

UFMS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



JOSÉ MANOEL MARCONCINI

UTILIZAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA COMO
ENZIMA MODELO NO PROCESSO DE
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS
EM ÉSTER XÂNTICO DERIVADO DE CELULOSE

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química, junto a o Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Célia Maria da Silva Oliveira

Campo Grande

-2000-



UFMS

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE
JOSÉ MANOEL MARCONCINI**

**“UTILIZAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA COMO ENZIMA MODELO NO
PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM ÉSTER XÂNTICO
DERIVADO DE CELULOSE”**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação - Nível de Mestrado em Química (Resolução N. 13/2000) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química - Área de Concentração: Físico-Química.

Aprovada por:

Prof.ª. Dr.ª. Célia Maria da Silva Oliveira
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora
DQI - UFMS

Prof. Dr. Roy Eduard Bruns
IQ - UNICAMP

Prof. Dr. José Dilson Silva de Oliveira
UNIOESTE

Aos meus pais, Adeval e Zilda,
e à minha irmã, Sandra,
pelo esforço conjunto nesta caminhada.

À Lucinéia,
minha incansável companheira,
com muito amor e carinho.

Agradecimentos

A realização de um mestrado é por vários momentos um trabalho solitário e exaustivo, porém impossível sem o auxílio daqueles que colaboram na sua concretização. Agradeço de antemão a todos que conviveram e participaram da realização deste trabalho, e peço que não desanimem, pois a pesquisa é árdua, porém imprescindível, pois o futuro de todos depende dela.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Célia Maria da Silva Oliveira pelos seus ensinamentos, apoio total e espírito de luta na concretização deste projeto.

À Prof^a. Dr^a. Neuza M. M. Somera, pela receptividade no Departamento de Química e auxílio durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Maia, pela convivência, discussões e ensinamentos na área de Físico-Química, e aos espectros de infravermelho.

Ao Prof. Dr. José Dílson Silva de Oliveira pelo aprendizado, espírito de luta e pelas análises térmicas.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez pelo apoio e perseverança durante a realização deste mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Rozanna Marques Muzzi e ao Prof. Dr. Dênis Pires de Lima pela convivência, aprendizado e perseverança no LP-4.

À Prof^a. Dr^a. Neli Kika Honda e ao Prof. Dr. Onofre Salgado Siqueira, pelos artigos e ensinamentos durante este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Garcez pelo auxílio neste projeto.

Aos colegas da primeira turma de mestrado: Daniel Mendes, Edilene D. Rodrigues, Eunisse G. B. Lopez (*in memoriam*), Luzinátia Ramos, Maria José de Camargo e Matildes Blanco, pela amizade, estudo árduo, convivência e comemorações durante o mestrado.

Ao acadêmico Aldo Alves de Souza, pelo auxílio durante este projeto.

Aos técnicos do DQI, Luís Leonardo pelos espectros de infravermelho e memoráveis discussões sobre química, ao Nico pelas vidrarias mágicas, ao Chicão e Antônio, pelo auxílio e apoio, à Joana e seu Benê, e a todos que participaram deste trabalho.

Aos colegas de todas as turmas de mestrado, pela convivência, aprendizado, discussões e trabalho desenvolvidos.

Aos colegas do LP-4 por toda convivência e troca de conhecimentos durante este mestrado.

Aos funcionários do DQI pela disposição em colaborar.

Ao CNPq, CAPES e PROPP/UFMS, por propiciarem condições para realização deste trabalho.

À Zilda, Adeval, Sandra e João Paulo, pois sem o apoio desta família seria impossível concluir este trabalho.

A tantos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este mestrado.

À Lucinéia, que esteve sempre ao meu lado, fazendo chuva ou sol, dia ou noite, apoiando-me neste mestrado.

Faz-se ciência com os fatos,
como se faz uma casa com pedras;
mas uma acumulação de fatos não é ciência,
assim como um monte de pedras não é uma casa.

Henri Poincaré

Sumário

| | | |
|----------|---|-------------|
| | LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | vii |
| | LISTA DE TABELAS..... | x |
| | LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| | LISTA DE ANEXOS..... | xiii |
| | RESUMO..... | xv |
| | ABSTRACT..... | xvi |
| 1 | OBJETIVOS..... | 1 |
| 2 | INTRODUÇÃO..... | 2 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 4 |
| 3.1 | Celulose..... | 4 |
| 3.2 | Estrutura da celulose..... | 5 |
| 3.3 | Reatividade da celulose..... | 7 |
| 3.4 | Derivados da celulose..... | 11 |
| 3.5 | Grau de substituição (GS) de derivados de celulose..... | 12 |
| 3.6 | Xantato de celulose..... | 13 |
| 3.7 | Hidrólise e aminólise de ésteres xânticos de celulose..... | 15 |
| 3.8 | Métodos de imobilização de enzimas..... | 16 |
| 3.8.1 | Aprisionamento de enzimas..... | 17 |
| 3.8.2 | Ligado a um suporte..... | 17 |
| 3.8.2.1 | Adsorção física ao suporte..... | 18 |
| 3.8.2.2 | Ligação iônica com o suporte..... | 19 |
| 3.8.2.3 | Ligação covalente com o suporte..... | 19 |
| 3.8.2.4 | Ligado a um metal ou quelação..... | 20 |
| 3.8.3 | Ligações cruzadas..... | 21 |
| 3.9 | Derivados de celulose como suporte para imobilização de enzimas..... | 21 |
| 3.10 | Fosfatase alcalina imobilizada..... | 22 |
| 4 | PARTE EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 4.1 | Equipamentos..... | 23 |
| 4.2 | Reagentes..... | 23 |
| 4.3 | Síntese do xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB), variando as condições experimentais..... | 24 |
| 4.4 | Determinação do grau de substituição (GS) do CelXNB..... | 26 |
| 4.5 | Cinética de hidrólise do CelXNB..... | 26 |
| 4.6 | Cinética de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB..... | 27 |
| 4.7 | Imobilização da fosfatase alcalina..... | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.8 | Determinação da absorvidade molar do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)..... | 28 |
| 4.9 | Influência da concentração do substrato na atividade enzimática (v_0) para a fosfatase alcalina em solução..... | 28 |
| 4.10 | Influência da concentração de fosfatase alcalina em solução na atividade enzimática..... | 29 |
| 4.11 | Influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizada na atividade enzimática..... | 30 |
| 4.12 | Influência da reutilização da enzima imobilizada na atividade enzimática.... | 31 |
| 4.13 | Influência da concentração de substrato na atividade enzimática (v_0) para a fosfatase alcalina imobilizada..... | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 5.1 | Cálculo do grau de substituição (GS) do CelXNB..... | 32 |
| 5.2 | Variação das condições de síntese do CelXNB..... | 35 |
| 5.2.1 | Influência da concentração de NaOH da reação de mercerização na morfologia do CelXNB..... | 36 |
| 5.2.2 | Influência do solvente no grau de substituição do CelXNB..... | 38 |
| 5.2.3 | Influência da maturação no grau de substituição do CelXNB..... | 39 |
| 5.2.4 | Influência da concentração de NaOH da reação de mercerização no grau de substituição do CelXNB..... | 40 |
| 5.3 | Caracterização das modificações estruturais por espectroscopia na região do infravermelho..... | 41 |
| 5.4 | Análise térmica de celulose e derivados por calorimetria exploratória diferencial (DSC)..... | 43 |
| 5.5 | Cinética de hidrólise do CelXNB..... | 44 |
| 5.6 | Cinética de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB..... | 47 |
| 5.7 | Determinação da absorvidade molar do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)..... | 48 |
| 5.8 | Influência da concentração do substrato na atividade enzimática da fosfatase alcalina em solução e imobilizada..... | 50 |
| 5.9 | Influência da reutilização da enzima imobilizada na atividade enzimática.... | 53 |
| 5.10 | Influência da concentração de fosfatase alcalina em solução na atividade enzimática..... | 54 |
| 5.11 | Influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizada na atividade enzimática..... | 55 |
| 5.12 | Estimativa do peso molecular da fosfatase alcalina..... | 57 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 59 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 60 |
| | ANEXO..... | 63 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

| | |
|------------------------|--|
| A | agitador mecânico |
| A' | absorbância da reação rápida de hidrólise |
| A'' | absorbância da reação lenta de hidrólise |
| A' ₀ | absorbância infinita para hidrólise rápida do CelXNB |
| A'' ₀ | absorbância infinita para hidrólise lenta do CelXNB |
| A ₂₈₅ | absorbância em 285nm |
| A _{HID} | absorbância da reação de hidrólise do CelXNB |
| A _{IMOB} | absorbância da reação de imobilização em CelXNB |
| A _∞ | absorbância em um tempo infinito |
| A _m | absorbância na microsseringa |
| A _t | absorbância em um tempo qualquer |
| A _T | absorbância no tubo de reação |
| b | comprimento do caminho ótico |
| BP | bomba peristáltica |
| BT | banho termostatizado |
| C | computador |
| °C | grau Celsius |
| Cel | celulose |
| CelNa | soda celulose |
| CelTCB | celulose tionocarbamato |
| CelX | xantato de celulose |
| CelXNB | xantato de celulose de p-nitrobenzila |
| CP | polarização cruzada |
| cm | centímetro |
| DP | grau de polimerização médio |
| DSC | calorimetria exploratória diferencial |
| [enz] | concentração de enzima |
| E | espectrofotômetro |
| g | grama |
| g _{CelXNBenz} | grama de CelXNB com enzima imobilizada |
| GS | grau de substituição |
| h | hora |
| k' | constante de velocidade de pseudo primeira ordem de hidrólise rápida do CelXNB |

| | |
|------------------------------------|---|
| k'' | constante de velocidade de pseudo primeira ordem de hidrólise lenta do CeIXNB |
| k_{cat} | constante catalítica da enzima |
| k_{esp} | constante de hidrólise espontânea do CeIXNB |
| k_{obs1} | Primeira constante de velocidade de pseudo primeira ordem da imobilização da fosfatase alcalina em CeIXNB |
| k_{obs2} | Segunda constante de velocidade de pseudo primeira ordem da imobilização da fosfatase alcalina em CeIXNB |
| $k_{tampão}$ | constante de catálise do tampão carbonato |
| K_M | constante de Michaelis |
| L | litro |
| m | massa de xantato de celulose de p-nitrobenzila |
| mg | miligrama |
| mg _{Enz} | miligrama de enzima |
| mL | mililitro |
| m/m | porcentagem em massa |
| m/V | porcentagem massa – volume |
| massa _{CeIXNBenz} | massa de suporte com enzima imobilizada |
| mM | milimolar |
| M | molar |
| MAS | rotação no ângulo mágico |
| n_{NBT} | número de mols de p-nitrobenziltiol liberados por grama de celulose |
| n_T | número de mols de p-nitrobenziltiol liberados no tubo de reação |
| nm | nanômetro |
| [NaOH] | concentração molar de hidróxido de sódio |
| [Na ₂ CO ₃] | concentração molar de carbonato de sódio |
| NBT | p-nitrobenziltiol |
| [NBT] | concentração molar de p-nitrobenziltiol no tubo de reação |
| OPM | oscilações por minuto |
| PM | peso molecular |
| R | vidraria de dupla parede para reação |
| r | coeficiente de regressão linear |
| RMN | ressonância magnética nuclear |
| s | segundo |
| [S] | concentração de substrato p-nitrofenilfosfato dissódico |
| t | tempo |
| UV/VIS | ultravioleta e visível |
| v_0 | atividade enzimática (velocidade inicial de transformação do substrato) |
| v_0^* | atividade enzimática corrigida |

| | |
|--|---|
| $v_{m\acute{a}x}$ | velocidade máxima |
| V/V | porcentagem em volume |
| V_c | volume na cubeta |
| V_m | volume na microsseringa |
| V_T | volume no tubo de reação |
| TOSS | supressão de bandas laterais |
| $\Delta A_{285}/\Delta m$ | coeficiente angular do gráfico absorvância em 285nm versus massa de xantato de celulose de p-nitrobenzila |
| $\Delta n_T/\Delta m$ | variação do número de mols liberados de NBT pela variação da massa de CelXNB |
| $\Delta v_0/\Delta m_{\text{CelXNBEnz}}$ | variação da atividade enzimática pela variação da massa de suporte com enzima imobilizada |
| ϵ_{285} | absortividade molar do p-nitrobenziltiol em 285nm |
| ϵ_{400} | absortividade molar do p-nitrofenol em 400nm |
| ϕ | fenil |

Lista de Tabelas

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 - | Conteúdo de celulose de diversas origens..... | 4 |
| Tabela 2 - | Alguns derivados de substituição da celulose..... | 11 |
| Tabela 3 - | Graus de substituição de alguns derivados de celulose..... | 13 |
| Tabela 4 - | Composição percentual média das proteínas (somente resíduos reativos)..... | 19 |
| Tabela 5 - | Condições de síntese utilizadas na obtenção de CelNa, CelX e CelXNB..... | 24 |
| Tabela 6 - | Valores de GS, n_{NBT} , $\Delta A_{285}/\Delta m$, Vc e Vm de CelXNB das sínteses realizadas..... | 35 |
| Tabela 7 - | Concentração de NaOH na obtenção de CelNa, solvente e tempo de maturação na síntese do CelX, GS e morfologia do CelXNB das sínteses realizadas..... | 36 |
| Tabela 8 - | Valores experimentais da constante de velocidade de hidrólise observada (k'') e relação A''_0/A_∞ do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) etanol/aquoso a várias concentrações de carbonato..... | 45 |
| Tabela 9 - | Valores obtidos para $v_{\text{máx}}$ e K_M para a fosfatase alcalina em solução e imobilizada..... | 52 |
| Tabela 10 - | Massa de CelXNB com fosfatase alcalina imobilizada, atividade enzimática v_0 da enzima imobilizada, atividade enzimática corrigida v_0^* , concentração de fosfatase alcalina e massa de fosfatase alcalina imobilizada..... | 56 |

Lista de Figuras

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Estrutura da celulose. Entre parênteses, a unidade monomérica anidroglucopiranósica da celulose..... | 5 |
| Figura 2 - | Distribuição de pesos moleculares e a posição dos pesos moleculares médios..... | 6 |
| Figura 3 - | Distribuição de pesos moleculares da celulose de 11 origens diferentes..... | 6 |
| Figura 4 - | Célula unitária cristalina da celulose I..... | 7 |
| Figura 5 - | Efeito do hidróxido de sódio na celulose de algodão a várias temperaturas e concentrações (%m/V de NaOH)..... | 9 |
| Figura 6 - | Diagrama de transição de fases para a mercerização da celulose de algodão (círculos vazios) e de madeira de eucalipto (círculos cheios) após tratamento a várias concentrações de hidróxido de sódio (% m/V de NaOH) a 20 °C..... | 9 |
| Figura 7 - | Seções transversais das células unitárias da celulose I (nativa) e celulose II (mercerizada)..... | 10 |
| Figura 8 - | Ligações de hidrogênio para cristais de celulose I e celulose II (a) $O_3-H...O'_5$ (b) $O_6...H-O'_2$ (c) $O_6-H...O'_2$ | 10 |
| Figura 9 - | Distribuição teórica das unidades anidroglucopiranósicas em éteres de celulose, em que (a) não substituída, (b) monossustituída, (c) dissustituída e (d) trissustituída. Linha cheia: razão entre as constantes de velocidade 1:1:1 (HO-2:HO-3:HO-6); Linha pontilhada: Razão das constantes de velocidade 5:1:2 | 12 |
| Figura 10 - | Classificação dos métodos de imobilização de enzimas..... | 16 |
| Figura 11 - | Esquema experimental do sistema de fluxo contínuo para acompanhamento das cinéticas de reação. A: agitador mecânico, BP: bomba peristáltica, BT: banho termostatizado, C: computador, E: espectrofotômetro e R: vidraria de dupla parede para reação..... | 30 |
| Figura 12 - | Espectro na região do UV do p-nitrobenziltiol em solução pH 11,0 tampão carbonato (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso..... | 32 |
| Figura 13 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese A1..... | 34 |
| Figura 14 - | Diagrama GS versus concentração molar de NaOH na obtenção de soda celulose para as sínteses realizadas..... | 37 |
| Figura 15 - | Espectros de infravermelho da celulose, soda celulose, xantato de celulose, xantato de celulose de p-nitrobenzila e celulose tionocarbamato da síntese B4..... | 42 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 16 - | Curvas DSC das amostras de Cel, CelNa, CelX, CelXNB e CelTCB da síntese C3..... | 43 |
| Figura 17 - | Diagrama $\ln(A_{\infty}-A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (50,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso..... | 44 |
| Figura 18 - | Diagrama da constante de velocidade de hidrólise observada (k'') do CelXNB C3 versus concentração de tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) etanol/aquoso..... | 46 |
| Figura 19 - | Diagrama $\ln(A_{\infty}-A_t)$ versus tempo, em segundos, da reação de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB C3 (GS=13,58), em tampão carbonato pH 11,0 (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso..... | 48 |
| Figura 20 - | Espectros UV / VIS do p-nitrofenilfosfato dissódico e do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)..... | 49 |
| Figura 21 - | Diagrama absorvância em 400nm versus concentração molar de p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)..... | 49 |
| Figura 22 - | Diagrama da atividade enzimática, v_0 , versus concentração do substrato p-nitrofenilfosfato dissódico, para fosfatase alcalina em solução (50,0 mg.L) ⁻¹ (quadrados pretos) e fosfatase alcalina imobilizada (círculos vermelhos)..... | 50 |
| Figura 23 - | Diagrama do recíproco da atividade enzimática versus recíproco da concentração de p-nitrofenilfosfato dissódico, da fosfatase alcalina em solução 50,0mg.L ⁻¹ (quadrados pretos) e fosfatase alcalina imobilizada (círculos vermelhos)..... | 51 |
| Figura 24 - | Diagrama da porcentagem da atividade enzimática inicial da fosfatase alcalina imobilizada em CelXNB C3 versus número de ciclos de reutilização da enzima..... | 53 |
| Figura 25 - | Diagrama atividade enzimática versus concentração de fosfatase alcalina em solução..... | 54 |
| Figura 26 - | Diagrama da atividade enzimática versus massa de CelXNB C3 com fosfatase alcalina imobilizada..... | 55 |
| Figura 27 - | Diagrama massa de fosfatase alcalina imobilizada versus massa de CelXNB com fosfatase alcalina imobilizada..... | 56 |

Lista de Anexos

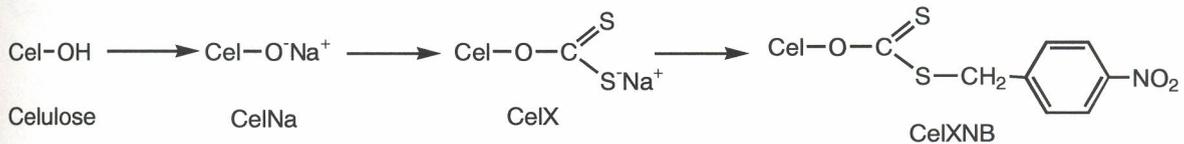
| | | |
|--------------|---|------|
| Gráfico 1 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A1 | I |
| Gráfico 2 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A2 | I |
| Gráfico 3 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A3 | II |
| Gráfico 4 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A4 | II |
| Gráfico 5 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B1 | III |
| Gráfico 6 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B2 | III |
| Gráfico 7 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B3 | IV |
| Gráfico 8 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B4 | IV |
| Gráfico 9 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B5 | V |
| Gráfico 10 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B6 | V |
| Gráfico 11 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B7 | VI |
| Gráfico 12 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese C1 | VI |
| Gráfico 13 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese C2 | VII |
| Gráfico 14 - | Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese C3 | VII |
| Gráfico 15 - | Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CeIXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (1,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso..... | VIII |
| Gráfico 16 - | Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CeIXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (10,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso..... | VIII |

- Gráfico 17 - Diagrama $\ln (A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CeIXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (25,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso..... IX
- Gráfico 18 - Diagrama $\ln (A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CeIXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (50,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso..... IX

Resumo

A imobilização de enzimas é um método de fixação ou encerramento de enzimas em suportes que tem sido utilizado tanto em pesquisas quanto na indústria. A utilização de derivados de celulose como suporte tem sido estudada intensamente, pois é um material abundante e com boas propriedades para essa aplicação.

Neste trabalho, sintetizou-se um éster xântico derivado de celulose, o xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB), conforme esquema abaixo, sob condições distintas de síntese, obtendo-se esse suporte com graus de substituição (GS) entre 0,45 e 13,20 e morfologias de tecido, fibras e fibras pulverizadas.



ESQUEMA – Síntese do CelXNB

Observou-se que a concentração de hidróxido de sódio na reação de mercerização influencia na morfologia do produto obtido, aumentando a degradação do tecido original com o aumento da concentração de NaOH, de acordo com a transição da celulose I para celulose II.

Estudou-se a hidrólise do suporte pois esta é uma reação competitiva com a reação de imobilização. Observou-se que o tampão catalisa a hidrólise do CelXNB com maior velocidade que a imobilização de enzimas.

A fosfatase alcalina foi utilizada como enzima modelo no estudo da imobilização de enzimas em CelXNB, comparando-se a atividade enzimática da fosfatase alcalina em solução e imobilizada. Houve perda de atividade enzimática de 12,4% após a imobilização da enzima. A enzima imobilizada apresentou atividade enzimática superior a 95% em relação à da original até o sétimo ciclo de reutilização.

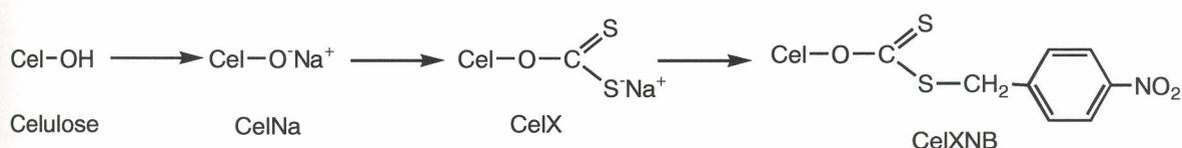
A concentração e o peso molecular da enzima imobilizada foram estimados a partir de resultados da cinética de imobilização e da cinética enzimática da enzima imobilizada.

As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina imobilizada em CelXNB são comparáveis à enzima em solução, proporcionando a utilização desta enzima imobilizada em CelXNB em técnicas de determinação analítica e na construção de biossensores.

Abstract

Enzyme immobilization is an enzyme fixation or entrapment method on carriers that has been used in research and industry. Cellulose derivatives have been studied as carriers because of their abundance and appropriate properties for this application.

In this work, p-nitrobenzyl cellulose xanthate (CelXNB), a xanthic ester cellulose derivative, was prepared under different conditions (scheme), obtaining this carrier with degrees of substitution (GS) between 0.45 and 13.20, and textile, fiber, and pulverized fiber morphologies.



SCHEME – CelXNB synthesis

It was observed in a mercerization reaction that NaOH concentration influenced the product morphology, increasing degradation of original textile with NaOH concentration increase, in agreement with cellulose mercerization phase transition.

CelXNB hydrolysis was studied because this reaction is competitive with immobilization. It was observed that carbonate buffer catalyses CelXNB hydrolysis and this reaction is faster than immobilization.

Alkaline phosphatase was used as a model enzyme to CelXNB enzyme immobilization. Immobilized and dissolved enzyme activity was measured and the loss of activity after immobilization was 12.4%. Phosphatase immobilized showed enzyme activity above 95% of initial activity until the seventh reutilization cycle.

Immobilized enzyme concentration and molecular weight were estimated from immobilization kinetic and enzyme kinetic results.

Immobilized alkaline phosphatase activity is comparable with activity in solution, and this CelXNB immobilized enzyme can be used in analytical techniques and to construct biosensors.

1 – Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a síntese do suporte xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB), para imobilização de enzimas. Variaram-se as condições de reação para obtê-lo com morfologias e graus de substituição diferentes, para nele imobilizar a fosfatase alcalina, utilizando-a como enzima modelo no processo de imobilização de enzimas.

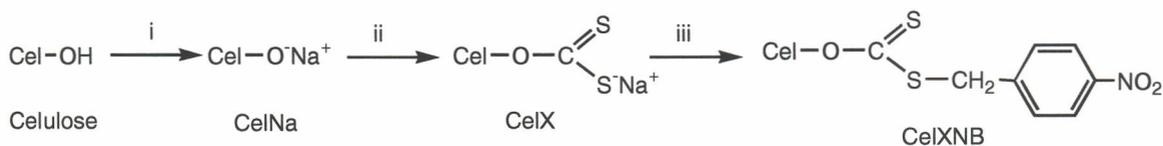
2 – Introdução

A imobilização de enzimas é um método de fixação ou encerramento de uma enzima em suportes¹ e tem sido utilizada como ferramenta para o uso de enzimas em pesquisas, processos industriais e métodos analíticos². As vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em comparação com as mesmas em solução são o uso múltiplo ou repetitivo de uma determinada quantidade de enzimas^{1, 2}, a possibilidade de parar a reação rapidamente por meio da remoção da enzima da solução (ou vice versa)^{1, 2}, a não contaminação do produto com a enzima (especialmente útil nas indústrias alimentícias e farmacêuticas)^{1, 2}, a possibilidade de automatização de sistemas em que o substrato passa por reatores de enzima imobilizada^{3, 4}, a construção de biossensores de enzima imobilizada⁵ e a separação de inibidores de enzimas empregando-se cromatografia de afinidade^{6, 7, 8}.

Vários métodos de imobilização têm sido empregados na preparação de derivados de enzimas insolúveis em água, como o da formação de ligação covalente entre a enzima e suportes insolúveis em água². Este método foi empregado neste trabalho, imobilizando-se a fosfatase alcalina no suporte sólido xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB).

No intuito de se obter o CelXNB com diferentes graus de substituição (GS), estudou-se a variação das condições de síntese desse suporte. Esta foi realizada em três etapas, conforme o esquema 1:

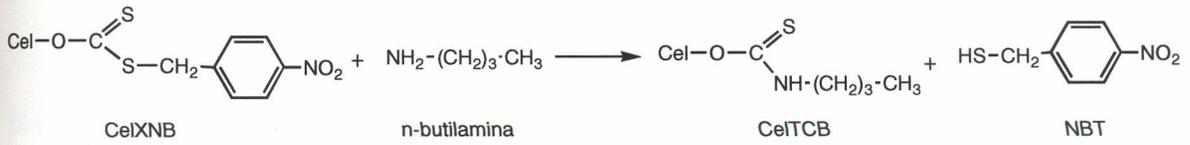
- i) Tratamento da celulose com hidróxido de sódio (mercerização), obtendo-se soda celulose (CelNa).
- ii) Xantação da celulose em meio alcalino, obtendo-se o xantato de celulose (CelX).
- iii) Esterificação com brometo de p-nitrobenzila para formar o xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB).



ESQUEMA 1

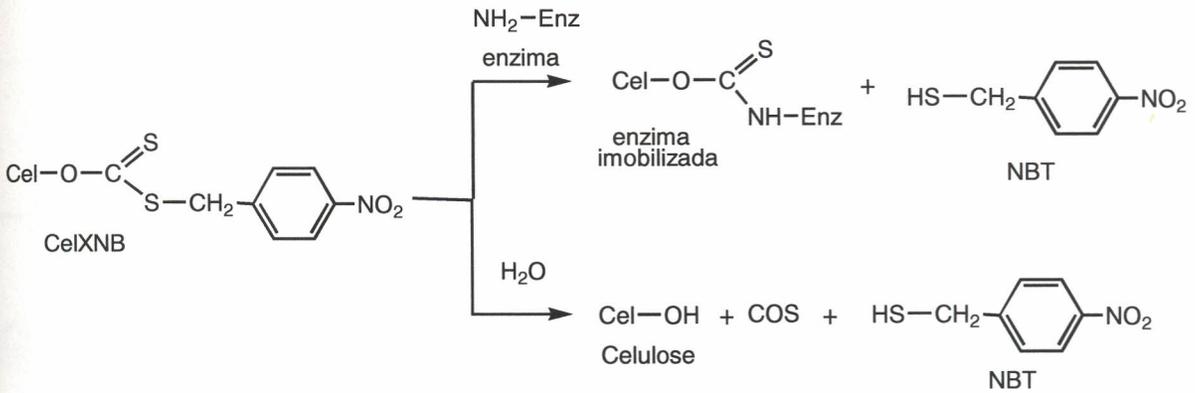
Obtiveram-se as curvas DSC (calorimetria exploratória diferencial) e espectros de infravermelho para algumas amostras de celulose, CelNa, CelX, CelXNB e CelTCB, caracterizando-se as modificações estruturais.

A determinação do grau de substituição (GS) deste éster xântico foi realizada por intermédio de reação de aminólise com n-butilamina, que produz a celulose tionocarbamato (CelTCB), liberando p-nitrobenziltiol (NBT), o qual pode ser observado espectrofotometricamente (esquema 2).



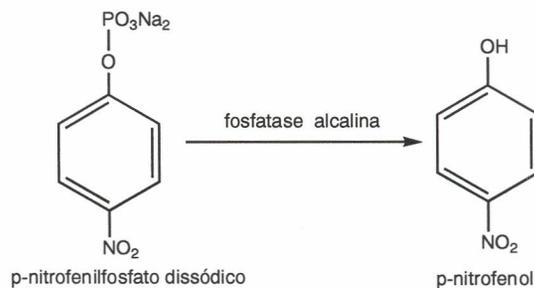
ESQUEMA 2

Realizou-se então a imobilização da fosfatase alcalina no CelXNB com maior grau de substituição obtido, acompanhado-se cineticamente a reação por meio do aparecimento do NBT (esquema 3). A hidrólise do CelXNB, que é uma reação paralela e competitiva à imobilização, também foi estudada.



ESQUEMA 3

Para quantificar a variação da atividade catalítica da fosfatase alcalina após a imobilização, realizou-se um estudo cinético da fosfatase alcalina em solução e imobilizada. A reação catalisada pela fosfatase alcalina foi acompanhada espectrofotometricamente pelo aparecimento do p-nitrofenol (esquema 4).



ESQUEMA 4

3 – Revisão da Literatura

3.1 Celulose

A celulose é um polímero natural com ocorrência em algas, algumas bactérias e plantas⁹. É o componente estrutural primário das paredes celulares das plantas e responsável por cerca da metade do carbono na biosfera. Estima-se que a quantidade de celulose sintetizada e degradada anualmente seja da ordem de 10^{15} kg¹⁰. Comercialmente, as duas fibras celulósicas mais importantes são a polpa de madeira e o algodão, constituindo, respectivamente, a base das indústrias de papel e celulose, e têxtil. Altas porcentagens de celulose ocorrem em fibras vegetais, tais como o algodão (tabela 1)⁹.

Tabela 1 - Conteúdo de celulose de diversas origens⁹

| ORIGEM | CONTEÚDO DE CELULOSE (% m/m em peso seco) |
|---------------------------|--|
| Algodão | 95-99 |
| Ramie | 80-90 |
| Madeira | 40-50 |
| Casca do caule | 20-30 |
| Musgo | 25-30 |
| Bactéria | 20-30 |
| Algas marrons e vermelhas | 1-10 |

Por ser um material abundante, proveniente de uma fonte de biomassa renovável e apresentar boas propriedades mecânicas e químicas, a celulose é um polímero versátil e muito utilizado, apresentando uma grande variedade de derivados e aplicações⁹.

3.2 Estrutura da celulose

Estruturalmente, a celulose é um polissacarídeo formado por unidades β - D - anidroglicopiranosícas, que se ligam por meio dos carbonos 1 e 4, dando origem a um polímero linear (figura 1). Na molécula de celulose, cada unidade anidroglicopiranosíca contém três grupos hidroxila livres, ligados aos carbonos 2, 3 e 6, havendo uma tendência a formar pontes de hidrogênio intramoleculares (entre as unidades monoméricas da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de moléculas adjacentes)^{10, 11}.

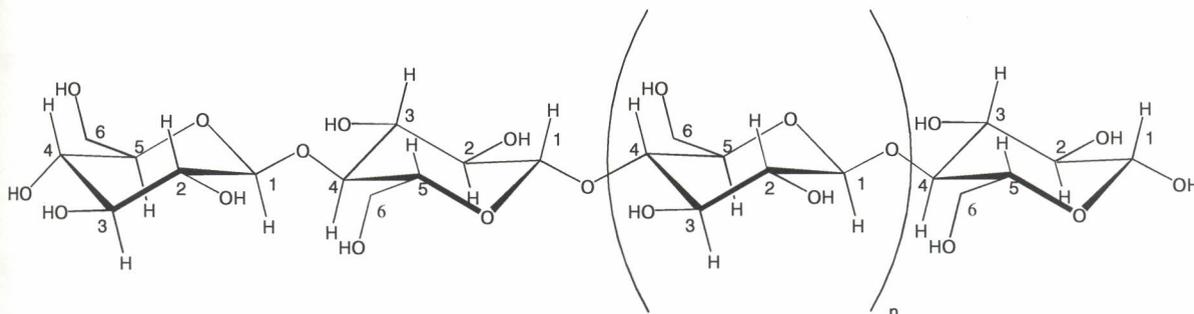


Figura 1 - Estrutura da celulose. Entre parênteses, a unidade monomérica anidroglicopiranosíca da celulose

Devido à natureza polimérica da celulose, suas propriedades físicas e químicas dependem de seu peso molecular médio. De um modo geral, não se pode determinar um peso molecular uniforme e definido para compostos poliméricos, pois estes são polidispersos, isto é, as moléculas de um polímero apresentam diferentes tamanhos. Deste modo, o peso molecular de uma substância polimérica é representado por um valor médio, a partir da curva de distribuição de pesos moleculares¹².

Os diferentes tipos de peso molecular médio de um polímero são¹²:

- M_N – peso molecular numérico médio
- M_W – peso molecular ponderal médio
- M_Z – peso molecular z médio
- M_{Z+1} – peso molecular z+1 médio
- M_V – peso molecular viscosimétrico médio

Na figura 2, apresenta-se uma curva típica de distribuição de pesos moleculares de um polímero, na qual ilustra-se a posição dos diferentes pesos moleculares médios.

Na determinação do peso molecular médio da celulose, têm sido aplicados os métodos usuais para polímeros, tais como determinação de grupos terminais, osmometria, espalhamento de luz, ultracentrifugação e viscosimetria¹¹.

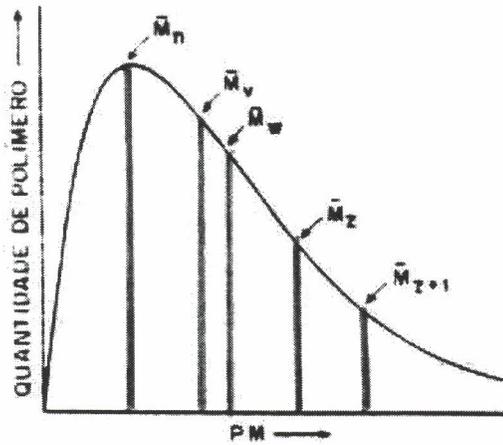


Figura 2 - Distribuição de pesos moleculares e a posição dos pesos moleculares médios (figura adaptada da referência 12)

O grau de polimerização médio (DP), que é o peso molecular médio do polímero dividido pelo peso molecular da unidade monomérica, varia de acordo com a origem da celulose e a técnica utilizada, estando em geral entre 4.000 e 5.000, o que corresponde a um peso molecular médio entre 650.000 e 800.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ aproximadamente ^{9, 11}. O DP da celulose de samambaias, gimnospermas e angiospermas é da ordem de 10.000, podendo alcançar 15.000¹¹.

Além de estar relacionada com o peso molecular médio, a distribuição dos pesos moleculares influencia em diversas propriedades de polímeros tais como, tenacidade, módulo de relaxação, resistência à tração, deformação e capacidade de fiação¹². Para a celulose, a distribuição de pesos moleculares depende de sua origem, como se observa na figura 3.

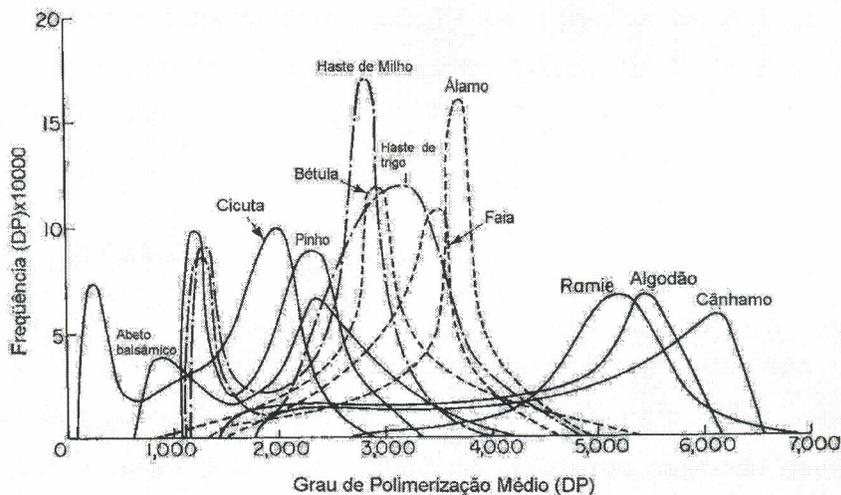


Figura 3 - Distribuição de pesos moleculares da celulose de 11 origens diferentes (figura adaptada da referência 11)

Muitos polímeros são parcialmente cristalinos, inclusive a celulose. A evidência mais direta deste fato é mostrada por meio de estudos de difração de raios X.

Os padrões de difração de raios X da celulose são mais difusos que os de cristais puros, porém indicam que existem regiões cristalinas definidas no polímero. A cristalinidade ocorre devido à organização das cadeias poliméricas no espaço, por meio das ligações de hidrogênio entre essas cadeias, dando à celulose uma estrutura supermolecular tridimensional. A célula unitária proposta para a celulose é uma célula monoclinica, com dimensões $a = 8,3 \text{ \AA}$, $b = 10,3 \text{ \AA}$, $c = 7,9 \text{ \AA}$ e $\beta = 84^\circ$, denominada de celulose I¹¹ (figura 4).

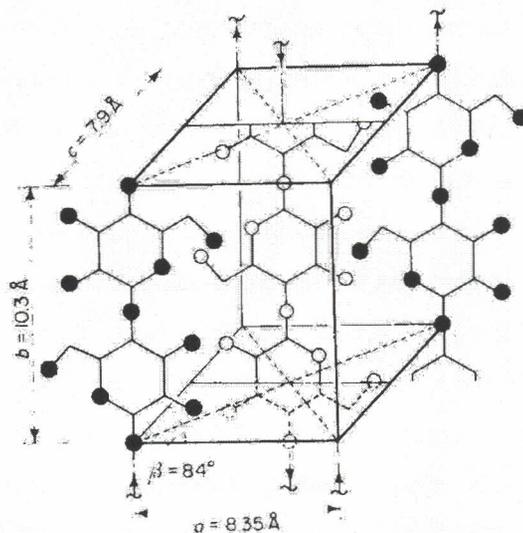


Figura 4 - Célula cristalina unitária da celulose I (figura adaptada da referência 11)

Celuloses de diferentes origens e tratamentos diferem substancialmente quanto ao grau de cristalinidade. Estimativas das proporções de material cristalino e material amorfo mostram que a porcentagem de cristalinidade varia entre 50 e 90%. A reatividade da celulose depende dessa porcentagem porque as hidroxilas de regiões cristalinas, por estarem formando ligações de hidrogênio, apresentam menor acessibilidade a reagentes que as de regiões amorfas¹¹.

3.3 Reatividade da celulose

As propriedades físicas e a reatividade da celulose dependem diretamente da distribuição do peso molecular, do grau de polimerização e da estrutura supermolecular do polímero. Mesmo apresentando uma grande polaridade na molécula devido aos grupos hidroxila, somente uma fração limitada destes estarão disponíveis para interagir com os reagentes. Portanto, a maioria das hidroxilas e grupos acetais estarão inacessíveis aos reagentes, a menos que a estrutura supermolecular seja modificada por tratamento com

agentes que expandam a estrutura da celulose, rompendo as ligações de hidrogênio, tais como soluções de ácidos ou bases fortes, ou que transformem as regiões cristalinas em regiões amorfas, como a amônia.^{9,11}

Quando o conteúdo de água do ácido ou da base é suficientemente alto para causar ionização e suficientemente baixo para levar as hidroxilas da celulose a competir pelos íons hidrônio ou hidroxila, e às vezes também por água, o reagente entra na estrutura da celulose. Isto não causa somente a expansão da célula unitária, mas também uma expansão intermicelar.¹¹

Para solubilizar totalmente a celulose, são empregados como solventes bases de amônia quaternária, cobre amônia e hidróxido de cobre amina. Neste último, o cobre também complexa com as hidroxilas da celulose, diminuindo as ligações de hidrogênio entre as moléculas. Hidróxidos contendo íons multivalentes complexados, tais como Co, Ni, Zn e Cd, atuam de maneira similar ao cobre. Outro modo de solubilizar totalmente a celulose é levado a efeito da preparação de acetato de celulose ou de xantato de celulose, que é uma etapa do processo de fabricação da viscose (celulose regenerada).^{9,11}

Os grupos hidroxila reagem com agentes de adição, substituição e oxidação e os grupos acetal sofrem hidrólise tanto em meio ácido como em meio básico. Os grupos aldeído terminais podem ser reduzidos a álcool, oxidados a ácido carboxílico ou rearranjados sob influência de álcalis para formar grupos álcool ou ácido carboxílico terminais. Pode também ser feita a graftização da cadeia polimérica, formando copolímeros de celulose.^{9,11}

A reação da celulose com hidróxido de sódio (esquema 1, pág. 2), denominada mercerização, leva à formação da soda celulose (celulose mercerizada). A figura 5, à pág. 9, mostra o efeito do hidróxido de sódio na celulose de algodão a várias temperaturas e concentrações.

A mercerização inicia-se em uma concentração bem definida e completa-se em um intervalo de aproximadamente 4% (m/V) de NaOH (figura 6, pág. 9). Antes de ocorrer expansão intramicelar ocorre a expansão intermicelar a baixas concentrações de álcalis, que alcança o máximo a concentrações inferiores ao intervalo de mercerização. À temperatura ambiente, este fenômeno ocorre até uma concentração de 10% (m/V) de NaOH. A expansão intermicelar ocorre preferencialmente na fase amorfa do polímero, isto é, nas regiões mais desordenadas do material enquanto a expansão intramicelar ocorre nas regiões cristalinas, nas quais haverá quebra das ligações de hidrogênio e mudança da estrutura cristalina (figuras 6 e 7, pág. 9 e 10, respectivamente), necessitando para isso uma maior concentração de álcalis^{9,11}.

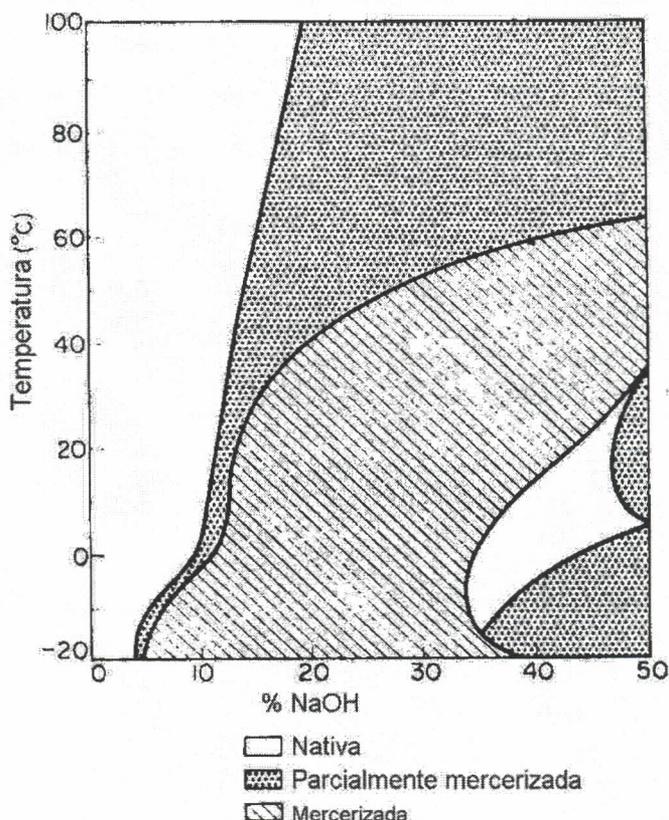


Figura 5 - Efeito do hidróxido de sódio na celulose de algodão a várias temperaturas e concentrações (% m/V de NaOH) (figura adaptada da referência 11)

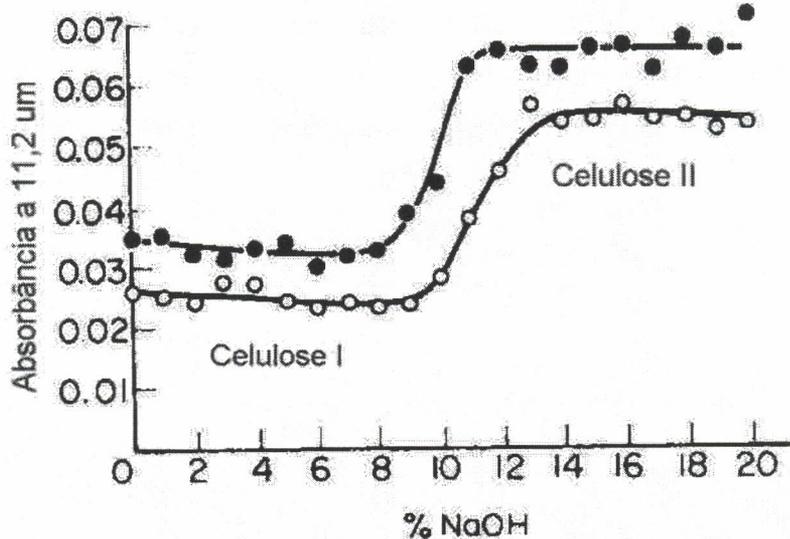


Figura 6 - Diagrama de transição de fases para a mercerização da celulose de algodão (círculos vazios) e de madeira de eucalipto (círculos cheios) após tratamento a várias concentrações de hidróxido de sódio (% m/V de NaOH) a 20 °C (figura adaptada da referência 11)

Na figura 6, observa-se o diagrama de transição de fases para mercerização da celulose do algodão e da madeira de eucalipto, em que ocorre expansão da célula unitária com a mudança de fase de celulose I (nativa) para celulose II (mercerizada), que apresenta dimensões $a = 8,1 \text{ \AA}$, $b = 10,3 \text{ \AA}$, $c = 9,1 \text{ \AA}$ e $\beta = 62^\circ$ (figura 7).

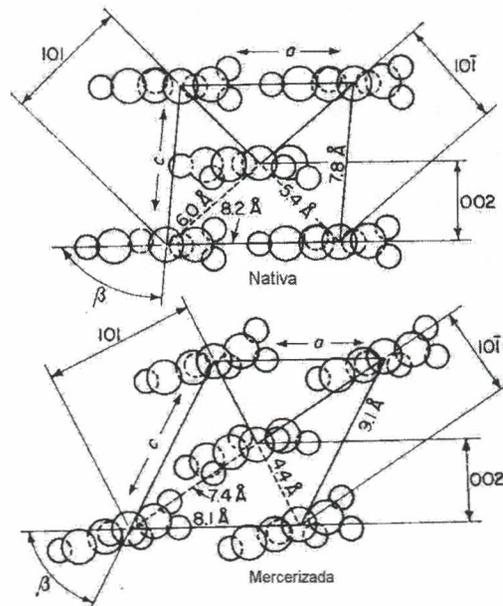


Figura 7 - Seções transversais das células unitárias da celulose I (nativa) e celulose II (mercerizada) (figura adaptada da referência 11)

As ligações de hidrogênio intramoleculares entre as unidades adjacentes da celulose têm sido estudadas por meio de ^{13}C RMN CP/MAS/TOSS e infravermelho de derivados de celulose deuterados. Nota-se que há diferença entre os tipos de ligação de hidrogênio existentes na celulose I e celulose II (figura 8), o que influencia na reatividade de cada uma dessas fases¹³.

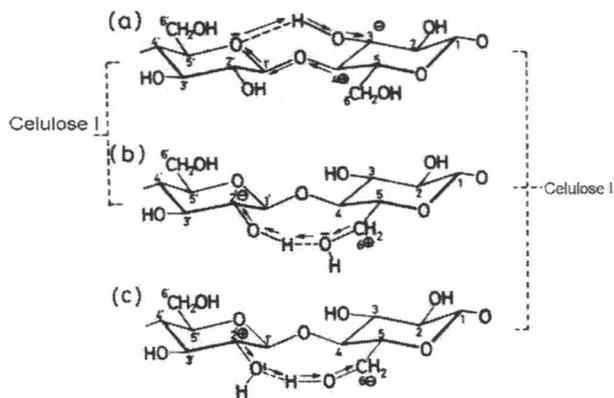


Figura 8 - Ligações de hidrogênio para cristais de celulose I e celulose II
 (a) $\text{O}_3 - \text{H} \dots \text{O}'_5$ (b) $\text{O}_6 \dots \text{H} - \text{O}'_2$ (c) $\text{O}_6 - \text{H} \dots \text{O}'_2$
 (figura adaptada da referência 13)

3.4 Derivados da celulose

Dentre os principais derivados de celulose estão os ésteres, os éteres e os xantatos de celulose, provenientes de reações de substituição. Na tabela 2 apresenta-se alguns destes derivados^{9, 11}.

Tabela 2 - Alguns derivados de substituição da celulose

| TIPO E NOME | REAGENTE | SUBSTITUINTE |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Ésteres | | |
| Sulfato | H_2SO_4 | $R - OSO_3H, R - OSO_3Na$ |
| Nitrato | HNO_3 | $R - ONO_2$ |
| Fosfato | H_2PO_4 | $R - OPO_3H_2$ |
| Formiato | $HCOOH$ | $R - OCHO$ |
| Acetato | $(CH_3CO)_2O$ | $R - OCOCH_3$ |
| Ésteres alifáticos em geral | $R'COOH + (ClCH_2CO)_2O$ | $R - OCOR'$ |
| p-Tolueno sulfonato | $CH_3C_6H_4SO_2Cl$ | $R - OSO_2C_6H_4CH_3$ |
| Feniluretano | C_6H_4NCO | $R - OCONHC_6H_5$ |
| Éteres | | |
| Metil | $CH_3Cl, (CH_3)_2SO_4$ | $R - OCH_3$ |
| Etil | C_2H_5Cl | $R - OCH_2CH_3$ |
| Éteres alifáticos em geral | $C_nH_{2n-1}Cl$ | $R - OCH_2R'$ |
| Hidroxietil | $C_2H_4O, ClCH_2CH_2OH$ | $R - OCH_2CH_2OH$ |
| Carboximetil | $ClCH_2COONa$ | $R - OCH_2COONa$ |
| Sulfoetil | $ClCH_2CH_2SO_3Na$ | $R - OCH_2CH_2SO_3Na$ |
| Cianoetil | $CH_2=CHCN$ | $R - OCH_2CH_2CN$ |
| Xantatos | | |
| Ditiocarbonato | $CS_2 + NaOH$ | $R - OCS_2Na$ |
| Tiocarbonato | $COS + NaOH$ | $R - OCOSNa$ |

R = Celulose

3.5 Grau de substituição (GS) de derivados de celulose

A reatividade dos três grupos hidroxila das posições 2, 3 e 6 da unidade anidroglicopiranosica oferece uma variedade de possibilidades na obtenção de derivados de celulose. Somente em condições de total rompimento das ligações de hidrogênio, seja com a celulose expandida ou com a celulose solúvel, todos os grupos hidroxila se tornam acessíveis às moléculas dos reagentes^{11, 14}.

Portanto, pela própria natureza aleatória da reação, um produto homogêneo é obtido somente pela completa substituição dos grupos hidroxila (grau de substituição, GS=3). Em qualquer grau de substituição diferente de 3 a reação leva a seqüências aleatórias de unidades consistindo dos seguintes componentes: (a) unidades de anidroglicopiranosose não reagidas, (b) três unidades monossubstituídas (derivados 2-, 3-; e 6-), (c) três unidades dissustituídas (2,3-, 2,6- e 3,6-) e (d) unidades totalmente substituídas (derivado 2,3,6-trissubstituído). A distribuição estatística teórica dos substituintes em função do grau de substituição para a celulose é apresentado na figura 9¹⁴.

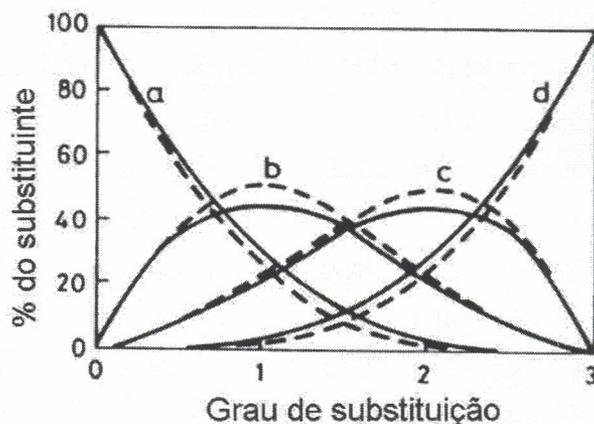


Figura 9 - Distribuição teórica das unidades anidroglicopiranosicas em éteres de celulose, em que (a) não substituída, (b) monossustituída, (c) dissustituída (d) trissustituída. Linha cheia: razão entre as constantes de velocidade 1:1:1 (HO-2:HO-3:HO-6); Linha pontilhada: Razão das constantes de velocidade 5:1:2 (figura adaptada da referência 14)

O grau de substituição depende das condições de síntese e dos solventes utilizados. Derivados de celulose com diversos graus de substituição são encontrados. A tabela 3 apresenta os valores de grau de substituição médio de alguns derivados de celulose^{9, 14}.

Tabela 3 – Graus de substituição de alguns derivados de celulose¹⁴

| DERIVADO DE CELULOSE | GRAU DE SUBSTITUIÇÃO |
|----------------------|----------------------|
| Nitrato de celulose | 1,9 – 2,8 |
| Acetato de celulose | 1,8 – 3,0 |
| Xantato de celulose | 0,2 – 1,2 |
| Meticelulose | 1,5 – 2,4 |
| Etilcelulose | 2,3 – 2,6 |
| Carboximetilcelulose | 0,5 – 1,2 |
| Hidroxietilcelulose | 1,3 – 3,0 |
| Cianoetilcelulose | 2,0 |

O grau de substituição médio nos fornece um valor geral do rendimento da reação para o polímero, porém não nos fornece informação específica da reatividade e substituição de cada tipo de hidroxila. Para cada um dos grupos hidroxila pode-se calcular o grau de substituição médio $\langle\langle f_k \rangle\rangle$, ($k= 2, 3$ e 6)¹⁵. A somatória dos $\langle\langle f_k \rangle\rangle$ fornece o grau de substituição médio do polímero $\langle\langle F \rangle\rangle$. A partir de métodos físicos como, a ressonância magnética nuclear (RMN), e métodos químicos, que permitem reação seletiva com os substituintes de uma determinada hidroxila, é possível determinar os valores de $\langle\langle f_k \rangle\rangle$ e $\langle\langle F \rangle\rangle$ ^{15, 16}.

Métodos químicos para diferenciar as hidroxilas tendem a ser morosos e apresentar um erro experimental maior que aqueles determinados por RMN. A evolução dos equipamentos de RMN e o avanço nas técnicas de análise de sólidos têm auxiliado na elucidação e determinação do grau de substituição de derivados de celulose.^{15, 16}

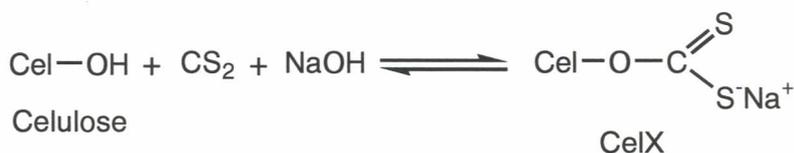
3.6 Xantato de celulose

O principal uso do xantato de celulose (esquema 5, pág. 14) está no processo de obtenção da viscose (celulose regenerada), em que o xantato é o intermediário chave para a dissolução da celulose, processo químico desenvolvido no final do século XIX¹¹. Neste processo, utiliza-se uma concentração de NaOH de 4,5M, ocorrendo total solubilização da celulose à temperatura ambiente¹¹.

O xantato de celulose também é utilizado na estabilização de solos, evitando erosões e fornecendo maior agregação às partículas do solo¹⁷, como suporte na imobilização de

enzimas¹⁸, como material de partida na síntese de ésteres xânticos¹⁹, na complexação com metais²⁰ e eliminação de metais pesados de resíduos químicos.

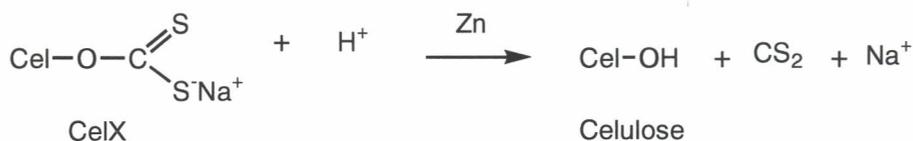
A formação de ésteres xânticos de celulose é realizada por intermédio do tratamento da celulose com dissulfeto de carbono (CS₂) em meio alcalino, formando o xantato de celulose (CelX) (esquema 5).



ESQUEMA 5

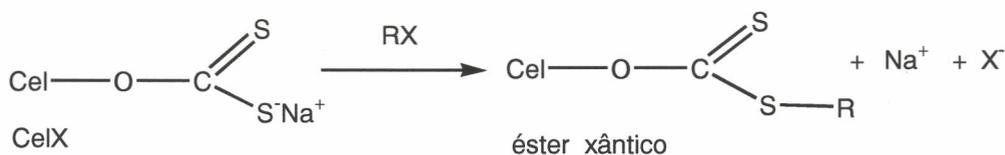
Entretanto, há alguma indicação de que o dissulfeto de carbono não é propriamente o reagente mas, sim, a sua forma hidratada, CS₂.H₂O ou HOCSSH. Isto dificulta a xantação da celulose mercerizada a altas concentrações de hidróxido de sódio, apesar da maioria dos éteres de celulose ocorrer sob essa condição, pois haverá pouca água livre para a reação. Paralelamente, ocorre a hidrólise do agente de xantação nestas condições, levando a íons biditiocarbonatos, que reagem novamente formando sulfeto, carbonato, tritiocarbonato, etc^{11, 14}.

Em contraste com os éteres de celulose, o xantato de celulose não é estável em soluções alcalinas. A acetilação e a xantação são reações controladas por equilíbrio, enquanto as eterificações normais têm controle cinético. Portanto, no processo de obtenção da viscose, há hidrólise contínua e rexantação, ambas causando uma distribuição mais uniforme dos grupos xantato e diminuindo continuamente o grau de substituição devido às reações paralelas^{11, 14}. Devido a essa instabilidade, os xantatos são usados como intermediários na manufatura de diferentes tipos de celulose regenerada no processamento da viscose. A regeneração consiste na hidrólise ácida do éster xântico, catalisada por zinco, obtendo-se celulose com menor peso molecular que aquele da inicial (esquema 6)^{11, 14}.



ESQUEMA 6

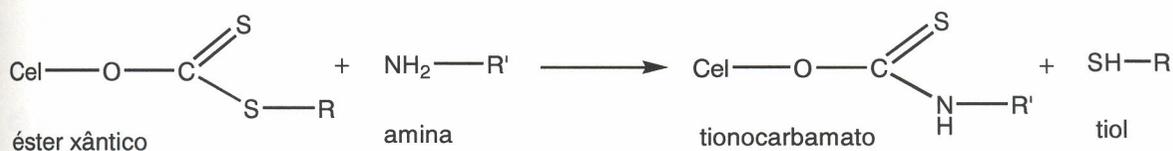
Na síntese de ésteres xânticos de celulose, reage-se o xantato de celulose com haletos (RX), obtendo-se desta forma esses ésteres (esquema 7)^{16, 19}.



ESQUEMA 7

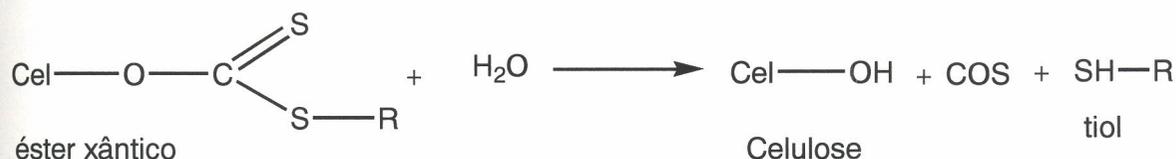
3.7 Hidrólise e aminólise de ésteres xânticos de celulose

O método de imobilização de enzimas utilizado neste trabalho baseia-se na reação de aminólise dos grupamentos amino livres da enzima. A reação de aminólise de um éster xântico de celulose produz a celulose tionocarbamato (esquema 8), composto com boa estabilidade química e térmica^{19, 21}.



ESQUEMA 8

A reação de aminólise é realizada em meio aquoso e sofre a influência da reação paralela de hidrólise do éster xântico, produzindo celulose regenerada, sulfeto de carbonila e tiol (esquema 9)^{19, 21}.



ESQUEMA 9

As constantes de velocidade de aminólise e hidrólise básica de ésteres derivados de celulose são menores que as dos análogos etil derivados, provavelmente porque o nucleófilo externo é fortemente solvatado e tem dificuldades energéticas e estéricas para atingir o centro de reação por meio da rígida camada de solvatação da celulose. Na reação de aminólise não foi observada diferença de reatividade entre os isômeros C-2, C-3 e C-6^{16, 19, 21}.

A hidrólise de ésteres xânticos de celulose apresenta diferentes reatividades para os carbonos C-2, C-3 e C-6. A constante de velocidade de hidrólise dos carbonos (C-2 + C-3) é maior que a do carbono C-6. A hidrólise lenta na posição C-6 foi comprovada por estudos de RMN ¹³C, observando-se o sinal desse carbono após 150 horas de reação¹⁶. Esta diferença de reatividade sugere que deve haver uma organização da região cibotática da água ao redor dos carbonos C-2 e C-3, catalisando a hidrólise dos mesmos^{16, 19, 21}.

3.8 Métodos de imobilização de enzimas

Existem várias maneiras de classificar os vários tipos de enzimas imobilizadas. O termo enzima imobilizada inclui os seguintes modos de imobilização^{1, 2} :

- enzimas imobilizadas insolúveis em água;
- enzimas solúveis usadas em reatores com uma membrana de ultrafiltração, pelo qual ocorre a passagem dos produtos de reação da hidrólise de substratos de alto peso molecular, mas com a retenção das moléculas de enzima dentro do reator;
- enzimas com mobilidade restrita a partir de ligações com outras macromoléculas, porém a enzima imobilizada permanece solúvel em água.

A classificação pode também estar baseada em uma combinação da natureza da interação responsável pela imobilização de enzimas e a natureza do suporte. Há vários métodos de imobilização disponíveis na literatura, sempre surgindo novas metodologias para alcançar objetivos específicos. A figura 10 mostra um esquema geral dos métodos de imobilização baseado no sistema de classificação descrito anteriormente².

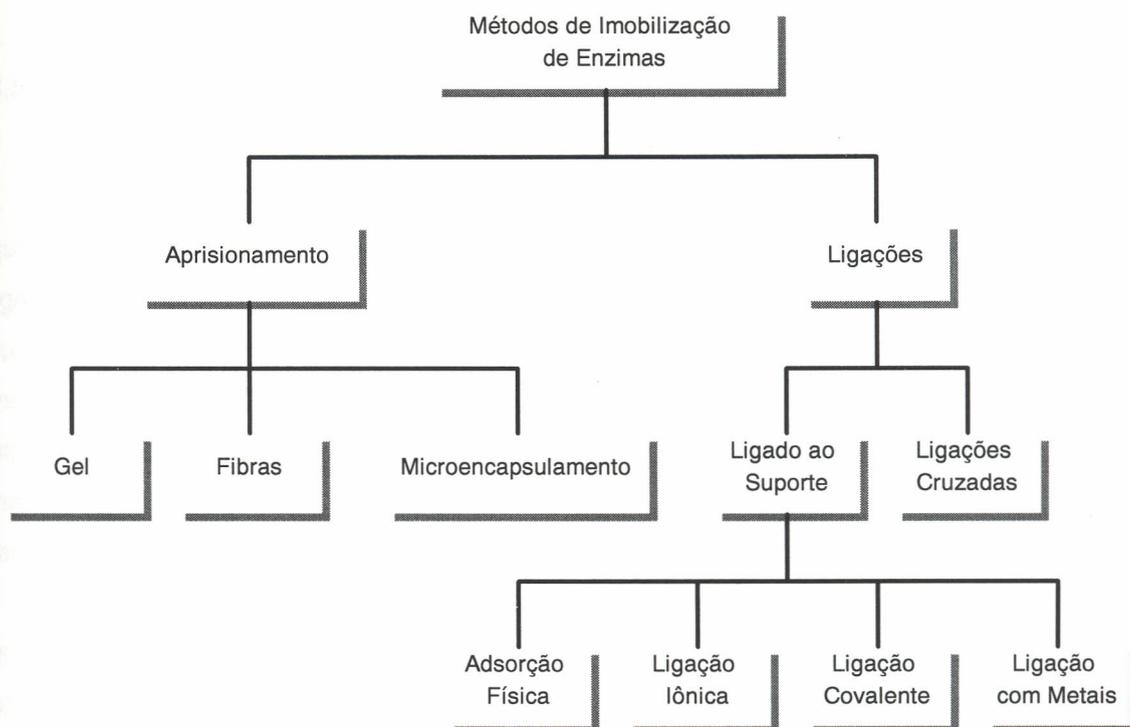


Figura 10 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas²

3.8.1 Aprisionamento de enzimas

O método de imobilização por aprisionamento de enzimas é baseado na localização da enzima dentro de lacunas de uma matriz polimérica ou de uma membrana. Isto é feito de modo que a proteína fique retida enquanto ocorre a penetração do substrato. O aprisionamento pode ser feito em lacunas ou em microcápsulas^{2, 22}.

Este método difere dos métodos por ligação pois a enzima não se liga à matriz ou à membrana, resultando em uma grande aplicabilidade. As condições utilizadas na reação química de polimerização são relativamente severas e geram perda da atividade enzimática. Portanto, faz-se necessária uma seleção cuidadosa das condições mais apropriadas para a imobilização de cada enzima^{2, 22}.

O formato em que a enzima é imobilizada pode ser classificado em quatro tipos: partículas, membranas, tubos e filtros. O formato de partículas é o mais utilizado pois facilita o manuseio e a aplicação^{2, 9}.

Os suportes sólidos usados na imobilização da enzima podem ser orgânicos ou inorgânicos. Alguns suportes orgânicos incluem: polissacarídeos, proteínas, carbono, poliestirenos, poliácridatos, copolímeros de anidrido maleico, polipeptídeos, polímeros vinílicos, alílicos e poliamidas^{2, 9}.

3.8.2 Ligado a um suporte

A imobilização de uma enzima em um suporte insolúvel é o método mais antigo e o que mais prevalece entre os métodos⁹. Ele pode ser subclassificado em adsorção física, ligação iônica, ligação com metais e ligação covalente². Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, variando apenas a metodologia e o tipo de ligação pela qual a enzima será imobilizada. O suporte ideal para uma dada aplicação é aquele que pode aumentar a interação com o substrato, diminuir a inibição, alterar o pH aparente ótimo para um valor desejado, não propiciar crescimento microbológico e ser facilmente recuperado para a reutilização^{2, 9}.

Para uso em reator, o suporte deve ser estável na solução e não deteriorar sob as condições de reação. Para uso em reatores de leito fixo, deve ser mecanicamente rígido e apresentar baixa compactação em altas velocidades de fluxo. Em aplicações médicas, a enzima imobilizada não pode provocar respostas imunológicas, devendo ser biocompatível².

3.8.2.1 Adsorção Física ao Suporte

Este método de imobilização de enzimas é baseado na adsorção física das proteínas da enzima na superfície de suportes insolúveis em água. Logo o método causa pequena ou nenhuma alteração conformacional da enzima ou destruição do seu sítio ativo. Se um suporte apropriado é encontrado, este método pode ser tanto simples como barato. Entretanto existe a desvantagem que a enzima adsorvida pode escapar do suporte durante o uso devido a fraca força de ligação entre a enzima e o suporte^{2, 9}. Os processos disponíveis para adsorção física de enzimas são:

- a) procedimento estático: faz-se a imersão do suporte na solução da enzima, retirando-se após um tempo determinado.
- b) eletrodeposição: realiza-se a eletrodeposição da enzima no suporte.
- c) carregamento de reator: o suporte é carregado em um reator que será usado em um processo e a enzima é adicionada e recirculada por meio do reator. É o método preferido comercialmente.
- d) mistura ou agitação: o suporte e a enzima são colocados na mesma solução e misturados com um agitador. É o método preferido em laboratórios.

A maior vantagem da adsorção como um método geral de imobilização de enzimas é que geralmente independe do uso de reagentes e somente um mínimo de etapas de ativação são necessárias. A adsorção tende a ser menos destrutiva para as proteínas enzimáticas do que os métodos químicos de fixação pois suas ligações mantêm-se por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. A este respeito, o método apresenta grande semelhança às situações encontradas nas membranas biológicas e tem sido utilizado como modelo para tais sistemas^{2, 9}.

Devido às fracas ligações envolvidas, a dessorção da proteína resulta das variações de temperatura, pH, força iônica ou da mera presença do substrato. Uma outra desvantagem é a não especificidade, além da adsorção de outras proteínas ou outras substâncias com a enzima imobilizada. Isto pode alterar as propriedades da enzima imobilizada ou, se a substância adsorvida é um substrato para a enzima, a velocidade provavelmente diminuirá dependendo da mobilidade superficial da enzima e do substrato^{2, 9}.

A adsorção da enzima pode ser necessária para facilitar reações covalentes descritas posteriormente. A estabilização temporária das enzimas adsorvidas sobre a matriz tem sido conseguida por ligações cruzadas da proteína em uma reação química subsequente à adsorção física².

3.8.2.2 Ligação Iônica com o Suporte

O método consiste na ligação iônica da enzima a um suporte insolúvel em água contendo grupamentos para troca iônica².

Polissacarídeos e polímeros sintéticos que têm centros de troca iônica são geralmente utilizados como suportes. A ligação de uma enzima com o suporte é facilmente realizada e as condições são muito mais brandas do que as necessárias para o método de ligação covalente. Consequentemente, o método de ligação iônica causa menos alterações na conformação e no sítio ativo da enzima. Portanto este método leva a enzimas imobilizadas com alta atividade em muitos casos².

O desprendimento das enzimas do suporte pode ocorrer em soluções de substrato com força iônica muito alta ou com a variação do pH. Isto ocorre pois as forças entre as enzimas e o suporte são mais fracas do que as de uma ligação covalente.

A diferença principal entre ligação iônica e adsorção física é que no primeiro método é mais difícil a enzima se soltar do suporte, devido à força de ligação ser muito maior que na adsorção. Comparando com a ligação covalente, este método produz interações mais fracas².

3.8.2.3 Ligação Covalente com o Suporte

A técnica mais intensamente estudada é a formação de ligações covalentes entre a enzima e a matriz suporte^{2, 9}. Quando se tenta selecionar o tipo de reação pelo qual uma dada proteína deve ser imobilizada, a escolha é limitada por duas características:

- a) a reação deve ser realizada sob condições que não causem perda da atividade enzimática;
- b) o sítio ativo da enzima não pode ser afetado pelos reagentes utilizados.

Os grupos funcionais das enzimas que tomam parte na ligação podem ter os seguintes grupos funcionais: amino, carboxila, sulfidríla, hidroxila, imidazol, fenólico, tiol, treonina e indol^{2, 10}. A tabela 4 mostra a porcentagem de resíduos reativos para imobilização.

Tabela 4 - Composição percentual média das proteínas (somente resíduos reativos)²

| RESÍDUOS | % | RESÍDUOS | % | RESÍDUOS | % |
|-------------------|-----|-------------------|-----|--------------|-----|
| L-serina | 7,8 | L-ácido glutâmico | 4,8 | L-histidina | 2,2 |
| L-lisina | 7,0 | L-arginina | 3,8 | L-metionina | 1,6 |
| L-treonina | 6,5 | L-tirosina | 3,4 | L-triptofano | 1,2 |
| L-ácido aspártico | 4,8 | L-cisteína | 3,4 | | |

As condições para imobilização por ligações covalentes são muito mais complicadas e menos amenas do que nos casos de adsorção física e ligação iônica. Portanto, a ligação covalente pode alterar a estrutura conformacional e o centro ativo da enzima, resultando em maior perda de atividade e/ou mudanças no substrato. Entretanto, a força de ligação entre a enzima e o suporte é muito mais forte, não ocorrendo perda de enzima mesmo na presença de um substrato ou de uma solução com força iônica alta².

A fixação covalente a uma matriz suporte deve envolver somente grupos funcionais da enzima que não são essenciais na ação catalítica. O sítio ativo da enzima não pode ser impedido, de modo tal que exista um amplo espaço entre a enzima e o suporte. Altas atividades resultam da prevenção de reações de inativação com resíduos de aminoácidos dos sítios ativos. Um número de métodos de proteção têm sido planejados², tais como:

- a) Fixação covalente da enzima na presença de um inibidor competitivo ou de substrato
- b) Um complexo reversível ligado covalentemente enzima – inibidor
- c) Uma enzima solúvel quimicamente modificada, cuja ligação covalente com a matriz é obtida por meio de novos resíduos incorporados.
- d) Um precursor zimogênio.

3.8.2.4 Ligado a um Metal ou Quelação

Esta técnica envolve o uso de compostos com metais de transição como ativadores da superfície do suporte seguido de acoplamento direto da enzima sem derivatização do suporte ativado por meio da formação de quelatos. Suportes como vidro, quitina, ácido algínico, gelatina e celulose têm sido utilizados para imobilizar enzimas e antibióticos. Também é possível formar hidróxidos ou óxidos de metais de transição imediatamente antes, ou na presença da molécula a ser imobilizada².

Apesar deste método ser descrito como quelação ou por alguns pesquisadores como parcialmente covalente, a dessorção pode ocorrer assim como em outras imobilizações sob condições de uso intenso ou longo tempo de estocagem. Isto levou alguns autores a classificar o método como adsorção, mas desenvolvimentos mais recentes da quelação mostram que o sucesso e altos graus de estabilidade operacional podem ser alcançados².

3.8.3 Ligações Cruzadas

A imobilização de enzimas também pode ser realizada por meio de ligações cruzadas intermoleculares entre as proteínas ou entre grupos funcionais da matriz suporte insolúvel e a enzima². A ligação cruzada de uma enzima com ela mesma é mais cara e ineficiente, pois alguma parte do material protéico irá inevitavelmente atuar principalmente como suporte. Isto resultará em uma atividade enzimática relativamente baixa. Geralmente, ligações cruzadas são melhor utilizadas em conjunto com algum dos outros métodos de imobilização. É utilizado largamente como um meio de estabilizar enzimas adsorvidas e também para prevenir a soltura dos géis de poliacrilamida².

Já que a enzima está covalentemente ligada à matriz suporte, pouca dessorção é provável usando esse método. O reagente mais comum usado como formador de ligações cruzadas é o glutaraldeído. Reações de ligação cruzada são realizadas sob condições severas. Estas podem mudar a conformação do sítio ativo da enzima e podendo levar a uma perda significativa da atividade enzimática².

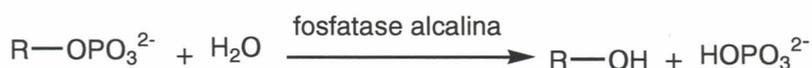
3.9 Derivados de Celulose como Suporte para Imobilização de Enzimas

A celulose, devido às suas propriedades físicas e químicas, seu baixo custo e fácil acesso, tem sido utilizada com sucesso como suporte para imobilização de enzimas. São citados na literatura diversos derivados de celulose que foram utilizados como suporte com técnicas distintas de imobilização²: Listam-se a seguir os derivados de celulose utilizados nos diversos tipos de imobilização:

- a) Aprisionamento em fibras: celulose, acetato de celulose, poli(álcool vinílico) e celulose;
- b) Microencapsulamento: nitrocelulose, etil celulose;
- c) Adsorção Física: celulose, fenóxi acetil celulose, palmitoil celulose, tanino-TEAE-celulose, tanino-aminoexil-celulose;
- d) Ligação Iônica: DEAE-celulose, AE-celulose, TEAE-celulose, CM-celulose;
- e) Quelação: celulose, DEAE-celulose;
- f) Ligação covalente: as seguintes funcionalizações da celulose foram utilizadas em imobilização – acoplamento por diazotização, derivados cíclicos imidocarbonatos, derivados de isocianato e isotiocianato, ésteres xânticos, derivados de cloreto de acila, derivados de carbonatos cíclicos, derivados de carbodiimidas, derivados acetil halogenados, formação de base de Schiff.

3.10 Fosfatase Alcalina Imobilizada

A fosfatase alcalina é uma enzima que promove a hidrólise das ligações fosfato de diversos substratos (esquema 10), tais como, glicose 6-fosfato, grupos fosfato terminais de DNA, p-nitrofenilfosfato dissódico, entre outros¹⁰. Tem como co-fatores os íons Zn^{2+} e Mg^{2+} , que aumentam a atividade enzimática e sua estabilidade para 60°C em solução e para 80°C quando imobilizada²³.



ESQUEMA 10

A fosfatase alcalina tem sido utilizada no desenvolvimento de técnicas analíticas para a detecção de pesticidas organofosforados, pois estes atuam como inibidor dessa enzima⁵. O desenvolvimento de biossensores de fosfatase alcalina também está sendo pesquisado pois há a possibilidade de desenvolvimento de sensores quimioluminescentes com substratos fluorescentes^{23, 24}, eletroquímicos⁵ e microcalorimétricos⁵. No seqüenciamento genético, a fosfatase alcalina imobilizada é utilizada na etapa inicial, promovendo a hidrólise dos grupamentos fosfato terminais do DNA¹⁰.

4 – Parte Experimental

4.1 Equipamentos

As medidas cinéticas e os espectros de absorção foram obtidos mediante um espectrofotometro UV/VIS HITACHI, modelo U-3000.

As cinéticas em fluxo contínuo foram realizadas utilizando uma bomba peristáltica MILAN modelo 204. A temperatura foi mantida constante com um banho termostatizado TECNAL modelo TE-184.

Utilizou-se como agitador mecânico durante as reações uma Mesa Agitadora Pendular TECNAL modelo TE-240.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro FTIR BOMEM MB-SERIES.

Para as medidas de pH usou-se um pHmetro HANNA 8314 com eletrodo combinado de vidro. As regressões lineares foram realizadas empregando-se o software Microcal Origin versão 3.0.

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento SHIMADZU modelo DSC-50, empregando-se cadinho de alumínio, com tampa perfurada e ar como atmosfera, velocidade de fluxo de $100,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2 Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico, sem purificação prévia, com exceção da n-butilamina (P.E.= 78°C a 760mmHg), submetida a processo de destilação.

A enzima fosfatase alcalina (E.C. 3.1.3.1) era da Sigma Chem. Co., cristalizada e liofilizada. Substrato p-nitrofenilfosfato dissódico, na forma de pastilhas para cinética otimizada de fosfatase alcalina, era da Merck.

Utilizaram-se, como tampão, fosfato de potássio, tri(hidroximetil) amino metano (TRIS) e carbonato de sódio, todos da Merck. Os solventes, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO) eram da Merck, o etanol, o dioxano e o éter etílico eram da Vetec. Os reagentes dissulfeto de carbono, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, p-nitrofenol e brometo de p-nitrobenzila eram todos da Merck.

A água utilizada no preparo das soluções foi destilada e, quando necessário, desoxigenada.

4.3 Síntese do xantato de celulose de p-nitrobenzila (CeIXNB), variando as condições experimentais

Cerca de 50g de tecido de algodão foram previamente agitados com uma solução de HCl 1M durante 3 horas e lavado várias vezes com água destilada, retirando-se impurezas oriundas do processo de fabricação do tecido. O material foi seco em estufa à temperatura de 40°C durante 24 horas. Posteriormente, utilizou-se em cada síntese cerca de 1g de algodão, sendo o tecido cortado em quadrados de 10cm de lado. Na obtenção da soda celulose (esquema 11), em um Erlenmeyer de 250mL agitou-se o tecido mecanicamente durante 4 horas a 250 oscilações por minuto (OPM) com 200mL de solução de NaOH, variando-se a concentração de acordo com a tabela 5.

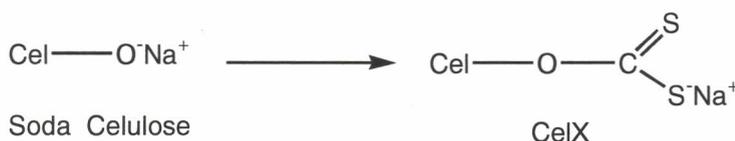


ESQUEMA 11

Tabela 5 – Condições de síntese utilizadas na obtenção de CelNa, CelX e CeIXNB

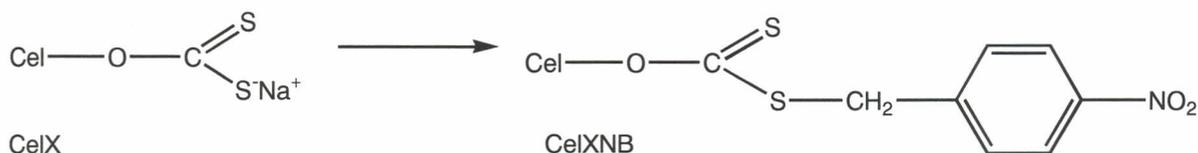
| Síntese | CelNa | | CelX | | | CeIXNB |
|---------|-----------|------------------------|----------|-----------|--------------|---|
| | [NaOH], M | [CS ₂], mM | Solvente | [NaOH], M | Maturação, h | [BrCH ₂ φNO ₂], mM |
| A1 | 4,5 | 2,8 | acetona | 0,5 | – | 77,1 |
| A2 | 2,0 | 2,8 | acetona | 1,0 | – | 77,1 |
| A3 | 2,0 | 2,8 | dioxano | 1,0 | – | 77,1 |
| A4 | 2,0 | 2,2 | – | 1,0 | – | 77,1 |
| B1 | 2,0 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B2 | 2,25 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B3 | 2,5 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B4 | 2,75 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B5 | 3,0 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B6 | 3,25 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| B7 | 3,5 | 9,9 | – | 0,8 | 24 | 71,3 |
| C1 | 2,0 | 2,5 | acetona | 1,0 | – | 46,4 |
| C2 | 2,5 | 2,5 | acetona | 1,25 | – | 46,4 |
| C3 | 3,0 | 2,5 | acetona | 1,5 | – | 46,4 |

Para a obtenção do xantato de celulose (esquema 12), retiraram-se aproximadamente 100mL de solução de NaOH e se adicionou dissulfeto de carbono dissolvido em solvente, ou não, de acordo com a tabela 5. Agitou-se mecanicamente durante 3 horas a 250 OPM, obtendo-se uma solução de coloração laranja. Os CelX das sínteses B1 a B7 foram separados após 24 horas do término da reação (maturação). O produto da reação obtido foi separado por filtração a vácuo e lavado várias vezes com tampão fosfato (0,1M) pH 8,0, com etanol gelado e éter etílico gelado. O produto foi seco a pressão reduzida, sob sílica gel dessecante, apresentando coloração amarelo pálido.



ESQUEMA 12

Em um Erlenmeyer de 250mL, o CelX foi tratado sob agitação mecânica durante 15 horas a 250 OPM com brometo de p-nitrobenzila ($\text{BrCH}_2\phi\text{NO}_2$) dissolvido em 100mL de acetona nas concentrações apresentadas na tabela 5 (esquema 13). Na síntese A3 foi utilizado dioxano como solvente no lugar da acetona. O produto obtido foi filtrado, lavado com água desoxigenada pH 5,0 (adição de algumas gotas HCl 0,1M), para eliminar grupos xantato que não foram esterificados, com água desoxigenada gelada, etanol gelado e éter etílico gelado. O xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB) foi seco a pressão reduzida, sob sílica gel dessecante. Os produtos obtidos da síntese B4 em forma de pó possibilitaram a formação de pastilhas de KBr e foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. O CelXNB foi caracterizado pelo grau de substituição (GS). Realizou-se análise térmica por DSC de amostras de celulose, soda celulose, xantato de celulose e xantato de celulose de p-nitrobenzila da síntese C3 para caracterização do material de partida e dos produtos obtidos.



ESQUEMA 13

4.4 Determinação do grau de substituição (GS) do CelXNB

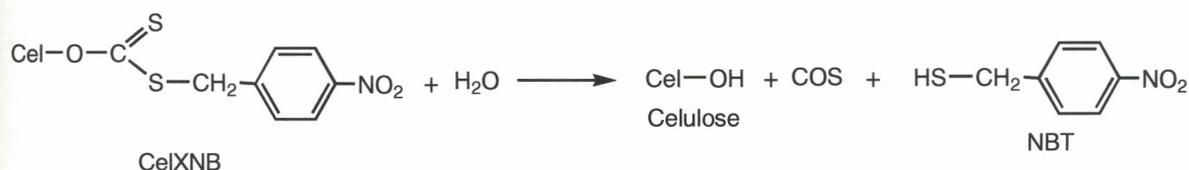
O grau de substituição (GS) é definido como o número de grupos xantato introduzidos em cada 100 unidades anidroglicopiranosícas da celulose. O GS é obtido a partir da equação 1, em que $1,62 \cdot 10^4$ é o peso molecular de 100 unidades anidroglicopiranosícas e n_{NBT} é o número de mols de p-nitrobenziltiol (NBT) liberados por grama de CelXNB na reação de aminólise (esquema 2, pág. 3).

$$\text{GS} = 1,62 \cdot 10^4 \cdot n_{\text{NBT}} \quad (1)$$

Quantidades pesadas de CelXNB foram colocadas em tubos de vidro. Adicionaram-se a cada amostra 5,0mL de tampão carbonato (0,05M) pH 11,0 10% (V/V) de etanol/aquoso e 1,0mL de solução aquosa de n-butilamina 1,0M. Os tubos eram selados com septum de borracha, borbulhando-se nitrogênio por meio deste durante 10 minutos. Agitaram-se mecanicamente os tubos à temperatura ambiente, retirando-se amostras periodicamente com auxílio de uma microsseringa e as absorvâncias foram lidas até o valor constante a 285nm. A absorvidade molar do NBT, liberado a pH 11,0 em carbonato (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso (ϵ_{285}) é $8,15 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ¹⁶. O valor de n_{NBT} foi obtido a partir de cada gráfico do valor da absorvância constante em 285nm versus massa de CelXNB (anexo).

4.5 Cinética de hidrólise do CelXNB

Durante a imobilização de enzimas em CelXNB ocorre paralelamente o processo de hidrólise do suporte (esquema 14). Para melhor compreensão desta reação competitiva realizaram-se cinéticas de hidrólise do CelXNB, verificando-se a influência da concentração do tampão carbonato e a ocorrência de hidrólise espontânea do CelXNB.



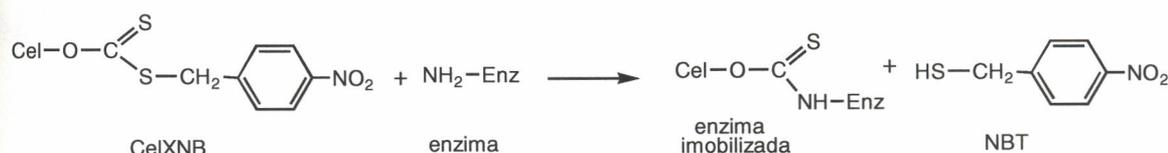
ESQUEMA 14

Cerca de 20mg de CelXNB C3 (GS=13,20) foram colocados em tubos de vidro. Adicionaram-se a cada amostra 5,0mL de tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) de etanol,

a concentrações de carbonato de 0,001M, 0,01M, 0,025M e 0,05M. Os tubos eram selados com septum de borracha, borbulhando-se nitrogênio por meio deste durante 10 minutos. Agitaram-se mecanicamente os tubos à temperatura ambiente a 250 OPM, retirando-se amostras de 100 μ L periodicamente com auxílio de uma microsseringa e as absorvâncias, A_t , foram lidas a 285nm até o tempo de 9000 segundos (2,5 horas). O valor da absorvância após o término da reação, A_∞ , foi lido a 285nm após adição de 1,0mL de n-butilamina 1,0M e agitação mecânica, até a absorvância atingir valor constante. As constantes de pseudo primeira ordem, k , foram calculadas a partir dos gráficos de $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo (anexo), em que o coeficiente angular é igual a $-k$.

4.6 Cinética de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB

A reação de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB foi acompanhada cineticamente pelo aparecimento do produto p-nitrobenziltiol (NBT) em 285nm (esquema 15).



ESQUEMA 15

Uma massa de 50,55mg de CelXNB C3 (GS=13,20) e uma solução de 20,47mg de fosfatase alcalina em 50,0mL de tampão carbonato pH 11,0 (0,05M) 10% (V/V) de etanol/aquoso foram colocadas em um tubo de vidro selado com um septum. Borbulhou-se nitrogênio durante 10 minutos e colocou-se o tubo sob agitação mecânica a 250 OPM, à temperatura ambiente. Amostras de 100 μ L foram retiradas com auxílio de uma microsseringa periodicamente e a absorvância A_t medida a 285nm. Após 14 horas adicionou-se 10mL de n-butilamina 1,0M, acompanhando-se a absorvância até valor constante. Este valor foi considerado como A_∞ . O produto da reação foi separado por filtração, lavado em abundância com tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M), seco com auxílio de secador e a vácuo sob sílica gel dessecante. A enzima imobilizada foi armazenada sob refrigeração a -20°C.

4.7 Imobilização da fosfatase alcalina

Massas previamente pesadas de CelXNB C3 foram colocadas em tubos de vidro, adicionando-se 5,0mL de solução de fosfatase alcalina $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão carbonato pH 11,0 (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso. Vedaram-se os tubos de reação com septo de borracha, borbulhando-se nitrogênio gasoso no meio reacional durante 10 minutos. A reação (esquema 15, pág. 27) durou 15 horas sob agitação mecânica a 250 OPM. Após este período, observou-se a absorvância da solução em 285nm, verificando-se a concentração de NBT liberado durante a imobilização. Adicionou-se ao tubo reacional 1,0mL de solução aquosa de n-butilamina. 1,0M, reagindo os grupos éster restantes do CelXNB, e acompanhando a absorvância até valor constante. Este valor foi considerado como A_{∞} . A enzima imobilizada foi lavada com tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) em abundância, seca com secador e a vácuo sob sílica gel dessecante.

4.8 Determinação da absortividade molar do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)

O acompanhamento das cinéticas enzimáticas da fosfatase alcalina foi realizado em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) por meio do aparecimento do p-nitrofenol em 400nm (esquema 4, pág.3). Para estas condições experimentais, primeiramente determinou-se a absortividade molar do p-nitrofenol, de forma a permitir a quantificação das cinéticas enzimáticas.

Assim, em um balão volumétrico de 100mL, preparou-se uma solução estoque de p-nitrofenol com concentração igual a $1,0\cdot 10^{-3}\text{M}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M).

Diluições para as seguintes concentrações foram realizadas: $1,0\cdot 10^{-6}\text{M}$, $3,0\cdot 10^{-6}\text{M}$, $5,0\cdot 10^{-6}\text{M}$, $7,0\cdot 10^{-6}\text{M}$, $1,0\cdot 10^{-5}\text{M}$, $3,0\cdot 10^{-5}\text{M}$, $5,0\cdot 10^{-5}\text{M}$, $7,0\cdot 10^{-5}\text{M}$ e $1,0\cdot 10^{-4}\text{M}$. A absorvância em 400nm para cada uma das diluições foi medida em triplicata. A absortividade molar do p-nitrofenol, ϵ_{400} , foi calculada a partir do gráfico de absorvância em 400nm versus concentração de p-nitrofenol, em que ϵ_{400} é o coeficiente angular, à pág. 49.

4.9 Influência da concentração do substrato na atividade enzimática (v_o) para a fosfatase alcalina em solução

Para caracterização da cinética enzimática da fosfatase alcalina em solução obteve-se a curva de atividade enzimática, v_o , versus concentração do substrato, a 25°C.

Preparou-se uma solução estoque de fosfatase alcalina de $2,50 \cdot 10^{-1} \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) e uma solução estoque do substrato p-nitrofenilfosfato dissódico de $2,95 \cdot 10^{-3} \text{M}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M). As demais concentrações de substrato foram obtidas por diluição da solução estoque.

As concentrações finais de substrato na cubeta foram de: $2,36 \cdot 10^{-7} \text{M}$, $4,73 \cdot 10^{-7} \text{M}$, $1,18 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $1,66 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $2,36 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $7,09 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $1,18 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $1,66 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $2,36 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $1,18 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e $2,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$. A concentração final de enzima na cubeta foi de $5,00 \cdot 10^{-2} \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Acompanhou-se espectrofotometricamente a cinética enzimática por intermédio do aparecimento do p-nitrofenol em 400nm. Foram colocados na cubeta 2,0mL de substrato e 500 μL de solução estoque da enzima. As velocidades iniciais foram medidas pelo coeficiente angular da curva absorbância em 400nm versus tempo durante os 10 segundos iniciais da cinética, equivalente a um tempo na qual o consumo do substrato é inferior a 5% da concentração inicial. Todas as cinéticas forneceram linhas retas nesse período inicial. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo a média o valor da velocidade inicial v_o . Os valores da constante de Michaelis-Menten, K_M , e da velocidade máxima, $v_{\text{máx}}$, foram obtidos a partir do gráfico do recíproco de v_o versus recíproco da concentração de substrato, à pág. 51.

4.10 Influência da concentração de fosfatase alcalina em solução na atividade enzimática

Continuando a caracterização da fosfatase alcalina em solução, obteve-se a curva de atividade enzimática, v_o , versus concentração de fosfatase alcalina, com as medidas realizadas a 25°C.

Preparou-se uma solução estoque de fosfatase alcalina de $1,04 \cdot 10^{-1} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) e uma solução estoque do substrato p-nitrofenilfosfato dissódico de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M). As demais concentrações de enzima foram obtidas por diluição da solução estoque.

As concentrações finais de fosfatase alcalina na cubeta foram de $2,08 \cdot 10^{-4} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $8,32 \cdot 10^{-4} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1,25 \cdot 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $2,08 \cdot 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $8,32 \cdot 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1,25 \cdot 10^{-2} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1,66 \cdot 10^{-2} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $2,08 \cdot 10^{-2} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração final de substrato foi de $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

As cinéticas enzimáticas foram acompanhadas espectrofotometricamente por meio do aparecimento do p-nitrofenol em 400nm. Foram colocados na cubeta 2,0mL da solução estoque de substrato e 500 μL de solução da enzima. As velocidades iniciais foram medidas

pelo coeficiente angular da curva absorvância em 400nm versus tempo durante os 10 segundos iniciais da cinética, equivalente a um tempo em que o consumo do substrato é inferior a 5% da concentração inicial. Todas as cinéticas forneceram linhas retas nesse período inicial. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo a média o valor da velocidade inicial v_0 . Obteve-se a curva v_0 versus concentração de fosfatase alcalina, à pág. 54.

4.11 Influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizada na atividade enzimática

Em um sistema de fluxo contínuo (figura 11), 20,0mL de substrato em uma concentração de $2,0 \cdot 10^{-4}M$ foram colocados no tubo de reação. A temperatura durante a reação foi mantida a $25^\circ C$. Massas previamente pesadas de enzima imobilizada foram adicionadas ao tubo de reação, seguindo-se de agitação e registro da absorvância em 400nm. As velocidades iniciais foram medidas pelo coeficiente angular da curva absorvância em 400nm versus tempo durante os 10 segundos iniciais da cinética, equivalente ao tempo em que o consumo do substrato é inferior a 5% da concentração inicial. Todas as cinéticas forneceram linhas retas nesse período inicial.

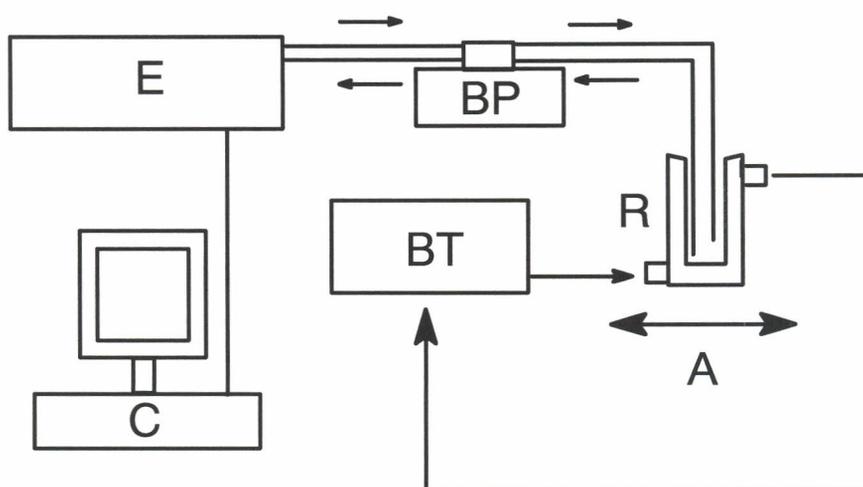


Figura 11 - Esquema experimental do sistema de fluxo contínuo para acompanhamento das cinéticas de reação. A: agitador mecânico, BP: bomba peristáltica, BT: banho termostatizado, C: computador, E: espectrofotômetro e R: vidraria de dupla parede para reação.

4.12 Influência da reutilização da enzima imobilizada na atividade enzimática

Em um sistema de fluxo contínuo (figura 11, pág. 30), 20,0mL de substrato em uma concentração de $2,0 \cdot 10^{-4}M$ foram colocados no tubo de reação. A temperatura durante a reação foi mantida a $25^{\circ}C$. Uma amostra de 21,52mg de enzima imobilizada foi adicionada à reação, registrando-se o aparecimento do p-nitrofenol continuamente em 400nm. Após uma determinação, filtrava-se a enzima imobilizada lavando-a com tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) em abundância. A amostra era secada e realizava-se uma nova determinação de atividade. Entre duas determinações consecutivas, limpava-se e secava-se o sistema experimental (mangueiras, vidraria e cubeta de fluxo). Após a sexta determinação, a enzima imobilizada permaneceu guardada sob refrigeração a $-20^{\circ}C$ durante 12h. As velocidades iniciais foram medidas pelo coeficiente angular da curva absorbância em 400nm versus tempo durante os 10 segundos iniciais da cinética. Realizaram-se doze determinações, verificando-se a influência da reutilização da enzima (Fig. 24, pág. 53).

4.13 Influência da concentração do substrato na atividade enzimática (v_o) para a fosfatase alcalina imobilizada

Em um sistema de fluxo contínuo (figura 11), 20,0mL de substrato em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) nas seguintes concentrações foram utilizados no tubo de reação: $1,18 \cdot 10^{-6}M$, $1,66 \cdot 10^{-6}M$, $1,18 \cdot 10^{-5}M$, $1,66 \cdot 10^{-5}M$, $1,18 \cdot 10^{-4}M$ e $2,36 \cdot 10^{-4}M$. A temperatura durante a reação foi mantida a $25^{\circ}C$. Uma amostra de 30,56mg de enzima imobilizada foi adicionada à reação, registrando-se o aparecimento do p-nitrofenol continuamente em 400nm. Entre duas determinações consecutivas, limpava-se e secava-se o sistema experimental (mangueiras, vidraria e cubeta de fluxo), filtrava-se a enzima imobilizada lavando-a com tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) em abundância. A amostra era secada e realizava-se a determinação seguinte. As velocidades iniciais foram medidas pelo coeficiente angular da curva absorbância em 400nm versus tempo durante os 10 segundos iniciais da cinética.

Todas as cinéticas forneceram linhas retas neste período inicial. O valor da constante de Michaelis-Menten, K_M , e da velocidade máxima, $v_{m\acute{a}x}$, para enzima imobilizada foram obtidos a partir do gráfico do recíproco de v_o versus recíproco da concentração de substrato, à pág. 51.

5 – Resultados e Discussão

5.1 Cálculo do grau de substituição (GS) do CelXNB

Para caracterização do éster xântico de celulose e avaliação das sínteses realizadas calculou-se o grau de substituição dos CelXNB das sínteses A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, C1, C2 e C3.

A reação entre CelXNB e n-butilamina dá origem ao sólido celulose tionocarbamato (CelTCB) e liberam em solução p-nitrobenziltiol (NBT) (esquema 2, pág. 3). Logo, pode-se calcular o GS do CelXNB determinando-se o número de moléculas de NBT liberadas por 100 unidades anidroglicopiranosicas de celulose (equação 1, pág. 26). Teoricamente, o valor máximo de GS é 300, que ocorre em caso de substituição total das três hidroxilas de cada uma das 100 unidades anidroglicopiranosicas.

Determinou-se espectrofotometricamente a concentração de p-nitrobenziltiol (NBT), pois este composto apresenta absorvidade molar, ϵ_{285} , de $8,15 \cdot 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em 285nm (figura 12), em solução pH 11,0 tampão carbonato (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso¹⁹.

O método de determinação do GS através da reação de aminólise apresenta concordância com os métodos de determinação de GS por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e por análise do teor de enxofre¹⁶.

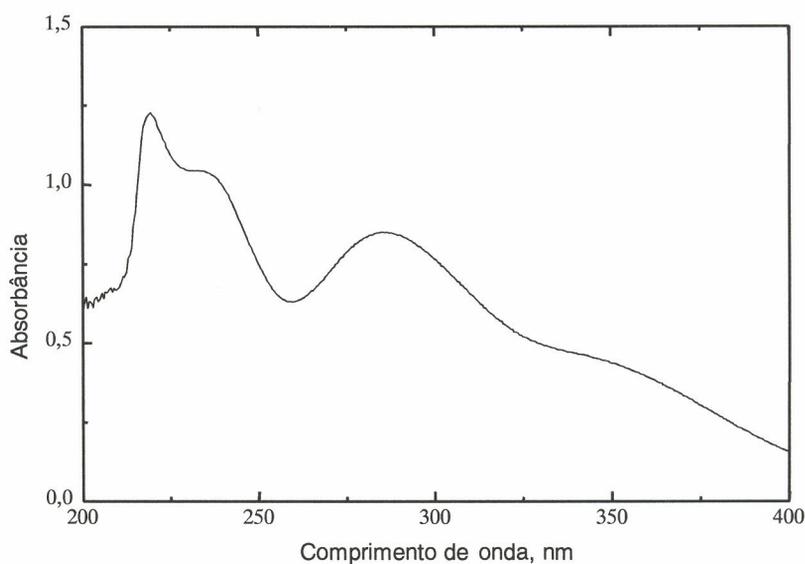


Figura 12 – Espectro na região do UV do p-nitrobenziltiol em solução pH 11,0 tampão carbonato (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso

Para uma amostra de CeIXNB de massa m reagindo com n-butilamina são liberados n_T mols de NBT no tubo de reação. Obtendo-se valores de n_T para diversas amostras de CeIXNB de diferentes massas m calcula-se n_{NBT} , pois $n_{\text{NBT}} = \Delta n_T / \Delta m$. Pela lei de Lambert-Beer, a absorvância A_T no tubo de reação é

$$A_T = b \cdot \epsilon_{285} \cdot [\text{NBT}] = b \cdot \epsilon_{285} \cdot \frac{n_T}{V_T} \quad (2)$$

onde,

A_T = absorvância no tubo de reação

b = caminho ótico

ϵ_{285} = absorvância molar do p-nitrobenziltiol em 285nm

$[\text{NBT}]$ = concentração de p-nitrobenziltiol no tubo de reação

V_T = volume no tubo de reação

Das condições experimentais, $A_T = A_m = A_{285} \cdot V_c / V_m$. Substituindo esta relação em (2) e isolando-se n_T obtém-se a equação 3.

$$n_T = \left(\frac{V_T \cdot V_c}{b \cdot \epsilon_{285} \cdot V_m} \right) \cdot A_{285} \quad (3)$$

onde,

A_m = absorvância na microseringa

A_{285} = absorvância em 285nm

V_c = volume na cubeta

V_m = volume na microseringa

Substituindo a equação 3 na definição de n_{NBT} obtém-se a equação 4.

$$n_{\text{NBT}} = \frac{\Delta n_T}{\Delta m} = \left(\frac{V_T \cdot V_c}{b \cdot \epsilon_{285} \cdot V_m} \right) \cdot \left(\frac{\Delta A_{285}}{\Delta m} \right) \quad (4)$$

em que,

$\frac{\Delta A_{285}}{\Delta m}$ = coeficiente angular do gráfico absorvância em 285nm versus variação de massa de CeIXNB

A partir da regressão linear dos gráficos de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB foram obtidos os valores de $\Delta A_{285} / \Delta m$, calculando-se n_{NBT} e GS. Em todos os

experimentos $b=1,0\text{cm}$, $\epsilon_{285}=8,15 \cdot 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $V_T=6,0\text{mL}$. Na figura 13, apresenta-se o gráfico de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese A1. Os demais gráficos de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB para cada uma das sínteses realizadas estão apresentados no anexo (gráficos 1 a 14).

Considerando a definição de grau de substituição da literatura¹⁴, $GS=1$ para uma hidroxila substituída por unidade anidroglicopiranosica de celulose, $GS=2$ para 2 hidroxilas substituídas e $GS=3$ para todas as 3 hidroxilas substituídas, e que os valores de GS na literatura obtidos para xantato de celulose variam entre 0,2 e 1,2 (tabela 3, pág. 13)¹⁴, o rendimento máximo esperado para a síntese do CelXNB é de $GS=1,2$. Isto corresponde a 1,2 hidroxila substituída por unidade monomérica da celulose. Utilizando a definição de GS do CelXNB, este valor de GS é de 120, isto é, em cada 100 unidades monoméricas de celulose há 120 grupos xantato introduzidos na celulose. Neste trabalho, o valor máximo obtido de GS do CelXNB foi de 13,20 (tabela 6, pág. 35), encontrando-se na literatura o valor máximo GS do CelXNB de 22¹⁶.

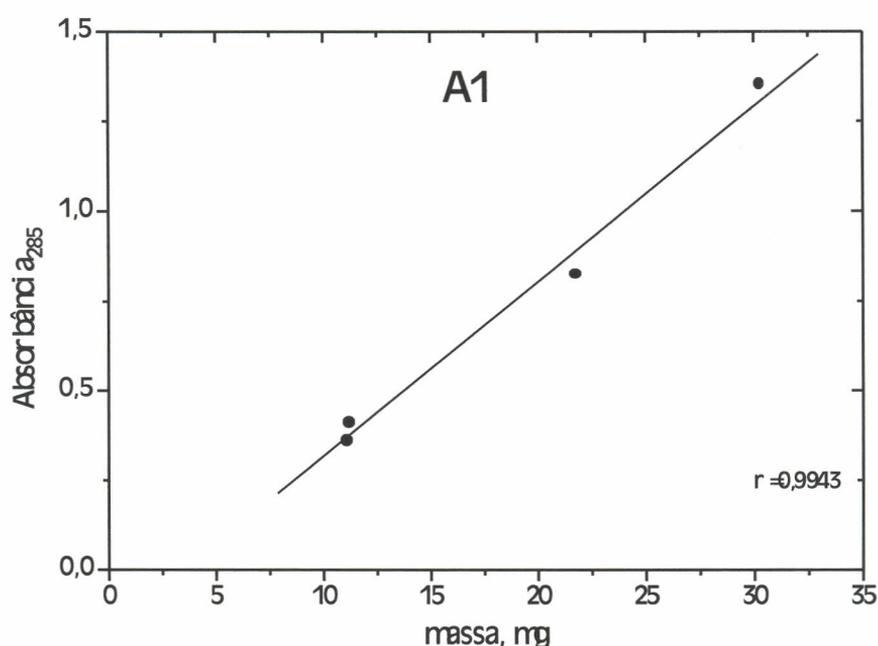


Figura 13 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese A1

A tabela 6 apresenta GS, n_{NBT} , $\Delta A_{285}/\Delta m$, V_c e V_m para as sínteses realizadas.

Tabela 6 - Valores de GS, n_{NBT} , $\Delta A_{285}/\Delta m$, V_c e V_m de CeIXNB das sínteses realizadas

| Síntese | GS | $10^5 \cdot n_{\text{NBT}}$, mol.g ⁻¹ | $\Delta A_{285}/\Delta m$, g ⁻¹ | V_c , mL | V_m , μL |
|---------|-------|---|---|------------|-----------------------|
| A1 | 3,54 | 21,849 | 49,464 | 3,0 | 500 |
| A2 | 7,09 | 43,737 | 63,653 | 2,8 | 300 |
| A3 | 0,95 | 5,8589 | 10,977 | 2,9 | 400 |
| A4 | 0,65 | 3,9966 | 9,0479 | 3,0 | 500 |
| B1 | 0,76 | 4,7206 | 10,687 | 3,0 | 500 |
| B2 | 0,58 | 3,6097 | 8,1720 | 3,0 | 500 |
| B3 | 0,72 | 4,4300 | 10,029 | 3,0 | 500 |
| B4 | 0,99 | 6,1160 | 13,846 | 3,0 | 500 |
| B5 | 0,71 | 4,4102 | 9,9841 | 3,0 | 500 |
| B6 | 0,45 | 2,7474 | 6,2199 | 3,0 | 500 |
| B7 | 0,48 | 2,9794 | 6,7450 | 3,0 | 500 |
| C1 | 6,11 | 37,702 | 19,697 | 2,6 | 100 |
| C2 | 9,83 | 60,668 | 31,695 | 2,6 | 100 |
| C3 | 13,20 | 81,453 | 42,554 | 2,6 | 100 |

5.2 Variação das condições de síntese do CeIXNB

Estudou-se a variação das condições de síntese do suporte CeIXNB no intuito de obtê-lo com diferentes morfologias e graus de substituição (GS). Na tabela 7, pág. 36, apresentam-se as condições experimentais de concentração de NaOH na obtenção do CeIXNB, solvente e tempo de maturação na obtenção do CeIX, e os resultados de grau de substituição e morfologia do CeIXNB.

Tabela 7 – Concentração de NaOH na obtenção do CelNa, solvente e tempo de maturação na obtenção do CelX, GS e morfologia do CelXNB das sínteses realizadas

| Síntese | CelNa | | CelX | | GS | Morfologia do CelXNB |
|---------|---------|---------|----------|--------------|-------|------------------------------|
| | [NaOH], | | Solvente | Maturação, h | | |
| | M | (% m/V) | | | | |
| A1 | 4,5 | 18 | acetona | – | 3,54 | fibras pulverizadas |
| A2 | 2,0 | 8 | acetona | – | 7,09 | tecido |
| A3 | 2,0 | 8 | dioxano | – | 0,95 | tecido |
| A4 | 2,0 | 8 | – | – | 0,65 | tecido |
| B1 | 2,0 | 8 | – | 24 | 0,76 | tecido |
| B2 | 2,25 | 9 | – | 24 | 0,58 | tecido |
| B3 | 2,5 | 10 | – | 24 | 0,72 | tecido e fibras |
| B4 | 2,75 | 11 | – | 24 | 0,99 | fibras |
| B5 | 3,0 | 12 | – | 24 | 0,71 | fibras e fibras pulverizadas |
| B6 | 3,25 | 13 | – | 24 | 0,45 | fibras pulverizadas |
| B7 | 3,5 | 14 | – | 24 | 0,48 | fibras pulverizadas |
| C1 | 2,0 | 8 | acetona | – | 6,11 | tecido |
| C2 | 2,5 | 10 | acetona | – | 9,83 | tecido e fibras |
| C3 | 3,0 | 12 | acetona | – | 13,20 | fibras e fibras pulverizadas |

5.2.1 Influência da concentração de NaOH da reação de mercerização na morfologia do CelXNB

As morfologias obtidas dos CelX e dos CelXNB sintetizados foram iguais, sofrendo influência da reação de mercerização, etapa i (esquema 1, pág. 2), e da reação de xantação, etapa ii (esquema 1). Comparando-se as sínteses, observou-se uma mudança significativa quanto à morfologia do produto (tabela 7, pág. 36 e figura 14, pág.), passando de tecido a fibras pulverizadas com o aumento da concentração de NaOH na etapa i do esquema 1, à pág. 2.

Para as sínteses realizadas sob as mesmas concentrações de NaOH na etapa i do esquema 1 (pág. 2), observa-se a mesma morfologia, como, por exemplo, em A2, A3, A4, B1 e C1 a 2,0M de NaOH com o CelXNB na forma de tecido, B3 e C2 a 2,5M de NaOH, na forma de tecido e fibras, e B5 e C3 a 3,0M de NaOH, na forma de fibras e fibras pulverizadas (tabela 7, pág. 36).

À medida que se aumenta a concentração de NaOH na reação de mercerização (etapa i, esquema 1, pág. 2), passa-se de tecido a fibras soltas do tecido, com comprimento das fibras da ordem de centímetros. Aumentando-se mais a concentração de NaOH, passa-se de fibras a fibras pulverizadas, com comprimento das fibras da ordem de milímetros. Na figura 14, apresenta-se o gráfico do grau de substituição do CelXNB versus concentração de NaOH na obtenção da soda celulose para as sínteses realizadas, com as diferentes morfologias obtidas.

As concentrações nas quais houve uma mistura de morfologia de produto (2,5 e 3,0M) foram consideradas como limites das transições de morfologia. Observa-se que esta transição é gradual à medida que se aumenta a concentração de NaOH, não ocorrendo de maneira abrupta.

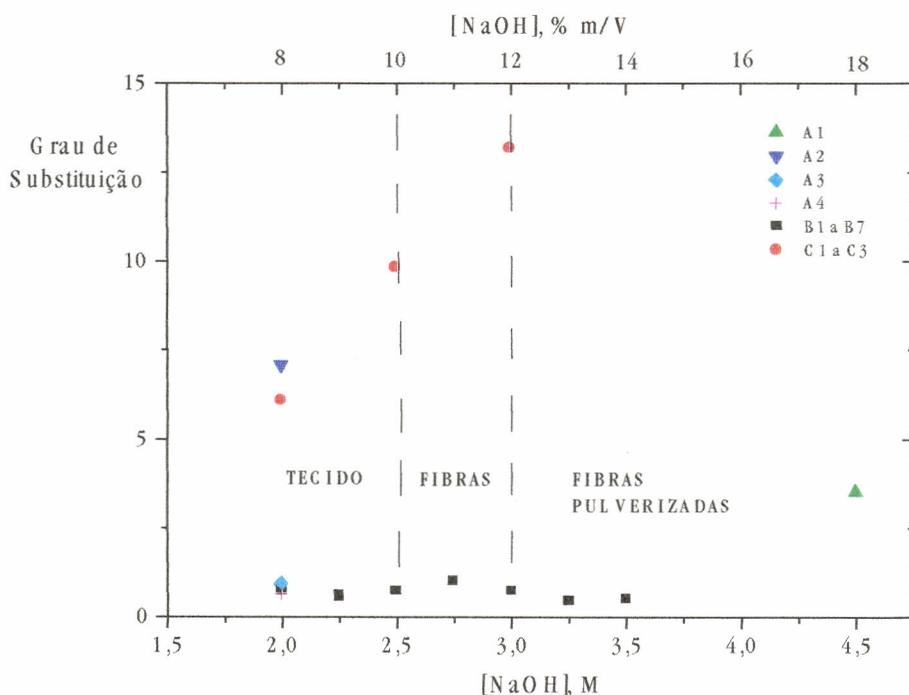


Figura 14 - Diagrama GS versus concentração molar de NaOH na obtenção de soda celulose para as sínteses realizadas

Comparando os resultados (figura 14) com a literatura (figura 6, pág. 9)¹¹, nota-se que a transição de morfologias encontradas para o CelXNB apresenta concordância com a

transição de fases para a mercerização da celulose. Abaixo de 2,5M, o tecido mantém suas características originais, pois a concentração de NaOH é suficiente apenas para que haja expansão intermicelar da celulose, afetando majoritariamente as regiões amorfas da celulose. Portanto, na reação de xantação (etapa ii, esquema 1, pág. 2), praticamente apenas as regiões amorfas do polímero estarão disponíveis para a reação, não alterando significativamente a morfologia do produto.

Na faixa entre 2,5 e 3,0M de NaOH, ocorre a transição de celulose I para celulose II, provocando mudanças na fase cristalina do polímero e resultando em mudanças na morfologia do produto final^{11, 13}. Nesta faixa, à medida em que se aumenta a concentração de NaOH, ocorre um aumento de celulose II, que apresenta maior reatividade que a celulose I por causa de sua estrutura cristalina expandida (figura 7, pág. 10)¹¹. Conseqüentemente, a reação de xantação ocorrerá em uma porção maior de celulose, provocando diminuição do peso molecular médio do polímero e mudanças de morfologia do produto.

Acima de 3,0M, as regiões cristalinas que tiveram acesso ao reagente transformam-se em celulose II, disponibilizando maior quantidade de celulose para a reação de xantação. Com o decréscimo do peso molecular ocasionado pela reação de xantação, o produto obtido torna-se cada vez mais pulverizado quando se aumenta a concentração de NaOH^{11, 13}.

Na síntese A1, à concentração de 4,5M, a celulose foi totalmente solubilizada durante a reação de xantação, formando viscose. Para reprecipitação da celulose, o meio reacional foi acidificado a pH 6,0 com algumas gotas de HCl 0,1M. O produto na forma de fibras pulverizadas foi separado por filtração a vácuo, lavado com tampão fosfato pH 8,0, etanol e éter etílico. Nas demais sínteses não houve solubilização total da celulose.

5.2.2 Influência do solvente no grau de substituição do CelXNB

O grau de substituição do CelXNB é uma estimativa da eficiência global da síntese do CelXNB e depende dos rendimentos de cada uma das três etapas da síntese deste composto. Portanto, as condições de cada uma das reações influenciam diretamente no GS do CelXNB^{13,14}.

Variou-se o solvente nas sínteses, observando-se diferenças significativas de GS. Quando dissulfeto de carbono foi adicionado à reação sem a presença de solvente orgânico observou-se um sistema trifásico composto pela soda celulose (sólido), a solução aquosa de NaOH (líquido) e o dissulfeto de carbono (líquido), que é imiscível com a água. Ao se agitar mecanicamente o meio reacional, ocorre a formação de uma emulsão entre a solução aquosa de NaOH e CS₂, seguida de reação com o sólido.

Ao se dissolver dissulfeto de carbono em acetona ou dioxano e, em seguida, adicionar ao meio reacional, observou-se a formação de somente duas fases, a fase líquida constituída pela solução de NaOH, solvente e CS₂, e a fase sólida, a soda celulose. Ocorre portanto maior contato do CS₂ com a soda celulose quando o reagente é dissolvido em um solvente orgânico.

As sínteses realizadas sem dissolução do CS₂ em solvente orgânico (A4, B1 a B7) apresentaram menores valores de GS (GS<1) comparando-se com as sínteses realizadas com acetona (A1, A2, C1 a C3) na reação de xantação (GS>1) (tabela 7, pág. 36 e figura 14, pág. 37). Esta diferença é influenciada pela diminuição da interação do reagente CS₂ com a soda celulose na ausência de solvente orgânico.

Comparando-se A2 (acetona, GS=7,09) com A3 (dioxano, GS=0,95), apesar de apresentarem na reação de xantação apenas duas fases, houve diferença significativa de GS. Esta diferença surge da influência do solvente nas reações de xantação (etapa ii, esquema 1, pág. 2) e esterificação (etapa iii, esquema 1, pág. 2) em que a polaridade do solvente é importante. Solventes apróticos com maior polaridade têm maior capacidade de solvatação de cátions, catalisando reações de substituição nucleofílica S_N2²⁵. A reação de esterificação (etapa iii, esquema 1, pág. 2) apresenta caráter S_N2, sendo influenciada pela polaridade do solvente²⁵. Como a acetona é um solvente polar aprótico de maior polaridade que o dioxano, a diferença de GS entre as sínteses A2 e A3 sofre influência do solvente²⁵.

5.2.3 Influência da maturação no grau de substituição do CelXNB

O processo de maturação após a síntese do xantato de celulose (CelX) constitui-se em manter o meio reacional sem agitação por um período de tempo após o término da reação. Utiliza-se este processo na indústria para se obter maior homogeneidade do produto com relação à distribuição de peso molecular médio e tamanho de fibra¹⁴. Durante este período, as reações de xantação e desxantação acontecem devido à reação de equilíbrio, conforme o esquema 5, à pág. 14.

Como o agente de xantação CS₂.H₂O sofre hidrólise, formando íons biditiocarbonatos, sua concentração diminui com o tempo, deslocando o equilíbrio no sentido da desxantação^{11, 14}. Portanto, nas sínteses em que houve maturação do CelX (B1 a B7), houve tempo para que ocorresse desxantação, além de sofrer a influência de um meio reacional com três fases, resultando em um menor GS em comparação com as sínteses que não sofreram processo de maturação.

Observa-se que, mesmo havendo diferenças na concentração de NaOH na reação de mercerização, não houve diferenças significativas de GS entre as sínteses de B1 a B7,

obtendo-se GS na faixa de 0,4 a 1 (tabela 7, pág. 36 e figura 14, pág. 37), evidenciando um resultado da desxantação do CelX.

5.2.4 Influência da concentração de NaOH da reação de mercerização no grau de substituição do CelXNB

A reação de mercerização (etapa i, esquema 1, pág. 2) depende da concentração de NaOH como se observa na figura 6, à pág. 9, e determina a morfologia do produto final. Evitando-se a desxantação na reação de xantação e otimizando-se a reação de esterificação, o passo fundamental para obtenção de CelXNB com maior GS é o controle da reação de mercerização.

Acima das concentrações de NaOH na reação de mercerização que levam à solubilização da celulose na reação de xantação (etapa ii, esquema 1, pág. 2), há a necessidade de reprecipitação da celulose por meio de acidificação do meio reacional para se separar o CelX, acontecendo desxantação do produto e ocasionando uma diminuição do rendimento da reação. Comparando-se A1 ([NaOH]=4,5M e GS=3,54), onde houve formação de viscose, com A2 ([NaOH]=2,0M e GS=7,09) observa-se menor valor de GS para A1 devido à necessidade de se acidificar o meio reacional para a obtenção do produto.

Há portanto uma concentração limite de NaOH em que o rendimento da reação de xantação diminui, pois ocorre formação de viscose e, para se isolar o produto, acidifica-se o meio reacional levando à desxantação do CelX.

Comparando-se sínteses realizadas sob condições semelhantes, obteve-se GS muito próximos. Este é o caso das sínteses A2 (GS=7,09) e C1 (GS=6,11), e de A4 (GS=0,65) e B1 (GS=0,76) (tabela 7, pág. 36).

Abaixo da concentração em que ocorre a formação de viscose, evitando-se a desxantação do CelX e realizando-se a síntese com acetona, verificou-se que o grau de substituição apresenta uma relação com o diagrama de transição de fases da celulose de algodão (figura 6, pág. 9). Nas sínteses C1, C2 e C3, com o aumento da concentração de NaOH observou-se um aumento linear do GS na região entre 2,0 e 3,0M de NaOH (figura 14, pág. 37) com a relação (5) entre GS e concentração molar de NaOH.

$$GS = -8,01 + 7,09.[NaOH], \quad \text{se } 2,0M \leq [NaOH] \leq 3,0M \quad (5)$$

Na região entre 2,0 e 3,0M ocorre a transição de fases da celulose I para celulose II e quanto maior a concentração de NaOH maior a quantidade de celulose II e maior o rendimento da região de xantação.

Não ocorrendo desxantação, o rendimento da reação de esterificação (etapa iii, esquema 1, pág. 2) é diretamente proporcional à quantidade de grupos xantato inseridos na reação de xantação.

5.3 Caracterização das modificações estruturais por espectroscopia na região do infravermelho

Foram obtidos espectros de infravermelho para amostras de celulose, soda celulose, xantato de celulose, xantato de celulose de p-nitrobenzila e celulose tionocarbamato da síntese B4 (figura 15, pág. 42). Os compostos analisados apresentaram espectros distintos entre si, caracterizando que ocorreu modificação estrutural após as reações.

A celulose e seus derivados apresentam bandas largas entre 3700 e 3100cm^{-1} , região de estiramento O–H. Não se definem picos estreitos de hidroxilas devido à natureza polimérica da celulose e das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares^{13, 15}. Ao se transformar a celulose em soda celulose (CeI_{Na}), ocorre uma alteração significativa nesta região do espectro, devido à substituição de parte das ligações covalentes O–H pela ligação iônica O⁻Na⁺.

Após a reação de xantação, observa-se no espectro do xantato de celulose (CeIX), na região entre 3700 e 3100cm^{-1} , um padrão semelhante ao espectro da celulose. Isto se deve à volta das hidroxilas nas posições não substituídas pelos grupos xantato.

Os compostos que contêm C=S não são facilmente identificados por infravermelho como os compostos carbonílicos (C=O). Em muitos casos, a ligação C=S ocorre na região de 1200 a 1000cm^{-1} , ficando muito difícil de se diferenciar das ligações C–O e C–C. Um número muito pequeno desses compostos foi estudado de maneira sistemática por infravermelho.

A frequência C=S assinalada para vários compostos deve ser aceita com alguma reserva, pois várias alterações podem ocorrer com a mudança do substituinte^{26, 27}. Para a tiobenzofenona, o dimetiltiocarbonato e o ácido ditioacético, C=S aparece com um sinal forte em 1230cm^{-1} . Para o tiofosfênio, este valor cai para 1121cm^{-1} , devido à substituição por dois cloros e na tioacetamida esse sinal surge em 1310cm^{-1} .^{26, 27}

No caso das tioamidas, δ C=S tem sido assinalada na vasta região de 1400 a 1000cm^{-1} , dependendo dos substituintes. No etilxantato de etila, aparece uma banda forte em 1220cm^{-1} , para o etilxantato de fenila em 1270cm^{-1} , para o etilxantato de p-nitrobenzila em 1450cm^{-1} , e para o etilxantato de 2,4-dinitrofenila em 1520cm^{-1} .^{26, 27}

Para os ésteres xânticos de celulose, o sinal C=S aparece junto aos sinais C–O do anel da anidroglicopiranoose, dificultando sua melhor identificação. Para caracterização

inequívoca dessa ligação faz-se necessário o uso de técnicas de RMN ^{13}C de sólidos CP/MASS/TOSS¹⁶.

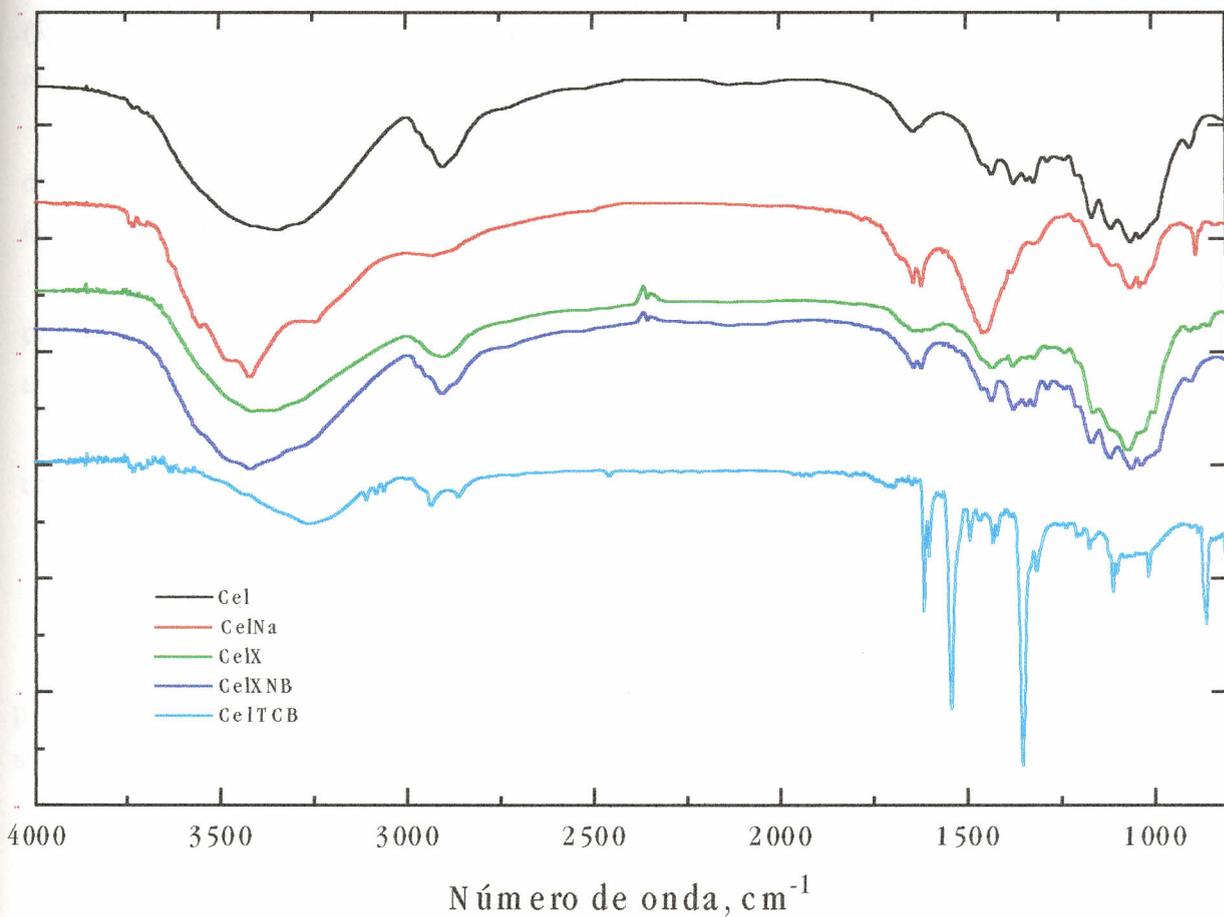


Figura 15 - Espectros de infravermelho da celulose, soda celulose, xantato de celulose, xantato de celulose de p-nitrobenzila e celulose tionocarbamato da síntese B4

5.4 Análise térmica de celulose e derivados por calorimetria exploratória diferencial (DSC)²⁸

Foram obtidas curvas DSC para amostras de celulose, soda celulose, xantato de celulose, xantato de celulose de p-nitrobenzila e celulose tionocarbamato da síntese C3 (figura 16). Essas curvas apresentaram conformações distintas entre si, caracterizando as modificações estruturais dos compostos analisados.

Não se observa transição vítrea nem fusão polimérica para as amostras analisadas, caracterizando que as amostras de tecido (celulose) não apresentaram misturas com outras fibras poliméricas tais como polietileno tereftalato (poliéster) ou náilons.

Verifica-se estabilidade térmica até 270°C para os compostos Cel e CelXNB, 230°C para CelNa e CelTCB e 210°C para CelX, caracterizando intervalos de temperatura para utilização dos materiais sintetizados.

Para valores maiores de temperatura, as curvas DSC apresentam picos exotérmicos originados pela decomposição oxidativa dos compostos analisados.

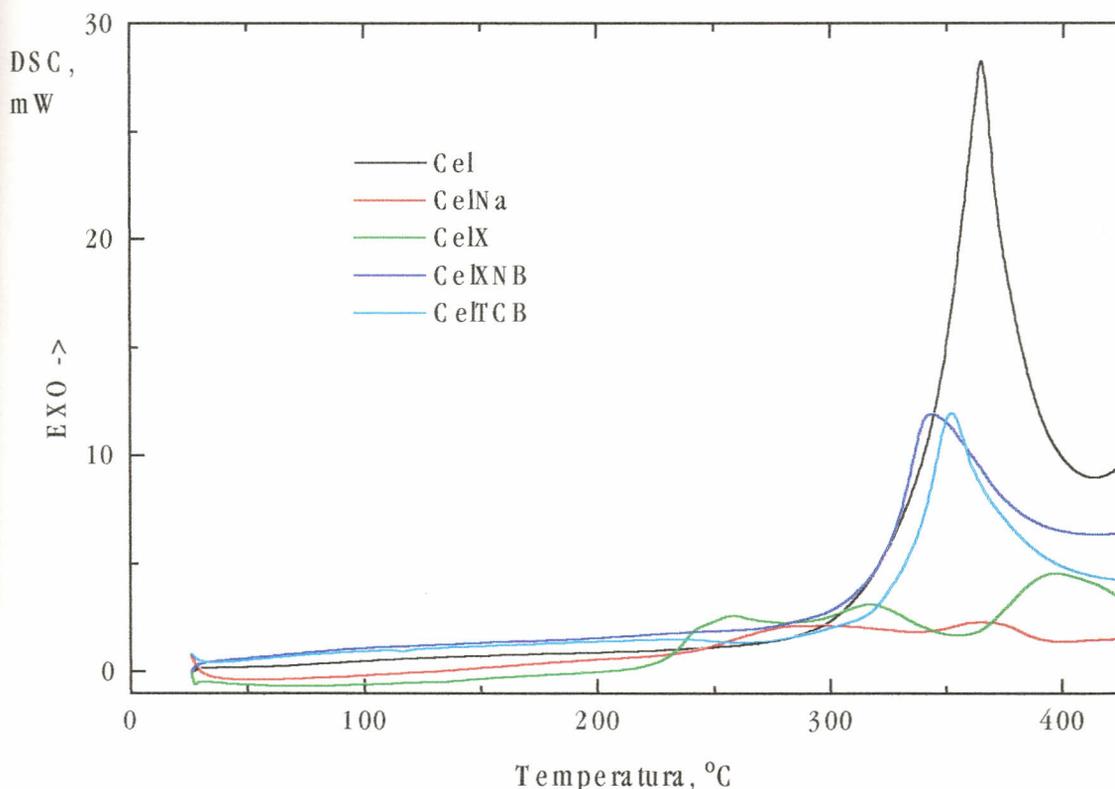


Figura 16 – Curvas DSC das amostras de Cel, CelNa, CelX, CelXNB e CelTCB da síntese C3

5.5 Cinética de hidrólise do CelXNB

A reação de hidrólise do CelXNB (esquema 14, pág. 26) compete com a imobilização de enzimas neste suporte (esquema 15, pág. 27).

Para melhor entendimento da imobilização da fosfatase alcalina estudou-se a reação de hidrólise do suporte CelXNB C3, com o maior GS obtido (GS=13,20). A reação foi realizada em 4 concentrações diferentes de tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) etanol/aquoso, com acompanhamento cinético por intermédio do aparecimento do NBT em 285nm.

As constantes de pseudo primeira ordem (k'') foram calculadas dos gráficos $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo, em que A_∞ e A_t são as absorbâncias nos tempos infinito e t qualquer, respectivamente. Na figura 17, mostra-se o gráfico $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo para a concentração de 0,050M de tampão, encontrado-se anexos os demais gráficos (gráficos 15 a 18). As hidrólises espontâneas do CelXNB não foram estritamente de primeira ordem, resultado semelhante à literatura^{19, 21}.

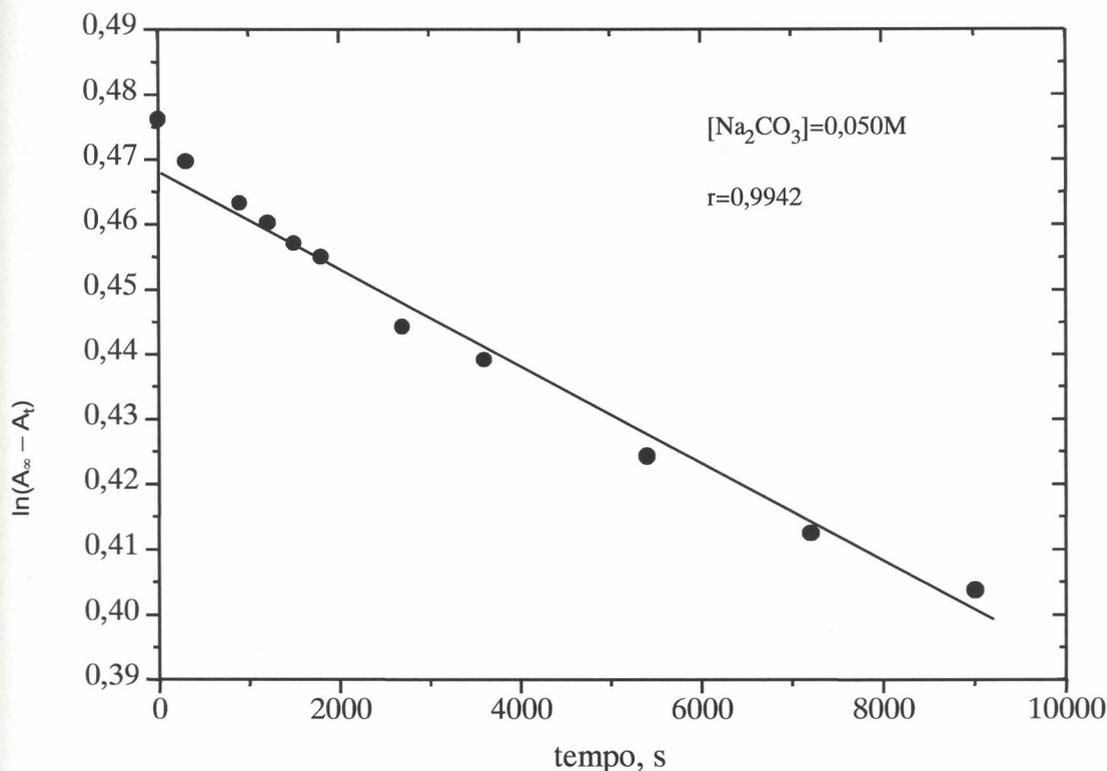
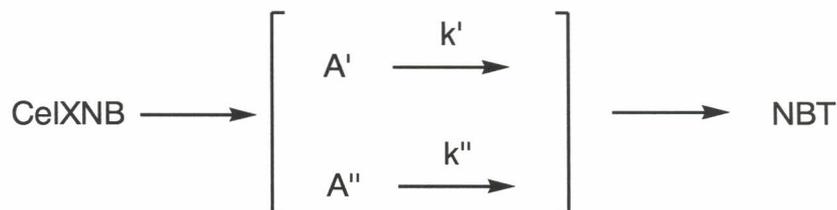


Figura 17 - Diagrama $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (50,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso

Após um rápido aumento inicial da absorvância (até 1000s), ocorre um processo mais lento comparando-se com o valor da absorvância teórica calculada do GS. Cineticamente, o processo pode ser descrito por meio do esquema 16, onde $k' \gg k''$, A' e A'' são dois grupos xantato com reatividades diferentes.



ESQUEMA 16

A absorvância observada A_t em um dado tempo é dada pela equação 6. O termo $A' = A'_0 \cdot e^{-k' \cdot t}$ decresce muito mais rápido do que $A'' = A''_0 \cdot e^{-k'' \cdot t}$. Do gráfico de $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo obteve-se k'' e A''_0 . Calculando-se o termo $A'' = A''_0 \cdot e^{-k'' \cdot t}$, pode ser construído um gráfico de $\ln A'$ versus tempo, obtendo-se k' da inclinação e $\ln A'_0$ do intercepto^{16, 19}.

$$A_t = A_\infty - A' - A'' \Rightarrow A_t = A_\infty - A'_0 \cdot e^{-k' \cdot t} - A''_0 \cdot e^{-k'' \cdot t} \quad (6)$$

Devido à pequena quantidade de medidas na região inicial da cinética (até 1000s), não foi possível calcular o valor de A' para se obter k' e A'_0 .

Na tabela 8, apresentam-se os valores experimentais de k'' e A''_0 / A_∞ para cada concentração de tampão carbonato. Observou-se a partir da relação A''_0 / A_∞ que a reação mais lenta corresponde em média a 99,2% da absorvância infinita.

Tabela 8 - Valores experimentais da constante velocidade de hidrólise observada (k'') e relação A''_0 / A_∞ do CeIXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) etanol/aquoso a várias concentrações de carbonato

| $[\text{Na}_2\text{CO}_3]$, M | $10^6 \cdot k''$, s^{-1} | A''_0 / A_∞ |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 0,001 | 1,6306 | 0,9950 |
| 0,010 | 2,7053 | 0,9908 |
| 0,025 | 3,9832 | 0,9910 |
| 0,050 | 7,5029 | 0,9913 |

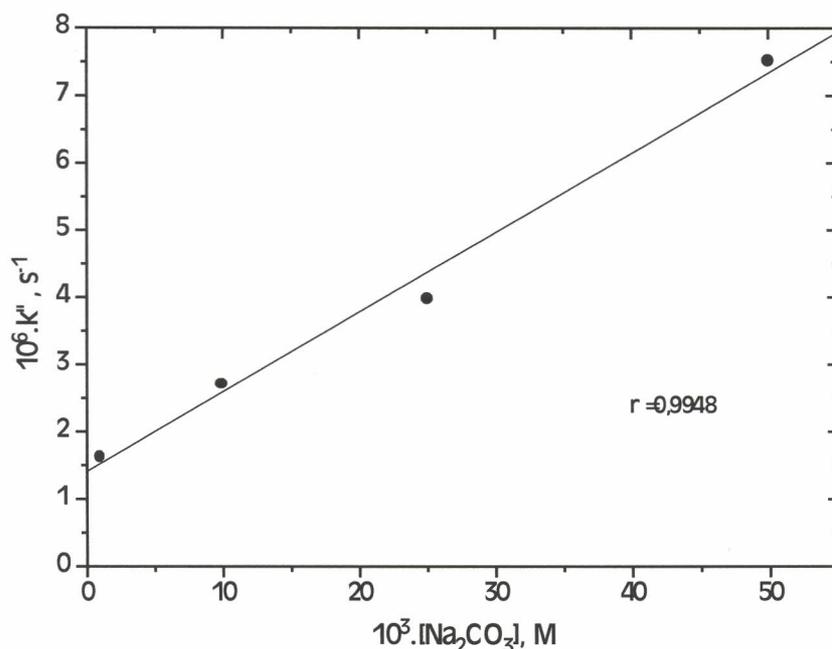


Figura 18 - Diagrama da constante de velocidade de hidrólise observada (k'') do CelXNB C3 versus concentração de tampão carbonato pH 11,0 10% (V/V) etanol/aquoso

Observa-se na figura 18 que existe uma relação linear entre k'' e $[\text{Na}_2\text{CO}_3]$ na região estudada, sob a forma da equação 7, com o tampão atuando como catalisador da reação de hidrólise do CelXNB.

$$k'' = k_{\text{esp}} + k_{\text{tampão}} \cdot [\text{Na}_2\text{CO}_3] \quad (7)$$

A inclinação do gráfico da figura 18 fornece a constante de catálise do tampão, $k_{\text{tampão}}$, e extrapolando à concentração zero de tampão, obtém-se a constante de hidrólise espontânea do CelXNB, k_{esp} , nessas condições experimentais.

Os valores experimentais obtidos para estas constantes foram $k_{\text{esp}} = 1,41 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{tampão}} = 1,18 \cdot 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, e, substituindo-os na equação 7, obtém-se a equação 8.

$$k'' = 1,41 \cdot 10^{-6} + 1,18 \cdot 10^{-4} \cdot [\text{Na}_2\text{CO}_3] \quad (8)$$

Comparando com resultados da literatura, os etil xantatos apresentam hidrólise de primeira ordem, o que indica apenas um mecanismo de hidrólise, enquanto os xantatos derivados de celulose, tais como, xantato de celulose de p-nitrobenzila (CelXNB) e xantato de celulose de 3,5-dinitrofenila (CelXDNF), apresentam estes dois processos paralelos de hidrólise, um mais rápido e outro mais lento. Medidas de constante de velocidade mostram que a reatividade dos ésteres xânticos de celulose com a água é maior que a dos etil xantatos^{19, 21}.

Estudos de RMN ^{13}C de sólidos indicam que a hidrólise do CelXNB é muito mais rápida nas posições dos carbonos 2 e 3, com constante de velocidade k' , do que no

carbono 6, com constante de velocidade k'' (esquema 16, pág. 45), do anel anidroglicopiranosico da celulose. Esta diferença pode ser explicada pela organização da região cibotática da água ao redor da celulose, em que as moléculas de água estão orientadas aos carbonos 2 e 3, diminuindo a entropia no estado de transição^{19, 21}. Como a hidrólise rápida ocorre nos carbonos 2 e 3, a imobilização de enzimas, que é uma reação lenta, deve acontecer preferencialmente na posição 6 do anel.

5.6 Cinética de imobilização da fosfatase alcalina em CeIXNB

A reação de imobilização de enzimas foi acompanhada espectrofotometricamente pelo aparecimento do NBT em 285nm (esquema 3, pág. 3). Durante esta reação, ocorre paralelamente a reação de hidrólise do CeIXNB (esquema 3, pág. 3), portanto, a concentração de NBT determinada é influenciada por essas duas reações paralelas.

A figura 19, à pág. 48, mostra-se o gráfico $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo, em tampão carbonato pH 11,0 (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso. As constantes de pseudo primeira ordem da reação de imobilização de enzimas foram calculadas a partir das inclinações deste gráfico por intermédio de regressão linear.

Observou-se nesta reação três comportamentos distintos. De 0 a 5min (900s), houve um rápido aumento da concentração de NBT, semelhante à reação de hidrólise. Devido à ausência de medidas nessa região inicial, a constante de velocidade não foi determinada. Entre 5min e 2,5h (900 a 9000s, respectivamente), ocorreu uma queda de velocidade em relação ao período inicial, de modo similar à reação de hidrólise, apresentando constante de velocidade $k_{obs1} = 5,49 \cdot 10^{-6} s^{-1}$. Entre os instantes 2,5h e 5,5h (9000s e 19800s, respectivamente), houve um aumento da velocidade de reação, apresentando a constante de velocidade $k_{obs2} = 1,89 \cdot 10^{-5} s^{-1}$.

Devido à característica lenta tanto da reação de hidrólise quanto de imobilização, os tempos de acompanhamento das cinéticas tornam-se demasiadamente longos. Para melhor estudo da reação de imobilização, faz-se necessário aprofundar os estudos da hidrólise do suporte em tempos maiores de reação e por meio de sistema de acompanhamento cinético em fluxo.

A partir de um estudo mais aprofundado da hidrólise, poder-se-á verificar se a catálise observada a partir de 2,5h (9000s) ocorre devido à hidrólise ou à imobilização da enzima, ou a uma outra reação paralela, como uma tiólise. A reação de imobilização também pode ser melhor estudada por meio da variação da concentração de enzima, pela dependência da constante de velocidade observada com a concentração de enzima.

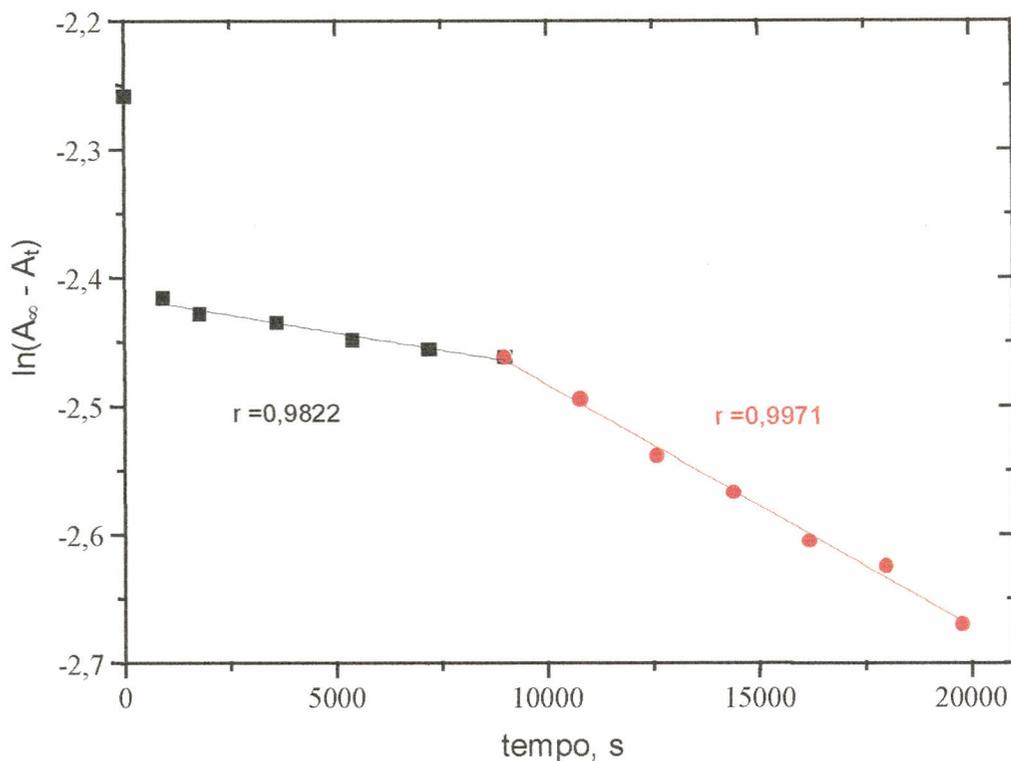


Figura 19 - Diagrama $\ln(A_{\infty}-A_t)$ versus tempo, em segundos, da reação de imobilização da fosfatase alcalina em CelXNB C3 (GS=13,20), em tampão carbonato pH 11,0 (0,05M) 10% (V/V) etanol/aquoso

5.7 Determinação da absorvidade molar do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)

A atividade enzimática da fosfatase alcalina foi acompanhada espectrofotometricamente pela transformação do p-nitrofenilfosfato dissódico em p-nitrofenol, em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M) (esquema 4, pág. 3).

Estas duas substâncias apresentam espectros UV / VIS distintos (figura 20, pág. 49), possibilitando o acompanhamento das cinéticas enzimáticas em 400nm pelo aparecimento do p-nitrofenol.

Para quantificação das concentrações de p-nitrofenol determinou-se, em 400nm ($\lambda_{\text{máximo}}$), o valor da absorvidade molar ϵ_{400} do p-nitrofenol nas condições da reação. Na figura 21, à pág. 49, apresenta-se o gráfico absorvância em 400nm versus concentração de p-nitrofenol. O valor do coeficiente angular deste gráfico foi obtido por regressão linear, fornecendo o valor experimental de $\epsilon_{400} = 1,72 \cdot 10^4 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M), com linearidade entre absorvância 0,0010 e 1,7500.

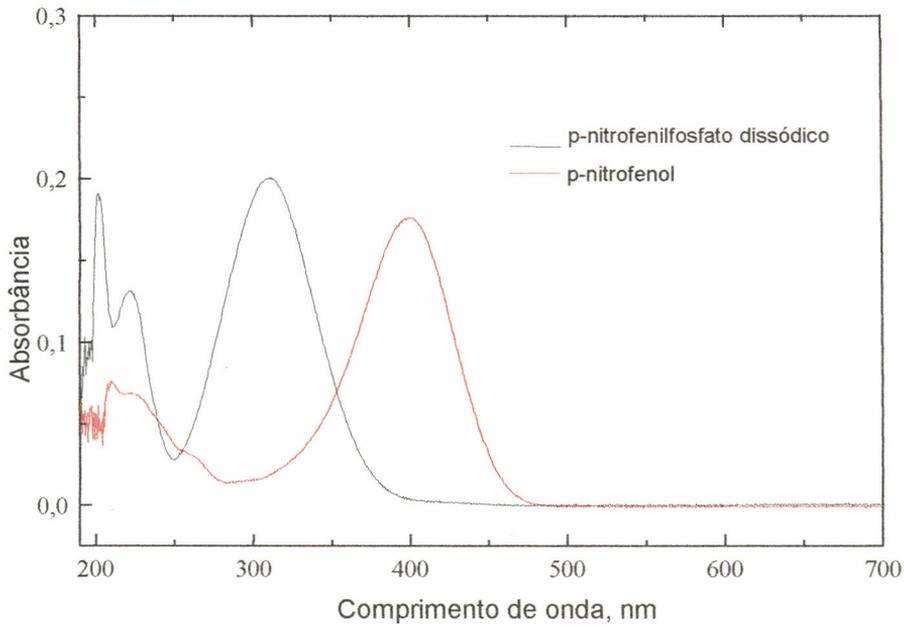


Figura 20 - Espectros UV / VIS do p-nitrofenilfosfato dissódico e do p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)

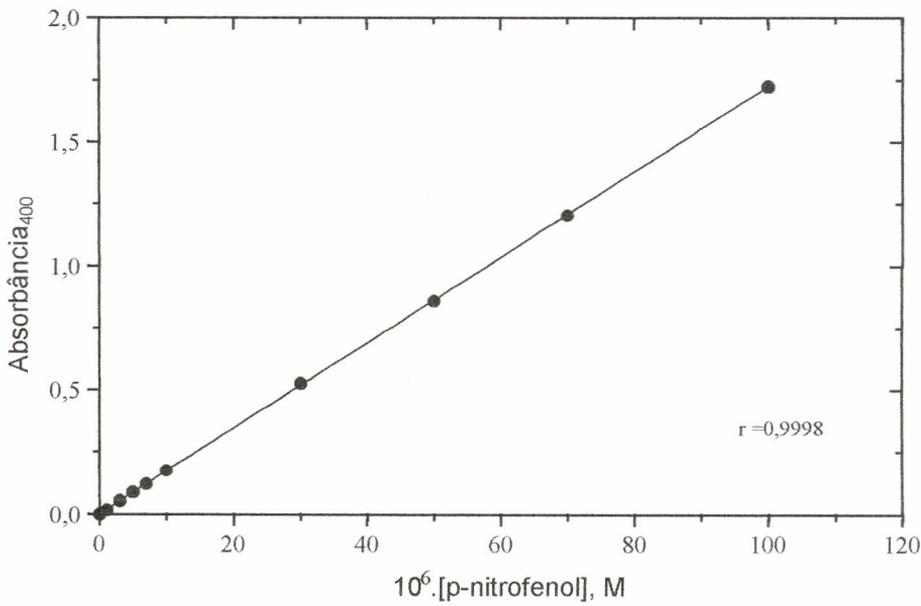


Figura 21 - Diagrama absorbância em 400nm versus concentração molar de p-nitrofenol em tampão TRIS-HCl pH 8,0 (0,01M)

5.8 Influência da concentração do substrato na atividade enzimática da fosfatase alcalina em solução e imobilizada

A fim de se determinar a concentração de substrato em que a fosfatase alcalina atinge a velocidade máxima de transformação de substrato em produto, variou-se a concentração de substrato, mantendo-se constante a concentração de enzima na reação. A figura 22 apresenta o gráfico da atividade enzimática v_0 versus concentração de p-nitrofenilfosfato dissódico para a enzima em solução e imobilizada. A figura 23, à pág. 51, apresenta o gráfico do recíproco da atividade enzimática v_0 versus recíproco da concentração de p-nitrofenilfosfato dissódico para a enzima em solução e imobilizada, que foi utilizado na determinação da constante de Michaelis K_M e da velocidade máxima $v_{m\acute{a}x}$.

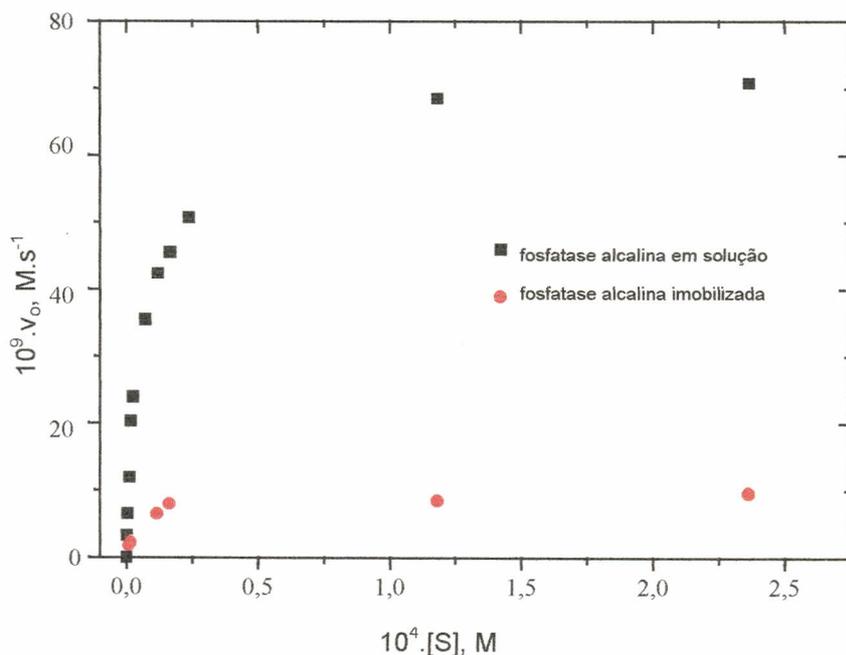


Figura 22 - Diagrama da atividade enzimática, v_0 , versus concentração do substrato p-nitrofenilfosfato dissódico, para fosfatase alcalina em solução ($50,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (quadrados pretos) e fosfatase alcalina imobilizada (círculos vermelhos)

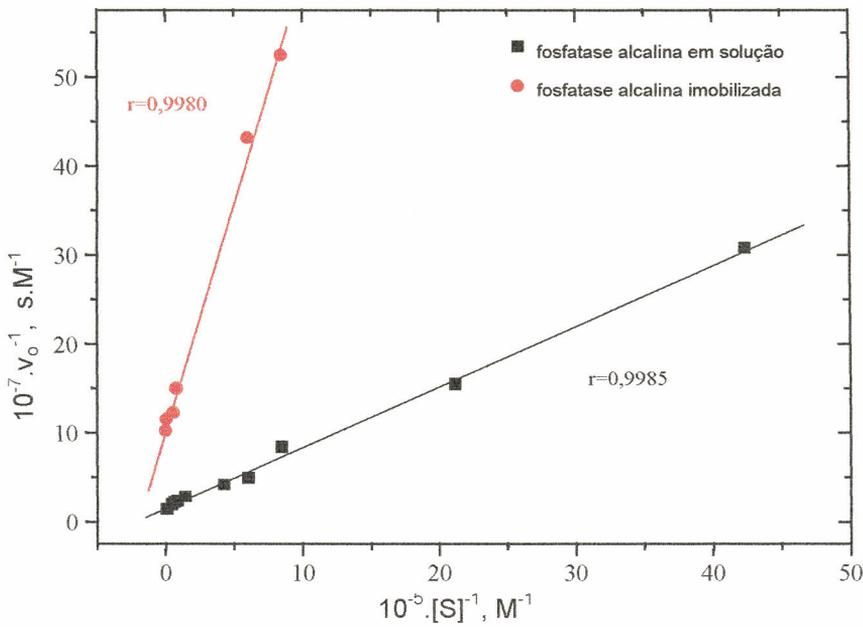


Figura 23 - Diagrama do recíproco da atividade enzimática versus recíproco da concentração de p-nitrofenilfosfato dissódico, da fosfatase alcalina em solução $50,0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (quadrados pretos) e fosfatase alcalina imobilizada (círculos vermelhos)

Observando-se os resultados da figura 22 (pág. 50), houve uma queda de atividade enzimática após a imobilização da enzima em CeIXNB. Obteve-se uma relação linear entre o recíproco da atividade enzimática e o recíproco da concentração de substrato, utilizando-se portanto o modelo de Michaelis-Menten¹⁰ (equação 9) para a relação entre atividade enzimática e concentração de substrato e a relação de Lineweaver-Burk¹⁰ (equação 10) para determinação de K_M e $v_{\text{máx}}$.

$$v_o = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [\text{enz}] \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{v_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{v_{\text{máx}}} + \frac{K_M}{v_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (10)$$

em que,

- v_o = velocidade inicial de transformação do substrato em produto (atividade enzimática)
 k_{cat} = constante de velocidade de catálise da enzima
 $[enz]$ = concentração de enzima
 $[S]$ = concentração do substrato
 $v_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima de transformação do substrato em produto
 K_M = constante de Michaelis

A partir da regressão linear dos gráficos da figura 23 (pág. 51) obteve-se, do coeficiente angular, o valor de $K_M/v_{m\acute{a}x}$ e, do intercepto com o eixo das ordenadas, o valor de $1/v_{m\acute{a}x}$. A equação 11 expressa a equação obtida para a enzima em solução e a equação 12 para a enzima imobilizada.

$$\frac{1}{v_o} = 1,57 \cdot 10^7 + 68,55 \cdot \frac{1}{[S]} \quad (11)$$

$$\frac{1}{v_o} = 1,05 \cdot 10^8 + 512,21 \cdot \frac{1}{[S]} \quad (12)$$

Na tabela 9 apresenta-se os resultados obtidos de K_M e $v_{m\acute{a}x}$ para fosfatase alcalina em solução e imobilizada.

Tabela 9 - Valores obtidos para $v_{m\acute{a}x}$ e K_M para a fosfatase alcalina em solução e imobilizada

| | $10^9 \cdot v_{m\acute{a}x}, M \cdot s^{-1}$ | $10^6 \cdot K_M, M$ |
|--------------------------------|--|---------------------|
| Fosfatase Alcalina em Solução | 63,54 | 4,36 |
| Fosfatase Alcalina Imobilizada | 9,56 | 4,90 |

A partir de concentrações de substrato maiores que $19 \cdot K_M$, obtêm-se valores de v_o acima de 95% de $v_{m\acute{a}x}$. Acima deste valor, a variação da atividade enzimática é pequena quando se varia a concentração¹⁰. Devido à concentração de substrato de $2,0 \cdot 10^{-4} M$ corresponder a 97,8% de $v_{m\acute{a}x}$, esta foi escolhida para as determinações de atividade enzimática da fosfatase alcalina.

Comparando as velocidades máximas da fosfatase alcalina em solução e imobilizada, houve uma diminuição de 85,0% da velocidade máxima após a imobilização da enzima. Esta diminuição da velocidade máxima ocorre devido à menor concentração de enzima imobilizada comparando-se com a enzima em solução e às perdas de atividade enzimática provenientes da imobilização.

Ao se comparar as constantes de Michaelis, houve um aumento de 12,4% de K_M após a imobilização, o que indica uma perda de 12,4% da atividade enzimática após a imobilização da enzima.

5.9 Influência da reutilização da enzima imobilizada na atividade enzimática

A reutilização da enzima imobilizada é uma das vantagens em relação à enzima em solução^{1,2}. Na figura 24, apresenta-se o resultado obtido da porcentagem da atividade enzimática inicial versus número de ciclos de reutilização. Observa-se que a atividade enzimática da enzima imobilizada mantém-se acima de 95% até o sétimo ciclo de reuso, considerando-se que o sétimo ciclo foi realizado após a enzima ser mantida sob refrigeração (-20°C) por 12h.

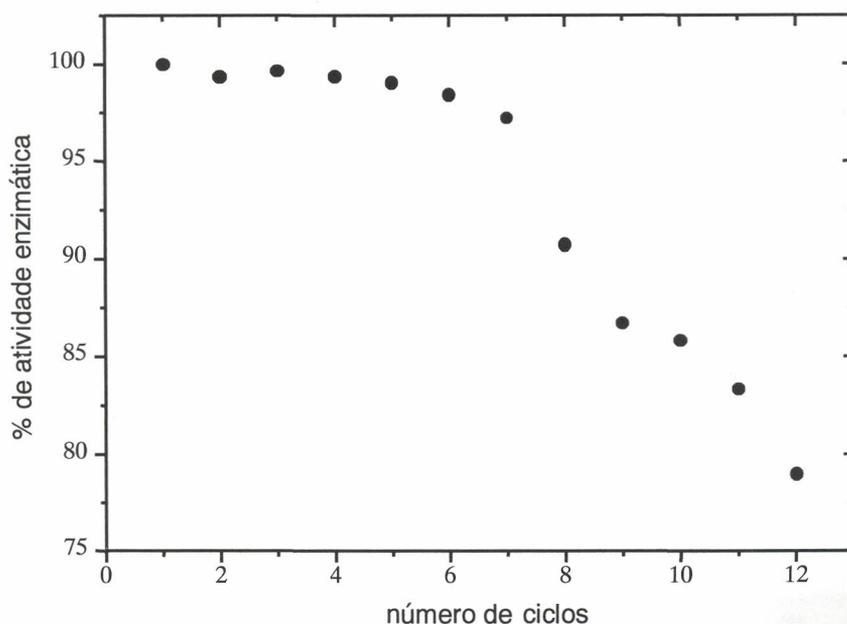


Figura 24 - Diagrama da porcentagem da atividade enzimática inicial da fosfatase alcalina imobilizada em CelXNB C3 versus número de ciclos de reutilização da enzima

Após o oitavo ciclo de reutilização, o tecido com enzima imobilizada começou a desfibrar, ocorrendo perda de massa e contribuindo com a queda acentuada da atividade enzimática.

Na determinação da constante de Michaelis para a enzima imobilizada, utilizou-se seis vezes a mesma porção de enzima imobilizada, procurando-se manter o número de cinéticas inferior a sete para a mesma amostra.

5.10 Influência da concentração de fosfatase alcalina em solução na atividade enzimática

De acordo com a equação 9 (pág. 52), conhecendo-se o valor de K_M e, mantendo-se a concentração de substrato constante, pode-se determinar a constante catalítica k_{cat} da enzima a partir da inclinação ($\Delta v_o / \Delta [enz]$) do gráfico de atividade enzimática versus concentração de enzima.

Na figura 25, apresenta-se o gráfico da atividade enzimática versus concentração de fosfatase alcalina em solução. Obteve-se uma relação linear entre a atividade e a concentração de enzima na faixa estudada, estando os resultados em concordância com o modelo de Michaelis-Menten. O valor da inclinação do gráfico foi obtido através de regressão linear, e é igual a $1,52 \cdot 10^{-6} \text{M} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$.

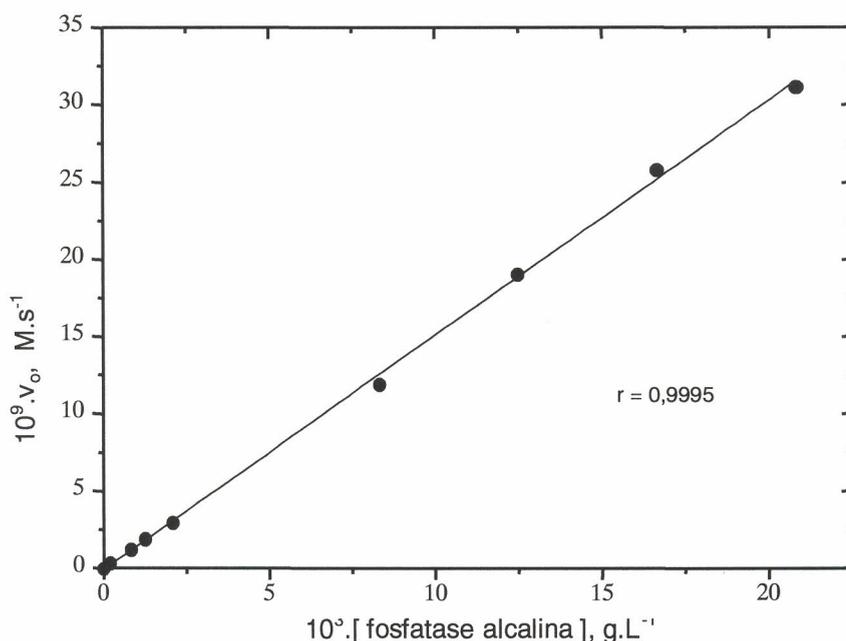


Figura 25 - Diagrama atividade enzimática versus concentração de fosfatase alcalina em solução

Substituindo na equação 13 os valores de $[S] = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e $K_M = 4,36 \cdot 10^{-6} \text{M}$ obtém-se o valor da constante catalítica k_{cat} para a fosfatase alcalina em solução.

$$\frac{\Delta v_o}{\Delta[\text{enz}]} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [S]}{K_M + [S]} = 1,52 \cdot 10^{-6} \text{M} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1} \quad (13)$$

$$k_{\text{cat}} = 1,55 \cdot 10^{-6} \text{M} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$$

5.11 Influência da concentração de fosfatase alcalina imobilizada na atividade enzimática

Determinou-se a atividade enzimática para quatro amostras de enzima imobilizada de massas diferentes. Verificou-se uma relação linear entre a atividade da enzima imobilizada e a massa de CelXNB com enzima imobilizada, calculando-se a relação $(\Delta v_o / \Delta m_{\text{CelXNBEnz}})$ a partir da regressão linear do gráfico da figura 26. O valor para $\Delta v_o / \Delta m_{\text{CelXNBEnz}}$ corresponde a $3,75 \cdot 10^{-7} \text{M} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ e obteve-se a equação 14, abaixo, com a massa em gramas.

$$v_o = -2,26 \cdot 10^{-9} + 3,75 \cdot 10^{-7} \cdot \text{massa}_{\text{CelXNBEnz}} \quad (14)$$

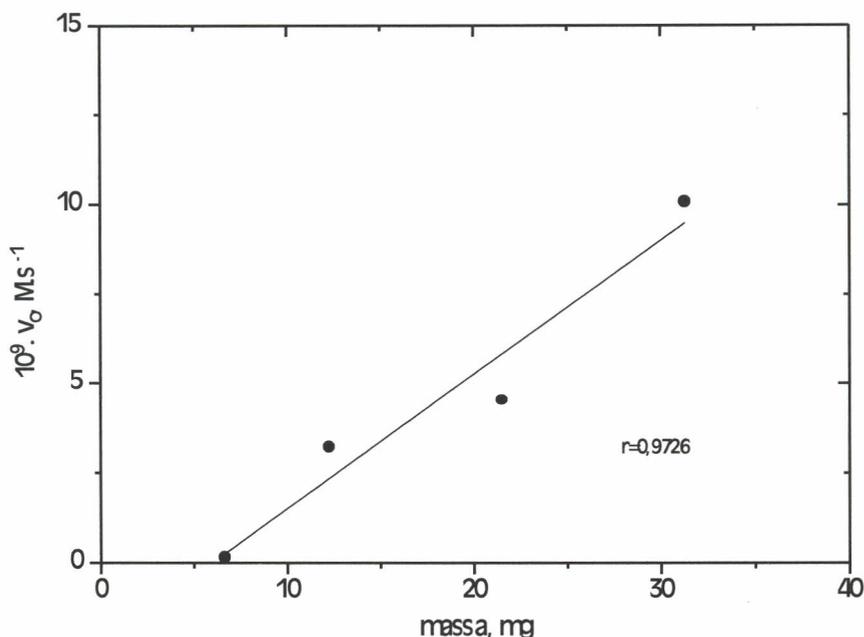


Figura 26 - Diagrama da atividade enzimática versus massa de CelXNB C3 com fosfatase alcalina imobilizada

Corrigindo-se os valores de v_0 para enzima imobilizada do valor da perda de atividade enzimática (12,4%), obtiveram-se os valores de v_0^* , considerando-se que a enzima imobilizada se comportasse como em solução. A partir do resultado de $\Delta v_0 / \Delta[\text{enz}]$ da figura 25, obtiveram-se os valores de concentração de fosfatase alcalina para as enzimas imobilizadas. Com o volume de 20,0mL de substrato utilizado nas determinações de atividade da enzima imobilizada calcularam-se os valores da massa de fosfatase alcalina imobilizada no CelXNB (tabela 10).

Tabela 10 - Massa de CelXNB com fosfatase alcalina imobilizada, atividade enzimática v_0 da enzima imobilizada, atividade enzimática corrigida v_0^* , concentração de fosfatase alcalina e massa de fosfatase alcalina imobilizada.

| Massa de CelXNB com fosfatase alcalina imobilizada, mg | $10^9 \cdot v_0$, M.s ⁻¹ | $10^9 \cdot v_0^*$, M.s ⁻¹ | $10^3 \cdot [\text{fosfatase alcalina}]$, g.L ⁻¹ | Massa de fosfatase imobilizada, mg |
|--|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|
| 6,74 | 0,12872 | 0,14468 | 0,095187 | 0,001904 |
| 12,32 | 3,2247 | 3,6246 | 2,3846 | 0,04769 |
| 21,53 | 4,5176 | 5,0778 | 3,3406 | 0,06681 |
| 31,30 | 10,0781 | 11,3280 | 7,4524 | 0,14905 |

Pode - se obter portanto uma estimativa da massa de fosfatase alcalina imobilizada por grama de suporte com enzima imobilizada. A partir dos dados da tabela 10, construiu-se um gráfico de massa de fosfatase alcalina imobilizada versus massa de CelXNB C3 com fosfatase alcalina imobilizada, apresentado na figura 27.

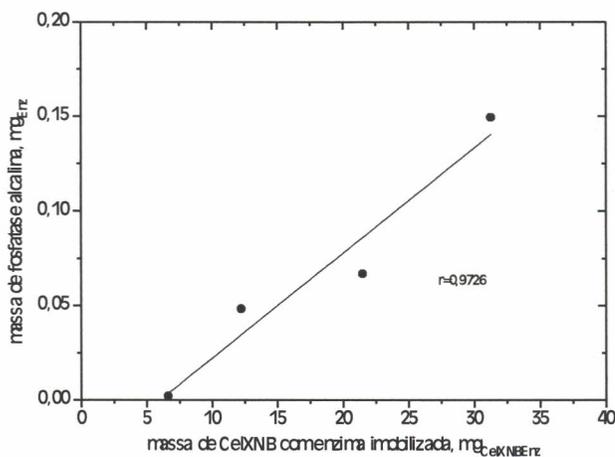


Figura 27 - Diagrama massa de fosfatase alcalina imobilizada versus massa de CelXNB com fosfatase alcalina imobilizada

Obteve-se o valor da inclinação da reta por regressão linear, que correspondeu a $5,55\text{mg}_{\text{Enz}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{CelXNBEnz}}$.

5.12 Estimativa do peso molecular da fosfatase alcalina

Tendo a estimativa de massa de fosfatase alcalina imobilizada e o número de mols liberados de NBT somente pela reação de imobilização da enzima, pode-se estimar o peso molecular da enzima imobilizada.

Considerando-se a reação de imobilização, tem-se que a absorbância A_t em um dado tempo t é dada pela equação 15.

$$A_t = A_\infty - A_{\text{HID}} - A_{\text{IMOB}} \quad (15)$$

em que,

A_∞ = absorbância no tempo t infinito

A_{HID} = absorbância da reação de hidrólise

A_{IMOB} = absorbância da reação de imobilização

Considerando que a reação de hidrólise dependa essencialmente da etapa lenta de hidrólise A'' , da tabela 8 (pág. 46) temos que $A''_0 = 0,992 \cdot A_\infty$, e isolando-se A_{IMOB} , obtém-se a equação (16).

$$A_{\text{IMOB}} = A_\infty - A_t - 0,992 \cdot A_\infty \cdot e^{-k'' \cdot t} \quad (16)$$

A partir do valor de A_{IMOB} obtém-se o valor do número de mols de NBT liberados somente pela reação de imobilização. Realizando-se este experimento para diversas amostras, obtém-se um gráfico da massa da enzima imobilizada versus número de mols liberados somente pela reação de imobilização, onde a inclinação é o peso molecular da enzima imobilizada.

Para se realizar esta estimativa de peso molecular da enzima imobilizada, deve-se aprimorar o estudo da reação de hidrólise do suporte CelXNB, calculando-se as constantes k' e k'' nas condições de reação e para um período de tempo da mesma ordem de grandeza desta reação.

A própria reação de imobilização de enzimas deve ser melhor estudada, com acompanhamento cinético durante todo o tempo de reação. A catálise observada após 2,5h (9000s) de reação deve ser estudada, verificando se o aumento da concentração de NBT ocorre devido à hidrólise, à imobilização ou a outras reações paralelas, como, por exemplo, uma tiólise, pois há aumento da concentração de tiol no decorrer da reação.

Estimou-se o peso molecular, como exemplo, para a amostra de 21,53mg de CelXNB com enzima imobilizada. Obteve-se uma massa estimada de fosfatase alcalina imobilizada de 0,06681mg (tabela 10) e número de mols calculado a partir da equação 16 de $5,31 \cdot 10^{-10}$ mol, resultando em um peso molecular estimado da fosfatase alcalina da ordem de $130.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

É necessário também um estudo da caracterização através de ^{13}C RMN do sólido obtido formado a partir da reação de imobilização, possibilitando a compreensão em qual posição do anel anidroglucopiranosico da celulose ocorre a imobilização, estimar o grau de substituição da enzima imobilizada e o entendimento das ligações formadas entre suporte e enzima imobilizada.

6 – Conclusão

O xantato de celulose de p-nitrobenzila (CeIXNB) é um suporte sintetizado a partir de matérias primas acessíveis, apresentando boa estabilidade térmica para imobilização de enzimas.

O CeIXNB foi sintetizado com diferentes graus de substituição e diferentes morfologias. Observou-se que a concentração de hidróxido de sódio na reação de mercerização influencia na morfologia do produto obtido, aumentando a degradação do tecido original com o aumento da concentração de NaOH, de acordo com a transição da celulose I para celulose II.

O grau de substituição do CeIXNB apresentou aumento linear com o aumento da concentração de hidróxido de sódio na região de transição de fases de celulose I para celulose II, na reação de mercerização, quando não ocorre desxantação do CeIX.

A reação de hidrólise do CeIXNB é composta por duas reações, uma rápida, minoritária, e outra lenta, majoritária, a qual compete com a imobilização de enzimas. A hidrólise do CeIXNB é catalisada pelo tampão, podendo-se minimizar a hidrólise do suporte por diminuição da concentração do tampão.

A fosfatase alcalina é uma enzima de baixo custo encontrada comercialmente e de fácil acompanhamento cinético, podendo ser acompanhada na região visível do espectro, o que possibilita sua utilização como enzima modelo no estudo da reação de imobilização.

A fosfatase alcalina imobilizada apresentou atividade enzimática superior a 95% da original até o sétimo ciclo de reutilização. Isto indica que a reação de imobilização de enzimas no CeIXNB ocorreu por meio de ligação covalente e não por adsorção. A imobilização de enzimas em CeIXNB parece geral para qualquer tipo de enzima.

A imobilização da fosfatase alcalina ocasionou perda de 12,4% de atividade enzimática da enzima imobilizada comparando-se com a enzima em solução. As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina imobilizada em CeIXNB são comparáveis à da enzima em solução, proporcionando a sua utilização na forma imobilizada em CeIXNB em técnicas de determinação analítica e na construção de biossensores.

É possível estimar o peso molecular da enzima imobilizada a partir de resultados da cinética de imobilização e da cinética enzimática da enzima imobilizada.

7 – Referências Bibliográficas

- 1 – ZABORSKY, R., Immobilized enzymes, Chemical Rubler, 1974.
- 2 – WISEMAN, A., Handbook of enzyme technology, 2nd edition, John Wiley & Sons, USA, 1985.
- 3 – LICKLIDER, L., KUHR, W. G., Characterization of reaction dynamics in a trypsin-modified capillary microreactor, *Analytical Chemistry*, **70**, 9, 1902-1908, 1998.
- 4 – LICKLIDER, L., KUHR, W. G., LACEY, M. P., KEOUGH, T., PURDON, M. P., TAKIGIKU, R., On-line microreactors/capillary electrophoresis/mass spectrometry for the analysis of proteins and peptides, *Analytical Chemistry*, **67**, 22, 4170-4177, 1995.
- 5 – AYYAGARI, M. S., PANDE, R., KAMTEKAR, S., GAO, H., MARX, K. A., KUMAR, J., TRIPATHY, S. K., AKKARA, J. A., KAPLAN, D. L., Molecular assembly of proteins and conjugated polymers - toward development of biosensors, *Biotechnology and Bioengineering*, **45**, 2, 116-121, 1995.
- 6 – ADACHI, M., YAMAZAKI, M., HARADA, M., SHIOI, A., KATCH, S., Bioaffinity separation of trypsin inhibitor immobilized in reverse micelles composed of a nonionic surfactante, *Biotechnology and Bioengineering*, **53**, 4, 406-408, 1997.
- 7 – KULIK, E. A., KATO, K., IVANCHENKO, M. I., IKADA, Y., Trypsin immobilization on to polymer surface throught grafted layer and its reaction with inhibitors, *Biomaterials*, **14**, 10, 763-769, 1993.
- 8 – LABROU, N. E., CLONIS, Y. D., Biomimetic dye affinity chromatography for the purification of bovine heart lactate dehydrogenase, *Journal of Chromatography A*, **718**, 35-44, 1995.
- 9 – YOUNG, R. A., ROWELL, R. M., Cellulose – Structure, modification and hydrolysis, 1st edition, John Wiley & Sons, USA, 1986.
- 10 – VOET, D., VOET, J. G., Biochemistry, 2nd edition, John Wiley & Sons, USA, 1995.

- 11 – RYDHOLM, S. A., *Pulping Process*, Reprinted, John Wiley & Sons, USA, 1985.
- 12 – BILMEYER, F. W., *Textbook of polymer science*, John Wiley & Sons, USA, 1984.
- 13 – YAMASHIKI, T., MATSUI, T., SAITOH, M., OKAJIMA, K., KAMIDE, K., SAWADA, T.,
Characterisation of cellulose treated by the steam explosion method. Part 1:
Influence of cellulose resources on changes in morphology, degree of
polymerization, solubility and solid structure, *British Polymer Journal*, **22**, 73-83,
1990.
- 14 – SJOSTRÖN, E., *Wood Chemistry: fundamentals and applications*, 1st edition, Academic
Press, USA, 1981.
- 15 – KAMIDE, K., OKAJIMA, K., Determination of distribution of o-acetyl group in trihydric
alcohol units of cellulose-acetate by C-13 nuclear magnetic-resonance analysis,
Polymer Journal, **13**, 2, 127-133, 1981
- 16 – OLIVEIRA, C. M. S. Mecanismo de aminólise de ésteres xânicos de celulose e
análogos, Tese de Doutorado, UFMG, 1995.
- 17 – MENEFEÉ, E., HAUTALA, E., Soil stabilization by cellulose xanthate, *Nature*, **275**, 530-
532, 1978
- 18 – KENNEDY, J. F., ZAMIR, A., The use of cellulose xanthate for the immobilisation of
biological molecules, *Carbohydrate Research*, **41**, 227-233, 1975
- 19 – HUMERES, E., SOLDI, V., KING, M., NUNES, M., OLIVEIRA, C. M. S., BARRIE, P. J.,
Hydrolysis and aminolysis of alkyl xanthate esters and cellulose analogues,
Canadian Journal of Chemistry, **77**, 5-6, 1050-1056, 1999
- 20 – KIM, H. T., LEE K., Application of insoluble cellulose xanthate for the removal of heavy
metals from aqueous solution, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **16**, 3, 298-
1999

- 21 - HUMERES, E., SEQUINEL, L. F., NUNES, M., OLIVEIRA, C. M. S., BARRIE, P. J., Kinetic effects induced by cellulose on water-catalyzed reactions. Hydrolysis of 2,4-dinitrophenyl cellulose xanthate and some sugar xanthate ester analogues, *Canadian Journal of Chemistry*, **76**, 6, 960-965, 1998
- 22 – PIZARRO, C., FERNÁNDEZ-TORROBA, M. A., BENITO, C., GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M., Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment, *Biotechnology and Bioengineering*, **53**, 5, 497-506, 1997.
- 23 – SURINENAITE, B. R., BENDIKENE, V. G., JUODKA, B. A., Immobilization of enzymes on magnetic carriers: Optimization of immobilization conditions for chicken intestine alkaline phosphatase, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **32**, 6, 547-551, 1996
- 24 – GAO, H. H., CHEN, Z. P., KUMAR, J., TRIPATHY, S. K., KAPLAN, D. L., Tapered fiber tips for fiber optic biosensors, *Optical Engineering*, **34**, 12, 3465-3470, 1995
- 25 – MORRISON, R., BOYD, R., Química Orgânica, 8ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
- 26 – KATADA, T., TSUJI, S., SUGYAMA, T., KATO, S., MIYUTA, M., Preparation and reactions of unsymmetrical thiocarbonyl disulfides, *Chemistry Letters*, **5**, 441 - 444, 1976.
- 27 – KATO, S. HORI, A., SHIOTANI, H., MIZUTA, M., Infrared and raman-spectra of (thioacetoxythio)triorgano derivatives of silicon, germanium, tin and lead, *Journal of Organometallic Chemistry*, **82**, 2, 223-230, 1974.
- 28 – WENDLANDT, W. W., Thermal Methods of analysis, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 1986.

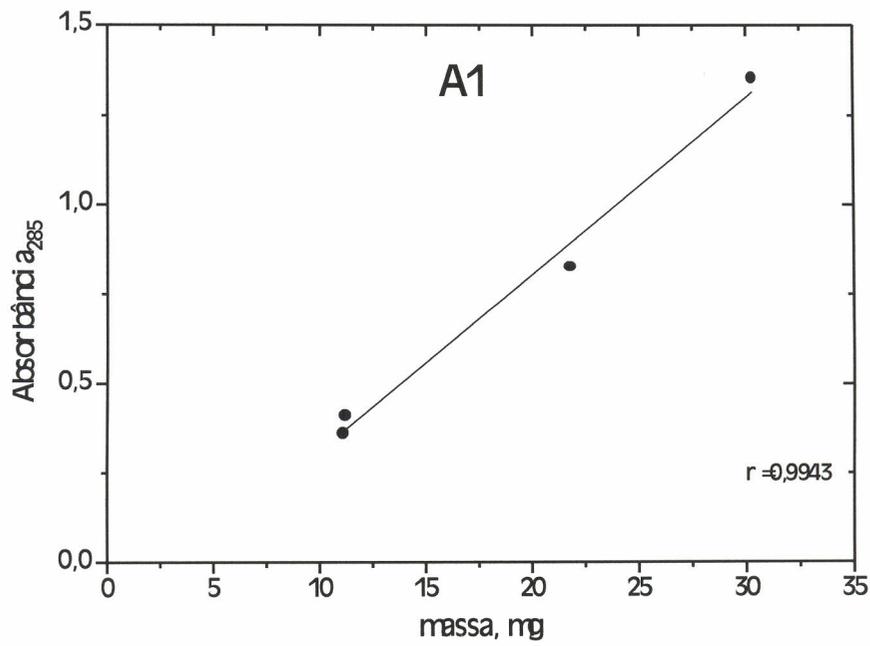


Gráfico 1 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese A1

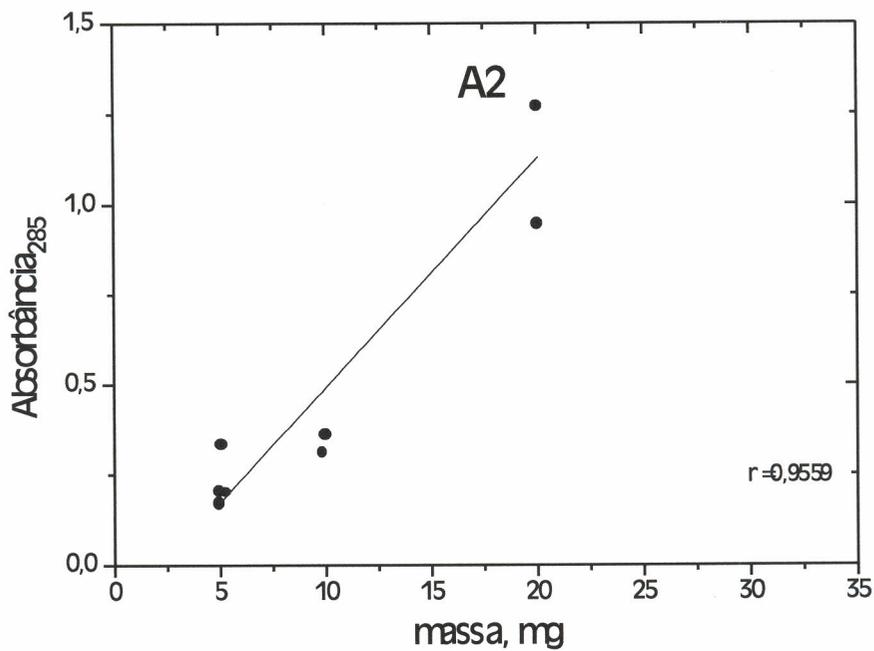


Gráfico 2 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese A2

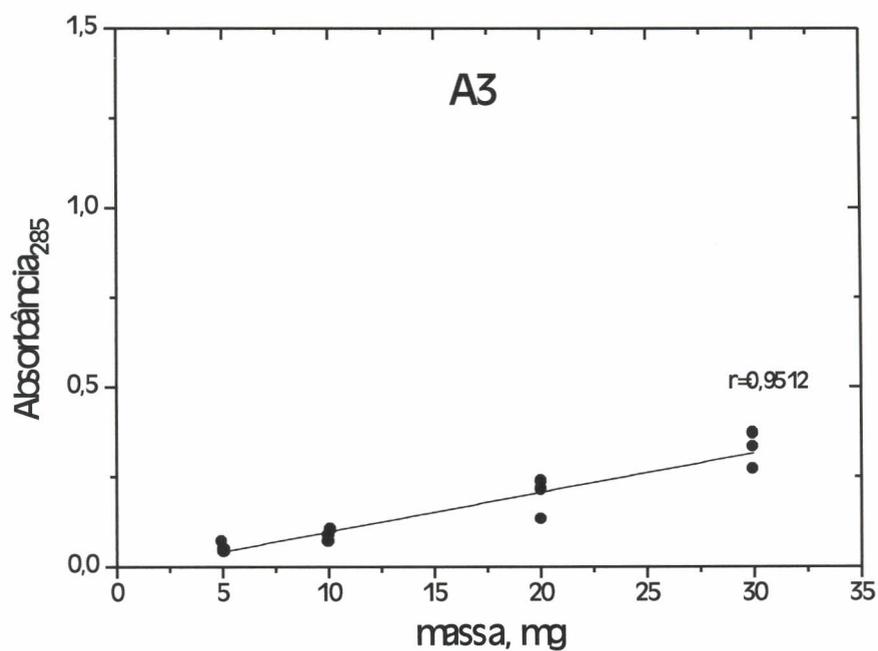


Gráfico 3 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A3

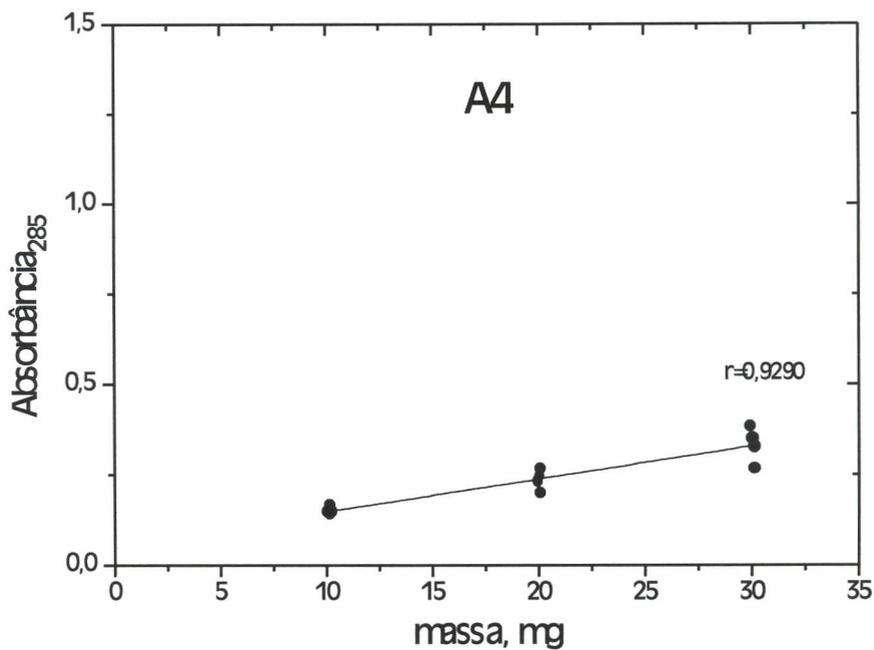


Gráfico 4 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese A4

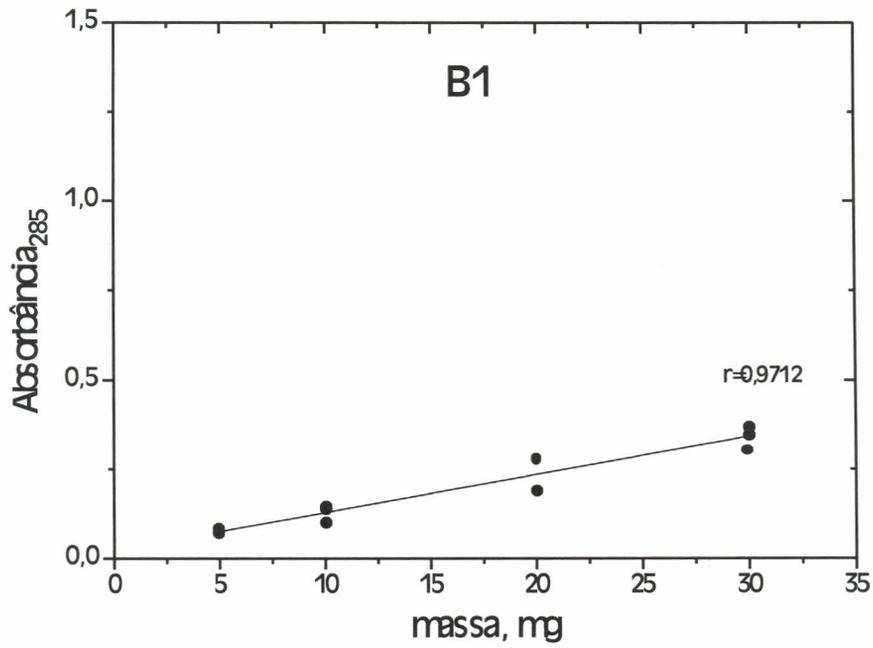


Gráfico 5 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B1

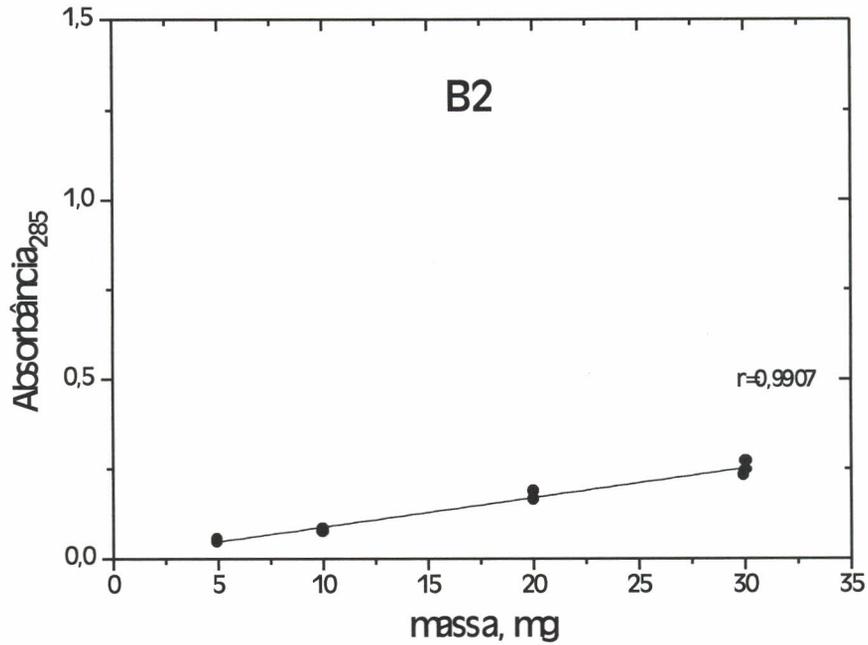


Gráfico 6 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B2

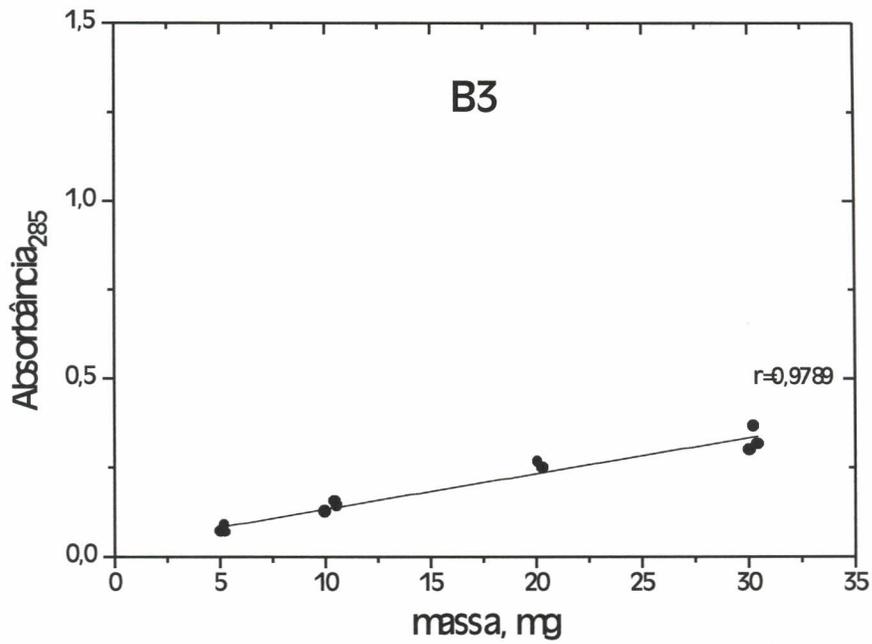


Gráfico 7 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B3

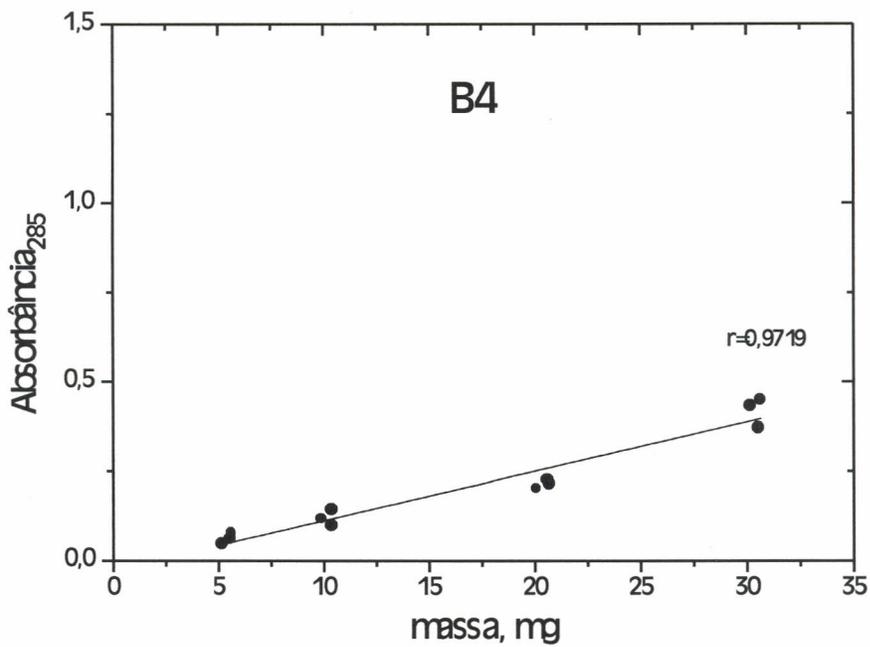


Gráfico 8 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B4

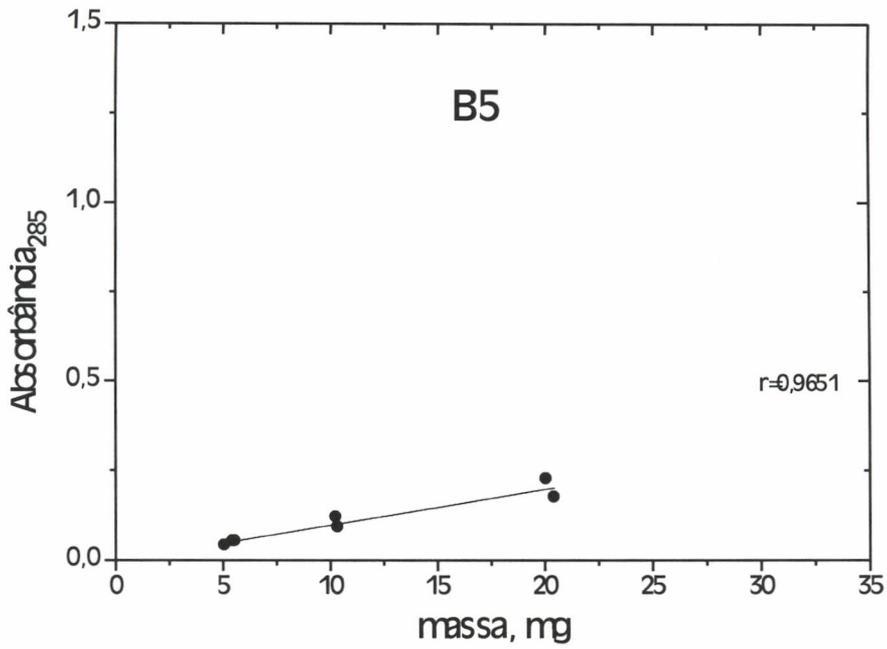


Gráfico 9 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B5

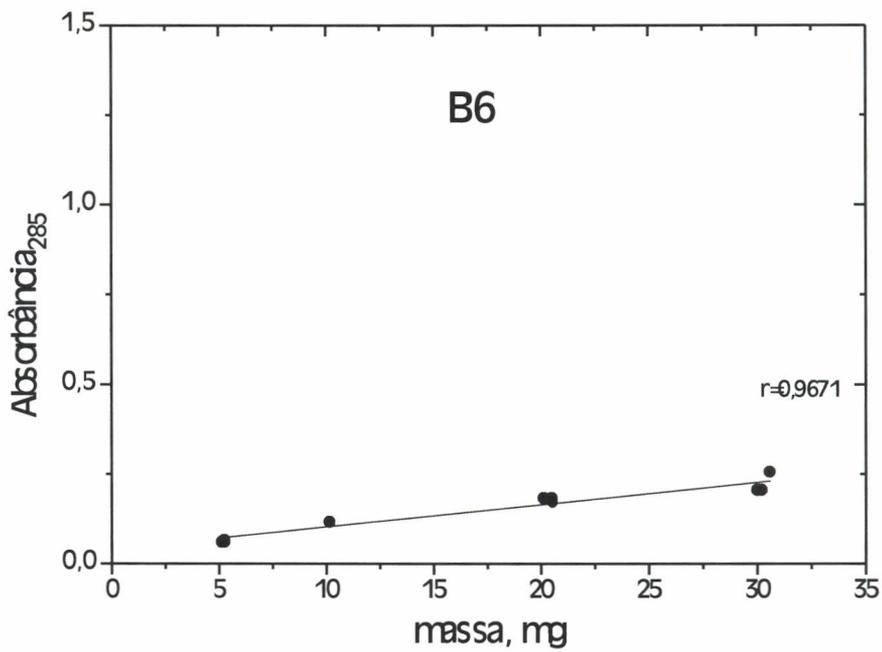


Gráfico 10 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B6

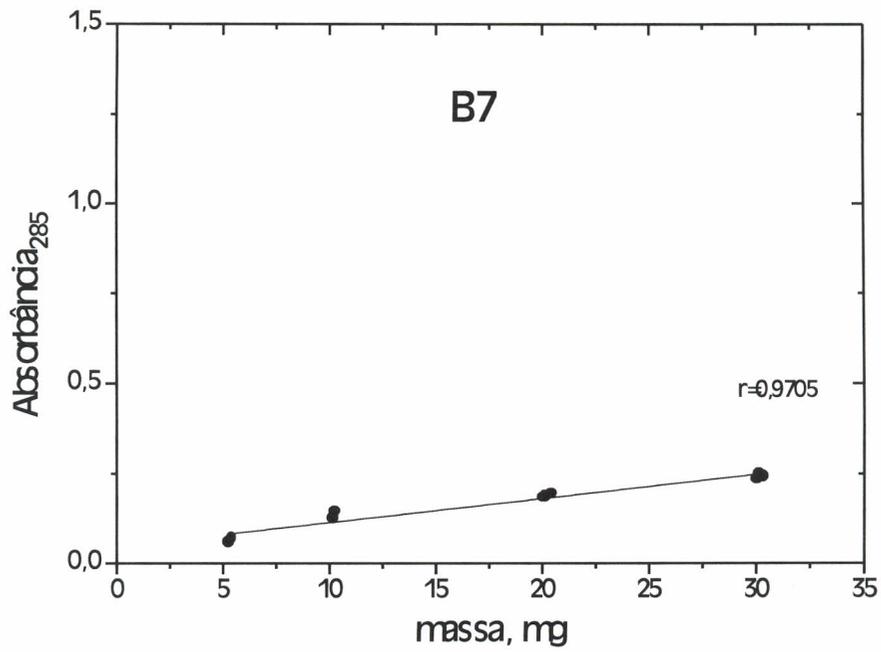


Gráfico 11 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese B7

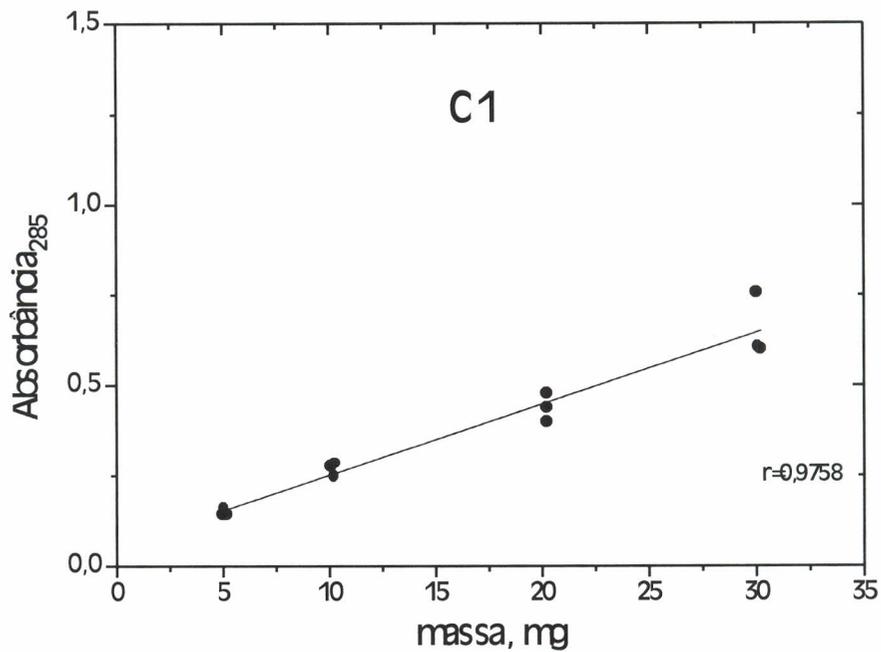


Gráfico 12 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CeIXNB da síntese C1

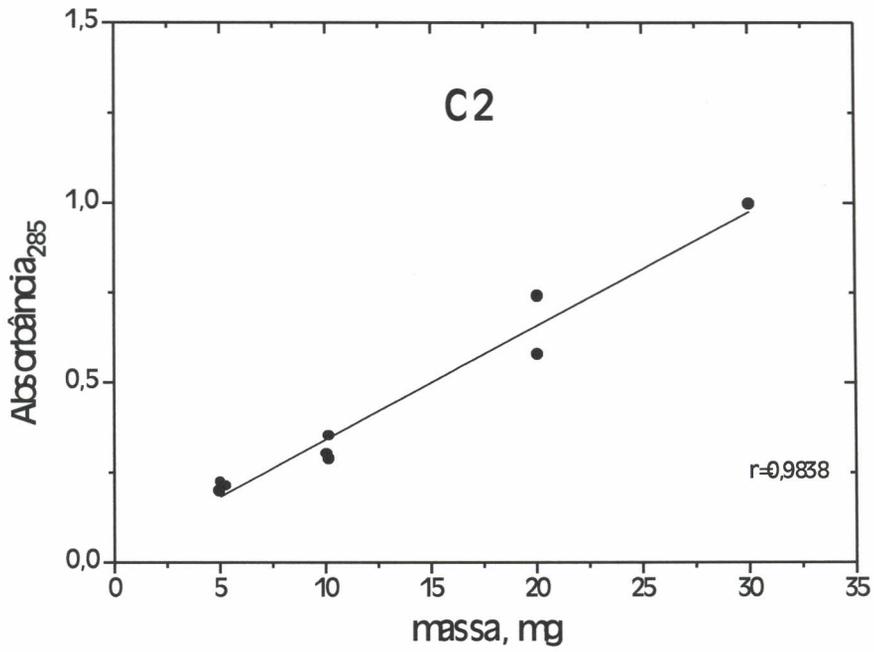


Gráfico 13 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese C2

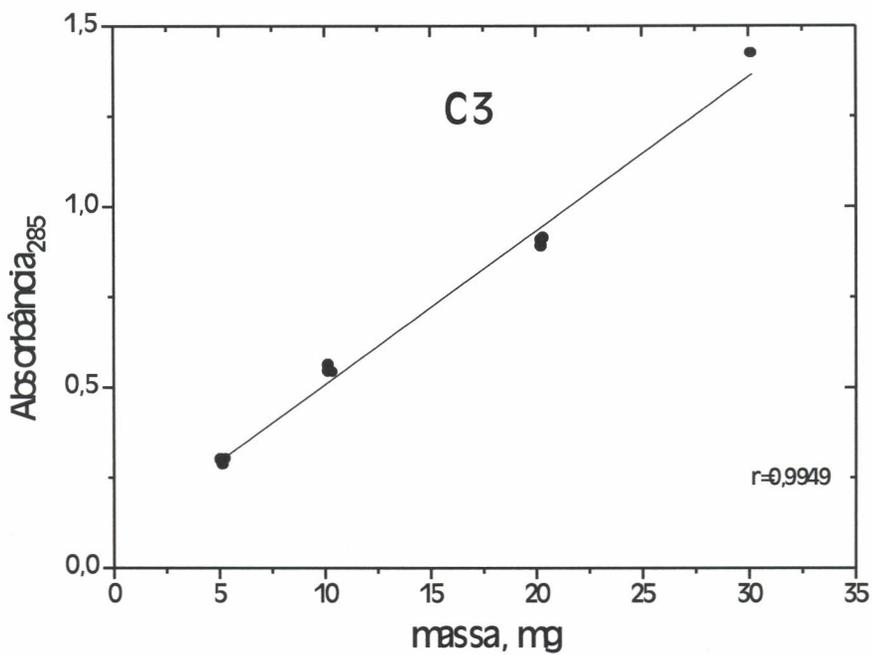


Gráfico 14 - Diagrama de absorvância em 285nm versus massa de CelXNB da síntese C3

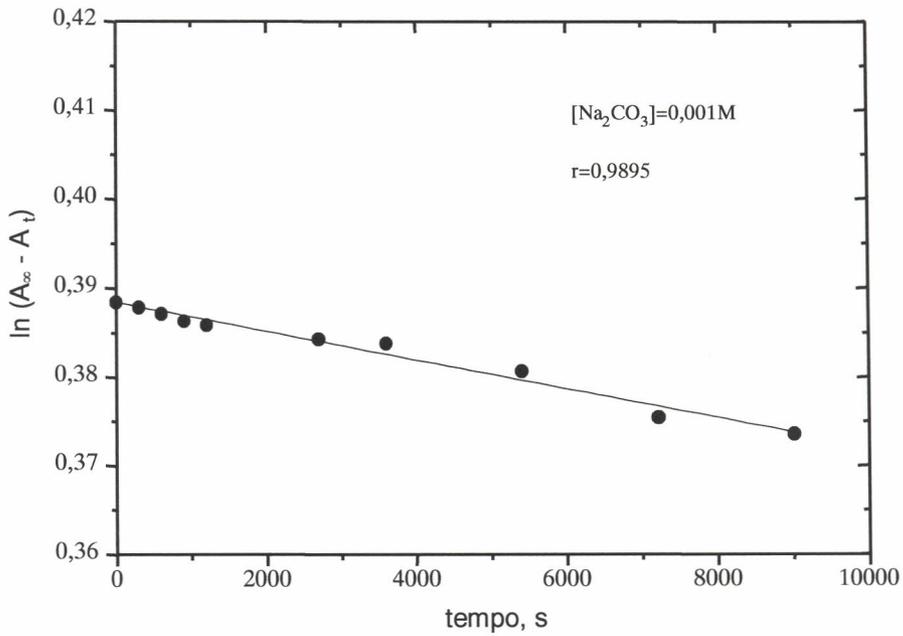


Gráfico 15 - Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (1,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso

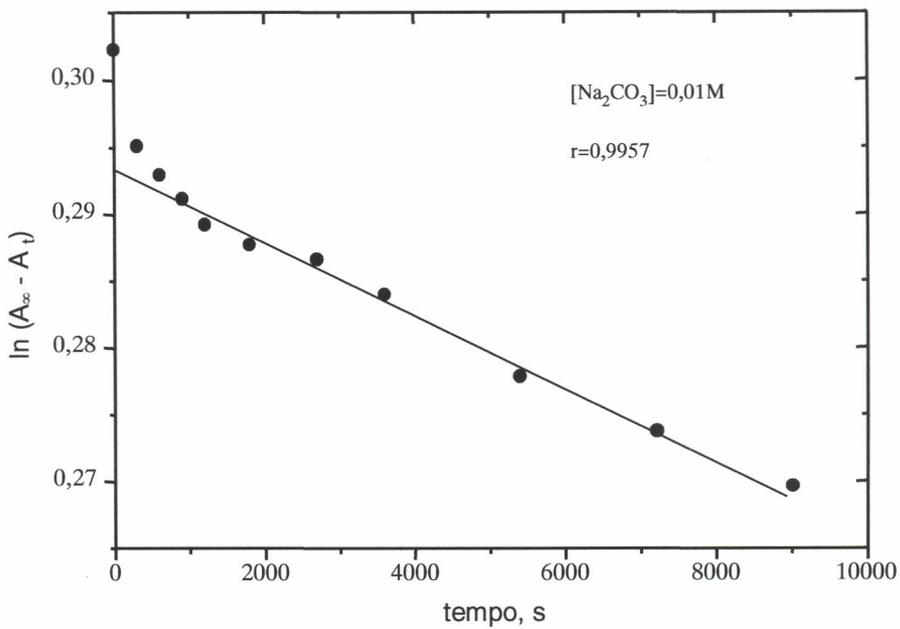


Gráfico 16 - Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (10,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso

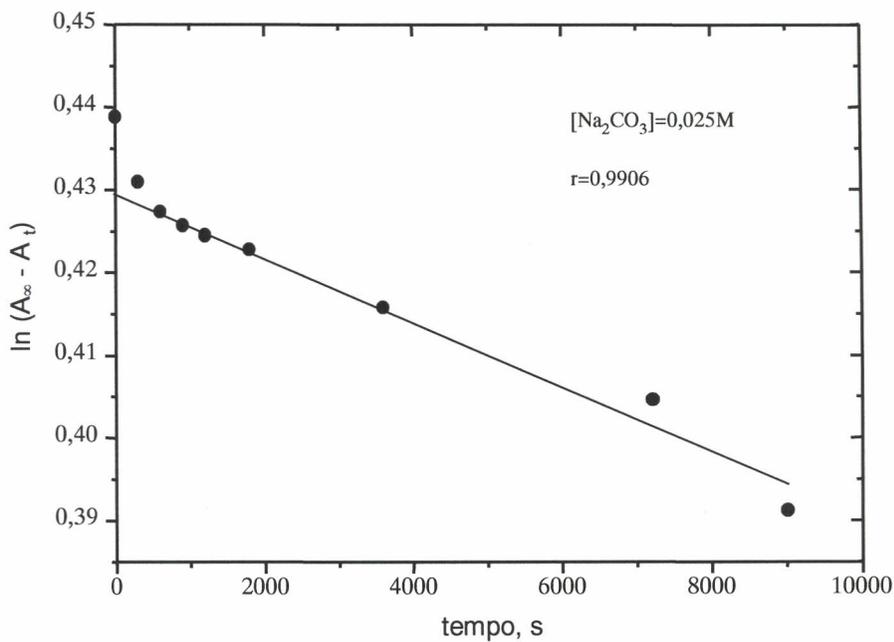


Gráfico 17 - Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (25,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso

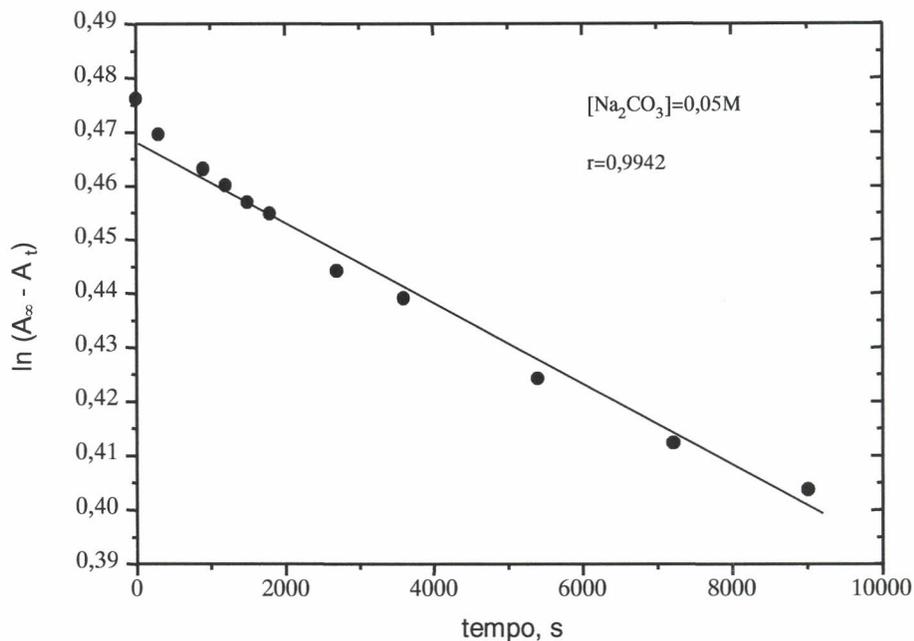


Gráfico 18 - Diagrama $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus tempo, em segundos, da hidrólise do CelXNB C3 em tampão carbonato pH 11,0 (50,0mM) 10% (V/V) etanol/aquoso