINÁRIO DE CATÁLISE, IBP - Rio de Janeiro, 1981, p.116.
118. ZITTLE, A. C. Adv. Enzymol. 14:319, 1953.