

34.072720



BR0343048

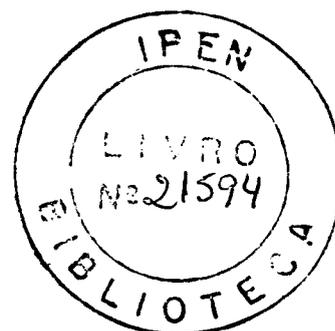
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA OBTENÇÃO DE
SUPORTES POLIMÉRICOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS
COM POTENCIAL DE USO CLÍNICO**

ANDREA CECILIA DORIÓN RODAS

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear

Orientadora:
Dra. Olga Zazuco Higa



SÃO PAULO

1997

UTILIZAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA OBTENÇÃO DE SUPORTES POLIMÉRICOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS COM POTENCIAL DE USO CLÍNICO

Andrea Cecilia Dorión Rodas

RESUMO

No desenvolvimento de polímeros com atividade biológica, estudou-se a enxertia do monômero ácido acrílico (AA) em suportes de polietileno (PE) e polipropileno (PP) na forma de grânulos, pela técnica da irradiação simultânea. Neste estudo foi verificado o efeito da taxa de dose, dose total de irradiação e concentração do monômero. O PP teve um rendimento maior na taxa de dose de 0,25kGy/h e o PE em taxas de dose menores. Doses de irradiação de 8 a 10kGy foram suficientes para obtenção dos graus de enxertia mais elevados e a concentração de AA de 40% v/v, foi a mais adequada. O enxerto de poli (ácido acrílico) foi modificado quimicamente para a imobilização de duas enzimas, a glicose oxidase e a urease. Para ambas as enzimas, foi observado que conforme se aumentou o grau de enxertia dos grânulos, aumentou-se a quantidade de enzima nos suportes. Para a enzima glicose oxidase observou-se que a melhor atividade ocorreu na imobilização em suportes de PP-g-AA com grau de enxertia em torno de 2%. Foram determinados os perfis de pH e temperatura ótimos, o K_m e a $V_{máx}$. da enzima livre e imobilizada. Os suportes enxertados com AA não se mostraram adequados para a imobilização química da urease.

UTILIZATION OF IONIZING RADIATION TO OBTENTION OF POLYMERIC SUPPORTS FOR THE ENZYME IMMOBILIZATION WITH CLINICAL POTENTIAL USE

Andrea Cecilia Dori3n Rodas

ABSTRACT

In the development of polymers with biological activity, it was studied the grafting of acrylic acid monomer onto polyethylene (PE) and polypropylene (PP) pellets by mutual radiation grafting technique. The effect of dose rate, irradiation total dose, and monomer concentration were studied. With the PP pellets the best grafting yield occurred at dose rate of 0.25kGy/h and with the PE pellets the dose rate was lower. The irradiation dose from 8 to 10 kGy was sufficient to obtain the highest grafting degree, and the AA concentration of 40% v/v was suitable. The graft of poly (acrylic acid) was chemically modified for the immobilization of two enzymes, the glucose oxidase and the urease. For both enzymes the increasing of grafting degree onto the pellets, increased the enzyme immobilization yield. The immobilized glucose oxidase showed the best activity when immobilized onto PP-g-AA supports with grafting degree around 2%. The optimum pH and temperature profiles, and the K_m and V_{max} for free and immobilized enzyme were determined. The supports grafted with AA were not suitable for the chemical immobilization of urease.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Olga Zazuco Higa, pela orientação.

Ao IPEN pela oportunidade da realização desta Dissertação.

Ao Dr. Mario Carezza, por suas sugestões.

À bolsista de Iniciação científica Mônica Taoda, que colaborou para obtenção dos resultados experimentais.

À Elizabeth S.R. Somessari e Carlos G. Silveira, pela realização das irradiações.

Ao Celso Vieira de Moraes, pela obtenção das micrografias por MEV.

À Msc. Flavia Martellini, pela ajuda na discussão dos resultados e sua amizade.

Ao Eric, Stella, Lucimary, Yasko, João Ezequiel, Mauro, Ieda, Márcia, Maria Aparecida, Míriam e Luís Lobo, pela amizade dedicada.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Agradeço em especial aos meus pais
Fernando e Estela, que me deram apoio em
todas as minhas escolhas.*

*A Frank Ferrer Sene agradeço por seu
companheirismo e dedicação, mas
principalmente, por seu amor...*

*Dedico esta Dissertação a todos que
contribuíram de forma direta ou indireta
para a realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. ASPECTOS GERAIS.....	05
2.1. Copolimerização por enxertia.....	05
2.1.1 Fenômenos que ocorrem durante o processo de enxertia.....	06
2.1.1.1. Formação de radicais livres aprisionados	07
2.1.1.2. Efeito do oxigênio na geração dos radicais.....	07
2.1.1.3. Efeito da taxa de dose.....	09
2.1.1.4. Efeito da transferência de cadeia.....	10
2.1.1.5. Etapa de terminação.....	11
2.1.2.6. Efeito da difusão.....	12
2.1.2. Técnicas de enxertia.....	13
2.1.2.1. Técnica da preirradiação.....	14
2.1.2.2. Técnica da peroxidação.....	15
2.1.2.3. Técnica de enxertia por irradiação simultânea.....	16
2.1.3. Efeito da radiação nos sistemas estudados.....	18
2.2. Imobilização de enzimas.....	20
2.2.1. Imobilização por inclusão.....	22
2.2.1.1. Inclusão em matriz.....	22
2.2.1.2. Inclusão em microcápsula.....	22
2.2.2. Fixação sobre suporte sólido.....	23
2.2.2.1. Fixação por adsorção ou ligação iônica.....	24
2.2.2.2. Fixação por ligação covalente.....	24
2.2.3. Propriedades das enzimas imobilizadas.....	26
2.2.3.1. Medida da atividade.....	26
2.2.3.2. Influência das condições operatórias.....	28

2.2.3.3. Influência do microambiente.....	28
2.2.3.3.1. pH ótimo de ação das enzimas imobilizadas.....	28
2.2.3.3.2. Constante de Michaelis - Menten: Km.....	29
2.2.3.3.3. Impedimento estérico.....	36
2.2.4. <i>Glicose oxidase</i> [E.C. 1.13.4].....	36
2.2.5. <i>Urease</i> [E.C. 3.5.1.5].....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Procedimentos para enxertia do ácido acrílico em grânulos de polietileno e polipropileno.....	40
3.1.1. Determinação da taxa de dose.....	41
3.1.2. Determinação da dose de irradiação.....	42
3.1.3. Determinação da concentração do ácido acrílico.....	42
3.1.4. Caracterização da superfície enxertada.....	43
3.1.4.1. Análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
3.1.4.2. Hidrofilicidade.....	44
3.2. Ativação dos grânulos de PE-g-AA e PP-g-AA e imobilização da glicose oxidase.....	44
3.3. Procedimentos para determinação da atividade da enzima glicose oxidase.....	47
3.3.1. Medida da atividade da glicose oxidase pelo método da <i>o</i> -dianisidina.....	48
3.3.1.1. Glicose oxidase livre.....	48
3.3.1.2. Glicose oxidase imobilizada.....	48
3.3.2. Testes das propriedades da glicose oxidase.....	49
3.3.2.1. Curva de calibração da glicose.....	49
3.3.2.2. Efeito da enxertia do suporte.....	49
3.3.2.3. Estabilidade da enzima imobilizada com a reutilização e armazenamento.....	50
3.3.2.4. Atividade enzimática em diferentes pHs.....	51
3.3.2.5. Atividade enzimática em diferentes temperaturas.....	52
3.3.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da glicose oxidase.....	53
3.4. Procedimentos para determinação da atividade da enzima urease.....	53
3.4.1. Atividade da urease pelo método de Berthelot.....	55

3.4.1.1. Urease livre.....	55
3.4.1.2. Urease imobilizada.....	56
3.4.2. Teste das propriedades da urease imobilizada.....	56
3.4.2.1. Curva de calibração da uréia.....	56
3.4.2.2. Efeito da enxertia do suporte.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. Enxertia do ácido acrílico em grânulos de polietileno e polipropileno.....	57
4.1.1. Efeito da taxa de dose.....	57
4.1.2. Efeito da dose de irradiação.....	61
4.1.3. Efeito da concentração do monômero.....	64
4.1.4. Caracterização da superfície enxertada.....	66
4.1.4.1. Análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	66
4.1.4.2. Hidrofilicidade.....	70
4.2. Determinações sobre a glicose oxidase.....	71
4.2.1. Curva de calibração de glicose pelo método da <i>o</i> -dianisidina com a glicose oxidase.....	71
4.2.2. Efeito da enxertia do suporte na glicose oxidase imobilizada.....	73
4.2.3. Estabilidade da glicose oxidase imobilizada.....	75
4.2.4. Efeito do pH na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada.....	78
4.2.5. Efeito da temperatura na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada.....	80
4.2.6. Valores da constante de Km e V _{máx}	81
4.3. Determinações sobre a urease.....	83
4.3.1. Curva de calibração da uréia pelo método de Berthelot.....	83
4.3.2. Determinação do efeito da enxertia do suporte na urease imobilizada.....	84
4.4. Comentários gerais.....	85
5. CONCLUSÃO.....	86
6. REFERÊNCIAS.....	87

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Os sistemas poliméricos estão disponíveis em uma infinidade de composições e propriedades e como são facilmente preparados em diversas formas e estruturas, eles podem ser convenientemente usados com o propósito de obtenção de biomateriais.[1]

Em 1986, com o propósito de definir termos utilizados nos materiais de aplicação biomédica, foi realizada a Conferência Consensual da Sociedade Européia de Biomateriais, que definiu Biomaterial como um material não vivo usado como dispositivo biomédico que se pretende interagir com sistemas biológicos [2].

Os biomateriais poliméricos obtidos por radiação têm características de ampla aplicação, pois podem ser desenvolvidos sob várias condições, tais como, temperaturas altas e baixas; pressões altas e baixas; fases viscosas e sólidas; fases complexadas e heterogêneas; e taxas de dose altas e baixas. Baseado nestas características, uma reação química e uma moldagem, uma síntese e uma fabricação podem ser realizadas ao mesmo tempo por uma irradiação. Em adição a esta vantagem, uma imobilização de componente biofuncional no material pode ser executado simultaneamente com a reação e fabricação. Como exemplo, uma mistura de monômero e um componente biofuncional pode ser moldado e polimerizado pela radiação em um produto biofuncional de forma pré - estabelecida [3].

A copolimerização por enxerto ou enxertia, é uma modificação química de polímeros, envolvendo a formação nesses polímeros, de cadeias ramificadas constituídas de monômeros de outro tipo, resultando na formação de um copolímero de enxerto [4]. A enxertia é um dos métodos promissores de modificação de vários polímeros e materiais poliméricos para obtenção de biomaterial.

Na aplicação da química das radiações em sistemas poliméricos de uso biomédico, podemos ter duas abordagens [1]:

a) Modificação de materiais poliméricos para imobilização de biocomponentes e para utilização em equipamentos de uso médico.

b) Síntese de géis poliméricos (hidrogéis) usados como suporte para imobilização de espécies biologicamente ativas, assim como para sistema de liberação controlada de drogas.

Exemplos das espécies que podem ser imobilizadas são mostrados na Tabela 1 [5].

Tabela 1. Aplicação de biomoléculas imobilizadas

Espécie imobilizada	Aplicação
enzimas	<ul style="list-style-type: none"> •agentes terapêuticos •biossensores •órgãos artificiais •biorreatores •separadores
anticorpos e antígenos	<ul style="list-style-type: none"> •imunodiagnósticos •sistema controlado de drogas •biossensores de diagnósticos •separadores
agentes anti - trombogênicos	<ul style="list-style-type: none"> •superfícies compatíveis com o sangue
drogas	<ul style="list-style-type: none"> •sistema controlado de drogas •estudo do mecanismo de drogas (pesquisa do receptor)
neurotransmissores e hormônios	<ul style="list-style-type: none"> •biossensores
células e organelas	<ul style="list-style-type: none"> •biorreatores •órgãos artificiais •biossensores
aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> •síntese de peptídeos
DNA	<ul style="list-style-type: none"> •análises de prova de DNA

As enzimas como biocatalizadores tem alta eficiência e especificidade biológica que geralmente funcionam na forma solúvel. As enzimas são difíceis e

caras de isolar a formas razoavelmente puras e seu uso em processos industriais é restrito, porque uma vez usadas, elas não são recuperadas convenientemente. Para superar estas limitações, várias técnicas tem sido usadas para manter as enzimas insolubilizadas na água, como a imobilização em polímeros inertes [6].

A imobilização de biocatalisadores sobre diferentes suportes tem sido objeto de muitos estudos [7, 8, 9, 10]. A seleção do suporte depende do potencial do uso desse sistema e da enzima a ser imobilizada. Há um grande interesse no uso de copolímeros de enxerto como suportes para imobilização através de ligação covalente de compostos biológicos. Com esses substratos copoliméricos é possível o desenvolvimento de possíveis sistemas não somente com as características físicas e químicas desejadas, mas também com grupos ativos convenientes para o acoplamento do composto biológico [11, 12, 13]. Estes grupos ativos podem ser do tipo amina, carboxila e hidroxila, os quais podem ser subsequentemente modificados [14, 15].

As enzimas imobilizadas são altamente aproveitáveis em sistemas analíticos nos quais os produtos de reação podem ser detectados diretamente. Técnicas tais como potenciometria, polarografia e microcalorimetria são frequentemente escolhidos na exploração dos benefícios das enzimas imobilizadas. Enzimas imobilizadas nas paredes internas de tubos plásticos são convenientes no uso de sistemas de fluxo contínuo e, em membranas podem fazer parte de eletrodos enzimáticos, comumente conhecidos como biossensores [16].

A atividade da enzima está ligada à manutenção da integridade de sua conformação terciária, em particular do seu sítio ativo. Os processos de imobilização devem, por conseguinte, fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando a estrutura nativa da proteína, as ligações criadas entre o suporte e a enzima, excluindo os aminoácidos implicados diretamente na reação catalítica [6].

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de suportes poliméricos por meio da radiação ionizante para a imobilização de enzimas com potencial de uso clínico, como a urease e a glicose oxidase.

Os suportes poliméricos selecionados para este trabalho foram grânulos de polietileno (PE) e polipropileno (PP) por suas características mecânicas, propriedades inertes e disponíveis comercialmente a baixo custo. Para gerar grupamentos carboxílicos na superfície dos grânulos de PE e PP foi escolhido o monômero vinílico ácido acrílico (AA), o qual foi enxertado pela técnica da irradiação simultânea. Para tanto foram estudados:

- taxa de dose de irradiação a uma dose fixa;
- dose de irradiação a uma taxa de dose fixa;
- concentração do monômero AA.

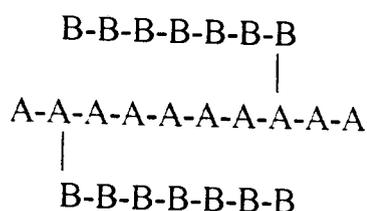
Após a preparação dos copolímeros de enxerto, as enzimas foram neles imobilizadas por meio de acoplamento químico. As enzimas imobilizadas foram estudadas quanto a:

- estabilidade sob armazenamento e reutilização;
- atividade frente a mudança de pH;
- atividade frente a mudança de temperatura;
- determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx.}$)

CAPÍTULO 2 - ASPECTOS GERAIS

2.1. COPOLIMERIZAÇÃO POR ENXERTIA

Um *copolímero de enxerto* é um polímero cuja molécula é composta de duas ou mais partes poliméricas quimicamente diferentes. De acordo com esta definição, um copolímero de enxerto pode ser considerado como resultado de uma combinação química de duas macromoléculas quimicamente diferentes. Esquemáticamente a estrutura de um copolímero de enxerto A_pB_q pode ser representado da seguinte maneira:



Onde A é o polímero de cadeia principal e B a cadeia polimérica ramificada [17].

A síntese de copolímeros de enxerto é baseada na produção de um ou mais “sítios ativos” na cadeia principal do polímero original (A). Unidades do monômero B são então adicionadas sucessivamente a cada “sítio ativo” produzindo cadeias longas de B que se estendem a partir do polímero principal, como mostrado no esquema acima. Embora nem sempre o caso, o “sítio ativo” é mais comumente o local onde um elétron não emparelhado existe no radical livre, e a este lugar o monômero B é adicionado sequencialmente por um mecanismo de adição para produzir uma cadeia lateral de unidades B [18].

Uma das razões pela qual os copolímeros de enxerto são interessantes para os químicos de polímeros, é que um filme ou fibra de uma cadeia enxertada na superfície com ramos de um monômero, podem aumentar a repelência à água, a capacidade de tingimento, a resistência a solventes, a resistência à luz, a resistência a fungos, etc. Frequentemente o enxerto de um monômero na superfície de um polímero, ou dentro do polímero até uma certa profundidade, produz mudanças significativas nas propriedades físicas do polímero [18].

A copolimerização por enxertia pode ser iniciada por vários métodos, por exemplo, radiação de alta energia (raios gama e feixe de elétrons), tratamento de plasma, radiação de luz ultra violeta, decomposição de iniciadores químicos e oxidação de polímeros [19], sendo que todos estes métodos ocorrem essencialmente por mecanismos de radical livre.

Os métodos radioquímicos para obtenção de copolímeros de enxerto são geralmente fáceis e simples de serem empregados do que os métodos químicos convencionais. O fato que tem sido apontado é que devido a absorção não seletiva da radiação pela matéria, é possível (a princípio) combinar qualquer par de monômero/polímero por esta técnica. A reação de enxertia ocorre não somente na superfície do polímero, mas onde o monômero penetra o polímero, podendo ocorrer profundamente no interior dele [18].

2.1.1. FENÔMENOS QUE OCORREM DURANTE O PROCESSO DE ENXERTIA

Alguns fenômenos particulares da enxertia radiolítica verificados nas observações experimentais de alguns pesquisadores serão discutidos a seguir: geração e preservação de radicais livres no substrato polimérico; o efeito do

oxigênio na geração de radicais: a dependência da enxertia com a taxa de dose: a importância da transferência de cadeia. o aumento da enxertia quando a terminação é bloqueada; e a limitação da enxertia algumas vezes causada pela baixa difusão do monômero no substrato polimérico[17, 18].

2.1.1.1. Formação de radicais livres aprisionados

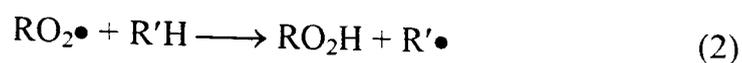
A iniciação da enxertia depende da eficiência da produção de radicais aprisionados formados nos vários polímeros sob diferentes condições de irradiação. Na maioria dos casos a concentração de radicais no polímero aumenta com o incremento da dose, mas alcança um valor máximo após um tempo e não aumenta mais com o incremento da dose. Conseqüentemente, existe uma ótima dose para cada sistema que somente pode ser determinada experimentalmente [18].

2.1.1.2. Efeito do oxigênio na geração de radicais

A irradiação de um polímero na presença do oxigênio geralmente resulta na produção de polímeros peroxidados.



Tal radical peróxido pode permanecer aprisionado no polímero. A extensão do tempo de permanência depende da não recombinação do estado físico do polímero, da temperatura, da taxa de dose, e da dose total, de uma forma complexa. Um radical peróxido pode desaparecer através da abstração de hidrogênio,



ou os dois radicais podem combinar-se com perda do oxigênio



A abstração de hidrogênio (reação 2) e a recombinação (reação 3) são competitivos entre si. Quando a abstração de hidrogênio predomina, os produtos principais são hidroperóxidos. Quando a recombinação é a reação principal, os principais produtos formados são peróxidos.

A reação 2 requer uma certa energia de ativação e conseqüentemente irá ocorrer a altas temperaturas e em polímeros contendo hidrogênios de carbonos terciários (lábeis). A reação 3 predominará a baixas temperaturas e em polímeros lineares que não contenham hidrogênio de carbono terciário [18].

Diferenças importantes entre polímeros contendo peróxidos ou hidroperóxidos são evidenciadas quando os polímeros são utilizados para iniciar a copolimerização de enxerto. A decomposição térmica de um peróxido polimérico, ROOR, produz dois radicais poliméricos, RO•, que na presença de um monômero leva à produção de duas ramificações enxertadas. Sob aquecimento brando similar, um hidroperóxido polimérico, ROOH, formará uma ramificação enxertada e uma molécula de homopolímero iniciada pelo radical OH•. A diferença pode ser observada pela comparação da reação de enxertia iniciada pela peroxidação por radiação de polietileno (PE) e polipropileno (PP). O PE contém peróxidos que são estáveis à temperatura ambiente e retém a capacidade de iniciar a copolimerização de enxertia por períodos de 1 ano ou mais [18]. Também, quando usado para iniciar a copolimerização de enxertia, o PE produz somente pouca quantidade de homopolímero. Por outro lado, PP que tenha sido irradiado no ar inicia a enxertia à temperatura ambiente, acompanhado por uma produção relativamente alta da quantidade de homopolímero. Entretanto pode ser notado que o PP é mais facilmente peroxidado a baixas doses de irradiação que o PE, sugerindo que os

hidroperóxidos formados no PP por meio de reações de cadeia envolvem abstração de hidrogênio de carbono terciário (reação 2) [18].

2.1.1.3. Efeito da taxa de dose

Este efeito pode ser melhor discutido em duas partes: 1) efeito da dose e taxa de dose no método direto de enxertia e 2) efeito da dose e taxa de dose no enxerto de polímeros peroxidados.

No método direto de enxertia, o número de ramificações formadas e sua extensão são influenciados pela dose e taxa de dose, respectivamente. O número de radicais formados (número de ramificações) é determinado diretamente pela dose absorvida e o valor de G_R (rendimento de radicais), que é o número de radicais formados por 100eV absorvidos. A taxa de dose, que evidentemente determina a velocidade de iniciação da polimerização, poderá entretanto afetar a cinética da extensão da cadeia e conseqüentemente, o comprimento da ramificação enxertada. O comprimento das ramificações também dependem da concentração do monômero, temperatura da reação, e a viscosidade do meio de reação [18].

Na preparação de polímeros peroxidados para iniciação da enxertia, a concentração de peróxidos poliméricos aumentará com a dose de irradiação. A baixas doses de irradiação, a concentração dos peróxidos aumenta linearmente com a dose. A doses muito altas, um estado de equilíbrio pode ser alcançado no qual a taxa de formação de peróxidos equivale a sua taxa de desaparecimento [18].

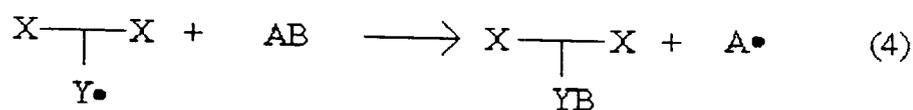
Considerando que o número de sítios com radicais peróxidos nos polímeros determina o número de ramificações, estas podem ser reguladas pelo controle da quantidade da dose de preirradiação. Além disso, se a enxertia é conduzida a certa temperatura, a concentração de peróxidos determina a taxa de iniciação da

polimerização e conseqüentemente, influencia o comprimento da ramificação enxertada. Portanto, no método de enxertia por peroxidação, a dose de preirradiação afeta tanto o número como o comprimento das ramificações enxertadas. Além, do mais, o comprimento das ramificações é influenciado pela concentração do monômero e a temperatura de reação.

O efeito da taxa de dose no rendimento da peroxidação não pode ser previsto sem uma detalhada determinação dos mecanismos da reação. Por exemplo, se o fornecimento de oxigênio é limitado por sua baixa velocidade de difusão no polímero, altas taxas de dose podem causar exaustão do oxigênio dentro do polímero e conseqüentemente favorecer outras reações como ligações cruzadas e degradação.

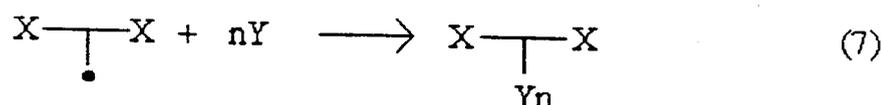
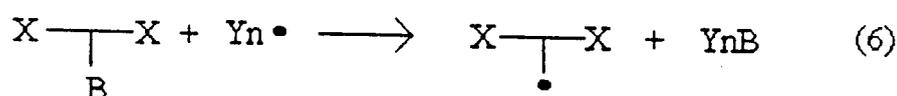
2.1.1.4. Efeito da transferência de cadeia

Se o monômero ou o solvente tem uma alta constante de transferência, o homopolímero adicional pode ser produzido através da transferência para o monômero ou solvente como se indica a seguir:



Aqui AB é o monômero, ou solvente, ou qualquer substância adicionada de rápida transferência. As reações 4 e 5 evidentemente irão diminuir a eficiência da enxertia.

Contudo, se a transferência de cadeia ocorre principalmente em direção ao polímero, cada radical polimérico formará várias ramificações enxertadas. Esta reação diminui o comprimento das ramificações enxertadas, mas não alteram a produção do enxerto. Em termos mais gerais, quando qualquer monômero é polimerizado na presença de um polímero, a transferência de cadeia para o polímero dará lugar a alguma extensão e isto levará à formação de um copolímero de enxerto como abaixo:

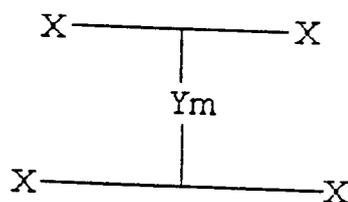


Assim, um processo pode aumentar consideravelmente a eficiência da enxertia em toda sua extensão, especialmente se o polímero tem uma alta constante de transferência com respeito ao monômero Y. Esta transferência para o polímero pode ser favorecida em alguns sistemas pelo incremento da temperatura [18].

2.1.1.5. Etapa de terminação

Muitas copolimerizações de enxertia tem lugar num meio de reação de alta viscosidade. Por causa dessa alta viscosidade, a etapa de terminação (combinação do radical) pode ser dificultada ou tornar-se impossível. Portanto, muitas cadeias em crescimento permanecem inacabadas e ficam “aprisionadas” ao fim do processo de enxertia. Comportamento similar é característica de alguns monômeros que exibem o “efeito gel” em sua polimerização [18].

Pode-se mencionar que uma possível reação cruzada do substrato polimérico original pode ser causada pela ação da etapa de terminação. Por exemplo, se a terminação da polimerização do monômero Y ocorre através da combinação de dois crescimentos de cadeias, o copolímero de enxerto final poderá conter moléculas nas quais duas ou mais cadeias de polímero X_n são ligadas por uma cadeia do polímero Y_m .



Assim, um processo pode levar a uma cadeia tridimensional de alta conversão no qual todas as cadeias de X são reticuladas pelas cadeias de Y. Isto pode ser especialmente verdadeiro se Y ser um monômero polifuncional.

Em tais reações a formação de reticulação pode ser evitada pelo uso de um agente transferidor adequado. O comprimento dos radicais enxertados dependerão da concentração do agente transferidor. Tal técnica levará a uma intensificação da formação do homopolímero através das reações (4) e (5).

2.1.1.6. Efeito da difusão

Um fator muito importante mencionado pela maioria dos pesquisadores neste campo é a possível diminuição da velocidade da reação de enxertia devido à lentidão da difusão do monômero nos polímeros sólidos [18].

Os fatores que podem causar diminuição da difusão ou limitar a taxa de enxertia são os seguintes:

- 1-baixa constante de difusão intrínseca no filme polimérico sólido.
- 2-baixa temperatura (causando diminuição na constante de difusão).
- 3-alta taxa de enxertia intrínseca,
- 4-alta taxa de dose (causando alta velocidade de enxertia)

Os fatores 3 e 4 causam rápido consumo de monômero com o filme, enquanto que os fatores 1 e 2 limitam a velocidade com a qual o monômero pode chegar no filme.

Por outro lado, pode-se maximizar a velocidade de difusão do monômero no filme e minimizar a taxa de consumo do monômero com o filme, levando-se à eliminação do efeito de difusão na taxa de enxertia, ajustando-se os seguintes fatores:

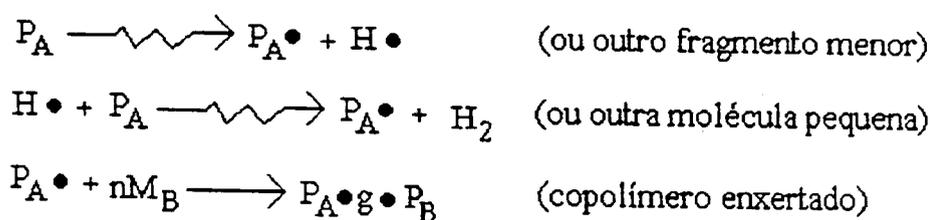
- 1-alta constante de difusão intrínseca no filme polimérico sólido,
- 2-alta temperatura (causando aumento na constante de difusão),
- 3-baixa taxa de enxertia intrínseca,
- 4-baixa taxa de dose (causando diminuição na velocidade de enxertia).

2.1.2. TÉCNICAS DE ENXERTIA

Baseando-se nos fenômenos que ocorrem durante o processo de enxertia, forma então determinados três técnicas principais para obtenção de copolímeros de enxerto [12, 14, 20]. São elas: técnica da preirradiação, técnica da peroxidação e técnica da irradiação simultânea.

2.1.2.1. Técnica da preirradiação

Nesta técnica o polímero de cadeia principal, P_A , é irradiado na ausência de oxigênio (ar) antes da exposição ao monômero M_B que pode estar na forma de líquido ou vapor. Se o polímero é semicristalino ou está abaixo da temperatura de transição vítrea, os radicais formados pela radiação podem permanecer aprisionados e capazes de reagir com o monômero para formar uma cadeia lateral enxertada. A reação pode ser expressa como a seguir:



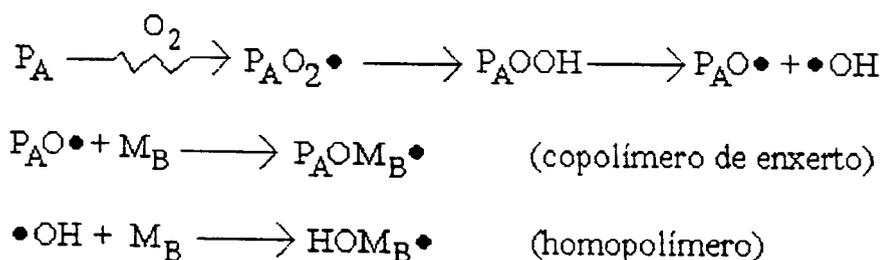
O monômero M_B geralmente necessita a inclusão de um agente intumecedor para facilitar sua difusão no polímero P_A .

Uma vantagem desta técnica é que um elétron acelerado pode ser usado para o passo da radiação e a alimentação do substrato irradiado como uma linha de operação direta ao monômero. Isto tem sido demonstrado em projetos pilotos, notadamente com polietileno como P_A e ácido acrílico como M_B . O polietileno tem tido enxertia significativa em filme e na forma de pó. Uma segunda vantagem é que virtualmente qualquer reativo vinílico ou monômero dieno podem ser enxertados, ao contrário da técnica simultânea. Por outro lado, o substrato polimérico pode ser capaz de reter os radicais por um tempo suficientemente longo para possibilitar uma eficiente reação de enxertia. Pode ser notado que uma vez que o substrato polimérico é removido do campo de radiação, os radicais aprisionados começam então a diminuir por recombinação [14].

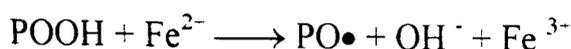
Uma desvantagem desta técnica é que, diferentemente da técnica simultânea não há proteção do polímero pelo monômero ou agente intumescedor. Isto pode levar à degradação, reticulação ou outras mudanças no polímero. Com a maioria dos sistemas de enxertia, entretanto, isto não foi provado ser o maior obstáculo. A segunda desvantagem é que o processo é muito sensível à presença do ar. Isto pode tornar-se vantajoso se os peróxidos resultantes forem usados para iniciar a enxertia [14].

2.1.2.2. Técnica da peroxidação

Aqui o polímero é irradiado na presença do ar para produzir principalmente hidroperóxidos. Estes polímeros peroxidados, que são em geral completamente estáveis podem ser decompostos no contato com monômeros para produzir copolímeros enxertados. Se os hidroperóxidos são as principais espécies, o radical hidroxila formado levará à homopolimerização. As reações podem ser descritas como a seguir:



Se o radical peróxido inicial reage simultaneamente, são produzidos peróxidos P-OO-P. Estes são geralmente mais estáveis mas não levam ao homopolímero. Se um agente redutor é adicionado ao monômero (por exemplo o Fe^{2+}), o homopolímero é mínimo devido a reações do tipo:



Pode ser visto que a técnica da peroxidação também é um processo de preirradiação com similares vantagens e desvantagens. Ela pode ser adaptada à irradiação por feixe de elétrons. Entretanto, a degradação do polímero pode ser consideravelmente pronunciada na presença do ar. Por outro lado, esta técnica anula a necessidade de um gás inerte durante a radiação.

Uma conciliação entre as duas técnicas é uma irradiação no ar e usar uma combinação de radicais aprisionados e peróxidos para iniciar a enxertia por si só. Isto normalmente envolveria um aumento da temperatura, mas com a técnica de preirradiação, pode geralmente ser levada a temperatura ambiente.

2.1.2.3. Técnica de enxertia por irradiação simultânea

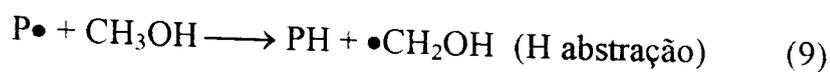
Neste procedimento, a matriz polimérica principal (P_A) é irradiada conjuntamente em contato com o monômero (M_B) o qual pode estar presente como vapor, líquido ou em solução. A irradiação pode ter lugar no ar ou, muito melhor, numa atmosfera inerte e levar diretamente à formação de radicais livres ativos em ambos, polímero P_A e monômero M_B , resultando num copolímero enxertado. Esta é a técnica mais eficiente de enxertia desde que os radicais possam reagir tão rápido quanto são produzidos, entretanto, pode ser apreciado um aumento do homopolímero. Espécies iônicas podem também iniciar a enxertia via técnica simultânea e podem ser propostos mecanismos análogos às equações envolvendo intermediários iônicos positivos ou negativos. As reações relevantes envolvidas são as seguintes:

2.1.3. EFEITO DA RADIAÇÃO NOS SISTEMAS ESTUDADOS

Na irradiação de polietileno (PE) e polipropileno (PP) tem sido observado a formação de macrorradicais secundários e terciários, promovidos pelos raios gama, os quais são gerados pela abstração de hidrogênio no substrato polimérico. Sua concentração relativa depende de sua estabilidade (terciário > secundário) e população (secundário > terciário), sendo que os radicais terciários predominam no PP [21] e os secundários no PE [22]. Embora os radicais produzidos no PP sejam mais estáveis que os do PE, pelo alto valor de G_R (rendimento de radicais) do PE, este apresentará um maior rendimento de enxertia [23].

A enxertia por radiação de monômeros vinílicos (grupo químico ao qual pertence o ácido acrílico (AA)) sobre polietileno e polipropileno ocorre exclusivamente por abstração de hidrogênio. Este método de enxertia por radical livre produz materiais que são de difícil caracterização e contêm várias quantidades de homopolímero e fração gel [24].

As reações de transferência de cadeia são um processo muito importante em todas as copolimerizações por enxertia. Desta forma, se o monômero, ou qualquer substância adicionada, tem uma alta constante de transferência de cadeia, uma quantidade adicional de homopolímero será formada, via transferência de cadeia, no crescimento dos ramos pelo monômero, ou da substância adicionada, de acordo com a seguinte reação, em que se tem como exemplo, o metanol:



Aqui $P\bullet$ representa o radical do substrato formado durante a irradiação e M denota o monômero. Quando a reação (8) acontece, a copolimerização de enxerto desejada será obtida; entretanto, no caso da reação (9) o substrato abstrai átomos de H do álcool e produz $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$, que por sua vez, pode levar a formação do homopolímero em vez do copolímero de enxerto [25].

Quando o poli(ácido acrílico) é exposto à radiação de alta energia no vácuo, o tamanho do polímero aumenta e reações de reticulação começam a predominar. Com o desenvolvimento da estrutura de rede, o polímero originalmente solúvel em certos solventes, passa a ser insolúvel [26, 27], neste ponto, a viscosidade do meio reacional aumenta e o monômero apresenta o chamado "efeito gel".

A homopolimerização pode ser causa de sérios problemas na enxertia usando a técnica simultânea. O rendimento do enxerto será fortemente limitado pela homopolimerização [23]

Quando o valor do G_R do monômero é apreciavelmente maior que o do substrato polimérico, a eficiência de rendimento da enxertia é seriamente comprometida quando é usada a técnica da irradiação simultânea [28].

Existem alguns métodos para superar este problema. O emprego de íons metálicos como Fe^{3+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} , que são conhecidos como inibidores da polimerização por radicais livres e extremamente eficientes na enxertia do AA no PE pela técnica da irradiação simultânea [23, 29, 30].

Os primeiros trabalhos de copolimerização por enxertia do AA em politetrafluoretileno (PTFE) mostraram que o sulfato férrico amoniacal (sal de Mohr) diminuiu muito a homopolimerização [31]. Este efeito também foi confirmado quando a homopolimerização foi reduzida durante a enxertia de ácido acrílico (AA) e ácido metacrílico (MAA) [32].

O mecanismo de ação desses inibidores é explicado nos trabalhos de Huglin [28] e Gargan [30] que demonstraram que o cátion metálico desativa ambos os processos: a reação de homopolimerização e a formação de copolímero de enxerto.

Em nosso trabalho de enxertia do AA em PE e PP foi utilizado o sulfato de cobre como inibidor da homopolimerização.

2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Muito antes das técnicas de imobilização serem conhecidas tais como são, o uso da catálise enzimática já estava presente, mesmo em processos de larga escala. Aproximadamente em 1815, foi descoberto por meios puramente empíricos, que o vinagre podia ser eficientemente produzido deixando-se escorrer uma solução contendo álcool sobre aparas de madeira. É claro, não foi imaginado que este procedimento produzia o ácido acético das bactérias aderidas às aparas, que equivale a uma imobilização efetiva. O desenvolvimento de um método, de início puramente empírico, não é de todo incomum em biotecnologia. De fato, muitos procedimentos microbianos, tais como a produção de bebidas alcoólicas, pão e queijo azedo, foram praticados bem antes de serem conhecidos os microorganismos envolvidos [33]

No começo de 1916 foi registrado por Nelson e Griffin [34] que o carvão ativado retinha a capacidade de quebrar a sacarose, após seu contato com espuma de invertase e subsequente lavagem. Este é o primeiro artigo publicado de imobilização enzimática. Contudo, não lhe foi dada atenção do ponto de vista de imobilização, até depois da II Guerra Mundial, quando mais estudos na ligação de enzimas apareceram. Em 1948, Sumner [35] relatou a imobilização da urease por tratamento com álcool e sal comum. Isto foi seguido por poucas publicações durante os anos

50, no qual Grubhofer e Schleith [36], assim como Manecke [37] e outros, foram capazes de demonstrar que polímeros sintéticos de atividade específica podiam ser usados para ligação de proteínas fisiologicamente ativas [33].

Em 1971, foi realizada em Henniker (USA) a primeira conferência de Engenharia Enzimática, que definiu uma classificação das enzimas imobilizadas de acordo com o modo de fixação escolhido, conforme mostrado na Fig. 1 [6, 33, 38].

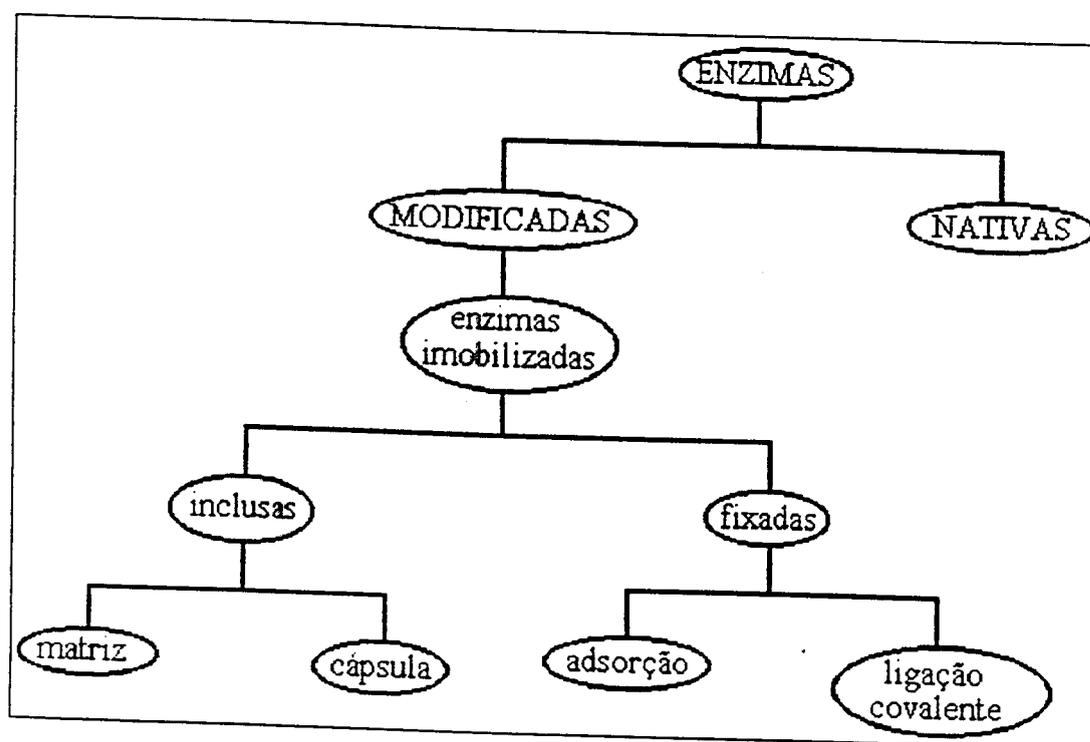


Figura 1. Classificação das enzimas imobilizadas

Entre outras normalizações, foi recomendado o termo “enzima imobilizada”. Anteriormente a isto, um número de diferentes nomes tais como “fixada”, “insolubilizada”, “ligada a matriz”, etc, foram usados no lugar de “imobilizada” [6].

2.2.1. IMOBILIZAÇÃO POR INCLUSÃO

As moléculas de enzimas ficam retidas na rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionado no interior de microcápsulas delimitadas por uma membrana semipermeável, cujos poros são suficientemente pequenos para impedir a difusão da macromolécula, mas suficientemente grandes para permitir a passagem do substrato e dos produtos da reação [6].

Nesse procedimento, a enzima em si não está ligada ao suporte e conserva a sua integridade molecular [6].

2.2.1.1 *Inclusão em matriz* [6]

A enzima é dissolvida e dispersada na solução de um monômero que, em seguida, é polimerizado na presença de um agente de reticulação ou pela radiação ionizante e pode incluir um colóide protetor, albumina, agarose ou dextrana.

Os polímeros mais correntemente utilizados são sintéticos: poliacrilamida, metacrilato, polietileno glicol, poli (vinil pirrolidona); ou naturais : amido, K carragenana. As enzimas podem também, ser aprisionadas em membranas ou fibras ocas.

2.2.1.2. *Inclusão em microcápsula* [6]

A técnica da microencapsulação é correntemente utilizada nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos ou de corantes e na indústria alimentícia.

Trata-se da retenção de um produto no interior de uma cápsula delimitada por uma membrana semipermeável. São descritos na literatura vários processos de microencapsulação de enzimas. No método por polimerização interfacial, uma solução aquosa encerrando a enzima e um monômero hidrófilo (poliamina ou glicol) é emulsionada em um solvente orgânico que não se mistura na água. Por adição de um segundo monômero hidrófobo (cloreto de ácido polibásico) é provocada uma reação de polimerização acarretando a formação de uma membrana (poliamida ou poliéster) ao redor das microgotículas. Frequentemente, é necessário acrescentar um agente tensoativo que estabiliza a emulsão e permite ajustar o formato da cápsulas às dimensões desejadas que devem variar de 1 a 100 microns.

O método das lipossomas ou membranas líquidas é diferente: agregados de fosfolípidos dispersos na solução enzimática são submetidos à sonicação. São obtidas pequenas esferas constituídas de uma dupla camada lipídica encerrando gotículas de enzima em solução aquosa. Ao contrário das outras técnicas, a penetração do substrato não depende, então, do formato dos poros da membrana, mas de sua solubilidade nos constituintes lipídicos.

2.2.2. FIXAÇÃO SOBRE SUPORTE SÓLIDO

Nesta técnica, a enzima deve ser fixada ao suporte tão solidamente quanto possível. É importante, então, levar em conta as características próprias tanto da proteína que se quer fixar, como do suporte: formato das partículas, relação molar dos grupamentos hidrófilos e hidrofóbicos e grupamentos reativos [6].

De acordo com o modo de ligação da enzima, distingue-se:

- fixação por adsorção (ou ligação iônica),
- fixação por ligação covalente.

2.2.2.1. Fixação por adsorção ou ligação iônica [6]

A imobilização por adsorção emprega um grande número de forças de interação de baixa energia entre o suporte e a proteína: interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas.

No caso de suportes não porosos nos quais o biocatalisador se fixa na superfície, formam-se, nas vizinhanças das partículas sólidas, camadas sucessivas de moléculas de enzima cada vez menos fortemente ligadas. Quando o material é poroso, as macromoléculas protéicas penetram nos poros.

Se o suporte é portador de cargas elétricas, as ligações iônicas, que se podem estabelecer além das forças físicas de adsorção, conferem ao complexo uma estabilidade maior.

É possível, também, aumentar a carga de proteína por fixação de grupos fortemente dissociados, o que vai reforçar o número e a afinidade das ligações enzima - suporte.

2.2.2.2. Fixação por ligação covalente [39]

O tipo do grupo funcional na proteína, através do qual a ligação covalente com o suporte polimérico será formada, não deve ser essencial para a atividade catalítica da enzima. Além disso, são preferidas reações de ligação que possam ser realizadas sob condições relativamente brandas e essencialmente em meio aquoso. Na seleção da reação de ligação apropriada e do polímero funcional a ser empregado para a imobilização de determinada enzima, todas as informações disponíveis da composição dos aminoácidos e dos aminoácidos envolvidos no sítio

ativo. devem ser considerados. Os efeitos das modificações químicas específicas na atividade, a proteção da região do sítio ativo por agentes químicos específicos ou inibidores e a estrutura tridimensional da enzima, também devem ser considerados.

Numerosos polímeros naturais e sintéticos têm sido explorados como suportes potenciais para imobilização enzimática. Isto tem levado ao desenvolvimento de uma ampla variedade de técnicas para

(a) a enxertia de grupos funcionais específicos sobre polímeros pré - formados.

(b) a síntese de polímeros e copolímeros idealizados para cumprir uma necessidade particular, e

(c) o uso de matrizes poliméricas, que por manipulações químicas podem ser transformados em espécies químicas melhor adaptadas a uma dada tarefa.

Os grupos funcionais de suportes poliméricos que podem ser utilizados para ligação covalente de enzimas incluem:

1. grupo hidroxila de polissacarídeos, poli (álcool vinílico), poli (hidroxietyl metacrilato) e vidros inorgânicos;
2. grupo carboxila e relacionados de poli (ácido acrílico), poli (ácido glutâmico), copolímeros de anidrido maleico, poli(acrilamida e carboximetilcelulose);
3. grupo amino de polissacarídeos aminoetilados e sílica gel, sílica gel de polissacarídeos arilaminados e polímeros sintéticos de poli (*p*-aminoestireno);
4. grupos aldeído e acetal de polímeros reagidos com glutaraldeído e polissacarídeos reagidos com periodato;
5. grupos mercapto em polímeros modificados;
6. grupos halogênio do tratamento de polímeros com ácido cloro cianídrico, brometo de bromoacetil, iodo alquil álcool e polímeros contendo 3-flúor-4,6-dinitrofenil.
7. grupos amida de polipeptídeos e poliamidas tais como o nylon.

Vários tipos de reações de acoplamento tem sido relacionadas, tais como: método do brometo cianogênico, método do *trans*-2,3-carbonato cíclico, método da azida de Curtius, método do glutaraldeído, reação de condensação de quatro componentes (4CC), etc [39].

2.2.3. PROPRIEDADES DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Os efeitos da imobilização sobre a atividade das enzimas resultam da interação de diferentes fatores:

1. modificação da estrutura tridimensional da enzima, sob a ação de injunções que aparecem com a imobilização;
2. modificação do microambiente: pH local, interações eletrostáticas;
3. fenômenos de difusão no interior do sistema;
4. impedimento estérico

Este conjunto de fatores representará um papel determinante na atividade e estabilidade da enzima [6, 33, 38]

2.2.3.1. Medida da atividade

As condições ótimas de ação das enzimas imobilizadas frequentemente diferem daquelas das enzimas em solução e precisam ser perfeitamente conhecidas para evitar todo risco de erro de interpretação. Parece que a imobilização ocasiona, frequentemente, uma perda de atividade, bastante variável de acordo com a natureza da enzima e o modo de fixação, mas casos de aumento de atividade foram igualmente registrados. Essas variações, tanto em um caso como em outro, podem

ser explicadas por uma modificação estérica do sítio ativo da enzima, sob o efeito de uma mudança de conformação da cadeia polipeptídica.

A imobilização pode causar perturbações estruturais na enzima, reduzindo sua eficácia catalítica. Além disso, a imobilização pode limitar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, reduzindo novamente sua atividade. Ambos fenômenos podem ser descritos como efeitos conformacionais.

Os efeitos de partição ocorrem quando as concentrações do substrato ou de outros componentes relacionados com a atividade da enzima, podem ser diferentes na superfície da matriz suporte das observadas no restante da solução. Estes efeitos podem surgir por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas e dependendo do(s) componente(s) implicado(s), os efeitos de partição podem intensificar ou abaixar a velocidade de reação observada.

As mudanças conformacionais são difíceis de determinar. Os efeitos conformacionais variam com a enzima, o método de imobilização e o suporte utilizado. Algumas das conseqüências adversas da imobilização sobre a atividade enzimática são ilustradas na Fig. 2 [40].

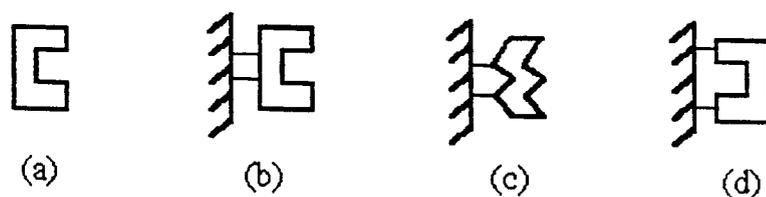


Figura 2. Conseqüências da imobilização de enzimas: (a) enzima livre; (b) enzima ativa imobilizada; (c) enzima inativa imobilizada (mudança conformacional); (d) enzima inativa imobilizada (impedimento estérico).

2.2.3.2. Influência das condições operatórias

Se a atividade residual das enzimas imobilizadas é mais baixa que a das enzimas nativas, em contrapartida a sua estabilidade, geralmente aumenta. Entretanto, o tempo de duração dos sistemas é muito variável e os números retirados das obras científicas variam de algumas dezenas de horas e muitos meses e, em alguns casos excepcionais, a muitos anos.

As quantidades de proteína imobilizadas são, também, muito variáveis e dependem da enzima considerada, do suporte utilizado e do método de imobilização empregado. Não existe, devido aos fenômenos de impedimento estérico, uma relação linear entre a atividade, relacionada à unidade de massa do sistema, e quantidade de biocatalizador fixado.

As condições de pH e de temperatura necessárias à reação de imobilização podem provocar uma perda parcial ou total da atividade enzimática. Mas, uma vez que a imobilização foi realizada, observa-se, frequentemente, que as enzimas fixadas resistem melhor às variações de pH e aos tratamentos térmicos do que as espécies em solução. Ainda aqui, a resposta difere de acordo com a origem da enzima, o suporte utilizado e o método de fixação considerado [6].

2.2.3.3. Influência do microambiente

2.2.3.3.1. pH ótimo de ação das enzimas imobilizadas

Numerosos autores observaram um deslocamento de valores do pH ótimo que pode ir até duas unidades dependendo da enzima estudada estar imobilizada ou em

solução. Tal fenômeno pode ser explicado facilmente quando o suporte sólido comporta numerosos grupos ionizados.

Dois casos podem, então, ocorrer:

1. o suporte é carregado negativamente: cria-se na vizinhança imediata das partículas sólidas, uma concentração de prótons do meio. O pH nessa interface é mais ácido do que o medido no meio.

Esses prótons podem ser produzidos no curso da reação catalítica. Nesse caso, a velocidade de difusão de íons H^+ na massa da solução influi no perfil da curva da atividade em função do pH. Embora o pH ótimo real da enzima seja imutável, medir-se-á um deslocamento aparente na zona básica.

2. o suporte está carregado positivamente: em consequência da repulsão dos prótons, o pH ótimo aparente situa-se em zona mais ácida.

Em meio tamponado, as curvas de atividade em função do pH para a enzima nativa tendem a se confundir quando a força iônica se eleva, com os íons em solução neutralizando as cargas do suporte.

Em alguns casos, o pH ótimo da enzima imobilizada é o mesmo que o da forma nativa, mas o perfil da curva alarga-se. Esse dado é interessante porque permite trabalhar com pH incompatíveis com o emprego de enzimas solúveis [6].

2.2.3.3.1.2. Constante de Michaelis-Menten: K_m

Para muitas enzimas, a velocidade de catálise, V , varia com a concentração de substrato, $[S]$. A uma concentração de enzima fixa, V é aproximadamente

linearmente proporcional a $[S]$ quando $[S]$ é pequena. A altas $[S]$, V é aproximadamente independente da $[S]$, como mostrado na Fig. 3.

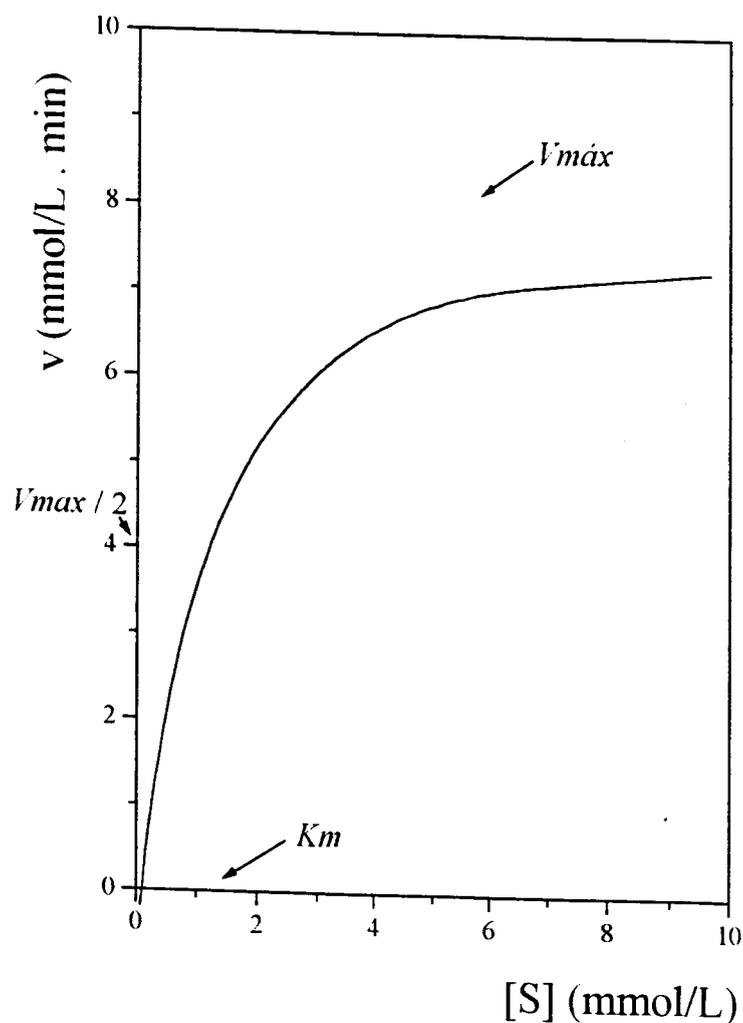
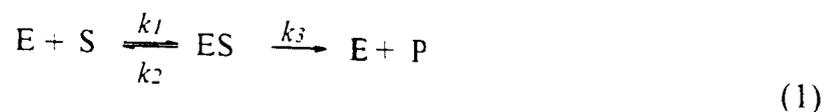


Figura 3. Um gráfico de velocidade de reação, V , como uma função de concentração de substrato, $[S]$, para uma enzima que obedece a cinética de Michaelis - Menten ($V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima e K_m é a constante de Michaelis).

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para avaliação desta característica cinética. A parte cinética essencial neste tratamento é que um complexo ES específico é um intermediário necessário na

catalise. O modelo proposto, que é simplesmente uma das determinações das propriedades cinéticas de muitas enzimas, é:



A enzima E combina com S para formar um complexo ES, com uma velocidade constante k_1 . O complexo ES tem dois destinos possíveis. Ele pode se dissociar a E e S com uma velocidade constante k_2 , ou ele pode prosseguir para formar o produto P com uma velocidade constante k_3 . É assumido que não há reversão do produto ao substrato inicial.

Queremos então, uma expressão que relacione a velocidade de catálise a concentrações de substrato e enzima e a velocidade dos passos individuais. O ponto de partida é que a velocidade de catálise é igual a concentração de produto do complexo ES e k_3 :

$$V = k_3 [ES] \quad (2)$$

Agora, precisamos expressar ES em termos de quantidades conhecidas. A velocidade de formação e decomposição de ES é dado por:

$$\text{velocidade de formação de ES} = k_1 [E] [S] \quad (3)$$

$$\text{velocidade de decomposição de ES} = (k_2 + k_3) [ES] \quad (4)$$

Estamos interessados na velocidade catalítica sob condições de estado estacionário. Uma situação de estado estacionário é uma em que a concentração dos intermediários estão ao mesmo tempo na concentração dos materiais iniciais e produtos são transformados. Isto ocorre quando a velocidade de formação e decomposição do complexo ES são iguais. Igualando as equações (3) e (4), teremos:

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad (5)$$

Rearranjando a equação (5),

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (6)$$

A equação (6) pode ser simplificada definindo uma nova constante de Michaelis:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (7)$$

e substituindo-se na equação (6), que então ajusta-se a

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_m} \quad (8)$$

Examinando-se o numerador da equação (8), a concentração de substrato não combinado, [S], é muito proximamente igual à concentração total de substrato, provido que a concentração de enzima é muito menor que a do substrato. A concentração de enzima total E_T menos a concentração do complexo ES, corresponde à concentração de E livre.

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (9)$$

Substituindo-se esta expressão de [E] na equação (8),

$$[ES] = ([E_T] - [ES]) [S] / K_m \quad (10)$$

Rearranjando a equação (10),

$$[ES] = [E_T] \frac{[S] / K_m}{1 + [S] / K_m} \quad (11)$$

ou

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (12)$$

Pela substituição desta expressão por [ES] na equação (2), teremos:

$$V = k_3 [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (13)$$

A velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ é alcançada quando os sítios da enzima estão saturados com o substrato, ou seja, quando [S] é muito maior que K_m , então que $[S]/([S] + K_m)$ aproxima-se de 1. Então:

$$V_{m\acute{a}x} = k_3 [E_T] \quad (14)$$

Substituindo-se a equação (14) na equação (13) teremos a equação de Michaelis - Menten:

$$V = V_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (15)$$

A baixas concentrações de substrato, quando [S] é muito menor que K_m , $V = [S] \cdot V_{m\acute{a}x} / K_m$, isto é, a velocidade é diretamente proporcional à concentração de substrato. A altas concentrações de substrato, quando [S] é muito maior que K_m , $v = V_{m\acute{a}x}$; isto é, a velocidade é máxima, independente da concentração de substrato.

O significado de K_m é evidente da equação (15). Quando $[S] = K_m$, então $v = V_{m\acute{a}x}/2$. Então, K_m é igual à concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade do valor máximo [41].

Em virtude da curva de V vs. $[S]$ ser uma hipérbole, é bastante difícil determinar-se a $V_{máx}$ e, portanto, a $[S]$ que fornece $\frac{1}{2} V_{máx}$ (isto é, K_m). Para facilitar a determinação das constantes cinéticas, os dados são geralmente lançados em gráficos de métodos lineares como o de Lineweaver - Burk.

Este gráfico é baseado no rearranjo da equação de Michaelis - Menten em uma forma linear ($y=mx+b$):

$$\frac{V}{V_{máx}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad ; \text{ invertendo } \frac{V_{máx}}{V} = \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

Multiplicando os dois termos: $\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx} [S]}$

Separando os termos: $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}} + \frac{[S]}{V_{máx} [S]}$

ou

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Então, se construirmos um gráfico de $1/v$ vs. $1/[S]$, como mostrado na Fig. 4, a inclinação = $K_m/V_{máx}$ e a interseção no eixo dos $y = 1/V_{máx}$. Podemos observar também que quando $1/v = 0$, $(K_m/V_{máx}) \times (1/[S]) = 1/V_{máx}$ e, portanto, $1/[S] = -1/K_m$. Logo, a interseção no eixo de $1/[S]$ é $-1/K_m$ [42].

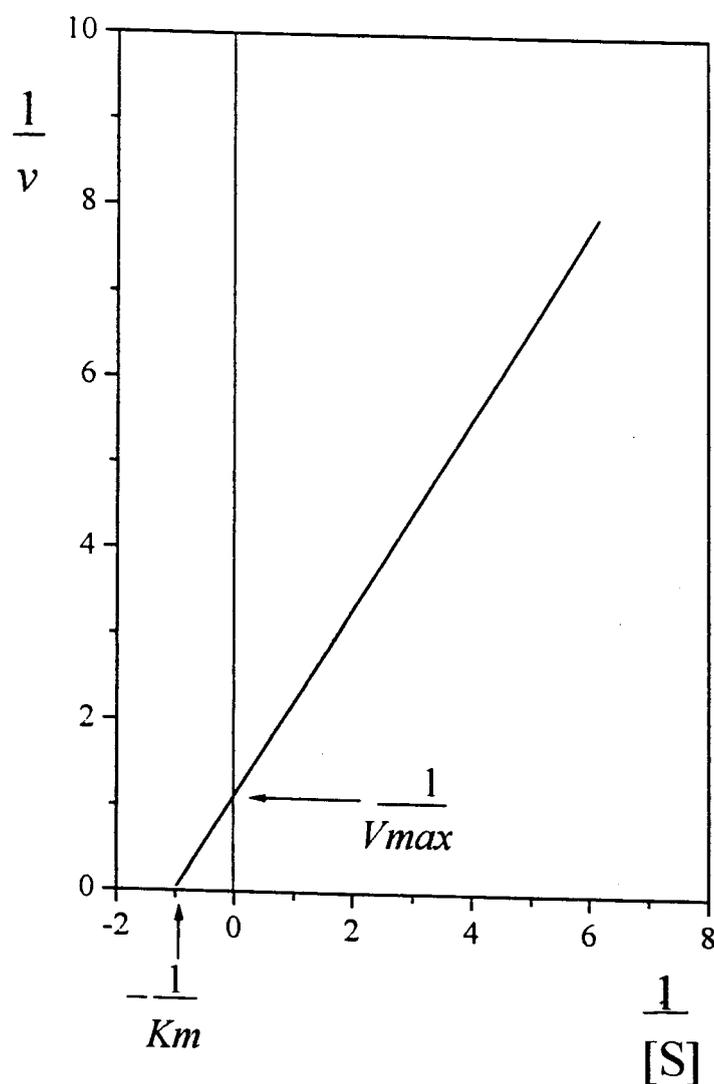


Figura 4. Gráfico duplo recíproco ($1/V$ vs. $1/[S]$) de Lineweaver - Burk

A determinação do valor de K_m de uma enzima é essencialmente importante e representa o grau de influência do microambiente na sua atividade. A imobilização de uma enzima pode resultar no aumento ou diminuição deste parâmetro. Um decréscimo no valor de K_m de uma enzima após imobilização (o valor resultante refere-se ao K_m aparente) pode ter vantagens práticas porque a velocidade de reação pode aumentar a baixas concentrações do substrato. Inversamente, um aumento no K_m da forma imobilizada pode significar que uma alta concentração de substrato é requerida para alcançar a mesma velocidade de reação observada com a enzima

livre. Assim, mudanças no K_m e $V_{m\acute{a}x}$ podem ser atribuídos a efeitos microambientais na vizinhança das partículas da enzima imobilizada [43].

2.2.3.3.3. Impedimento estérico

A fixação de uma macromolécula protéica em um suporte rígido diminui a acessibilidade do substrato ao sítio ativo, particularmente quando se trata de uma macromolécula.

Esses fenômenos de impedimento estérico são igualmente lembrados para explicar que pontos de clivagem diferentes são, às vezes, observados sobre substratos macromoleculares, sob a ação das enzimas livres e insolubilizadas.

2.2.4. GLICOSE OXIDASE [E.C. 1.1.3.4]

A glicose é importante no metabolismo da maioria das células - animais, plantas e microorganismos - e um número de enzimas tem sido identificadas que catalizam a reação da glicose. Entretanto, somente uma enzima, a glicose oxidase, tem recebido alguma atenção significativa na determinação da glicose em aplicações clínicas [44].

A glicose oxidase é específica para a catálise da glicose, o que tornou seu emprego muito comum em análises clínicas. Vários métodos são propostos para determinação do peróxido de hidrogênio formado como produto da reação da catálise, dos quais podemos citar o método da *o*-dianisidina, *o*-toluidina, Trinder, sensor elétrico, etc [6, 44].

A maioria dos estudos cinéticos da glicose oxidase, também conhecida por β -D-glicopiranosose aerodehidrogenase, P-FAD, corilofilina, microcide e notatin, tem sido confirmadas com enzimas de *Aspergillus niger* e de espécies de *Penicillium*. As enzimas de *A. niger* são um dímero, de peso molecular de 186 000 Da, tendo duas moléculas de FAD ligadas muito próximas por dímero, ainda que as de *P. amagasakiense* são muito similares, o dímero tem um peso molecular de 160 000 Da. No último caso, cada unidade no dímero é composta de duas cadeias polipeptídicas conectadas por uma ligação dissulfeto [45].

A reação catalizada pela glicose oxidase é mostrada na Fig. 5:

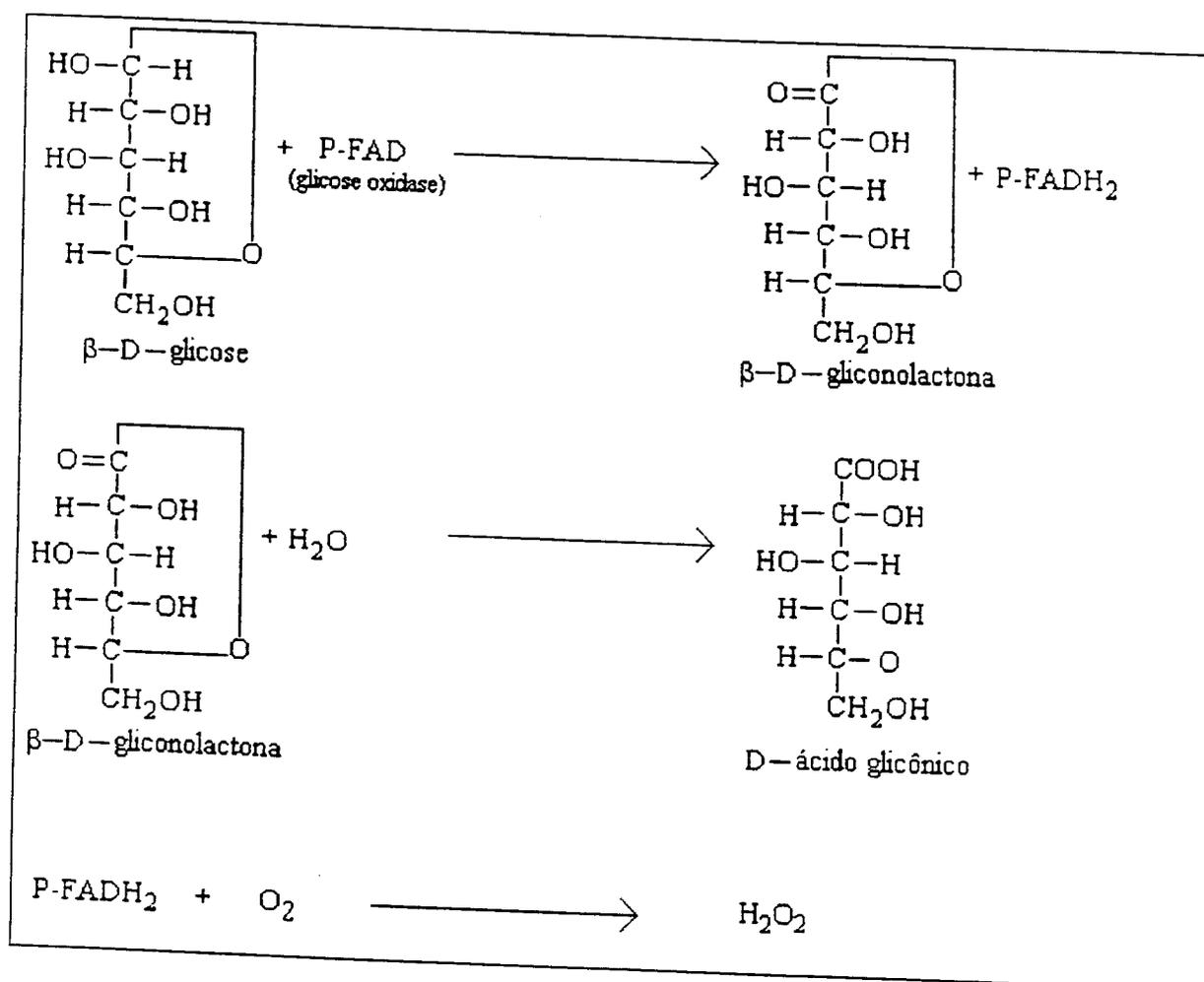


Figura 5. Oxidação da glicose pela glicose oxidase

A glicose oxidase é ativa sobre uma ampla faixa de pH, envolvendo valores de pH tão baixos quanto 3 ou tão altos quanto 9. O efeito catalítico ótimo é exercido de pH 4 a pH 7 [44].

A glicose oxidase imobilizada tem uma grande aplicação no desenvolvimento de biossensores para determinação da glicose [46, 47, 48].

2.2.5. UREASE [E.C. 3.5.1.5]

A uréia é o principal produto final do catabolismo humano das proteínas e aminoácidos. Mais de 90% da uréia é excretada através dos rins e é filtrada passivamente pelos glomérulos.

Uma ampla variedade de doenças renais com diferentes trocas glomerulares, tubulares, intersticial ou dano vascular, podem causar aumento na concentração plasmática de uréia. Outros fatores como dieta alimentar, catabolismo protéico, desgaste muscular etc, podem também alterar a concentração de uréia, tanto no plasma como na urina [16].

Clinicamente, a determinação quantitativa da uréia ocorre indiretamente utilizando-se a urease, que hidrolisa a ligação C-N não peptídica, característica da uréia, conforme mostrado na Fig. 6 [6, 49,50].

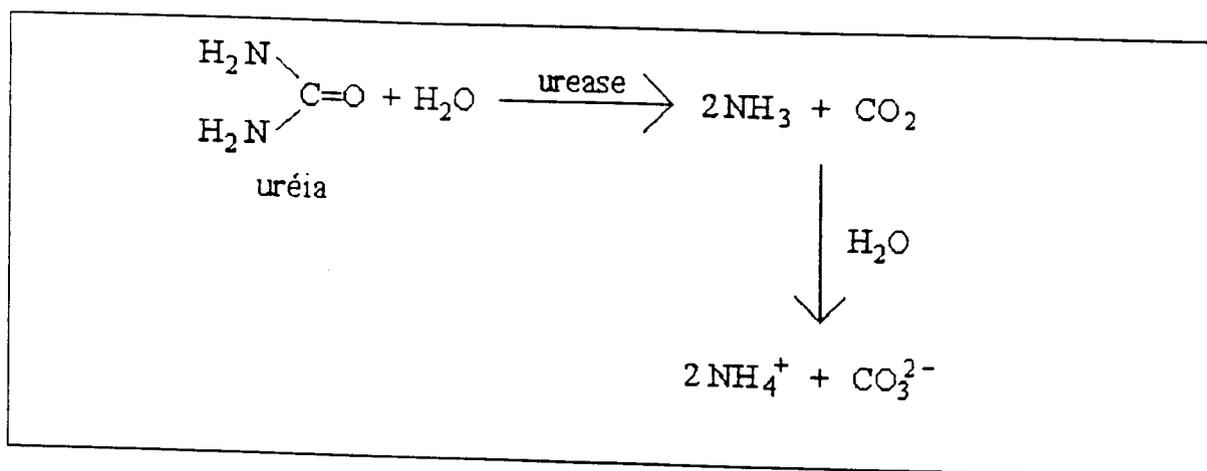


Figura 6. Hidrólise da uréia pela urease

A urease, também conhecida como uréia-amidohidrolase, tem peso molecular de 489 000 Da e a molécula contém muitos aminoácidos ao longo dela, que são aproximadamente 77 metioninas, 29 cistinas e 47 cisteínas. É isolada do feijão da espécie *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., *Leguminosae*: Hanabuse [51].

O pH de atividade catalítica ótimo em tampão maleato é de 6,5 comparado ao 7,5 em tampão Tris. Em tampão fosfato de potássio ou sódio, o pH ótimo é de 6,5 [50].

A imobilização da urease tem potencial aplicação para desenvolvimento de biossensores para análises clínicas, na determinação de uréia nos fluidos corpóreos, tais como plasma, urina e suor [6, 52].

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTOS PARA ENXERTIA DO ÁCIDO ACRÍLICO EM GRÂNULOS DE POLIETILENO E POLIPROPILENO

Materiais:

-Ácido acrílico (AA), fornecido pela Dow Produtos Químicos. Utilizado como recebido.

-Grânulos de Polietileno de baixa densidade (PE), fornecidos pela Poliolefinas Co.

Diâmetro: $0,361 \pm 0,042$
Peso molecular: 50 000
Densidade: 0,92 - 0,94
Índice de refração: 1,51 - 1,52
Tm: 109 - 125°C; Tg: -20 - -30 °C
Cristalinidade: até 60%

-Grânulos de Polipropileno (PP), fornecidos pela Polibrasil

Diâmetro: $0,318 \pm 0,078$
Peso molecular: 80 000 - 500 000
Densidade: 0,94
Índice de refração: 1,49
Tm: 4 - 12 °C; Tg: 165-175 °C
Cristalinidade: 60 a 70%

-Metanol

-Sulfato de cobre II pentahidratado

-Fonte de ^{60}Co , tipo panorâmica

3.1.1. Determinação da taxa de dose

Objetivando-se padronizar as melhores condições para atingir o máximo grau de enxertia do AA nos grânulos de PE e PP, foi realizado inicialmente o estudo da taxa de dose de irradiação usando água e metanol como solventes para o AA.

Os copolímeros de enxerto foram obtidos pela técnica da irradiação simultânea. Para aumentar o rendimento da enxertia, certos procedimentos foram tomados, como a eliminação do oxigênio do meio, utilizando-se o borbulhamento de gás nitrogênio no sistema irradiado.

Foram pesados 5g de grânulos de PE e PP, que foram colocados em tubos diferentes, os quais foram irradiados com AA na concentração de 30% (v/v) em água e em metanol, juntamente com sulfato de cobre II $6 \cdot 10^{-2}$ mol/L, como inibidor de homopolimerização.

Os tubos preparados foram submetidos ao fluxo de gás nitrogênio por 10 minutos e seladas com fita de PTFE. Após 48 horas as amostras foram expostas a uma fonte de ^{60}Co a temperatura ambiente, onde foi variada a distância de exposição dos tubos, para obter o intervalo de taxa de dose de 0,1 a 0,8 kGy/h. A dose total de irradiação foi de 5kGy.

Após a irradiação, as amostras foram colocadas em ultra-som por aproximadamente 10 minutos, para eliminação de restos de monômero e do homopolímero formado. Depois foram submetidas a refluxo no extrator Soxhlet com metanol por 12 horas, ou até remoção total do homopolímero visível.

Os grânulos após serem retirados do metanol, foram deixados a temperatura ambiente para evaporação do excesso do mesmo durante 3 dias, depois foram colocados em estufa ventilada com temperatura entre 50 a 55°C durante 24 horas e

então pesados. O grau de enxertia ($E\%$) nos grânulos foi avaliado pela diferença da massa das amostras antes e após irradiação, conforme a expressão:

$$E\% = \frac{(m_f - m_i) \times 100}{m_i}$$

onde: m_f é a massa da amostra seca após enxertia

m_i é a massa da amostra seca antes da enxertia

3.1.2. Determinação da dose de irradiação

Depois da escolha do solvente (água ou metanol) mais favorável para a enxertia do AA em PE e PP, as amostras foram irradiadas em uma determinada taxa de dose em intervalos de tempo que proporcionou doses de 2 a 15 kGy. A concentração do AA foi mantida em 30% (v/v).

Os grânulos foram submetidos a lavagem, secagem e determinação do grau de enxertia conforme descrito no item anterior.

3.1.3. Determinação da concentração do ácido acrílico (AA)

Para a enxertia do AA nos grânulos de PE e PP, foi variada a concentração do monômero de 10 a 50% (v/v) com sulfato de cobre II como inibidor. As irradiações foram realizadas nas seguintes condições: PP com AA em metanol; taxa de dose de 0,31kGy/h; e dose total de irradiação de 10kGy. PE com AA em água; taxa de dose de 0,21kGy/h; e dose total de irradiação de 10kGy.

Os grânulos foram submetidos a lavagem, secagem e determinação do grau de enxertia conforme descrito no item anterior.

3.1.4. Caracterização da superfície enxertada

A modificação superficial dos grânulos de PP e PE pode ser evidenciada por algumas propriedades adquiridas do polímero enxertado, o poli (ácido acrílico). Estas novas propriedades podem ser mudança na superfície do grânulo, que foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); capacidade em incorporar água (hidrofilicidade), característica esta do poli (ácido acrílico).

3.1.4.1. Análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As superfícies dos grânulos de PE e PP não enxertadas e enxertadas com AA foram observadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da marca Philips, modelo XL 30

Para análise no MEV as amostras foram fixadas com cola de prata sobre um suporte metálico e recobertas com ouro na forma de plasma em um "sputtering" (25kV por 2 minutos).

3.1.4.2. Hidrofilicidade

Grupos com 5 grânulos de graus de enxertia diferentes foram pesados e colocados em água destilada e deixados à temperatura ambiente por 24 horas. Foram pesados novamente e o conteúdo de água nos grânulos foi determinado conforme a expressão:

$$Hd\% = \frac{(mf-mi) \times 100}{mi}$$

onde: mi é a massa da amostra seca

mf é a massa da amostra após contato com a água

3.2. ATIVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE PE-g-AA E PP-g-AA E IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Materiais:

- Grânulos de PE-g-AA com graus de enxertia de 1,40 a 14,6%
- Grânulos de PP-g-AA com graus de enxertia de 1,71 a 17,7%
- Metanol p.a.
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidrazina anidra fornecida pela Sigma

-Glicose oxidase [E.C. 1.1.3.4], 1 000U/mL, tipo V fornecida pela Sigma

-Urease [E.C. 3.5.1.5], tipo IX fornecida pela Sigma

Para a ativação dos grânulos de PE-g-AA e PP-g-AA contendo grupos carboxílicos e a imobilização de enzimas sobre os polímeros foi utilizado o método da azida de Curtius, conforme descrito por Coulet [53], como é mostrado na Fig. 7.

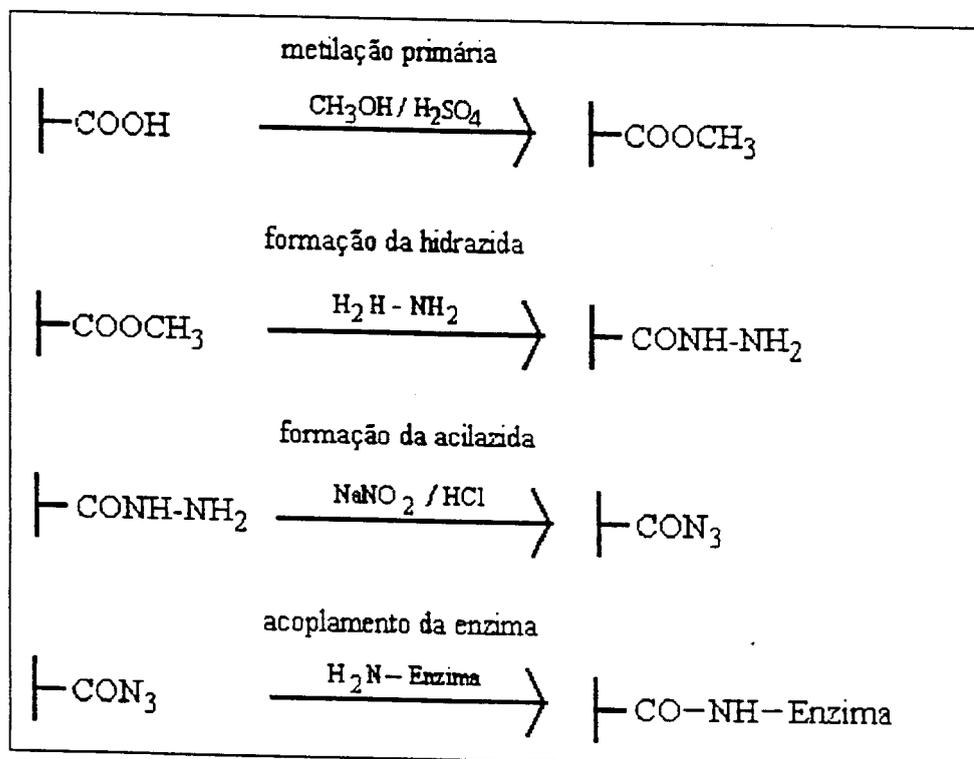


Figura 7. Ativação de polímeros contendo grupo funcional ácido para imobilização de enzimas.

O grupo carboxílico do AA enxertado é modificado a metil éster, que se faz reagir com a hidrazina para formar hidrazida. O derivado hidrazida é então colocado com solução aquosa de nitrito de sódio para obtenção da acilazida. O derivado acilazida pode reagir com um grupo amino da enzima sob condições alcalinas [39].

2g dos grânulos de PE-g-AA e PP-g-AA, foram colocados em balões de fundo redondo juntamente com 50mL de metanol e 1mL de ácido sulfúrico concentrado. Os balões foram acoplados a condensadores de bola e aquecidos em

manta na temperatura aproximada de 60°C por 3 dias, para metilação dos grupos carboxílicos do AA enxertado.

Em seguida os grânulos foram lavados com água destilada deionizada até pH 5-7 e colocados em contato com 20mL da solução de hidrazina 4% v/v em água destilada, sob borbulhamento de nitrogênio gasoso por 5 minutos. Os balões foram fechados com Parafilm[®] e colocados na geladeira a 4 °C por dois dias, para formação dos grupos acilazídicos nos grupos metilados.

A solução de hidrazina foi retirada e os grânulos lavados com água destilada a 4°C, foram transferidos para um becker com 35mL de ácido clorídrico 0,3mol/L e 2mL de nitrito de sódio 0,5mol/L, e mantidos sob agitação por 25 minutos em agitador magnético e banho de gelo. Em seguida, foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,1mol/L.

Os grânulos foram, então, para frascos de vidro de capacidade de 20mL onde colocou-se 3mL de solução de enzima na concentração de 1mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05mol/L pH 8,8 durante 24 horas a 4 °C. Retirada a solução de enzima, os grânulos foram lavados 5 vezes com tampão Tris-HCl 0,05mol/L pH 8,0 e por uma noite em contato com o tampão para posterior medida da atividade.

Na solução de enzima determinou-se a quantidade protéica ligada à superfície dos grânulos enxertados, correspondendo ao rendimento de imobilização (RI%). Este RI% corresponde à diferença na concentração de enzima da solução antes e após o contato com os grânulos. O método colorimétrico de Bradford [54] foi utilizado para esta quantificação.

3.3. PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOSE OXIDASE

- *Materials*

-D – glicose

-Glicose oxidase [E.C. 1.1.3.4] 1 000U/mL, tipo V fornecida pela Sigma

-*o*-dianisidina, fornecida pela Sigma

-Peroxidase [E.C. 1.11.1.7] 250U/mL, tipo X fornecida pela Sigma

-Triton X-100

O método escolhido para medir a atividade da glicose oxidase foi o da *o*-dianisidina, conforme descrito por Dahlqvist [55].

A enzima glicose oxidase, utilizada na imobilização nos grânulos de PE-g-AA e PP-g-AA, catalisa a oxidação aeróbia da glicose a gliconolactona e peróxido de hidrogênio, como foi mostrado na Fig. 5. O peróxido de hidrogênio oxida a *o*-dianisidina pela catálise da peroxidase, obtendo-se uma coloração vermelho-alaranjado, que é medido no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 420nm.

3.3.1. Medida da atividade da glicose oxidase pelo método da *o*-dianisidina

A padronização do método da *o*-dianisidina para verificação da atividade enzimática foi efetuada com o reagente contendo a glicose oxidase (TGO) e reagente sem glicose oxidase (T).

3.3.1.1. Glicose oxidase livre

Reagente TGO: dissolveram-se 2mg de glicose oxidase (GO) em 100ml de tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7. Adicionou-se 1mL de solução de *o*-dianisidina 10mg/mL em água destilada, 1mL de Triton X-100 a 25% p/p em etanol e 500 μ L de peroxidase 1mg/mL em tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7.

Foram colocados 200 μ L de solução de glicose em um tubo de ensaio, juntamente com 3mL do reagente TGO. Incubou-se em banho maria 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.1.2. Glicose oxidase imobilizada

Reagente T (sem glicose oxidase): em 100mL de tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7, adicionou-se 1mL de solução de *o*-dianisidina 10mg/mL em água destilada, 1mL de Triton X-100 a 25% p/p em etanol e 500 μ L de peroxidase 1mg/mL em tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7.

Foram colocados 500 μ L de solução de glicose em tampão Tris-HCl 0.5mol/L pH 7 em frascos que continham 5 grânulos (\pm 0,1g). Após 60 minutos em banho maria a 37°C foram retiradas alíquotas de 200 μ L da solução e transferidas para tubos de ensaio contendo 3mL do reagente T. Deixou-se os tubos em banho maria a 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.2. Teste das propriedades da glicose oxidase

3.3.2.1. Curva de calibração da glicose

A curva de calibração de glicose foi construída com a glicose oxidase livre, presente no reagente TGO. Foram colocados 200 μ L de solução de glicose nas concentrações de 4,5; 9; 18; 36; 54; 72,1; 90,1; 108,1; 144,1 e 180,1 mmol/L em tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7, juntamente com 3 ml do reagente TGO. Incubou-se em banho maria a 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.2.2. Efeito da enxertia do suporte

Nesta determinação foram utilizados grânulos de PP-g-AA e PE-g-AA com vários graus de enxertia. A concentração da solução de glicose utilizada foi de 45mmol/L e procedeu-se conforme o item 3.3.1.2.

3.3.2.3. Estabilidade da enzima imobilizada com a reutilização e o armazenamento

Este procedimento teve como objetivo determinar o tempo em que a glicose oxidase imobilizada manteve sua atividade sob condições de armazenamento e com as diversas reutilizações no decorrer do tempo. Em ambas as análises foram utilizados grânulos de PP-g-AA com 3,11% de enxertia com a glicose oxidase imobilizada.

No experimento da estabilidade sob armazenamento, os grânulos utilizados foram lavados, guardados na geladeira e analisados após tempos diferentes de armazenamento em tampão Tris - HCl 0,05mol/L pH8 (tampão de lavagem da enzima após contato dos grânulos com a solução de enzima concentrada - 1mg/mL).

No experimento da manutenção da atividade com as sucessivas reações, após cada reação, os mesmos grânulos foram guardados na geladeira em tampão Tris - HCl 0,05mol/L pH8.

Foram colocados 500 μ L de solução de glicose a 45mmol/L em tampão Tris-HCl 0,5mol/L pH 7 em cada frasco que continha 5 grânulos (0,1g) com a enzima imobilizada. Após 60 minutos em banho maria a 37°C foram retiradas alíquotas de 200 μ L da solução e transferidas para tubos de ensaio contendo 3mL do reagente T. Deixou-se os tubos em banho maria a 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.2.4. Atividade enzimática em diferentes pHs

Foi estudado o comportamento da glicose oxidase livre e imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 2,10% de enxertia no intervalo de pH 3 a 10. Para obtenção de pHs no intervalo de 3 a 6,5 foi utilizado tampão fosfato dissódico - ácido cítrico 0,5mol/L. Para o intervalo de pH entre 7 a 10, foi utilizado o tampão Tris - HCl 0,5mol/L.

Glicose oxidase livre: preparou-se uma solução de glicose oxidase em 500 μ L em tampão, ambos duas vezes concentrado; deixou-se na geladeira por 15 minutos. Preparou-se uma solução de glicose a 90mmol/L em água destilada. Foram aliqotados 100 μ L da solução de glicose oxidase mais 100 μ L de glicose. Deixou-se incubar em banho maria 37°C por 60 minutos, depois adicionou-se 3mL do reagente T mantendo-se novamente em banho maria 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração.

Glicose oxidase imobilizada: Foram colocados 500 μ L dos diferentes tampões de pH nos grânulos de PP-g-AA com 2,10% de enxertia com a enzima imobilizada durante 15 minutos. Depois retirou-se o tampão dos grânulos de PP-g-AA com 2,10% de enxertia com a enzima imobilizada e colocou-se 500 μ L de solução de glicose 45mmol/L nos tampões com os respectivos pHs. Após 60 minutos em banho maria 37°C foram retiradas alíquotas de 200 μ L da solução e transferidas para os tubos de ensaio contendo 3mL do reagente T. Deixou-se os tubos em banho maria a 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.2.5. Atividade enzimática em diferentes temperaturas

Foi estudado o comportamento da glicose oxidase livre e imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 1,71% de enxertia nas temperaturas de 32, 56 e 74°C.

Glicose oxidase livre: preparou-se uma solução de glicose oxidase em tampão Tris - HCl 0,5mol/L pH 7,0, alíquotando-se 100µL desta solução em diferentes tubos para cada temperatura, que foram deixados por 5 minutos no banho maria nas temperaturas estabelecidas. Adicionou-se 100µL de uma solução de glicose a 45mmol/L em tampão Tris - HCl 0,5mol/L pH 7,0. Após incubação no banho maria por 60 minutos foram retirados e colocados em banho de gelo onde foi adicionado 3mL do reagente T, e recolocados ao banho maria 37°C por mais 60 minutos para o desenvolvimento da coloração.

Glicose oxidase imobilizada: os grânulos de PP-g-AA com 1,71% de enxertia com a enzima imobilizada foram colocados nos banhos maria nas temperaturas estabelecidas com tampão Tris - HCl 0,05mol/L pH8 por 5 minutos. Depois retirou-se esse tampão e adicionou-se 500µL de uma solução de glicose 45mmol/L em tampão fosfato dissódico - ácido cítrico 0,5mol/L pH6. Após 60 minutos em banho maria foram retiradas alíquotas de 200µL da solução e transferidas para os tubos de ensaio contendo 3mL do reagente T. Deixou-se os tubos em banho maria a 37°C por 60 minutos para desenvolvimento da coloração. A leitura espectrofotométrica foi feita no comprimento de onda de 420 nm.

3.3.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos da glicose oxidase

Os valores da velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) foram determinados para a enzima livre e imobilizada em PP-g-AA com 2.28% de enxertia

Glicose oxidase livre: 3 mL do reagente TGO foram colocados em cubeta de espectrofotômetro UV-visível e mantida em banho maria 37°C por 15 minutos. Colocou-se 200µL de glicose na concentração de 180,16mmol/L em tampão Tris - HCl 0.5mol/L pH7 e a cada 2 minutos, foi retirada a cubeta do banho para a leitura espectrofotométrica.

Glicose oxidase imobilizada: foram utilizados 5 grânulos (0,1g) de PP-g-AA com 2.28% de enxertia com a enzima imobilizada para tempos de intervalo de 2 minutos, totalizando um tempo de 16 minutos e 8 amostras, nas quais adicionou-se uma solução de glicose 180,16mmol/L em tampão fosfato dissódico - ácido cítrico 0,5mol/L pH6 a 37°C. Procedeu-se depois como no item 3.3.1.2.

3.4. PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA UREASE

Materiais:

-Fenol pa

-Nitroprussiato de sódio ($Na_2Fe(CN)_5NO$), fornecido pela Sigma

-Hipoclorito de sódio comercial

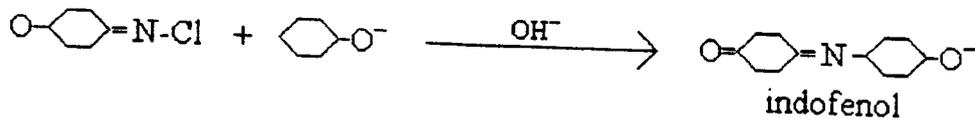
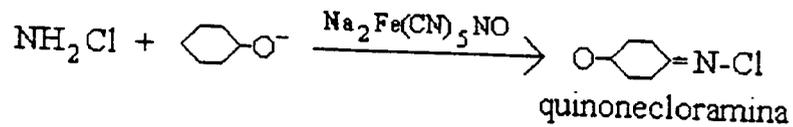
-Hidróxido de sódio pa

-Uréia pa

-Urease [E.C. 3.5.1.5.], tipo IX fornecida pela Sigma

O método escolhido para medir a atividade da urease foi o método de Berthelot, conforme descrito por Kaplan [49].

Neste método, a reação de coloração ocorre com o NH_3 formado da hidrólise da uréia com a urease, conforme a reação:



A concentração de indofenol formado é medido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 580nm.

3.4.1. Atividade da urease pelo método de Berthelot

A padronização do método de Berthelot para verificação da atividade enzimática foi efetuada com os seguintes reagentes:

Solução fenol nitroprussiato: dissolveu-se 12,5g de nitroprussiato de sódio em um pouco de água destilada e adicionou-se 2,5mL de fenol líquido. Completou-se o volume para 250mL com água destilada.

Solução hipoclorito hidróxido de sódio: dissolveu-se 2,5 g de hidróxido de sódio em um pouco de água destilada e adicionou-se 2,5mL de hipoclorito de sódio. Completou-se o volume para 500mL com água destilada.

Solução de urease: dissolveu-se 1,1mg de urease em 3,0mL de tampão fosfato de sódio 0,2mol/L pH 6,5 e adicionou-se 3,0mL de glicina.

3.4.1.1. Urease livre

Pipetou-se 100 μ L de uréia e 50 μ L da solução de urease em tubos de ensaio. Colocou-se no banho maria a 37°C por 15 minutos. Adicionou-se 2,5mL da solução fenol / nitroprussiato e 2,5 ml da solução hipoclorito / hidróxido de sódio. Colocou-se novamente no banho maria 37°C por 30 minutos. Leu-se a coloração desenvolvida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 580nm.

3.4.1.2. Urease imobilizada

Pipetou-se 3ml de solução de uréia em tampão fosfato de sódio 0,2mo/L pH 6,5 nos frascos que continham 2g de grânulos com a urease imobilizada. Colocou-se no banho maria a 37°C por 15 minutos. Retirou-se uma alíquota de 150µL e colocou-se em um tubo contendo 2,5ml da solução fenol / nitroprussiato e 2,5mL da solução de hipoclorito / hidróxido de sódio. Colocou-se novamente no banho maria 37°C por 30 minutos e leu-se a coloração desenvolvida em 580nm.

3.4.2. Teste das propriedades da urease imobilizada

3.4.2.1. Curva de calibração da uréia

A curva de calibração da uréia foi construída com a urease livre. Pipetou-se 100µL de uréia nas concentrações de 4,2; 8,3; 12,5; 16,6; 24,9; 33,3 e 41,6 mmol/L e 50µL da solução de urease em tubos de ensaio. Depois procedeu-se conforme o item 3.4.1.1.

3.4.2.2. Efeito da enxertia do suporte

Pipetou-se 3ml de solução de uréia 0,04mol/L em tampão fosfato de sódio 0,2mol/L pH 6,5 nos frascos que continham 2g de grânulos de PE-g-AA e PP-g-AA com diferentes graus de enxertia e que continham a urease imobilizada. Depois procedeu-se como descrito no item 3.4.1.2.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENXERTIA DO ÁCIDO ACRÍLICO EM GRÂNULOS DE POLIETILENO E POLIPROPILENO

Nesta dissertação foram verificados experimentalmente alguns dos fenômenos que ocorrem durante o processo de enxertia do monômero ácido acrílico (AA) sobre grânulos de polipropileno (PP) e polietileno (PE), através da técnica da irradiação simultânea. São eles: o efeito da taxa de dose, dose total de irradiação e concentração do monômero dissolvidos em dois solventes (água e metanol). Outros efeitos como temperatura de reação e viscosidade inicial do meio de reação foram mantidos constantes.

4.1.1. Efeito da taxa de dose

O comportamento da enxertia dos grânulos de PE e PP em função da taxa de dose foi estudado com o ácido acrílico dissolvido em água e metanol, na proporção de 30% (v/v) e com uma pequena quantidade de inibidor de polimerização.

Na Fig. 8, é mostrada a enxertia do AA no PP, e em ambas as curvas observa-se um crescimento do grau de enxertia até uma taxa de dose aproximada de 0,24kGy/h. Com o aumento da taxa de dose houve uma diminuição gradual da enxertia. Na Fig. 9 é mostrada a enxertia do AA no PE, na qual pode-se observar que a baixas taxas de dose a reação de enxertia foi mais favorecida.

Este comportamento indica que existe um aumento da velocidade do processo a baixas taxas de dose, até atingir-se uma enxertia na qual a velocidade é máxima. A uma taxa de dose de irradiação mais elevada, a homopolimerização torna-se mais alta, diminuindo a disponibilidade do monômero e conseqüentemente, o grau de enxertia [56].

A diferença de comportamento entre os grânulos de PP e PE nas taxas de dose menores que 0.24kGy/h pode ser explicada pela maior cristalinidade do PP [21] e o menor valor de G_R (G_R do PP < G_R do PE) [23].

O intumescimento tanto na água como no metanol do PE e PP é muito baixo. Katbab *et al* [57], que trabalharam com borracha baseada no etileno - propileno (EPDM), concluíram que estes solventes não funcionam como agentes intumescedores, mas ativam preferencialmente a polimerização do monômero. Neste caso, o polímero enxertado foi predominantemente superficial e os solventes não permitiram que se elevasse muito a viscosidade do meio reacional.

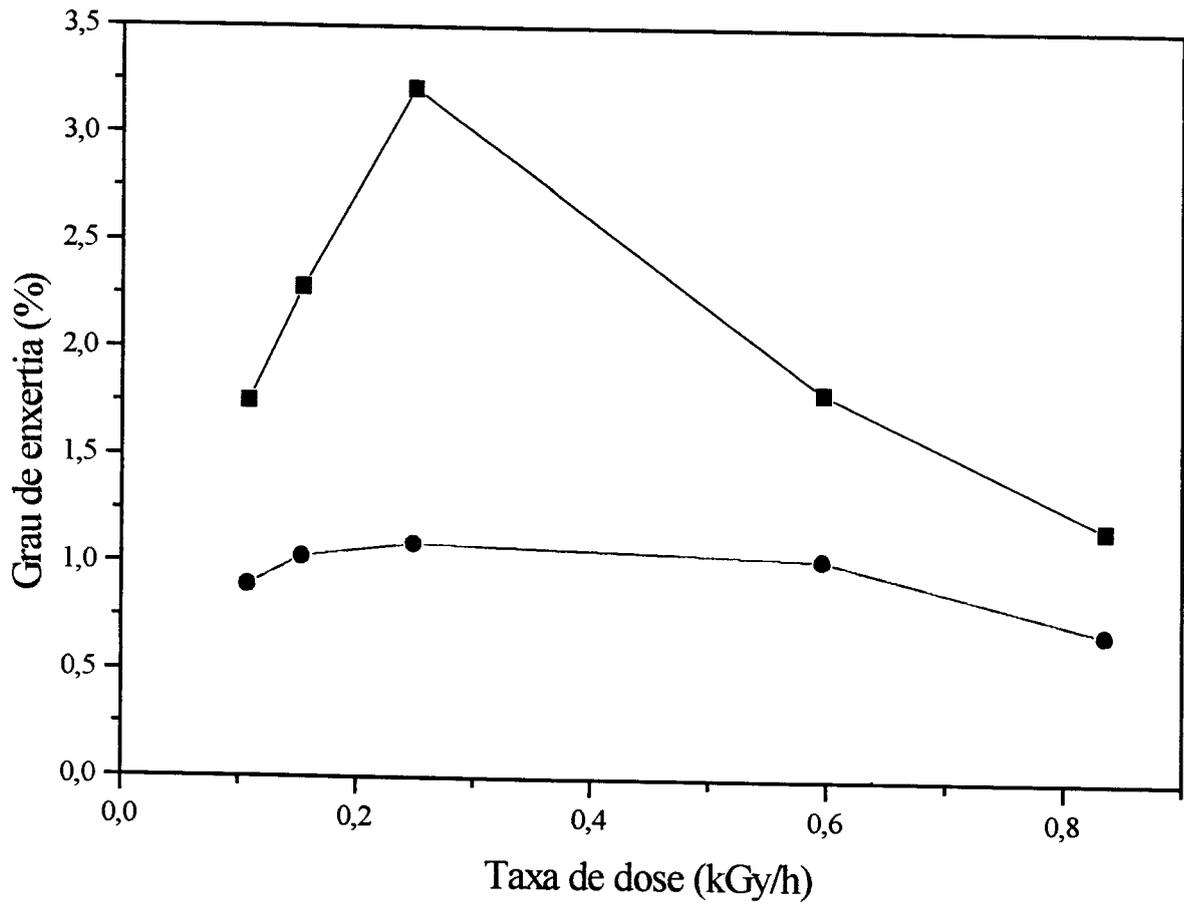


Figura 8. Percentual de enxertia do PP em função da taxa de dose. Dose total de irradiação: 5kGy. (■) AA na concentração de 30% v/v em metanol; (●) AA na concentração de 30% v/v em água.

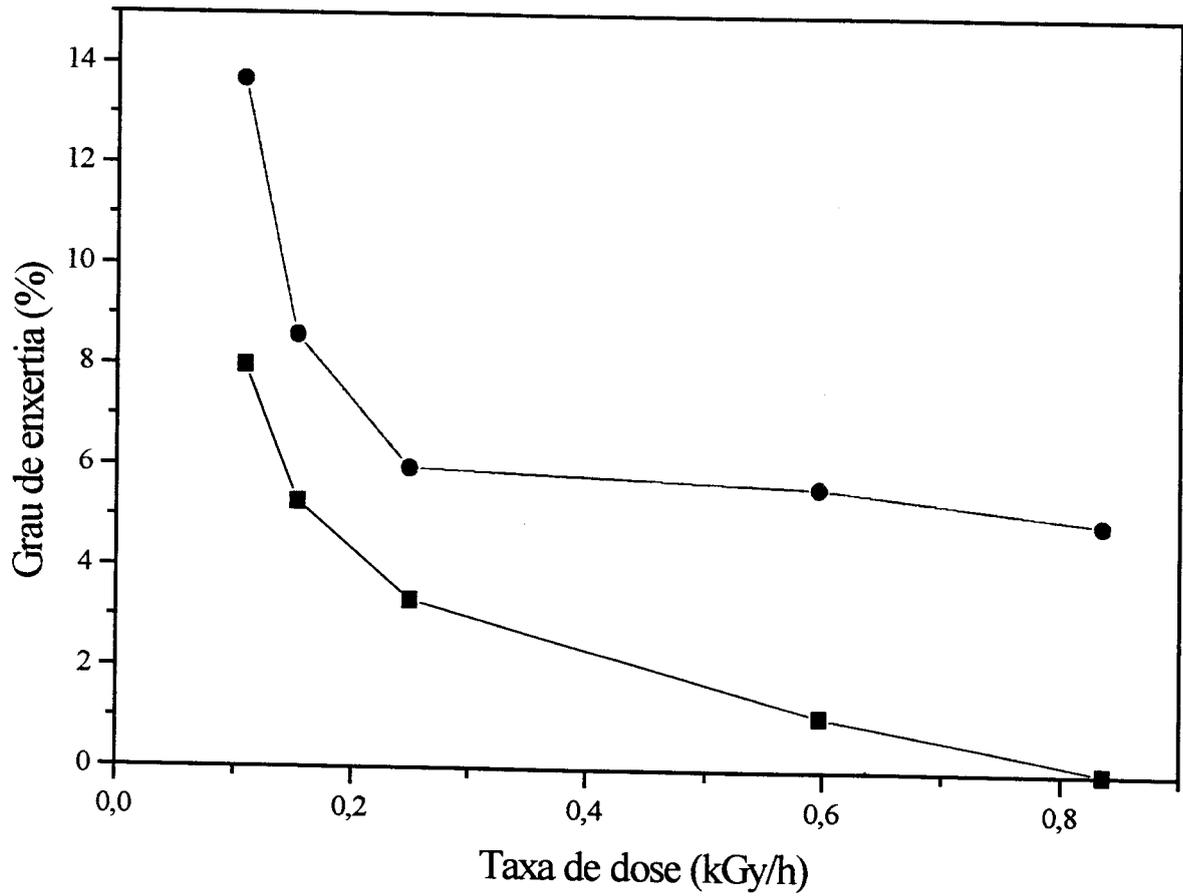


Figura 9. Percentual de enxertia do PE em função da taxa de dose. Dose total de irradiação: 5kGy. (■) AA na concentração de 30% v/v em metanol; (●) AA na concentração de 30% v/v em água.

4.1.2. Efeito da dose de irradiação

No estudo da dose de irradiação foi adotada a taxa de dose de 0.25kGy/h e a concentração do AA a 30%v/v em metanol para o PP, e em água para o PE.

Na Fig. 10a é mostrado o efeito da dose de irradiação na formação do PE-g-AA e PP-g-AA. Nesta figura observa-se que não houve reprodutibilidade dos dados referentes à condição de 5kGy que são apresentados nas Figs. 8 e 9, o que pode estar relacionado à forma irregular dos polímeros.

Embora uma das grandes vantagens da irradiação para obtenção de copolímeros de enxerto seja poder se usar o polímero em várias formas, na enxertia de substratos na forma de grânulos com tamanhos e formas irregulares, estes não apresentaram reprodutibilidade do grau de enxertia sob as mesmas condições experimentais. Todos os resultados, entretanto, mostraram a mesma tendência. Houve um aumento do grau de enxertia até atingir-se um máximo, ocorrendo depois uma diminuição com o aumento da dose total de irradiação, como se observa nas Figs. 10a e 10b.

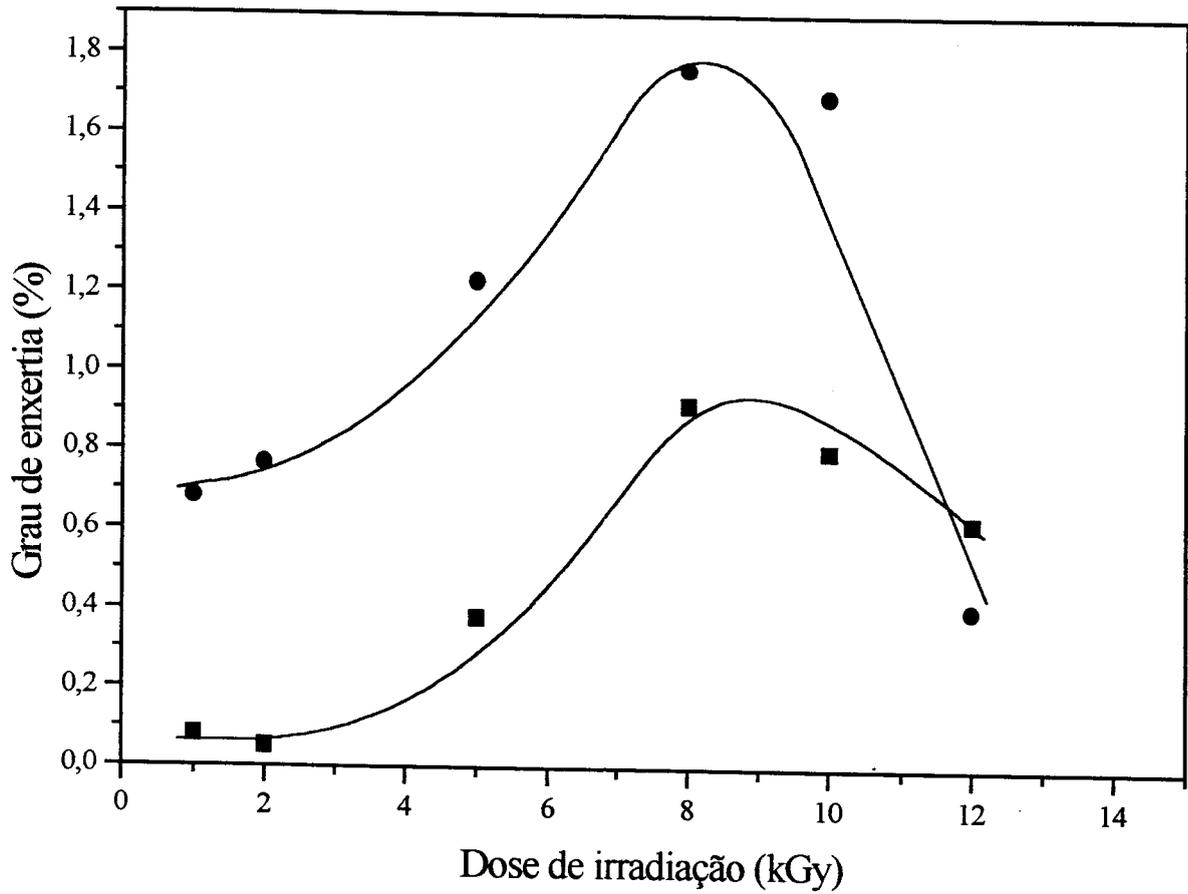


Figura 10a. Determinação do grau de enxertia em função da dose de irradiação. Taxa de dose: 0,25kGy/h. (■) Sistema: PP com AA na concentração de 30% v/v em metanol; (●) Sistema: PE com AA na concentração de 30% v/v em água.

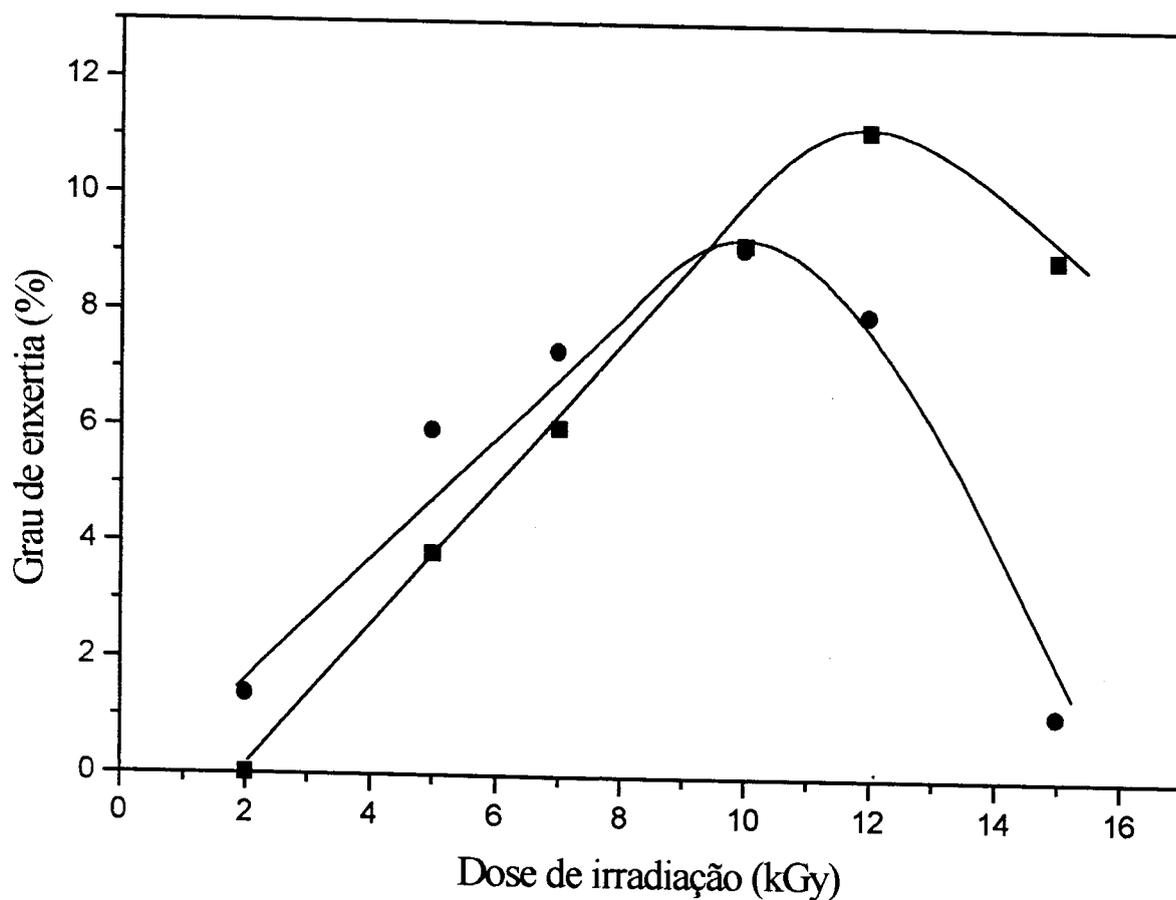


Figura 10b. Determinação do grau de enxertia em função da dose de irradiação. (■) Sistema: PP com AA na concentração de 30% v/v em metanol, na taxa de dose de 0,31kGy/h; (●) Sistema: PE com AA na concentração de 30% v/v em água, na taxa de dose de 0,21kGy/h.

4.1.3. Efeito da concentração do monômero

Para o estudo do efeito da concentração do monômero na enxertia do PE, tomou-se o AA diluído em água, e na enxertia do PP, AA diluído em metanol, ambos irradiados a 10kGy, como mostra a Fig. 11. Aqui observou-se que, com o aumento da concentração do monômero, há um aumento não linear no grau de enxertia até concentrações compreendidas ao redor de 40% (v/v) de AA nos dois solventes. A partir dessa concentração, observou-se uma diminuição no grau de enxertia.

A diminuição do grau de enxertia nas concentrações muito acima de 40%, pode ser devido à baixa solubilidade do monômero AA no poli(ácido acrílico) formado na superfície dos polímeros, retardando a ligação do monômero com os sítios ativos do polímero. Tal observação foi feita por Harada *et all* [19].

Então, o decréscimo do grau de enxertia ocorre porque há uma maior interação do monômero com ele mesmo, onde a viscosidade do meio reacional aumenta, dificultando a mobilidade dos radicais livres formados, aprisionando-os em suas cadeias em formação. Este fenômeno é conhecido como “efeito gel” [26].

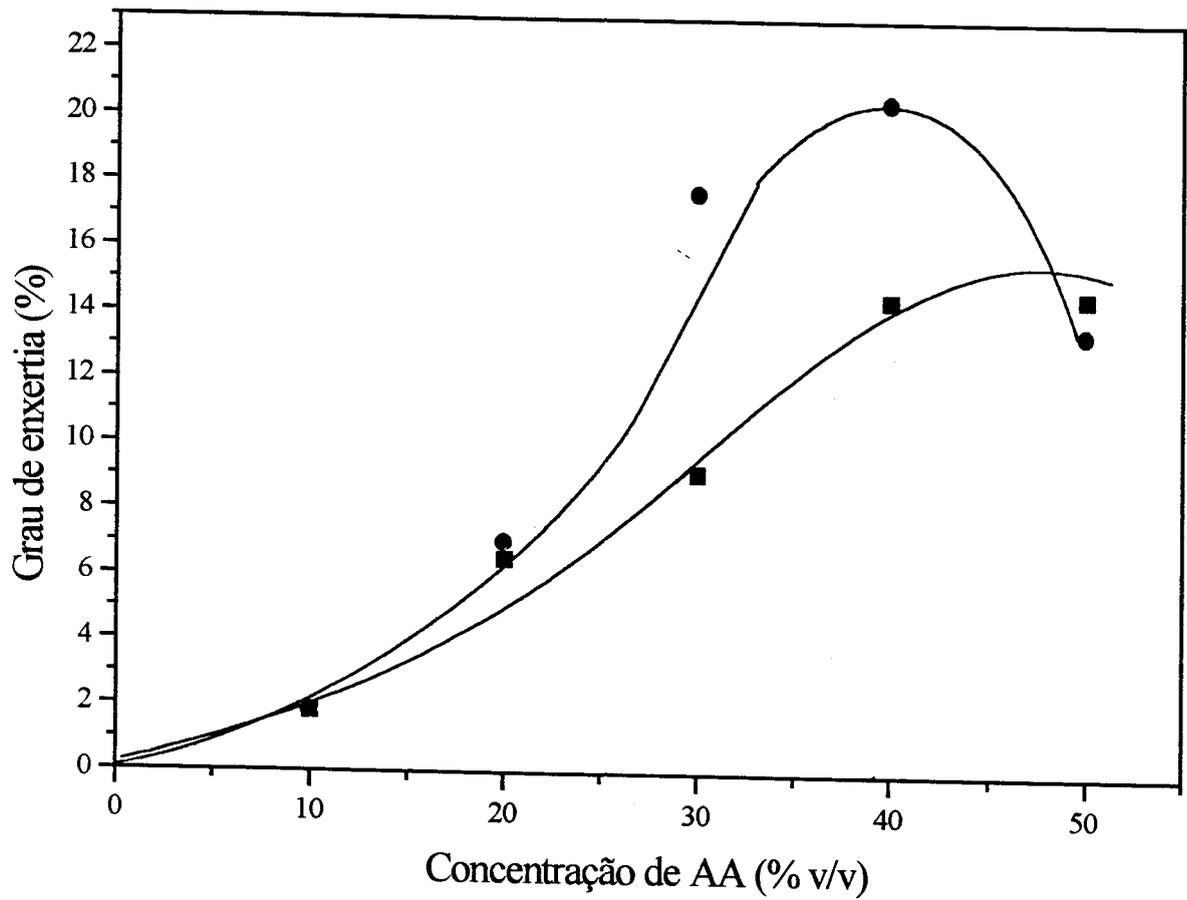


Gráfico 11. Grau de enxertia em função da concentração do AA. (■) Sistema: PP com AA em metanol; taxa de dose de 0,31kGy/h; e dose total de irradiação de 10kGy. (●) Sistema: PE com AA em água; taxa de dose de 0,21kGy/h; e dose total de irradiação de 10kGy.

4.1.4. Caracterização da superfície enxertada

4.1.4.1. Análise da superfície dos grânulos poliméricos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A copolimerização por enxertia induzida pela radiação pode levar a modificações significativas na estrutura do polímero. Estas modificações podem compreender uma mudança na topografia da superfície, como a formação de rugosidade, que podem influenciar nas propriedades físico-químicas do polímero.

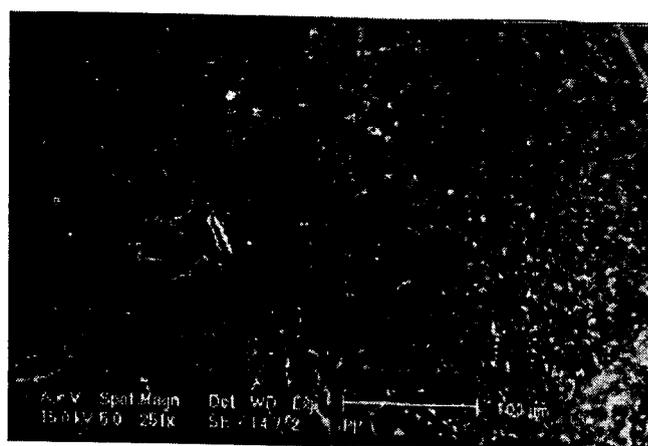
As superfícies poliméricas, após processo de enxertia, foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme mostrado nas Figs. 12 e 13, nas quais se observa um aumento de rugosidade com o aumento do grau de enxertia dos polímeros. As matrizes de PP e PE não enxertados também são mostrados na Fig. 12a e Fig. 13a, respectivamente.

As micrografias mostram a textura da superfície das amostras de PP e PE enxertadas com AA nas mesmas condições: concentração do AA a 30% v/v e dose de irradiação de 5kGy.

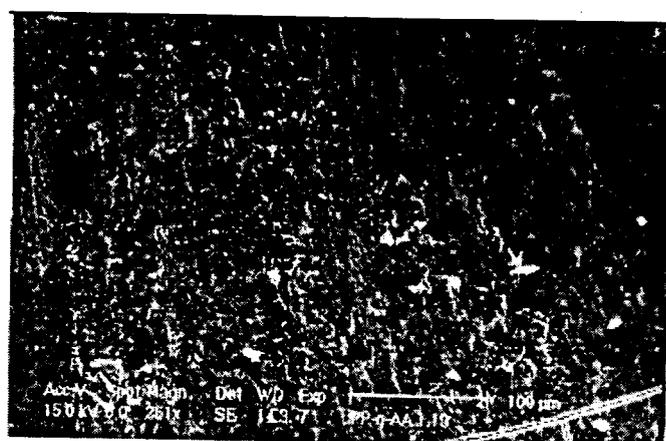
Na Fig. 12 observa-se que a superfície do PP que está mais modificada após a enxertia, é aquela obtida a uma taxa de dose mais baixa (0,154kGy/h), Fig. 12c, que tem a rugosidade aumentada em relação àquela obtida em uma taxa de dose maior (0,836kGy/h), Fig. 12b. A mesma diferença de topografia é mostrada com o PE enxertado com diferentes taxas de dose (Figs. 13b e 13c).

Estas topografias diferentes também foram notadas por Razzak [58], que enxertou o monômero dimetilacrilamida (DMAA) no polímero politetrafluoretileno (PTFE), variando a taxa de dose de irradiação.

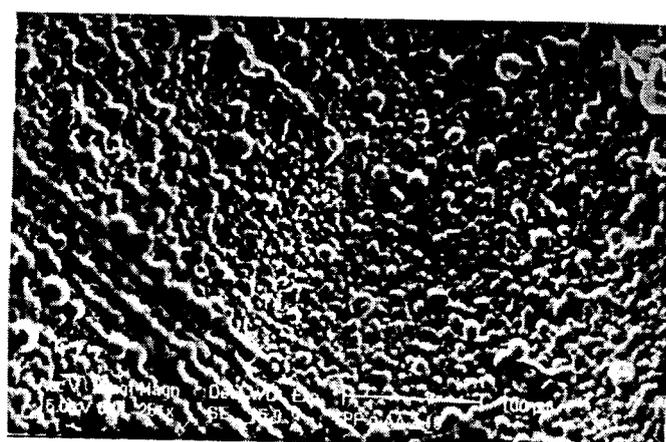
As observações obtidas das micrografias estão coerentes com os resultados obtidos no estudo da taxa de dose, mostrados nas Figs. 8 e 9. Aqui também pode-se observar que o percentual de enxertia nas amostras granulares, determinados pela variação da massa antes e após o processo de enxertia, não está relacionado com o percentual de superfície enxertada, e a relação massa - superfície é muito grande. Portanto, pequenos valores de grau de enxertia podem representar uma superfície com grande quantidade de enxerto, como pode ser observado nas micrografias (Figs. 12 e 13).



a

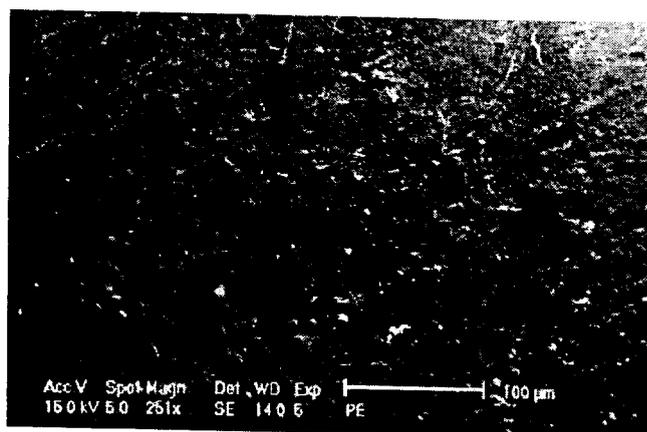


b

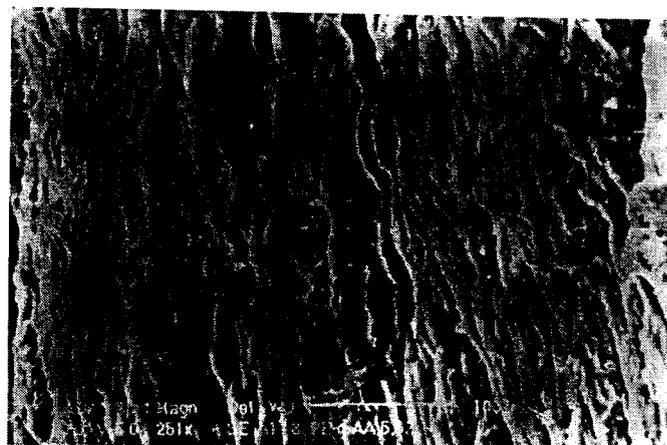


c

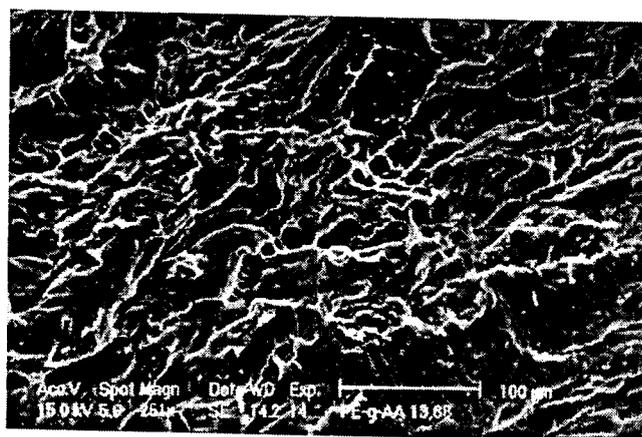
Figura 12. Micrografias dos grânulos de PP-g-AA obtidas por MEV. Aumento de 251X. Dose total de irradiação: 5kGy. Concentração de AA: 30% em metanol. (a) PP não enxertado; (b) PP-g-AA 1,19% de enxertia obtido na taxa de dose de 0,836kGy/h; (c) PP-g-AA 2,19% de enxertia obtido na taxa de dose de 0,145kGy/h.



a



b



c

Figura 13. Micrografias dos grânulos de PE-g-AA obtidas por MEV. Aumento de 251X. Dose total de irradiação: 5kGy. Concentração de AA: 30% em água. (a) PE não enxertado; (b) PE-g-AA 5,6% de enxertia obtido na taxa de dose de 0,599kGy/h; (c) PE-g-AA 13,68% de enxertia obtido na taxa de dose de 0,103kGy/h.

4.1.4.2. Hidrofilicidade

A capacidade de absorção de água é uma propriedade relacionada ao hidrogel poli (ácido acrílico), e varia conforme seu grau de enxertia [26, 59].

A determinação do grau de hidrofilicidade dos grânulos enxertados implica na confirmação do enxerto do AA nos grânulos de PE e PP, como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Grau de hidrofilicidade em função do nível de enxertia dos grânulos de PE e PP

Tipo do grânulo	Grau de enxertia (E%)	Hidrofilicidade (Hd%)
PE	0	0,13
	2,86	1,62
	5,62	3,66
	10,72	8,61
PP	0	0,06
	1,40	1,03
	2,50	1,33
	6,01	5,95

Nesta tabela observa-se que com o aumento do grau de enxertia, houve um aumento da retenção de água nos grânulos.

4.2. DETERMINAÇÕES SOBRE A GLICOSE OXIDASE

O efeito do pH, temperatura, força iônica e substrato nas preparação da enzima imobilizada são exemplos de parâmetros que devem ser determinados e comparados com os dados obtidos da enzima livre e devem ser realizados da mesma forma [43].

Para compreender a influência do microambiente na difusão do substrato sobre uma enzima imobilizada, foi determinado a diferença do K_m entre a enzima nativa e imobilizada.

4.2.1. Curva de calibração de glicose pelo método da *o*-dianisidina com glicose oxidase

Foi construída uma curva de calibração do consumo de glicose, que depois foi utilizada para o cálculo dos outros experimentos.

A região linear que obedece a lei de Lambert-Beer da curva de calibração da glicose é mostrada na Fig. 14.

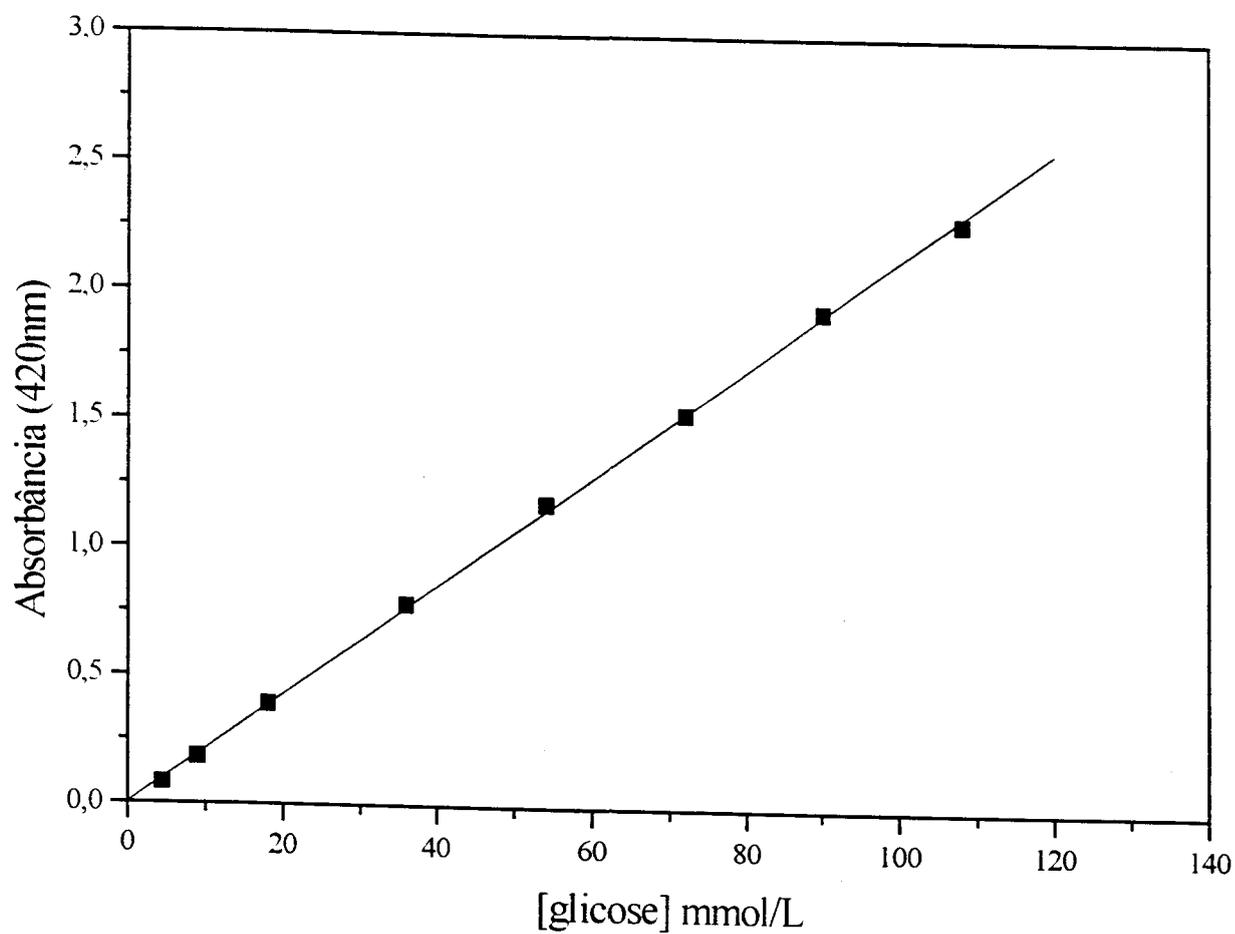


Figura 14. Curva linear da calibração da glicose.

Equação da reta da Fig. 14, usada para os cálculos de glicose consumida:

$$y = 2,11 \cdot 10^{-1} + 2,13 \cdot 10^{-2} x$$

$$r = 0,99982$$

$$sd = 0,01712$$

4.2.2. Determinação do efeito da enxertia do suporte na glicose oxidase imobilizada

Na Tabela 3 é mostrado o rendimento da imobilização (RI%) da glicose oxidase determinado pelo método de Bradford, dos grânulos de polipropileno (PP) e polietileno (PE) enxertados com o ácido acrílico (AA) com diferentes graus de enxertia. Na Tabela 4, é mostrado o efeito do grau de enxertia na atividade da glicose oxidase imobilizada.

Tabela 3. Efeito do grau de enxertia do AA em PP e PE no rendimento de imobilização (RI%) da glicose oxidase

Tipo de grânulo	Grau de enxertia (E%)	Rendimento de imobilização (RI %)
PE-g-AA	1,4	16,27
	2,5	16,50
	6,01	21,77
PP-g-AA	2,86	12,44
	5,62	20,31
	10,72	29,09

Tabela 4. Efeito do grau de enxertia do AA em PP e PE na atividade da glicose oxidase

Tipo de grânulo	Grau de enxertia (E%)	[glicose] consumida por g copolímero (mmol/L)
PE-g-AA	2,40	5,74
	4,95	3,80
	8,58	2,83
PP-g-AA	2,19	29,22
	3,11	8,13

Na Tabela 3 observa-se que com o aumento do grau de enxertia, houve um incremento na quantidade de glicose oxidase imobilizada. Na Tabela 4 observa-se que com o aumento da enxertia houve um decréscimo da atividade da enzima. Tais resultados foram também obtidos por outros pesquisadores [7, 8, 9, 10].

Hongfei *et al* [7] enxertaram o AA em filmes de polieteruretano (SPEU) para imobilização da peroxidase. Foi observado que a quantidade de enzima imobilizada aumenta com o aumento do grau de enxertia, porém a atividade diminui com o aumento da enxertia. A explicação dada é que a altos valores de enxertia, muitas moléculas de enzima ficam ligadas na superfície do filme, as quais provocam um impedimento estérico que pode bloquear o sítio ativo da enzima ou afetar a conformação dela.

Gombotz *et al* [8] enxertaram ácido metacrílico (MAAc) em PP e imobilizaram a asparaginase. Também foi observado que com o aumento do grau de enxertia houve uma diminuição da atividade, e que este comportamento pode ocorrer porque a enzima pode estar ligada mais proximamente devido à grande quantidade de grupos carboxílicos nos altos valores da enxertia. Isto pode romper o sítio catalítico. Além disso nos altos valores de enxertia, mais grupos carboxílicos estão presentes criando um microambiente ácido no qual a enzima é menos reativa. Isto pode ser devido a mudanças no substrato e difusão dos produtos, assim como mudanças na atividade intrínseca da enzima.

Considerando que maiores graus de enxertia representam um aumento da espessura do enxerto do AA na superfície do grânulo, e o AA sendo um hidrogel, vale a pena destacar que outros trabalhos onde foram utilizados hidrogéis para imobilização de enzimas, foi observado que quanto menor a espessura, a atividade apresentada era maior [60, 61, 62].

4.2.3. Determinação da estabilidade da glicose oxidase imobilizada

A capacidade da enzima em manter sua atividade após a imobilização foi uma vantagem verificada no desenvolvimento deste trabalho. Duas formas de estabilidade foram então abordadas: estabilidade da atividade em usos repetidos e sob condições de armazenamento, ambas foram verificadas com a glicose oxidase imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 3,11% de enxertia.

Na Fig. 15 é mostrado a estabilidade da glicose oxidase imobilizada sob condições de armazenamento em tampão Tris-HCl 0,05mmol/L pH8,0. Aqui observa-se que a glicose oxidase imobilizada e armazenada nestas condições, mantém sua atividade relativamente constante por pelo menos 20 dias. Este tipo de observação demonstra que o método utilizado para a imobilização por ligação covalente foi adequado e que a enzima não “desgrudou” do suporte.

A estabilidade em usos repetidos é mostrada na Fig. 16. Observa-se que a atividade da glicose oxidase imobilizada, que inicialmente era de 8,13 mmol/L/g de copolímero decresce nas duas primeiras utilizações, mantendo-se constante até a sétima utilização. Comportamento similar foi observado por outros pesquisadores [10, 62, 63,64].

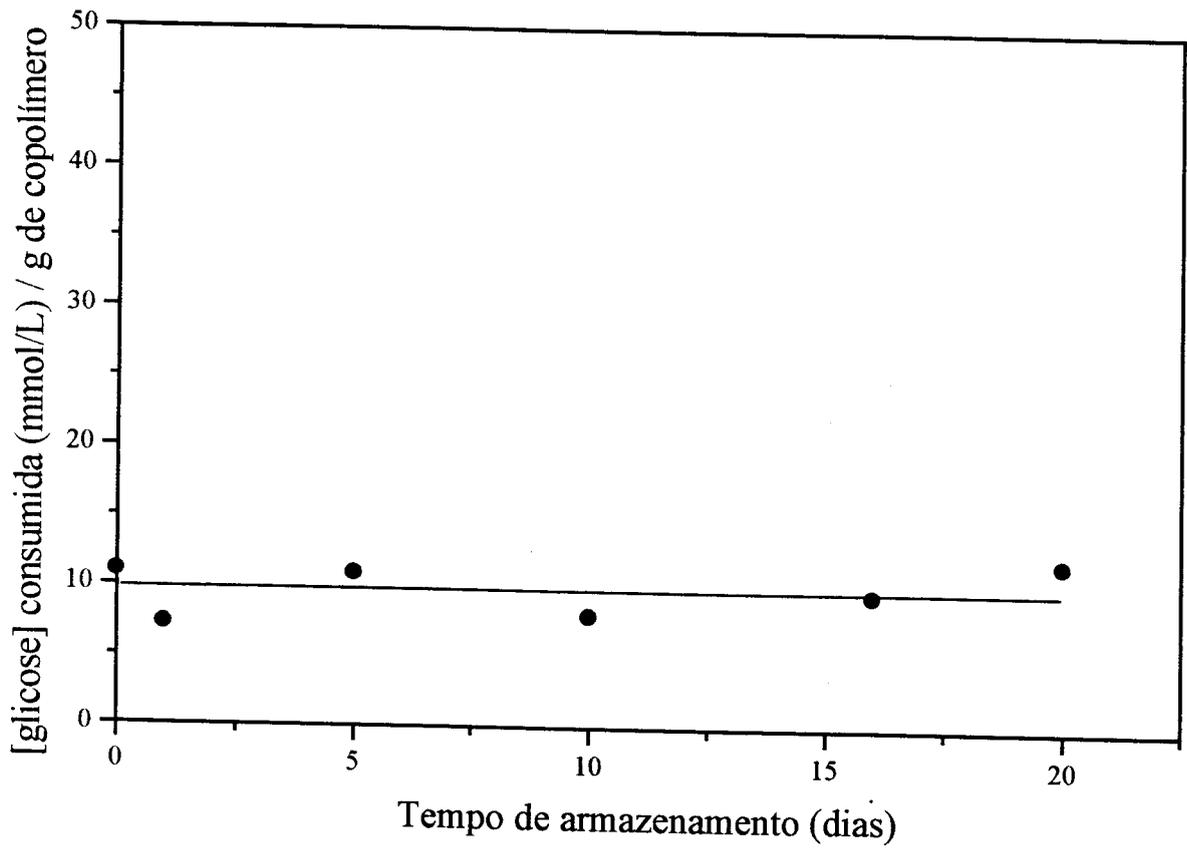


Figura 15. Medida da atividade da glicose oxidase immobilizada em grânulos de PP-g-AA com 3,11% de enxertia e armazenada em tampão Tris-HCl 0,05mmol/L pH8,0.

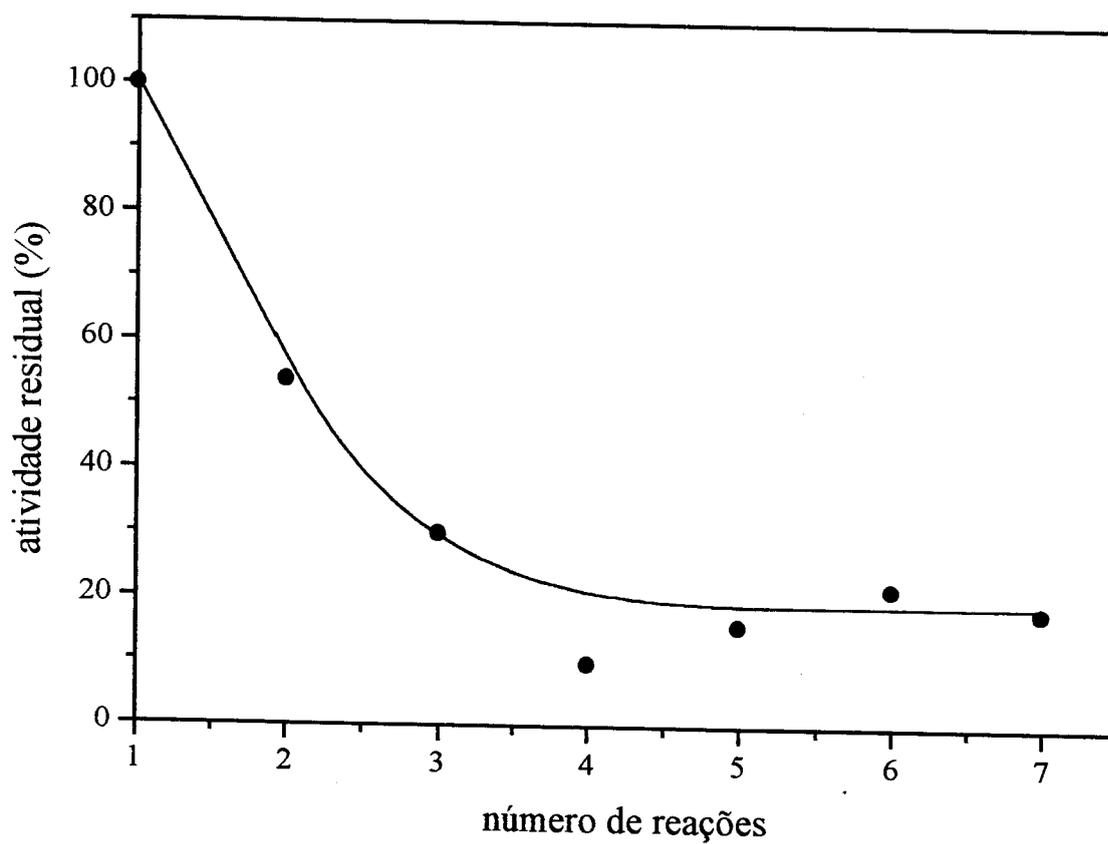


Figura 16. Sucessivas utilizações da glicose oxidase imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 3,11% de enxertia.

4.2.4. Efeito do pH na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada

O efeito do pH na glicose oxidase livre e imobilizada é mostrado na Fig. 17. Nesta figura, observa-se que a glicose oxidase teve alterada sua resistência frente a mudança de pH. Observa-se também que houve um estreitamento da faixa ótima de pH de atividade da enzima. O pH de atividade máxima para a enzima livre foi 4,5 e para a imobilizada foi 6.

De acordo com Free [44], a faixa de atividade da glicose oxidase situa-se entre o pH 4 a 7. A mudança do pH ótimo da enzima imobilizada pode ser atribuída à interação dos grupos polares do AA com os grupos funcionais da enzima e também devido a alterações na enzima durante a imobilização [64].

Por outro lado, o suporte enxertado é carregado negativamente, criando-se na vizinhança imediata das partículas sólidas, uma concentração de prótons no meio. O pH nesta zona é mais ácido que o medido no meio. Neste caso, a velocidade de difusão de íons H^+ na massa da solução influi no perfil da curva de atividade em função do pH. Embora o pH ótimo real da enzima seja imutável, mediu-se um deslocamento aparente para a zona básica [6].

A forma da curva dependente do pH é uma resultante de efeitos separados. A enzima pode catalisar a reação somente se o substrato enzimático está também na forma dissociada ou associada, e a extensão da dissociação é dependente do pH no sistema de reação e do pK de dissociação do grupo ácido ou básico do substrato. A atividade da própria enzima é também afetada pela extensão de dissociação de certos aminoácidos chaves da cadeia lateral da molécula protéica, tanto no "sítio ativo" como e em outra parte da molécula. Ambos o pH e o ambiente iônico têm um efeito na conformação tridimensional da proteína e portanto na sua atividade. A extremos valores de pH, as enzimas podem ser desnaturadas irreversivelmente. A extensão da desnaturação depende da temperatura e do período de exposição ao pH

extremo. A forma ativa de muitas enzimas consiste da associação de duas ou mais cadeias peptídicas individuais; a valores extremos de pH essas associações são rompidas, com conseqüente perda da atividade catalítica [16].

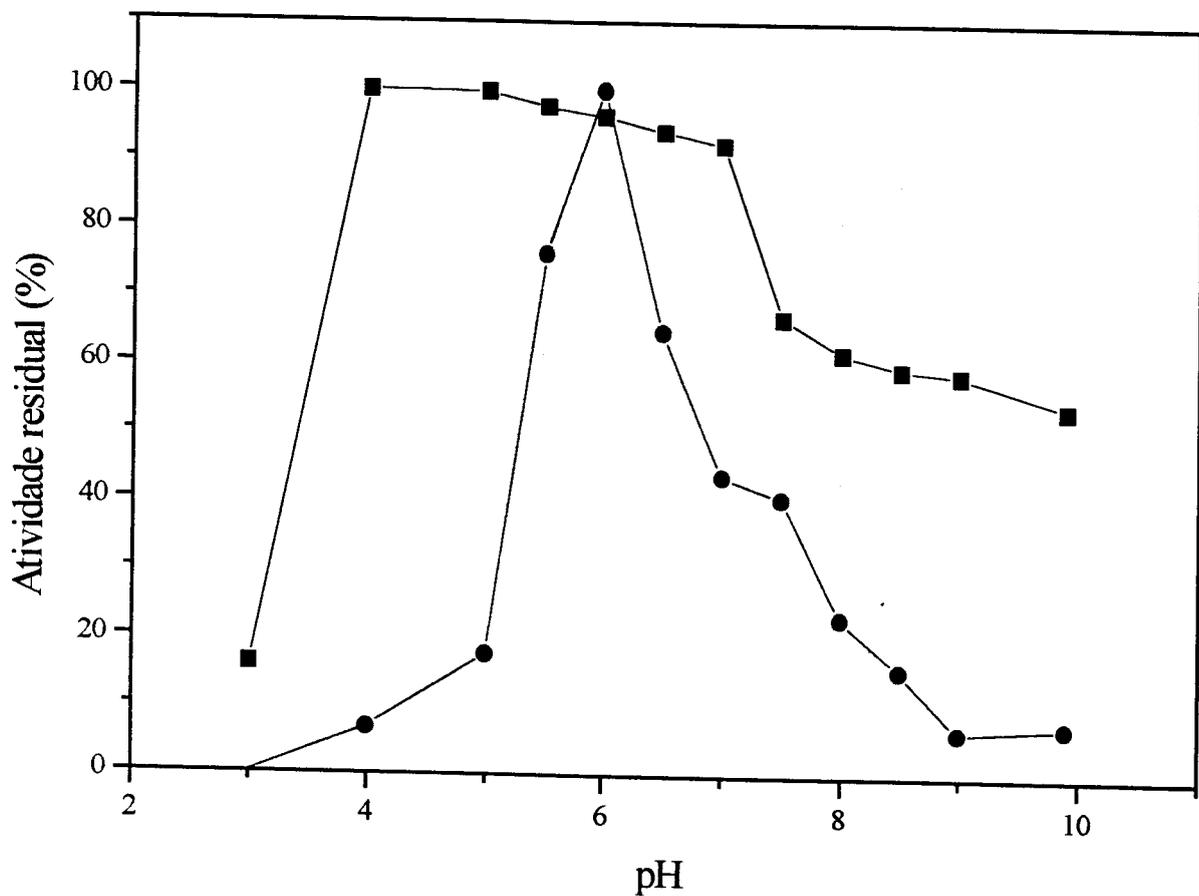


Figura 17. Efeito do pH na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada. Temperatura de reação: 37°C. (■) glicose oxidase livre; (●) glicose oxidase imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 2,10% de enxertia.

4.2.5. Efeito da temperatura na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada

Na Fig. 18 observa-se que nas temperaturas estudadas (32, 56 e 74°C) o comportamento foi semelhante, tanto para a glicose oxidase livre como para a imobilizada.

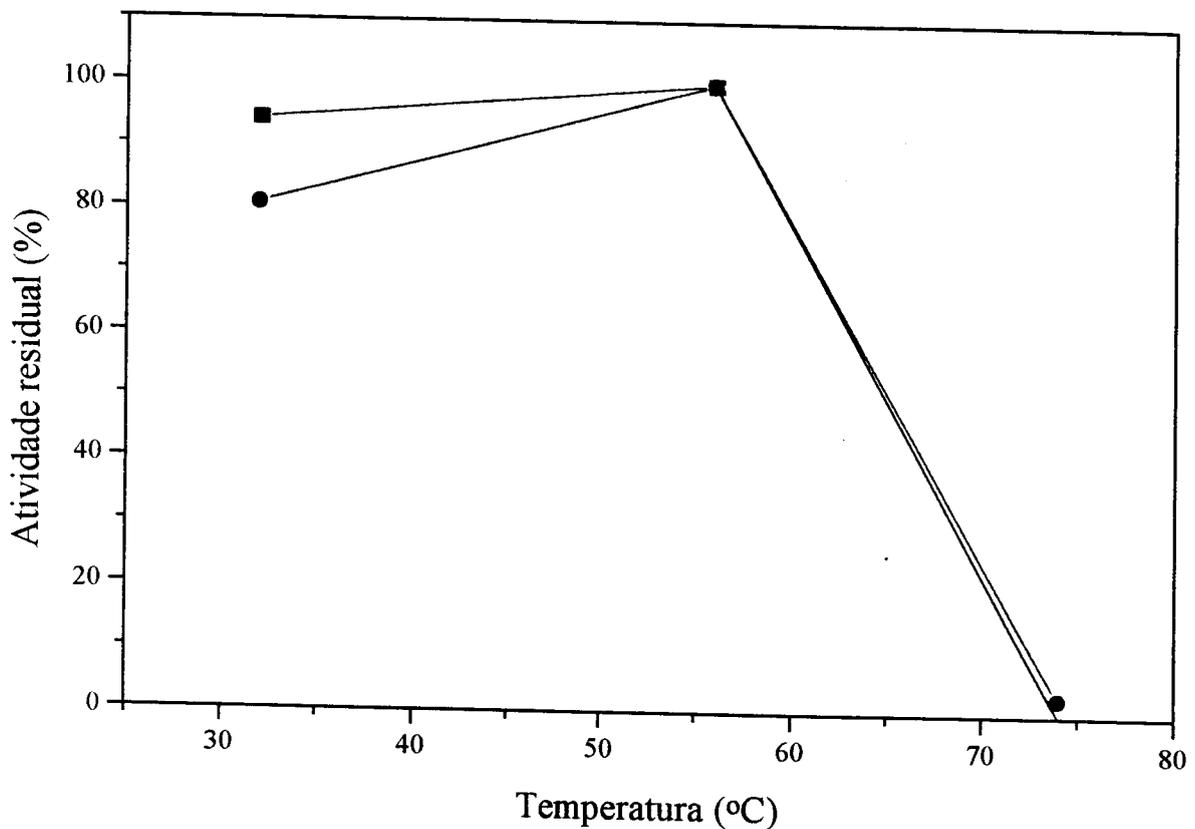


Figura 18. Efeito da temperatura na atividade da glicose oxidase livre e imobilizada (■) glicose oxidase livre, pH 7 em tampão Tris- HCl 0,5mol/L; (●) glicose oxidase imobilizada em PP-g-AA com 1,71% de enxertia, pH 6 em tampão fosfato dissódico - ácido cítrico 0,5mol/L.

4.2.6. Determinação da constante de Michaelis - Menten (K_m) e da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$)

A determinação da $V_{m\acute{a}x}$. e do K_m foram realizados utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk, conforme é mostrado na Fig.19 e os resultados são mostrados na Tabela 5. Os dados experimentais obtidos correspondem às condições operatórias do método padronizado.

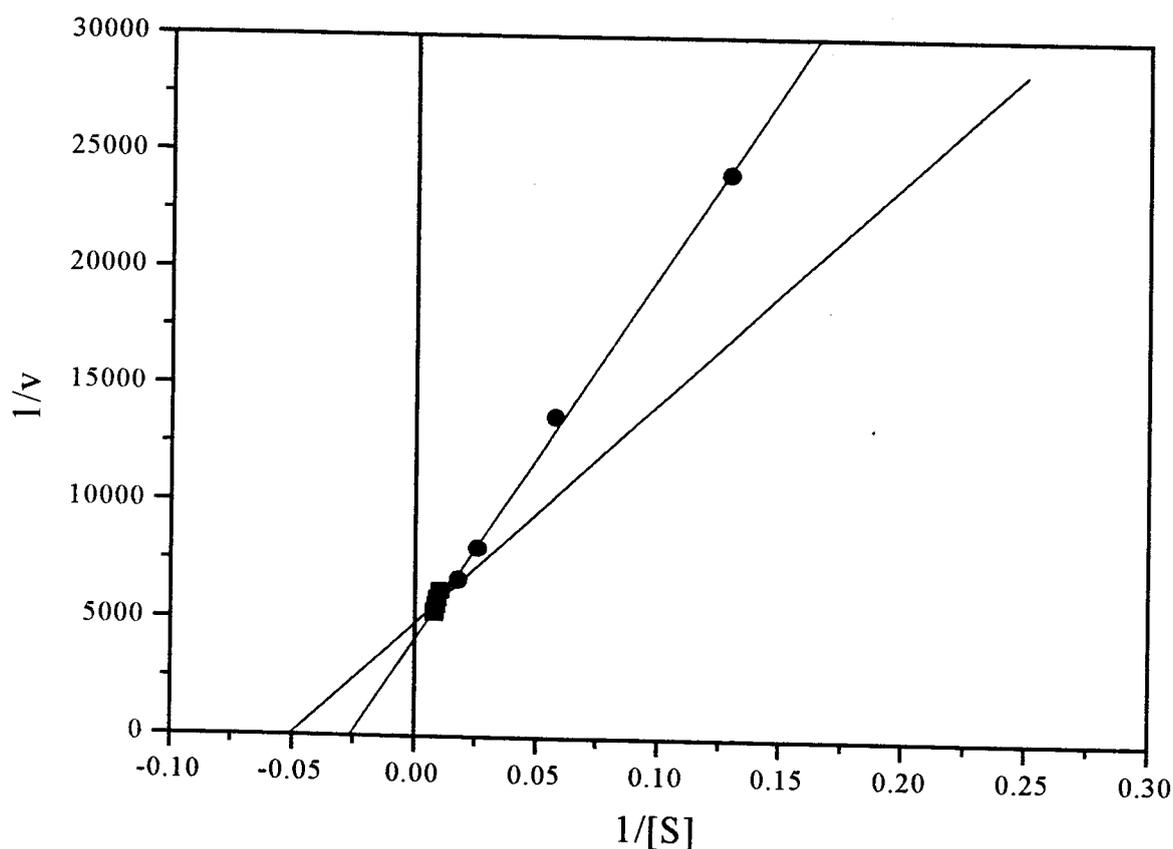


Figura 19. Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ ($1/v \times 1/[S]$). Temperatura de 37°C . (■) glicose oxidase livre, pH 7 em tampão Tris- HCl 0,5mol/L; (●) glicose oxidase imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 2,28% de enxertia, pH 6 em tampão fosfato dissódico - ácido cítrico 0,5mol/L.

Tabela 5. Comparação da determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da glicose oxidase livre e imobilizada em grânulos de PP-g-AA com 2,28% de enxertia, obtidos da Fig. 19.

parâmetros cinéticos	glicose oxidase livre	glicose oxidase imobilizada
equação da reta	$y = 2054,33 + 397795,72x$	$y = 4044,77 + 156529,79x$
r	0,998	0,999
K_m (mmol/L)	19,64	38,70
$V_{m\acute{a}x}$. (10^{-4} mmol $^{-1}$.L $^{-1}$.min $^{-1}$)	49,37	2,472

Na Fig.19 são mostrados os dois recíprocos em que foram determinados o K_m e a $V_{m\acute{a}x}$. A diferença entre estes parâmetros demonstra que houve interação entre a enzima e o suporte utilizado para imobilização. O aumento do K_m com consequente diminuição de $V_{m\acute{a}x}$. sugere que a enzima imobilizada teve uma perda de sua afinidade com o substrato (glicose) [56].

As diferenças entre K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de ambas as formas, pode estar refletindo indiretamente alguma alteração estrutural da enzima após imobilização. Por motivos de impedimento estérico da enzima, podem ocorrer limitações na difusão do substrato e produtos de reação, o que influencia no valor da $V_{m\acute{a}x}$ [65, 66].

4.3. DETERMINAÇÕES SOBRE A UREASE

4.3.1. Curva de calibração da uréia pelo método de Berthelot

Foi construída uma curva de calibração do consumo de urease, para posterior uso no cálculo dos outros experimentos. Esta curva de calibração é mostrada na Fig. 20.

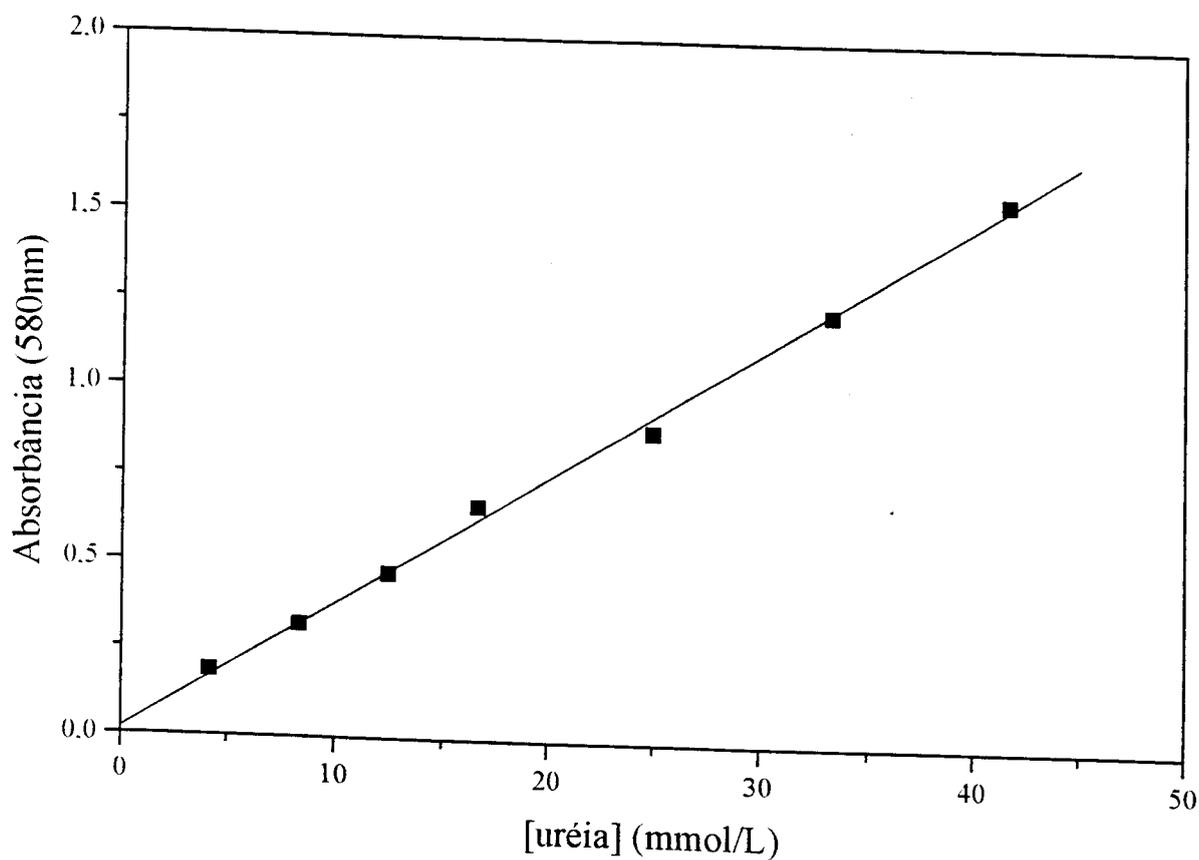


Figura 20. Curva de calibração de uréia.

Equação da reta da Fig. 20, usada para os cálculos de urease consumida:

$$y = 0,0181 + 0,0367.x$$

$$r = 0,99888$$

4.3.2. Determinação do efeito da enxertia do suporte na urease imobilizada

Na Tabela 6 é mostrado o rendimento de imobilização (RI%) da urease, determinado pelo método de Bradford, dos grânulos de polietileno (PE) e polipropileno (PP) enxertados com ácido acrílico (AA) com diferentes graus de enxertia. Observou-se que com o aumento do grau de enxertia, houve um incremento na quantidade de urease imobilizada. Entretanto, a urease imobilizada nos vários suportes não apresentou qualquer atividade catalítica, quando colocada em presença de seu substrato.

A perda total da atividade catalítica de uma enzima geralmente é atribuída a impedimentos estéricos que ocorrem na enzima devido a interações entre ela mesma e o suporte utilizado na imobilização [7, 8, 65].

Tabela 6. Efeito do grau de enxertia do AA em PE e PP no rendimento da imobilização (RI%) e na atividade da urease imobilizada

Tipo de grânulo	Grau de enxertia (E%)	Rendimento de imobilização (RI%)	[uréia] consumida por g de copolímero (mmol/L)
PE-g-AA	1,83	9	0
	5,27	23,1	0
	5,75	25,4	0
	14,59	27,0	0
PP-g-AA	2,40	14,75	0
	5,05	20,0	0
	8,44	21,9	0
	17,72	21,9	0

4.4. COMENTÁRIOS GERAIS

Neste trabalho foi realizada a obtenção de suportes poliméricos para a imobilização de enzimas de uso clínico. Os suportes poliméricos utilizados foram grânulos de polietileno (PE) e polipropileno (PP), que foram modificados superficialmente com o monômero ácido acrílico (AA) pela técnica da irradiação simultânea, havendo uma grande quantidade de grupamentos carboxílicos para acoplamento das enzimas.

Ao longo do desenvolvimento da enxertia, procurou-se determinar as condições experimentais ótimas para obtenção do maior grau de enxertia, porém, observou-se que não ocorreu reprodutibilidade dos resultados experimentais, o que foi atribuído ao formato de grânulos do PE e PP.

Além do formato de grânulos, a não reprodutibilidade dos resultados pode também ser atribuída à técnica de enxertia utilizada (técnica da irradiação simultânea). Stanett [14] em sua publicação comenta que no uso do sistema polietileno-ácido acrílico, na técnica de irradiação simultânea, é produzido preferencialmente o poli (ácido acrílico), diminuindo o grau de enxertia. Explica o fenômeno dizendo que isto ocorre porque o valor do $G(R\bullet)$ do polímero é menor que o valor do G (radical) do monômero e que este tipo de sistema (polietileno-ácido acrílico) funciona bem com as técnicas de preirradiação ou peroxidação. Tal observação também foi feita por Haddadi *et all* [23].

Entretanto, quando foram realizados os testes das propriedades das enzimas imobilizadas, observou-se que a enzima glicose oxidase apresentou melhor atividade quando ligada a grânulos de PE e PP, com baixos graus de enxertia de AA (por volta de 2%). Assim, para obtenção de baixos graus de enxertia, a técnica da irradiação simultânea mostrou ser eficiente e adequada ao propósito do trabalho.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Pelo interesse em se desenvolver polímeros biofuncionais, o enxerto do AA nos grânulos de PE e PP combinou características desejáveis de ambos os polímeros e propriedades do monômero. Do PE e PP visou-se a estabilidade mecânica, a propriedade inerte e a disponibilidade comercial. Do monômero AA produziu-se o poli (ácido acrílico) para utilização de seus grupamentos ácidos na imobilização química das enzimas glicose oxidase e urease, ambas de interesse clínico.

Uma pequena modificação na superfície dos suportes poliméricos enxertados, foi suficiente para uma efetiva imobilização da enzima glicose oxidase.

A enzima glicose oxidase imobilizada no suporte apresentou uma vantagem muito apreciável que foi a sua estabilidade sob armazenamento, reutilização e mudança de temperatura, embora tenha ocorrido uma influência do suporte na atividade da enzima (alteração da estabilidade frente ao pH; aumento do K_m com consequente diminuição da $V_{máx.}$).

Entretanto, para a enzima urease, estes suportes enxertados com o AA não se mostraram adequados para manutenção da atividade após imobilização química.

REFERÊNCIAS

01. CARENZA, M. Recent Achievements in the Use of Radiation Polymerization and Grafting for Biomedical Applications. *Radiat. Phys Chem.*, v. 39, n. 6, p. 485-493, 1992.
02. WILLIAMS, D.F. (ed) *Definitions in biomaterials*: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.38 (progress in biomedical engineering, 4).
03. KAETSU, I. Radiation Synthesis and Fabrication for Biomedical Applications. *Radiat. Phys Chem.*, v. 46, n. 4-6, p. 1025-1030, 1995.
04. IVANOV, V.S.; Radiation-Chemical Transformations of Polymers In: IVANOV, V.S. *Radiation Chemistry of Polymers*, The Netherlands: VSP Utrecht, 1992. p. 123-139.
05. HOFFMAN, A.S. Applications of Ionizing Radiation and Plasma Gas Discharge Processing in Medicine and Biotechnology. In: RADIATION TECHNOLOGY FOR IMMOBILIZATION OF BIOACTIVE MATERIALS. June 15-18, 1987, Beijing. *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1988. p. 25-54. (IAEA-TECDOC, 486)
06. BERSET, C. Enzimas Imobilizadas. In: SCRIBAN, R (coord.). *Biotecnologia*. São Paulo, S.P.: Manole, 1985. p. 221-237.
07. HONGFEI, H.; GUANGHUI, W.; JILAN, W. Immobilization of Peroxidase on SPEU Film Via Radiation Grafting. *Radiat. Phys Chem.*, v. 31, n. 4-6, p. 761-767, 1988.
08. GOMBOTZ, W.; HOFFMAN, A.; SCHMER, G.; UENOYAMA, S. Immobilization Enzymes in Blood Plasma Exchangers Via Radiation Grafting. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 2, n. 4-6, p. 594-556, 1985.
09. da SILVA, M.A.; GIL, M.H.; GUIOMAR, J.; LAPA, E.; MACHADO, E.; MOREIRA, M.; GUTHRE, J.T.; KOTOV, S. The Immobilization of Enzymes onto Poly(ethylene)-g-co-Methacrylic Acid, [Poly(ethylene)-g-co-Hydroxyethyl Methacrylate]-g-co-Methacrylic acid and [Poly(ethylene) - g.co - Methacrylic Acid] - g.co - Hydroxyethyl Methacrylate. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 36, n. 4, p. 589-593, 1990.

10. D'ANGIURO, L.; CREMONESI, P. Immobilization of Glucose Oxidase on Sepharose by UV-Initiated Graft Copolymerization. *Biotech. Bioeng.*, v. 24, p. 207-216, 1982.
11. da SILVA, M.A.; BEDDOWS, C.G.; GIL, M.H.; GUTHRIE, J.T.; GUIOMAR, A.J.; KOTOV, S.; PIEDADE, A.P. The Application of Radiation-Induced Processed Copolymers to Biocatalysts Immobilization *Radiat. Phys Chem.*, v. 35, n. 1-3, p. 98-101, 1990.
12. GARNETT, J.L. Grafting. *Radiat. Phys Chem.*, v. 14, p. 79-99, 1979.
13. KAETSU, I. Biomedical Materials, Devices and Drug Delivery Systems by Radiation Techniques. *Radiat. Phys Chem.*, v. 47, n. 3, p. 419-424, 1996.
14. STANNETT, V.T. Radiation Grafting- state-of-the-art. *Radiat. Phys Chem.*, v. 35, n. 1-3, p. 82-87, 1990.
15. MÜLER - SCHULTE, D. Synergistic - Radiation Grafting: A Novel Modification Technique For the Preparation of Biomaterials. *Radiat. Phys Chem.*, v. 42, n. 4-6, p. 891-896, 1993.
16. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 2 ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders, 1994.
17. CHAPIRO, A. Chapter XII - Preparation of Graft Copolymers with the Aid of Ionizing Radiations. In: CHAPIRO, A. *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*. London: Interscience, 1962. p. 596-691.
18. WILSON, J.E. Radiolytic Grafting of Monomers on Polymeric Films. In: WILSON, J.E. *Radiation Chemistry of Monomers, Polymers, and Plastics*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1974. p. 477-517.
19. HARADA, J.; CHERN, R.T.; STANNETT, V.T. Acrylic-Acid-Grafted Polyethylene by Electron Beam Preirradiation Method. In: CLOUGH, R.L.; SHALABY, S.W. (eds) *Radiation Effects on Polymers*. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. p. 238-250. (ACS Symposium Series 475).
20. RAZZAK, M.T.; TABATA, Y.; OTSUHATA, K. Modification of Natural Rubber by Different Grafting Techniques. *Radiat. Phys Chem.*, v. 42, n. 1-3, p. 57-60, 1993.
21. MÚSICO Filho, W. *Efeito da Radiação Ionizante no Polímero Nacional*. São Paulo: 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. p 87.

22. YASUKAWA, T.; TAKAHASHI, T.; MURAKAMI, K.; ARAKI, K.; SASUGA, T.; OHMICHI, H. Kinetics of Radiation - Induced Grafting Reactions. I. Polyethylene - Styrene Systems. *J. Polym. Sci.*, v. 10, suppl. A-1, p. 259-273, 1972.
23. HADDADI-ASL, V.; BURFORD, R.P.; GARNETT, J.L. Radiation Graft Modification of Ethylene-Propylene Rubber - I. Effect of Monomer and Substrate Structure. *Radiat. Phys Chem.*, v. 44, n. 4, p. 385-393, 1994.
24. DREYFUSS, P.; QUIRK, R.P. Graft Copolymers. In: MARK, H.F.; BIKALES, N.M., OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. *Encyclopedia of Polymers Science and Engineering*. New York N.Y.: Wiley, 1987, v. 7. p. 551-579.
25. HADDADI-ASL, V.; BURFORD, R.P.; GARNETT, J.L. Radiation Graft Modification of Ethylene-Propylene Rubber - II. Effect of Additives. *Radiat. Phys Chem.*, v. 45, n. 2, p. 191-198, 1995.
26. YGIT, T.; TEKIN, N.; ERKAN, S.; GÜVEN, O. Determination of Gelation Doses of Gamma-Irradiated Hydrophilic Polymers by Different Methods. *Radiat. Phys Chem.*, v. 43, n. 4, p. 323-327, 1994.
27. CHAPIRO, A.; DULIEU, J.; LABORITE, F., Gamma - Ray Initiated Polymerization of Acrylic Acid in Solutions. In: DOBÓ, J.; HEDVING, P. (eds) TIHANY SYMPOSIUM ON RADIATION CHEMISTRY, 3. May 10-15, 1971, Tihany. *Proceedings...* Budapest: Akadémiai Kiadó, 1972. p. 649-657.
28. HUGLIN, M.B.; JOHONSON, B.L. Role of Cations in Radiation Grafting and Homopolymerization. *J. Polym. Sci.*, v. 7, suppl. A-1, p. 1379-1384, 1969.
29. STANNETT, V. Grafting. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 18, n. 1-2, p. 215-222, 1981.
30. GARGAN, K.; KRONELI, E.; LOVELL, K.V. Pre-Irradiation Grafting of Hydrophilic Monomers onto Polyethylene - I. The Influence of Homopolymersation Inhibitors. *Radiat. Phys Chem.*, v. 36, n. 6, p. 757-761, 1990.
31. CHAPIRO, A.; SEIDLER, P. Preparation et Proprietes de Quelques Membranes Semi-Permeable Obtenues par Greffage de Films de Polytetrafluoroethylene dans Leur Masse. *Eur. Polym. Journ.*, v. 1, p. 189-205, 1965.
32. KABANOV, V. Ya. Radiation Induced Graft Polymerization in the U.S.S.R. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 33, n. 1, p. 51-60, 1989.

33. HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - an introduction*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 212.
34. NELSON & GRIFFIN apud HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - an introduction*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 212.
35. SUMNER apud HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - an introduction*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 212.
36. GRUBHOFFER & SCLEITH apud HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - an introduction*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 212.
37. MANECKE apud HARTMEIER, W. *Immobilized Biocatalysts - an introduction*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 212.
38. OLLIS, D.F.; DATTA, R. Activity Correlations Between Similarly Modified Soluble and Immobilized Enzymes. In: MOSBACH, K. *Methods in Enzymology - Immobilized Enzymes*. New York, N.Y.: Academic, 1976, v. 44. p. 444-450.
39. INAKI, Y. The Immobilization of Enzymes. In: TAKEMOTO, K.; INAKI, Y.; OTTENBRITE, R.M. (eds) *Functional Monomers and Polymers - procedures, synthesis, applications*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1987. p. 461-505.
40. GACESA, P.; HUBBLE, J. *Tecnología de las Enzimas*. Zaragoza: Ascribia, 1990. p. 94-95.
41. STREYER, L. *Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman, 1975. p. 124-126.
42. SEGEL, I.H. *Bioquímica - teoria e problemas*. Rio de Janeiro, R.J.: Livros técnicos e Científicos, 1979. p. 287-288.
43. WOODWARD, J. Immobilized Enzymes: Adsorption and Covalent Coupling. In: WOODWARD, J. (ed.) *Immobilised Cells and Enzymes*. Washington D.C.: IRL Oxford, 1985. p. 3-17.
44. FREE, A.H. Enzymatic Determinations of Glucose. *Adv. Clin. Chem.*, v. 6, p. 67-96, 1963.
45. BRIGHT, H.J.; PORTER, D.J.T. Flavoproteins Oxidases. In: BOYER, P.D. *The Enzymes*, 3 ed. New York, N.Y.: Academic, 1975, v. 12: Oxidation reduction - part B. p. 421-505.

46. Von STORP, G.N.L.H.; GUILBAULT, G.G. Enzyme Electrode for Glucose Based on an Iodide Membrane Sensor. *Anal. Chim. Acta*, v. 66, p. 443-455, 1973.
47. UPDIKE, S.J.; SHULTS, M.C.; BUSBY, M. Continuous Glucose Monitor Based on an Immobilized Enzyme Electrode Detector. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 93, n. 4, p. 519-527, 1979.
48. DUMONT, J.; FORTIER, G.; Behavior of Glucose Oxidase Immobilized in Various Electropolymerized Thin Films. *Biotech. Bioeng.*, v. 49, p. 544-552, 1996.
49. KAPLAN, A. The Determination of Urea, Ammonia, and Urease. *Meth. Biochem. Anal.*, v. 17, p. 311-324, 1969.
50. REITHEL, F.J. Ureases In: BOYER, P.D. *The enzymes*. New York, N.Y.: Academic, 1971, v. 4: Hydrolysis. p. 1-21.
51. (THE) **MERCK Index**, 11 ed. Rahway, N.J., U.S.A.: MERCK & CO, 1989. p. 9789.
52. MASCINI, M., GUILBAULT, G.G. Urease Coupled Ammonia Electrode for Urea Determination in Blood Serum. *Anal. Chem.*, v. 49, n. 6, p. 759-789, 1977.
53. COULET, P.R.; JULLIARD, J.H.; GAUTHERON, D.C. A Mild Method of General Use for Covalent Coupling of Enzymes to Chemically Activated Collagen Films. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 16, p. 1055-1068, 1974.
54. BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
55. DAHLQVIST, A. Assay of Intestinal Disaccharidases. *Anal. Biochem.*, v. 22, p. 99-107, 1968.
56. QUEIROZ, A.A.A. *Obtenção de Copolímeros de Enxerto via Radiação Ionizante, Caracterização e Estudo de suas Propriedades Hemocompatíveis*. São Paulo: 1993. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. p. 157.
57. KATBAB, A.A.; BURFORD, R.P.; GARNETT, J.L. Radiation Grafting Modification of EPDM Rubber. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 39, n. 3, p. 293-302, 1992.

58. RAZZAK, M.T. *Radiation Grafting Studies on the Modification of Fluoropolymers and Natural Rubber for Biomaterials*. Tokyo: 1988. Thesis (Degree of Doctor) - Department of Nuclear Engineering, Faculty of Engineering, University of Tokyo. p. 287.
59. NEMEC, J.W.; BAUER Jr., W. Acrylic and Methacrylic Acid Polymers. In: MARK, H.F.; BIKALES, N.M., OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. *Encyclopedia of Polymers Science and Engineering*. New York, N.Y.: Wiley, 1987, v. 1, p. 211-234.
60. KUMAKURA, M.; KAETSU, I. Immobilization of Cellulase by Radiation Polymerization. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, v. 34, n. 10, p. 1445-1450, 1983.
61. CARENZA, M.; VERONESE, F.M. Entrapment of Biomolecules into Hydrogels Obtained by Radiation - Induced Polymerization. *J. Controlled Release*, v. 29, p. 187-193, 1994.
62. CHABANE-SARI, S.M.; HADJADJ, A. Immobilization of Glucose Oxidase by Radiation - Induced Polymerization. *J. Chim. Phys.*, v. 90, p. 1055-1065, 1993.
63. KAWAKAMI, M.; KOYA, H.; GONDO, S. Immobilization of Glucose Oxidase on Polymer Membranes Trated by Low-Temperature Plasma. *Biotech. Bioeng.*, v. 32, p. 369-373, 1988.
64. DORETTI, L.; FERRARA, D.; LORA, S. Enzyme - Entrapping Membranes for Biosensors Obtained by Radiation-Induced Polymerization. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 8, p. 443-450, 1993.
65. WANG, C.C.; HSIUE, G.H. Glucose Oxidase Immobilization onto a Plasma-Induced Graft Copolymerized Polymeric Membrane Modified by Poly(ethylene oxide) as a Spacer. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 50, p. 1141-1149, 1993.
66. VITOLO, M.; BARROS, D.P.; Sucrose Hydrolysis by Invertase Immobilized on Chitin. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, v. 25, p. 240-243, 1992.