

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila

Maria Helena Comerlato
Tese de Doutorado
1995

Orientadora: Profa.Dra.Inés Joeques



Cam-00078732-6

UNIDADE	20
N.º ORÇAMENTO	
T/UNICAMP	
C734i	
V.	
N.º DO EMP.	25724
PROD.	433/95
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/09/95
N.º CPD	

Comerlato, Maria Helena

Imobilização de enzimas no sup
orte crisotila

T/UNICAMP/C734i
DEVOLVER NONE LEIT. - (25724/95)

À minha mãe, Julieta.

E às minhas irmãs,
Isabel, Inês, Neusa e Silvana,
e ao meu irmão Nelson.

AGRADECIMENTOS

- à Inés pela orientação e convivência profissional.
- aos colegas de grupo, Zuca, Paulinho, Osvaldo, Zoega, Anna Lúcia, Flávio, Valéria, Nádia, Carol, Rose, Marcelo, Wilson, Vagner, Fábio e José Eduardo pela convivência.
- à Ercília pelo carinho.
- à Valéria do Carmo Barbosa pela obtenção dos espectros FTIR.
- ao Eloi Alves da Silva pelo auxílio no uso do microcalorímetro.
- à Iacy dos Santos Draetta pelas determinações de atividade do extrato solúvel de invertase.
- à SAMA pela Bolsa Pesquisa/Empresa concedida, em especial ao Sr. Paulo de Tarço Chander Jr.
- ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila.

Tese de Doutorado de Maria Helena Comerlato
Orientadora: Prof.Dra.Inés Joeques
Instituto de Química- UNICAMP- Caixa Postal 6154
13081-970 Campinas- São Paulo- Brasil

Resumo

A imobilização de enzimas em suportes apropriados se constitui em área de interesse enquanto pode significar melhoria de processos e barateamento de custos. O suporte ideal deve adsorver irreversivelmente a enzima, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação enzimática.

Neste trabalho imobilizou-se urease e invertase sobre crisotila. Crisotila, um mineral de hábito fibroso e superfície hidroxilada, possui boas propriedades de retenção. A urease é bastante utilizada em clínica/química. A invertase é importante na indústria de alimentos.

Foram determinados: isotermas de adsorção a baixa cobertura, retenção, atividade catalítica e estabilidade das enzimas suportadas.

A urease, tanto em água deionizada quanto em tampão tris/HCl pH = 8, atinge o equilíbrio de adsorção sobre crisotila em cerca de 1 hora. A quantidade adsorvida depende pouco da massa de crisotila. Não se obteve saturação. As quantidades adsorvidas não dependem do meio.

A invertase obtida pela autólise do fermento Fleischmann, atinge o equilíbrio de adsorção em cerca de 5 minutos. A quantidade adsorvida independe da massa de crisotila.

Tanto urease quanto invertase adsorvem irreversivelmente sobre o suporte. A urease não desorve e a invertase desorve muito pouco.

Ambas enzimas apresentam atividade após suportadas e mesmo depois de estocadas, embora esta atividade seja bem menor que a das enzimas livres. A atividade específica de urease suportada varia de 1 a 4% com relação à enzima livre, dependendo do meio e do pré-tratamento do suporte; valores típicos de atividade são da ordem de 66 a 198 $\mu\text{mol amônia/dia}$ para 3,0 mg de urease suportadas em 1 g de crisotila. A atividade específica de invertase imobilizada varia de 19 a 35% com relação à da enzima livre no extrato; valor típico de atividade é da ordem de 8,7 $\mu\text{mol glicose/min}$ para 0,73 mg proteína adsorvida em 0,25 g de crisotila.

Observa-se redução da atividade de ambas as enzimas suportadas tanto na reutilização quanto após estocagem; urease/crisotila perde cerca de 80% da sua atividade após 7 dias de estocagem.

Ao todo, a adsorção das enzimas é rápida, eficiente e irreversível, nas quantidades ensaiadas. A urease/crisotila tem atividade bastante reduzida comparada à apresentada em outros suportes. Invertase/crisotila apresenta atividade comparável à obtida nos melhores suportes.

Immobilization of Enzymes onto Chrysotile

Doctorate Thesis of Maria Helena Comerlato

Supervisor: Prof. Inés Joeques

Chemistry Institute - State University of Campinas- UNICAMP

Caixa Postal 6154 - 13.081-970 Campinas- São Paulo- Brazil.

Abstract

The immobilization of enzymes on appropriate supports is an area of interest since it can improve processes and reduce costs. The ideal support would adsorb irreversibly the enzyme, without affecting its activity and without interfering in the enzymatic reaction.

In this work, urease and invertase were immobilized on chrysotile. Chrysotile, a fibrous mineral with hydroxylated surface, has good retention properties. Urease is widely used in clinical chemistry and invertase has important applications in food industry.

Adsorption isotherms at low coverage, retention, catalytic activity and stability of supported enzymes were determined.

Urease, in destilated water and in tris/HCl buffer at pH 8.0, reaches adsorption equilibrium on chrysotile after one hour. The quantity adsorbed depends little on the amount of chrysotile used. Saturation was not observed. The quantity adsorbed was independent of solution media.

Invertase, obtained from the autolysis of Fleischmann yeast, reaches the adsorption equilibrium in approximately five minutes. The quantity adsorbed is independent on the amount of chrysotile used.

The adsorption of both enzymes is irreversible. Urease showed no desorption. Invertase showed a small desorption.

Both enzymes show activity when supported, even after storage, although lower than the activity of the free enzymes. The specific activity of urease/chrysotile varies from 1 to 4% with respect to the free enzyme, depending on the solution media and on the support pre-treatment; typical activity values are 66 to 198 μmol ammonia/day for 3.0 mg of supported urease in 1 g of chrysotile. The specific activity of invertase/chrysotile varies from 19 to 35% with respect to the free enzyme; typical activity value is 8.7 μmol glucose/min for 0.73 mg of adsorbed protein in 0.25 g of chrysotile.

After storage or reuse, urease/chrysotile and invertase/chrysotile lose activity; urease/chrysotile shows an activity reduction of c.a. 80% after 7 days storage.

In summary, the adsorption process is fast, efficient and irreversible in the conditions used in this work. Urease/chrysotile shows lower activity on this support than on others described. Invertase/chrysotile shows comparable activity to the best systems described.

ÍNDICE

1- Introdução	1
1.1- Enzimas	1
1.2- Imobilização de enzimas	3
1.2.1- Definição	3
1.2.2- História	3
1.2.3- Por que imobilizar enzimas?	3
1.2.4- Métodos de imobilização	4
1.3- Urease	9
1.3.1- Histórico	10
1.3.2- Propriedades	10
1.3.3- Aplicações	11
1.3.4- Imobilização de urease	12
1.4- Invertase	12
1.4.1- Propriedades	13
1.4.2- Aplicações	14
1.4.3- Imobilização de invertase	14
1.5- Crisotila	15
1.5.1- Características da superfície da fibra de crisotila	18
1.5.2- Adsorção de proteínas pela crisotila e possíveis efeitos biológicos	19
1.5.3- Situação da crisotila como material adsorvente	22
2- Objetivos	25
3- Parte experimental	26
3.1- Materiais utilizados	26
3.1.1- Crisotila	26
3.1.1.1- Purificação e ativação da crisotila natural	26
3.1.1.2- Determinação da área superficial da crisotila natural e tratada	27
3.1.2- Enzimas	28
3.1.2.1- Obtenção do extrato solúvel de invertase	28
3.1.2.2- Determinação de proteína do extrato solúvel de invertase	28
3.2- Metodologia geral	29
3.3- Cinética de adsorção de urease em crisotila	30

3.4- Adsorção de urease em função da massa de crisotila	30
3.5- Isotermas de adsorção de urease em crisotila	31
3.6- Caracterização do sistema crisotila/urease por FTIR	31
3.7- Atividade da urease livre e imobilizada em crisotila	32
3.7.1- Determinação de atividade da urease livre	33
3.7.2- Determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila.....	33
3.7.3- Estudo da variação de atividade da urease imobilizada na crisotila em função da sua reutilização	34
3.7.4- Estudo da variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função do número de reutilizações, com tempo de reação de 24 horas cada determinação	35
3.7.5- Estudo da variação da atividade enzimática da urease imobilizada em crisotila em função do tempo de estocagem	36
3.8- Cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila	36
3.9- Adsorção do extrato solúvel de invertase em função da variação da massa de crisotila	37
3.10- Estudo da variação da atividade enzimática do extrato solúvel de invertase livre e imobilizado em crisotila em função da sua reutilização	38
3.11- Estudo microcalorimétrico	39
3.12- Estudo da estabilidade térmica da urease livre e imobilizada em crisotila por DSC	40
4- Resultados	41
4.1- Cinética de adsorção de urease em crisotila	41
4.2- Adsorção de urease em função da massa de crisotila	42
4.3- Isotermas de adsorção de urease em crisotila	45
4.4- Determinação da atividade da urease livre e imobilizada em crisotila	46
4.5- Variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização	48

4.6- Estudo da variação de atividade da urease imobilizada em crisotila, num tempo de reação de 24 horas, em função do número de reutilizações	49
4.7- Variação da atividade da urease imobilizada em crisotila em função do tempo de estocagem	51
4.8- Cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila	52
4.9- Adsorção do extrato solúvel de invertase em função da variação da massa de crisotila	54
4.10- Estudo da variação da atividade do extrato solúvel de invertase imobilizada em crisotila em função da reutilização	56
4.11- Caracterização do sistema crisotila/urease por FTIR	57
4.12- Estudo microcalorimétrico	59
4.13- Estudo da estabilidade térmica da urease livre e imobilizada em crisotila por DSC	59
5- Discussão	62
5.1- Adsorção de enzimas no suporte crisotila	62
5.1.1- Cinética de adsorção das enzimas em crisotila	62
5.1.2- Adsorção das enzimas em função da massa de crisotila	64
5.1.3- Isoterma de adsorção de urease em crisotila	67
5.2 - Atividade enzimática da urease imobilizada em crisotila	69
5.2.1- Variação da atividade da urease e extrato solúvel de invertase imobilizados em crisotila em função da reutilização e do tempo de estocagem	73
6- Conclusões	77
7- Bibliografia	79

1- Introdução

Este trabalho trata do estudo da imobilização de enzimas no suporte crisotila. Esta introdução foi distribuída em quatro partes.

A primeira parte se refere a imobilização de enzimas situando o leitor em relação a uma das primeiras questões sobre o assunto, que é - Por que imobilizar enzimas? - Também, descreve-se os principais métodos de imobilização de enzimas, com suas vantagens e desvantagens. A apresentação destes diferentes métodos de imobilização é importante, pois muito da literatura utilizada para a redação desta tese, se refere a imobilização de enzimas utilizando diferentes técnicas de imobilização.

A segunda e terceira partes se referem às enzimas utilizadas neste trabalho, apresentando-as através de suas características gerais, propriedades, seu campo de aplicação e exemplos da literatura sobre a imobilização destas enzimas em diferentes suportes e com diferentes técnicas de imobilização.

A quarta parte se refere ao suporte utilizado neste trabalho para a imobilização de enzimas, a crisotila. A apresentação da crisotila é feita através de sua estrutura cristalina, suas propriedades relevantes e as características superficiais da fibra de crisotila. Para situar a crisotila no contexto atual, apresentam-se os estudos de adsorção de proteínas pela crisotila e os possíveis efeitos biológicos induzidos por estas fibras. Pode-se mencionar que a maioria dos estudos com crisotila, ou asbestos em geral, direcionam-se na tentativa de explicar a grande carcinogenicidade destes materiais.

1.1- Enzimas.

As características mais marcantes das enzimas são seu poder catalítico e sua especificidade.

As enzimas têm um enorme poder catalítico. Elas aceleram reações, multiplicando suas velocidades por fatores de, pelo menos, um milhão. De fato, a maioria das reações em sistemas biológicos não ocorre com velocidades perceptíveis na ausência de enzimas.⁽¹⁾

As enzimas são altamente específicas, tanto para as reações catalisadas quanto na sua escolha de reagentes, que são chamados substratos. Uma enzima geralmente catalisa uma só reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Reações colaterais que levam ao desperdício da formação de produtos secundários raramente ocorrem em reações catalisadas por enzimas, em contraste com as não-catalisadas. O grau de especificidade para o substrato é geralmente alto e, às vezes, virtualmente absoluto.⁽¹⁾

Grande parte do poder catalítico das enzimas ocorre por elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis nos complexos enzima-substrato (ES). Os substratos prendem-se a uma região específica da enzima, chamada de centro ativo (ou sítio ativo). Em sua maioria, as enzimas são altamente seletivas em sua ligação aos substratos. De fato, a especificidade catalítica das enzimas depende em parte da especificidade de ligação. Além disso, as atividades de algumas enzimas são controladas nesse estágio.⁽¹⁾

- Algumas características importantes dos centros ativos.⁽¹⁾

O centro ativo de uma enzima é a região que se liga aos substratos e contém os radicais de aminoácidos que participam diretamente na feitura e na ruptura de ligações. Esses aminoácidos são chamados de grupamentos catalíticos. Apesar das enzimas diferirem muito em estrutura, especificidade e modo de catálise, podem-se estabelecer algumas generalizações acerca de seus centros ativos, tais como:

- 1) o centro ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima;
- 2) o centro ativo é uma entidade tridimensional;
- 3) os substratos ligam-se às enzimas por múltiplas atrações fracas;
- 4) os centros ativos são depressões ou fendas;
- 5) a especificidade de ligação depende do arranjo, definido com precisão, dos átomos no centro ativo.

1.2- Imobilização de enzimas.

1.2.1- Definição.

Enzimas imobilizadas são definidas como "enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região definida no espaço com retenção de sua atividade catalítica, as quais podem ser usadas repetidamente e continuamente."⁽²⁾

Esta definição é aplicável para enzimas, organelas celulares, células microbiais, células de plantas e de animais, isto é, para todos os tipos de biocatalisadores. Em alguns casos, esses biocatalisadores são ligados em ou entre suportes insolúveis por ligação química ou física. Em outros casos, os biocatalisadores estão livres, mas confinados em regiões limitadas ou espaços do suporte.⁽³⁾

1.2.2- História.⁽³⁾

Em 1916, Nelson e Griffin observaram que a invertase adsorvida em carvão catalisava a hidrólise da sacarose. Vários artigos foram publicados sobre imobilização de proteínas ativas fisiologicamente por ligação covalente em vários suportes. Contudo, enzimas imobilizadas não foram utilizadas na prática até 1953. O maior desenvolvimento da tecnologia de imobilização de enzimas foi nos últimos 30 anos. A primeira aplicação industrial de enzimas imobilizadas foi em 1969. Foi utilizada a enzima fungal aminoacilase imobilizada em DEAE-Sefadex através de ligação iônica e foi usada para a hidrólise estereoseletiva de N-acil-D,L- aminoácidos para obter L- aminoácidos e N-acil-D-aminoácidos.

1.2.3- Por que imobilizar enzimas?

Enzimas são materiais de alto custo, e se a enzima puder ser imobilizada num suporte sem perda de atividade por um razoável período de tempo, a mesma amostra de enzima imobilizada poderá ser usada várias vezes, significando uma economia em processos industriais.

É importante ressaltar os efeitos da imobilização de enzimas. Alguns destes efeitos são resumidamente apresentados como: ⁽⁴⁾

- a) a imobilização pode aumentar o potencial de uma enzima, como catalisador em escala industrial;
- b) a imobilização pode ser utilizada como uma estratégia para estabilizar enzimas, pode reduzir ou não ter nenhum efeito na sua estabilidade;
- c) a perda de atividade da enzima imobilizada geralmente resulta de mudanças conformacionais;
- d) o micromeio ao redor de uma enzima imobilizada pode diferir daquele da forma livre.

1.2.4- Métodos de imobilização.

A imobilização ou insolubilização de um material biológico, por exemplo enzimas, é muito importante pois substitui a utilização destes materiais na forma solúvel, restando apenas a necessidade de removê-los do meio reacional para posterior aplicação. Assim, geralmente a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo.

No processo de imobilização, é muito importante não desnaturar o centro ativo das enzimas, devendo ser realizada através dos vários grupos que não possuem atividades catalíticas.

Os principais métodos de imobilização são mostrados na figura 1.

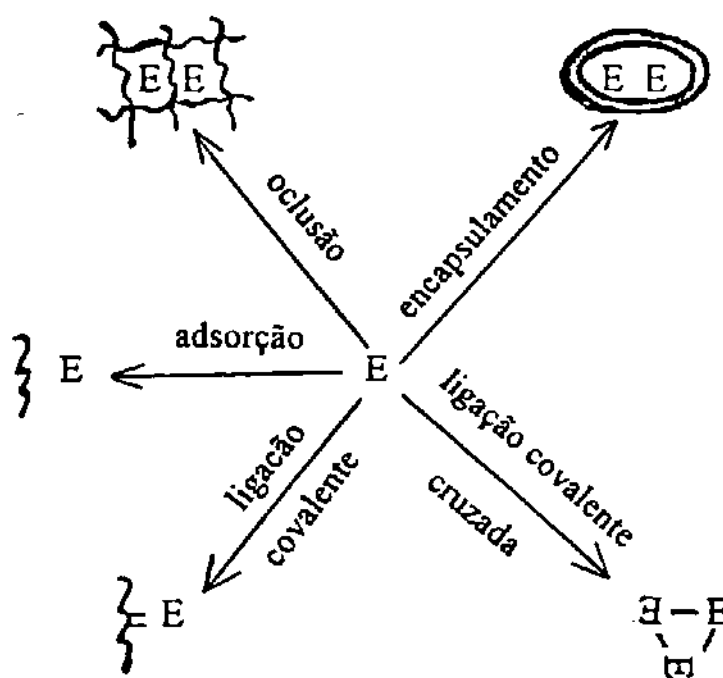


Figura 1. Técnicas de imobilização.⁽⁴⁾

- Método de oclusão.^(4,5)

Este método envolve o confinamento ou aprisionamento da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel (por exemplo: agar-agar, álcool polivinílico, poliacrilamida, amido, borracha de silicone, carragenatos e outros). Em aplicações industriais, são geralmente utilizadas fibras ocas de um material tal como triacetato de celulose.

A grande vantagem deste método é que a reação entre o substrato e a enzima não sofre nenhuma modificação, pois a imobilização da enzima praticamente não altera a sua estrutura, no entanto, pode ocorrer a perda de parte da enzima imobilizada causada pela variação do tamanho dos poros intersticiais do polímero, o que é uma desvantagem.

Como exemplo de utilização deste método, Tor e Freeman imobilizaram urease em poliacrilamida.⁽⁶⁾

- Microencapsulamento.(4,5)

O método de microencapsulamento de enzimas envolve seu confinamento em pequenas esferas (microcápsulas) de membranas semipermeáveis com poros variando de 5 a 300 μm , que permite somente a movimentação livre de substratos e produtos da reação enzimática. Este tipo de imobilização difere do anterior por permitir o aprisionamento de um volume ou número de moléculas maior do que o anterior, que é geralmente de uma molécula, permitindo uma interação enzimática intermolecular.

Este método possui a vantagem de manter um alto grau de atividade da enzima, e permitir a imobilização simultânea de várias enzimas em apenas uma etapa. No entanto, a necessidade de alta concentração de enzima para o microencapsulamento e a restrição da passagem de substratos através dos poros da membrana, constituem uma desvantagem.

Como exemplo de utilização deste método, Monshipouri e colaboradores (7) mostraram o microencapsulamento de urease em membranas de poliamida.

- Ligação covalente no suporte.(4,5)

Este tipo de imobilização em suporte insolúvel é realizada através da ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima, isto é, não essenciais para a sua atividade catalítica, a grupos reativos (como por exemplo hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

Os suportes insolúveis mais utilizados incluem polímeros sintéticos como por exemplo celulose, agar-agar, sefarose, colágeno, amido, dextrana, e materiais inorgânicos como por exemplo óxidos metálicos e pérolas de vidro com porosidade controlada.

Fatores tais como, capacidade de ligação química, facilidade de ligação química e a estabilidade do suporte são obviamente importantes. Como um exemplo, a celulose e seus derivados são muito utilizados porque suas propriedades hidrofílicas favorecem e mantêm a atividade catalítica das enzimas.

O processo de ligação envolve a formação de um intermediário reativo no suporte, o qual subsequentemente reage com a enzima. Embora resulte num sistema imobilizado estável, há o risco da enzima ser desativada durante o tratamento químico.

Como exemplo de utilização deste método, Mansfeld e colaboradores (8) mostraram invertase ligada via ligação covalente em resina de troca aniônica.

- Ligação covalente cruzada.(4,5)

O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e /ou com o suporte inerte com reagentes funcionais.

A ligação covalente cruzada é obtida utilizando reagentes bifuncionais tais como glutaraldeído, o qual reage diretamente com grupos amino da enzima.

O método de imobilização com o glutaraldeído é um dos mais empregados, pois a enzima geralmente é mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade frente as variações de pH, força iônica, solventes e temperatura.

Como exemplo da utilização deste método, Godbole e colaboradores (9) mostraram invertase imobilizada em fibras de algodão por adsorção seguido pela ligação cruzada com glutaraldeído.

- Adsorção.

A adsorção de enzimas em suportes insolúveis resulta geralmente em interações do tipo iônica, polar, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas. Esses suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, vidro, nitrato de celulose, agar-agar, sefadex, sílica-gel e outros.(5,10)

Como exemplo da utilização deste método, Gianfreda e colaboradores (11) mostraram a adsorção, atividade e propriedades cinéticas da urease em montmorilonita, hidróxido de alumínio e complexo montmorilonita-hidróxido de alumínio.

A maior vantagem da adsorção, como método geral de insolubilização de enzimas, é a sua simplicidade. Geralmente nenhum reagente e somente um mínimo de passos de ativação são necessários.

Possui por outro lado a grande desvantagem da enzima adsorvida ser extremamente dependente de fatores, tais como pH, solvente, substrato e temperatura.⁽¹⁰⁾ Outra desvantagem é que a adsorção na superfície é não-específica, e portanto poderá adsorver outras proteínas ou outras substâncias as quais é exposta durante o seu uso. Isto deve alterar as propriedades da enzima imobilizada ou, se a substância adsorvida é um substrato para a enzima, a velocidade provavelmente decrescerá dependendo da mobilidade superficial da enzima e substrato.⁽¹²⁾

Embora, a adsorção seja facilmente alcançada, a natureza fraca das ligações envolve dessorção de proteína, devido a mudanças no pH, temperatura, força iônica ou pela simples presença do substrato.⁽¹⁰⁾

A adsorção foi definida por Messing ⁽¹³⁾ como: "adsorção é a adesão de uma enzima na superfície de um suporte que não foi especificamente funcionalizado para que ocorra ligação covalente".

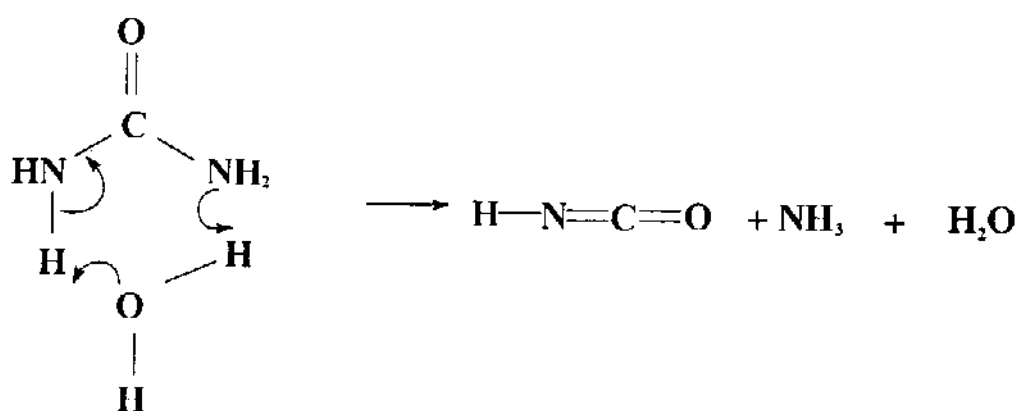
Segundo Chibata ⁽²⁾, este método frequentemente causa pouca ou nenhuma mudança conformacional da enzima, ou destruição de seu centro ativo. Consequentemente, se um suporte adequado for encontrado para uma determinada enzima, este método é simples e efetivo.

Os fatores envolvidos na imobilização por adsorção podem ser especificados como segue: ⁽¹³⁾

- a) concentração e quantidade de enzima versus a área superficial ou peso do suporte;
- b) efeito da adsorção sobre a enzima;
- c) força iônica;
- d) pH inicial de adsorção e subsequente pH de aplicação;
- e) temperatura de adsorção;
- f) ponto isoelétrico da enzima e sítios de adsorção do suporte.

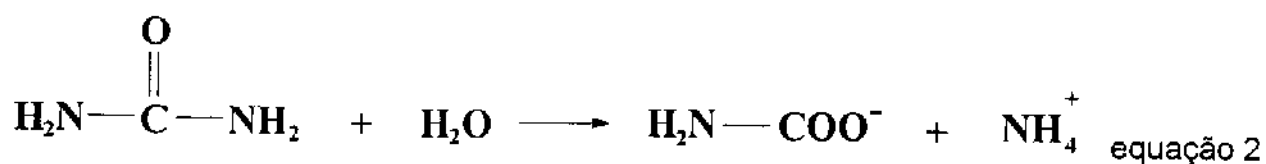
1.3- Urease.

Uréia, o substrato para urease, é uma molécula bastante estável. Entre pH 2 e 12 a decomposição não-enzimática da uréia em meio aquoso é independente do pH, e sua meia-vida é 3,6 anos a 38°C.^(14,15) Foi mostrado que esta reação é uma reação de eliminação e os únicos produtos são amônia e ácido ciânico, conforme equação 1.^(16,17)



equação 1

A urease catalisa a hidrólise da uréia formando ion carbamato e ion amônio ⁽¹⁸⁾, como é mostrado na equação 2:



equação 2

Este é um fato importante para a química especial desta enzima, visto que a hidrólise espontânea da uréia não foi observada em solução aquosa. Em pH 7,0 e 38°C, a urease catalisa a hidrólise da uréia no mínimo 10¹⁴ vezes mais rápido que a hidrólise espontânea.⁽¹⁷⁾

1.3.1- Histórico.

A urease foi a primeira enzima a ser obtida na forma cristalina em 1926 por Sumner.⁽¹⁹⁾ Embora, a ação da urease sobre a uréia tenha sido estudada por um grande número de pesquisadores, sua cinética não é tão simples de ser entendida. Sumner e colaboradores ⁽²⁰⁾ foram os primeiros a demonstrar que o carbamato de amônio é formado como um dos produtos da hidrólise da uréia catalisada pela urease. Mais tarde, Wang e Tarr ⁽²¹⁾ , Jencks ⁽²²⁾ e Blakeley e colaboradores ⁽¹⁸⁾ descrevem que o carbamato é o primeiro intermediário desta reação de hidrólise. Assim, a reação procede através da formação do carbamato, seguido pela decomposição do carbamato em dióxido de carbono e amônia; o dióxido de carbono reage com água para formar o ácido carbônico.

Em relação a um modelo e o mecanismo de ação da urease, foi muito bem revisado e discutido por Blakeley e Zerner ⁽²³⁾, com aproximadamente 20 referências bibliográficas.

Hellerman e colaboradores ⁽²⁴⁾ mostraram que há 23 grupos -SH por mol de urease e representa um grupo -SH por sítio ativo.

1.3.2- Propriedades.

A Tabela I apresenta algumas propriedades da urease.

TABELA I. Algumas propriedades da urease.

Propriedade	Valor
Peso molecular	480.000 (3,25)
Peso molecular da subunidade	75.000-83.000 (3)
K _m constante Michaelis (substrato)	1,05 x 10 ⁻² mol/L (uréia) (3)
pH ótimo	7,0 (3)
Ponto isoelétrico	5,0-5,1 (3)
Densidade	1,4 g/cm ³ (26)
Volume parcial específico	0,734 cm ³ /g (25,26)
Raio	52 Å (27)
Coeficiente de difusão D _{20,w}	3,46 x 10 ⁻⁷ cm ² /s (25)

1.3.3- Aplicações.

A urease é de interesse na área de clínica/química; é utilizada para a determinação de uréia no soro sanguíneo e na urina.^(27,28) Yugar e colaboradores ⁽²⁹⁾ imobilizaram urease e estudaram a sua aplicação num aparelho para o monitoramento de uréia no sangue.

Em estudo realizado por Kallury e colaboradores ⁽²⁷⁾ , a urease imobilizada em superfícies de sílica carregadas com fosfolípidos, mantém sua atividade original. Este sistema de enzima/fosfolípido possui grande aplicabilidade em equipamentos de diálise "in vivo" ou para o monitoramento "on line" da uréia.

A uréia é um importante fertilizante, e o seu desempenho no solo, é afetado pela presença, atividade e estabilidade da urease, que é a enzima que catalisa a hidrólise da uréia para formar dióxido de carbono e amônia. Por esta razão, urease é uma das enzimas do solo mais estudadas.⁽¹¹⁾

1.3.4- Imobilização de Urease.

A literatura contém inúmeros estudos sobre urease imobilizada em vários suportes e com diferentes técnicas de imobilização. Alguns exemplos são descritos a seguir: Messing ⁽³⁰⁾ mostrou a imobilização de urease em óxido de titânio com tamanho de poro controlado; Tarafdar e colaboradores ⁽³¹⁾ mostraram a adsorção de urease em argilas; Monshipouri e colaboradores ⁽⁷⁾ mostraram o microencapsulamento de urease em membranas de poliamida; Schmidt-Steffen e colaboradores ⁽³²⁾ utilizaram membranas de ultrafiltração que são adequadas para ligação covalente de urease; Gianfreda e colaboradores ⁽¹¹⁾ estudaram a adsorção, atividade e propriedades cinéticas da urease em montmorilonita, hidróxido de alumínio e complexo montmorilonita-hidróxido de alumínio; e Brennan e colaboradores ⁽³³⁾ estudaram a transdução da reação entre uréia e urease imobilizada através de ligação covalente em membranas.

1.4- Invertase.

A invertase (β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) catalisa a quebra e formação de ligações glicosídicas entre frutose e frutose ou frutose e outros monossacarídeos. A hidrólise da sacarose para formar glicose e frutose é um processo muito investigado, e numerosos estudos tem tratado de sua cinética, especialmente em altas concentrações do substrato.^(34,35)

- Natureza do complexo ativo substrato/enzima.⁽³⁴⁾

Há duas suposições básicas: a) a enzima apresenta 2 sítios ativos; b) uma molécula do substrato deve ter acesso a ambos os sítios para a reação acontecer. É possível chegar a um modelo para o complexo ativo substrato/enzima. O mecanismo de reação, inicialmente proposto por Laidler ⁽³⁶⁾ está ilustrado na figura 2, e considera a complexação de ambos os grupos ácidos e básicos dos sítios ativos da invertase.

Mais recentemente, Sato e colaboradores ⁽³⁷⁾ levaram em consideração o modelo de Bowski ⁽³⁴⁾ para explicar os resultados experimentais obtidos.

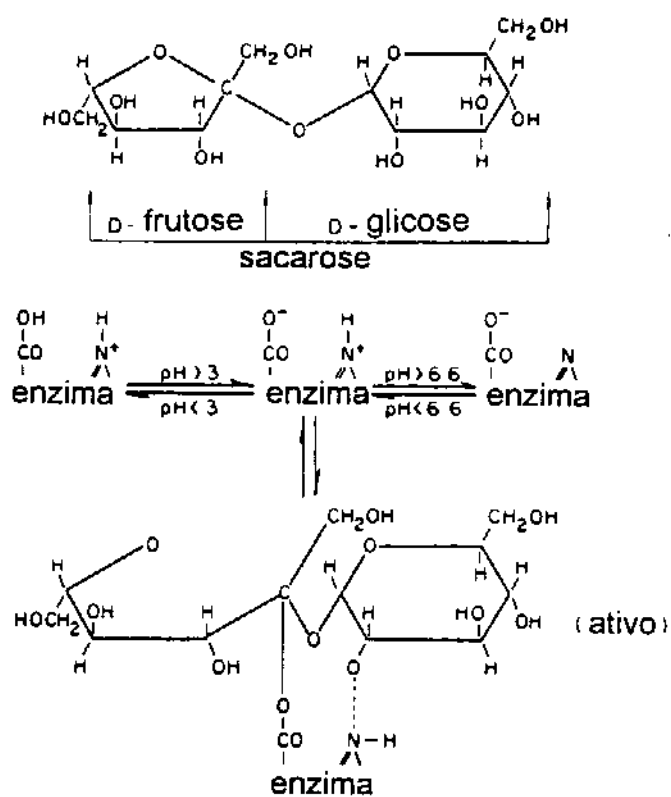


Figura 2. Indicação de sítios de ligação para o complexo ativo sacarose/invertase.

1.4.1- Propriedades.

A tabela II apresenta algumas propriedades da invertase.

TABELA II. Algumas propriedades da invertase.

Propriedade	Valor
Peso molecular	270.000 (3)
Peso molecular subunidade	135.000 (3)
K _m constante Michaelis (substrato)	2,6 x 10 ⁻² M (sacarose) (38)
pH ótimo	4,7 (4,5-5,5) (38)
Ponto isoelétrico	aprox.4,0 (38)
Temperatura ótima	55°C (38)
Tamanho: diâmetro	4,8 nm (39)
comprimento	8,3 nm (39)

1.4.2- Aplicações.

A invertase é uma enzima de interesse em aplicações nas áreas de tecnologia de alimentos e biotecnologia. A invertase é utilizada no processo de hidrólise da sacarose formando açúcares redutores, que é de grande importância na área de tecnologia de alimentos. O uso da invertase imobilizada é importante, pois a sua reutilização e o aumento na estabilidade do catalisador leva geralmente a uma redução no custo do processo.

Em aplicações laboratoriais, a invertase é utilizada na formação de ligações glicosídicas entre frutose e álcoois alifáticos e depende da estabilidade da enzima em solventes orgânicos, e pode convenientemente ser determinada por medidas calorimétricas.⁽⁴⁰⁾

1.4.3- Imobilização de invertase.

A literatura descreve inúmeros estudos sobre invertase imobilizada em vários suportes e utilizando diferentes técnicas de imobilização. Alguns exemplos são os trabalhos de: Boudrant e colaboradores ⁽⁴¹⁾ que mostraram estudos de adsorção de invertase em resina de troca iônica; Godbole e colaboradores ⁽⁹⁾ que mostraram a

invertase imobilizada em fibras de algodão por adsorção seguido pela ligação cruzada com glutaraldeído; Kotzelski e colaboradores ⁽⁴²⁾ que utilizaram membranas de ultrafiltração para ligar a invertase; Mansfeld e colaboradores ⁽⁸⁾ que mostraram a invertase ligada via ligação covalente em resina de troca aniônica; Docolomansky e colaboradores ⁽⁴³⁾ que apresentaram no seu trabalho uma adaptação de enzima termistor para a caracterização das propriedades microcinéticas de biocatalisadores imobilizados.

1.5- Crisotila.

A crisotila é um mineral do grupo das serpentinas, de forma fibrosa, é um silicato de magnésio hidratado que têm a fórmula química $3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. ^(44,45)

A crisotila é uma forma polimérica do mineral serpentina. É a forma magnesiana trioctaédrica da estrutura cristalina da caulinita. Apesar de ter textura fibrosa, a estrutura cristalina é a de um filossilicato lamelar, como a caulinita. Uma parte da camada estrutural da crisotila é um reticulado planar pseudo-hexagonal formado por tetraedros de SiO_4 ligados. Todos os tetraedros no plano ou folha estão voltados para o mesmo lado e ligados a estes tetraedros está uma folha de brucita - $\text{Mg}(\text{OH})_2$ - em que, de apenas um lado, duas a cada três hidroxilas estão substituídas pelos oxigênios apicais dos tetraédros SiO_4 . A distância perpendicular repetitiva entre as folhas compostas deste tipo, é de 7,3 Å aproximadamente. Como as dimensões da camada de brucita e da camada de tridimita são diferentes (em uma cela ortoexagonal, $a = 5,4 \text{ Å}$ e $b = 9,3 \text{ Å}$ para a brucita e $a = 5,0 \text{ Å}$ e $b = 8,7 \text{ Å}$ para a tridimita), há um elevado grau de desemparelhamento ou distorção: isso leva ao encurvamento da camada composta brucita-tridimita, com os componentes tetraédricos do lado de dentro da curvatura. ⁽⁴⁶⁾

A estrutura consiste então de uma camada de sílica tetraédrica (tridimita) que é coberta com uma camada de hidróxido de magnésio (brucita). A brucita é ligada à camada de sílica por dois dos três grupos -Mg-O, como mostra a figura 3.

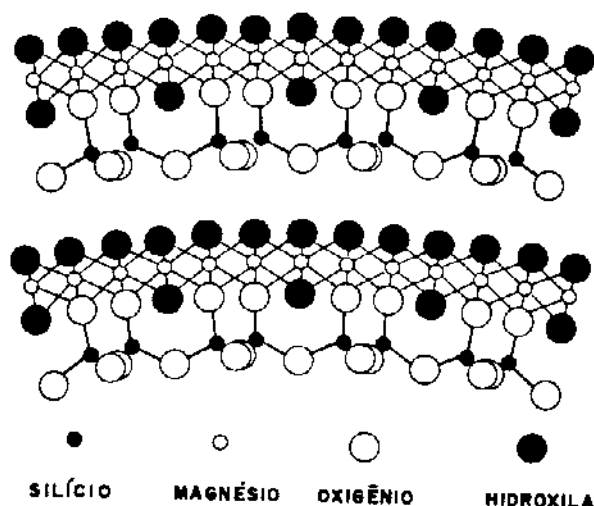


Figura 3. Esquema de uma parte das camadas curvas da parede de uma fibrila de crisotila.⁽⁴⁷⁾

Um grande número de resultados experimentais demonstra a existência de serpentinas com folhas cristalinas curvas, como é mostrado esquematicamente na figura 3, que mostra as repetidas camadas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (básico) e SiO_2 (ácido). Essas folhas fecham-se concêntricamente formando a fibrila de crisotila, cuja existência foi demonstrada por microscopia eletrônica, pela primeira vez por Turkevich e Hillier.⁽⁴⁸⁾ A fibrila de crisotila é constituída de uma parede com doze a vinte camadas compostas, de $7,3 \text{ \AA}$ de espessura cada uma. O diâmetro médio externo das fibrilas é da ordem de $250 \text{ \AA}$ e o interno de $100 \text{ \AA}$, medidos por microscopia eletrônica.

As fibrilas de crisotila são cilíndricas e aparecem como um emparelhado de cilindros concêntricos. Yada ⁽⁴⁹⁾ mostra que a maioria das fibras têm uma forma cilíndrica oca. A literatura ^(50,51) sugere que a cavidade central desses cilindros contém um mineral amorfo, e sua composição varia dependendo da origem da crisotila.

Estudos minuciosos das propriedades físico-químicas de fibras de crisotila são geralmente difíceis devido às variações na composição e heterogeneidade de

tamanho do material. As variações na composição devido à elementos substitucionais são intrínsecas ao material de interesse e não pode ser evitado. Contudo, em relação as impurezas intersticiais, por exemplo excesso de brucita e minerais amorfos entre fibras, podem ser evitados, usando-se fibras finamente divididas, idealmente monofibras (fibrilas). As monofibras devem ter todas diâmetros comparáveis e desta forma diminuir a heterogeneidade de tamanho. Fibras finamente divididas são também intrinsicamente mais adequadas para estudos físico-químicos. Por exemplo, absorção no infravermelho e adsorção na superfície. Pesquisas com crisotila finamente dividida também são úteis para estudos relacionados com o meio ambiente e a saúde, visto que as fibras menores são mais rapidamente transportadas pelo ar ou transportadas em fluxos.⁽⁵²⁾

As fibras pequenas individualizadas, em muitos casos, são mais adequadas para estudos físico-químicos, bioquímicos ou biológicos.

A Tabela III mostra algumas das características mais importantes da crisotila.

TABELA III. Características do Amianto Crisotila.⁽⁵³⁾

Estrutura	Veios cross ou slip no serpentinito
Fórmula química	$3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Composição	Silicato de magnésio hidratado
Hábito	Fibroso asbestiforme
Sistema cristalino	Monoclínico
Cor	Branco, esverdeado, cinza amarelado
Briho	Sedoso
Densidade	2,4 a 2,6 (g/cm ³)
Flexibilidade	Elevada
Comprimento	Desde muito curta até aproxim. 5 cm
Tensão à tração	Alta, aproxim. 5841 Kgf/cm ²
Resistência a álcalis e ácidos	Baixa
Impurezas	Ferro, cromo, níquel, cádmio
Resistência ao calor	Boa, friável a altas temperaturas

1.5.1- Características da superfície da fibra de crisotila.

A superfície externa das fibras de crisotila consiste de hidróxido de magnésio e, portanto não é surpreendente que as fibras se comportem em alguns aspectos como se fossem de hidróxido de magnésio apenas. Um exemplo do comportamento da crisotila semelhante ao do hidróxido de magnésio é mostrado no trabalho de Pundsack.⁽⁵⁴⁾

As superfícies interna e externa da crisotila são compostas de camadas de SiO_2 e Mg(OH)_2 respectivamente. Estas superfícies foram estudadas para verificar a acessibilidade das moléculas nos sítios de adsorção, - MgOH e - SiOH . Como exemplos, NO foi preferencialmente adsorvido na superfície externa em baixa pressão de NO e na superfície interna em alta pressão ⁽⁵⁵⁾; e em estudo realizado por Ozeki e colaboradores ⁽⁵⁶⁾ foi assumido que a adsorção de poli-L-lisina em crisotila ocorre principalmente através de uma ligação de hidrogênio entre um grupo amino da poli-L-lisina e um grupo OH na superfície interna e externa da crisotila.

Quanto as características superficiais das fibras de crisotila, é importante salientar os estudos do efeito do pH na carga superficial, ou potencial zeta, de minerais asbestos, que foram realizados por Martinez e Zucker ⁽⁵⁷⁾ pelo método do potencial de fluxo. A curva completa de pH versus potencial zeta foi obtida por estes autores. O ponto isoelétrico (potencial eletrocinético igual a zero) ocorreu em pH 11,8 para a crisotila. Eles atribuíram o aumento no potencial obtido, na faixa de pH 3 a 7, à remoção de grupos hidroxila da superfície, resultando na exposição de íons magnésio. Em pH inferior a 3, os íons magnésio são removidos e a sílica é exposta na superfície, decrescendo o potencial zeta.

Um estudo importante sobre os sítios ácidos e básicos da superfície da crisotila foi realizado por Bonneau e colaboradores ⁽⁵⁸⁾ mostrando que o mineral crisotila tem uma grande quantidade de sítios doadores na superfície Mg(OH)_2 , e desta forma atividade catalítica. Eles verificaram que a crisotila estudada não possui sítios ácidos (aceptores de elétrons). Para a determinação dos sítios básicos foi utilizado ácido benzóico (forte acceptor de elétrons) e CO_2 (fraco acceptor de elétrons), onde pela adsorção do ácido benzóico foi calculado que $3,8 \times 10^{18}$ OH/m² comportam-se como sítios adsortivos básicos (de Lewis) e pela adsorção de CO_2 foi calculado que $3,8 \times 10^{17}$ OH/m² comportam-se como sítios ativos básicos.

Como dado ilustrativo, a crisotila possui $1,2 \times 10^{19}$ OH/m² que representa o número de grupos hidroxila estimado por parâmetros cristalográficos ($a = 5,3 \text{ \AA}$ e $b = 9,2 \text{ \AA}$).

Pode-se mencionar também, que a propriedade superficial tal como a adsorvidade molecular, é afetada por algumas impurezas dos asbestos minerais. Os íons Mg^{+2} superficiais também podem ser lixiviados, tornando a superfície externa da crisotila muito defeituosa.

1.5.2- Adsorção de proteínas pela crisotila e possíveis efeitos biológicos.

A literatura mostra estudos das propriedades de adsorção de proteínas nas fibras de asbestos e os possíveis efeitos biológicos induzidos por estas fibras. (59,60)

As propriedades físicas e estruturais das fibras são geralmente consideradas como sendo os determinantes primários de seus efeitos biológicos. Considerando-se as fibras de asbestos, as propriedades mais importantes são carga superficial, solubilidade, área superficial e dimensões, em determinações de atividade citotóxica, fibrinogênicas e carcinogênicas de asbestos. (61) É bem conhecido que exposição à fibras de asbestos pode induzir no homem sérias doenças tais como: asbestose, câncer no pulmão e mesotelioma. (62) Asbesto é também citotóxico (63) e pode induzir danos em cromossomos de mamíferos (64) e nas células humanas. (65) Ainda não há um modelo para explicar esses efeitos biológicos. A este respeito, tem sido dada atenção às propriedades de adsorção de asbestos. Jones e colaboradores (66) estudaram as características de adsorção de proteínas do soro.

Foi sugerido por Governi e Vadala (67) que a adsorção de proteínas por fibras de asbestos é o primeiro estágio na formação de corpos de asbestos. Os resultados mostraram que a adsorção de proteínas por fibras de asbestos "in vivo" é muito rápida, particularmente no caso da crisotila.

A fibra de crisotila é composta de feixes de fibrilas similares, as quais se separam em solução. Esta é uma propriedade importante em relação a sua atividade biológica "in vivo". Além disso, a superfície química da fibra tem um papel importante na interação entre o mineral e o material biológico.

Fibras de asbestos adsorvem proteínas na sua superfície.⁽⁶⁶⁾ A remoção de íons magnésio das fibras de crisotila, pelo lixiviamento com ácido, reduz a afinidade das fibras em relação a albumina.⁽⁶⁰⁾ Isto demonstra que o lixiviamento da crisotila induz modificações dos efeitos biológicos desta fibra, resultando na redução do efeito hemolítico e da incidência de tumor mesotelial maligno, depois de injetar fibras lixiviadas na cavidade pleural de ratos.⁽⁶⁸⁾ Com base nestes resultados, foram feitos estudos de como diferentes proteínas são adsorvidas por fibras de crisotila lixiviada e não-lixiviada, e isotermas de adsorção de albumina e ferritina foram comparadas.⁽⁶⁹⁾ Por exemplo, ferritina apesar de ter um ponto isoelétrico próximo da albumina, mostra uma menor afinidade para a crisotila. Esta afinidade aumenta depois de lixiviar as fibras, contrário ao que é observado com albumina após tratamento análogo das fibras. Ferritina foi uma proteína escolhida para ser testada, porque ela representa um dos principais componentes dos corpos ferruginosos.⁽⁷⁰⁾

Da mesma forma, Valerio e colaboradores ⁽⁷¹⁾ mostraram que a crisotila e a crocidolita adsorvem seletivamente algumas proteínas do soro. De acordo com os resultados experimentais obtidos, dois mecanismos distintos de adsorção ocorrem quando proteínas do soro são incubadas com crisotila e crocidolita. O primeiro mecanismo parece como sendo reversível e não-específico, independente das características da proteína e da superfície da fibra. O segundo mecanismo é visto como dependente do tipo de fibra e envolve somente algumas espécies de proteína que estão fortemente concentradas na superfície da fibra. Este último mecanismo de adsorção parece como sendo de natureza eletrostática. Estes estudos são importantes, pois baseados nestas observações eles sugeriram que a adsorção de proteínas por fibras de asbestos dependem de mecanismos os quais são mais complexos do que simples interações eletrostáticas.

Também, em estudo realizado por Valerio e colaboradores ⁽⁵⁹⁾ foi analisado como o peso molecular e densidade de carga de certas proteínas podem influenciar na afinidade às fibras de crisotila e crocidolita. A crisotila mostrou uma capacidade de adsorção maior, particularmente para albumina e citocromo c. Este estudo, embora limitado pelo pequeno número de proteínas testadas, mostrou que a afinidade de proteínas às fibras de asbestos é extremamente variável. O peso molecular e a natureza da carga total das fibras ou proteínas tem pouca importância,

embora a área específica da fibra e a densidade de carga da proteína (especialmente para as fibras de crisotila) parece ter um papel importante na adsorção.

Também, em estudo de Jaurand e colaboradores ⁽⁷²⁾ as macromoléculas albumina e lipossomos foram adsorvidas na superfície de fibras de crisotila e em fibras de crisotila lixiviadas (tratadas com ácido). As macromoléculas são adsorvidas na superfície da crisotila, os lipossomos como bicamada e a albumina na posição "end-on". As diferenças na adsorção de crisotila e crisotila lixiviada sugerem que a natureza da interação entre macromoléculas e fibras pode estar relacionado com o estado químico ou físico-químico das fibras.

Um entendimento geral dos efeitos fisiológicos da inalação de materiais fibrosos é ainda incompleto, mas é sugerido que os três fatores que determinam o risco destas fibras são suas dimensões, durabilidade e dose. A dimensão da fibra é importante para determinar se ela pode ser transportada pelo ar e portanto tornar-se respirável; fibras maiores do que 3 μm de diâmetro e 50-100 μm de comprimento são consideradas como improváveis para penetrar no pulmão. As fibras que entram nos pulmões, são aquelas menores do que aproximadamente 3 μm e que podem ser removidas pelos mecanismos de defesa do corpo, com a condição de que as concentrações não sejam tão altas ou as doses muito prolongadas. As fibras mais perigosas mesmo em pequenas doses são aquelas que são quimicamente duráveis, 5 - 10 μm de comprimento e aproximadamente 0-1 μm de diâmetro. Crisotila, que é constituída de feixes de fibrilas, e cada fibrila com um diâmetro médio de 0,25 μm , é classificada na categoria de altamente perigosa.⁽⁷³⁾

Outro risco dos minerais asbestos é sua toxicidade para as células vivas. A toxicidade pode ser medida pelos efeitos sobre os macrófagos, destruição das células vermelhas do sangue (hemólise) e neurotoxicidade. Estes efeitos caracterizam a crisotila como de alta toxicidade. Contudo, o mecanismo de carcinogenicidade da crisotila permanece obscuro. Recentemente Suslova e colaboradores ⁽⁷⁴⁾ concluíram que crisotila tem a capacidade única de gerar radicais livres em interação com algumas moléculas biológicas em meio aquoso. Este fato deve explicar a grande carcinogenicidade da crisotila.

As fibrilas de crisotila variam em diâmetro nos diferentes depósitos deste mineral, e se a fibrilização fornece fibrilas, a característica das fibras respiráveis varia de acordo com a procedência. O número de fibrilas e a área superficial mudam entre os diferentes depósitos, e esta variação depende de vários fatores.⁽⁷⁵⁾

Asbestose não é uma doença do povo em geral. Assim há limites de riscos em níveis maiores de exposição de asbestos, como para trabalhadores em minas de asbestos e trabalhadores em fábricas de produtos manufaturados que utilizam asbestos, do que no meio ambiente em geral. Com a introdução da contagem de fibras em 1960, tornou-se possível calcular a exposição de cada trabalhador em termos de fibras, multiplicando-se o tempo de trabalho pelo nível de fibras na área de trabalho. Exposições de trabalhadores de uma fábrica textil inglesa são comparados com os resultados de exames médicos e de raios-x, e em 1969 estes tornaram-se a base para o regulamento TLV (threshold limit value) de 2 fibras/mL, que é o primeiro padrão baseado na contagem de fibras. Em 1984, a Ontario Royal Comission sugeriu que nenhum caso de asbestose clinicamente diagnosticado ocorre em exposições com menos de 25 fibras-ano, que é, trabalhando por 25 anos num nível de fibras de 1 fibra/mL, ou 50 anos em 0,5 fibra/mL, ou qualquer outra combinação tendo um produto de 25. Em outras palavras, há um limite de exposição de 25 fibras-ano à ser percorrido antes do risco do desenvolvimento da asbestose. Fibras-ano fornecem uma medida da total quantidade de pó inalado, e pode-se trabalhar indefinidamente num nível de fibras de 1-2 fibras/mL sem riscos. Portanto, o limite de 25 fibras-ano pode ser considerado como uma norma de segurança.⁽⁷⁶⁾

1.5.3- Situação da crisotila como material adsorvente.

A literatura fornece um amplo estudo de enzimas imobilizadas em diferentes suportes e técnicas de imobilização. Porém, para a crisotila não foram encontrados até o momento estudos de sua utilização como suporte para imobilização de enzimas. Existem apenas patentes que se referem a imobilização de enzimas em asbestos.^(77,78,79)

Conforme descrito no item anterior, foram apresentados estudos de adsorção de proteínas nas fibras de asbestos, os quais tem o objetivo de elucidar os

efeitos biológicos induzidos por estas fibras. Estes estudos contribuíram, um pouco apenas, no entendimento do comportamento da crisotila como material para a imobilização de enzimas, que é o objetivo deste trabalho. Porém, para a avaliação do desempenho de atividade das enzimas imobilizadas em crisotila, não há na literatura disponível, estudos de imobilização de enzimas em crisotila. Consequentemente, a avaliação do desempenho das enzimas imobilizadas é feita através da comparação e discussão baseados em estudos com enzimas imobilizadas em outros tipos de suportes e diferentes técnicas de imobilização.

A imobilização de enzimas utilizando como suporte fibras de crisotila ativada, é inédita. O suporte possui propriedades superficiais muito boas, é de fácil obtenção e de baixo custo. Deve-se destacar também, que enzimas são materiais de alto custo, e que podendo a enzima ser imobilizada num suporte insolúvel, neste caso crisotila, sem perda de atividade por um razoável período de tempo, a mesma amostra de enzima imobilizada pode ser usada várias vezes. Pois, uma das primeiras objeções para o uso de enzimas em análises químicas é o alto custo destes materiais. Em uma rotina de análises contínua ou semicontínua usando enzimas, requerem-se grandes quantidades destes materiais, quantidades maiores do que podem ser razoavelmente fornecidas e quantidades que podem representar grandes gastos na maioria dos casos.

A maioria das enzimas são proteínas ou polipeptídeos que podem manter suas conformações e atividades somente sob limitadas condições. Por outro lado, a maioria das enzimas apresenta catálise homogênea e são dispersas num solvente, que geralmente, é a água, e desta maneira não podem ser economicamente recuperadas e reutilizadas como numa catálise heterogênea convencional. Portanto, a imobilização oferece uma solução possível para estes problemas, pela associação da enzima com um suporte sólido insolúvel o qual é permeável a mistura contendo o substrato e solvente e desta forma produzindo um sistema catalisador heterogêneo, e que poderá ser usado várias vezes em processos contínuos ou em batelada.

Em relação a crisotila brasileira, que é material estudado em nosso grupo de pesquisa, nomeia-se como "aplicações nobres" da crisotila brasileira estudos que foram desenvolvidos inicialmente em Teses de Mestrado, a obtenção e caracterização de filtros de profundidade a partir de crisotilas brasileiras⁽⁸⁰⁾, e a ativação da superfície

de crisotilas e aplicação na imobilização de biocatalisadores.⁽⁸¹⁾ Uma patente ⁽⁸²⁾ foi obtida e trata de um processo de tratamento de crisotila "in natura", cuja finalidade é obter a crisotila de alta atividade superficial. Posteriormente, foram desenvolvidos estudos em Teses de Mestrado, de adsorção de espécies quirais em crisotila brasileira ⁽⁸³⁾, e o estudo da interação TiO_2 e crisotila ⁽⁸⁴⁾ ; e as Teses de Doutorado, com o estudo de adsorção nos sítios MgOH da crisotila e aplicações como fase estacionária para HPLC ⁽⁸⁵⁾, e o estudo da crisotila como suporte de catalisadores inorgânicos.⁽⁸⁶⁾

Os estudos mencionados aqui mostram a grande aplicabilidade da crisotila brasileira, seja pelas suas propriedades superficiais que a caracterizam como um excelente suporte para materiais inorgânicos, orgânicos e biológicos, seja pela facilidade de obtenção no mercado nacional, purificação e baixo custo, entre outras.

2- Objetivos

A relevância deste trabalho está voltada para o suporte utilizado, a crisotila, a qual possui propriedades superficiais muito boas, é de fácil obtenção, purificação e de baixo custo. Deve-se destacar também que enzimas são materiais de alto custo, e que se puderem ser imobilizadas num suporte insolúvel, sem perda de atividade por um razoável período de tempo, a mesma amostra de enzima imobilizada poderá ser usada várias vezes.

Este trabalho tem como objetivo utilizar fibras de crisotila como suporte para imobilização das enzimas urease e invertase, e posteriormente a avaliação do desempenho das propriedades catalíticas do sistema crisotila/enzima obtido.

Para tanto, são objetivos específicos deste trabalho:

- o estudo da relação crisotila/enzima na imobilização, com a finalidade de otimizar as condições de trabalho;
- avaliação do sistema crisotila/enzima quanto as suas propriedades catalíticas;
- e avaliação da estabilidade das enzimas suportadas em crisotila.

3- Parte experimental

3.1 - Materiais utilizados.

3.1.1- Crisotila.

Foi utilizada crisotila tipo 5RL, obtida da SAMA, Mina de Cana Brava, Minaçu-GO.

A classificação do amianto brasileiro SAMA tipo crisotila, é baseada no ensaio granulométrico realizado na máquina de ensaio padrão Quebec.⁽⁴⁶⁾ A máquina Quebec consiste de um conjunto de 3 peneiras de aberturas de 1/2 polegada, 4 mesh, 10 mesh e um fundo para coleta do material mais fino, onde são peneiradas 16 onças de crisotila (1 onça = 28,35 g). A crisotila 5RL, utilizada neste trabalho, foi classificada pela SAMA, e o resultado é mostrado na Tabela IV.

TABELA IV: Teste padrão Quebec * da crisotila 5RL usada neste trabalho.

Peneira	massa de crisotila retida (onças)
1/2 polegada	0,0
4 mesh	1,0
10 mesh	13,0
fundo	2,0
massa total	16,0

* realizado pela mina de Cana Brava em fevereiro de 1990.

3.1.1.1- Purificação e ativação da crisotila natural.^(80,81)

A crisotila tipo 5RL foi jateada com água de torneira, sobre uma peneira Tyler 250 mesh, durante 15 minutos. A crisotila é seca em estufa a 120°C por 5 horas. Desta crisotila, 3 g são colocadas num béquer, completando-se com 300 ml de solução tampão ácido acético/acetato de sódio equimolar $3,3 \times 10^{-2}$ M pH 4,7 e coloca-se no ultra-som por 30 minutos. Foi utilizado um ultra-som marca Thornton, modelo 4L e

frequência 25 kHz. Após a ultra-sonificação a crisotila é filtrada numa peneira Tyler 250, lavada com água destilada para retirar o excesso da solução tampão, e seca em estufa a 120°C por uma noite.

Também foi preparada a crisotila, sem o tratamento com o tampão acético/acetato, utilizando-se apenas água destilada, nas mesmas condições descritas acima.

A crisotila tal como é vendida comercialmente, apresenta-se com uma certa quantidade de pó de rocha aderida às fibras, bem como pó de fibra, prejudicando a sua qualidade.

O processo de purificação e fibrilização para a crisotila brasileira tipo 5 RL tem a finalidade de eliminar estas impurezas e aumentar o grau de fibrilização dos feixes de crisotila. Observou-se que após o jateamento da crisotila natural com água, há perdas de aproximadamente 40% de massa ⁽⁸⁰⁾, e tal como foi realizado pode-se dizer que é apenas um processo de seleção de fibras mais longas.

Este processo de purificação e fibrilização deve ser suave, para não alterar as fibras de crisotila.

3.1.1.2- Determinação da área superficial da crisotila natural e tratada.

As áreas superficiais da crisotila natural e tratada foram obtidas por adsorção de N₂ pelo método BET, utilizando-se um Micromeritics Flow Sorb II 2300, para subsequente obtenção da relação quantidade de enzima adsorvida/área superficial de crisotila.

Obteve-se uma área superficial de 13,8 m²/g para a crisotila natural e 17,8 m²/g para a crisotila tratada. Observa-se que após a purificação e fibrilização ocorre aumento na área superficial da crisotila.

A área superficial específica de asbestos crisotila varia consideravelmente com as condições físicas da fibra, quando determinada por medidas de adsorção de gás. Pundsack ⁽⁵⁴⁾ observou que a área superficial da crisotila é afetada grandemente pelo grau de abertura das fibras. Fibras retiradas com pinça de um bloco de fibras, apresentam uma área superficial de 4 a 12 m²/g, dependendo do grau de individualização das fibras. Naumann e Drescher ⁽⁸⁷⁾

estudaram também as áreas superficiais de várias crisotilas, encontrando uma considerável variação na área superficial com o grau de abertura das fibras.

3.1.2- Enzimas.

As enzimas utilizadas foram: urease (EC 3.5.1.5) U-1500 tipo III, de 27.200 unidades/g e 45.300 unidades/g, obtidas da Sigma, e extrato solúvel de invertase obtida pela autólise de fermento Fleischmann.

3.1.2.1- Obtenção do extrato solúvel de invertase.

O extrato solúvel de invertase foi obtido da seguinte maneira: 500 g de fermento Fleischmann são misturados com 50 mL de acetato de etila e autolisado a 30°C, em banho termostático, por 24 horas.⁽⁸⁸⁾

A mistura foi diluída com volume de água destilada de 50mL e centrifugada a 10.000 rpm, por um tempo de 10 minutos, a 25°C. Foi utilizada uma centrífuga Beckman, modelo J-213, operando com rotor JA-14. O sobrenadante constitui o extrato solúvel. Foram adicionados 5 mL de tolueno ao extrato, para preservação. O extrato foi guardado na geladeira.

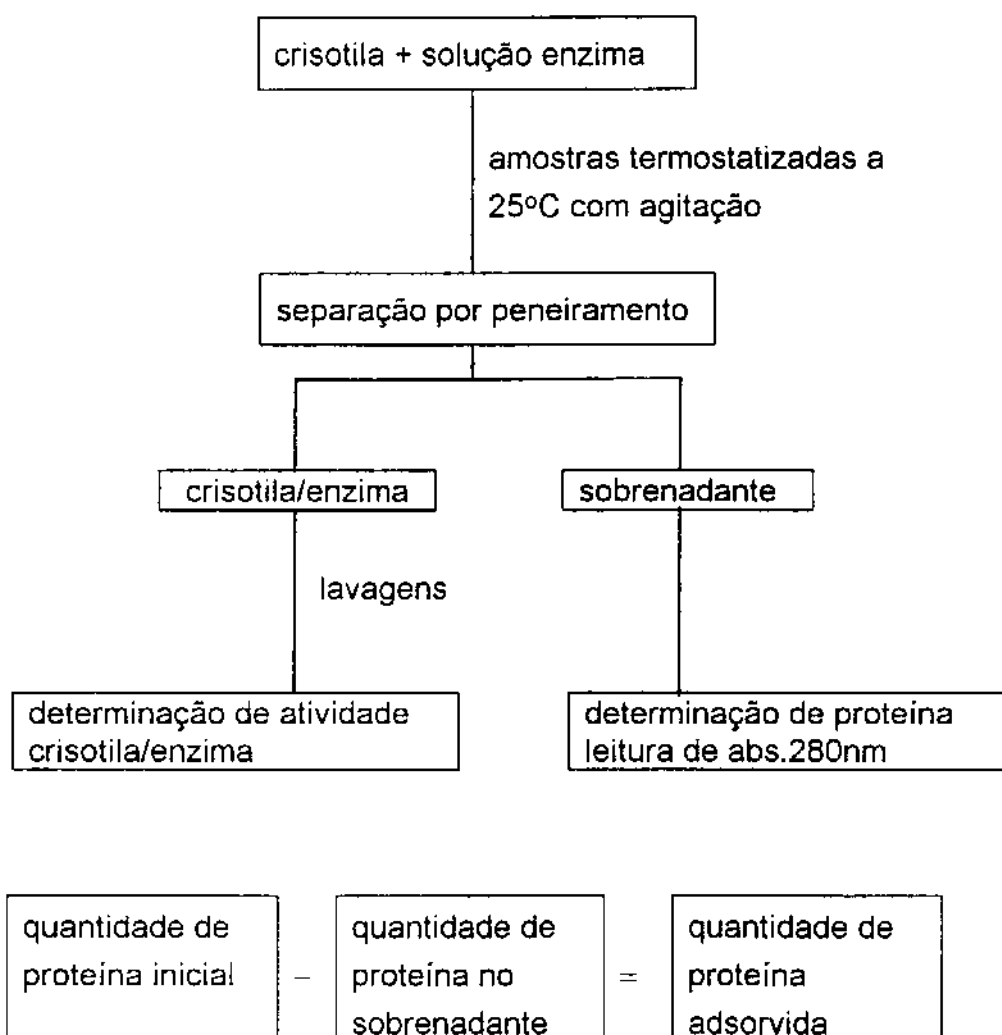
3.1.2.2- Determinação de proteína do extrato solúvel de invertase.

Foram feitas diluições do extrato solúvel de invertase com os seguintes fatores de diluição: 25, 50, 100, 200, 500 e 1000. Para a determinação de proteína das diluições do extrato solúvel de invertase, foi utilizado o método de Lowry modificado⁽⁸⁹⁾, utilizando-se como referência uma curva padrão de albumina bovina. Para cada uma destas diluições, foi lida a absorbância a 280 nm usando um espectrofotômetro Micronal B-342. Foram construídos gráficos relacionando absorbância a 280 nm das respectivas diluições em função da concentração de proteína das diluições.

Com a finalidade de verificar a estabilidade do extrato solúvel de invertase, periodicamente determinou-se a quantidade de proteína do extrato, tanto pelo método de Lowry como pelas leituras de absorbâncias a 280 nm.

3.2- Metodologia Geral.

O diagrama de blocos mostra a metodologia geral que foi utilizada para todos os experimentos de adsorção das enzimas em crisotila, realizados neste trabalho.



3.3 - Cinética de adsorção de urease em crisotila.

Foi utilizada para cada amostra, uma massa de 0,5 g de crisotila tratada com o tampão acético/acetato. Adicionou-se a cada amostra 10 mL de solução de urease 0,35 mg/mL em meio aquoso. As amostras em duplicatas foram colocadas num banho termostático com agitação moderada por 5, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos a 25°C. Para cada duplicata, fez-se um branco utilizando-se 0,5 g de crisotila mais 10 mL de água deionizada.

Separou-se a crisotila/enzima do sobrenadante por peneiramento. Recolheu-se o sobrenadante e centrifugou-se por 5 minutos, com a finalidade de separar eventuais fibras de crisotila do sobrenadante. A seguir, fez-se leituras de absorbâncias a 280 nm dos sobrenadantes e do branco, para a determinação de proteína presente nos sobrenadantes. Utilizou-se um espectrofotômetro Micronal B-342, para as leituras de absorbâncias a 280 nm. Foi construída uma curva de calibração da absorbância a 280 nm em função da concentração de urease mg/mL.

A quantidade de proteína adicionada a crisotila menos a quantidade de proteína que resta no sobrenadante indica a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila.

3.4- Adsorção de urease em função da massa de crisotila.

Pesou-se crisotila tratada entre 0,5 e 1,0 g, adicionou-se a cada amostra 10 mL de solução de urease 0,35 mg/mL em tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0. Estas amostras foram colocadas num banho termostático com agitação moderada por 1 hora, a 25°C.

Separou-se a crisotila/enzima do sobrenadante por peneiramento. Lavou-se as amostras crisotila/enzima, na própria peneira, com 10 mL do mesmo tampão para verificar se ocorre dessorção de enzima da crisotila. Foram feitas 3 lavagens para cada amostra crisotila/enzima. Para cada massa de crisotila utilizada, fez-se um controle utilizando-se a respectiva massa de crisotila mais 10 mL do mesmo tampão. Centrifugou-se o sobrenadante, as águas de lavagens e o controle; fez-se leituras de absorbâncias a 280 nm para determinação de proteína.

A quantidade de proteína adicionada menos a quantidade de proteína que resta no sobrenadante indica a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila.

Realizou-se este experimento também em meio de água deionizada.

3.5 - Isotermas de adsorção de urease em crisotila.

Foram utilizadas massas de crisotila de 1 g e adicionados 10 mL de solução de urease, variando-se a concentração da solução de urease, em meio tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0. Trabalhou-se com triplicatas e um controle. O controle contém 1 grama de crisotila mais 10 mL de solução tampão tris/HCl pH 8,0. Estas amostras foram colocadas num banho termostático com agitação moderada por 1 hora, a 25°C.

Separou-se a crisotila/enzima do sobrenadante por peneiramento. Lavou-se as amostras crisotila/enzima com 10 mL do mesmo tampão para verificar se ocorre dessorção de enzima da crisotila. Foram feitas 2 lavagens para cada amostra crisotila/enzima. Centrifugou-se o sobrenadante, as águas de lavagens e o controle; fez-se leituras de absorbância a 280 nm para determinação da quantidade de proteína.

A quantidade de proteína adicionada menos a quantidade de proteína que resta no sobrenadante indica a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila.

Realizou-se este experimento também em meio de água deionizada.

3.6- Caracterização do sistema crisotila/urease por FTIR.

Para a caracterização da urease suportada em crisotila, foram obtidos espectros no infravermelho. Foram feitas pastilhas de KBr/crisotila, KBr/urease e KBr/crisotila/urease. Usou-se janelas de NaCl para nujol/urease, nujol/crisotila e nujol/crisotila/urease. Os espectros foram obtidos num espectrofotômetro IV com transformada de Fourier, 16 PC, Perkin Elmer, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com 64 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} .

A amostra de crisotila/urease foi seca em dessecador sob vácuo, para ser posteriormente utilizada. A crisotila foi seca em estufa.

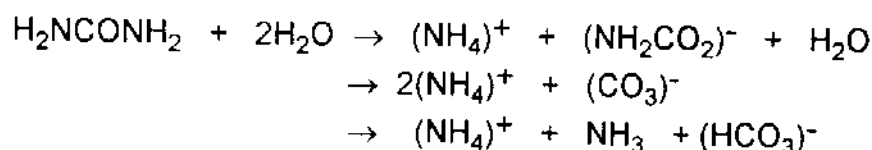
Foram também obtidos espectros no infravermelho para crisotila, urease e crisotila/urease utilizando um microscópio ótico acoplado ao espectrofotômetro com transformada de Fourier, por reflectância, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com 128 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} . A amostragem foi de um feixe de fibras de crisotila, e a abertura da fenda em 1,25 μm^2 .

3.7- Atividade da urease livre e urease imobilizada em crisotila.

As atividades enzimáticas da urease livre e urease imobilizada em crisotila foram determinadas por um método alcalimétrico. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade que catalisa a hidrólise de 0,5 μmol de uréia e libera 1 μmol de amônia.⁽⁹⁰⁾

No caso da urease, manter o pH constante é muito difícil, exceto em circunstâncias especiais, porque a ação da enzima converte um substrato neutro para um produto básico.

O método de análise alcalimétrico ⁽⁹⁰⁾ baseia-se na observação feita por Kistiakowsky e Shaw ⁽⁹¹⁾ onde o pH inicialmente neutro, de uma solução não tamponada de uréia-urease rapidamente aumenta para 9,0, e então permanece aproximadamente constante. Os produtos neste pH são geralmente carbamato de amônio, misturado com carbonato de amônio e bicarbonato:



Os produtos constituem um sistema tampão que mantém o pH aproximadamente constante, a medida que a reação acontece. Utilizando-se inicialmente o substrato tamponado em pH 9,0, evita-se a subsequente mudança de pH. A adição de excesso de ácido clorídrico no final do tempo estabelecido interrompe a reação, e converte o carbamato e amônia para o íon amônio. Portanto, a retrotitulação com hidróxido de sódio mede o ácido que não reagiu.

A ação do tampão é convenientemente fornecida pelo tris (tris[hidroximetil]aminometano), o qual apresenta duas vantagens: não tem efeito de inibição específica na atividade da urease, e ao contrário do que o tampão fosfato é facilmente obtido com alta pureza.

Nos experimentos descritos nos itens 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3 foi utilizada urease 27.200 unidades/g que corresponde a especificação do fabricante; para os experimentos descritos nos itens 3.7.4 e 3.7.5 foi utilizada urease 45.300 unidades/g.

3.7.1- Determinação da atividade da urease livre.

De acordo com o método alcalimétrico, o substrato foi preparado dissolvendo-se 3 g de uréia em 100 mL de tampão tris/HCl 0,1 M pH 9,0. A concentração da solução de urease é de 0,98 mg/mL. O procedimento para a determinação de atividade da urease livre foi: misturou-se 1 mL da solução de urease 0,98 mg/mL, 1 mL do substrato e 10 mL de água deionizada; para os tempos de reação de 30 minutos, 24, 96 e 264 horas, na temperatura de 25°C. Retirou-se uma alíquota de 2 mL da mesma amostra e parou-se a reação com adição de HCl 0,1 M. O excesso de HCl foi então retrotitulado com NaOH 0,05 M, usando-se como indicador alaranjado de metila; foi utilizada uma bureta de 5 mL. Fez-se um branco, nas mesmas condições acima, utilizando-se 1 mL de substrato e 11 mL de água deionizada.

3.7.2 - Determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila.

As amostras de crisotila/urease utilizadas neste experimento, foram preparadas com 1 g de crisotila em contato com 10 mL de solução de urease 0,98 mg/mL. O procedimento para adsorção e condições experimentais estão descritos no item 3.4. As amostras de crisotila/urease utilizadas para a determinação de atividade enzimática, possuem aproximadamente 6,2 mg urease adsorvida/g crisotila.

O procedimento para a determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila foi o seguinte: para a amostra de crisotila com urease imobilizada,

adicionou-se 11 mL de água deionizada mais 1 mL do substrato; para os tempos de reação de 30 minutos, 24, 96 e 264 horas, na temperatura de 25°C, retirou-se uma alíquota de 2 mL da mesma amostra, em cada tempo de reação estabelecido, e interrompeu-se a reação com adição de HCl 0,1 M. O excesso de HCl foi então retrotitulado com NaOH 0,05 M, conforme descrito para a determinação de atividade da enzima livre. Fez-se um branco, utilizando-se somente crisotila e adicionou-se 11 mL de água deionizada mais 1 mL do substrato, realizado nas mesmas condições.

Este experimento também foi realizado para amostras de crisotila com urease imobilizada utilizando crisotila sem tratamento com o tampão acético/acetato.

Foi também analisado o sobrenadante de cada amostra, que restou do experimento de adsorção, com o objetivo de verificar se a enzima restante no sobrenadante, que não foi adsorvida pela crisotila, possui atividade enzimática. O procedimento foi o seguinte: misturou-se 1 mL do sobrenadante, 1 mL do substrato e 10 mL de água deionizada, realizado nas mesmas condições.

3.7.3 - Estudo da variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização.

As amostras de crisotila/urease, utilizadas neste experimento, são iguais as amostras preparadas no item 3.7.2.

O procedimento para a determinação de atividade da urease imobilizada e urease livre foi o mesmo descrito no item 3.7.2. Neste experimento foi estabelecido um tempo de reação de 30 minutos. Fez-se uma primeira determinação de atividade da urease imobilizada. Separou-se a amostra de crisotila/urease, do meio reacional, por filtração em funil de Buchner e lavou-se as amostras, no próprio funil, com 30 mL de água deionizada. Em seguida reutilizou-se a amostra de crisotila/urease, seguindo o mesmo procedimento para a determinação de atividade.

Este experimento também foi realizado fazendo-se uma primeira determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila. Separou-se a amostra de crisotila/urease, do meio reacional, por filtração em funil de Buchner e lavou-se as amostras, no próprio funil, com 30 mL de água deionizada. Estas amostras de

crisotila/urease foram estocadas úmidas, em geladeira por 2 dias. A urease livre, em solução aquosa, também foi estocada na geladeira no mesmo período. Após este tempo, reutilizou-se estas amostras de crisotila/urease, seguindo o mesmo procedimento para a determinação de atividade.

3.7.4 - Estudo da variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função do número de reutilizações, com tempo de reação de 24 horas para cada determinação de atividade.

A crisotila utilizada nestes experimentos foi a crisotila sem tratamento com tampão acético/acetato, isto é, a crisotila foi jateada com água de torneira e após feito o tratamento em ultra-som com água destilada apenas, conforme descrito no item 3.1.1.1. Para comparação, foi utilizada crisotila com tratamento tampão acético/acetato, e também urease em meio tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0 imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acético/acetato.

As amostras de crisotila/urease utilizadas neste experimento, foram preparadas com 1 g de crisotila em contato com 10 mL de solução de urease 0,50 mg/mL. O procedimento para a adsorção e as condições experimentais estão descritos no item 3.4. Estas amostras de crisotila/urease utilizadas para a determinação de atividade, possuem aproximadamente 3,0 mg urease adsorvida/g crisotila (para todos os casos).

O procedimento para a determinação de atividade da urease livre e imobilizada foi o mesmo utilizado nos itens 3.7.1 e 3.7.2 respectivamente. Neste caso foi estabelecido um tempo de reação de 24 horas.

Determinou-se também, a variação de atividade da urease imobilizada em função do número de reutilizações, para todos os casos. O procedimento para a reutilização foi o seguinte: após a primeira determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila, separou-se a crisotila/urease, do meio reacional, por filtração em funil de Buchner e lavou-se as amostras, no próprio funil, com 50 mL de água deionizada. Para as subseqüentes determinações de atividade (reutilizações) destas amostras, o procedimento é o mesmo descrito anteriormente, para cada reutilização.

3.7.5 - Estudo da variação da atividade enzimática da urease imobilizada em crisotila em função do tempo de estocagem.

Preparou-se amostras de crisotila com urease imobilizada, utilizando-se crisotila sem tratamento com tampão acetato. Esta crisotila foi escolhida, pois foi a que apresentou a melhor atividade da urease imobilizada, conforme descrito no item 3.7.4. As amostras de crisotila/urease utilizadas neste experimento possuem aproximadamente 3,5 mg de urease adsorvida/g crisotila. Estas amostras foram estocadas úmidas na geladeira. A urease livre, em solução aquosa, também é estocada na geladeira no mesmo período.

O procedimento para a determinação de atividade da urease imobilizada foi o mesmo utilizado no item 3.7.4. Determinou-se a atividade enzimática para amostras de urease imobilizada em crisotila após o tempo de estocagem de 1 dia e para amostras de urease imobilizada em crisotila após o tempo de estocagem de 7 dias.

3.8- Cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila.

Este experimento foi realizado utilizando-se para cada amostra, uma massa de crisotila tratada de 0,5 g. Adicionou-se a cada amostra 10 mL de solução do extrato solúvel de invertase 1:100. As amostras em duplicatas foram colocadas num banho termostático com agitação moderada por 5, 15, 30 e 60 minutos a 25°C. Para cada duplicata, fez-se um branco utilizando-se 0,5 g de crisotila mais 10 mL de água destilada.

Separou-se a crisotila/extrato do sobrenadante por peneiramento. Recolheu-se o sobrenadante e centrifugou-se por 5 minutos, com a finalidade de separar eventuais fibras de crisotila do sobrenadante. A seguir, fez-se leituras de absorbâncias a 280 nm dos sobrenadantes e do branco, para determinação de proteína presente nos sobrenadantes.

A quantidade de proteína adicionada a crisotila menos a quantidade de proteína que resta no sobrenadante indica a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila. Neste experimento, não foram feitas lavagens das amostras crisotila/extrato.

Este experimento, também foi realizado nas mesmas condições, utilizando-se crisotila sem tratamento com tampão acético/acetato.

3.9- Adsorção do extrato solúvel de invertase em função da variação da massa de crisotila.

Pesou-se crisotila tratada entre 0,25 e 1,25 g, adicionou-se em cada amostra 10 mL de solução do extrato solúvel de invertase diluído 1:100. Estas amostras foram colocadas em banho termostático com agitação moderada por 1 hora na temperatura de 25°C.

Separou-se a crisotila/extrato do sobrenadante por peneiramento. As amostras de crisotila/extrato foram lavadas, na própria peneira, com 10 mL de água destilada, para verificar se ocorre dessorção de extrato da crisotila. Foram feitas 2 lavagens para cada amostra de crisotila/extrato. Para cada massa de crisotila utilizada, fez-se um controle utilizando-se a respectiva massa de crisotila acrescida de 10 mL de água destilada. O sobrenadante, o controle e as águas de lavagens foram centrifugados, e feitas leituras de absorbâncias a 280 nm para determinação de proteína restante nos sobrenadantes.

A quantidade de proteína adicionada a crisotila menos a quantidade de proteína que resta no sobrenadante indica a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila.

Este experimento também foi realizado utilizando-se crisotila sem tratamento com tampão acético/acetato; e também, foi feita a adsorção do extrato solúvel de invertase diluído 1:100 em meio tampão acético/acetato 0,1 M pH 5,0 em crisotila sem o tratamento com o tampão acetato.

3.10- Estudo da variação da atividade enzimática do extrato solúvel de invertase livre e imobilizado em crisotila em função da sua reutilização.

O procedimento para a determinação de atividade do extrato solúvel de invertase livre seguiu o método desenvolvido por Draetta ⁽⁸⁸⁾ com modificações. Misturou-se 5 mL de solução de sacarose 0,05 M em tampão acetato 0,01 M pH 4,6 e 0,1 mL do extrato solúvel de invertase diluído 1:100 mais 0,9 mL de água destilada; incubou-se por 10 minutos a 40°C, após adicionou-se 5 mL de carbonato de sódio 0,01 M para interromper a reação enzimática. Retirou-se uma alíquota de 0,05 mL para a determinação de glicose produzida. Utilizou-se um kit para determinação de glicose obtida da Labtest-Sistemas para Diagnósticos, que consiste de:

- 0,05 mL da amostra ou padrão
- 5,0 mL do reagente de cor N°1

A mistura é aquecida em água fervente por 5 minutos. Esfria-se em água fria por 3 minutos. A seguir são feitas leituras de absorbâncias das amostras e do padrão em 630 nm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de glicose produzida num tempo de 10 minutos a 40°C.

As amostras de crisotila/extrato solúvel de invertase utilizadas neste experimento, foram preparadas utilizando-se 0,25g e 1,25g de crisotila em contato com 10 mL de solução de invertase diluído 1:100. A crisotila utilizada neste experimento foi preparada sem o tratamento com o tampão acético/acetato. O procedimento para adsorção e condições experimentais estão descritos no item 3.9. As amostras de crisotila/extrato solúvel de invertase utilizadas neste experimento, possuem aproximadamente 0,73 mg de proteína adsorvida em 0,25 g de crisotila e 1,04 mg de proteína adsorvida em 1,25 g de crisotila.

O procedimento para a determinação de atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado em crisotila foi o seguinte: para a amostra de crisotila/invertase adicionou-se 10 mL de solução de sacarose 0,05 M em tampão acetato 0,01 M pH 4,6 mais 1,0 mL de água destilada. Incubou-se por 10 minutos a 40°C, e a seguir adicionou-se 5 mL de carbonato de sódio 0,01 M a fim de parar a reação enzimática.

Filtra-se em papel Whatman N° 1 e retira-se uma alíquota de 0,05 mL para a determinação de glicose. A amostra de crisotila/invertase foi lavada com 50 mL de água destilada, filtrada em placa porosa e guardada em geladeira.

Para as determinações subsequentes da atividade (reutilizações) destas amostras, o procedimento é o mesmo descrito anteriormente, para cada reutilização. As reutilizações destas amostras foram feitas dentro de um período de 15 dias.

A imobilização de invertase no suporte crisotila e a avaliação do seu desempenho, faz parte de um projeto que está sendo desenvolvido conjuntamente com o Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL-. Desta forma, a determinação de atividade do extrato solúvel de invertase livre e imobilizado em crisotila foram realizados pelo ITAL, no laboratório de bioquímica.

3.11- Estudo microcalorimétrico.

Foi utilizado um microcalorímetro Thermal Activity Monitor LKB. 2277, utilizando o método de titulação por perfusão. As condições de trabalho foram:

- temperatura = 25°C
- potência de trabalho = 30 μ W
- velocidade de agitação = 30 rpm
- velocidade do papel no registrador = 2 mm/min

Dentro da cela do microcalorímetro dispersou-se 0,03 g de crisotila tratada, com 1 mL de água deionizada. Foram feitas 7 injeções (uma de cada vez) da solução de urease. Cada injeção corresponde a um volume de 26 μ L da solução de urease. A concentração da solução aquosa de urease foi de 1 mg/mL.

O experimento também foi realizado utilizando-se pó de crisotila tipo 7R, coletado em peneira Tyler 250.

Com o objetivo de obter o calor de diluição da solução de urease de 1 mg/mL, foi realizado o mesmo procedimento acima, apenas sem crisotila, isto é, foi colocado dentro da cela do microcalorímetro 1 mL de água deionizada e feitas 7 injeções de solução de urease 1 mg/mL (uma de cada vez).

3.12- Estudo da estabilidade térmica da urease livre e imobilizada em crisotila por DSC.

As amostras analisadas por DSC foram: crisotila, urease livre em solução e crisotila/urease. Foi utilizado um Thermal Analyzer 9900, Du Pont Instruments, com velocidade de aquecimento de 5°C/min.

Para a urease livre em solução, foi utilizado um volume de 21,52 µl da solução de urease 1 mg/mL em água deionizada, e como referência água deionizada. As amostras de crisotila e crisotila/urease foram secas em estufa a 70°C, por 2 dias.

4 - Resultados

Neste trabalho, foi avaliado o desempenho da crisotila como suporte para a imobilização das enzimas urease e invertase, e posteriormente a avaliação da atividade enzimática da enzima livre e imobilizada em crisotila, bem como a estabilidade do sistema crisotila/enzima.

Inicialmente trabalhou-se com a enzima urease, obtida da Sigma, e posteriormente trabalhou-se com a enzima invertase obtida a partir da autólise do fermento Fleischmann na forma de um extrato solúvel de invertase.

Desenvolveu-se estudos de cinética de adsorção com a finalidade de obter-se o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio de adsorção no sistema crisotila/enzima. Na sequência, estudou-se o comportamento da adsorção das enzimas em função da massa de crisotila; e para a enzima urease também foram obtidas isotermas de adsorção. Todos estes experimentos foram realizados com o objetivo de obter as condições ótimas de trabalho, relativos ao comportamento de adsorção para o sistema crisotila/enzima.

Foram também realizados experimentos de microcalorimetria, DSC e FTIR numa tentativa de caracterização do sistema crisotila/enzima.

Posteriormente, foi realizada a avaliação da atividade enzimática destas enzimas imobilizadas em crisotila, em função de suas propriedades catalíticas e da estabilidade quando suportadas em crisotila.

4.1 - Cinética de adsorção de urease em crisotila.

Este experimento foi realizado com o objetivo de obter a quantidade de urease adsorvida em função do tempo, mantidas constante massa de crisotila, volume de solução de urease e temperatura, e desta forma estabelecer o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio de adsorção no sistema crisotila/urease. Os resultados obtidos são mostrados na figura 4.

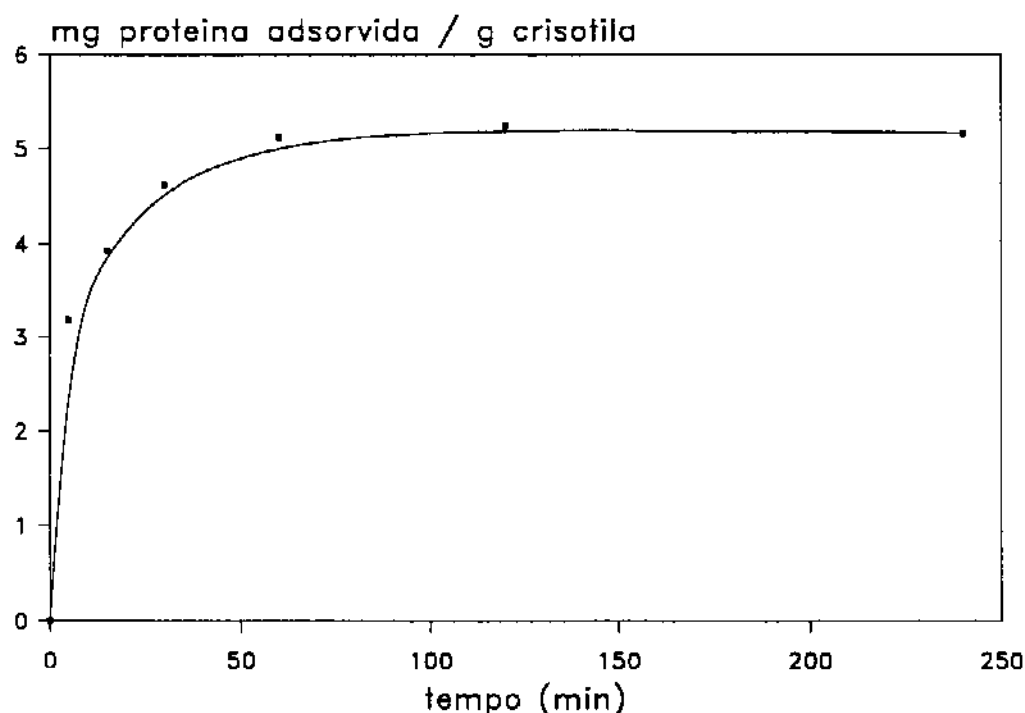


Figura 4. Cinética de adsorção de urease em crisotila. Massa de crisotila 0,5 g; concentração da solução de urease 0,35 mg/mL em meio aquoso. Amostras termostatizadas com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cada ponto é média de duplicata.

Observa-se por este experimento que o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio é de 60 minutos. Desta forma, ficou estabelecido um tempo de contato de 60 minutos para o sistema crisotila/urease.

Resultados obtidos na literatura ⁽⁶⁶⁾ mostram que a cinética de absorção de proteínas do soro pela crisotila rodesiana e pela crisotila canadense, alcançam um máximo depois de um período de contato de 60 minutos.

4.2 - Adsorção de urease em função da massa de crisotila.

O experimento foi realizado com o objetivo de verificar o efeito na adsorção de urease, utilizando massas de crisotila diferentes em contato com solução de urease de concentração conhecida.

Utilizou-se solução de urease em meio de água deionizada e em meio de tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0, com o objetivo de verificar o comportamento de adsorção da urease pela crisotila, nos diferentes meios aquosos utilizados.

Observou-se que nas águas de lavagens não resta urease, isto significa que não há dessorção da urease imobilizada na crisotila. Porém, deve-se salientar que estas lavagens são brandas. Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 5 e 6.

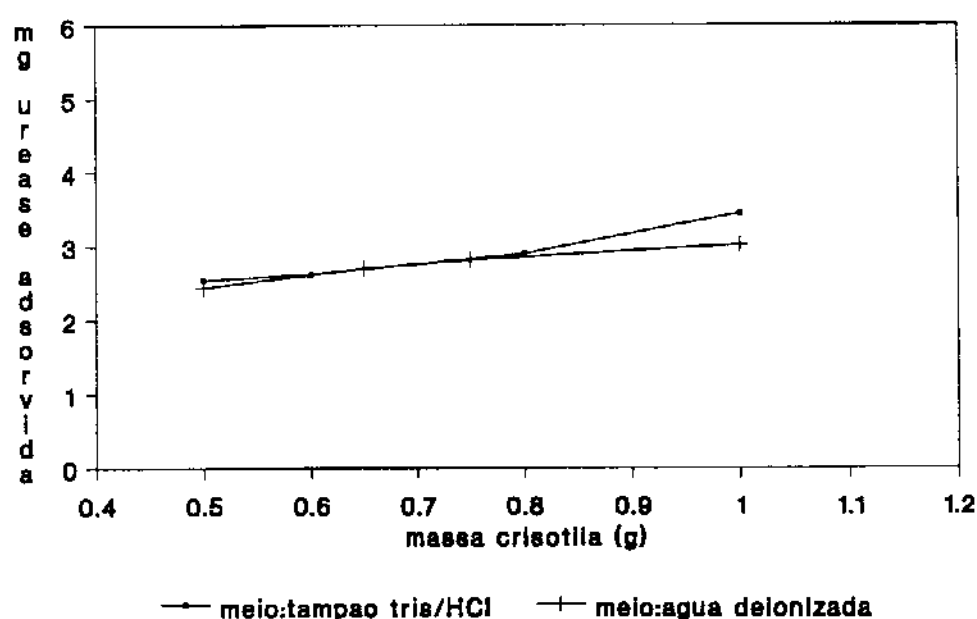


Figura 5. Adsorção de urease em função da massa de crisotila, após 1 hora em banho termostatizado com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Volume de 10 mL da solução de urease. Concentração da solução de urease aproximadamente 0,35 mg/mL. Cada ponto é média de duplicata.

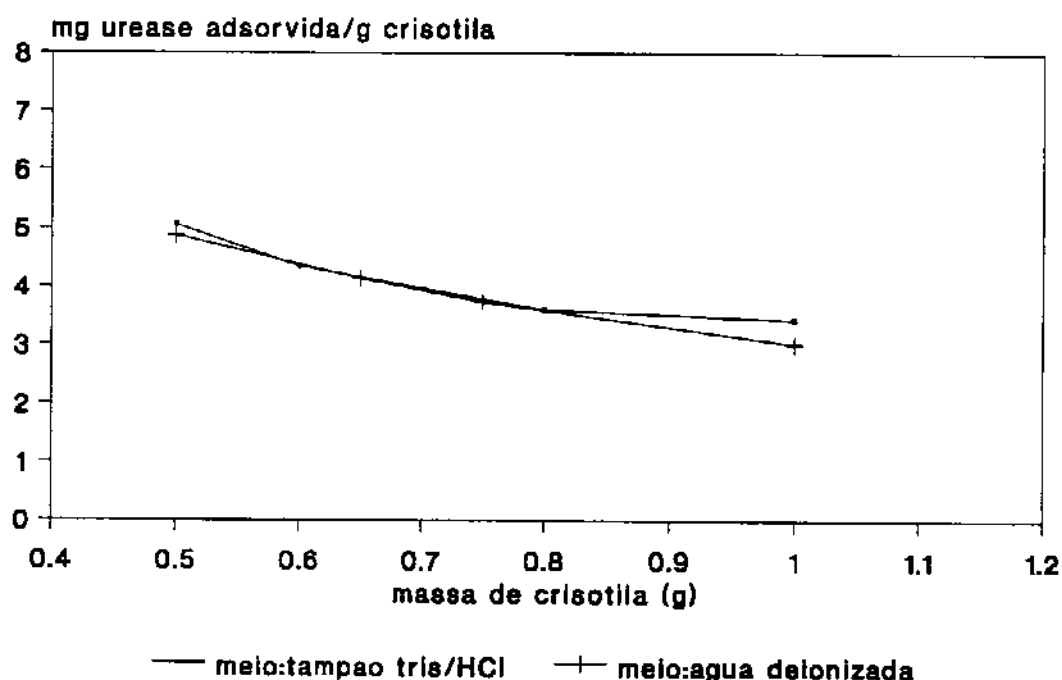


Figura 6. Adsorção de urease expressa em mg de urease adsorvida por g de crisotila em função da massa de crisotila, após 1 hora em banho termostatizado com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Volume de 10 mL da solução de urease. Concentração da solução de urease aproximadamente 0,35 mg/mL. Cada ponto é média de duplicata.

Observa-se na figura 5, que a adsorção de urease aumenta ligeiramente com o aumento da massa de crisotila, contudo a quantidade de urease adsorvida por unidade de massa diminui, conforme mostrado na figura 6. Observa-se também o mesmo comportamento de adsorção de urease pela crisotila, nos diferentes meios aquosos utilizados, tanto para urease em meio de água deionizada como para urease em meio tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0.

A partir deste experimento, escolheu-se a massa de 1 g de crisotila para construir as isotermas de adsorção de urease. Este ponto corresponde a adsorção quase total da urease em crisotila, restando uma quantidade insignificante de urease no sobrenadante, nestas condições experimentais.

4.3 - Isotermas de adsorção de urease em crisotila.

Este experimento tem como objetivo verificar qual a afinidade entre a enzima e a crisotila.

Estudos de adsorção foram realizados pela interação de quantidades conhecidas de urease em crisotila. Foi utilizada a massa de 1 g de crisotila, pois é onde se obteve a maior quantidade de urease adsorvida, conforme definido no item anterior. Os resultados obtidos são mostrados na figura 7.

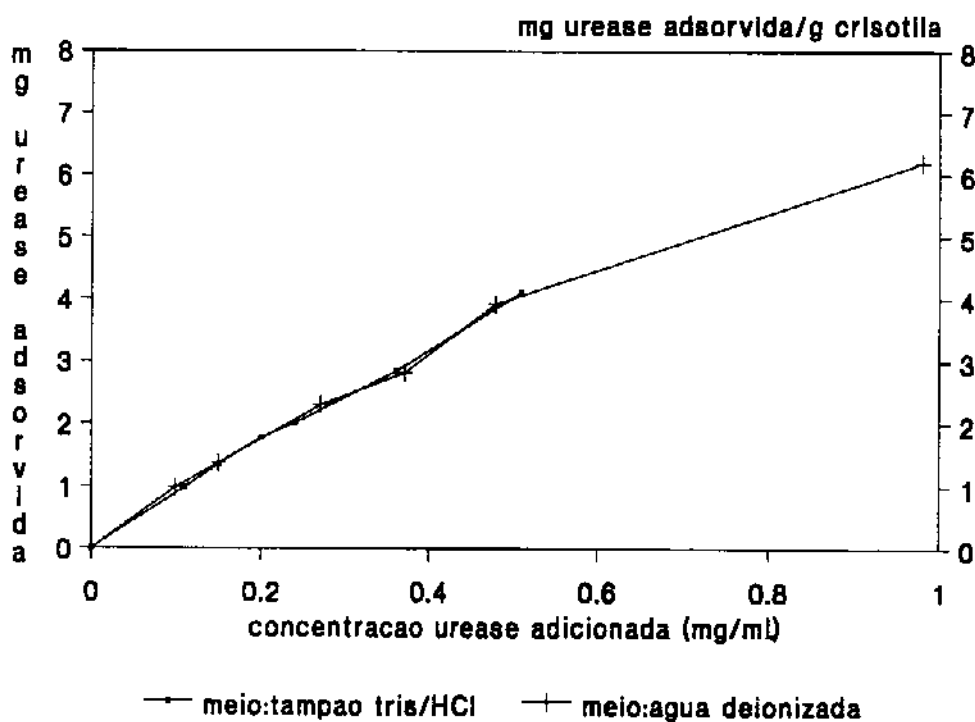


Figura 7. Isoterma de adsorção de urease em crisotila. Massa de 1 g de crisotila. Volume de 10 mL da solução de urease. Tempo de adsorção de 1 hora em banho termostaticado com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cada ponto é média de triplicata.

As isotermas mostram que não ocorre saturação, mesmo na maior concentração de urease utilizada neste experimento. Verificou-se pelas lavagens das

amostras crisotila/urease que não ocorre dessorção de urease. Porém, deve-se salientar que estas lavagens são brandas. Apenas para a concentração de urease adicionada de 1,0 mg/mL, observa-se uma pequena dessorção de urease nas águas de lavagem.

Observa-se o mesmo comportamento de adsorção de urease em crisotila, nos diferentes meios aquosos utilizados, tanto para adsorção de urease em meio de água deionizada como para a adsorção de urease em meio tampão tris/HCl 0,02 M pH 8,0.

A figura 7 mostra um comportamento linear na quantidade de urease adsorvida, aproximadamente até a concentração de 0,5 mg/mL da solução de urease adicionada, que significa que a quantidade de urease adsorvida é uma função da concentração de urease adicionada. Também, pelos resultados obtidos observa-se que na concentração de urease de 0,1 mg/mL, ocorre adsorção total da urease em crisotila, isto é, 100% de adsorção.

4.4- Determinação da atividade da urease livre e imobilizada em crisotila.

Este experimento tem o objetivo de avaliar o desempenho da urease adsorvida em crisotila através da determinação de atividade enzimática da urease livre e do sistema crisotila/urease.

Determinou-se a atividade enzimática no sistema crisotila/urease e urease livre, através da formação de amônia, produto da reação da urease com a uréia como substrato.

Os resultados são mostrados na figura 8. Este experimento foi realizado utilizando-se 6,2 mg urease suportadas em 1 grama de crisotila, aproximadamente 6 vezes maior que a quantidade de urease livre utilizada, pois apenas nestas condições foi possível determinar a atividade da urease imobilizada. Com quantidades menores de urease imobilizada não se obteve atividade.

Utilizou-se quantidades menores de urease livre para a determinação de atividade, pois não havia disponibilidade de enzima.

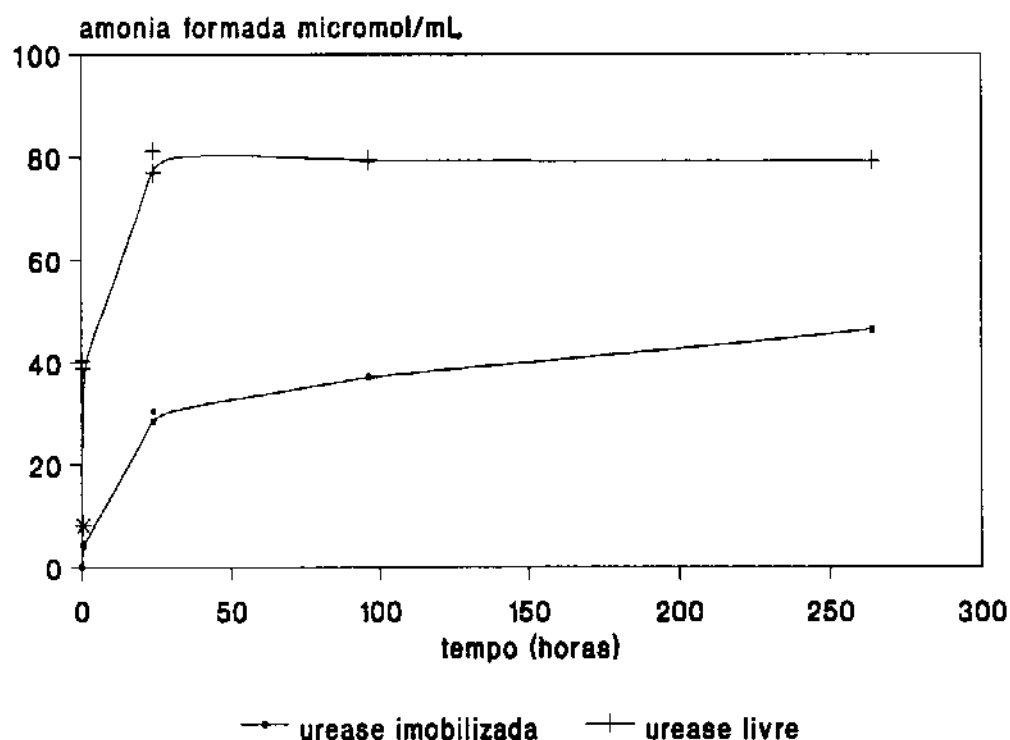


Figura 8. Atividade da urease livre e urease imobilizada em crisotila. (+) urease livre 0,98 mg; (•) 6,2 mg urease imobilizada em 1 g de crisotila, a crisotila utilizada é com tratamento tampão acetato; (*) 6,2 mg de urease imobilizada em 1 g de crisotila sem tratamento com tampão acetato.

Observa-se que para a urease imobilizada na crisotila, a formação do produto é mais lenta, quando comparado com a urease livre. Após o tempo de reação de 24 horas a reação enzimática da urease livre parou, isto é, atingiu a hidrólise máxima do substrato; para a urease imobilizada em crisotila a atividade enzimática continua aumentando até 264 horas de reação.

Uma amostra de crisotila/urease, utilizando crisotila sem tratamento com tampão acetato e com um tempo de reação de 30 minutos, apresenta atividade ligeiramente maior da urease adsorvida do que a urease adsorvida em crisotila com tratamento com tampão acetato (ponto * mostrado na figura 8).

Verificou-se que os sobrenadantes, restantes do experimento de adsorção pertencentes a cada amostra de crisotila/urease, não apresentam atividade enzimática.

A partir deste experimento, foi estabelecido o tempo de reação de 24 horas para determinar a variação na atividade da urease imobilizada em função da sua reutilização. Os resultados são mostrados no item 4.6.

4.5- Variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização.

Este experimento foi realizado com a finalidade de verificar a possibilidade da reutilização das amostras de crisotila/urease. A avaliação foi feita através da determinação da atividade enzimática do sistema crisotila/urease.

Com o objetivo de verificar a variação de atividade da urease imobilizada, reutilizou-se as amostras de crisotila/urease e determinou-se novamente a atividade da urease imobilizada, estabelecido um tempo de reação de 30 minutos para cada determinação de atividade. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela V e Tabela VI.

TABELA V. Variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização. Cada amostra contém aproximadamente 6,2 mg urease adsorvida em 1 g de crisotila. Tempo de reação de 30 minutos. Cada determinação é média de duplicata.

	atividade crisotila/urease $\mu\text{mol amônia/mL} \times \text{mg}$ urease adsorvida	atividade urease livre $\mu\text{mol amônia/mL} \times \text{mg}$ urease livre.
1ª det. atividade	1,09	51,7
reutilização	0,20	---

A Tabela V mostra que na reutilização das amostras crisotila/urease ocorre uma redução de aproximadamente 80% na atividade.

TABELA VI. Variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização após um tempo de estocagem de 2 dias na geladeira. Cada amostra contém aproximadamente 6,2 mg de urease adsorvida em 1 g de crisotila. Tempo de reação de 30 minutos. Cada determinação é média de duplicata.

	atividade crisotila/urease $\mu\text{mol amônia/mL} \times$ mg urease adsorvida	atividade urease livre $\mu\text{mol amônia/mL} \times$ mg urease livre.
1ª det.atividade	0,99	51,5
reutilização*	0,22	51,0

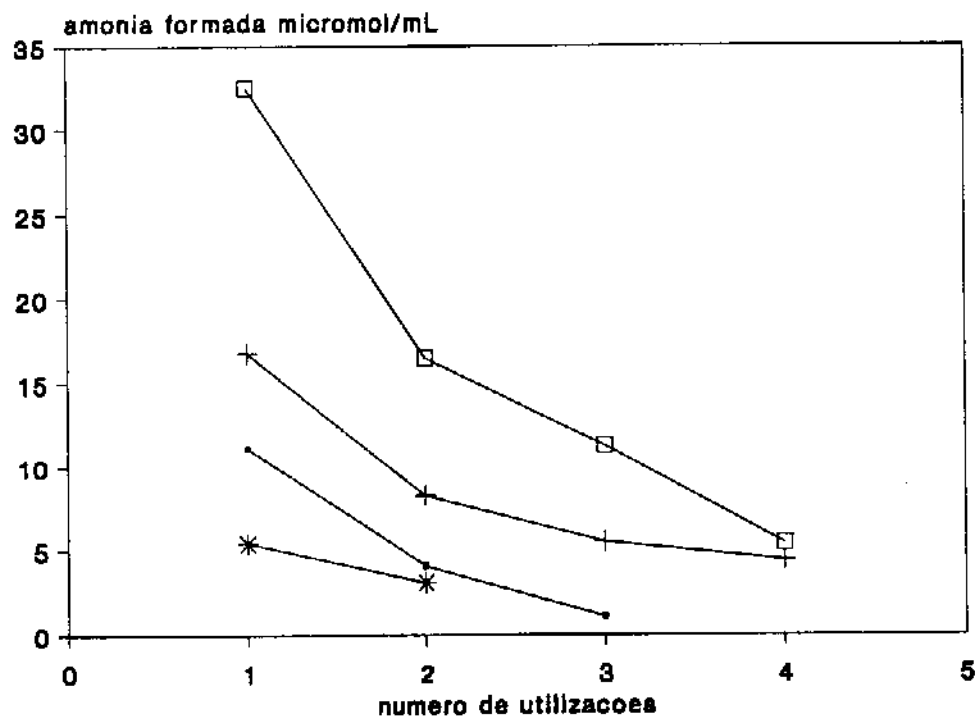
* reutilização após 2 dias.

A Tabela VI mostra que na reutilização, após 2 dias, das amostras crisotila/urease ocorre também uma redução na atividade de aproximadamente 80%. Observa-se que para a urease livre em solução aquosa, estocada no mesmo período, que não há alteração na sua atividade enzimática.

4.6- Estudo da variação de atividade da urease imobilizada em crisotila, num tempo de reação de 24 horas, em função do número de reutilizações.

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar a variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função do número de reutilizações do sistema crisotila/urease, isto é, verificar a estabilidade da urease adsorvida. Difere do experimento descrito no item 4.5, pelo tempo de reação estabelecido para cada determinação de atividade.

Estes experimentos foram realizados num tempo de reação de 24 horas para cada determinação, pois a velocidade de reação da urease imobilizada em crisotila é menor, conforme mostrado na figura 8. Para se verificar a estabilidade da urease adsorvida, reutilizou-se as amostras de crisotila/urease sequencialmente. Os resultados obtidos são mostrados na figura 9.



- urease imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acetato (urease 27.200 unidades/g).
Contém aproximadamente 6,2 mg urease adsorvida em 1 g de crisotila.
- + urease imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acetato (urease 45.300 unidades/g).
- urease imobilizada em crisotila com tratamento com tampão acetato (urease 45.300 unidades/g).
- * urease em tampão tris/HCl pH 8,0 imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acetato (urease 45.300 unidades/g).

Figura 9. Variação de atividade da urease imobilizada em crisotila, num tempo de reação de 24 horas, em função do número de reutilizações. As amostras contém aproximadamente 3,0 mg urease adsorvida em 1 g de crisotila (para todos os casos, exceto a série de dados da ponto é média de duplicata).

Observa-se que a urease imobilizada na crisotila sem tratamento com tampão acetato apresenta uma maior atividade, quando comparado com a atividade da

urease imobilizada em crisotila com tratamento com tampão acetato e com a urease em meio tampão tris/HCl pH 8,0, imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acetato. Isto significa que há alterações na atividade enzimática, conforme o tratamento feito na crisotila utilizada em cada caso.

Observa-se também, que nas reutilizações das amostras de crisotila/urease nas mesmas condições do experimento, ocorre redução na atividade da urease adsorvida na crisotila, para todos os casos.

A partir deste experimento, escolheu-se as amostras de crisotila/urease utilizando crisotila sem o tratamento com o tampão acetato, para estudar a variação de atividade da urease imobilizada em função do tempo de estocagem, pois apresentaram o melhor resultado de atividade enzimática, conforme mostra a figura 9.

4.7- Variação da atividade da urease imobilizada em crisotila em função do tempo de estocagem.

O objetivo deste experimento é verificar a estabilidade da urease imobilizada em crisotila, que foi estocada por um tempo determinado. O tempo de estocagem significa que as amostras de crisotila/urease foram guardadas na geladeira por um determinado tempo.

Pela determinação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função do tempo de estocagem, obteve-se os resultados mostrados na Tabela VII. Utilizou-se crisotila sem o tratamento com o tampão acetato, conforme definido no item anterior.

TABELA VII. Variação da atividade da urease imobilizada em crisotila e da urease livre em função do tempo de estocagem. As amostras de crisotila contém aproximadamente 3,5 mg urease adsorvida em 1 g de crisotila. Cada ponto é média de duplicata.

	tempo de estocagem (dias)	atividade $\mu\text{mol amônia/mL} \times \text{mg urease adsorvida}$
urease/crisotila	1	7,1
urease/crisotila	7	1,6

	tempo de estocagem (dias)	atividade $\mu\text{mol amônia/mL} \times \text{mg urease livre}$
urease livre 0,50 mg	1	165,8
	7	164,0

Estes resultados mostram que num período de estocagem de 7 dias das amostras de crisotila/urease, há uma redução na atividade da urease imobilizada de aproximadamente 80%. Observa-se que a atividade da urease livre em solução aquosa não variou, estocada no mesmo período e nas mesmas condições.

4.8 - Cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila.

Este experimento foi realizado com o objetivo de obter a quantidade do extrato solúvel de invertase adsorvido em função do tempo, mantidas constante massa de crisotila, volume de solução do extrato solúvel de invertase diluído 1:100 e temperatura, e desta forma estabelecer o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio de adsorção no sistema crisotila/extrato solúvel de invertase.

Utilizou-se crisotila com o tratamento com o tampão acetato e sem o tratamento, com o objetivo de verificar o comportamento da cinética de adsorção do

extrato solúvel de invertase em relação aos diferentes tratamentos feitos na crisotila. Obteve-se os resultados mostrados na figura 10.

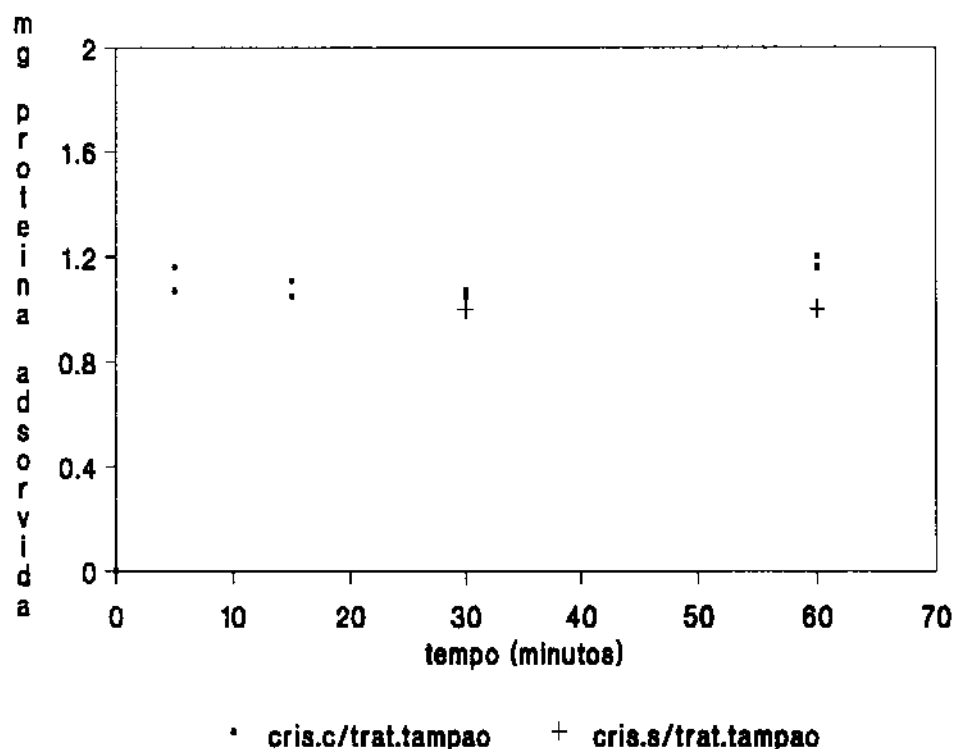


Figura 10. Cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase diluído 1:100. Massa de crisotila de 0,5 g. Volume de 10 mL da solução do extrato solúvel de invertase. Amostras termostatizadas com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Observa-se que a adsorção é rápida e que não há alteração na adsorção com a variação do tempo. Observa-se também o mesmo comportamento da cinética de adsorção utilizando-se crisotila com ou sem o tratamento com tampão acético/acetato.

A partir deste experimento, estabeleceu-se o tempo de 1 hora para os experimentos de adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila.

4.9 - Adsorção do extrato solúvel de invertase em função da variação da massa de crisotila.

O experimento foi realizado com o objetivo de verificar o efeito na adsorção do extrato solúvel de invertase, variando-se a massa de crisotila em contato com solução do extrato solúvel de invertase de concentração conhecida, e também verificar o efeito na adsorção do extrato solúvel de invertase utilizando crisotila com e sem o tratamento com o tampão acetato. Os resultados são mostrados nas figuras 11 e 12.

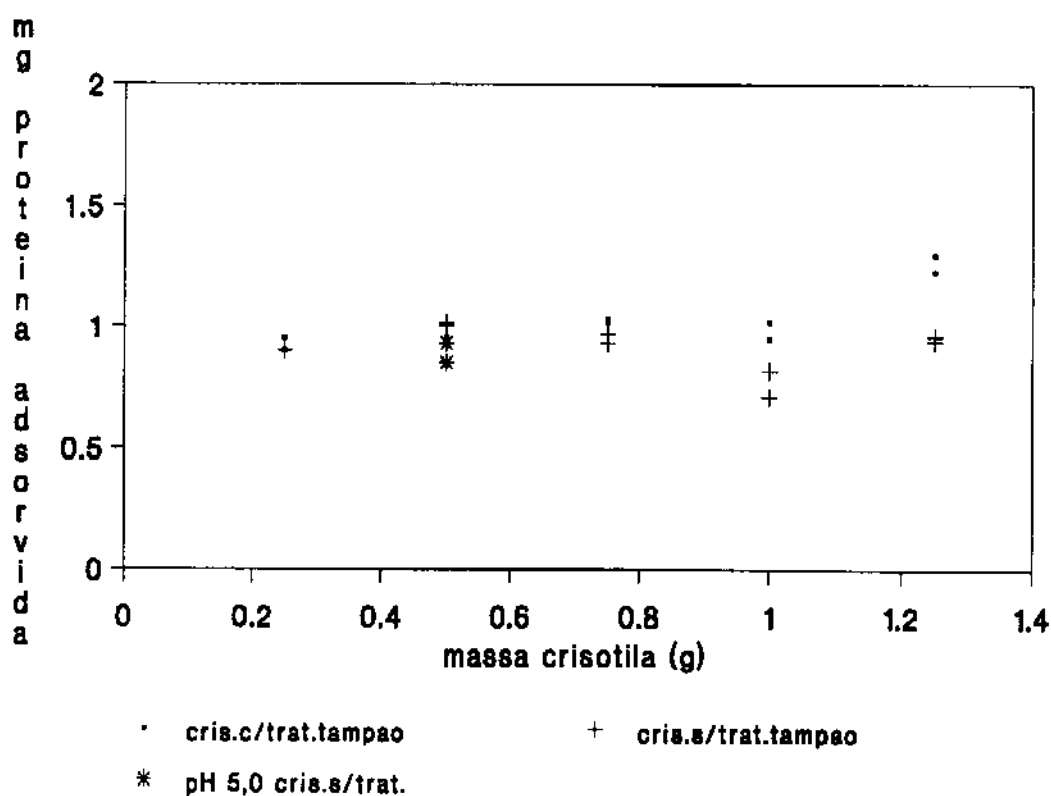


Figura 11. Adsorção do extrato solúvel de invertase em função da massa de crisotila. Tempo de adsorção de 1 hora em banho termostatzado com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Volume de 10 mL de solução do extrato solúvel de invertase. Extrato solúvel de invertase diluído 1:100.

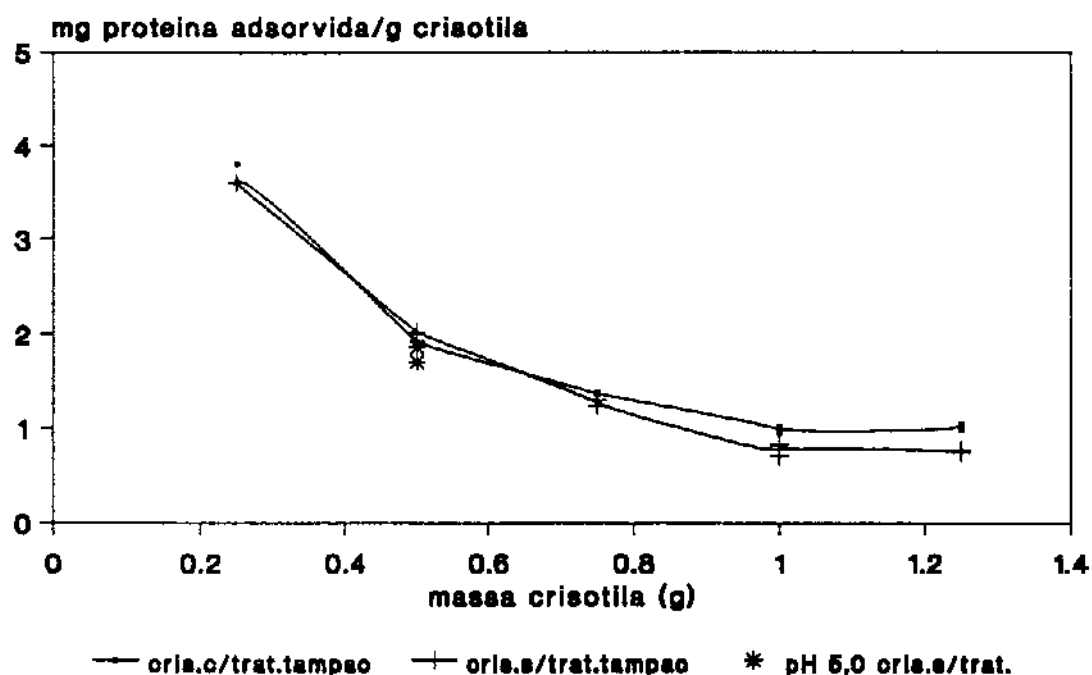


Figura 12. Adsorção do extrato solúvel de invertase expressa em mg de proteína adsorvida por grama de crisotila em função da massa de crisotila. Tempo de adsorção de 1 hora em banho termostatzado com agitação a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Volume de 10 mL de solução do extrato solúvel de invertase. Extrato solúvel de invertase diluído 1:100.

Observa-se, pela figura 11, que a quantidade de proteína adsorvida não é proporcional a massa de crisotila. Observa-se também o mesmo comportamento de adsorção utilizando-se crisotila com os diferentes tratamentos.

Utilizando-se massa de 0,5 g de crisotila para adsorção do extrato solúvel de invertase diluído 1:100 em solução tampão acético/acetato 0,1 M pH 5,0, a quantidade de proteína adsorvida foi aproximadamente igual a adsorvida em crisotila com os diferentes tratamentos.

Pelos resultados apresentados na figura 11, observa-se que a quantidade de proteína adsorvida não varia muito com o aumento da massa de crisotila. A figura 12 mostra que a quantidade de proteína adsorvida/g crisotila diminui até ficar

constante. É importante salientar que a quantidade de proteína adsorvida em função da variação de massa de crisotila, corresponde a aproximadamente 30% do conteúdo total de proteína do extrato solúvel de invertase diluído 1:100.

A partir deste experimento, escolheu-se as amostras de crisotila/extrato solúvel de invertase utilizando-se crisotila sem o tratamento com o tampão acetato, para a determinação de atividade enzimática.

4.10- Estudo da variação da atividade do extrato solúvel de invertase imobilizada em crisotila em função da reutilização.

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar a variação de atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado em crisotila, em função do número de reutilizações e também em função do tempo de estocagem, com a finalidade de avaliar a estabilidade do extrato solúvel de invertase adsorvido em crisotila.

Determinou-se a atividade enzimática no sistema crisotila/extrato solúvel de invertase e extrato solúvel de invertase livre, através da formação de glicose, produto da reação da invertase com a sacarose. A crisotila utilizada é sem o tratamento com o tampão acetato. Os resultados são mostrados na figura 13.

Observa-se que as amostras (b) com menor massa de crisotila (0,25g) e menos proteína adsorvida apresentam uma maior atividade quando comparado com as amostras (c) de maior massa de crisotila (1,25g) e maior quantidade de proteína adsorvida. Em termos de atividade relativa (%), representam aproximadamente 35% e 19% respectivamente, quando comparadas com a atividade do extrato solúvel de invertase livre (a).

Observa-se também, que a atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado diminui com o número de reutilizações e com o tempo de estocagem.

Foi feita apenas a primeira determinação de atividade do extrato solúvel de invertase diluído 1:100 livre, pois na segunda determinação após 4 dias, a solução já estava turva.

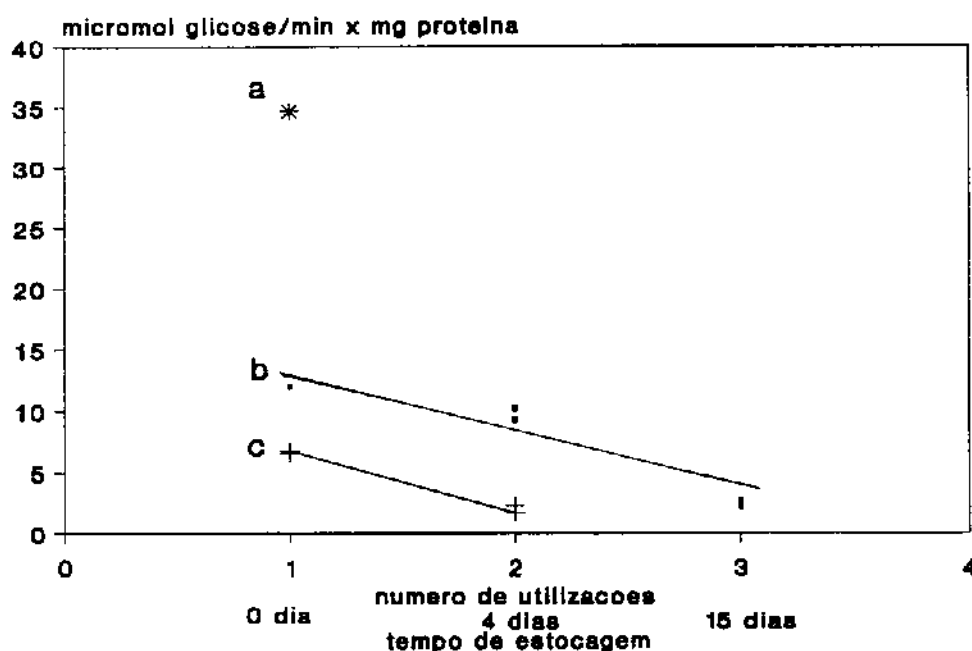


Figura 13. Variação de atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado em crisotila em função do número de reutilizações e do tempo de estocagem. (*) 0,030 mg proteína livre; (•) aproximadamente 0,73 mg proteína adsorvida em 0,25g de crisotila; (+) aproximadamente 1,04 mg proteína adsorvida em 1,25g de crisotila.

4.11- Caracterização do sistema crisotila/urease por FTIR.

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de caracterizar a urease suportada em crisotila, através da obtenção de espectros no infravermelho.

Os espectros obtidos por microscopia no infravermelho são mostrados nas figuras 14 e 15. O espectro de crisotila/urease mostrado na figura 14, apresenta um conjunto de bandas na região $2965-2850\text{ cm}^{-1}$ característica do estiramento de ligação C-H, similares ao espectro da urease, mostrando a presença de urease sobre crisotila. Isto apenas comprova os resultados anteriores, que a urease está adsorvida na crisotila. Nas demais regiões do espectro, mostrado na figura 15, não se observa diferença pois as bandas de absorção de crisotila encobrem as bandas de absorção da urease.

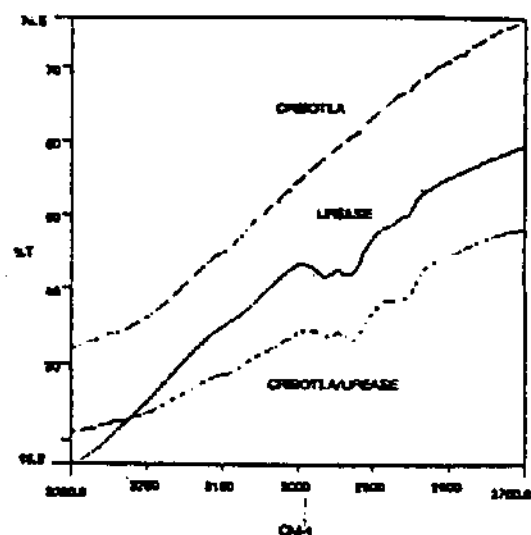


Figura 14. Espectros no infravermelho de crisotila, urease e crisotila/urease obtidos com microscópio ótico acoplado ao espectrofotômetro.

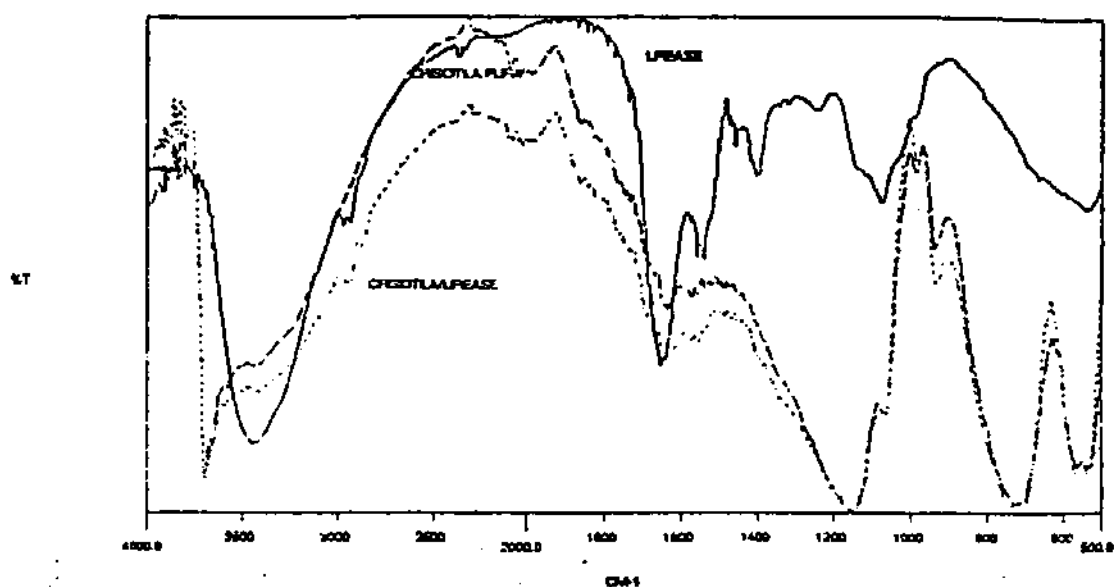


Figura 15. Espectros no infravermelho de crisotila, urease e crisotila/urease obtidos com microscópio ótico acoplado ao espectrofotômetro.

Os espectros obtidos no infravermelho de KBr/crisotila e KBr/crisotila/urease, foram sobrepostos, e não se observou diferença significativa entre eles. Resultados análogos foram obtidos para os espectros no infravermelho de nujol/crisotila e nujol/crisotila/urease.

4.12- Estudo microcalorimétrico.

Este experimento tem o objetivo de determinar o calor de adsorção do sistema crisotila/enzima, com a finalidade de determinar se o tipo de adsorção é física ou química, entre outros.

A adsorção é realizada a pressão constante. Sob esta condição o efeito de calor é igual a entalpia de adsorção ΔH_{ads} . Este valor é o resultado de contribuições de vários tipos de interações que estão envolvidas no processo de adsorção.

Obteve-se como resultado, que o calor de diluição da solução de urease de 1 mg/mL em água deionizada é muito pequeno. Quanto ao calor de adsorção, obteve-se sinais endotérmicos. Observou-se que o calor de adição (mJ) decresce com a quantidade de enzima adicionada. Contudo, não se obtiveram resultados reprodutíveis, nem com a crisotila tratada nem com o pó de crisotila.

4.13- Estudo da estabilidade térmica da urease livre e imobilizada em crisotila por DSC.

A técnica DSC permite uma determinação direta do efeito do processo de imobilização na estabilidade térmica de proteínas.⁽⁹²⁾ A utilização desta técnica tem como objetivo avaliar a estabilidade térmica da urease livre e urease imobilizada em crisotila.

Foram obtidos termogramas para a crisotila, urease livre em solução aquosa e crisotila/urease. O termograma de desnaturação térmica da urease livre é mostrado na figura 16. O pico da curva representa a temperatura de desnaturação, aproximadamente em 91°C. A alteração da estrutura de maior ordem inicia aproximadamente em 77°C, e a transição é completa aproximadamente em 125°C.

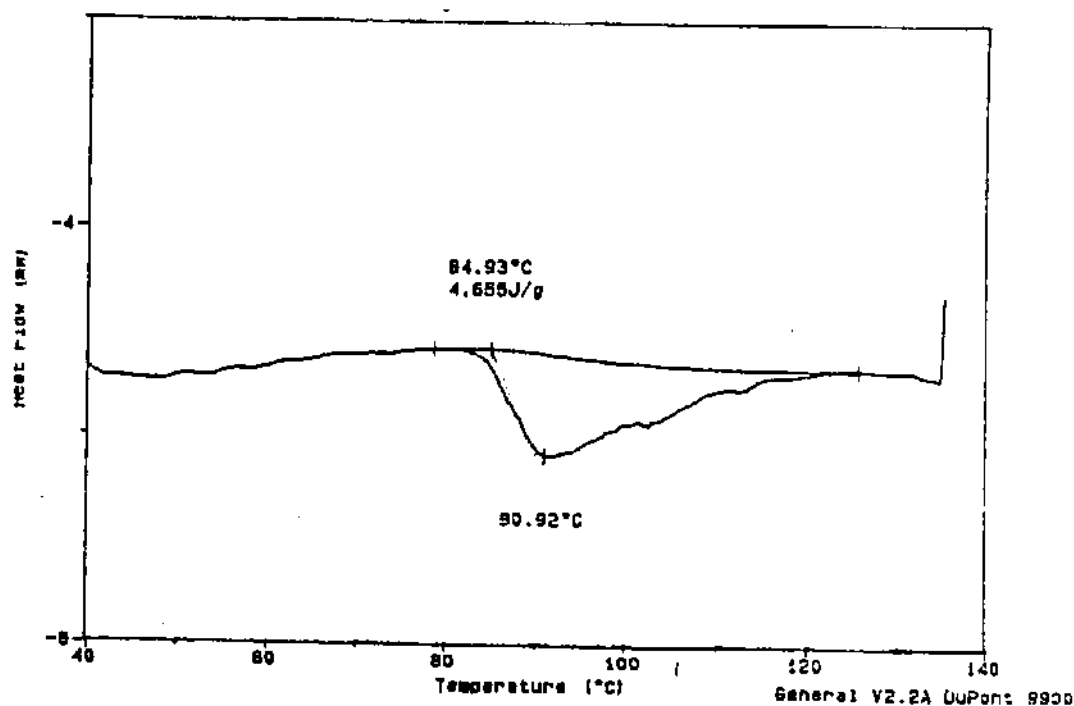


Figura 16. Termograma obtido por DSC para urease em solução aquosa. Volume de 21,52 μL da solução de urease de concentração de 1 mg/mL. Utilizando como referência água deionizada. Velocidade de aquecimento de 5°C/min.

O termograma da crisotila é mostrado na figura 17. A crisotila foi seca em estufa a 70°C. Este procedimento foi necessário pois o termograma obtido de crisotila, que não foi seco em estufa, mostrou transição no intervalo de temperatura estudada.

O termograma da crisotila/urease é mostrado na figura 18. Esta amostra também foi seca em estufa a 70°C.

Obteve-se também um termograma de crisotila/urease e usou-se como referência crisotila. Contudo, não foi possível obter nenhuma informação do termograma. Este resultado pode evidenciar, que a quantidade de urease imobilizada na crisotila esteja fora dos limites de detecção do aparelho.

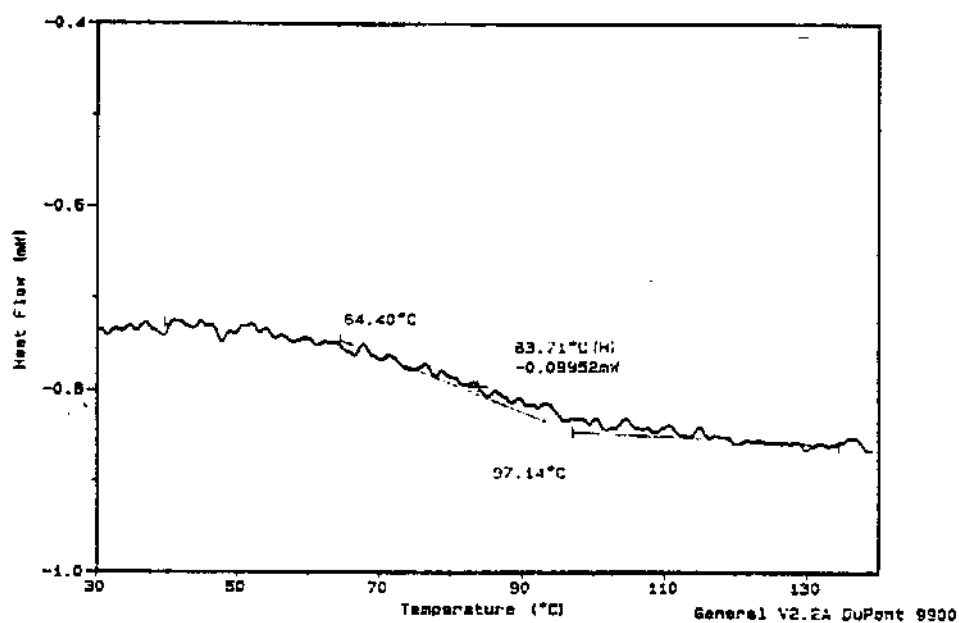


Figura 17. Termograma obtido por DSC para a crisotila. Velocidade de aquecimento de 5°C/min.

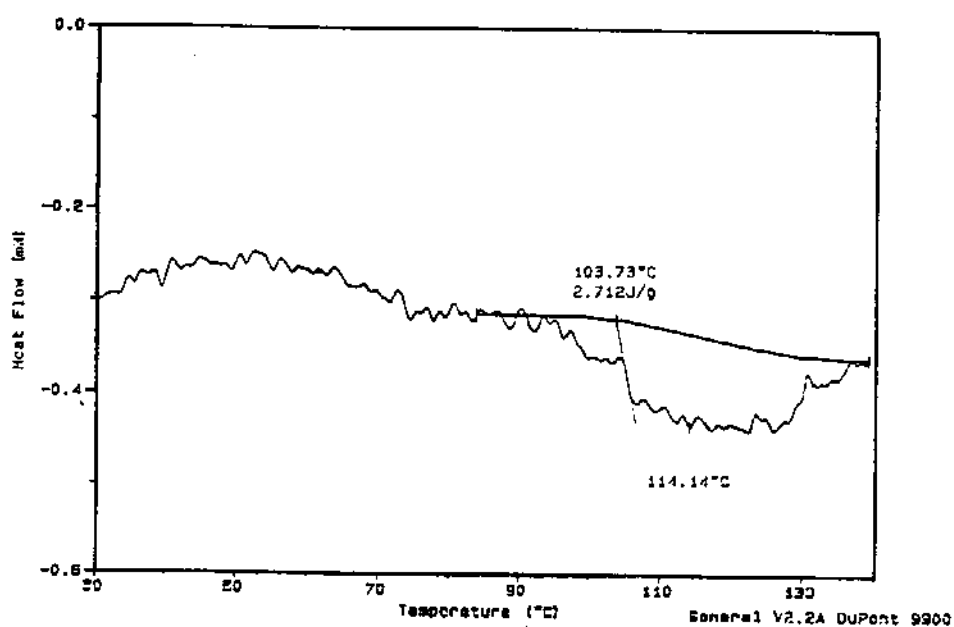


Figura 18. Termograma obtido por DSC para a crisotila/urease. Velocidade de aquecimento de 5°C/min.

5- Discussão

Neste trabalho foi utilizada crisotila com o tratamento com o tampão acético/acetato, e sem o tratamento com o tampão, conforme preparação descrita no item 3.1.1.1, com o objetivo de verificar se o tratamento estaria de alguma forma afetando a adsorção das enzimas na crisotila.

Esta idéia de utilizar a crisotila com o tratamento com o tampão acético/acetato e sem o tratamento com o tampão, vem de trabalho realizado por Parizotto ⁽⁸¹⁾ onde é estudado o grau de fibrilização da crisotila com o tratamento por ultra-som em água versus o tratamento em solução do tampão acético/acetato, onde este processo de fibrilização foi avaliado por adsorção de azul de metileno em solução. Deste trabalho foi observado que, para o mesmo tempo de exposição, ocorre um aumento na capacidade de adsorção para qualquer concentração do tampão.

No entanto, para a adsorção de urease ou do extrato solúvel de invertase em crisotila, os resultados experimentais mostraram que não há diferença na adsorção utilizando-se crisotila com ou sem o tratamento com o tampão acético/acetato. Pode-se dizer neste caso, que a adsorção destas enzimas independe do grau de fibrilização da crisotila. Talvez, isto ocorra em função da pequena quantidade de enzima em solução adicionada à crisotila, nestas condições experimentais.

5.1- Adsorção de enzimas no suporte crisotila.

5.1.1- Cinética de adsorção das enzimas em crisotila.

A cinética de adsorção da urease em crisotila apresentada na figura 4, mostra que o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio é de 1 hora, e representa que aproximadamente 73% do total da urease adicionada é adsorvida. Para o extrato solúvel de invertase, apresentado na figura 10, a adsorção em crisotila é rápida e não há alteração na adsorção com o tempo. O comportamento da cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase mostra que aproximadamente 30% do total de proteína adicionado é adsorvida.

A literatura ⁽³¹⁾ mostra que a urease adsorve rapidamente em superfícies de argila e o equilíbrio foi alcançado em 1 hora de incubação. Urease tem um alto peso molecular e sua rápida adsorção pode ser atribuída a esta característica. Pois, a adsorção de proteínas e enzimas em superfícies de argila é consideravelmente mais rápida do que substâncias orgânicas de baixo peso molecular.

Comportamento cinético semelhante ao obtido para o extrato solúvel de invertase em crisotila foi apresentado por Fischer e colaboradores ⁽⁹³⁾ que utilizaram em seu trabalho um extrato de invertase purificado obtido de levedura, para adsorção em $\text{Al}(\text{OH})_3$, obtendo uma cinética de adsorção rápida, com adsorção completa da invertase em 3 minutos. Usami e colaboradores ⁽⁹⁴⁾ também obtiveram invertase ligada em DEAE-celulose (DEAE=dietilaminoetanol), e a adesão mostrou-se praticamente invariável num tempo de contato de 5 a 60 minutos.

Este comportamento mostra que a adsorção envolve somente a superfície externa da fibra, visto que o equilíbrio entre proteína em solução e proteína adsorvida é alcançado em alguns minutos.

Em relação a crisotila, dados da literatura ⁽⁶⁶⁾ mostraram que a adsorção de soro de proteínas pela crisotila da Rodésia e do Canadá, alcançam um máximo depois de um período de contato de 60 minutos, e que a quantidade de proteína adsorvida pela crisotila rodesiana corresponde a 40% e pela crisotila canadense a 60%. Contudo, Morgan ⁽⁶⁰⁾ mostrou como resultado de adsorção de albumina sobre crisotila, uma cinética rápida atingindo o equilíbrio em 15 minutos, obtendo uma fração de albumina adsorvida da solução de aproximadamente 0,52 contrastando com as observações de Jones e colaboradores ⁽⁶⁶⁾ e os resultados obtidos neste trabalho de adsorção de urease em crisotila. Uma explicação possível para as diferenças encontradas pode ser atribuída, aos últimos, a utilização de maior concentração de crisotila nos experimentos. Com amostras completamente dispersas, tendem a ser formados géis tixotrópicos em concentrações de asbestos excedendo 10 mg/mL, particularmente com crisotila. Sob estas condições é possível que a velocidade de adsorção torne-se dependente da difusão, e portanto, leve maior tempo para alcançar o equilíbrio.

5.1.2- Adsorção das enzimas em função da massa de crisotila.

Pela adsorção das enzimas em função da massa de crisotila, obteve-se que a adsorção de urease aumenta com o aumento da massa de crisotila, mostrado na figura 5. Contudo a quantidade de urease adsorvida não é proporcional a massa de crisotila. A figura 6 também mostra que a quantidade de urease adsorvida por unidade de massa diminui. A adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila, mostrado na figura 11, mantém-se aproximadamente constante com o aumento de massa da crisotila, isto é, a quantidade de extrato solúvel de invertase adsorvida independe do aumento de massa da crisotila. O comportamento da adsorção do extrato solúvel de invertase em função da massa de crisotila mostra que aproximadamente 30% do total de proteína adicionada é adsorvida. Consequentemente, a figura 12 mostra que a quantidade do extrato solúvel de invertase adsorvido por unidade de massa diminuiu.

Portanto, se estes sistemas se comportassem como um sistema clássico, seria esperado que a quantidade de enzima adsorvida fosse proporcional à quantidade de crisotila.⁽⁹⁵⁾

Por outro lado, em se tratando de adsorção de proteínas sobre asbestos, a literatura ⁽⁶⁶⁾ mostra também que a quantidade de proteína adsorvida não é proporcional a massa de asbestos. Desai e colaboradores ⁽⁹⁶⁾ também mostraram que as concentrações de diferentes minerais, entre eles a crisotila, afetam a quantidade de proteína adsorvida. Como um exemplo, 10 mg de crisotila retém mais material proteico por unidade de massa de crisotila, do que amostras de 30 ou 50 mg. Possivelmente, quando uma pequena massa de crisotila é utilizada, deve ocorrer adsorção multicamada e este efeito deve ser reduzido ou impedido aumentando-se a concentração do mineral.

Dados da literatura ⁽³¹⁾ mostram que a adsorção de urease aumenta com o aumento da concentração de argila. Contudo, o comportamento linear entre concentração de argila e adsorção de urease foi obtido somente até 40 mg de argila por mL, e além desta concentração a porcentagem de adsorção de enzima decresce. Porém, pela maneira como os resultados foram apresentados por estes autores, não se pode estimar a quantidade real de enzima adsorvida.

Os experimentos de adsorção de urease em crisotila foram realizados utilizando-se diferentes meios aquosos, isto é, foi realizada a adsorção de urease em meio de água deionizada e em meio tampão tris/HCl pH 8,0. Para a adsorção do extrato solúvel de invertase em crisotila, utilizou-se meio de água destilada e meio tampão acético/acetato a pH 5,0, como uma tentativa de melhorar a adsorção em pH constante, pois as suspensões de crisotila variam o pH em função da massa de crisotila e do tempo de contato.⁽⁸¹⁾ Contudo, pelos resultados obtidos mostrados nas figuras 5, 6, 7, 11 e 12, o comportamento de adsorção das enzimas pela crisotila, nos diferentes meios aquosos, é semelhante.

O controle do pH é um parâmetro importante no estudo da adsorção das enzimas. Morgan ⁽⁶⁰⁾ em seu estudo de adsorção de albumina por vários minerais asbestiformes, inclusive crisotila, realizou a adsorção a pH 7,4 com tampão fosfato. Ele observou que a crisotila adsorve 10 vezes mais do que a crocidolita, e explicou pelo fato de ter trabalhado em pH 7,4, onde ambas albumina e crocidolita são carregadas negativamente, enquanto nas mesmas condições as fibras de crisotila tem uma carga líquida positiva. Porém, em estudos realizados por Valerio e colaboradores ⁽⁶⁹⁾ de adsorção de albumina e ferritina em crisotila, mostraram que não é possível generalizar tais observações. Por exemplo, ferritina apesar de ter um ponto isoelétrico próximo da albumina, mostra uma menor afinidade para a crisotila. Esta afinidade aumenta depois de lixiviar as fibras, contrário ao que é observado com albumina após tratamento análogo das fibras.

Valerio e colaboradores ⁽⁷¹⁾ também mostraram que a crisotila e a crocidolita adsorvem seletivamente algumas proteínas do soro. Estes estudos são importantes, pois baseados nestas observações eles sugeriram que a adsorção de proteínas por fibras de asbestos depende de mecanismos os quais são mais complexos do que simples interações eletrostáticas. De acordo com os resultados experimentais obtidos naquelas condições experimentais, as proteínas do soro devem ser adsorvidas no mínimo por dois mecanismos diferentes. O primeiro mecanismo é reversível, não-específico e relativamente independente da superfície e características da proteína, e a energia da ligação envolvida é relativamente fraca. O segundo mecanismo de adsorção está provavelmente correlacionado à forte interação eletrostática entre cargas das fibras e das proteínas. Neste caso as características específicas das proteínas, tais como, ponto isoelétrico, distribuição de carga, forma

molecular, e a superfície das fibras, tais como natureza dos sítios ativos, sua densidade na superfície, composição química, são obviamente importantes.

Os sistemas crisotila/enzima apresentados neste trabalho, mostraram que não há dessorção da urease adsorvida em crisotila, e apenas uma pequena dessorção do extrato solúvel de invertase adsorvida em crisotila. A magnitude de afinidade da crisotila com a enzima, quando a amostra de crisotila/enzima é lavada com água ou tampão específico, evidencia uma forte afinidade de adsorção da crisotila para a enzima. Em relação à crisotila natural, pode-se supor apenas, que a adsorção de urease em crisotila pode ocorrer através de uma ligação de hidrogênio entre um grupo amino da urease e um grupo OH da superfície externa da crisotila. Em um estudo da interação entre poli-L-lisina (PLL) e a crisotila sintética ⁽⁵⁶⁾, os autores assumiram que a adsorção de PLL ocorre principalmente através de uma ligação de hidrogênio entre um grupo amino da PLL e um grupo OH da superfície interna e externa da crisotila.

Exemplos da literatura, de desprendimento destas enzimas imobilizadas, são apresentados por Sungur e colaboradores ⁽⁹⁷⁾ no sistema urease/carboximetilcelulose-gelatina onde ocorre um pequeno desprendimento de urease, considerado desprezível pelos autores. Para a invertase imobilizada, a literatura mostra um pequeno desprendimento de invertase imobilizada em DEAE-celulose via ligação iônica ⁽⁹⁴⁾; e também um desprendimento mínimo de invertase imobilizada em gelatina fotográfica.⁽⁹⁸⁾

Portanto, a capacidade adsortiva da crisotila frente a macromoléculas pode ser interpretada como a soma de sua propriedade física (área superficial específica 18 m²/g) que em parte determina a quantidade de material adsorvido, e sua superfície química (superfície hidrofílica), a qual determina a especificidade de ligação. A crisotila também possui uma propriedade única que é muito importante em sua atividade biológica "in vivo", isto é, é composta por feixes de fibrilas similares os quais separam-se rapidamente em solução.

Os resultados obtidos mostraram também que o percentual de adsorção de urease em crisotila é maior do que o percentual de adsorção do extrato solúvel de invertase. Neste caso, a urease tem peso molecular maior. Porém, a partir destes

resultados não se pode concluir que a crisotila possui maior afinidade para adsorção em função do peso molecular das enzimas, pois somente duas enzimas foram estudadas e ainda não se tem dados suficientes para avaliar. Em relação a este tipo de correlação, afinidade de adsorção em função do peso molecular, Valerio e colaboradores ⁽⁵⁹⁾ apresentaram a adsorção específica de várias proteínas pela crisotila rodesiana, e os resultados mostraram que não há uma clara correlação entre peso molecular e adsorção específica. Estas proteínas foram escolhidas com peso molecular entre 12.500 a 400.000 g/mol.

5.1.3- Isoterma de adsorção de urease em crisotila.

A isoterma de adsorção de urease em crisotila, figura 7, mostra que não ocorre saturação, mesmo na maior concentração de urease utilizada nestas condições experimentais. A literatura ⁽³¹⁾ revela que para o sistema argila/urease, as isotermas de adsorção obtidas não mostram uma adsorção máxima, mesmo na maior concentração de urease utilizada. A literatura ⁽⁹⁹⁾ também mostra um comportamento semelhante das isotermas de adsorção de várias proteínas adsorvidas sobre esmectitas homoiônicas, principalmente para proteínas de alto peso molecular, como por exemplo, catalase de peso molecular 225.000-251.000.

É discutido na literatura ⁽³¹⁾ que vários fatores podem influenciar este comportamento. Primeiramente, na concentração de enzima utilizada, os sítios das argilas devem estar parcialmente saturados. Em segundo lugar, como também foi observado por Harter e colaboradores ⁽⁹⁹⁾ este tipo de isotermas não são verdadeiras isotermas, visto que parte da proteína adsorvida pode ser removida pela eluição com água, mostrando que uma fração de proteína está muito fracamente adsorvida na superfície das argilas.

O primeiro fator poderia ser aplicado à crisotila, se os sítios ativos da crisotila estivessem parcialmente saturados com a urease adsorvida. O segundo fator não se aplica à crisotila, pois a urease não é retirada pelas águas de lavagens. Portanto, como a urease não é retirada pelas águas de lavagens, pode-se dizer que ocorre adesão da enzima na superfície da crisotila. Pode-se até ilustrar com a definição

de adsorção ⁽¹³⁾ que é: "adsorção é a adesão de uma enzima na superfície de um suporte que não foi especificamente funcionalizado para que ocorra ligação covalente".

O raio da molécula de urease é 52 Å ⁽²⁷⁾, é uma molécula grande, de alto peso molecular 480.000 g/mol ⁽¹⁰⁰⁾, e pelos resultados obtidos das isotermas de adsorção, observa-se que não há formação de monocamada. A molécula de urease tem uma área superficial 1,5 vezes maior que a albumina, isto é, $8,5 \times 10^{-17}$ m²/molécula ou 8.500 Å², assumindo um raio de 52 Å, peso molecular de 480.000 g/mol e área de πr^2 , por ser uma proteína globular. Pelos resultados obtidos de urease adsorvida, considerando-se os pontos de maior adsorção mostrados na figura 7, que não é a condição de saturação da crisotila, a urease cobre uma área da superfície de crisotila entre 0,42-0,66 m²/g. Isto significa que aproximadamente 2,3% a 3,7 % da área superficial de crisotila foi ocupada, com base na área superficial da crisotila de 18 m²/g. Contudo, considerando-se que a área superficial específica da crisotila obtida por BET foi de 18 m²/g, que é a área superficial acessível para o N₂, é possível que quantidades maiores de uma superfície sejam acessíveis ao nitrogênio do que por exemplo, para uma molécula grande como a urease.

Por outro lado, a literatura ⁽⁶⁹⁾ mostra isotermas de adsorção de albumina e ferritina em crisotila rodesiana, atingindo a saturação numa baixa concentração de equilíbrio (aproximadamente 0,2 µmol/L). Um patamar foi a indicação que uma monocamada de proteínas foi formada sobre a superfície das fibras. Quando a Ceq da albumina foi aumentada, a adsorção desta proteína ocorreu novamente. É provável que nestas condições, novas interações ocorram entre as fibras e as proteínas. Neste caso, os autores assumem que a dimensão molecular da albumina é 5700 Å², e a área superficial coberta seria de 6 m²/g na condição de saturação. Ferritina, uma proteína esférica com um raio de 62-65 Å, cobre uma área de 12 m²/g nas mesmas condições. Esta diferença pode ser uma indicação de que a afinidade da albumina às fibras é menor do que para ferritina, nestas condições experimentais.

Para o sistema crisotila/urease, as isotermas de adsorção são mostradas na figura 7. Pode-se observar que a quantidade de enzima adsorvida aumenta com tendências diferentes, isto é, duas linhas retas com diferentes inclinações. Isto significa que até uma determinada concentração inicial de urease, 0,45 mg/mL, ocorre um

comportamento linear na adsorção. Acima desta concentração a inclinação muda, sugerindo uma mudança no comportamento de adsorção da urease em crisotila.

Este tipo de comportamento também foi observado pela adsorção de urease em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ⁽¹⁰¹⁾, e foi mostrado que a interpretação quantitativa das medidas de adsorção fornecem um método indireto para obter informações sobre a estrutura da enzima adsorvida. As isotermas de adsorção obtidas mostram que a quantidade de enzima adsorvida aumenta com diferentes inclinações, indicando que a "isoterma de adsorção" não obedece as equações de Freundlich ou Langmuir. Os autores classificam estas inclinações como dois diferentes mecanismos de adsorção, dependendo da quantidade de enzima adsorvida. Este comportamento de adsorção é explicado por um modelo, onde é suposto que a estrutura da molécula de urease desvia-se da forma esférica.

5.2- Atividade enzimática da urease imobilizada em crisotila.

A figura 8 mostra a atividade da urease livre e imobilizada em crisotila em função do tempo de reação. Deve-se observar que a quantidade de urease imobilizada, é aproximadamente 6 vezes maior do que a quantidade de urease livre utilizada. Este experimento foi realizado desta forma, pois apenas nestas condições foi possível determinar a atividade da urease imobilizada. Com quantidades menores, o método analítico não permitiu obter a atividade da urease imobilizada. Para a urease livre, foi utilizada menor quantidade pois não havia disponibilidade de enzima. Desta maneira, observou-se que a urease imobilizada, mesmo em maior quantidade do que a urease livre, apresenta uma menor atividade.

A redução na atividade da urease imobilizada em crisotila pode ser atribuída a várias razões, entre elas:

- 1) a forma como a molécula de enzima se fixa na superfície da crisotila, isto é, a molécula de enzima poderia estar fixada em mais do que um sítio ativo podendo causar uma redução completa na atividade;
- 2) pelas mudanças conformacionais da enzima que podem ocorrer durante a interação enzima/superfície sólida;
- 3) uma reduzida acessibilidade das moléculas das enzimas adsorvidas na superfície da crisotila.

Em função destas razões, a literatura ⁽¹⁰²⁾ mostra a vantagem de empregar enzimas como um caminho para a caracterização de mudanças conformacionais que ocorrem durante a interação proteína/superfície sólida. Uma mudança na conformação da molécula de enzima determinada por uma perda de atividade da enzima, foi mostrada como possível na interação da enzima com uma superfície de látex hidrofóbica, sob certas condições experimentais. Foi demonstrado que a perda de atividade da enzima pode ocorrer com a condição de que uma suficiente quantidade de tempo e área superficial sejam disponíveis para a enzima estabelecer uma conformação desenrolada. Assim, numa razão relativamente alta de área superficial/concentração inicial de proteína é observada a inativação, enquanto em razões menores as moléculas de enzima individuais são limitadas por outras moléculas de enzimas adsorvidas adjacientemente em suas formas desenroladas, e portanto ocorre a inativação delas.

Uma inativação semelhante foi mostrada por Mizutani ⁽¹⁰³⁾, quando uma enzima interage com uma superfície de vidro hidrofílica.

Este comportamento pode ser atribuído à crisotila/urease e a crisotila/extrato solúvel de invertase, onde pelos resultados obtidos dos experimentos de adsorção de urease e extrato solúvel de invertase, tem-se uma razão alta de área superficial/concentração inicial de enzima, e estas condições favoreceriam a enzima a estabelecer uma conformação desenrolada, e com isto uma consequente perda de atividade. Em relação a crisotila/urease, observa-se que em razões menores de área superficial/concentração inicial de proteína, mesmo na maior concentração de urease utilizada no experimento das isotermas de adsorção de urease em crisotila, onde não ocorre saturação da crisotila, tem-se a atividade da enzima adsorvida.

Pelos resultados obtidos de adsorção de enzimas, urease e extrato solúvel de invertase sobre crisotila, observou-se que elas ocupam uma pequena área da superfície da crisotila. Entretanto, os substratos utilizados uréia e sacarose respectivamente, são moléculas pequenas, e pode-se supor também que ocorre uma competição das moléculas do substrato para a superfície livre da crisotila, isto é, uma parte das moléculas do substrato adsorveriam na crisotila e outra parte delas encontrariam as moléculas de enzimas e então ocorreria a reação enzimática.

A literatura sobre enzimas imobilizadas mostra que diferentes métodos de imobilização e tipos de suportes apresentam diferentes resultados de atividade de enzimas imobilizadas. Para exemplificar, pode-se citar Demirel e colaboradores (104) imobilizaram urease por simples adsorção das moléculas da enzima sobre carvão ativado. Eles concluíram, para este caso, que o sistema carvão/urease adsorvida assemelha-se a soluções de enzima livre e que as cinéticas comportam-se, em geral, da mesma maneira como em solução. Como o desprendimento da enzima não pode ser evitado, qualquer enzima não-ligada comporta-se como enzima livre em solução.

Para um caso de imobilização de urease via ligação covalente em membranas de ultrafiltração (32), a atividade no sistema membrana-urease ligada foi menos do que 10% quando comparada com a atividade da urease nativa. Os autores discutem as razões para a baixa atividade aparente da urease fixada. Primeiro, uma distribuição uniforme da enzima sobre o volume de poro é duvidosa, e desta forma, uma conversão reduzida pode ocorrer porque as moléculas pequenas de uréia podem passar no poro livre de enzima. Segundo, a molécula de enzima pode estar fixada em mais do que um sítio ativo causando uma redução completa na atividade.

Outro aspecto que merece ser mencionado, contrário as expectativas convencionais, é o fato que a velocidade da reação catalisada pela urease não é diretamente proporcional à concentração da enzima. Wall e Laidler (105) atribuíram este fato a dois efeitos: 1) em baixas concentrações de urease a desativação é muito severa, enquanto 2) em altas concentrações de íons amônio produzidos pela reação, eles mesmos são inibitórios. A reação também pode ser inibida pelo substrato uréia.

A literatura mostra em trabalho realizado por Gorin e Chin (90) o estudo da quantidade de amônia formada em função do tempo de reação e da concentração de urease. Eles verificaram que a formação do produto não é proporcional com o tempo, e este efeito foi atribuído a inibição pelo produto. Para testar esta possibilidade, eles determinaram a atividade da urease na presença de várias quantidades de amônia, mostrando que a amônia sem dúvida inibe fortemente a reação. Por esta razão, a velocidade da reação poderá permanecer constante somente em baixas conversões.

A inibição por íons amônio é importante visto que estes podem agir como um irreversível veneno para a urease. A literatura (106) mostra o estudo da desativação de urease imobilizada, pelo efeito do envenenamento da urease pela amônia somente,

a qual é o produto da decomposição da uréia, apontando para um mecanismo de envenenamento onde o produto ataca a forma livre da enzima, isto é, o produto ataca a enzima (E) que não está na forma do complexo enzima-substrato (ES). O comportamento da enzima na presença combinada de uréia e amônia é complicado, visto que a enzima parece estar sendo envenenada na sua forma livre (E) e na sua forma complexada com o substrato (ES) por ambas, a uréia e a amônia.

A enzima urease é altamente sensível a traços de íons metálicos. Diferentes metais mostraram comportamentos completamente diferentes em sua capacidade de agir como inibidores de enzimas.

Hellerman e colaboradores ⁽²⁴⁾ mostraram que há 23 grupos -SH por mol de urease e a oxidação destes resulta numa inativação enzimática completa.

A eficiência relativa de vários íons metálicos, como inibidores da urease, é mostrada pela sequência: $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, com Pb^{2+} e Zn^{2+} menos do que Cu^{2+} .⁽¹⁰⁷⁾ Em trabalho recente, Krajewska ⁽¹⁰⁸⁾ estudou a inativação da urease covalentemente imobilizada em membrana de quitosana pré-tratada com glutaraldeído, por íons de metais pesados, e compara com a urease livre. A sequência de toxicidade relativa dos íons metálicos para urease livre é: $\text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, correlacionando-se bem com as constantes do produto de solubilidade dos sulfetos metálicos (exceto para o Fe^{3+}). A estabilidade da urease imobilizada em relação a inativação por metais pesados foi realizada após a imobilização, e o Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} não inativaram a urease imobilizada na escala de concentrações na qual a urease livre é completamente inativada. Os resultados mostraram que o Fe^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} não inativam a urease até a concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$. Esta proteção deve resultar no mínimo dois efeitos: 1) mudanças estruturais da enzima em decorrência da imobilização e consequentemente menor acessibilidade do íon inibidor ao grupo essencial -SH do sítio ativo da enzima; e 2) o efeito quelante do suporte. Os outros íons metálicos, Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , inativaram a urease imobilizada em concentrações consideravelmente maiores. Este estudo mostra que a imobilização de urease em quitosana protege a enzima da inativação pelos metais pesados.

Porém, em relação ao suporte utilizado neste trabalho, a crisotila possui ferro, na forma de óxido, como contaminante. Foi determinado por Comerlato ⁽⁸⁰⁾ que o

conteúdo de ferro na crisotila brasileira tratada varia de 1,4 a 1,8 mg Fe/g crisotila, e este ferro estaria ligado à matriz por substituição, ou se trata de partículas muito ocluídas no feixe de fibrilas da crisotila. A presença de ferro na crisotila sugere uma explicação, em parte, para a diminuição de atividade da urease imobilizada em crisotila, e sendo a urease uma molécula de proteína complexa, com um grande número de grupos doadores de elétrons disponíveis, seria surpreendente se a quelação não estivesse envolvida.

Todos os estudos mencionados e discutidos neste item, tem a finalidade de mostrar as possíveis causas que podem influenciar na atividade da urease imobilizada.

5.2.1.- Variação da atividade da urease e extrato solúvel de invertase imobilizadas em crisotila em função da reutilização e do tempo de estocagem.

A imobilização de enzimas geralmente decresce sua atividade inicial quando comparado a enzimas livres, o que pode ser atribuído à influência do suporte na estrutura da enzima. Enquanto enzimas livres tornam-se inativadas após alguns dias, enzimas imobilizadas preservam sua atividade durante várias semanas ou meses. Admitindo sua facilidade de manuseio, enzimas imobilizadas em suportes podem ser usadas em processos contínuos, e também podem ter múltiplos usos em sistemas de batelada.

A variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em função da sua reutilização, mostradas nas Tabelas V e VI, revelam que na reutilização da urease imobilizada há uma redução na atividade de aproximadamente 80%, tanto na reutilização realizada no mesmo dia, como na reutilização das amostras de urease imobilizada guardadas por 2 dias na geladeira. Neste caso, pode-se dizer que na reutilização, não há relação do tempo de estocagem com a redução de atividade da urease imobilizada.

Deve-se mencionar que, para a reutilização da urease imobilizada, após a sua primeira determinação de atividade, a amostra de urease imobilizada é filtrada para separá-la do meio reacional e lavada com água destilada. Desta maneira, o que

pode ocorrer é a retirada de alguma enzima que esteja fracamente aderida na superfície da crisotila, pois a lavagem neste caso é mais forte se comparada com as lavagens das amostras de crisotila/urease realizadas nos experimentos de adsorção, que foram mais brandas.

A Tabela VII mostra a variação de atividade da urease imobilizada em crisotila em relação ao tempo de estocagem, e obteve-se uma redução na atividade de aproximadamente 80%, num período de estocagem de 7 dias. Isto significa que a urease imobilizada em crisotila não mantém a estabilidade quando estocada. Neste caso, a redução na atividade da urease imobilizada que foi estocada na geladeira por 7 dias, pode ser atribuída a alta razão da área superficial/concentração inicial de enzima e também em relação ao tempo de estocagem. Desta forma, estas condições favoreceriam a enzima a estabelecer uma conformação desenrolada, e com isto uma consequente perda de atividade.

A figura 9 mostra a variação de atividade da urease imobilizada, num tempo de reação de 24 horas para cada determinação, em função do número de reutilizações. Os resultados mostraram que a atividade da urease imobilizada está relacionada com o tipo de tratamento feito na crisotila, isto é, a urease imobilizada em crisotila sem tratamento com tampão acetato apresentou os melhores resultados de atividade da enzima. Observa-se que há um decréscimo na atividade enzimática considerando o tratamento feito na crisotila. Isto significa, que embora a afinidade da enzima para a superfície da crisotila nos diferentes tratamentos seja aproximadamente a mesma, há um reflexo no subsequente comportamento do complexo enzimático. Observa-se também, que há um decréscimo de atividade da urease imobilizada com o número de reutilizações. Conforme mostra a figura 9, não foram feitos outros experimentos de reutilizações das amostras de crisotila/urease além do que é mostrado, pois os valores obtidos de atividade enzimática estão muito próximos do valor obtido para o controle, isto é, a amostra de crisotila sem urease adsorvida.

Para comparação, pode-se citar o estudo de adsorção de urease realizado por Gianfreda e colaboradores ⁽¹¹⁾ onde a atividade específica da urease imobilizada em montmorilonita e complexo montmorilonita- $\text{Al}(\text{OH})_x$ é relativamente alta (71 e 64% respectivamente), quando comparado com a enzima livre. Por outro lado a atividade específica da urease adsorvida em hidróxido de alumínio (15%) foi

consideravelmente reduzida. Foi mostrado também que cobrindo as superfícies de montmorilonita com diferentes quantidades de espécies de OH-Al reduz a quantidade bem como a atividade da enzima adsorvida, mostrando que modificações na superfície do suporte, alteram a quantidade de enzima adsorvida, bem como a sua atividade. Neste trabalho, não é estudado a reutilização da urease imobilizada.

Em trabalho realizado por Krajewska e colaboradores ⁽¹⁰⁹⁾ de urease imobilizada via ligação covalente em membranas de quitosana pré-tratadas com glutaraldeído, foi mostrado que a urease imobilizada perde atividade depois de 9 ciclos de reutilização. A secagem da membrana depois de cada utilização, acelera consideravelmente o processo de decréscimo da atividade.

Com referência a reutilização de enzimas imobilizadas há um estudo de urease imobilizada por adsorção em óxido de titânio com tamanho de poro controlado ⁽³⁰⁾, e foi obtido que a meia-vida da urease adsorvida é de 10 dias.

Por outro lado, a urease imobilizada num sistema carboximetilcelulose-gelatina ⁽⁹⁷⁾, mostra uma atividade relativa (%) em relação a urease livre de 40% a 20% e não há diferença na atividade relativa da enzima imobilizada entre a primeira e a vigésima utilização, tornando este sistema viável devido ao baixo custo do suporte e alto número de reutilizações.

Um outro exemplo da literatura ⁽¹¹⁰⁾ utiliza urease imobilizada em géis de gelatina-poliacrilamida, e mostra uma atividade máxima na ordem de 75% e 80% que foi obtido no início dos experimentos de reutilizações, e foi observado que após 20 reutilizações a atividade relativa decresce para 30% e 71%, conforme a razão de poliacrilamida/gelatina. Os autores consideram que esta perda de atividade pode ser atribuída à mudanças estruturais na enzima durante a imobilização e o possível decréscimo da velocidade de reação devido ao aumento na concentração do produto entre os poros.

A variação de atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado em crisotila em função da reutilização e tempo de estocagem, são mostrados na figura 13. Os resultados mostram uma maior atividade para amostras com menor massa de crisotila e quantidade de proteína imobilizada. Isto evidencia a influência do suporte na atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado. Também, ocorre uma redução na atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado quando as amostras são

reutilizadas e com o tempo de estocagem. Comparando-se a atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado com a atividade do extrato solúvel de invertase livre, embora estejam em quantidades de proteína diferentes, observa-se uma redução na atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado. Em termos de atividade relativa (%) das amostras de crisotila/extrato solúvel de invertase mostradas na figura 13, representam 34,5% (amostras b) e 19% (amostras c), quando comparadas com a atividade do extrato solúvel de invertase livre.

Recentemente, Gianfreda e colaboradores ⁽¹¹¹⁾ mostraram que quando moléculas de invertase são adicionadas diretamente em montmorilonitas e adsorvidas, ocorre uma redução significativa de atividade da enzima (4,2-12% da atividade específica da invertase livre).

Para comparação com os experimentos de reutilização de invertase imobilizada, a literatura ⁽⁹⁸⁾ mostra filmes de poliéster cobertos com gelatina fotográfica contendo invertase imobilizada e foi obtido uma atividade relativa (%) menor para a invertase imobilizada, podendo ser reutilizada muitas vezes sem perda de atividade nas reutilizações.

Resumindo, os resultados obtidos neste trabalho referentes a atividade da urease e extrato solúvel de invertase imobilizados em crisotila, observa-se que a atividade específica do extrato solúvel de invertase adsorvido em crisotila representa 34,5%-19% quando comparado com a enzima livre, calculado a partir da figura 13; e a atividade específica da urease imobilizada em crisotila representa de 4%-1% quando comparado com a urease livre. As diferenças na atividade das enzimas são difíceis de explicar, mas é possível que diferentes mecanismos de adsorção estejam envolvidos com as enzimas e a crisotila. Em relação a reutilização, os resultados mostraram que ambas enzimas imobilizadas em crisotila podem ser reutilizadas. Concluindo, o sistema crisotila/enzima utilizado neste trabalho, é comparável com outros sistemas suporte/enzima e com os diferentes métodos de imobilização relatados na literatura.

6- Conclusões

A crisotila adsorve as enzimas urease e extrato solúvel de invertase. O procedimento proposto para a imobilização de enzimas em crisotila é simples e eficiente. Estas enzimas imobilizadas em crisotila mantêm uma certa atividade enzimática, e uma característica importante é que elas podem ser reutilizadas.

- Adsorção de enzimas pela crisotila.

Os estudos de cinética de adsorção da urease em crisotila mostram que o tempo mínimo necessário para que se atinja o equilíbrio é de 1 hora; e a cinética de adsorção do extrato solúvel de invertase é rápida, e num tempo de 5 minutos o equilíbrio já foi atingido.

A quantidade de urease adsorvida aumenta ligeiramente com o aumento de massa da crisotila. Contudo, a quantidade de urease adsorvida por unidade de massa diminui, o que mostra que o sistema crisotila/urease não se comporta como um sistema clássico de adsorção. A adsorção de urease pela crisotila nos diferentes meios aquosos utilizados, tanto para urease em meio de água deionizada como para urease em meio tampão tris/HCl pH 8,0, mostra o mesmo comportamento na adsorção. É importante salientar, que não há dessorção da urease imobilizada em crisotila.

A quantidade do extrato solúvel de invertase adsorvido varia pouco com o aumento de massa da crisotila. Contudo, a quantidade do extrato solúvel de invertase adsorvido por unidade de massa diminui até permanecer constante, o que mostra também, que o sistema crisotila/invertase não se comporta como um sistema clássico de adsorção. Observa-se o mesmo comportamento de adsorção utilizando-se crisotila com os diferentes tratamentos, isto é, crisotila com o tratamento com o tampão acético/acetato e sem o tratamento com o tampão. É importante salientar, que há apenas uma pequena dessorção do extrato solúvel de invertase adsorvido na crisotila.

A isoterma de adsorção de urease em crisotila mostra que não há saturação mesmo na maior concentração de urease utilizada; e mostra um comportamento linear da quantidade de urease adsorvida, o que significa que a quantidade de urease adsorvida é uma função da concentração da urease adicionada.

Observa-se também, o mesmo comportamento de adsorção utilizando-se os diferentes meios aquosos, água deionizada e tris/HCl pH 8,0.

- Atividade enzimática das enzimas imobilizadas em crisotila.

Ambas as enzimas imobilizadas apresentaram atividade. A atividade específica da urease imobilizada representa 4%-1% quando comparado com a urease livre; e a atividade específica do extrato solúvel de invertase imobilizado representa 34,5%-19% quando comparado com a enzima livre.

A reutilização da crisotila/urease apresenta uma redução na atividade de aproximadamente 80%, tanto para a reutilização imediata bem como para a reutilização após 2 dias.

A urease imobilizada na crisotila sem tratamento com tampão acetato apresentou uma maior atividade, que corresponde a aproximadamente 1,5 vezes e 3 vezes maior, quando comparado com a atividade da urease imobilizada em crisotila com tratamento com o tampão acetato e com urease em meio tampão tris/HCl pH 8,0, imobilizada em crisotila sem tratamento com o tampão acetato, respectivamente. Nas reutilizações destas amostras de crisotila/urease, para todos os casos, ocorre redução na atividade da urease adsorvida em crisotila.

Quanto a estabilidade da urease imobilizada em crisotila, em relação ao tempo de estocagem, foi mostrado que num período de estocagem de 7 dias há uma redução na atividade da urease imobilizada de aproximadamente 80%.

Pela determinação da atividade do extrato solúvel de invertase imobilizado em crisotila, obteve-se que a atividade diminui com o número de reutilizações e com o tempo de estocagem.

7- Bibliografia

- 1) Stryer, L. _ Bioquímica- 3ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1992.
- 2) Chibata, I. - Immobilized Enzymes. Research and Developement- John Wiley & Sons, New York, 1978, Cap.1.
- 3) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry - Editado por Gerhartz, W.- Vol A9, 5ª edição, VHC Verlagsgesellschaft, República Federal da Alemanha, 1987.
- 4) Bullock, C.- Immobilized Enzymes-Educ.Chem. - 26, 179, 1989.
- 5) Fatibello F., O. e Capelato, M.D.- Biossensores - Química Nova - 15, 28, 1992.
- 6) Tor, R. e Freeman, A.- New Enzyme Membrane for Enzyme Electrodes.- Anal.Chem.- 58, 1042, 1988.
- 7) Monshipouri, M. e Neufeld, R.J.- Activity and Distribution of Urease Following Microencapsulation within Polyamide Membranes.- Enzyme Microb.Technol. - 13, 309, 1991.
- 8) Mansfeld, J.; Schellenger, A. e Rombach, J.- Application of Polystyrene-Bound Invertase to Continuous Sucrose Hydrolysis on Pilot Scale. - Biotechnol.Bioeng. - 40, 997, 1992.
- 9) Godbole, S.S.; Kubal, B.S. e D'Souza, S.F. - Hydrolysis of Concentrated Sucrose Syrups by Invertase Immobilized on Anion Exchanger Waste Cotton Thread.- Enzyme Microb.Technol. - 12, 214, 1990.
- 10) Barker, S.A. e Kay, I. - Principles of Immobilized-Enzyme Technology- Em: Handbook of Enzyme Biotechnology.- Ed. Wiseman, A. - John Wiley & Sons Inc., New York, 1975.

- 11) Gianfreda, L.; Rao, M.A. e Violante, A. - Adsorption, Activity and Kinetic Properties of Urease on Montmorillonite, Aluminium Hydroxide and $\text{Al}(\text{OH})_x$ - Montmorillonite Complexes.- Soil Biol.Biochem. - 24, 51, 1992.
- 12) McLaren, A.D. e Estermann, E.F. - The Adsorption and Reactions of Enzymes and Proteins on Kaolinite. III. The Isolation of Enzyme-Substrate Complexes. - Arch.Biochem.Biophys. - 61, 158, 1956.
- 13) Messing, R.A. - Adsorption and Inorganic Bridge Formations.- Em: Methods in Enzymology - Editado por Mosbach, K. - Vol XLIV, Academic Press, New York, 1976, p.149.
- 14) Shaw, W.H.R. e Bordeaux, J.J. - The Decomposition of Urea in Aqueous Media.- J.Am.Chem.Soc. - 77, 4729, 1955.
- 15) Warner, R.C. - The Kinetics of the Hydrolysis of Urea and of Arginine -J.Biol.Chem. -142, 705, 1942.
- 16) Shaw, W.H.R. e Walker, D.G. - Kinetic Studies of Thiourea Derivatives. IV. The Methylated Thioureas. Conclusions.- J.Am.Chem.Soc. - 80, 5337, 1958.
- 17) Blakeley, R.L.; Treston, A.; Andrews, R.K. e Zerner, B. - Nickel (II) - Promoted Ethanolysis and Hydrolysis of N-(2-Pyridylmethyl)urea. A Model for Urease. - J.Am.Chem.Soc. - 104, 612, 1982.
- 18) Blakeley, R.L.; Hinds, J.A.; Kunze, H.E.; Webb, E.C. e Zerner, B. - Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a Carbamoyl-Transfer Reaction and Inhibition by Hydroxamic Acids.- Biochemistry - 8, 1991, 1969.
- 19) Sumner, J.B. - The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease.- J.Biol.Chem. - 69, 435, 1926.

- 20) Sumner, J.B.; Hand, D.B. e Holloway, R.G. - Studies of the Intermediate Products Formed During the Hydrolysis of Urea by Urease.- J.Biol.Chem. - 91, 333, 1931.
- 21) Wang, J.H. e Tarr, D.A.- On the Mechanism of Urease Action.- J.Am.Chem.Soc. - 77, 6205, 1955.
- 22) Jencks, N.P.- Infrared Measurements in Aqueous Media- Em: Methods in Enzymology- Editado por Colowick, S.P. - Vol.VI, Academic Press, New York, 1963.
- 23) Blakeley, R.L. e Zerner, B.- Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme.- J.Mol.Catal. - 23, 263, 1984.
- 24) Hellerman, L.; Chinard, F.P. e Deitz, V.R. - Protein Sulfhydryl Groups and the Reversible Inactivation of the Enzyme Urease.- J.Biol.Chem. - 147, 443, 1943.
- 25) Sumner, J.B.; Gralen, N. e Eriksson-Quensel, I.-B.- The Molecular Weight of Urease.- J.Biol.Chem. - 125, 37, 1938.
- 26) Dixon, N.E.; Hinds, J.A.; Fihelly, A.K.; Gazzola, C.; Winzor, D.J.; Blakeley, R.L. e Zerner, B. - Jack bean urease (EC 3.5.1.5) . IV. The Molecular Size and the Mechanism of Inhibition by Hydroxamic Acids. Spectrophotometric Titration of Enzymes with Reversible Inhibitors.- Can.J.Biochem. - 58, 1323, 1980.
- 27) Kallury, K.M.R.; Lee, W.E. e Thompson, M.- Enhancement of the Thermal and Storage Stability of Urease by Covalent Attachment to Phospholipid- Bound Silica.- Anal.Chem. - 64, 1062, 1992.
- 28) Solich, P.; Polasek, M. e Karlicek, R. - Spectrophotometric Flow-Injection Determination of Urea in Body Fluids by Using an Immobilized Urease Reactor. - Anal.Chim.Acta. - 218, 151, 1989.

- 29)** Yugari, Y.; Minamoto, Y.; Komiya, K.; Mitsugi, K. e Mimura, N. - Immobilization of Enzyme on PMG and Its Application to the Urea Monitoring Apparatus.- Em: Enzyme Engineering. Editado por Brown, G.B. - Vol.4- Plenum Press, New York, 1978, p.223.
- 30)** Messing, R.A.- A Stannous Bridge for Coupling Urease to Controlled Pore Titanium. - Biotechnol.Bioeng. - 16, 1419, 1974.
- 31)** Tarafdar, J.C. e Chhomkar, P.K.- Urease Clay Interactions: I- Adsorption of Urease on Clays Saturated with Different Cations.- J.Indian Soc.Soil Sci. - 30, 27, 1982.
- 32)** Schmidt-Steffen, A. e Staude, E.- Ultrafiltration Membranes for Chemical Bonding of Urease.- Biotechnol.Bioeng. - 39, 725, 1992.
- 33)** Brennan, J.D.; Kallury, K.M.R. e Krull, U.J.- Transduction of the Reaction Between Urea and Covalently Immobilized Urease by Fluorescent Amphiphilic Membranes.- Thin Solid Films - 244, 898, 1994.
- 34)** Bowski, L.; Saini, R.; Ryu, D.Y. e Vieth, W.R. - Kinetic Modeling of the Hydrolysis of Sucrose by Invertase.- Biotechnol.Bioeng. - 13, 641, 1971.
- 35)** Stefuca, V.; Gemeiner, P.; Kurillová, L.; Danielsson, B. e Báles, V. - Application of the Enzyme Thermistor to the Direct Estimation of Intrinsic Kinetics Using the Saccharose-Immobilized Invertase System.- Enzyme Microb.Technol. - 12, 830, 1990.
- 36)** Laidler, K.J. - The Chemical Kinetics of Enzyme Action.- 1ª edição, Oxford University Press, England, 1958.
- 37)** Sato, M.; Ozawa, S. e Ogino, Y. - Effects of Pressure on the Sucrose Inversion over an Immobilized Invertase Catalyst.- J.Phys.Chem. - 91, 5755, 1987.
- 38)** Wiseman, A.- New and Modified Invertases- and their Applications.- Em: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology.- Editado por Wiseman, A., Vol.3, John Wiley & Sons, New York, 1979, p.267.

- 39) Pollard, E.; Powell, W.F. e Reaume, S.H.- The Physical Inactivation of Invertase.- Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. - 38, 173, 1952.
- 40) Maske, M.; Strauß, A. e Kirstein, D.- Enzyme Thermistor Analysis of Kinetics and Stability of Immobilized Invertase.- Anal.Lett. - 26, 1613, 1993.
- 41) Boudrant, J. e Cheftel, C. - Continuous Hydrolysis of Sucrose by Invertase Adsorbed in a Tubular Reactor. - Biotechnol.Bioeng. - 17, 827, 1975.
- 42) Kotzelski, J.; Staude, E. e Ulbricht, M.- Transport and Reaction Behavior of Invertase Ultrafiltration Membranes Made from Substituted Polysulfone. - J.Membr.Sci. - 64, 173, 1991.
- 43) Docolomansky, P.; Gemeiner, P.; Mislovicova, D.; Stefuca, V. e Danielsson, B. - Screening of Concanavalin A - Bead Cellulose Conjugates Using an Enzyme Thermistor with Immobilized Invertase as the Report Catalyst.- Biotechnol.Bioeng. - 43, 286, 1994.
- 44) Gaze, R.- The Physical and Molecular Structure of Asbestos.- Ann. N.Y.Acad.Sci. - 132, 23, 1965.
- 45) Speil, S. e Leineweber, J.P.- Asbestos Minerals in Modern Technology - Environ.Res. - 2, 166, 1969.
- 46) Souza Santos, P. - Tecnologia de Argilas - Vol.2, Edgard Blucher, São Paulo, 1975, Cap.31.
- 47) Whittaker, E.J.W.- Chrysotile Fibers - Filled or Hollow Tubes? - Chem.Eng.News - p.34, 30 de dezembro de 1963.
- 48) Turkevich, J.e Hillier, J.- Electron Microscopy of Colloidal Systems - Anal.Chem. - 21, 475, 1949.

- 49) Yada, K. - Study of Chrysotile Asbestos by a High Resolution Electron Microscope. - Acta Crystallogr. - 23, 704, 1967.
- 50) Pundsack, F.L. - The Properties of Asbestos. II. The Density and Structure of Chrysotile. - J.Phys.Chem. - 60, 361, 1956.
- 51) Nauman, A.W. e Drescher, W.H. - The Influence of Sample Texture on Chrysotile Dehydroxylation - Am.Mineral. - 51, 1200, 1966.
- 52) Jolicoeur, C.; Roberge, P. e Fortier, J-L.- Separation of Shorts Fibers from Bulk Chrysotile Asbestos Fiber Materials: Analysis and Physico-Chemical Characterization - Can.J.Chem. - 59, 1140, 1981.
- 53) Sinclair, W.E. - Asbestos- Its Origin, Production and Utilization - Mining Publications Ltd, London, 1959.
- 54) Pundsack, F.L.- The Properties of Asbestos. I. The Colloidal and Surface Chemistry of Chrysotile - J.Phys.Chem. - 59, 892, 1955.
- 55) Uchiyama, H.; Kaneko, k. e Ozeki, S.- Stepwise NO Chemisorption Processes on Synthetic Chrysotile Asbestos: Tubular Crystals with Acidic and Basic Surfaces.- J.Chem.Soc. Faraday Trans. - 85, 3833, 1989.
- 56) Ozeki, S.; Oowaki, Y. e Kaneko, K.- Interaction Between Poly-L-Lysine and Synthetic Chrysotile Asbestos. - Colloids Surf. - 37, 329, 1989.
- 57) Martinez, E. e Zucker, G.L.- Asbestos Ore Body Minerals Studied by Zeta Potential Measurements. - J.Phys.Chem. - 64, 924, 1960.
- 58) Bonneau, L.; Suquet, H. e Pezerat, H.- Studies on Surface Properties of Asbestos. I - Active Sites on Surface of Chrysotile and Amphiboles - Environ.Res. - 41, 251, 1986.

- 59) Valerio, F.; Balducci, D. e Lazzarotto, A.- Adsorption of Proteins by Chrysotile and Crocidolite: Role of Molecular Weight and Charge Density.- Environ.Res. - 44, 312, 1987.
- 60) Morgan, A. - Adsorption of Human Serum Albumin by Asbestiform Minerals and Its Application to the Measurement of Surface Areas of Dispersed Samples of Chrysotile.- Environ.Res. - 7, 330, 1974.
- 61) Harington, J.S.; Allison, A.C. e Badami, D.V.- Mineral Fibers: Chemical, Physicochemical and Biological Properties. - Adv.Pharmacol.Chemother. - 12, 291-402, 1975.
- 62) Craighead, J.E. - Asbestos-associated Diseases - Arch.Pathol.Lab.Med. - 106, 544-596, 1982.
- 63) Craighead, J.E.; Mossman, B.T. e Bradley, B.J.- Comparative Studies on the Cytotoxicity of Amphibole and Serpentine Asbestos.- Environ.Health Perspect. - 34, 37, 1980.
- 64) Daniel, F.B.- In Vitro Assessment of Asbestos Genotoxicity. - Environ. Health Perspect. - 53, 163, 1983.
- 65) Valerio, F.; De Ferrari, M.; Ottaggio, L.; Repetto, E. e Santi, L. - Chromosomal Aberrations Induced by Chrysotile and Crocidolite in Human Lymphocytes in vitro. - Mutat.Res. - 122, 397, 1983.
- 66) Jones, B.M.; Edwards, J.H. e Wagner, J.C.- Absorption of Serum Proteins by Inorganic Dusts.- Brit.J.Industr.Med. - 29, 287, 1972.
- 67) Governa, M. e Vadala, C.R. - Histochemical Demonstration of Hematoidin in the Innermost Layers of Human Asbestos Body Coating.- Int.Arch.Arbeitsmed. - 30, 273, 1972.

- 68) Morgan, A.; Davies, P.; Wagner, J.C.; Berry, G. e Holmes, A.- The Biological Effects of Magnesium-leached Chrysotile Asbestos.- *Brit.J.Exp.Pathol* - 58, 465, 1977.
- 69) Valerio, F.; Veggi, M. e Santi, L.- Adsorption Isotherms of Albumin and Ferritin on Rhodesian Chrysotile. Effects of Magnesium Depletion.- *Environ.Res.* - 21, 186, 1980.
- 70) Blount, M.; Holt, P.F. e Leach, A.A.- The Protein Coating of Asbestos Bodies.- *Biochem.J.* - 101, 204, 1966.
- 71) Valerio, F.; Balducci, D. e Scarabelli, L.- Selective Adsorption of Serum Proteins by Chrysotile and Crocidolite.- *Environ.Res.* - 41, 432, 1986.
- 72) Jaurand, M-C.; Baillif, P.; Thomassin, J-H.; Magne, L. e Touray, J-C.- X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Chemical Study of the Adsorption of Biological Molecules on Chrysotile Asbestos Surface.- *J.Colloid Interface Sci.* - 95, 1, 1983.
- 73) Mackenzie, K.J.D. e Meinhold, R.H. - A Glass-Bonded Ceramic Material from Chrysotile (white asbestos). - *J.Mater.Sci.* - 29, 2775, 1994.
- 74) Suslova, T.B.; Cheremisina, Z.P. e Korkina, L.G.- Free Radical Generation during Interaction of Chrysotile Asbestos with Natural Compounds.- *Environ.Res.* - 66, 222, 1994.
- 75) Langer, A.M. e Nolan, R.P.- Chrysotile: Its Occurrence and Properties as Variables Controlling Biological Effects. - *Ann.occup.Hyg.* - 38, 427, 1994.
- 76) The Asbestos Institute Newsletter. - Thresholds of Risk. - Dr. Kevin Browne - Montreal (Quebec) - Canadá- March/July 1994.
- 77) Mishunin, I.F.; Basirova, I.N.; Vishnevskii, V.B. e Semenyuk, N.I.- Methods of Preparing Immobilized Proteolytic Enzyme Preparations - 1981- USSR 810,720. appud Chem.Abst. 94: P204553h.

- 78) Amotz, S.; Rugh, S.; Markussen, E.K. e Thomsen, K. - Particulate Immobilized Enzymes - 1984- Ger.Offen. DE 3,336,235. appud Chem.Abst. 101: P68471p.
- 79) Kalal, J. e Tlustakova, M.- Support Material for Immobilization of Biologically Active Substances- 1978- Ger.Offen. 2,750,595. appud Chem.Abstr. 89:P193189n.
- 80) Comerlato, M.H. - *Obtenção e Caracterização de Filtros de Profundidade de Crisotilas Brasileiras* - Tese de Mestrado - Instituto de Química - UNICAMP- 1989.
- 81) Parizotto, O. - *Crisotilas Naturais Brasileiras: Ativação da Superfície e Aplicação na Imobilização de Biocatalisadores*. - Tese de Mestrado - Instituto de Química- UNICAMP - 1989.
- 82) Joekes, I.; Comerlato, M.H.; Parizotto,O.; Pedroso, P.R.; Moran,P.J.S.; Rodrigues, J.A.R. e De Carvalho, M.- Proc. INPI 8.903.8449 de 01/08/89.- Processo de Preparação de Crisotilas de Alta Superfície Específica e Crisotila Obtida.
- 83) Canizares, E.M.P.N. - Estudo de Adsorção de Espécies Quirais em Crisotila Brasileira.- Tese de Mestrado - Instituto de Química- UNICAMP - 1993.
- 84) Giongo, C.V.T. - Estudo da Deposição de TiO_2 sobre Crisotila Brasileira.- Tese de Mestrado - Instituto de Química- UNICAMP - 1995.
- 85) Parizotto, O.- Crisotilas Brasileiras: Caracterização dos Sítios Superficiais por Cromatografia Inversa, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia no Infravermelho.- Tese de Doutorado - Instituto de Química - UNICAMP- 1995
- 86) Zuchetti, R.A.M. - Crisotila Brasileira como Suporte de Catalisadores. Aplicação na Oxidação de Álcoois com Radiação de Microondas. - Tese de Doutorado - Instituto de Química - 1994.
- 87) Naumann, A.W. e Drescher, W.H. - The Morphology of Chrysotile Asbestos as Inferred from Nitrogen Adsorption Data.- Am.Mineral. - 51, 711, 1966.

- 88) Draetta, I.S. e Park, Y.K.- Estudo das Propriedades de Cinética de Invertases Solúvel e Insolúvel.- Revista Brasileira de Tecnologia. - 4, 199,1973.
- 89) Manual de Técnicas para el Estudio de las Membranas Biológicas.- Elaborado por Maria Del Carmen Bertran N. - Estudo de Doutorado- 1987.
- 90) Gorin, G. e Chin, C. - Urease VI. A New Method of Assay and the Specific Enzymic Activity.- Anal.Biochem. - 17, 49, 1966.
- 91) Kistiakowski, G.B. e Shaw, W.H.R. - Ureolytic Activity of Urease at pH 8.9.- J.Am.Chem.Soc. - 75, 2751, 1953.
- 92) Battistel, E.; Bianchi, D. e Rialdi, G.- Thermodynamics of Immobilized Ribonuclease A.- Pure Appl.Chem. - 63, 1483, 1991.
- 93) Fischer, E.H. e Kohtès, L. - Purification de l'invertase de Levure. - Helv.Chim.Acta. - 34, 1123, 1951.
- 94) Usami, S.; Noda, J. e Goto, K. - Preparation and Properties of Water-Insoluble Saccharase.- J.Ferment.Technol. - 49, 598, 1971.
- 95) Nagy, M. - The Close Analogy Between the Preferential Solvation of Polymers in Mixed Solvents and Adsorption from Liquid Mixtures at Solid/Liquid Interfaces.- Langmuir - 4, 93, 1988.
- 96) Desai, R. e Richards, R.J. - The Adsorption of Biological Macromolecules by Mineral Dusts.- Environ.Res. - 16, 449, 1978.
- 97) Sungur, S.; Elçin, M. e Akbulut, U.- Immobilization of Urease into Carboxymethylcellulose-Gelatine System.- Macromol.Rep. - A29, 251, 1992.

- 98) Akbulut, U.; Sungur, S. e Pekyardimci, S.- Polyester Film Strips Coated with Photographic Gelatin Containing Immobilized Invertase.- Macromol.Rep. - A28, 239, 1991.
- 99) Harter, R.D. e Stotzky, G.- Formation of Clay-Protein Complexes. - Soil Sci.Soc.Amer.Proc. - 35, 383, 1971.
- 100) Fishbein, W.N.; Nagarajan, K. e Scurzi, W. - Urease Catalysis and Structure.- J.Biol.Chem. - 245, 5985, 1970.
- 101) Grunwald, P.; Gunsser, W.; Heiker, F.R. e Roy, W.- Immobilization Technique as a Possible Method for Determination of Enzyme Structures, Applied to the System Urease/Aluminium Hydroxide.- Anal.Biochem. - 100, 54, 1979.
- 102) Sandwick, R.K. e Schray, K.J.- The Inactivation of Enzymes upon Interaction with a Hydrophobic Latex Surface.- J.Colloid Interface Sci. - 115, 130, 1987.
- 103) Mizutani, T.- Decreased Activity of Proteins Adsorbed onto Glass Surfaces with Porous Glass as a Reference.- J.Pharm.Sci. - 69, 279, 1980.
- 104) Demirel, G.; Akovali, G.; Tanyolac, A. e Hasirci, N.- A Comparative Study of the Performance of Solid Supported and Soluble Urease for the Enzymatic Hydrolysis of Urea- J.Chem.Tech.Biotechnol. - 55, 319, 1992.
- 105) Wall, M.C. e Laidler, K.J.- The Molecular Kinetics of the Urea-Urease System. IV. The Reaction in an Inert Buffer.- Arch.Biochem.Biophys. - 43, 299, 1953b.
- 106) Vasudevan, P.T.; Ruggiano, L. e Weiland, R.H.- Studies on the Deactivation of Immobilized Urease. - Biotechnol.Bioeng. - 35, 1145, 1990.
- 107) Shaw, W.H.R. - The Inhibition of Urease by Various Metal Ions.- J.Am.Chem.Soc. - 76, 2160, 1954.

- 108)** Krajewska, B.- Urease Immobilized on Chitosan Membrane. Inactivation by Heavy Metal Ions.- J.Chem.Tech.Biotechnol. - 52, 157, 1991.
- 109)** Krajewska, B.; Leszko, M. e Zaborska, W.- Urease Immobilized on Chitosan Membrane: Preparation and Properties.- J.Chem.Tech.Biotechnol. - 48,337, 1990.
- 110)** Elçin, M.; Sungur, S. e Akbulut, U.- Urease Immobilization into Poly(acrylamide)-Gelatin Gels.- Bioorg.Med.Chem.Lett. - 2, 433, 1992.
- 111)** Gianfreda, L.; Rao, M.A. e Violante, A.- Invertase (β -Fructosidase): Effects of Montmorillonite, Al-Hydroxide and Al(OH)_x - Montmorillonite Complex on Activity and Kinetic Properties.- Soil Biol.Biochem. - 23, 581, 1991.