

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

**“ Síntese de Macro Esferas Porosas de Amino Polímeros:
Aplicação em Imobilização de Biocompostos.”**

Autor : Rodrigo Cirillo Baltieri

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena I. Mei

Dissertação submetida à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Grau de “ Mestre em Engenharia Química “ .

Campinas , São Paulo , Brasil

Março-1996

15/03/96



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	UNICAMP		
V.	Ex.		
TUMBO BC/	36314		
PROD	229/99		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	27/01/99		
N.º CPD			

CM-00120269-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B217s Baltieri, Rodrigo Cirillo
Síntese de macro esferas porosas de amino polímeros:
aplicação em imobilização de biocompostos. / Rodrigo
Cirillo Baltieri.--Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Lúcia Helena I. Mei.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Aminoplásticos. 2. Esfera. 3. Enzimas
imobilizadas. I. Mei, Lúcia Helena I. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

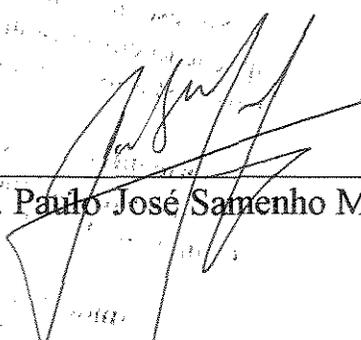
Dissertação defendida e aprovada, em 18 de março de 1996, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Helena Innocentini Mei



Prof^ª. Dr^ª. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro



Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran

Essa versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Rodrigo Cirillo Baltieri, e aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de março de 1996.



Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena I. Mei
Orientadora

Aos meus pais pelo amor ,
dedicação e oportunidades
a mim concedidas .

Agradecimentos.

À Professora Doutora Lúcia Helena Innocentini Mei, pela valiosa e dedicada orientação a realização deste trabalho.

Às colegas Daniella Collobialli e Máira P. Shiki pela inestimada ajuda prestada durante a realização da parte experimental deste trabalho.

À Rita, pelas horas dedicadas a análises de microscopia eletrônica, à Márcia, pelas análises espectroscópicas e à Manuella pelos dados de porosimetria de mercúrio e de área superficial.

À Professora Doutora Wirla M. S. C. Tamashiro pela grandiosa ajuda e atenção a mim prestada durante a realização dos testes ELISA .

Aos alunos e técnicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia desta universidade pela ajuda nos imunoensaios .

Ao Professor Doutor Ronaldo A. Pilli e Valéria Briotti pela ajuda prestada nos estudos preliminares com a lipase imobilizada.

A todos os amigos do Departamento de Tecnologia de Polímeros pela ajuda e sugestões na realização desta dissertação.

À Mônica Monteiro pela amizade , apoio e dedicação.

Ao meu filho Yago pelo simples fato de existir.

À todos meus familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se tornasse possível.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas pela colaboração e ajuda.

E ao CNPq pela ajuda financeira para execução deste trabalho.

“Viver , é aceitar cada minuto
como um milagre que
não poderá ser repetido.”

Autor desconhecido

Resumo

Neste trabalho foram sintetizadas as resinas de N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído a partir da reação de condensação da acrilamida e uréia, respectivamente, com o formaldeído.

Essas resinas e o monômero de acrilamida foram utilizados na síntese de macro esferas porosas através do gotejamento de suas respectivas soluções em óleo de silicone quente. Foram sintetizadas esferas de poli (N-metilolacrilamida), poli (uréia-formaldeído), poliacrilamida e poliacrilamidas recobertas por N-metilolacrilamida.

As resinas assim como as esferas foram caracterizadas por espectroscopia de infra-vermelho(I.V.). As esferas foram ainda caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura(MEV), porosimetria de mercúrio e área superficial (BET).

As esferas de poli (N-metilolacrilamida), poli (uréia-formaldeído) e poliacrilamida apresentaram estruturas porosas como verificado por análises microscópicas, por porosimetria e pela área superficial. Sua principal utilização foi em imunoenaios do tipo ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), onde as esferas serviram como suporte para imobilização de imunoglobulina(Ig) em análises de anti-imunoglobulina (a-Ig) de camundongo, marcada com peroxidase. As respostas destes testes foram analisadas em função da; variação da concentração de Ig e de a-Ig, variação do pH de imobilização e variação do polímero-suporte .

Os resultados obtidos mostraram que as esferas sintetizadas apresentam boas respostas frente a imobilização de imunoproteínas, com exceção da poliacrilamida a qual não foi possível analisar devido sua dissolução no meio reacional. Dentre as esferas testadas, as de N-metilolacrilamida apresentaram

melhores resultados dando respostas até diluição de 1:64000 de a-Ig e 1 $\mu\text{g/ml}$ de solução de Ig para imobilização em pH 4,5.

As esferas foram também analisadas quanto a sua capacidade de imobilizar a lipase para estudos posteriores de seu uso em reação de esterificação catalizada por esta enzima.

A quantidade de lipase imobilizada foi maior em pH=4,0; porém as melhores propriedades catalíticas foram observadas em pH=7,0.

Abstract

The work presented here concerns the synthesis of N-Methylolacrylamide (NMA) and Urea-formaldehyde (UF) resins through the polycondensation reactions of the acrylamide and urea with formaldehyde.

These resins and the acrylamide monomers were used in the synthesis of microspheres. Their solutions were dropped in hot silicon oil; after that microspheres of poly (N-methylolacrylamide), poly (urea-acrylamide), polyacrylamide and polyacrylamide coated with N-Methylolacrylamide were obtained.

The resins and the microspheres were characterized by using infrared spectroscopy (FTIR). The microspheres were analysed by scanning electron microscopy (SEM), mercury porosimetry and superficial area (BET).

The microspheres of poly (N-methylolacrylamide), poly (urea-formaldehyde) and polyacrylamide showed porosity as verified by electronic microscopy, mercury porosimetry and superficial area.

The microspheres were used in immunoassay, type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), as support to immobilize mouse immunoglobulin (Ig) in assays using mouse anti-immunoglobulin (α -Ig) labeled with horseradish peroxidase (HRP).

The parameters as the pH of the immobilization, the concentration of Ig and α -Ig and the support were varied to analyse their influences in the ELISA assays.

The polyacrylamide spheres were not analysed because they were soluble in the reaction medium, but the other microspheres showed excellent results in the ELISA assays. The poly (N-methylolacrylamide) microspheres

showed the best results of all. Responses were obtained up to a dilution 1:64000 of a-Ig and 1 μ g/ml of Ig solution to immobilization in pH=4,5.

In preliminary studies the macrospheres were used to immobilize lipase and then they were tested in the esterification reaction of the 3-Benzyloxy-1,2-propenediol with vinyl acetate.

It was observed that the best pH value for the lipase immobilization is 4,0 but its catalytic efficiency was observed at pH=7,0.

Lista de Abreviações

A – Absorbância.

a-Ig – anti-imunoglobulina.

ATP – Área Total de Poro.

BET – Método de Análise de Área Superficial.

D – Densidade

DMP – Diâmetro Médio de Poro.

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

FTIR – Espectroscopia de Infra Vermelho de Coordenadas de Furier.

HPR – Horseradish Peroxidase.

Ig – Imunoglobulina.

I.V. – Infra Vermelho.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

NMA – N- metilolacrilamida.

OPD – Orto Fenileno Diamino.

P – Porosidade.

PA – Poliacrilamida.

PA-rec – Poliacrilamida Recoberto com N-metilolacrilamida.

PBS – Tampão Salino Fosfato.

PS – Poliestireno.

THF – Tetra Hidro Furano.

U-F – Uréia-Formaldeído.

VTI – Volume Total de Intrusão.

Sumário

Tópicos	Página
Capítulo 1 – Introdução.....	01
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....	05
2.1 – Imobilização de Biocompostos.....	06
2.1.1 – Introdução.....	06
2.1.2 – Histórico da Imobilização.....	06
2.2 – Tipos de Imobilização.....	10
2.3 – Aplicação de Enzimas Imobilizadas.....	16
2.4 – Aspectos Econômicos.....	17
2.5 – Métodos Imunoquímicos – Teste ELISA.....	23
2.5.1 – Classificação dos Métodos ELISA.....	24
2.5.2 – Escolha da Enzima.....	29
2.5.3 – Conjugado Enzima-Antígeno ou Enzima-Anticorpo.....	31
2.5.4 – Os Imunoabsorventes.....	32
2.5.5 – Sensibilidade.....	34
2.5.6 – Especificidade.....	34
2.5.7 – Reprodutibilidade.....	34
2.6 – Os Suportes.....	35
Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....	44
3.1 – Síntese das Resinas.....	45
3.1.1 – Resina de N-metilolacrilamida.....	45
3.1.2 – Resina Uréia-Formaldeído.....	46
3.2 – Síntese das Macro Esferas.....	48

3.2.1 – Esferas de poli-N-metilolacrilamida.....	48
3.2.2 – Esferas de poli Uréia-Formaldeído.....	49
3.2.3 – Esferas de poli Acrilamida.....	50
3.2.4 – Esferas de poli Acrilamida Recobertas por N-metilolacrilamida.....	51
3.3 – Caracterização das Resinas e Esferas.....	52
3.3.1 – Espectroscopia de FTIR.....	52
3.3.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV).....	52
3.3.3 – Porosimetria de Mercúrio.....	52
3.3.4 – Área Superficial.....	53
3.4 – Análise dos Parâmetros de Imobilização para Teste ELISA.....	53
3.5 – Determinação dos Níveis de Detecção das Esferas para Teste ELISA.....	56
3.5.1 – Comportamento com a Variação de a-Ig.....	56
3.5.2 – Comportamento com a Variação de Ig.....	57
3.5.3 – Comportamento em Relação a Diferentes Suportes e pHs de Imobilização.....	57
3.6 – Estudos Preliminares da Imobilização de Lipase..	58
3.6.1 – Curva de Calibração.....	58
3.6.2 – Imobilização da Lipase.....	62
3.6.3 – Reação de Esterificação do Álcool 3-benziloxi 1,2-propanodiol com Acetato de Vinila.....	63
Capítulo 4 – Resultados e Discussões.....	66
4.1 – Caracterização das Resinas e Esferas.....	67
4.1.1 – Aspectos Físicos.....	67
4.1.2 – Análise de Espectroscopia de FTIR.....	68

4.1.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV).. .	74
4.1.4 – Área Superficial (BET).....	83
4.1.5 – Porosimetria de Mercúrio.....	84
4.2 – Resultados dos Estudos dos Parâmetros para Teste ELISA.....	85
4.2.1 – Resultados do Teste ELISA Frente a Variação de a-Ig.....	87
4.2.2 – Resultados do Teste ELISA Frente a Variação de Ig de camundongo.....	90
4.2.3 – Resultados do Teste ELISA Frente a Variação do pH de imobilização e Natureza do Suporte.....	94
4.3 – Imobilização da Lipase.....	97
4.3.1 – Estudos Preliminares do Uso da Lipase Imobilizada em Reação de Esterificação.....	97
Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões.....	101
5.1 – Conclusões.....	102
5.2 – Sugestões.....	103
Revisão Bibliográfica.....	104

Capítulo 1

Introdução

Muitos diferentes métodos de imobilização em diferentes suportes tem sido analisados, envolvendo níveis diferentes de complexibilidade e eficiência. Muitos trabalhos tem usado diferentes matrizes poliméricas, como Amberlite (XAD2 ,XAD4 , XAD7 e XAD8), poli ácido carboxílico, poliacrilonitrila, vidro entre outros, em forma de esferas de diversos tamanhos ⁽¹⁾⁽²⁾.

A possibilidade de sintetizar macro esferas porosas a partir de resinas que apresentavam boas qualidades de imobilização foi o marco inicial desta dissertação. Alguns trabalhos realizados com a uréia-formaldeído e N-metilolacrilamida, tanto no aspecto de imunoensaios, teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), como no aspecto de imobilização de enzima e utilização em leite fluidizado levaram a escolha destas resinas. Esses suportes apresentam baixo custo e são de fácil preparação, além de apresentarem grupos funcionais N-metilol (-NH-CH₂OH) em sua estrutura reticulada, capazes de reagir com vários grupos nas proteínas, no caso de enzimas, sem comprometimento de seus sítios ativos ⁽³⁾⁽⁴⁾.

As enzimas são catalisadores biológicos formados por proteínas que participam da maioria das reações nas células vivas. Um característica fundamental, que distingue as enzimas dos catalisadores químicos, é sua capacidade de exercer sua atividade com grande especificidade e sob condições suaves de temperatura pressão e pH⁽²⁾⁽⁵⁾.

O uso de enzima tem-se estendido gradualmente a vários campos, como na fabricação de bebidas, produção de alimentos, no tratamento de efluentes e nas análises clínicas, como por exemplo em testes ELISA. Porém, salvo alguns processos de hidrólise que atualmente empregam catalisadores enzimáticos, seu uso industrial é limitado pelo seu alto custo e instabilidade . Outra dificuldade para utilização industrial de enzimas é sua difícil recuperação do meio reacional, ainda na forma ativa.

O uso de enzima como marcadoras de imunoproteínas para imunoenaios tem crescido bastante nos últimos anos devido sua alta sensibilidade combinada com sua alta especificidade. Entre as técnicas de análise de imunoproteínas, o teste ELISA tem sido utilizado rotineiramente em comparação aos radioimunoensaios devido sua baixa periculosidade e baixo custo.

O método ELISA baseia-se na imobilização de um antígeno ou de um anticorpo em um suporte insolúvel. Esse biocomposto imobilizado, antígeno ou anticorpo, é exposto a anticorpos ou antígenos marcados com enzimas resultando em um conjugado antígeno-anticorpo-enzima ou anticorpo-antígeno-enzima. Ao se expor esse conjugado a um substrato e um cromógeno adequado observa-se uma coloração na solução podendo ser analisada através de leituras de absorbância em espectrofotômetro de U.V.-visível.

A imobilização de biocompostos pode ocorrer através de vários processos como ligação iônica, ligação covalente, adsorção física, reticulação, por captura em géis e fibras ou por encapsulamento dentre outros⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

Ela se baseia na limitação do movimento da enzima mantendo-a numa região relativamente definida no espaço, conservando suas propriedades catalíticas⁽⁵⁾.

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 de substrato;
- Permitir a reutilização da enzima;
- Diminuir o custo de produção.

A utilização de macroesferas facilita bastante o processo de separação das enzimas imobilizadas do meio reacional bem como abre a possibilidade de

utilização como suporte de colunas no campo de química analítica, como em cromatografia de afinidade. Uma outra vantagem é a presença de poros que aumentam a área superficial da matriz, possibilitando aumentar a concentração de biocompostos imobilizados.

As resinas uréia-formaldeído e N-metilolacrilamida já foram utilizadas na forma de discos suportados em tecidos de poliéster⁽³⁾⁽⁴⁾. É também conhecida a síntese de resinas de uréia-formaldeído e de acrilamida através de emulsões que resultam em microesferas porém se desconhece, até o momento, a existência de macro esferas.

Esta dissertação tem os seguintes **OBJETIVOS**:

- 1. Síntese e caracterização das resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído e sua caracterização por espectroscopia de I.V..
- 2. Síntese de macro esferas porosas a partir das resinas sintetizadas e do monômero de acrilamida.
- 3. Caracterização das esferas por espectroscopia de I.V., microscopia eletrônica de varredura, porosimetria de mercúrio e análise de área superficial (BET).
- 4. Estudo dos parâmetros de imobilização para utilização em teste ELISA.
- 5. Estudo de imunoensaios utilizando as esferas obtidas e comparação com os resultados de testes utilizando suporte comercial (placa de poliestireno).
- 6. Imobilização de lipase nas esferas de N-metilolacrilamida.
- 7. Estudo preliminar do comportamento da lipase imobilizada frente a uma reação de esterificação.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Imobilização de Biocompostos

2.1.1. Introdução

As enzimas, diferentes dos catalizadores de baixo peso molecular, possuem propriedades catalíticas específicas, além de operarem em condições brandas de pH e temperatura, sendo amplamente utilizadas em laboratórios. Entretanto, seu uso é inviável economicamente pois elas podem ser usadas apenas uma vez e a sua recuperação e purificação constituem processos bastante dispendiosos⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

As enzimas utilizadas comercialmente são, em sua maioria, exoenzimas, ou seja, enzimas secretadas pelas células designadas para trabalhar em meio aquoso. Devido à sua relativamente boa estabilidade e facilidade de isolamento, sua utilização comercial tem sido altamente explorada⁽⁹⁾.

A área de imobilização de enzimas tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos. A imobilização geralmente é feita em matrizes, o que pode tornar as enzimas mais eficientes em muitos casos e com inúmeras vantagens distintas em relação à sua estrutura em solução, tal como sua fácil separação, permitindo sua reutilização, bem como o aumento de sua estabilidade⁽⁹⁾.

2.1.2. Histórico da Imobilização

Muito antes que as técnicas de imobilização fossem conhecidas, catalisadores imobilizados já estavam em uso em processos em escala industrial⁽⁸⁾.

Em 1815 foi descoberto, por meio puramente empírico, que o vinagre poderia ser eficientemente produzido pelo álcool contido em raspas de alimentos, devido às bactérias aderidas nestes pequenos pedaços de matéria, constituindo um sistema de imobilização efetiva. O desenvolvimento de um método de origem puramente empírico não torna esse processo totalmente

inviável em biotecnologia. De fato, muitos processos que utilizam microorganismos, assim como a produção de bebidas alcólicas, queijos e pães já eram praticados muito antes da descoberta do envolvimento destes microorganismos⁽⁸⁾.

A tabela 1 ilustra resumidamente as etapas de desenvolvimento das técnicas de imobilização, tomando como critério a primeira imobilização em larga escala que se tem conhecimento, antes que o processo fosse desenvolvido em laboratório. Os biocatalisadores localizados na etapa II são normalmente denominados como os de primeira geração, enquanto que os da terceira etapa são denominados biocatalisadores de segunda geração⁽⁸⁾.

Em torno de 1916 foi reportado por Nelson e Griffin⁽¹⁰⁾ que o carvão ativo conservava sua habilidade de romper a sucrose após o contato com fermento de invertase e lavagens subsequentes, sendo o primeiro artigo publicado a respeito de imobilização de enzimas. Por muito tempo nenhuma atenção foi dada a este assunto, porém após a Segunda Guerra Mundial novos estudos nesta área apareceram. As publicações ressurgiram durante os anos 50 demonstrando o desempenho de polímeros sintéticos para o uso em imobilização de proteínas⁽⁸⁾.

A partir de 1960 ocorreu um enorme crescimento de publicações nesta área refletindo o interesse mundial. A primeira aplicação industrial em 1969 veio como uma consequência lógica e inevitável da intensificação do interesse científico neste campo. Baseado em um trabalho realizado por Chibata⁽¹¹⁾, a companhia japonesa Tanabe Seiyaku introduziu um método de produção do L-aminoácido da mistura racêmica usando a enzima L-aminoacilase ligada ionicamente a um suporte insolúvel. Além desses processos em larga escala, utilizando reações simples com enzimas sem o cofator de regeneração, outros ocorreram no início da década de 70 principalmente nos EUA e Japão⁽⁸⁾.

Tabela 1 - Principais etapas no desenvolvimento das técnicas de imobilização de biocompostos⁽⁸⁾.

ETAPA	DATA	DESCRIÇÃO	PROCESSOS TÍPICOS
I	1815	Uso empírico de microorganismo imobilizado sem conhecimento dos detalhes de imobilização.	Processos de gotejamento para produção de ácido acético e tratamento de águas residuais.
II	1969	Reações simples com uma enzima sem cofator de regeneração.	Produção de L-aminoácidos e Isomerização de glicose.
III	1985	Reação com duas enzimas incluindo o cofator de regeneração.	Produção de L-aminoácidos em reatores de membrana.

Devido a importância do assunto, foi realizada a primeira “Conferência de Engenharia de Enzimas” nos EUA, em 1971, com maior ênfase aos temas relacionados à imobilização de enzimas. Entre outras coisas o termo “enzima imobilizada “ foi recomendado nesta primeira reunião, no sentido de normalizar a linguagem científica com relação aos diferentes nomes usados até aquela data, tais como enzimas “fixadas”, “insolubilizadas”, “ligadas a matriz”, dentre outros. Ainda na mesma conferência surgiu uma classificação para as enzimas imobilizadas⁽⁸⁾.

Embora até o final dos anos 70 somente enzimas simples imobilizadas eram de interesse para a pesquisa e desenvolvimento, foi nessa época que sistemas mais complexos surgiram. Não só células vivas como também as

organelas começaram a receber mais atenção por parte dos pesquisadores. Assim, em 1975 Mosbach e col. desenvolveram o primeiro método em laboratório para ligar e regenerar coenzimas, até o final daquela década já haviam sido imobilizados microorganismos, células de plantas e culturas de tecido animal⁽⁸⁾.

Um desenvolvimento bastante importante ocorreu em meados dos anos 80 com a produção em escala industrial dos L-aminoácidos a partir de cetoácidos. Este foi um processo de duas enzimas envolvendo uma coenzima de regeneração em reatores de membranas e foi desenvolvido pelo grupo de pesquisadores de Wandrey e Kula⁽⁷⁾, ligados à companhia alemã Degusa. Com isso, a técnica de aplicação de biocatalisadores de segunda geração ficou conhecida⁽⁸⁾.

Publicações de trabalhos anteriores, relativos à imobilização de biocompostos, estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo de algumas publicações importantes sobre enzimas imobilizadas⁽³⁾.

DATA	ADSORVENTES	ENZIMA	AUTORES
1921	Alumina e carvão ativo	Invertase	Nelson e Hitchcok ⁽¹²⁾
1949	Derivado de ácido carboximetil celulose	Várias proteínas	Michael e Ewers ⁽⁵⁾
1953	Poliestireno	Pepsina Amilase Carboxipeptidase	Gruubhofer Shleith ⁽⁵⁾
1961	Copolímeros orgânicos a base de celulose	Tripsina Quimotripsina	e Mitz e Summaria ⁽¹³⁾
1967	Celulose , na forma de papel de filtro	Galactase Lactase Desidrogenase Piruvato quinase	Kay e Crook ⁽¹⁴⁾

Foram usados outros materiais com relativo sucesso, tais como: vidro (Weetall, 1969), Nylon (Inman e Hornby, 1972), e os derivados de poliacrilamida (Inman e Durtzis, 1969)⁽¹⁵⁾.

2.2. Tipos de Imobilização.

Existem vários métodos de se imobilizar enzimas e essas podem ser classificadas de acordo com a natureza da interação responsável pela imobilização e com a natureza do suporte. Esses métodos estão resumidos na figura 1.

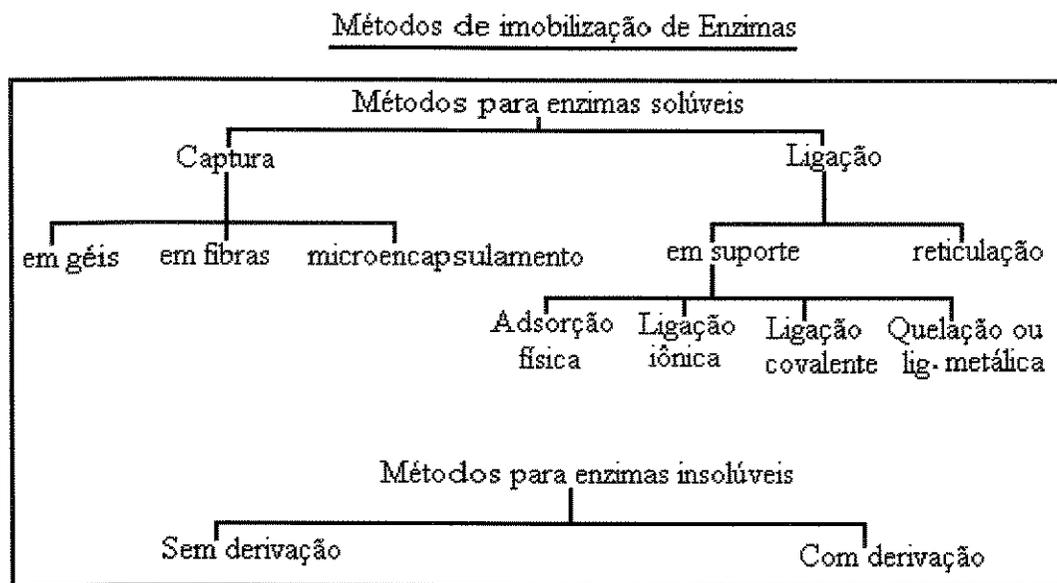


Figura 1 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas⁽¹⁶⁾.

Nos últimos anos, os métodos de imobilização tem crescido enormemente. A seguir estão citados alguns dos métodos mais conhecidos:⁽¹⁶⁾

2.2.1 Captura.

Este método é baseado na imobilização de enzimas dentro da estrutura de uma matriz polimérica ou membrana impedindo a perda da proteína e permitindo a penetração do substrato. Pode ser dividido em:⁽¹⁶⁾

2.2.1.1 Captura em gel - Este envolve a captura de enzimas dentro dos espaços intersticiais de géis de polímeros reticulados, insolúveis em água. Este método foi usado primeiramente por Bernfeld e Wan em 1963 para imobilizar tripsina e outros compostos em géis de poliacrilamida⁽¹⁶⁾.

2.2.1.2 Captura em fibras - Consiste em aprisionar enzimas dentro de microcavidades de fibras sintéticas, tal como o trabalho desenvolvido por Dinelli em 1972⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

2.2.1.3 Microencapsulamento - Neste método as enzimas são encapsuladas dentro de cavidades esféricas de membranas poliméricas semipermeáveis, ou seja, permeável ao substrato e produto e impermeável às enzimas. Este método foi usado primeiramente por Chang em 1964⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾.

2.2.2 Ligação em suportes.

A ligação de enzimas a suportes insolúveis consta como o método de imobilização mais antigo e o mais utilizado, segundo se observa na literatura, ele surgiu em 1916 desenvolvido por Nelson e Griffin⁽¹⁰⁾⁽¹⁶⁾.

Para este tipo de imobilização, os suportes devem apresentar algumas propriedades, tais como:⁽¹⁹⁾

- a) Estabilidade térmica;
- b) Durabilidade química;
- c) Funcionalidade química;
- d) Resistência mecânica;
- e) Resistência à microorganismos;
- f) Alta capacidade de imobilização;
- g) Baixo custo;
- h) Hidrofobicidade.

Quanto à natureza da interação enzima-suporte, podemos dividi-la em:

2.2.2.1 Adsorção física - Neste caso não ocorre a formação de ligação química, pois as moléculas são presas à superfície polimérica somente por forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, quimisorção ou troca iônica. Neste tipo de interação, qualquer variação de pH, temperatura ou força iônica do meio poderá causar a liberação do material imobilizado devido as forças que regem este tipo de imobilização serem de caráter muito fraco⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾.

2.2.2.2 Ligação iônica - Este método é baseado na utilização de suportes de resinas contendo grupos trocadores de íons. O primeiro a utilizar esse método foi Mitz em 1956 que empregou a DEAE-celulose para imobilizar a catalase⁽¹⁶⁾⁽²⁰⁾.

2.2.2.3 Quelação ou ligação metálica - É um método relativamente novo e está baseado na utilização de metais de transição, que ativam a superfície da matriz polimérica permitindo a ligação da enzima com o suporte ativado através da formação de quelatos⁽¹⁶⁾.

2.2.2.4 Ligação covalente - Este é o método de imobilização mais estudado e é baseado na formação de ligações covalentes entre a matriz polimérica e a enzima. Para que este tipo de ligação ocorra, condições mais drásticas são usadas. A ligação covalente se dá pelos grupos amino e carboxi terminais (-NH₂, -COOH) das proteínas ou grupos aminos pendentes contendo resíduos de lisina, histidina (grupos imidazol) e arginina (grupos guanidil) com os grupos ativos do suporte insolúvel, como aldeídos, aminos, diazônios, azidas ácidas, isocianatos e haletos. Este tipo de ligação tem a vantagem de

não ser reversível frente a mudanças de pH, força iônica ou substrato, porém a ligação pode causar alterações na enzima, mudando sua atividade ou até desativando totalmente a mesma⁽⁹⁾⁽¹⁶⁾.

2.2.3 Reticulação.

Este método é baseado na formação de ligações covalentes entre as moléculas de enzima, através de reagentes bi- e multi- funcionais, resultando em agregados reticulados tridimensionais. Esse método foi descrito primeiramente por Quioco e Richards em 1964, os quais utilizaram a carboxipeptidase A com glutaraldeído⁽¹⁶⁾.

A tabela 3 mostra as principais características dos diferentes métodos de imobilização .

Tabela 3 - Comparação das principais características dos diferentes métodos de imobilização⁽¹⁶⁾.

Caracterís- ticas	Reticula- ção	Adsorção Física	Ligação iônica	Quelação	Ligação covalente	Captura
Prepara- ção	Interme- diário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força de ligação	Forte	Fraca	Interme- diária	Interme- diária	Forte	Interme- diária
Atividade da enzima	Baixa	Interme- diária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Regenera- ção do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Raro	Impossível
Custo da imobiliza- ção	Interme- diário	Baixo	Baixo	Interme- diário	Alto	Interme- diário
Estabili- dade	Alta	Baixa	Interme- diária	Interme- diária	Alta	Alta
Comum aplicabili- dade	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção da enzima de ataque microbial	Possível	Não	Não	Não	Não	Possível

2.3. Aplicações de enzimas imobilizadas

As aplicações práticas das enzimas imobilizadas podem ser divididas em três categorias, isto é: uso analítico, terapêutico e industrial⁽¹⁵⁾.

As aplicações analíticas podem ser observadas através de duas técnicas, ou seja: a de eletrodos enzimáticos e a de análises automáticas. Os eletrodos enzimáticos consistem de uma célula capaz de gerar um potencial elétrico através de uma reação catalisada por uma enzima imobilizada ao redor da célula. Esse tipo de sensor é amplamente utilizado na determinação de uréia, glicose, ácido láctico, etanol, colesterol, aminoácidos, entre outras substâncias⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.

Outra utilização que surgiu e tem sido amplamente utilizada no mercado, devido sua praticidade e baixo custo, são os kits de diagnóstico, os quais são baseados na imobilização de enzima e de um agente cromógeno. Na presença do substrato adequado, o papel muda de cor devido a ação do agente cromógeno sobre o produto da reação catalisada pela enzima imobilizada. Um dos primeiros kits foi o Chimistix, desenvolvido pelo Miles Laboratories, para ser utilizado na dosagem de glicose e possível diagnóstico de diabete. Outros kits como os de dosagem de colesterol, de ácido úrico, de triglicerídeos, entre outros, podem ser encontrados⁽¹⁶⁾.

Um método amplamente utilizado, porém em escala laboratorial, é o ELISA, o qual utiliza biocompostos imobilizados combinados com enzimas no diagnósticos de doenças infecto-contagiosas como chagas, AIDS, hepatite entre outras⁽²¹⁾.

A cromatografia de afinidade possui também uma ampla utilização, principalmente para isolar inibidores enzimáticos e peptídeos marcados. Este método consiste em utilizar colunas com enzimas imobilizadas por onde um eluente será passado, permitindo o contato e a posterior formação do

complexo enzima-substrato que poderá ser revertido no fim da análise pela passagem de um tampão ácido⁽¹⁶⁾.

Como agente terapêutico, enzimas imobilizadas, contidas em cápsulas de polímeros não alérgicos podem ser ingeridas por indivíduos que apresentem problemas de deficiência ou mesmo ausência de determinada enzima no organismo. A injeção intravenosa de enzimas imobilizadas em cápsulas, semelhante a hemácias artificiais, resulta num rápido acúmulo destas no fígado e no baço, onde as cápsulas são rapidamente degradadas, liberando as enzimas⁽¹⁵⁾.

As aplicações biomédicas das enzimas imobilizadas situam-se num estado de estudo básico, devido a necessidade de pré-requisitos básicos, tais como: ausência de toxicidade, de hemólise, de alergia, de estabilidade química “in vitro” e de reação imunológica⁽²²⁾.

2.4. Aspectos econômicos .

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

Não se torna difícil observar a importância das enzimas, porém não é fácil obter dados de mercado confiáveis para se fazer uma análise econômica mais precisa devido a não existência de critérios fixos de avaliação. Uma avaliação aproximada pode ser encontrada na tabela 4 adiante onde apresenta-se o valor de consumo mundial em dólares para as principais enzimas no âmbito industrial⁽⁸⁾ .

Das enzimas de importância na indústria, a glicose isomerase e a lactase tem sido aplicadas quase exclusivamente na forma imobilizada. Por outro lado, as enzimas como a penicilina acilase, a L-amino acilase, raramente aparecem no mercado internacional. Elas são, em muitos casos, preparadas no momento da utilização devido sua baixa estabilidade e quantidades desejadas. Para biocatalisadores mais complexos, não existe nenhuma estimativa de mercado⁽⁸⁾.

Embora o número de companhias que comercializam enzimas seja aproximadamente 1000, o número de enzimas produzidas é muito menor. Ao todo, nos EUA e Europa Ocidental existem cerca de trinta empresas produzindo enzimas. Muitas delas são filiais de indústrias químico-farmacêuticas, onde o lucro obtido nessa atividade é bem menor que aquele obtido com seus principais produtos. No Japão, existem aproximadamente 20 companhias produzindo enzimas, sendo que algumas delas produzem para seu próprio consumo. Cerca de 90% da produção de enzimas são provenientes de apenas 10 grandes empresas⁽⁸⁾.

Das filiais das indústrias que empregam enzimas, as de produtos de limpeza e as de amido são as mais importantes. Juntas elas consomem quase 2/3 do total da produção mundial do mercado internacional⁽⁸⁾.

Tabela 4 - Estimativa do consumo das principais enzimas comerciais⁽²⁾.

Grupo de Enzimas	Enzimas	Consumo Anual em US\$ (em milhões)
Enzimas Proteolíticas	Protease Bacteriana	105
	Renina de Bezerro	50
	Renina Microbiana	18
	Papaina	13
	Protease de Pâncreas	7
	Protease Fungal	6
	Pepsina	1
Enzimas Degradantes de Polissacarídeos	Glucoamilase	55
	α - Amilase Bacteriana	25
	Pectinase	20
	α - Amilase Fungal	5
	Celulase e outras	2
	β - Glucanases	
Outras Enzimas	Glicose Isomerase	23
	Invertase	3
	Glicose Oxidase	2
	Lipase	1
	β - Galactosidase	1
TOTAL		US\$ 340 Milhões

Considerando-se que cerca de 2500 enzimas são conhecidas e uma mínima parte delas são bem caracterizadas, temos cerca de 300 enzimas sendo utilizadas comercialmente, porém menos de 20 delas são produzidas em escala industrial, o que é um valor surpreendentemente baixo. Considerando que o valor total de dinheiro movimentado anualmente com enzimas é de aproximadamente US\$ 350 milhões, este valor pode ser considerado bastante modesto em comparação com os lucros obtidos pelas grandes indústrias químicas e farmacêuticas. Isto pode ser explicado devido as propriedades catalíticas das enzimas, o que torna possível um largo espectro de processos dos quais são produzidos produtos com valores de mercado centena de vezes maiores que os valores das próprias enzimas ⁽⁸⁾.

Na figura 2 abaixo pode-se observar os mais importantes campos de utilização de enzimas.

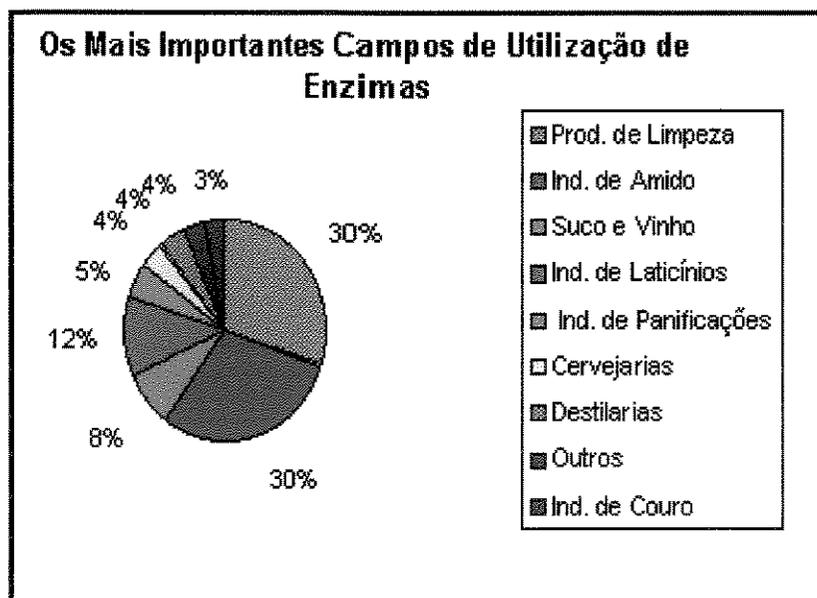


Figura 2 - Distribuição do consumo de enzimas nos campos de aplicação⁽⁸⁾.

Observando os dados apresentados acima, as indústrias de alimentos, incluindo as de amido, respondem pela maior parte do consumo⁽⁸⁾.

Em geral, o desempenho das enzimas, particularmente o desempenho das enzimas imobilizadas, em reações que representam pequenos danos aos produtos ou meio ambiente, estão ganhando importância rapidamente em indústrias de alimentos e químico-farmacêuticas. O aumento de interesse não precisa necessariamente ser refletido em um notável aumento do consumo de enzimas mas particularmente no consumo dos produtos por elas produzidos. A enorme quantidade de produtos obtidos a partir de uma pequena quantidade de enzimas incentivaram as pesquisas no campo de imobilização e estabilização de enzimas⁽⁸⁾.

O interesse de reações catalisadas por lipase, proveniente de várias fontes, tem crescido drasticamente nos últimos seis anos. Porém alguns pesquisadores tem estudado a utilização desta enzima na forma imobilizada em suportes insolúveis⁽¹⁹⁾⁽²³⁾.

A hidrólise de óleos e gorduras é uma das operações industriais mais importantes, apresentando uma produção mundial em torno de $1,6 \cdot 10^6$ ton por ano de ácidos graxos. Os produtos desta hidrólise (ácidos graxos e gliceróis) são materiais básicos para diversas indústrias.⁽²⁴⁾

Além das reações de hidrólise de gorduras, estas enzimas catalisam outras reações com sínteses de glicerídeos e ésteres e modificações de lipídeos⁽²⁵⁾.

Tabela 5 - Lipase imobilizada : Suportes e usos.

RESINA	UTILIZAÇÃO	AUTORES E ANO
Sephadex LH-20 Sephadex LH-60	Hidrólise do óleo de oliva em sistema de fase reversa.	Kang S. K. e Rhee J. S. 1989 ⁽¹⁹⁾
Sephadex G-50 Sephadex LH-20 Amberlite IRA94 Amberlite XAD-7	Hidrólise do óleo de oliva.	Yang D. e Rhee S. J. 1992 ⁽²⁵⁾
Amberlite XAD-2 Amberlite XAD-5 Amberlite XAD-7 Poli ácido carboxílico Poliacrilonitrila + 5% de divinilbenzeno	Hidrólise de ácido graxos.	Baris M. et al. 1994 ⁽¹⁾
Resina Acrilica	Esterificação de ácido oleico com metanol.	Ramamurthi S. e McCurdy A. 1994 ⁽²⁶⁾
Polipropileno	Interesterificação de óleo de oliva, ácido octanóico e linoleico.	Reyes H.R. e Hill C.G. 1994 ⁽²³⁾
Duolite	Esterificação de ácido oleico e etanol em dióxido de carbono supercrítico.	Marty A. et al. 1994 ⁽²⁷⁾
Duolite	Hidrólise de ácido graxos livres do óleo de farelo de arroz.	Kosugi Y. et al. 1994 ⁽²⁸⁾

2.5. Métodos Imunoquímicos - ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

A aplicação de métodos imunoquímicos para medidas de substâncias biologicamente importantes tornou-se muito popular nos últimos anos principalmente pela combinação da alta sensibilidade com excelente especificidade⁽²⁸⁾.

Os radioimunoensaios são muito sensíveis e usualmente simples porém possuem certas desvantagens, como o uso de reagentes instáveis e a necessidade de equipamentos sofisticados para as medidas de radiatividade, além de ser potencialmente perigosos aos analistas. Assim novas idéias surgiram entre elas a utilização de enzimas ligadas a antígenos ou anticorpos e de conjugados em ensaios quantitativos de substâncias solúveis, usando a mesma metodologia dos radio-imunoensaios. Sendo assim foi possível substituir os isótopos radioativos por reagentes estáveis e seguros além de equipamentos mais simples mantendo a mesma sensibilidade⁽²⁸⁾.

O método **ELISA** tem sido utilizado há alguns anos na detecção e localização de antígenos ou anticorpos, utilizando métodos baseados na luz visível e microscopia eletrônica (Nakame e Pierce, 1966⁽²⁹⁾; Avrameas e Uriel, 1966⁽³⁰⁾).

Imunoensaios enzimáticos tem sido aceito como uma alternativa para substituir outros ensaios imunológicos, sendo que o grande interesse em relação a esse tipo de ensaios tem aumentado o número de aplicações e modificações, oferecendo grandes esperanças de diagnósticos fora dos principais centros médicos⁽²⁸⁾.

2.5.1. Métodos de ELISA

Os métodos ELISA podem ser classificados em: ⁽⁵⁾⁽³¹⁾

A. Competitivos :

A.1- Usando o Conjugado Antígeno-Enzima⁽²⁸⁾⁽³²⁾: Neste método a primeira etapa é a imobilização química ou física do anticorpo a fase sólida. Após a imobilização analisa-se a influência nos resultados incubando-se o material imobilizado frente a uma quantidade padrão de antígeno marcado com diferentes concentrações conhecidas de antígenos não marcados, os antígenos marcados e não marcados passam a competir pelo sítios ativos dos anticorpo imobilizados modificando as respostas obtidas por colorimetria ou fluorometria.

A concentração de produto é inversamente proporcional a concentração de antígenos presente na amostra, ou seja, quanto menor a leitura obtida maior a concentração de antígeno na amostra.

Tendo conhecimento deste comportamento pode-se incubar uma amostra desconhecida e baseado nos dados obtidos anteriormente dosar a quantidade de antígenos.

Este tipo de ensaio é utilizado, por exemplo, na medida de IgG de coelho.

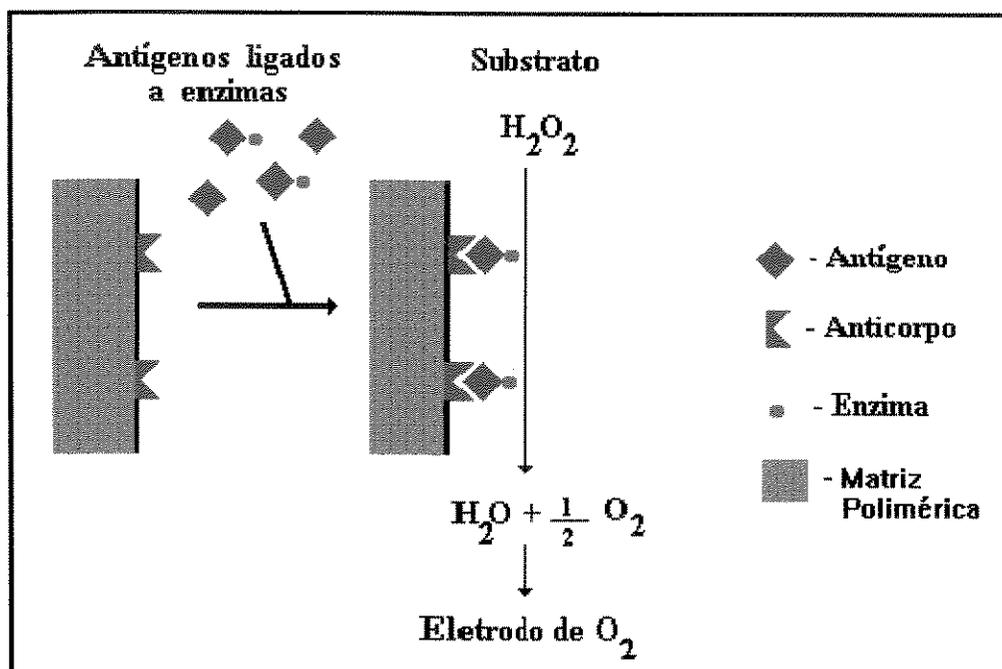


Figura 3 – Ensaio ELISA competitivo usando antígeno marcado com enzima HRP e anticorpo imobilizado.⁽³²⁾

A.2. Usando Anticorpo Marcado-Enzima : Este método é parecido com o citado acima, porém é o antígeno que se encontra imobilizado. Esse material imobilizado é exposto a uma concentração padrão de anticorpos marcados juntamente com quantidades variáveis e conhecidas de antígenos não imobilizados. O comportamento das resposta e análises de amostras desconhecidas é semelhante ao método anterior. Esse método é exemplificado na figura 4⁽³²⁾.

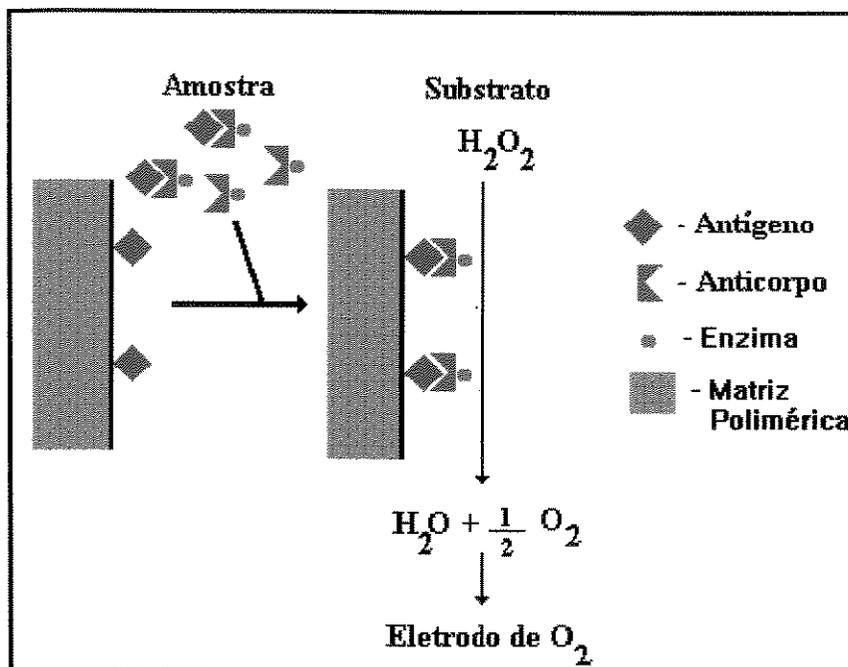


Figura 4 - Ensaio ELISA competitivo usando anticorpo marcado-enzima HRP e antígeno imobilizado⁽³²⁾.

B. Não-competitivos : São ensaios em que uma amostra antígeno conhecida ou desconhecida reage com um excesso de anticorpo e a extensão da reação antígeno-anticorpo é medida em uma segunda etapa. Esses ensaios podem ser classificados de acordo com a valência do antígeno, isto é, se este possuir uma única valência temos o ensaio não-competitivo de sítio-simples (single-site) e no caso de bi ou polivalência temos o ensaio sanduíche (sandwich assay)⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

B.1. Sítio Simples : Esses são simples modificações dos métodos competitivos. Nesse procedimento incuba-se uma mistura contendo uma concentração fixa e conhecida de antígeno marcado com enzima juntamente com concentrações variáveis de antígeno não marcado em presença de um excesso moderado de anticorpo imobilizado. Após a lavagem, o excesso de

antígeno marcado é incubado para permitir que se ligue com anticorpos não imobilizados e em seguida avalia-se a concentração pela análise colorimétrica ou fluorimétrica do produto obtido pela exposição do conjugado anticorpo-antígeno-enzima ao substrato adequado. Este procedimento pode ser realizado de forma contrária, ou seja, utilizar anticorpo marcado e antígeno imobilizado. Os resultados obtidos, ou seja, a concentração produto é inversamente proporcional a concentração de antígeno não marcado presente na mistura que pode ser proveniente de uma amostra conhecida ou desconhecida. Esse método pode ser usado em medidas de α -fetoproteína⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

B.2. Ensaio Sanduíche ou ELISA de Captura: São baseados na utilização de anticorpo imobilizado e uma solução padrão ou uma amostra de antígeno. O conjugado anticorpo imobilizado-antígeno é incubado na presença de anticorpo marcado permitindo que ocorra uma nova ligação com o antígeno. Caso esse segundo anticorpo não fosse marcado poderia utilizar um terceiro anticorpo marcado. Em ambos os casos a concentração do produto é diretamente proporcional a concentração de antígeno adicionado. Esse procedimento foi utilizado para dosagem de antígeno carcinoembriótico, α -fetoproteína (Belanger et al., 1973 usando fosfatase alcalina⁽³³⁾ e por Maiolini et al., 1975 usando glucose oxidase⁽³⁴⁾) e β -aminotransferase. A figura 5 exemplifica esse método⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

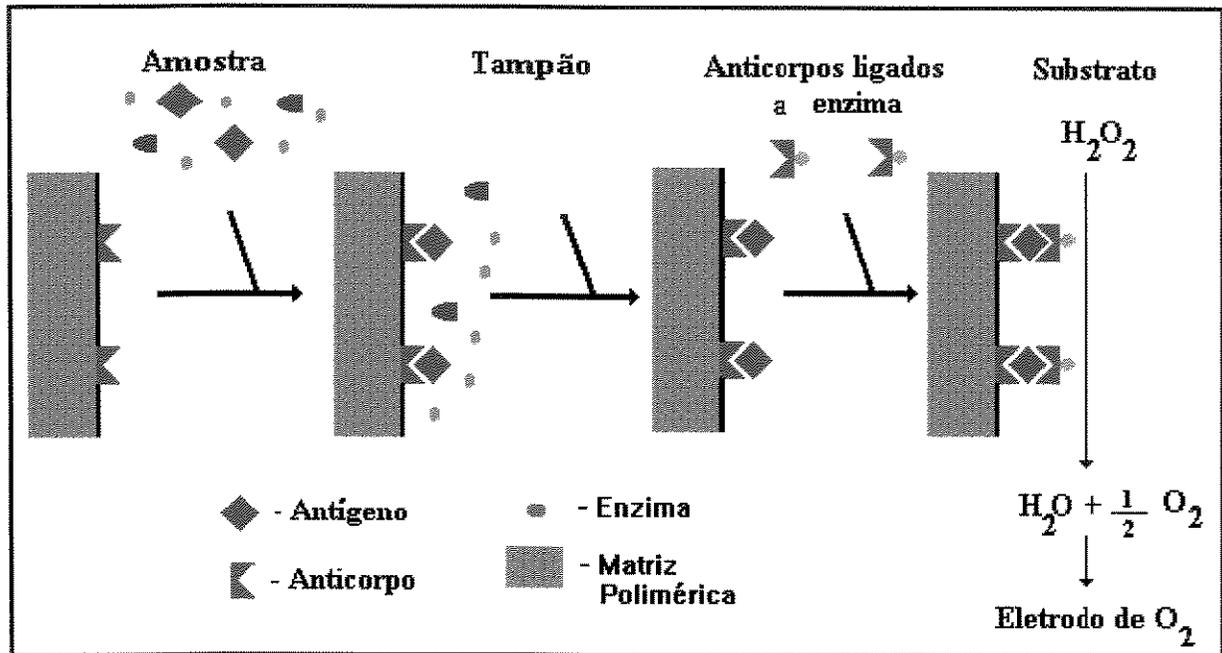


Figura 5 - Método Sanduíche para antígenos, enzima HRP⁽³²⁾.

B.3. Anti-Imunoglobulina Marcada : É baseado na imobilização do antígeno e exposição deste a anticorpo não marcado proveniente de uma amostra conhecida ou não. A quantidade de anticorpos ligados a fase sólida é quantificada por uma anti-imunoglobulina marcada. Esse método possui algumas vantagens, entre elas: antígenos e anticorpos não são marcados, não há necessidade de utilização de antígeno puro e utilização de apenas um conjugado para ensaios de diferentes anticorpos. Este método foi utilizado para determinação de anticorpos de coelho para albumina de soro humano e para o hapteno dinitrofenol (Engvall e Perlmann em 1972⁽³⁵⁾) e para determinação de anticorpos humanos para estreptoquinase e tiroglobulina (Engvall e Perlmann em 1975⁽³⁶⁾) e para DNA (Pesce et al. em 1974⁽³⁷⁾). Este método é extremamente útil pois permite medidas de anticorpos para uma variedade de antígenos. A figura 6 mostra este tipo de ensaio⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

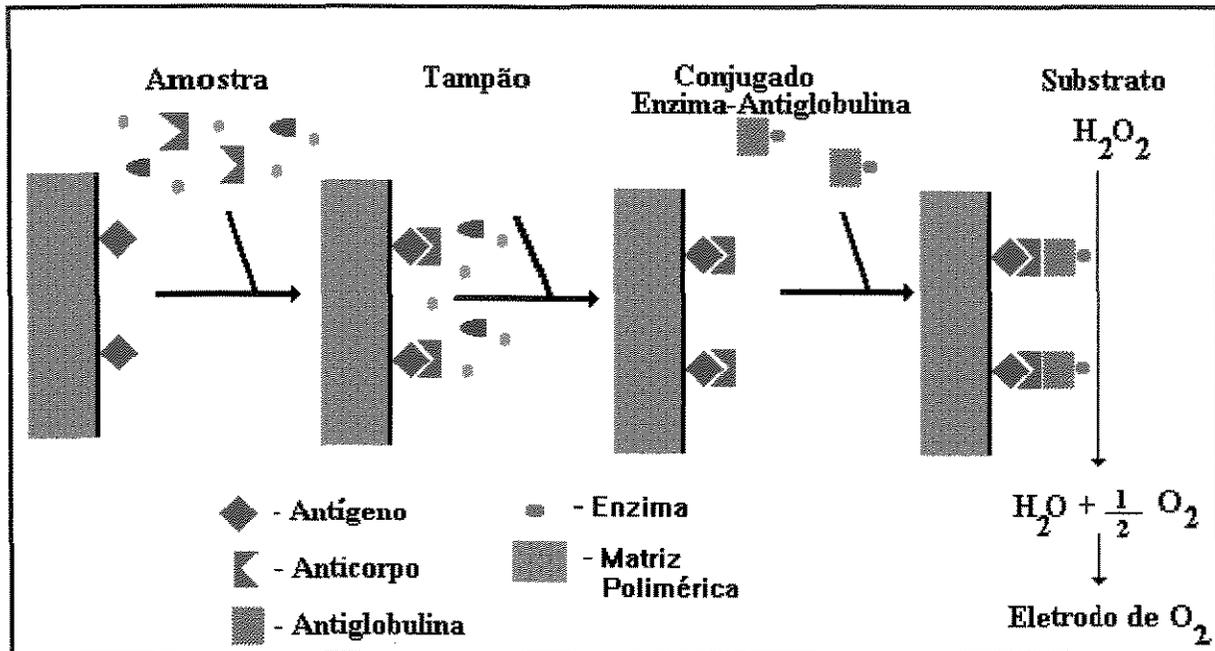


Figura 6 - ELISA indireto para anticorpos, este método é baseado na utilização do conjugado antiglobulina-HRP como revelador para a reação de acoplamento⁽³²⁾.

2.5.2. Escolha da enzima .

A sensibilidade de um imunoensaio enzimático está diretamente relacionado com escolha da enzima⁽³²⁾.

As enzimas utilizadas nestes métodos devem possuir determinadas propriedades, entre elas :

1. As enzimas devem ser estáveis entre 25 e 37°C, e ter tempo de meia vida de no mínimo 6 meses a 4°C.
2. Elas devem estar disponíveis no mercado e não possuir um valor relativamente elevado.
3. Suas atividades devem ser facilmente medidas através de métodos colorimétricos ou fluorimétricos simples.

4. Devem ser detectadas em pequenas quantidades. Portanto, a enzima deve ter alta conversão de substrato e o produto de reação deve ter um amplo coeficiente de absorvidade molar ou fluorescência.

5. Quando não abundantes em materiais biológicos, podem ser utilizadas em amostras desde que estas não contenham inibidores potenciais para a determinada enzima.

Essas propriedades são encontradas em três enzimas: A fosfatase alcalina do intestino de bezerro, a peroxidase de rabanete (Horseradish peroxidase) e a β -D-galactosidade de *Escherichia coli*⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

A fosfatase alcalina é muito estável e os ensaios onde esta é utilizada são bastantes simples e sensíveis. Os substratos usados por essa enzima são: fosfato de n-nitrofenila, o qual é hidrolisado a p-nitrofenol, sendo detectado por análise espectrofotométrica em 400 nm, e o fosfato de 4-metilumbeliferila que é convertido a 4-metilumbeliferona e é determinado por métodos fluorimétricos. A taxa de conversão do primeiro substrato é duas vezes maior que a do segundo⁽²⁸⁾.

A β -galactosidase de *E. coli* possui considerável estabilidade e sua atividade pode ser medida usando-se p-nitrofenil- β -D-galactosida ou 4-metilumbeliferil- β -D-galactosida como substrato. Possui alta conversão de substrato e os métodos usados são iguais ao da fosfatase⁽³²⁾.

A peroxidase de rabanete (HRP) é a mais barata das enzimas citadas e possui grande disponibilidade no mercado. A determinação é baseada em uma reação redox e na utilização de um substrato instável, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Vários métodos são usados para a quantificação do produto de reação, entre eles podemos citar:

- método do periodato;
- métodos com utilização de cromógenos como 2,2' azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), que é bastante caro e seu produto é instável, o ácido 5-aminosalicílico, que possui baixa sensibilidade, a o-toluidina e o o-fenilenodiamina, que é o mais sensível de todos, porém esses dois últimos possuem efeitos carcinogênicos e mutagênicos;
- métodos potencimétricos pela utilização de eletrodo de oxigênio⁽¹⁶⁾⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

2.5.3 Conjugado Enzima-Antígeno e enzima-Anticorpo⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

Singer em 1959⁽³⁸⁾ introduziu a ferritina para marcar anticorpos e assim dosá-los por microscopia eletrônica. Essa marcação foi feita pelo método do diisocianato de xileno ou do diisocianato de tolueno⁽²⁸⁾.

Mais tarde, as enzimas foram introduzidas como marcadores de anticorpos substituindo a ferritina permitindo que as análises de anticorpos fossem realizadas por métodos utilizando luz visível e microscopia eletrônica. Nakane e Pierce em 1966⁽²⁹⁾ usaram 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida para associar a fosfatase ácida a anticorpos e a p,p'-difluoro-m,m'-dinitrofenol sulfona para ligar a peroxidase a anticorpos⁽²⁸⁾.

Avraméas em 1968 e 1969⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾ descobriu que o glutaraldeído era um excelente agente conjugante. Este composto permite também preparar derivados ativos insolúveis como derivados de carboxipeptase A como feito por Quioco e Richards em 1966⁽⁴¹⁾ e derivados de tripsina como feito por Habbeb em 1967⁽⁴²⁾.

O glutaraldeído reage primariamente com os grupos amino das proteínas e o produto esperado entre o grupo amino e um aldeído é denominado base de Schiff. O glutaraldeído é facilmente polimerizável e contém aldeídos α,β -insaturados que são provavelmente os responsáveis pela reação com as proteínas. Quando reticulado com as proteínas este composto possui excepcional estabilidade⁽³²⁾.

A reticulação do glutaraldeído pode ser realizada por dois métodos; o de uma etapa, onde os dois componentes que podem se ligar covalentemente são misturados juntos com o agente reticulante; ou de duas etapas, onde um dos dois reagentes reage sozinho com o agente de acoplamento e ao produto deste adiciona-se o segundo reagente. No primeiro método cada componente reticula consigo mesmo e com o outro componente, enquanto que no método de duas etapas somente o primeiro componente reticulará consigo mesmo⁽²⁸⁾⁽³²⁾.

2.5.4 Os Imunoadsorventes⁽³²⁾.

A característica que diferencia o teste tipo ELISA dos outros imunoenaios enzimáticos é o uso de adsorventes, tornando mais rápida e fácil a separação de antígenos e anticorpos livres dos complexos antígeno-anticorpo. Anticorpos e antígenos tem sido ligados à celulose, agarose, poliacrilamida, poliestireno, polipropileno, policarbonato, borracha de silicone e vidro tratado. A fase sólida pode ser na forma de discos, esferas e tubos que facilitam as etapas de lavagem e separação, É interessante lembrar que o sucesso do método ELISA cresceu a partir do uso de pequenos tubos e pratos de poliestireno como fase sólida.

A adsorção de muitas proteínas em superfícies plásticas resulta da interação entre a estrutura hidrofóbica da proteína com a matriz plástica não

polar. A taxa e a intensidade desta adsorção dependerão do coeficiente de difusão da molécula que está sendo adsorvida, a razão entre a área superficial a ser recoberta, do volume de solução utilizada na etapa de imobilização, da concentração desta solução, da temperatura e do tempo da reação de adsorção.

O poliestireno tem sido amplamente utilizado para testes do tipo ELISA devido à sua reprodutibilidade e fácil recobrimento, porém como alguns plásticos, apresenta algumas desvantagens. O antígeno ou anticorpo se ligam fisicamente e não covalentemente a matriz polimérica, podendo resultar em perdas de proteínas adsorvidas durante as lavagens, além da possibilidade de desnaturação destas moléculas, levando a perda da atividade do antígeno ou anticorpo imobilizado. Tudo isso afeta a precisão e sensibilidade desta técnica, além da capacidade limitada de adsorção das superfícies plásticas. Entretanto a facilidade e rapidez de separação dos complexos antígeno-anticorpo do restante da solução freqüentemente compensam estas desvantagens.

As interações envolvidas no processo de adsorção, ao contrário das interações antígeno-anticorpo, são não específicas porque tanto os antígenos como os anticorpos marcados podem ser adsorvidos, indesejadamente, na fase sólida durante o ensaio. Esta adsorção pode ser minimizada pela utilização de detergentes neutros, tais como Triton® X-100 ou o Tween® 20, quais não interferem significativamente na reação antígeno-anticorpo. Estes devem ser adicionados em concentrações que evitem novas interações hidrofóbicas mas que também não permita a desorção de antígenos ou anticorpos previamente adsorvidos na superfície plástica.

A precisão do método pode ser afetada pelo potencial elétrico negativo presente em diversos suportes plásticos resultando em adsorções não específicas e na formação de dupla camada de moléculas.

2.5.5 Sensibilidade⁽³²⁾.

Os dois maiores fatores que limitam a sensibilidade do teste ELISA são: a afinidade de ligação antígeno-anticorpo e a enzima usada como marcadora. A alta sensibilidade de anticorpos, com uma constante de afinidade na ordem de $10^{10} \text{ (M/l)}^{-1}$ a $10^{12} \text{ (M/l)}^{-1}$, resulta numa sensibilidade em torno de 10^{-10} a 10^{-12} M. A enzima empregada de forma adequada pode resultar numa detecção da ordem de 0,02 fmol em 0,2 ml. Assim sendo, a afinidade antígeno-anticorpo provavelmente limita a sensibilidade nestes imunoenaios.

2.5.6 Especificidade⁽³²⁾.

O principal determinante da especificidade é o anticorpo. Isto está relacionado com a capacidade do anticorpo de reagir com outros antígenos de estruturas similares ao do imunizante. Outros fatores são a pureza do antígeno utilizado, os ensaios padrões, adsorção não específica de antígenos e anticorpos marcados.

2.5.7 Reprodutibilidade⁽³²⁾.

A reprodutibilidade do teste ELISA chegou em torno de 15% em 1971 em análises realizadas por Engvall⁽⁴³⁾. Esta pode ser devido a adsorções não homogêneas de antígenos e anticorpos durante a imobilização, resultado da não uniformidade da superfície ou da distribuição de cargas no material plástico. Esse efeito pode ser minimizado pela utilização de eliminadores de cargas estáticas entre outras coisas.

Atualmente os resultados obtidos por análises utilizando o método ELISA são bastante confiáveis devido sua boa reprodutibilidade e sensibilidade.

2.6 Os Suportes.

A primeira amino resina sintetizada que se tem notícia foi a uréia-formaldeído em 1884 por Holzer e posteriormente por Ludy em 1889⁽³⁾.

Em 1896, Golschmidt estudou a reação da uréia e formaldeído em meio ácido, a qual resultou em um pó branco de fórmula empírica $C_5H_{10}N_4O_3$ ⁽⁴⁴⁾. Essa mesma reação foi realizada em 1908 por Einhorn e Hamburger, obtendo como produto a mono e dimetiluréia de acordo com a quantidade de formaldeído utilizada⁽⁴⁵⁾.

Na década de 20 surgiu o primeiro produto comercial desta resina na Inglaterra desenvolvido por Edmond C. Rossiter, denominado Beetle⁽⁴⁶⁾.

As amino resinas são polímeros termofixos obtidos a partir da reação de condensação de aldeídos com compostos contendo grupos amino ($-NH_2$). A resina uréia-formaldeído corresponde a mais de 80% das vendas de amino resinas⁽⁴⁶⁾. Sua principal atração é a solubilização em água antes do processo de cura e após este seus produtos possuem excelente resistência mecânica, à solventes e ao fogo⁽⁴⁶⁾.

A aplicação industrial destas resinas é muito ampla, sendo que seu uso como adesivo, é responsável pela sua maior e principal utilização comercial. Outra utilização dessas resinas é o seu uso para modificar as propriedades de outros materiais, como por exemplo, a adição de pequenas quantidades à fibras têxteis com a finalidade de melhorar a qualidade das roupas confeccionadas a partir delas⁽⁴⁶⁾.

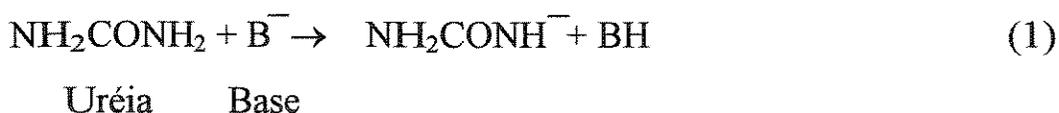
2.6.1 A química das amino resinas.

As amino resinas são sintetizadas em duas etapas. Na primeira etapa, a amina (ou amida) reage com um excesso controlado de aldeído em solução

aquosa e condições neutras ou levemente alcalinas à temperaturas moderadas. Como resultado desta primeira etapa, obtêm-se uma mistura de pequenas cadeias lineares e ramificadas com peso molecular na ordem de 10^3 . A resina obtida é solúvel e fundível, também conhecida como pré polímero⁽⁴⁷⁾.

A reação de um aldeído com grupos amina pode ser catalisada em meio ácido ou básico, sendo que em meio ácido a reação ocorre rapidamente “via condensação” enquanto que em meio básico e neutro ela ocorre “via adição” com uma velocidade menor. As reações 1 a 6 da figura 7 mostram o mecanismo destas sínteses⁽⁴⁷⁾.

a) em meio básico.



b) em meio ácido.



Formaldeído

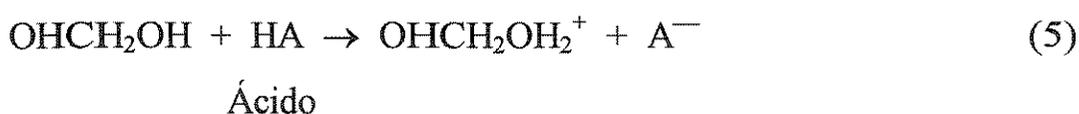


Figura 7 – Mecanismo da síntese de amino resinas em meio básico (a) a em meio ácido (b)⁽⁴⁷⁾.

Na segunda etapa, a resina é curada pela aplicação de calor, pressão ou através de catálise ácida. Nesta fase as cadeias crescem e reticulam resultando em produtos insolúveis e não fundíveis, também conhecidos como resinas termofixas⁽⁴⁷⁾.

Com as amino resinas, dois tipos de reações de condensação podem ocorrer durante a cura. O primeiro tipo consiste na condensação de dois grupos metilóis, resultando em um metileno éter (vide reação 8 na figura 8), essa reação é favorecida por altos valores de pH e alta razão aldeído / amina. No segundo caso, temos a reação de um grupo metilol com um grupo amina, resultando em ligação metileno (vide reação 9 e 10 na figura 8), sendo favorecida por baixos valores de pH e razão aldeído / amina⁽⁴⁷⁾.

Reação 8.



Reação 9 e 10.



Figura 8 – Tipos de reação das amino resinas durante a cura⁽⁴⁷⁾.

Visto que a uréia possui 4 hidrogênios ativos e três posições possíveis de polimerização, dependendo da relação molar uréia / formaldeído e das condições de processo, tais como: pH, temperatura, tempo de reação e procedimento reacional, pode-se obter uma gama de produtos. Estes produtos podem possuir estruturas lineares (monometiloluréia e dimetiloluréia), ramificadas e estruturas cíclicas (triazona e uronas), as quais podem ser

isoladas do meio reacional. Na reticulação desta resina é comum a utilização de sais metálicos derivados de ácidos fortes e bases fracas como iniciadores de reação, tais como cloreto de magnésio, sulfato de amônio, nitrato de zinco e cloreto de 2-amino metil propanol⁽⁴⁾.

A figura 9 mostra as reações e produtos possíveis de se obter a partir de uréia e do formaldeído⁽⁴⁸⁾.

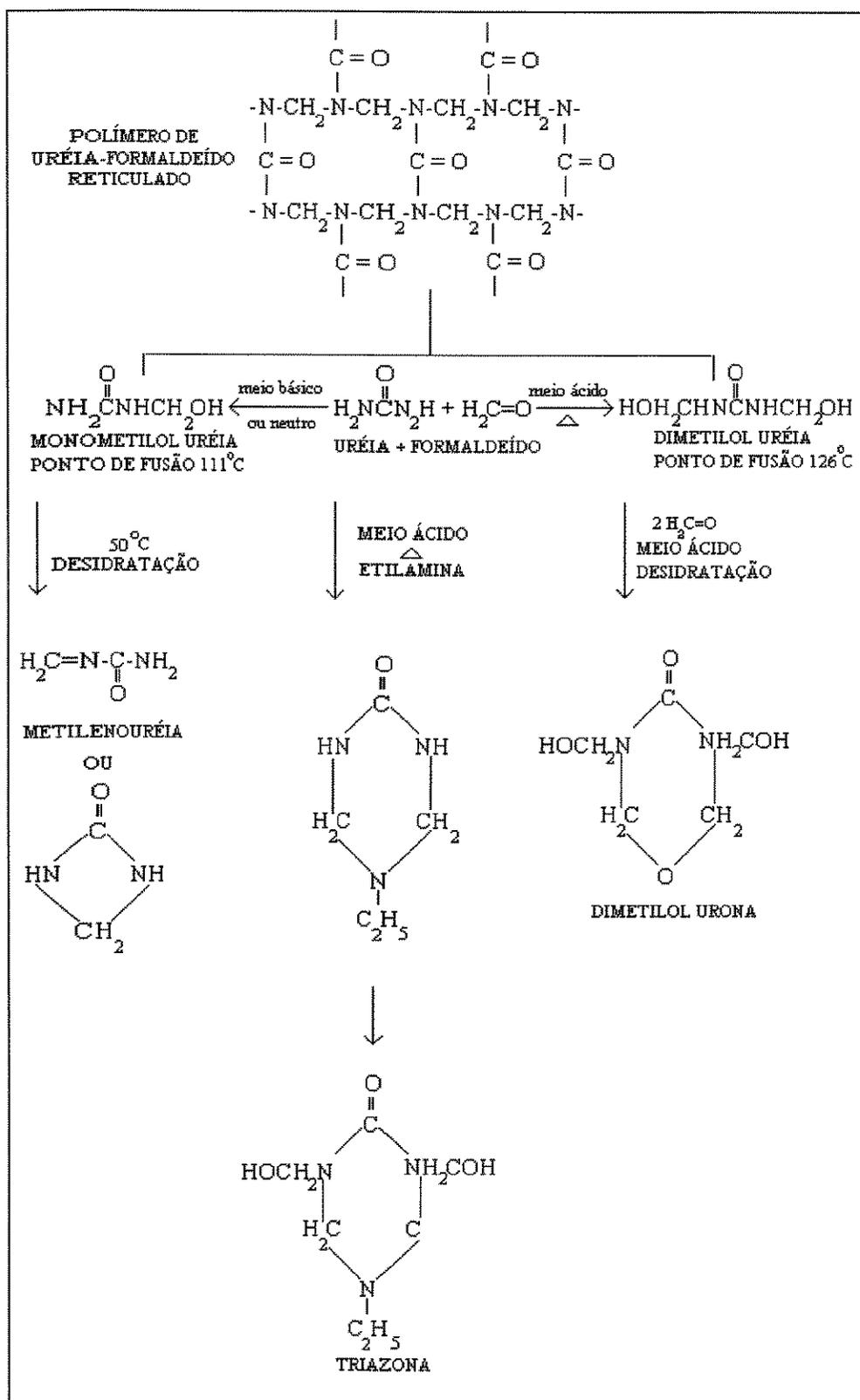


Figura 9 – Reações e produtos obtidos a partir de uréia e formaldeído⁽⁴⁸⁾.

Dentre os monômeros conhecidos, a acrilamida é um monômero bastante interessante para o uso como amino resinas. O grupo vinil é ativo para polimerização por radical livre enquanto que o grupo amina (-NH₂) é ativo para reação de condensação com o formaldeído⁽⁴⁵⁾.

A reação de síntese da N-metilolacrilamida consiste na adição do formaldeído à acrilamida, como exemplificado na figura 10⁽⁴⁾.

Reação 11.

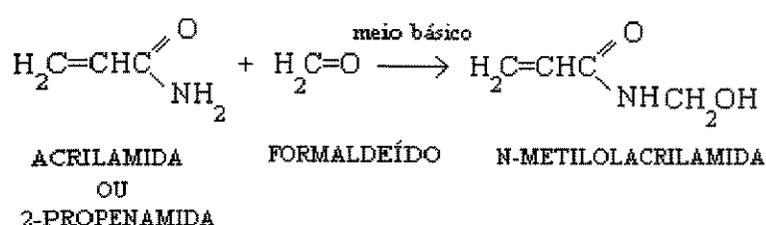


Figura 10 – Síntese da resina N-metilolacrilamida⁽⁴⁾.

Essa resina pode polimerizar via radicais livres a partir de uma cisão homolítica da dupla ligação ou através de seus grupos amina e hidroxil. No primeiro caso, o persulfato de amônio tem sido um iniciador bastante utilizado para a obtenção dos radicais livres, enquanto que no segundo caso utiliza-se iniciadores aniônicos⁽⁴⁾.

A figura 11 ilustra o mecanismo de polimerização da N-metilolacrilamida utilizando persulfato de amônio[(NH₄)₂S₂O₈] como iniciador.

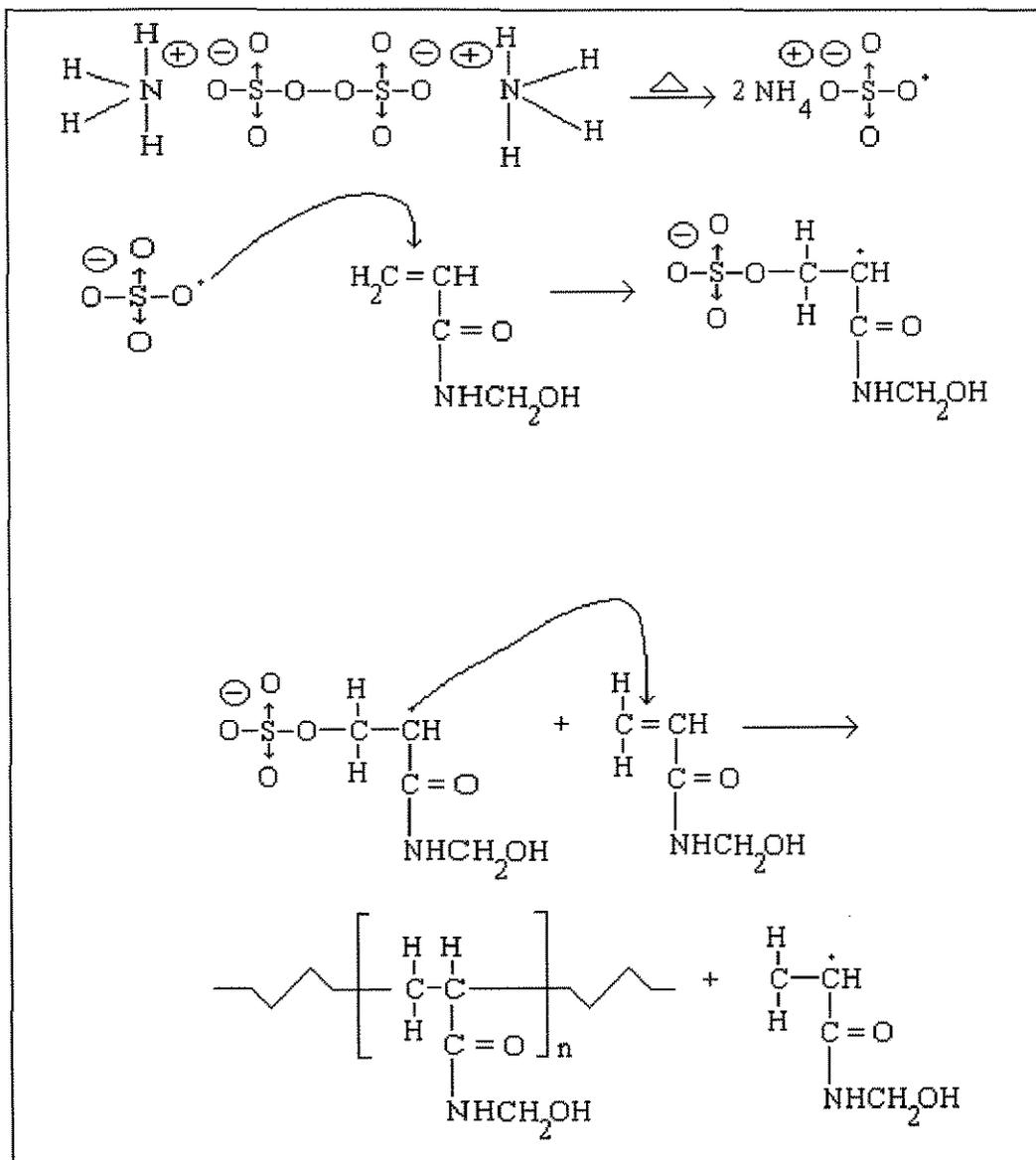


Figura 11 – Mecanismo de polimerização da resina resina N-metilacrilamida via radical livre⁽⁴⁾⁽⁴⁸⁾.

Quando o monômero de N-metilacrilamida é exposto à temperaturas superiores a 130° C temos como resultado uma rede tridimensional insolúvel, como mostra a figura 12.

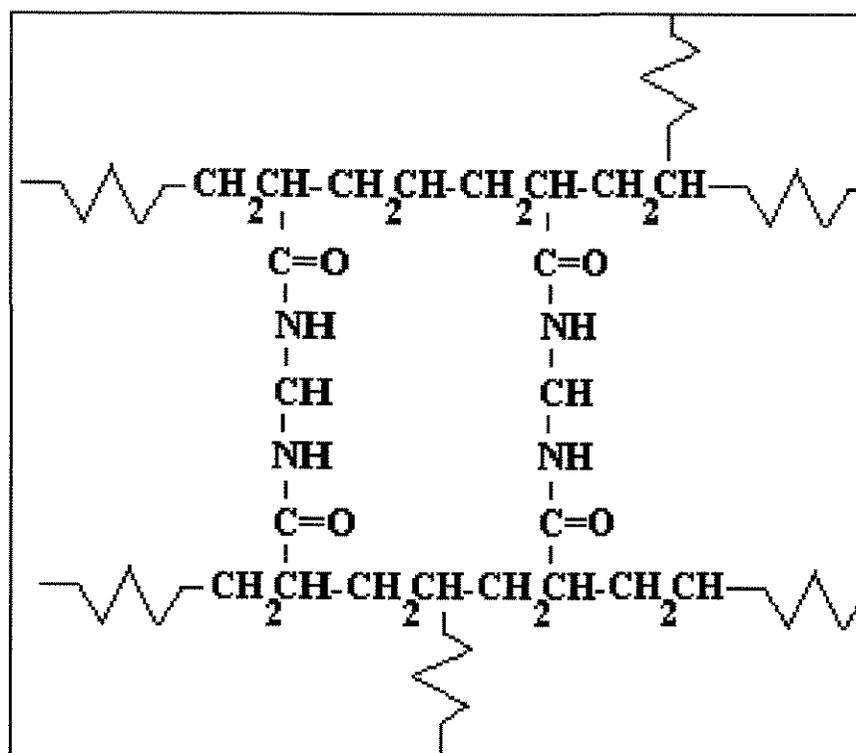


Figura 12 – Rede tridimensional da poli N-metilolacrilamida⁽⁴⁾.

Outro polímero interessante é a poliacrilamida, pois possui características muito semelhantes as apresentadas pela N-metilolacrilamida em termos de polimerização. Sua utilização tem crescido enormemente nos últimos trinta anos e pesquisas relacionadas à utilização deste polímero têm crescido consideravelmente⁽⁴⁶⁾.

Recentemente a literatura tem relatado sobre a obtenção de micro esferas porosas de diversas resinas como as de poli vinil benzeno e as de uréia-formaldeído⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁹⁾.

A obtenção de macro esferas de amino polímeros é nossa tentativa para facilitar a utilização desses polímeros que apresentam ótimas propriedades de imobilização devido a presença de grupos N-metilóis. A eficiência com que os grupos N-metilóis se ligam à biocompostos via ligação covalente, tem aumentado o interesse em torno desses polímeros.

A porosidade e a área superficial são alguns dos parâmetros que interferem na capacidade de imobilização de um suporte; assim um dos objetivos deste trabalho é a síntese de macro esferas porosas para se otimizar a imobilização de proteínas e outros compostos, possibilitando seu uso em uma vasta área de aplicação.

Para se obter esferas porosas, foram feitas diversas sínteses com posterior caracterização do material por; espectroscopia de I.V., porosimetria de mercúrio, microscopia eletrônica de varredura(MEV) e área superficial(BET).

Uma área bastante promissora para a utilização das macro esferas porosas de amino polímeros, está relacionada com o desenvolvimento de kits de diagnósticos para testes ELISA que possam facilitar os testes laboratoriais em regiões distantes e de poucos recursos financeiros. Ampliando o trabalho realizado por Peres e Bittencourt em 1986⁽⁴⁾ os quais utilizaram amino polímeros empregados em tecido de poliéster como suporte para antígenos de chagas, temos em vista otimizar o uso destes polímeros, em forma esférica, tanto para teste ELISA como também dar início ao uso destes suportes em bioreatores de leito fluidizado e colunas cromatográficas.

Neste trabalho propomos apenas a estudar o comportamento destas macro esferas porosas para imobilização de biocompostos, como imunoglobulina e lipase, procurando padronizar as condições em que os testes fornecem uma reprodutibilidade a nível de aceitação para aplicações em diagnósticos clínicos.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Síntese das Resinas

Foram sintetizadas as resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído. As procedimentos estão detalhados nos tópicos 3.1.1 e 3.1.2.

3.1.1 Resina N-metilolacrilamida⁽³⁾

3.1.1.1 Reagentes p.a. / Fornecedores.

- Acrilamida, da Reagen.
- Formaldeído 37%, da Merck.
- Hidróxido de Sódio, da Merck.
- Ácido Fórmico, da Synth.

3.1.1.2 Equipamentos.

A figura 13 mostra o esquema utilizado para a síntese das resinas.

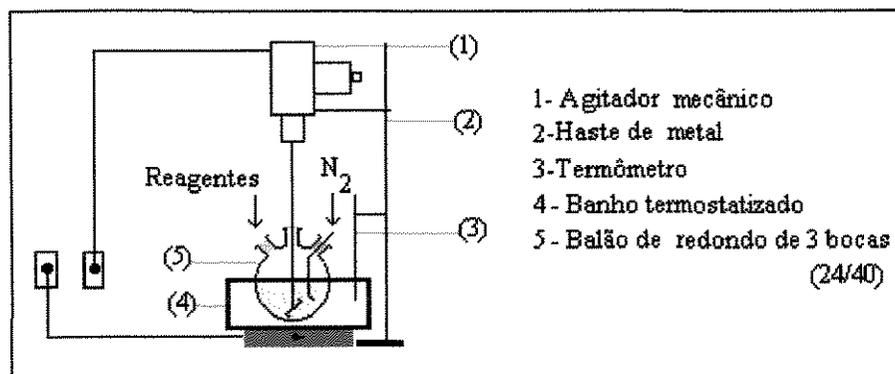


Figura 13 - Esquema de aparelhagem utilizado para a síntese das resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído.

- Liofilizador L5KR, EDWARDS.

3.1.1.3 Procedimento Experimental.

Em um balão de três bocas (24/40) de 250 ml foram colocados 48 g de acrilamida e 42 g de formaldeído. A mistura foi agitada e mantida sob atmosfera de nitrogênio(N₂) e temperatura de 20-25°C.

Após a homogeneização do sistema, foi adicionada solução de NaOH 50% para manter o pH entre 8 e 9.

A reação foi mantida com agitação por 2 horas e posteriormente foi adicionado ácido fórmico para levar o pH para 5-6.

A seguir, a resina obtida foi liofilizada e estocada sob vácuo para posterior utilização.

3.1.2 Resina Uréia-Formaldeído (UF)⁽³⁾.

3.1.2.1 Reagentes p.a. / Fornecedores.

- Uréia, da Reagen.
- Formaldeído 37%, dla Merck.
- Sulfito de Sódio, da Synth.
- Bissulfito de Sódio, da Synth..
- Sulfato de Magnésio, do Grupo Química.
- Hidróxido de Sódio, da Merck.
- Ácido Fórmico, da Synth.

3.1.2.2 Equipamentos.

- Na síntese da UF foram utilizados os mesmos equipamentos para obtenção da N-metilolacrilamida (fig.13).

- Foi utilizado um sistema de destilação a vácuo, como o mostrado na figura 14 e um potenciômetro digital para controle do pH durante a reação.

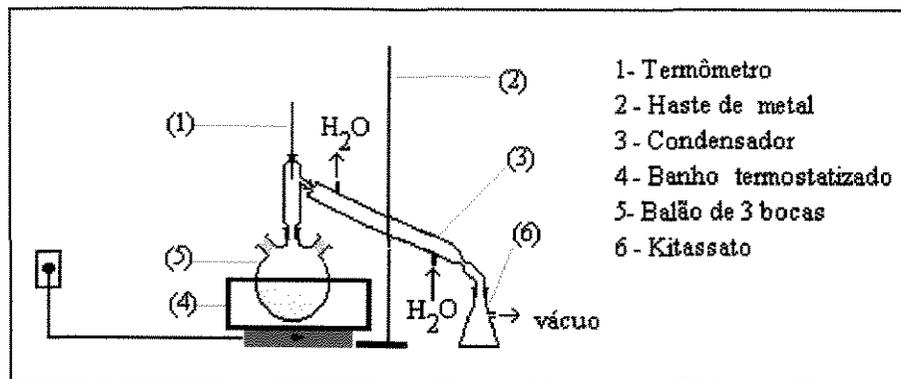


Figura 14 - Esquema da aparelhagem para destilação à vácuo da resina uréia-formaldeído .

- Liofilizador L5KR, EDWARDS.
- Bomba de Vácuo, Kohl Back.

3.1.2.3 Procedimento Experimental.

Foram pesados 95 g de formaldeído 37 % e a seguir seu pH foi elevado para 8 pela adição de solução de NaOH 50% e ácido fórmico.

A solução resultante foi transferida para um balão de três bocas (24/40) de 500 ml sendo adicionados, a seguir, 34 g de uréia. O sistema foi aquecido a 50°C, sob agitação e atmosfera inerte, até a completa dissolução.

Foi adicionado 0,20 g de sulfito de sódio e o sistema foi deixado sob agitação por 5 minutos; a seguir juntou-se 1,0 g de bissulfito de sódio e o pH foi levado entre 8,6-8,9 com solução de NaOH 10% e/ou ácido fórmico.

O sistema foi posteriormente aquecido a 80°C e seu pH foi levado para 4,4-4,6 com adição de ácido fórmico e a seguir a temperatura foi elevada para 90-95°C.

O sistema foi deixado sob agitação e amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos. As amostras foram gotejadas em 5 ml de solução de sulfato de magnésio a 30% a temperatura de 20°C.

A reação foi cessada quando uma gota de amostra turvou a solução de sulfato de magnésio 30%, pois essa turvação indica o final da reação.

O pH foi elevado para 7,2-7,4 com solução de NaOH 10% e a seguir a mistura foi destilada a vácuo. Após a destilação a amostra foi liofilizada.

3.2 Síntese das Macroesferas.

3.2.1 Esferas de Poli N-metilolacrilamida (ou poli NMA).

3.2.1.1 Materiais.

- Resina de N-metilolacrilamida liofilizada.
- Persulfato de amônio, p.a., da Cinética Química.
- Óleo de silicone, da Synth.
- N,N-dimetil formamida, p.a., da Nuclear.
- Acetona, p.a., da Merck.
- Éter Etílico, p.a., da Ecibra.

3.2.1.2 Equipamentos.

Foram utilizados um banho super termostatizado (Nova Técnica), uma estufa à vácuo (FANEM), béquer de 500 ml, pipetas Pasteur e peneiras comuns.

3.2.1.3 Procedimento.

Foi pesada uma amostra da resina N-metilolacrilamida e a ela foi adicionado persulfato de amônio 5% em relação a massa de resina.

A mistura foi dissolvida em N,N-dimetil formamida e com auxílio de uma pipeta Pasteur foi gotejada em óleo de silicone à temperatura de 50-90°C.

As esferas foram retiradas do óleo de silicone utilizando-se uma peneira comum. As esferas foram posteriormente lavadas com acetona e éter etílico.

Após a lavagem o produto foi secado em estufa a vácuo a 110°C por 48 h.

3.2.2 Esferas de Uréia-Formaldeído (UF).

3.2.2.1 Materiais.

- Resina de ureia-formaldeído liofilizada.
- Óleo de silicone, da Synth.
- Sulfato de amônio, p.a., da Carlo Erba.
- N,N-dimetil Formamida, p.a., da Nuclear.
- Acetona, p.a., da Merck.
- Éter etílico, p.a., da Ecibra.

3.2.2.2 Equipamentos.

Foram utilizados uma estufa à vácuo (FANEM), béquer de 500 ml e peneiras.

3.2.2.3 Procedimento.

Foi pesada uma amostra de uréia-formaldeído liofilizada e foi adicionado a esta, sulfato de amônio 5% em massa.

A mistura foi dissolvida em N,N-dimetil formamida e a seguir gotejada em óleo de silicone previamente aquecido a 110- 120°C em estufa.

As esferas foram retiradas com auxílio de peneiras e lavadas com acetona e éter etílico.

Essas esferas foram secas em estufa à vácuo a 120°C durante 48 h.

3.2.3 Esferas de Poliacrilamida (PA).

3.2.3.1 Materiais.

- Acrilamida, p.a., da Nuclear.
- Perssulfato de amônio, p.a., da Cinética Química.
- Óleo de silicone, da Synth.
- N,N-dimetil formamida, p.a., da Nuclear.
- Acetona, p.a., da Merck.
- Éter Etílico, p.a., da Ecibra.

3.2.3.2 Equipamentos

Foram utilizados os mesmos equipamentos do item 3.2.1.2.

3.2.3.3 Procedimento

Foi pesada uma amostra da acrilamida e a ela foi adicionado perssulfato de amônio 5% em relação a massa de acrilamida.

A mistura foi dissolvida em N,N-dimetil formamida e com auxílio de uma pipeta Pasteur foi gotejada em óleo de silicone à temperatura de 50-90°C.

As esferas foram retiradas do óleo de silicone utilizando uma peneira e posteriormente lavadas com acetona e éter etílico.

Após a lavagem o produto foi secado em estufa à vácuo a 110°C por 48 h.

3.2.4 Esferas de Poliacrilamida Recobertas por Poli N-metilolacrilamida (PA-rec).

3.2.4.1 Materiais.

- Esferas de Poli acrilamida.
- Formaldeído, p.a, da Merck.
- Hidróxido de Sódio, p.a., da Merck.
- Acetona, p.a., da Merck.

3.2.4.2 Equipamentos.

Nesta etapa foram utilizados uma estufa e um borrifador.

3.2.4.3 Procedimento.

As esferas de poliacrilamida foram borrifadas com solução de formaldeído, previamente alcalinizada com solução de NaOH 10%, e a seguir colocada na estufa.

Esse procedimento foi repetido até que toda a superfície das esferas estivesse recoberta. Após essa etapa, as esferas foram lavadas com água destilada e acetona, sendo a seguir secas em estufa a 60°C.

3.3 Caracterização das Resinas e Esferas.

As resinas e as esferas foram caracterizadas por espectroscopia de I.V.. As esferas foram também caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), porosimetria de mercúrio e BET (área superficial).

3.3.1 Espectroscopia de I.V..

As resinas e esferas trituradas foram caracterizadas para verificação da presença de grupos funcionais característicos. As análises foram feitas usando pastilhas de KBr (brometo de potássio) no aparelho de infravermelho FTIR 1600-Perkin Elmer M-80.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.

As esferas foram metalizadas e analisadas no aparelho Electron Probe Microanalyzer-JAX-840A-JEOL.

Essa análise foi realizada com a finalidade de dimensionar as esferas assim como verificar a presença de poros e fraturas.

3.3.3 Porosimetria de Mercúrio.

Essa caracterização foi realizada no aparelho Pore Sizer 9320, Micrometrics, com o propósito de se avaliar a porosidade das esferas produzidas. A obtenção de esferas porosas é um dos objetivos deste trabalho, visto que a existência de poros pode resultar em maior área para imobilização de biocompostos.

3.3.4 Área Superficial.

Essa análise foi realizada no FlowSorb 2300, Micrometrics, com o objetivo de dimensionar a área da superfície das esferas, visto que ela constitui um parâmetro de extrema importância para as técnicas de imobilização devido a quantidade de imobilizado ser altamente afetada por esta grandeza.

3.4 Análise dos Parâmetros de Imobilização para Teste ELISA⁽⁵⁰⁾.

3.4.1 Materiais.

- Esferas de N-metilolacrilamida e de uréia-formaldeído.
- Tampão carbonato/bicarbonato, 0,1 M, pH=9,5.
- Tampão PBS, 0,05 M, pH=7,5.
- Tampão acetato/ácido acético, 0,1 M, pH=4,5.
- Solução estoque de Imunoglobulina(Ig) de camundongo de concentração 370 µg/ml.
- Tween-20 (detergente não iônico).
- Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé).
- Solução estoque de anti-Imunoglobulina de camundongo (α-Ig) marcado com peroxidase (HRP), diluição 1:5 em glicerina 50%.
- Soro normal de coelho.
- Água oxigenada, 30 volumes, da Merck.
- Solução de ácido sulfúrico 4N, da Merck.
- Solução estoque de OPD (Orto Fenileno Diamino) em tampão acetato/ácido acético, da Merck.

OBS: Todos os materiais, exceto as esferas de N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído, foram fornecidos pelo Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.4.2 Equipamentos.

Foram utilizados tubos de ensaios, estufa a 37°C, pipetas automáticas, balança semi-analítica, pipetas graduadas de 5 e 10 ml, geladeira, espectrofotômetro de UV-vísivel para leitura de placa ELISA.

3.4.3 Procedimento para imobilização de biocompostos em esferas de N-metilolacrilamida.

Foram colocadas dez esferas em cada um dos 24 tubos de ensaio e a seguir foi adicionado 0,5 ml de solução de Ig de camundongo baseado no esquema da tabela 6.

Tabela 6 - Relação do número de tubos de ensaios a serem utilizados para cada solução de imobilização (pH e concentração de Ig).

pH \ [Ig] µg/ml	10	20
4,5	4 tubos	4 tubos
7,5	4 tubos	4 tubos
9,5	4 tubos	4 tubos

Os tubos foram colocados na estufa a 37° C por uma hora e a seguir transferidos para a geladeira onde permaneceram por 18 horas.

Após decorrido esse período, o sobrenadante foi retirado e as esferas foram lavadas três vezes, utilizando-se 1 ml de solução tampão de PBS com 0,05% de Tween-20, em cada lavagem, por tubo.

3.4.3.1 Bloqueio dos sítios ativos das esferas restantes após a imobilização.

Foi adicionado 0,5 ml de solução tampão PBS contendo 5% de leite molico por tubo para fazer o bloqueio. Os tubos foram colocados na estufa a 37°C por uma hora. Após transcorrido esse tempo o sobrenadante foi retirado e a lavagem foi repetida como na etapa de imobilização.

3.4.3.2 Adição de anti-Ig marcada com HRP.

Foram utilizadas nesta etapa duas concentrações de a-Ig: 1:500 e 1:1000 em solução tampão de PBS contendo 2% de leite molico e 2% de SNC (soro normal de coelho).

Os tubos foram incubados baseado no esquema mostrado na tabela 7, abaixo.

Tabela 7 - Relação do número de tubos a serem usados de acordo com as condições de imobilização e concentração da solução de a-Ig.

Imobilização \ [a-Ig]	1:500	1:1000
pH 4,5 e [Ig]-10µg/ml	2 tubos	2 tubos
pH 4,5 e [Ig]-20µg/ml	2 tubos	2 tubos
pH 7,5 e [Ig]-10µg/ml	2 tubos	2 tubos
pH 7,5 e [Ig]-20µg/ml	2 tubos	2 tubos
pH 9,5 e [Ig]-10µg/ml	2 tubos	2 tubos
pH 9,5 e [Ig]-20µg/ml	2 tubos	2 tubos

Foi adicionado 0,5 ml da solução adequada de a-Ig em cada tubo e logo após eles foram colocados na estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, o

sobrenadante foi retirado e as esferas foram lavadas com a mesma solução de lavagem das etapas anteriores, porém essa foi repetida 4 vezes utilizando-se 2 ml por tubo em cada lavagem.

3.4.3.3 Revelação

Nesta etapa foi adicionado em cada tubo 0,5 ml de uma solução de OPD em tampão acetato, 3% em H₂O₂. Os tubos foram deixados em repouso no escuro por 30 min. Após esse intervalo, foi adicionado em cada tubo 125 µl de ácido sulfúrico 4 N e a seguir foi transferido 100 µl de cada tubo para um placa de leitura. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de UV-vísivel em comprimentos de onda de 405 e 490 nm, devido às diferentes tonalidades de coloração obtidas. Foi utilizado como branco a solução de OPD.

3.4.4 Esferas de Uréia-Formaldeído

O mesmo procedimento foi realizado para estas esferas, porém foi utilizado apenas 20 µg/ml de Ig para imobilização pois este valor deu resultados satisfatórios na etapa anterior.

3.5 Determinação dos níveis de detecção das esferas para ELISA.

3.5.1 Comportamento com a variação de α-IG₁

Nesta análise foram utilizadas apenas as esferas de poli N-metilolacrilamida, em pH 4,5 e concentração de Ig de 10 µg/ml, devido suas melhores propriedades verificadas em etapas anteriores.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de a-Ig: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 e 1:64000.

As análises foram realizadas em duplicata e dois controles foram feitos:

Controle 1 - As esferas passaram pelas etapas de imobilização, bloqueio e revelação.

Controle 2 - As esferas passaram pelas etapas de bloqueio, de adição de a-Ig (1:500) e revelação.

3.5.2 Comportamento com a variação da concentração de Ig .

Nesta etapa o pH utilizado na imobilização foi de 4,5 e a concentração de a-Ig foi de 1:8000 baseado nos resultados obtidos em etapas anteriores.

A concentração de Ig foi variada da seguinte forma: 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g/ml}$.

Foram feitos controles da mesma forma da etapa anterior, porém no controle 1 foi usado 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ig e no controle 2 foi usado uma concentração de a-Ig 1:8000.

3.5.3 Comportamento em relação à diferentes suportes e pHs de imobilização.

Foram utilizadas nesta etapa as seguintes concentrações de Ig e a-Ig; 5 $\mu\text{g/ml}$ e 1:8000, respectivamente.

As esferas utilizadas foram as de poli N-metilolacrilamida, poli uréia-formaldeído, poli acrilamida recoberta por poli N-metilolacrilamida e a placa de poliestireno comercialmente vendida. As esferas de poli acrilamida não foram utilizadas devido elas se solubilizarem no meio reacional.

Os pHs de imobilização usados foram 4,5/ 7,5 e 9,5; com exceção das esferas recobertas com N-metilolacrilamida, onde foi testado apenas o pH 4,5

devido seu comportamento ser parecido com o das esferas de poli N-metilolacrilamida.

Os controles, nesta etapa, foram feitos com 5 µg/ml de Ig e 1:8000 de a-Ig, para as esferas de poli N-metilolacrilamida e poli uréia-formaldeído.

Para a placa de ELISA comercial foram utilizados os seguintes volumes em cada etapa:

Imobilização - 50 µl de solução de Ig por orifício.

Lavagens - 300 µl por vez em cada orifício. O número de lavagens foi igual ao estabelecido em procedimentos anteriores.

Bloqueio - 100 µl por orifício.

Adição de a-Ig - 50 µl da solução de a-Ig por orifício.

Revelação - 50 µl de solução de revelador e 25 µl de solução 4N de H₂SO₄.

3.6. Estudos Preliminares de Imobilização de Lipase .

3.6.1- Curva de Calibração

3.6.1.1 Materiais

- Hidróxido de Sódio, p.a, da Merck.
- Tartarato de Sódio e Potássio, p.a., da Merck.
- Sulfato de cobre pentahidratado, p.a., da Merck.
- Lipase Pancreática de Porco - Tipo II - Sigma.
- Solução Tampão fosfato/citrato, 0,1 M, pH=7,0.
- Solução Tampão fosfato/citrato , 0,1 M, pH=4,0.

3.6.1.2 Equipamentos.

Foram utilizados um espectrofotômetro de UV-visível Modelo B-382 da Micronal, balão volumétrico de 500ml, béqueres de 50ml, cubeta de vidro de caminho ótico de 1,0 cm, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1, 2, 3, 5 e 10 ml, balança analítica GA-200 OHAUS.

3.6.1.3 Procedimento.

3.6.1.3.A Solução estoque para Teste de Biureto⁽⁵¹⁾.

Foram pesadas 3g de tartarato de sódio e potássio, 15g de hidróxido de sódio e 0,75g de sulfato de sódio pentahidratado.

As amostras foram dissolvidas em água destilada e transferidas para um balão volumétrico de 500ml, o qual teve seu volume posteriormente completado.

3.6.1.3.B. Curva de Calibração

Foi preparada uma série de soluções de concentração de lipase variando de 10 mg/ml a 650 µg/ml para os 2 valores de pH utilizados na imobilização.

Foi transferido 1ml de cada solução para tubos de ensaio onde foram adicionados 4 ml de solução de biureto, deixando-se em repouso por 30 min. Para cada valor de pH foi feito um branco baseado na utilização de 1ml do tampão (pH 4,0 e 7,0) e 4ml da solução de biureto.

Após o período de repouso, os valores de absorbância das soluções foram lidos em um espectrofotômetro de UV-visível em comprimento de onda de 540 nm.

Os valores de absorbância lidos foram graficados em função da concentração de lipase.

A curva de calibração é necessária para determinação da concentração de amostras desconhecidas. No nosso caso ela foi utilizada para a determinação da concentração de lipase na solução após imobilização.

Foram feitas curvas de calibração para as duas imobilizações realizadas (pH 4,0 e 7,0).

Tabela 8 - Valores médios de absorbância obtidos para a construção das curvas de calibração da lipase, graficadas nas figuras 15 e 16.

Concentração mg/ml	A 540 nm , pH-4,0	A 540 nm - pH-7,0
0,625	0,010	0,003
1,25	0,017	0,017
2,5	0,042	0,042
5	0,084	0,088
10	0,158	0,160
Solução inicial	0,090	0,090
Solução final	0,031	0,053

A regressão linear das retas obtidas são mostradas abaixo :

$$\text{pH-4,0} \quad Y=0,0006667 + 0,01593 X \quad R= 0,99875$$

$$\text{pH-7,0} \quad Y = -0,00246 + 0,016663 \quad R= 0,99683$$

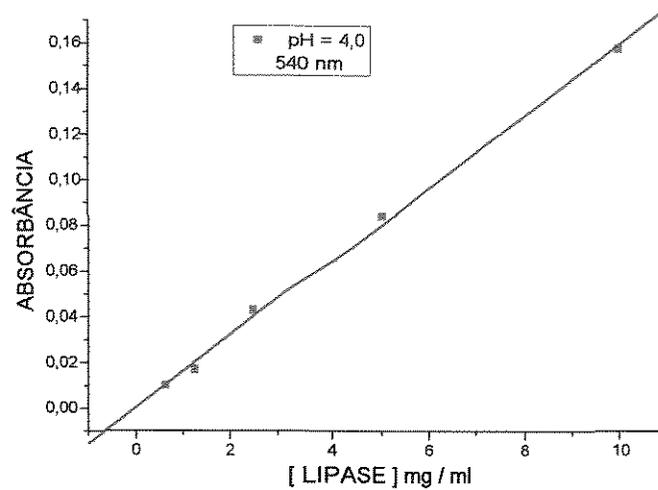


Figura 15 - Curva de calibração da enzima lipase para pH de imobilização 4,0 utilizando como suporte macroesferas de N-metilolacrilamida (Valores obtidos pelo do método do biureto).

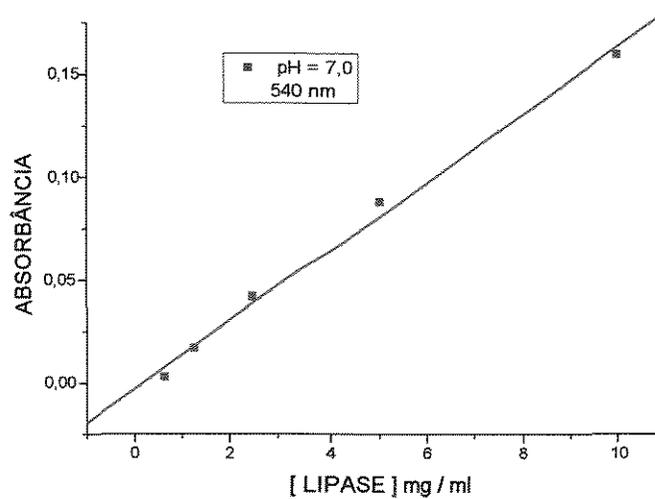


Figura 30 - Curva de calibração da enzima lipase para pH de imobilização 7,0 utilizando como suporte macroesferas de N-metilolacrilamida (Valores obtidos pelo do método do biureto).

3.6.2 Imobilização da Lipase.

3.6.2.1 Materiais

- Esferas de N-metilolacrilamida.
- Solução estoque para Teste de Biureto.
- Lipase Pancreática de Porco - Tipo II - Sigma.
- Solução Tampão fosfato/citrato, 0,1 M, pH=7,0.
- Solução Tampão fosfato/citrato , 0,1 M, pH=4,0.

3.6.2.2. Equipamentos

Foram utilizados um espectrofotômetro de UV-visível Modelo B-382 da Micronal, béqueres de 50ml, cubeta de vidro de caminho ótico de 1,0 cm, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1, 2, 3, 5 e 10 ml, geladeira, agitadores magnéticos, estufa, balança analítica GA-200 OHAUS e liofilizador L5KR, EDWARDS.

3.6.2.3. Procedimento.

Soluções contendo aproximadamente 5 mg/ml de lipase foram preparadas utilizando soluções tampão de citrato/fosfato de pH 4,0 e 7,0.

Foram pesadas duas amostras de esferas de N-metilolacrilamida e a seguir foram adicionadas as soluções de lipase. O volume adicionado foi o correspondente para satisfazer a relação de 1g de esferas para cada 50mg de lipase em solução.

Foi separado de cada solução 1ml para realização do teste de biureto (dosagem de proteína) como realizado na etapa anterior.

O sistema foi colocado na estufa por 1 h a 37°C e depois transferido para geladeira por 18h. Nestas duas etapas foi mantida a agitação constante.

No final da etapa de imobilização, uma alíquota de 1 ml foi retirada de cada sistema e a dosagem de proteína foi novamente feita.

Os sobrenadantes foram retirados e as esferas foram lavadas com solução tampão fosfato/citrato de pH=7,0 e água destilada.

Após a lavagem as esferas foram liofilizadas e depois conservadas em geladeira.

A partir da curva de calibração podemos determinar quanto de lipase foi imobilizada em uma determinada massa de esferas.

Concentração inicial de lipase (pH-4,0) - 5,61 mg/ml

Concentração final de lipase (pH-4,0) - 1,90 mg/ml

Massa imobilizada (pH-4,0) - 3,71 mg/ml

Foi utilizado 11,5 ml de solução de lipase e 1,15 g de esferas; assim temos 37,10 mg de lipase imobilizada (pH-4)/ g de esferas de N-metilolacrilamida.

Concentração inicial de lipase (pH-7,0) - 5,55 mg/ml

Concentração final de lipase (pH-7,0) - 3,33 mg/ml

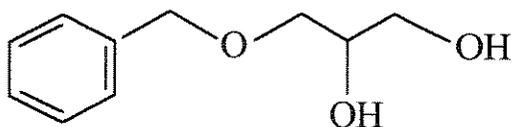
Massa imobilizada (pH-7,0) - 2,22 mg/ml

Foi utilizado 11,7 ml de solução de lipase e 1,17 g de esferas; assim temos 22,22 mg de lipase imobilizada (pH-7)/ g de esferas de N-metilolacrilamida.

3.6.3. Reação de Esterificação do Álcool 3-benziloxi-1,2-propanodiol com Acetato de vinila.

3.6.3.1. Materiais.

- Lipase imobilizada em pH=4,0 e 7,0 em esferas de N-metilolacrilamida.
- Lipase - Tipo II - Sigma.
- Acetato de vinila, p.a., da Merck.
- Álcool 3-benziloxi-1,2-propanodiol, fornecido pelo Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP.



- THF (Tetra Hidro Furano), p.a., da Merck.

3.6.3.2 Equipamentos.

- Balão de Fundo Redondo 50 ml (24/40).
- Pipeta Pasteur.
- Agitadores Magnéticos.
- Seringa de Injeção.
- Cromatógrafo a gás, VDC-5890A.

3.6.3.3 Procedimento.

Foram feitos três sistemas reacionais baseados na tabela 8 abaixo.

Tabela 8 - Relação de reagentes para as reações de esterificação.

Sistemas	Álcool		Acetato de Etila		Lipase	Estado da Lipase
	em g	em mmol	em g	em mmol	em mg	
1	0,11	0,55	0,14	1,65	22,45	imobilizada
2	0,06	0,33	0,08	0,99	13,90	imobilizada
3	0,18	1,00	0,26	3,00	40,00	em solução

A lipase utilizada no sistema 1 foi imobilizada em pH=4,0 enquanto que no sistema 2 a enzima foi imobilizada em pH=7,0.

A quantidade de esferas de N-metilolacrilamida com lipase imobilizada foi determinada a partir da quantidade de lipase imobilizada por grama de esferas descrito no tópico anterior.

Os sistemas foram mantidos sob agitação constante e à temperatura ambiente.

Foram retiradas alíquotas nos seguintes intervalos de tempo 1, 2, 3, 5, 24, 48, 144 h.

As alíquotas foram analisadas em cromatógrafo a gás, utilizando as seguintes condições de análise:

- Gás de arraste - Nitrogênio (N₂).
- Coluna - HP 5 (apolar).
- Temperatura no injetor: 250°C.
- Temperatura inicial da coluna: 100°C.
- Temperatura final da coluna: 200°C.
- Velocidade de aquecimento: 10°C/min.
- Detector - Ionizador de chama.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Caracterização das Resinas e Esferas.

4.1.1 Aspectos físicos .

As resinas de M-metilolacrilamida e uréia-formaldeído são um pó branco solúvel em água e em solventes polares.

Todas as esferas obtidas são brancas, sendo que, algumas das esferas de poli N-metilolacrilamida e poli acrilamida apresentaram coloração amarela devido a sua decomposição, quando expostas a temperaturas elevadas, acima de 120°C, por longo período de tempo.

As esferas são insolúveis em solventes orgânicos polares e apolares, assim como na água, com exceção das esferas de poli acrilamida que apresentaram solubilidade em água, possivelmente devido à não formação de uma rede polimérica tridimensional o que resultaria na não dissolução e assim apenas uma estrutura gelificada como característica desta resina.

Durante o procedimento experimental foi verificado que a massa de partida de resina resultava em uma massa maior de esferas o que levou a deduzir que o solvente utilizado durante a formação das esferas tinha sido incorporado na estrutura. Para nos certificarmos disso, submetemos as esferas à secagem a vácuo, para que a N,N-dimetil formamida (ponto de ebulição de aproximadamente 153°C), fosse evaporada a 120°C evitando uma possível degradação das esferas, os resultados de perda de massa são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Perda de massa das esferas de N-Metilolacrilamida, uréia-formaldeído, poliácrlamida e piloacrilamida recoberta por N-metilolacrilamida após 48h a 120° C em estufa a vácuo*.

Parâmetros Resinas	Massa inicial de esferas (em g)	Massa final de esferas (em g)	Massa perdida (em g)	Massa perdida (em %)
NMA	4,2987	3,4643	0,8344	19,41
U-F	1,8745	1,5455	0,3290	17,55
PA	4,5233	4,2611	0,2622	5,80
PA rec.	0,9057	0,7965	0,1092	12,06

* a pressão utilizada não foi mantida constante devido a problemas no vedamento da estufa utilizada.

Este tratamento térmico causou danos às esferas devido as formações de fraturas e conseqüente diminuição da resistência das mesmas a qualquer processo mecânico, como a agitação. Supostamente essas fraturas surgiram devido ao aumento da pressão dentro da estrutura das esferas com a evaporação do solvente nesta incorporado.

4.1.2 Análises de Espectroscopia de FTIR⁽⁵²⁾.

As figuras 17 a 24 mostram os espectros de I.V. obtidos.

Como observado no espectro da resina N-metilolacrilamida(figura 18), esta apresenta uma banda larga e intensa na região de 3326,5 cm⁻¹. Esse tipo de banda abaulada é característica do estiramento O-H de álcool enquanto que no caso da acrilamida(figura 17), as bandas nesta região são referentes aos estiramentos N-H das amidas. Na resina N-metilolacrilamida essas bandas

estão presentes porém, são incobertas pela banda característica da função álcool. O aparecimento desta banda caracteriza a síntese da resina em questão.

Próximo da região de $2961,1 \text{ cm}^{-1}$ verificamos a presença da banda característica do estiramento C-H dos alcenos. Esta banda está presente na acrilamida, sendo muitas vezes incoberta pela banda do estiramento N-H, e na resina N-metilolacrilamida indicando a presença da insaturação (C=C). A dupla ligação pode ser também caracterizada pelo estiramento C=C que aparece no espectro, na forma de bandas intensas, na região de $1613,6 \text{ cm}^{-1}$. Essas duas bandas características da dupla ligação desaparecem totalmente no espectro das esferas de poli N-metilolacrilamida (figura 19), indicando assim uma polimerização via radicais livres com o consumo das duplas ligações presentes no monômero. Assim sendo, a poli N-metilolacrilamida pode ser caracterizada pelo aparecimento de bandas de álcool (bandas largas na região de $3300\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$) e pelo desaparecimento das bandas do grupo alceno (bandas intensas na região 2900 cm^{-1} e 1600 cm^{-1}).

No caso da uréia (figura 20) temos bandas referentes ao estiramento N-H do grupo -NH_2 na região de $3300\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$, ao estiramento C=O em $1681,1 \text{ cm}^{-1}$ e a deformação N-H próximo de 1600 cm^{-1} ; porém os espectros desses grupos não sofrem grande interferência com a formação da resina uréia-formaldeído (figura 21). Esta é principalmente caracterizada pelo aparecimento de uma banda larga na região próxima de 3300 cm^{-1} , como dito anteriormente, e de outras na região de $1262,9 \text{ cm}^{-1}$ e $1386,6 \text{ cm}^{-1}$ características da deformação do grupo O-H.

No caso do polímero uréia-formaldeído (figura 22) não foram observadas mudanças aparentes.

No espectro da poli acrilamida (figura 23) não se observa variações nas bandas referentes ao grupo -NH_2 , porém observa-se uma drástica variação nas

bandas referentes ao grupo alceno, com a diminuição das intensidades nas regiões de 2900 cm^{-1} (estiramento C-H do alceno), 1600 cm^{-1} (estiramento C=C) e $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (deformação C-H de alcenos).

O espectro da poliacrilamida recoberta por N-metilolacrilamida (figura 24) é extremamente parecido com o espectro do polímero N-metilolacrilamida, como era de se esperar.

Não podemos deixar de considerar que as bandas referentes ao grupo OH são bastante influenciadas pela presença de água no composto visto que nenhum processo para sua eliminação foi realizado antes das análises de espectroscopia de I.V..

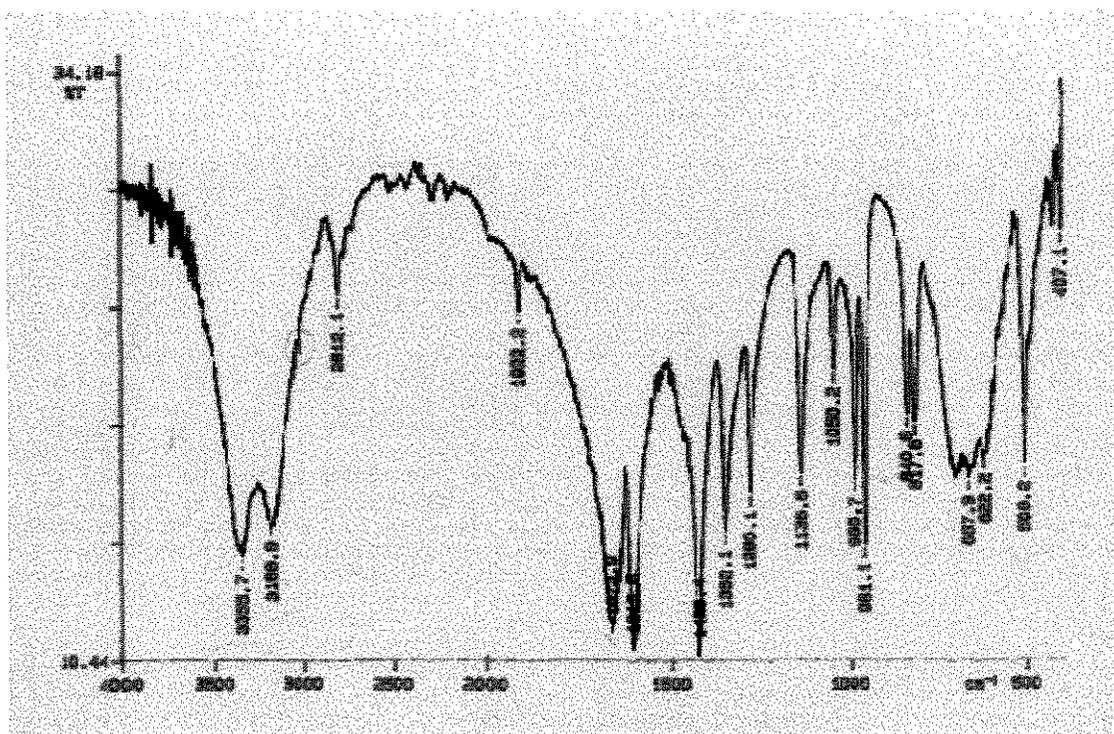


Figura 17 - Espectro de FTIR da Acrilamida, em pastilha de KBr na região de $4400\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

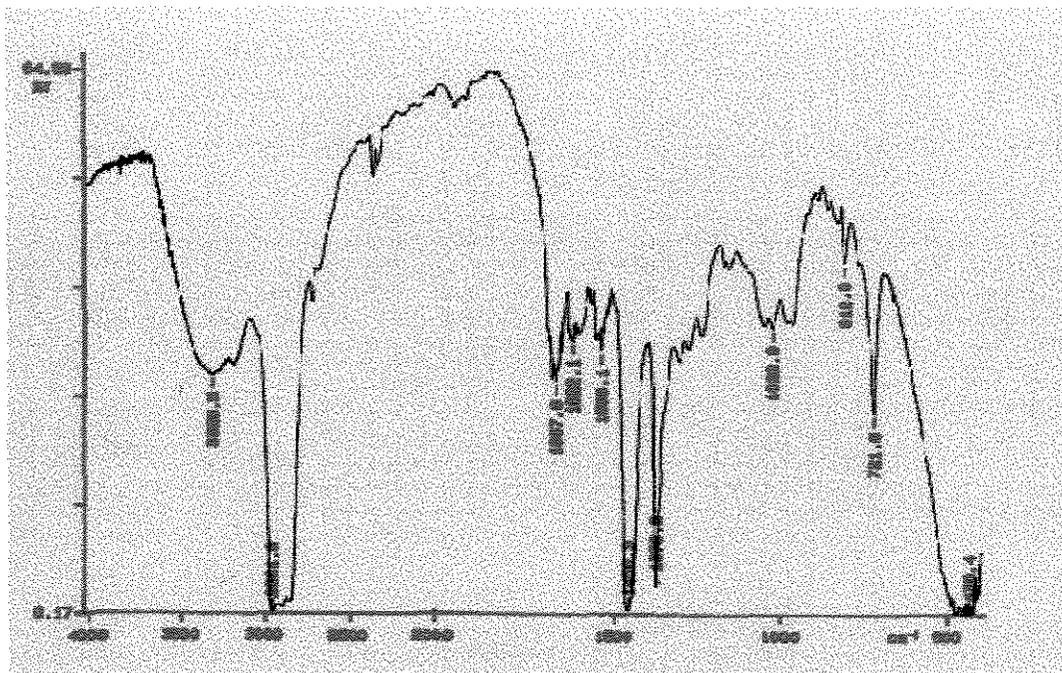


Figura 18 - Espectro de FTIR da resina de N-Metilolacrilamida, em pastilha de K Br na região de 4400-400 cm^{-1} .

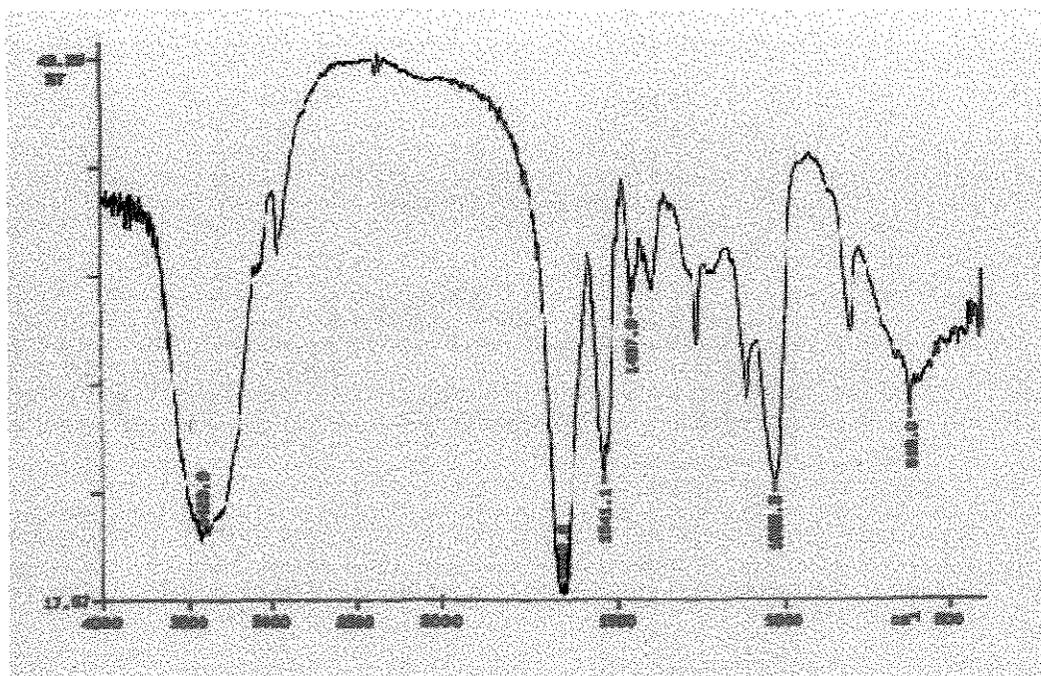


Figura 19 - Espectro de FTIR da esfera de N-Metilolacrilamida, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

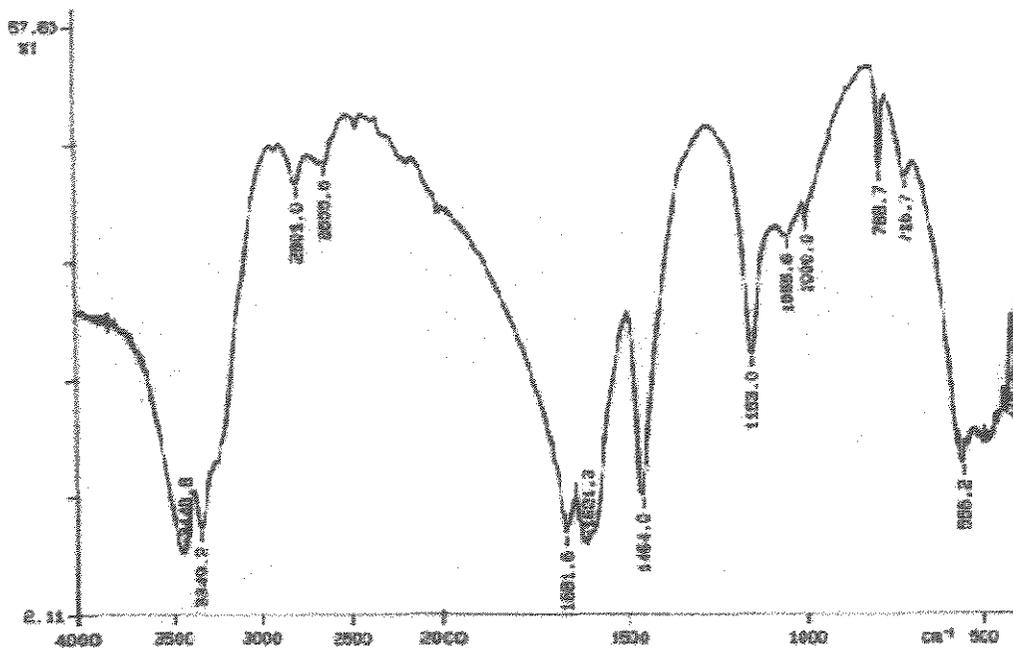


Figura 20 - Espectro de FTIR da Uréia, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

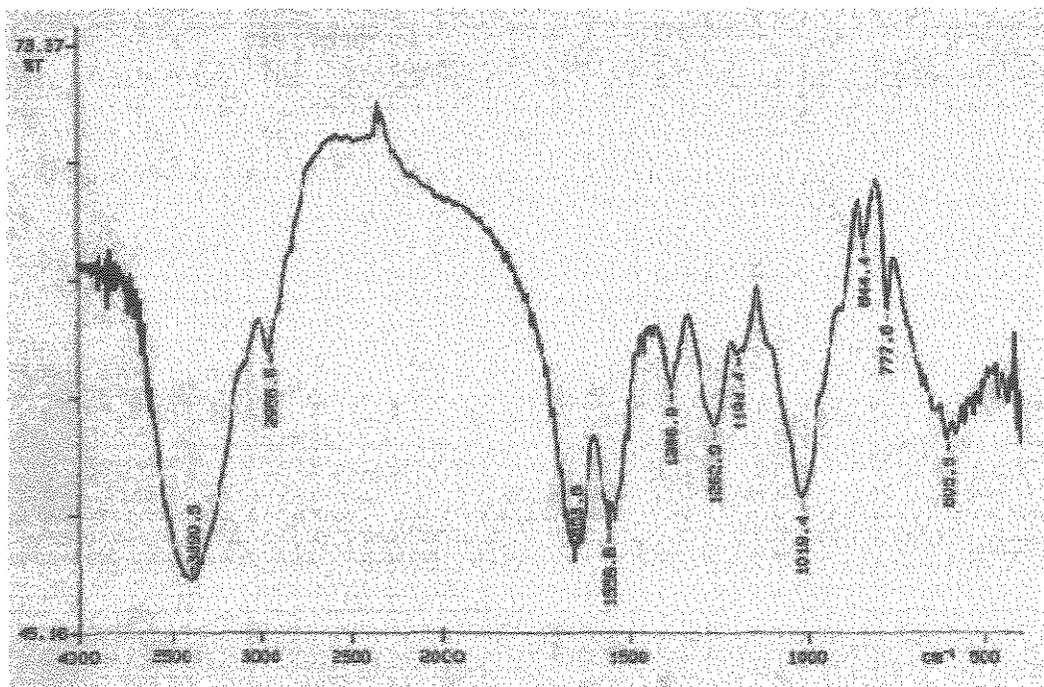


Figura 21 - Espectro de FTIR da resina de Uréia-Formaldeído, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

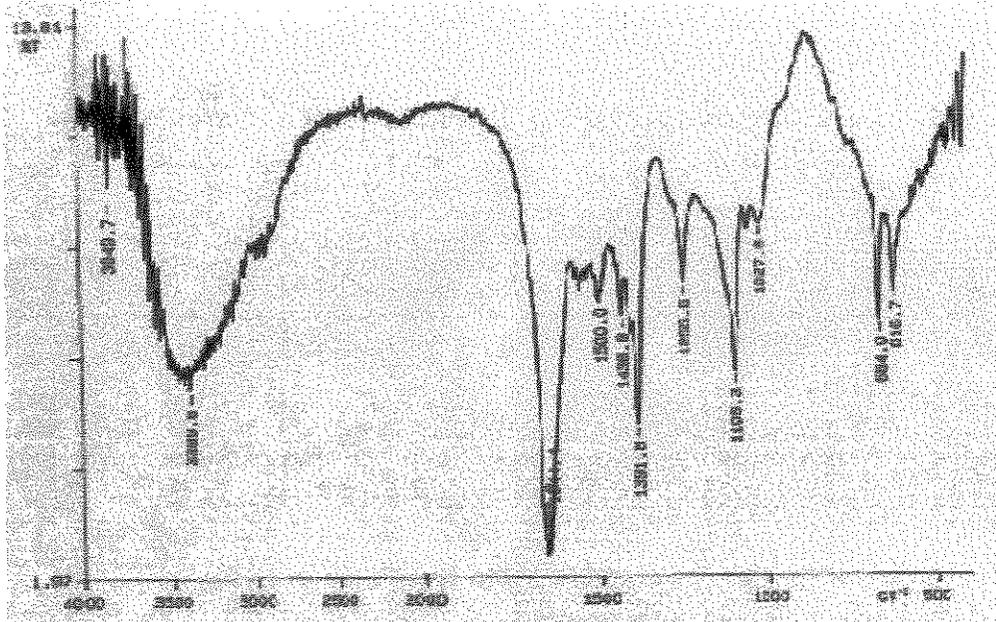


Figura 22 - Espectro de FTIR do Polímero Uréia-Formaldeído, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

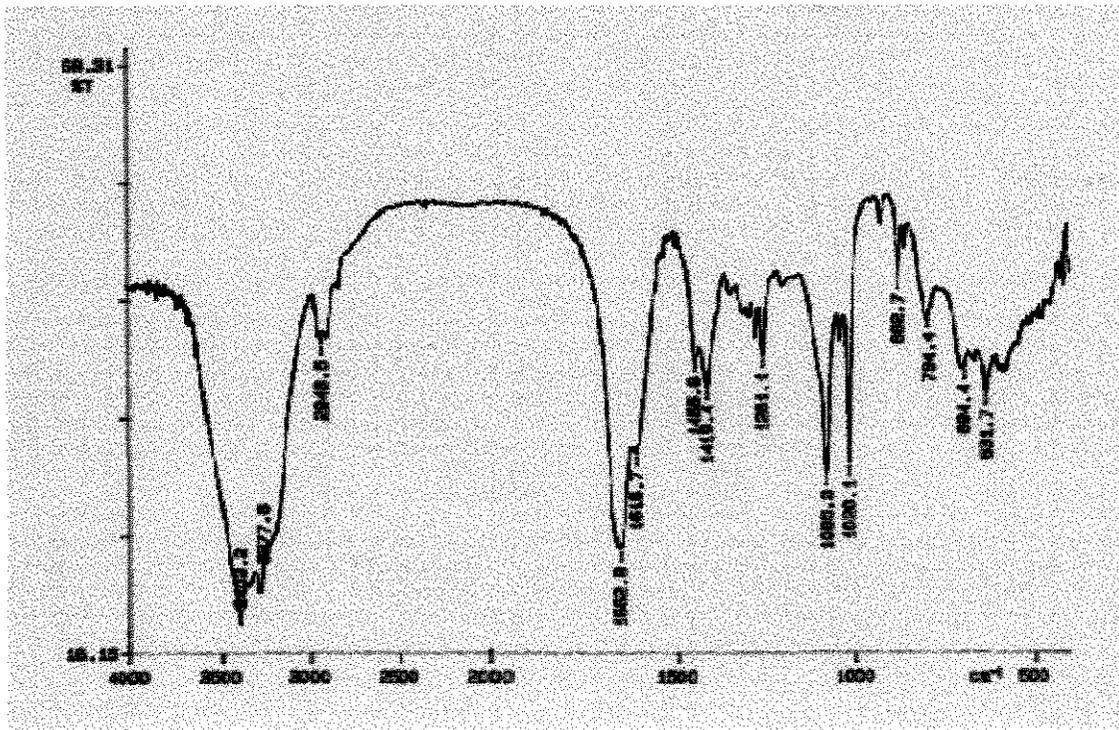


Figura 23 - Espectro de FTIR da esfera de Acrilamida, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

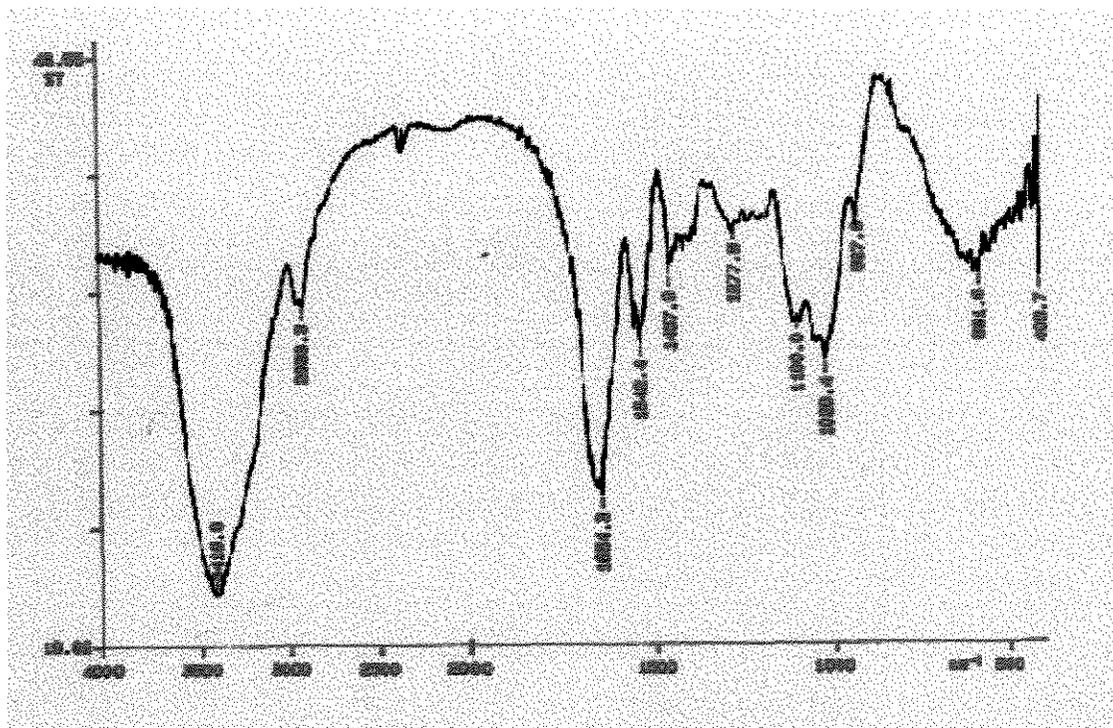


Figura 24 - Espectro de FTIR da esfera de Acrilamida recoberta por N-Metilolacrilamida, em pastilha de KBr na região de 4400-400 cm^{-1} .

4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura .

Pelas fotos (fotos 1 a 10) obtidas por microscopia eletrônica de varredura temos:

Tabela 11 - Tamanho médio das esferas obtidos.

Esferas	Tamanho (mm)
N-Metilolacrilamida	$2,70 \pm 0,05$
Poli acrilamida	$2,90 \pm 0,05$
Poli acrilamida recoberta	$2,70 \pm 0,05$
Uréia-formaldeído	$2,10 \pm 0,05$

Todas as esferas foram obtidas pelo mesmo processo, ou seja, gotejamento de soluções das resinas e do monômero acrilamida com auxílio de um pipeta pasteur. As esferas apresentaram tamanhos diferentes devido ao difícil controle da etapa de gotejamento e às diferentes temperaturas utilizadas para a sínteses de esferas de diferentes resinas e monômeros.

Os aspectos superficiais das esferas observados em microscopia eletrônica são os seguintes:

- As esferas de N-metilolacrilamida, poli acrilamida e uréia-formaldeído apresentam porosidade.

- As esferas de N-metilolacrilamida apresenta uma superfície bastante porosa e seus poros são maiores que os encontrados nas outras esferas como pode ser verificado nas fotos 3 e 4 obtidas. A porosidade das esferas de N-metilolacrilamida pode ser observada a partir de um aumento de foco de 150 vezes (vide foto 2) enquanto que no caso das esferas de uréia-formaldeído a porosidade foi observada com um aumento de 4500 vezes (vide foto 10) da poli acrilamida com um aumento de 1500 vezes (vide foto 9).

- As esferas de N-metilolacrilamida apresentam poros de tamanho bastante variados como pode se observar na foto 4.

- As esferas de poli acrilamida recobertas por N-metilolacrilamida não apresentam porosidade (vide fotos 7 e 8). Isto pode ser decorrente do processo de recobrimento, isto é, a solução de formaldeído penetrou nos poros das esferas de poli acrilamida resultando na reação de reticulação dentro destes interstícios e conseqüentemente os poros foram preenchidos pelo produto da reação, ou seja, N-metilolacrilamida.

- Apesar da ausência de porosidade, as esferas de poli acrilamida recoberta apresentaram fraturas decorrentes ao tratamento térmico realizado durante o processo de síntese como discutido anteriormente (vide foto 8).

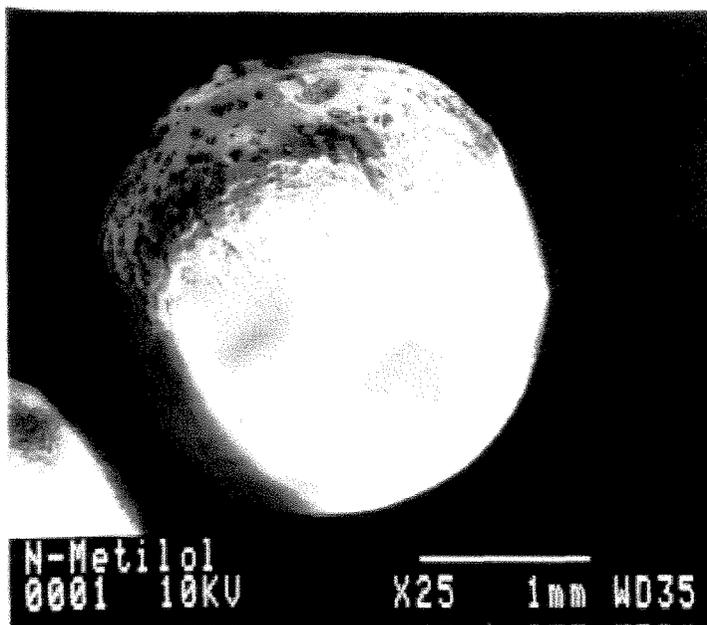


Foto 1 – Esferas de N-metilolacrilamida com aumento de 25 vezes.

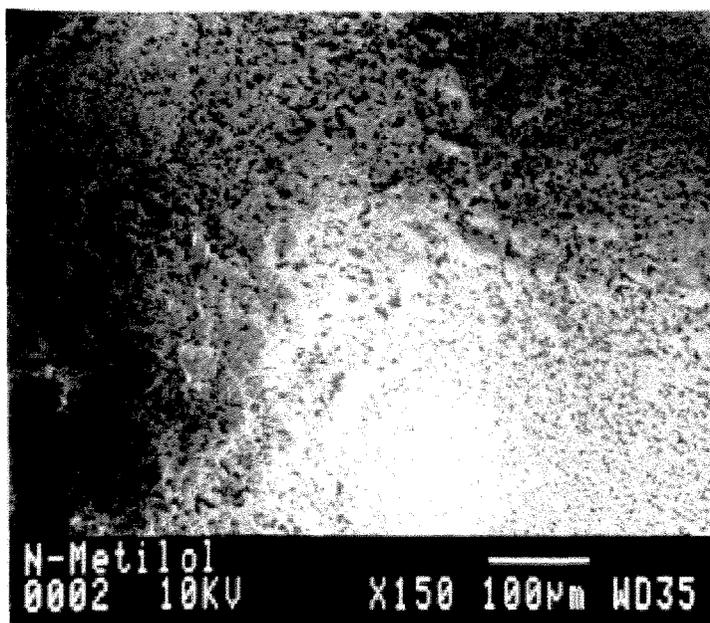


Foto 2 – Esfera de N-metilolacilamida com aumento de 150 vezes.

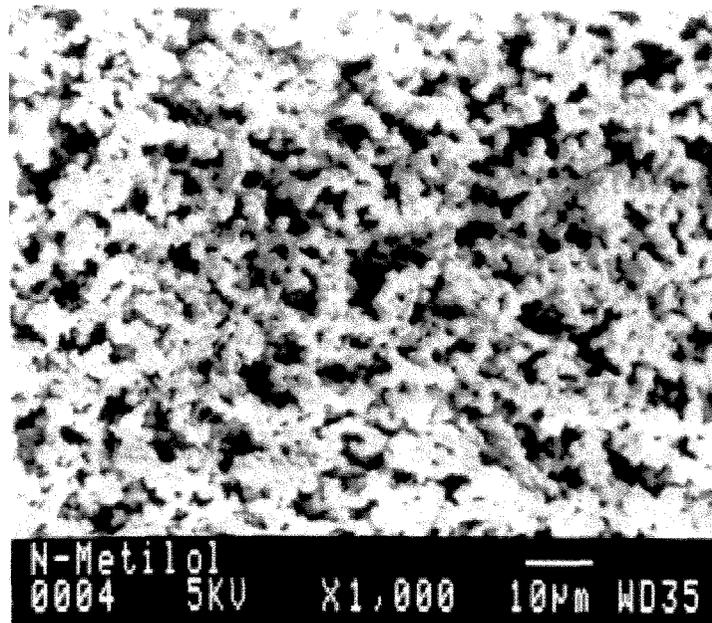


Foto 3 – Esfera de N-metilolacrilamida com aumento de 1000 vezes.

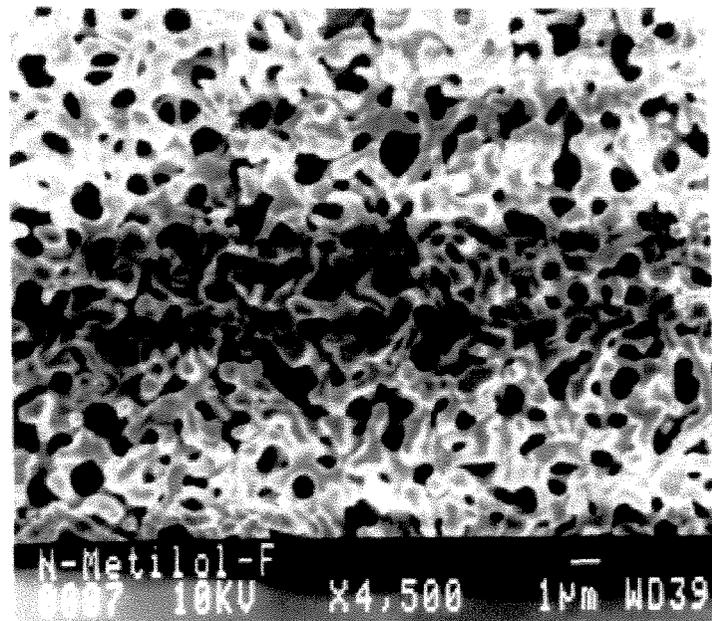


Foto 4 – Corte da esfera de N-metilolacrilamida com aumento de 4500 vezes.

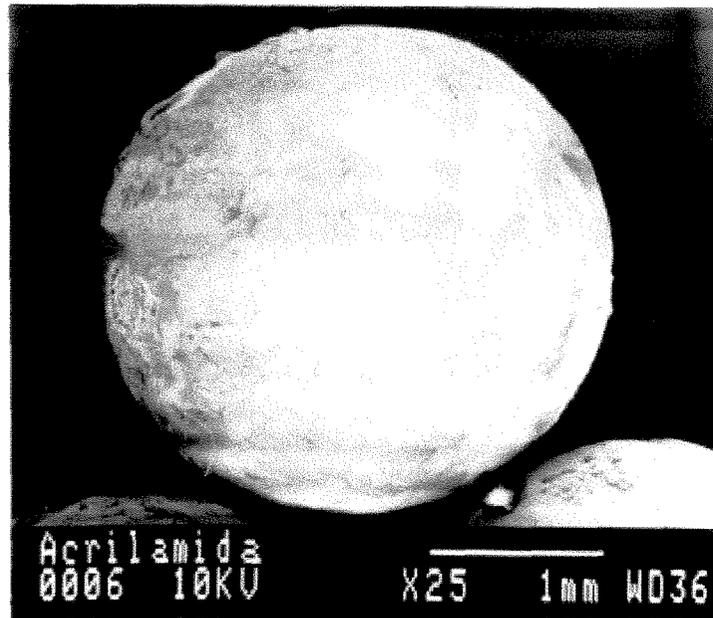


Foto 5 – Esfera de poli acrilamida com aumento de 25 vezes.

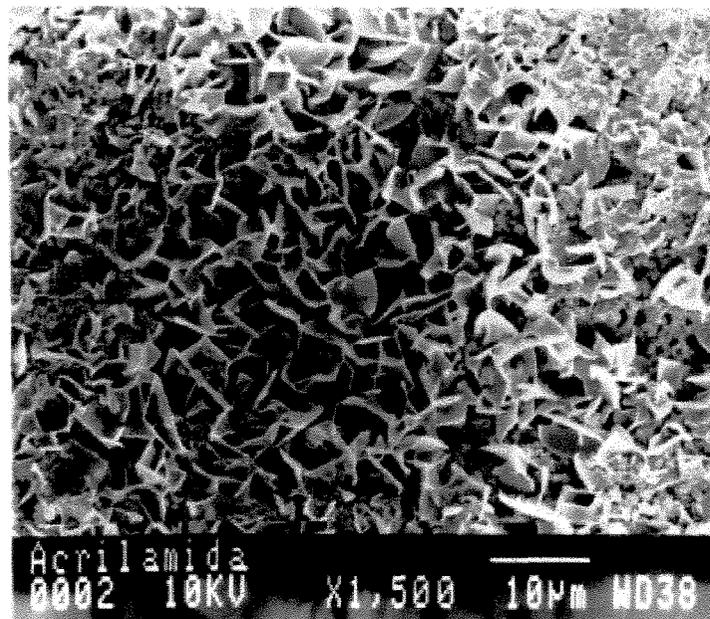


Foto 6 – Esfera de poli acrilamida com aumento de 1500 vezes.



Foto 7 – Esferas de poli acrilamida recobertas com N-metilolacrilamida com aumento de 15 vezes.

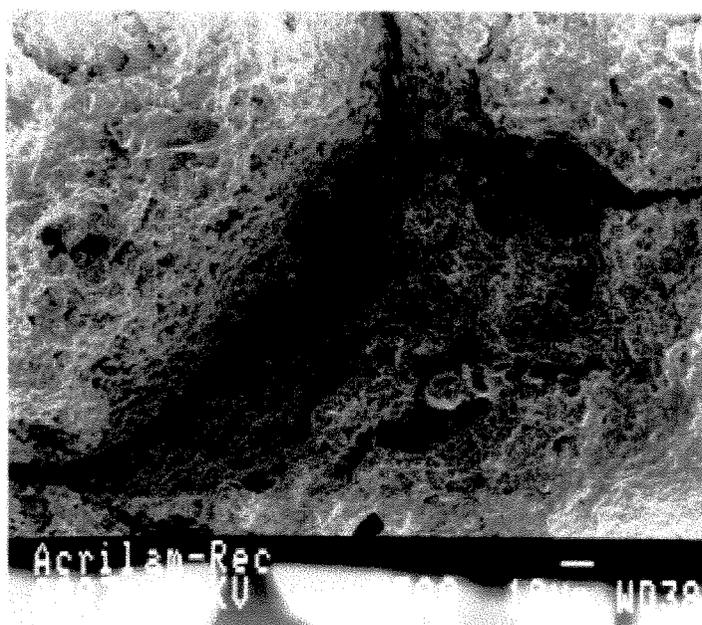


Foto 8 – Esfera de poli acrilamida recoberta com N-metilolacrilamida com aumento de 500 vezes.(Foto da fratura da esfera)

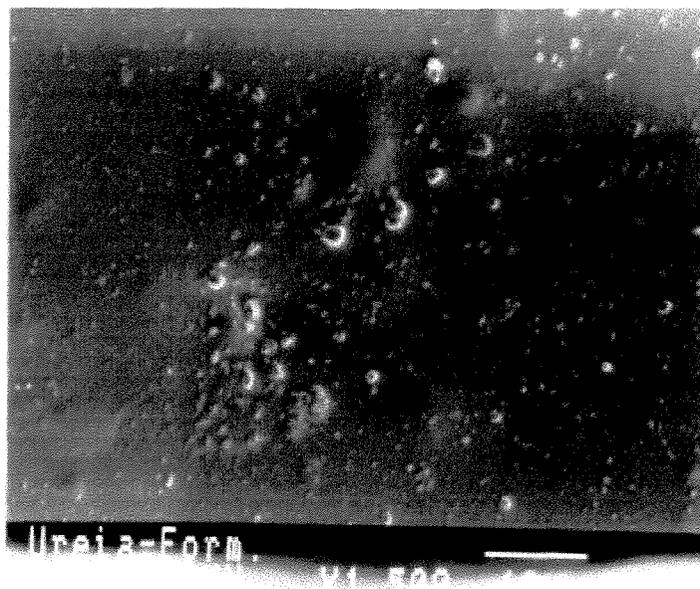


Foto 9 – Esfera de uréia-formaldeído com aumento de 1500 vezes.

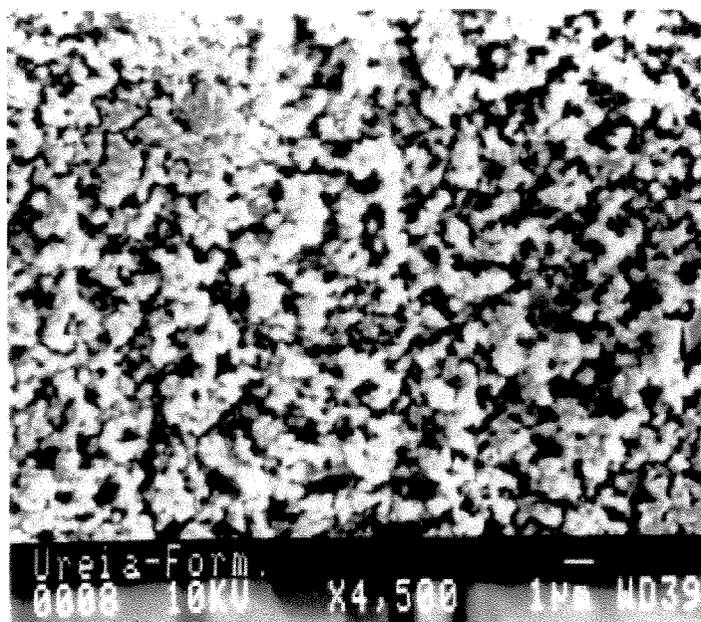


Foto 10 – Esferas de uréia-formaldeído com aumento de 4500 vezes.

As fotos de 11 a 14 são referentes a fotos tiradas com máquina fotográfica comum.



Foto 11 – Esferas de N-metilolacrilamida.



Foto 12 – Esferas de poli acrilamida.



Foto 13 – Esferas de poli uréia-formaldeído.

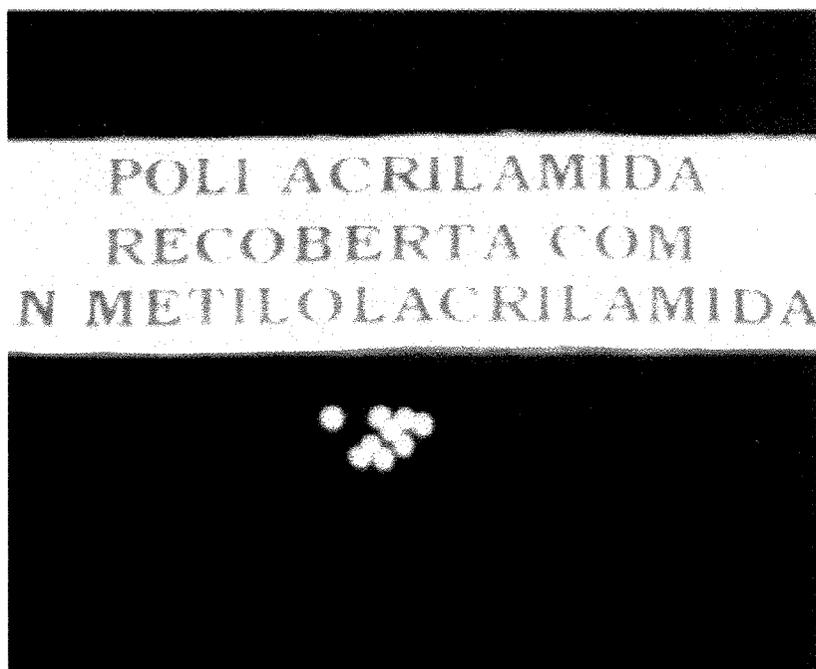


Foto 14 – Esferas de poli acrilamida recobertas com N-metilolacrilamida.

4.1.4 Área superficial (BET).

Os valores de área superficial obtidos para as diferentes esferas estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados das análises de área superficial(BET) das esferas obtidas.

Esferas	Área superficial (BET) (m ² /g)
N-metilolacrilamida	0,91 ± 0,08
Poli acrilamida	1,47 ± 0,07
Poli acrilamida recoberta	0,07 ± 0,03
Uréia-formaldeído	26,47 ± 0,04

Os valores de área superficial são concordantes com os resultados obtidos das análises de microscopia eletrônica de varredura, ou seja:

- Superfícies não porosas apresentam menor área superficial, neste caso observa-se que a menor área superficial é das esferas de poli acrilamida recobertas.

- Quanto maior o tamanho de poros, menor será a área superficial, assim como discutido no tópico 4.1.3, as esferas de N-metilolacrilamida apresentam poros grandes o que resulta em uma menor área superficial como verificado nos resultados apresentados na tabela 12.

A maior área superficial observada é referente as das esferas de uréia-formaldeído devido essas possuírem uma grande quantidade de poros de pequena dimensão, resultando neste alto valor de área superficial.

As esferas de poli acrilamida apresentam um valor de área superior ao apresentado pelas esferas de N-metilolacrilamida. Isto pode ser atribuído a existência de poros menores, o que não foi possível avaliar por microscopia eletrônica de varredura.

4.1.5 Porosimetria de mercúrio

Os resultados desta análise são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Resultados da análise de porosimetria de mercúrio para as esferas sintetizadas.

Esferas	VTI (ml/g)	ATP (m ² /g)	DMP			D (g/ml)	P (%)
			Volume	Área	4V/A		
NMA	0,7036	15,129	1,0103	0,0097	0,1860	1,2173	85,65
PA	0,4714	16,628	0,4830	0,0106	0,1134	26,9362	1269,71
PA-R	—	—	—	—	—	—	—
U-F	0,4044	79,085	0,0239	0,0159	0,0205	19,1570	774,74

Os valores apresentados na tabela 13 estão coerentes com os resultados obtidos por microscopia eletrônica e por BET.

As esferas de poli acrilamida recobertas não apresentaram respostas a esse método de análise o que vem a comprovar a não existência de poros.

Num caso ideal, considerando-se um material com todos os poros cilíndricos e do mesmo tamanho, o resultado obtido para diâmetro médio de poros seria único, por volume, área e $4V/A$ ⁽⁵³⁾. Baseado na idéia apresentada as esferas de uréia-formaldeído apresentam tamanho de poros bastante constante em relação as esferas de outros materiais.

4.2. Resultados dos estudos dos parâmetros para teste ELISA.

Na tabela 14 são apresentados os valores de absorbância lidos na etapa preliminar, na qual o principal objetivo era o de verificar se as resinas eram capazes ou não de imobilizarem imunoproteínas e, conseqüentemente, serem usadas em testes ELISA. Através dos resultados obtidos, tivemos uma noção do comportamento da imobilização frente à variação do pH e da concentração da solução de Ig. Observou-se que em meio ácido (pH=4,5) as resinas possuem maior potencial de imobilização, provavelmente devido a protonação do grupo OH destas, favorecendo a ligação com os elétrons livres do grupo amino ou de outra parte da enzima que possua afinidade por cargas positivas, ou seja, nucleófilos. Vide figura 25.

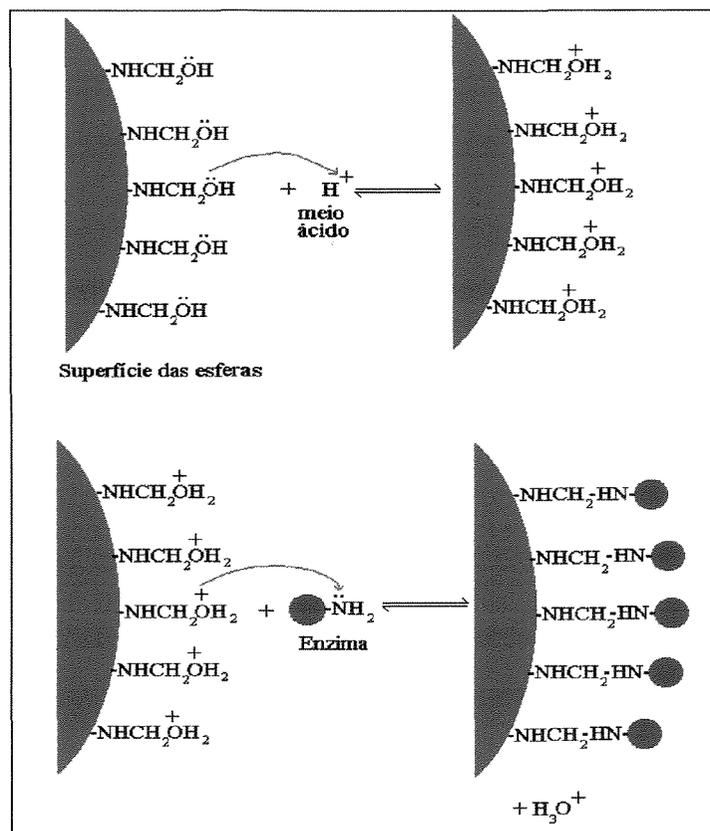


Figura 20- Mecanismo de imobilização de biocompostos em suportes com o grupo N-metilol

Tabela 14 - Valores médios das absorvâncias lidas, em 405 nm, para Ig imobilizada em esferas de N-metilolacrilamida usando diferentes concentrações de Ig e a-Ig.

		A média (405nm)	
pH	[Ig]	[a-Ig]	
	g/ml	1:500	1:1000
4,5	10	0,467	0,195
	20	0,415	0,307
7,5	10	0,270	0,174
	20	0,428	0,181
9,5	10	0,218	0,131
	20	0,251	0,197

Tabela 15 - Valores médios das absorvâncias lidas, em 492 nm, para Ig imobilizada em esferas de Uréia-Formaldeído.

		A média (405nm)	
pH	[a-Ig]		
	1:500	1:1000	
4,5	0,010	0,109	
7,5	0,014	0,074	
9,5	0,002	0,035	

Obs: [Ig] = 20 µg/ml

Os valores mostrados na tabela 15 não estão de acordo com o esperado pois os valores para a diluição 1:500 são menores que os de 1:1000, chegando-se a conclusão que houve erros durante o procedimento experimental. Porém, pode-se verificar novamente que as melhores respostas são para o valor de $\text{pH}=4,5$, para o valor de diluição 1:1000.

4.2.1. Resultados do Teste ELISA frente a variação de a-Ig.

Os resultados obtidos foram condizentes com o esperado, ou seja, quanto maior a diluição menor o valor de absorbância lida pois menor será o número de anti-imunoglobulina para se ligar no suporte e reagir posteriormente com o substrato, que nesse caso era a água oxigenada.

Os resultados são apresentados na tabela 16 a seguir.

Os valores de leituras apresentados são registrados pelo aparelho já descontado o valor do branco.

Nesta etapa foram utilizados controles. O controle 1 serve para verificar se o material imobilizado é capaz de interferir no valor da leitura, enquanto que o controle 2 indica se está havendo imobilização inespecífica de a-Ig, ou seja, se o bloqueio realizado está sendo eficiente. No nosso caso, o agente bloqueante são proteínas não específicas encontradas no leite e elas agem se ligando a possíveis sítios da resina que ainda se encontram livres. Neste experimento verificou-se que a resina utilizada, as esferas, interfere na resposta. Isto é comprovado devido este possuir uma leitura de absorbância positiva, assim como no controle 2, onde as leituras foram maiores que a do branco, nos levando a concluir que o bloqueio nesta etapa não foi satisfatório. Quando essas leituras interferem na análise, seu valor de leitura deve ser subtraído dos valores obtidos nas amostras. Os resultados apresentados em 492 nm não

foram subtraídos pois o valor de a-Ig usado no controle foi de 1:500 e as amostras lidas tinham valores de a-Ig inferiores a 1:8000. Em 405 nm as leituras para 1:500, 1:1000 e 1:2000 tiveram subtraídos de seus resultados o valor da leitura do controle 2.

Tabela 16 - Valores médios das absorvâncias lidas utilizando N-metilolacrilamida como suporte.

[a-Ig]	A 405 nm	A 492 nm
1:500	1,686	a
1:1000	1,002	a
1:2000	0,544	a
1:4000	0,252	a
1:8000	0,097	1,342
1:16000	0,055	0,546
1:32000	0,018 ^b	0,152
1:64000	0,034	0,050
Branco	0,055	0,052
Controle 1 ^c	0,044	0,026
Controle 2 ^d	0,014	0,188

Obs: [Ig] = 10 µg/ml

(^a) - representa valores de absorvância que o aparelho de medidas não foi capaz de ler, ou seja, acima do seu nível de detecção.

(^b) indica um valor discrepante dos demais, possivelmente proveniente de erros experimentais.

(^c) – Controle utilizando Ig e bloqueio.

(^d) – Controle utilizando bloqueio e a-Ig.

Com resultados deste experimento obteve-se gráficos de [a-Ig] vs. absorvância lida em 405 e 492nm, como mostrados nas figuras 26 e 27, respectivamente.

A linearidade observada nos leva a concluir que a leitura de absorvância é diretamente proporcional ao valor de a-Ig utilizado nas análises.

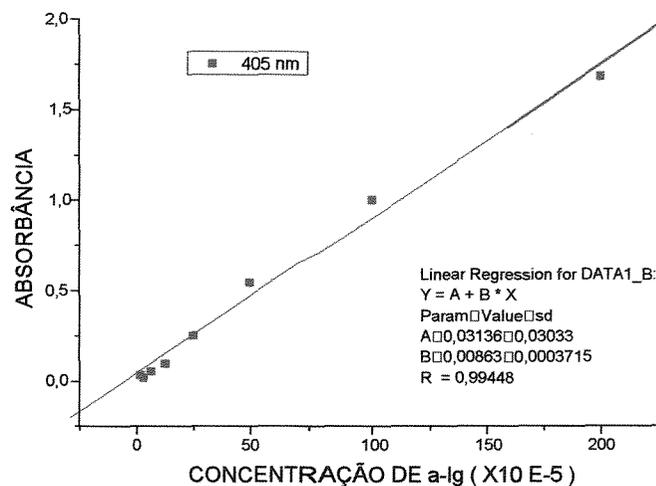


Figura 26 - Valores de absorvâncias lidas em 405 nm para o ensaio ELISA, utilizando esferas de N-metilolacrilamida como suporte, em função da variação da concentração de a-Ig .

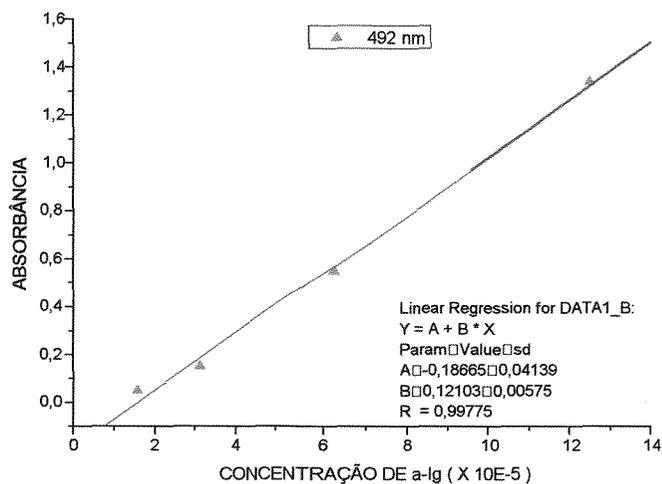


Figura 27 - Valores de absorvâncias lidas em 492 nm para o ensaio ELISA, utilizando esferas N-metilolacrilamida como suporte, em função da variação da concentração de a-Ig .

4.2.2. Resultados do teste Elisa com a variação de Ig de camundongo.

Nesta etapa foram avaliados os resultados dos imunoenaios utilizando-se a mesma concentração de a-Ig e o mesmo valor do pH, porém variando a concentração da solução de Ig.

Os resultados desta etapa estão descritos na tabela 17 a seguir.

Tabela 17 - Valores médios das absorvâncias lidas em 405 e 492 nm, para Ig de camundongo imobilizado.

[Ig]	A	
	405 nm	492 nm
1,0	0,021	0,157
2,5	0,033	0,395
5,0	0,064	1,013
10,0	0,086	1,342
20,0	0,096	1,610
40,0	0,103	1,875
Branco	0,051	0,058
Controle 1	0,018	-0.006
Controle 2	0,011	-0.007

Obs: [a-Ig] de camundongo = 1:8000, pH de imobilização = 4,5 e esferas de N-metilolacrimilamida como suporte.

Nesta etapa os valores para os controles 1 e 2 mencionados anteriormente, foram muito pequenos e portanto não foram subtraídos das leituras obtidas.

Com os resultados obtidos foram feitos gráficos de concentração de Ig [Ig] vs. absorvância (A) (vide figura 28 e 29). Como pode ser observado estes gráficos apresentam inicialmente uma região linear ascendente indicando que o aumento da [Ig] interfere positivamente nos valores de absorvância. A partir de determinada concentração, no nosso caso 10 µg/ml, o aumento da concentração passa a não interferir nos valores de absorvância significativamente. Assim

temos que nessa concentração a saturação da superfície da esfera (suporte) foi atingida.

Com a finalidade de linearizar o gráfico plotou-se $\log[\text{Ig}]$ vs. Absorbância cujos resultados são mostrados nas figuras 30 e 31.

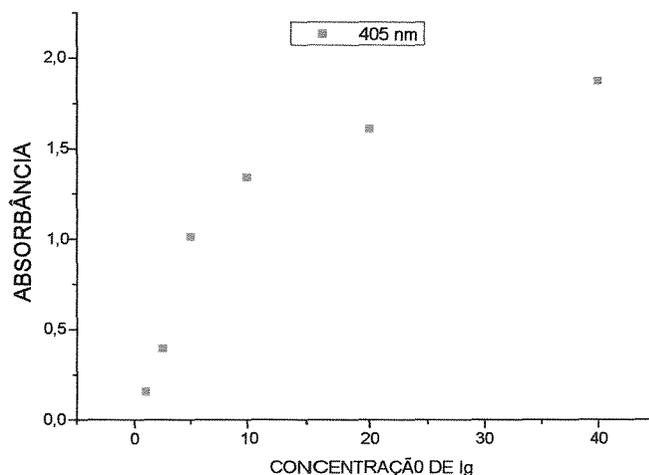


Figura 28 - Valores de absorbâncias lidas em 405 nm para o ensaio ELISA, utilizando como suporte esferas de N-metilacrilamida, variando-se a concentração de Ig ($\mu\text{g/ml}$) na solução de imobilização.

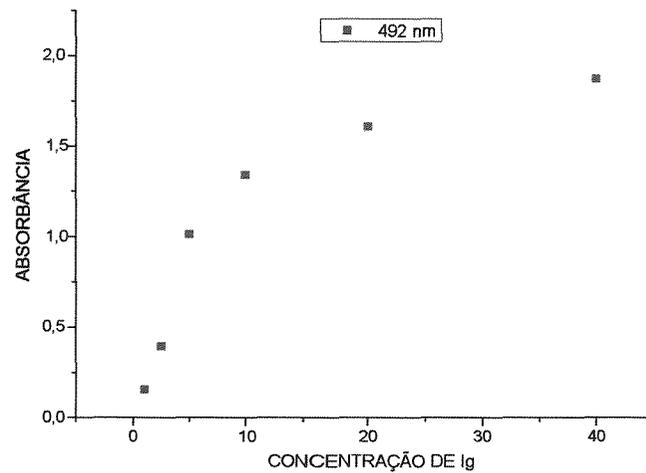


Figura 29 - Valores de absorbâncias lidas em 492 nm para o ensaio ELISA, utilizando como suporte esferas de N-metilolacrilamida, variando-se a concentração de Ig ($\mu\text{g/ml}$) na solução de imobilização.

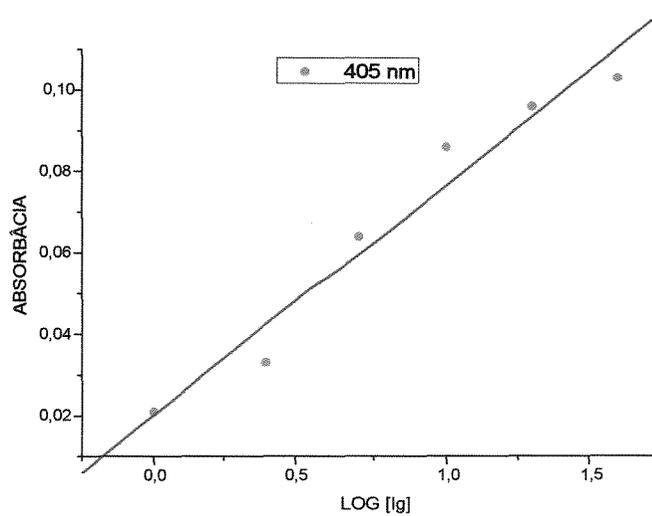


Figura 30 - Valores de absorbâncias lidas em 405 nm para o ensaio ELISA, utilizando como suporte esferas de N-metilolacrimilamida, variando-se log da concentração de Ig ($\mu\text{g/ml}$) na solução de imobilização.

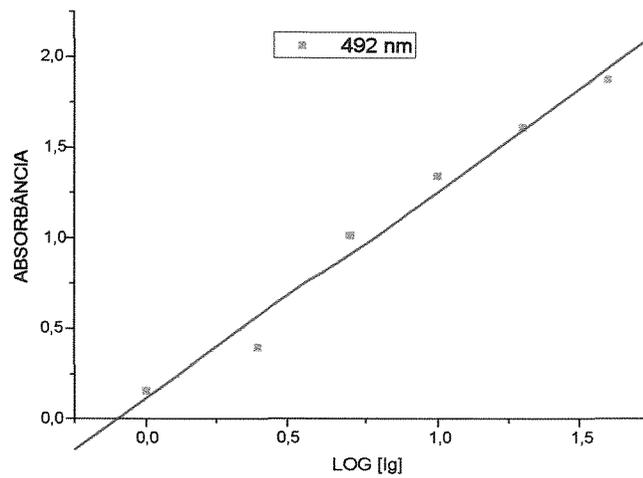


Figura 31 - Valores de absorvâncias lidas em 492 nm para o ensaio ELISA, utilizando como suporte esferas de N-metilolavariando-se o Log da concentração ($\mu\text{g/ml}$) de Ig na solução de imobilização.

4.2.3 Resultados do teste ELISA com a variação do pH de imobilização e da natureza do suporte.

Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na tabela 18 .

Tabela 18 . Valores de absorbâncias lidas em 405 e 492 nm, variando-se o pH da solução de imobilização e a natureza do suporte.

PH	Suporte	A	A
		405 nm	492 nm
4,5	NMA	0,064	1,013
	U-F	0,030	0,382
	PA-rec	0,135	1,092
	PS (placa ELISA)	0,112	1,810
7,5	NMA	0,054	0,824
	U-F	0,019	0,167
	PS (placa ELISA)	0,094	1,599
9,5	NMA	0,042	0,617
	U-F	0,010	0,021
	PS (placa ELISA)	0,078	1,352
Controle 1	NMA	0,041	0,025
	U-F	0,017	0,007
Controle 2	NMA	0,016	0,006
	U-F	0,003	-0,042

Obs.: - [Ig] de camundongo = 5 µg/ml [a-Ig] = 1:8000.

- Com exceção do PS, os outros suportes utilizados foram esferas.

Podemos observar que todas as esferas apresentaram leituras de absorbância utilizando-se baixas concentrações de Ig e a-Ig. A esfera de poli acrilamida recoberta, como era de se esperar, teve um comportamento semelhante, frente sua utilização como suporte em testes ELISA em leituras de

absorbância em 492 nm, ao das esferas poli N-metilolacrilamida pois ambas possuem a mesma estrutura química.

Os controles 1 e 2 apresentaram valores baixos podendo ser desprezados para leituras em 492 nm.

Os resultados para placa Elisa comercial de poli estireno(PS) foram 82, 94 e 119% , respectivamente para o pHs 4,5 , 7,5 e 9,5 , maiores que os obtidos para as esferas de N-metilolacrilamida, porém esta última tem a vantagem de imobilizar biocompostos irreversivelmente através de ligação covalente, o que não ocorre com a placa de poliestireno.

Os resultados desta etapa são mostrados nas figuras 32 e 33.

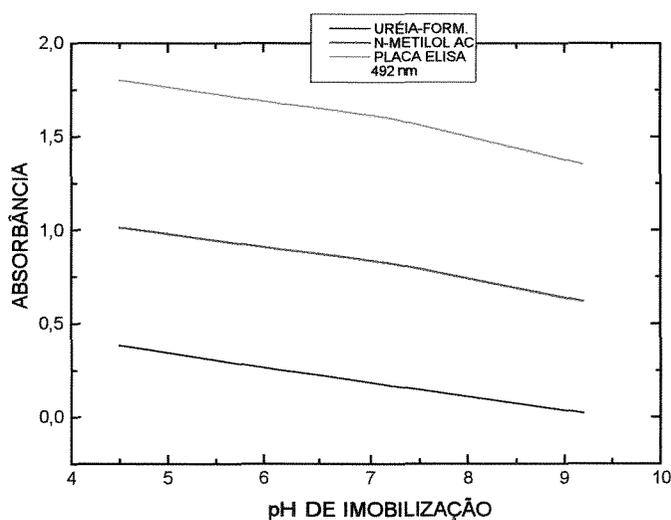


Figura 32 - Valores de absorbâncias lidas em 492 nm para o ensaio ELISA em função do suporte e do pH da solução de imobilização.

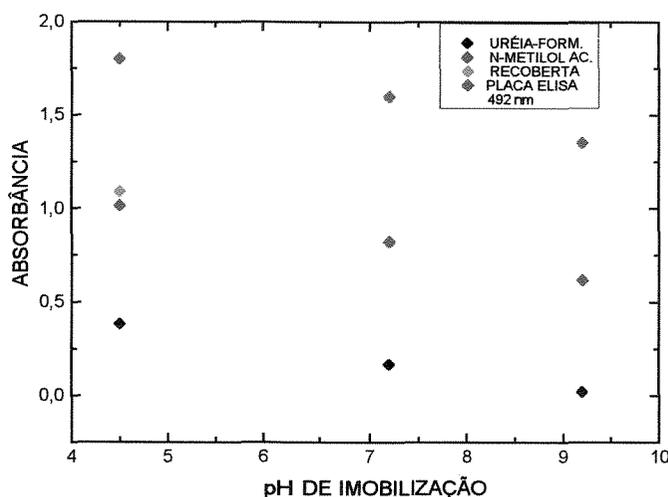


Figura 33 - Valores de absorbâncias lidas em 492 nm para o ensaio ELISA em função do suporte e do pH da solução de imobilização.

4.3. Imobilização da Lipase

A construção das curvas de calibração da lipase em diferentes pHs estão descritas no capítulo 3, Materiais e Métodos, nos tópicos 3.6.1.3.B e 3.6.2.3.

4.3.1 Estudos preliminares do uso de lipase imobilizada em reação de esterificação.

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa da reação de esterificação do álcool 3-benziloxi 1,2-propanodiol com acetato de vinila tendo como produto o 3-benziloxi 1,2-diacetoxi propano estão apresentados abaixo na tabela 19.

Tabela 19 - Resultados obtidos por análises de cromatografia gasosa para a conversão de 3-benziloxi 1,2-propanodiol em 3-benziloxi 1,2-diacetoxi propano utilizando lipase imobilizada em pHs 4,0 e 7,0 e na sua forma livre.

Sistemas \ Tempo de Reação (em h)	Porcentagem de Conversão		
	1	2	3
1	—	—	2,40
2	—	—	4,10
3	—	—	5,45
5	—	—	9,41
24	—	3,96	19,41
48	0,11	4,03	28,01
144	0,15	4,12	52,28

Obs: — indica que naqueles intervalos de tempo não houve nenhuma conversão de reagente em produto.

Pelos resultados obtidos verificamos que no processo de imobilização (sistemas 1 e 2), a lipase tem sua capacidade catalítica diminuída, através da comparação com a lipase livre (sistema 3).

A perda de atividade catalítica de uma enzima durante a imobilização pode ser decorrente da ligação da enzima pelo seu sítio ativo ou

por regiões que causam impedimentos estéricos na estrutura espacial da enzima impedindo que o substrato atinja a sítio ativo.

Comparando-se os sistemas 1 e 2, verificamos que o processo de imobilização realizado em pH=4,0 afeta mais profundamente a atividade catalítica da lipase, isto é decorrente ao processo de denaturação da enzima pelo uso de um pH drástico para este tipo de composto apesar de favorecer a ligação entre a enzima e o suporte como constatado pelo teste de biureto e discutido no tópico anterior.

A perda de atividade catalítica da lipase também é observado no processo de imobilização em pH=7,0 porém com menor intensidade que no caso anterior.

Em pH=7,0, a quantidade de lipase imobilizada é menor, porém essa condição é mais viável pois ela minimiza a perda de atividade catalítica que é uma das principais propriedades de interesse das enzimas.

Os cromatogramas do reagente e de uma das alíquotas retiradas durante a reação são representados nas figuras 34 e 35.

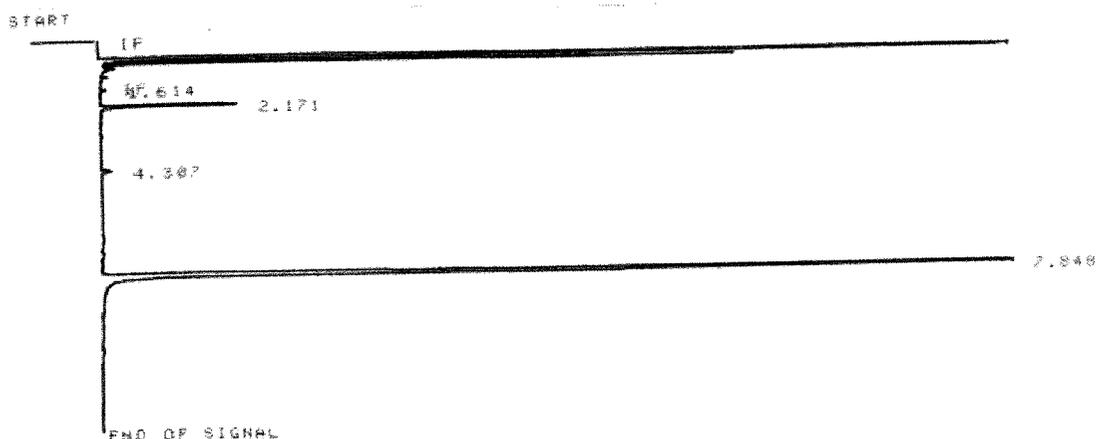


Figura 34 - Cromatograma dos reagentes da reação de esterificação álcool 3-benziloxi 1,2-propanodiol com acetato de vinila.

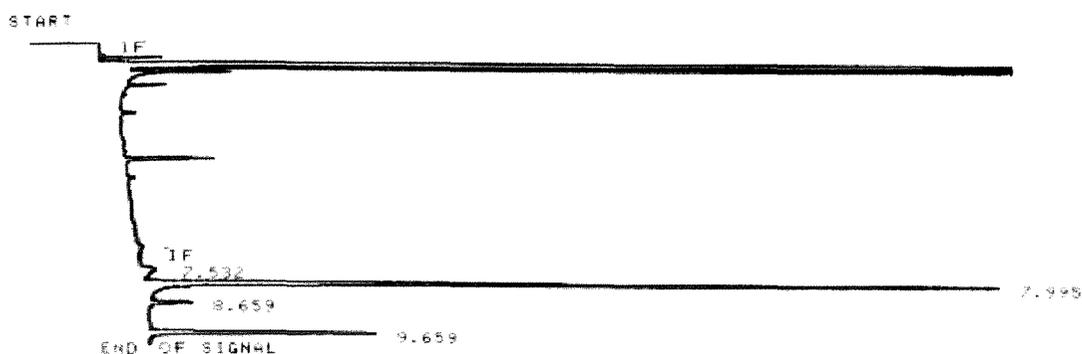


Figura 35 - Cromatograma da amostra da reação de esterificação álcool 3-benziloxi 1,2-propanodiol com acetato de vinila utilizando lipase livre, como catalisador, após transcorrido 24 h.

O primeiro pico, com maior intensidade é referente ao solvente da reação, o THF, juntamente com o acetato de etila; o pico na região de 7 min é referente ao álcool 3-benziloxi 1,2-propanodiol enquanto que na região de 9-10 min temos o pico do produto desta esterificação, 3-benziloxi 1,2-diacetoxi propano.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões

5.1 - Conclusão

Baseados nos resultados e discussões apresentados no capítulo anterior, podemos concluir que:

1. Foi desenvolvido um processo para sintetizar esferas de amino polímeros com extrema facilidade e praticidade.
2. Processos térmicos, como extração de solvente em estufa à vácuo, provocam fraturas nas esferas diminuindo sua resistência mecânica.
3. As esferas de N-Metilolacrilamida possuem uma estrutura porosa, a qual foi verificada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
4. As esferas sintetizadas possuem a capacidade de imobilizar imunoproteínas.
5. Todas as esferas (exceto a de acrilamida) apresentam pH ótimo de imobilização para Ig de 4,5.
6. A maior eficiência de imobilização, entre as esferas sintetizadas, foi apresentada pela de N-Metilolacrilamida.
7. Nos testes ELISA realizados foi possível analisar diluições de a-Ig até 1:64000 e utilizar soluções de imobilização com concentrações de até 1µg / ml.
8. Dentro dos valores obtidos a melhor condição de imobilização de imunoglobulina de camundongo, nas esferas, é 10µg/ml de Ig pois a partir desta concentração não se observa variações significativas nos resultados.
9. Em pH 4,0 observamos um melhor resultado na imobilização da lipase.
10. As melhores propriedades catalíticas da lipase imobilizada para a reação de esterificação do álcool 3-benziloxi-1,2-propanodiol são observadas para pH=7,0.

5.2 - Sugestões

Para dar continuidade a este trabalho e explorar outras possibilidades de uso para as esferas sintetizadas ,algumas sugestões são feitas abaixo:

1. Aprimorar a técnica de síntese de esferas de amino polímeros.
2. Utilizar o processo desenvolvido para tentar sintetizar esferas de outros polímeros.
3. Melhorar o processo para sintetizar esferas com porosidade controlada.
4. Utilizar as esferas de amino polímeros como suporte para testes ELISA em diagnósticos de doenças infecto-contagiosas.
5. Otimizar o processo de imobilização de biocompostos.
6. Estudar a possibilidade de se imobilizar outras enzimas de grande interesse em biotecnologia.
7. Utilizar as esferas como suporte de biocompostos em cromatografia de afinidade.
8. Estudar o uso de enzimas imobilizadas no tratamento de efluentes industriais em bioreatores.
9. Estudar o uso de enzimas imobilizadas em colunas de leito fluidizado.

Referências Bibliográficas

-
- [1] BASRI, M., AMPON, K., YUNUS, W.M.Z.W., RAZAK, C.N.A. e SALLEH, A.B.. Immobilization of Hydrophobic Lipase Derivates on the Organic Polymer Beads. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 59, p. 37-44, 1994.
- [2] ZANIN, G.M., TRINTIN, R.D. e MORAES, F.F. Imobilização de enzimas em microesferas de vidro - *Anais - 1º Seminário de Catálise, IBP*. Rio de Janeiro, p. 116, 1981.
- [3] CARDOSO, V. L.. *Síntese e Estudo do Desempenho de Suportes Poliméricos na Imobilização de Enzimas*, Dissertação de mestrado em Engenharia Química, UNICAMP, S.P., 1988.
- [4] PERES, L. e BITTENCOURT, E.. *Desenvolvimento e Caracterização de Imunosorventes e Avaliação do Desempenho em Ensaio Imunoenzimáticos*, Dissertação de mestrado em Engenharia Química, UNICAMP, S.P., 1986.
- [5] CHIBATTA, I.. *Immobilized Enzymes-Research and Development*. John Wiley & Sons, N.Y., USA, 1978.
- [6] RIBEIRO, E.J. e MORAES, I.O.. *Imobilização de Invertase em Resinas Trocadoras de Íons e Estudo Cinético da Inversão de Sacarose em Reator Tubular*, Tese submetida a prova de mestrado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, S.P., 1983
- [7] JOHNSON, J.C.. *Immobilized Enzymes, Preparation and Engineering, Recents Advances*. Noyes Data Corporation, N.J., USA, p. 01-05, 1979.

-
- [8] WINFRIED, H.. *Immobilized Biocatalyses.*, Spring-Verlag, Berlim, Alemanha, p. 18-21, 109-111, 1988.
- [9] WINGARD, L.B.. *Enzyme Engineering.* InterScience Publishers, N.Y., USA, p. 177-179, 1972.
- [10] NELSON, J.M. e GRIFFIN. E.G.. Adsorption of Invertase. *J. Am. Chem. Soc.*, 38, p. 1109-1116, 1916.
- [11] CHIBATA, I. et al.. Preparation and Industrial Application of Immobilized Aminoacylase. *Ferment. Technol. Today*, p. 384-389, 1972.
- [12] NELSON, J.M. e HITCHCOK, D.T.. The Activity of Adsorbed Invertase. *J. Am. Chem. Soc.*, 43, p. 1956-1961, 1921.
- [13] MITZ, M.A.e SUMMARIA, L..Synthesis of Biologically active Cellulose Derivatives of Enzymes. *Nature*, 189, p. 576-577, 1961.
- [14] KAY, G. e CROOK, E.M.. Coupling of Enzymes to Cellulose Using Chloro-s-Triazines. *Nature*, 216, p. 514-515, 1967.
- [15] TREVAN, M.D.,*Immobilized Enzymes - An Introduction and Applications in Biotechnology* .John Wiley & Sons, N.Y., USA, 1980.
- [16] WISEMAN, A..*Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2^a Ed., Ellis Horwood Limited, Inglaterra, p. 38-41; 65-97; 147-189; 223-243, 1985.

-
- [17] DINELLI, D.. Fibre-Entrapped Enzymes. *Proc. Biochem.*, August, p. 9-12, 1972.
- [18] CHANG, T.M.S.. Semipermeable Microcapsules, *Science*, 146, p. 524-525, 1964.
- [19] KANG, S.T. e RHEE, J.S.. Characteristics of Immobilized Lipase – Catalyse Hydrolysis, of Olive Oil of High Concentration in reverse Phase System. *Biotechnol. and Bioeng.*, 33, p. 1469-1476, 1989.
- [20] MITZ, M.A.. . New Insoluble Active Derivate of an Enzymes as a Model for study of Cellular Metabolism. *Science*, 123, p. 1076-1077, 1956.
- [21] CHANG, T.M.S.. *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, v.2, Plenum Press, N.Y., USA, 1977.
- [22] CABRAL, J.M.S.. *Estudos de Imobilização de Enzimas pelo Método dos Metais de Transição*, Tese doutoramento em Engenharia Química, Instituto Superior, Universidade Técnica de Lisboa, Setembro, 1982.
- [23] REYES, H.R. e HILL, C.G.Jr.. Kinetic Modeling of Interesterification Reactions Catalyzed by Immobilized Lipase, *Biotechnol. and Bioeng.*, 43, p. 171-182, 1994.
- [24] PRONK, W.; KERKHOF, P.J.A.M.; VAN HELDER, C. e VAN'T RIETI, K.. The Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Lipase in a Hydrophilic Membrane Reactor , *Biotechnol. and Bioeng.*, 32, p. 512-518, 1988.

-
- [25] YANG, D. e RHEE, J.S.. Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Immobilized Lipase in Organic Solvent, *Biotechnol. and Bioeng.*, 40, p. 748-752, 1992.
- [26] RAMAMURTHI, S. e Mc CURDY, A.R.. Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid and Methanol in Hexane – A Kinetic Study, *JOACS*, 71, 9, p. 927-930, 1994.
- [27] MARTY, A., COMBES, D. e CONDORET, J.S.. Continuous Reaction – Separation Process for Enzymatic Esterification in Super-Critical Carbon Dioxide. *Biotechnol. and Bioeng.*, 43, p. 497-504, 1994.
- [28] KOSUGI, Y., KUNIEDA e T., AZUMA, N.. Continuous Conversion of Free Fatty Acid in Rice Brain Oil to Triacylglycerol by Immobilized Lipase. *JOACS*, 71, 4, p. 445-448, 1994.
- [29] BERGMEYER, H.U.. *Methods of Enzymatic Analysis*, v.1, 3^a ed., Klambt-Druck GmbH, Alemanha, p. 89-91, 1983.
- [30] NAKANE, P.K. e PIERCE, G.B.. Enzyme-Labeled Antibodies – Preparation and Application for the Localization of Antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, p. 929-931, 1966.
- [31] AVRAMEAS, S. e URIEL, J.. Méthode de Marquage d'Antigènes et d'Anticorps Avec des Enzymes et Son Applications en Immunodiffusion, *Compt. Rend.*, 262, p. 2543-2550, 1966.

-
- [32] KUBY, S. A. *A Study of Enzymes*, vol. 2, CRC Press, Florida, USA, p. 580-582, 1990.
- [33] MAGGIO, E. T. *Enzyme-Immunoassay*, 7^a ed., CRC Press, Florida, USA, p. 167-178, 1988.
- [34] BELANGER, L., SYLVESTRE, C. e DUFOUR, D. Enzyme Linked Immunoassay for α -Fetoprotein by Competitive and Sandwich Procedures. *Clin. Chim. Acta*, 48, p. 15-19, 1973.
- [35] MAIOLINI, R., MASSEYEFF, R. A Sandwich Methods of Enzyme ImmunoAssay: Application to Rat and Human Alfa-Fetoprotein. *J. Immunol.*, 8, p. 223-228, 1975.
- [36] ENGVALL, E. e PERLMANN, P. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA – Quantification of Specific Antibodies of Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in antigens Coated Tubes. *J. Immunol.*, 109, p. 129-134, 1972.
- [37] ENGVALL, E. e PERLMANN, P. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*, in: *Automation in Microbiology and Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y., p. 528, 1975.
- [38] PESCE, A.J. et al.. Use of Enzyme-Lynked Antibodies to Measure Serum Anti-DNA Antibody in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Chim.*, 20, p. 353-360, 1974.

-
- [39] SINGER, S.J. Preparation of an Electrodense Antibody-Conjugate *Nature*, 183, p. 1523, 1959.
- [40] AVRAMEAS, S.. Détection d'Anticorps et d'Antigènes à l'Aide d'Enzymes, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, p. 1169-1971, 1968.
- [41] AVRAMEAS, S.. Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for the Detection of Antigens and Antibodies, *Immunochemistry*, 6, p.43-50, 1969.
- [42] QUIOCHO, F.A. e RICHARDS, F.M.. The Enzymic Behavior of Carboxypeptase-A in Solid State, *Biochemistry*, 5, p. 4062-4075, 1966.
- [43] HABEEB, A.F.S.A.. Preparation of Enzymatically Active, Water-Insoluble Derivates of Trypsin, *Arch. Biochim. Biophys.*, 119, p. 264, 1967.
- [44] ENGVALL, E. e PERLMANN, P.. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA – Quantitative Assay of Immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 8, p. 871-879, 1971.
- [45] GOLDSCHMIDT, C.. Über Die Einwirkung von Formaldehyde auf Harnstoff, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 29, p. 2438-2439, 1896.
- [46] SALYER, I.O. e USMANI, A.M.. Electrolysis of Open Pore Urea / Formaldehyde Structure, *J. of Applied Polymer Science*, 22, p. 3469-3474, 1978.

-
- [47] *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 1, 2^a ed., Ed. John Wiley & Sons, N.Y., p. 168-205; 752-787, 1985.
- [48] FAWCETT, A.H.. *High Value Polymers*, Ed. Fawcett, USA, p. 108-129, 1990.
- [49] SANDLER, S.R. e KARO, W.. *Polymer Synthesis Organic Chemistry .A Series of Monographs*, 29-II, Academic Press , N.Y., 1977.
- [50] COUTINHO, F.M.B., LUZ, C.T.L.. The Influence of Diluents on The Formation of Porous Structure in Ion Exchanger Resins Based on 2-Vinylpyridine and Divinylpyridine. *Eur. Polym. J.*, 29, p. 1119-1123, 1993.
- [51] JOHNSTONE, A. e THORPE, R.. *Immunochemistry and Practice*, 2^a ed., Blackwell Scientific Publishers, Oxford, U.K., 1987.
- [52] MENDES, M.Q. e LOPES, H.J.J.. *Atualização em Bioquímica Clínica*, 1^a ed., Mai Editora, Belo Horizonte, Brasil, p. 119-121.
- [53] POUCHERT, C.J.. *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, Aldrich Chemical Company, USA, p. 127-130, 1970.
- [54] TREVISAN, H.C., MEI, L.H.I.. *Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de enzimas*, tese de Doutorado em Engenharia Química, UNICAMP, S.P., 1993.