

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Curso de Pós - Graduação em Química

**SISTEMA DE MICROENCAPSULAÇÃO DE UREASE COM
QUITOSANA-PVA: REATIVIDADE E APLICAÇÕES**

**Tese submetida a Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de Doutor em Química**

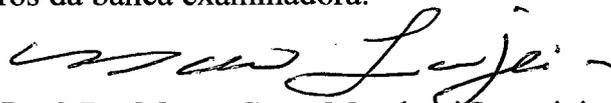
MARIA JOSÉ BRANDÃO MIGUEZ

Florianópolis, Santa Catarina - Brasil
Setembro de 1997

**SISTEMA DE MICROENCAPSULAÇÃO DE UREASE COM
QUITOSANA-PVA: REATIVIDADE E APLICAÇÕES**

MARIA JOSÉ BRANDÃO MIGUEZ

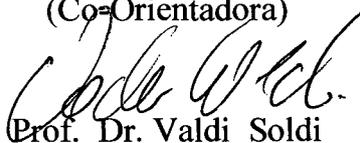
Esta Tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador, Co-Orientador e membros da banca examinadora.



Prof. Dr. Mauro Cesar Marghetti Laranjeira
(Orientador)



Profa. Dra. Maria de Nazaré de Matos Sanchez,
(Co-Orientadora)



Prof. Dr. Valdi Soldi
(Coordenador do Curso de Pós - Graduação)

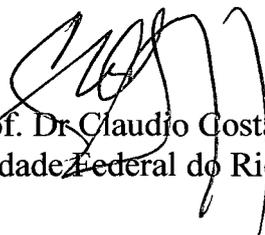
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Maria de Nazaré de M. Sanchez
Universidade Federal de Santa Catarina



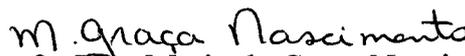
Prof. Dr. Claudio Costa Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Young K. Park
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dra. Marilene Klug
Universidade Federal de Santa Catarina

Toda ação gera uma força energética que retorna a nós da mesma forma... O que semeamos é o que colhemos.

E quando escolhemos ações que levam felicidade e sucesso aos outros, o fruto de nosso carma é a felicidade e o sucesso.

Deepak Chopra

*Aos meus queridos Carlos, Viviane,
Carlinhos e Renata que possibilitaram
mais esta realização diante de uma vida
feliz.*

AGRADECIMENTOS

Meu carinho e minha gratidão às seguintes pessoas:

A meu marido, Carlos Fernando Miguez, que sempre foi meu principal aliado, que me incentivou, apoiou, e não me deixou enfraquecer, que mostrou ao longo desses 21 anos que o casamento não rouba o espaço profissional de uma mulher e sim ajuda a conquistá-lo e preservá-lo, que abriu portas para eu seguir em frente e quando foi preciso seguiu ao meu lado, e nunca me deixou desistir.

Aos meus filhos Viviane B. Miguez, Carlos Fernando B. Miguez e Renata B. Miguez pelos seus sorrisos, compreensão, preocupação, valorização e respeito pelo que faço, e a Viviane, também por ser minha grande cúmplice.

A minha grande e verdadeira amiga, Profa. Dra. Maria de Nazaré de M. Sanchez que além de amiga, professora sempre foi meu exemplo profissional e um exemplo de vida, que mais uma vez esteve ao meu lado com sua competente orientação, criticando, mostrando as falhas e ajudando a consertá-las.

Aos professores do QUITTECH pelos momentos de alegria, por esses anos de convivência e pelo incentivo, e ao Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira que me recebeu no laboratório como Orientador.

Aos meus jovens amigos do curso de Pós-graduação, principalmente os do Grupo QUITTECH, pelos momentos de alegria, pelo clima de amizade, companherismo, cooperação e confidências e por compartilharem comigo a pureza de seus ideais, e a Blenda Rodriguez que, além disso, com muito carinho desenvolveu um trabalho competente contribuindo para a realização dessa Tese.

Aos Professores do Departamento Química pelos conhecimentos transmitidos em todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Química, da Secretaria do Curso de Pós-Graduação e às bibliotecárias por toda sua colaboração, e a Maria da Graça Hoeller e o Jadir Carminatti também por suas constantes orientações em relação aos trâmites no curso e por seus ombros amigos e pacientes em que despejamos nossas angústias e nossos anseios.

Aos meus amigos do Colégio de Aplicação que me incentivaram na realização desse trabalho e a Marlise também por sua constante colaboração.

Aos meus pais, Haroldo e Marly Brandão e minha madrinha Maria José Brandão pela eterna preocupação, desejo, torcida, carinho, amor e por serem meus eternos fãs.

A banca examinadora por suas valiosas sugestões, e a Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento também por seu estímulo e confiança.

Aos meus sogros Fernando e Leda Miguez, pelo apoio, incentivo, preocupação, e por proporcionarem condições emocionais para eu desenvolver meu trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Colégio de Aplicação pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ESQUEMAS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVIII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	01
1.1.1. Relevância do processo tecnológico.....	01
Matéria-prima - Quitina - Quitosana.....	01
Matéria-prima - Urease.....	02
Processo de microencapsulação.....	03
1.1.2. Importância de Imobilizar uma Enzima.....	04
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.1. BLENDA QUITOSANA-PVA.....	06
2.2. ENZIMA - UREASE.....	08
2.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	11
Microencapsulação.....	13
2.4. ENZIMA IMOBILIZADA EM QUITOSANA.....	16
2.5. UREASE IMOBILIZADA EM SUPORTES DIVERSOS.....	17
2.6. UREASE MICROENCAPSULADA.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. GERAL.....	21
3.2. ESPECÍFICOS.....	21

4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1.	MATERIAIS E REAGENTES.....	23
4.1.1.	Equipamentos.....	23
4.1.2.	Reagentes.....	24
4.1.3.	Soluções e reativos.....	24
	Solução Coagulante.....	25
	Solução Formalizante.....	25
	Reagente Alcalino.....	25
	Reagente Fenólico.....	25
	Reativo de Folin-Ciocalteau.....	25
	Solução Cupro-Alcalina.....	26
	Solução Enzimática.....	26
4.2.	MÉTODOS.....	26
4.2.1.	Preparação e purificação da quitosana.....	26
4.2.2.	Determinação do grau de desacetilação.....	27
4.2.3.	Determinação do peso molecular.....	29
4.2.4.	Preparação da blenda QTS-PVA.....	30
4.2.5.	Formação da microcápsula via cocervação salina.....	30
4.2.6.	Formalização da microcápsula.....	31
4.2.7.	Extração da enzima.....	32
4.2.8.	Microencapsulação da enzima.....	32
4.2.9.	Microscopia eletrônica de varredura.....	32
4.2.10.	Determinação da atividade enzimática	33
	Método para determinação da atividade enzimática.....	33
	Método de dosagem - Urease livre.....	34
	Método de dosagem - Urease microencapsulada.....	34
	Homogeneidade de microencapsulação.....	35
	Determinação da quantidade de amônia liberada.....	36

4.2.11. Determinação do teor de proteína.....	37
Dosagem da proteína no EE livre.....	37
Dosagem da proteína no EE microencapsulado.....	38
Curva padrão de proteína.....	39
4.2.12. Determinação dos parâmetros físico-químicos da urease livre e microencapsulada.....	40
Exposição do EE a 27°C e 50°C.....	40
Tempo de incubação.....	41
Limitação do substrato.....	41
Efeito da temperatura.....	41
Efeito de pH.....	41
Parâmetros cinéticos.....	41
Controle de estoque e de vazamento.....	42
4.2.13. Reuso.....	42
4.2.14. Ensaio <i>in vitro</i>.....	43
Dosagem da uréia nas amostras.....	43
Avaliação do método	43
Preparação das amostras.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. FORMAÇÃO DA MICROCÁPSULA.....	45
Sistema polimérico.....	45
Método de formação via coacervação salina.....	47
Formalização.....	52
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA UREASE MICROENCAPSULADA.....	57
5.2.1. Urease extraída da <i>Cucurbita pepo</i>.....	57
5.2.2. Urease padrão.....	61

5.3.	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA UREASE LIVRE - EXTRAÍDA DA SEMENTE DA <i>Cucurbita pepo</i>	63
5.3.1.	Exposição do EE a 27°C e 50°C.....	64
5.3.2.	Tempo de incubação.....	66
5.3.3.	Limitação do substrato e do EE.....	67
5.4.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECÍFICA DA UREASE....	69
5.4.1.	Atividade enzimática.....	70
	Reprodutibilidade da atividade enzimática do EE livre...	70
	Homogeneidade de microencapsulação.....	74
	Atividade enzimática.....	76
5.4.2.	Atividade específica.....	78
5.5.	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA UREASE LIVRE E MICROENCAPSULADA.....	80
5.5.1.	Efeito da temperatura.....	80
5.5.2.	Efeito do pH.....	86
5.5.3.	Parâmetros cinéticos.....	88
5.5.4.	Controle de estoque e vazamento.....	94
5.6.	TEMPO DE CONTATO DA ENZIMA COM O SUBSTRATO.....	97
5.7.	REUSO.....	100
5.8.	ENSAIO <i>IN VITRO</i>	101
5.8.1.	Controle de qualidade.....	101
5.8.2.	Exame de sangue e urina.....	107
	Resultados das análises de urina e sangue realizadas no Hospital Universitário.....	110
6.	CONCLUSÕES.....	112
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (a)	Estrutura química da quitosana.....	06
Figura 1 (b)	Estrutura química do álcool polivinílico.....	07
Figura 2	Representação esquemática de uma microcápsula.....	14
Figura 3 (a)	Curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	28
Figura 3 (b)	Derivada do plote pH <i>versus</i> volume de NaOH.....	28
Figura 4	Determinação da viscosidade intrínseca.....	29
Figura 5	Curva padrão da amônia.....	37
Figura 6	Curva padrão da albumina para determinação do teor de proteína.....	40
Figura 7	Formação das microcápsulas via coacervação salina.....	48
Figura 8	MEV da seção transversal de uma microcápsula não formalizada.....	48
Figura 9 (a)	MEV da seção transversal da microcápsula não formalizada e congelada antes de ser seccionada.....	49
Figura 9 (b)	MEV da ampliação da parede da microcápsula não formalizada e congelada antes de ser seccionada.....	49
Figura 10	MEV da superfície externa de uma microcápsula.....	51
Figura 11	Espectro elementar do sulfato de sódio presente na microcápsula, obtido através do MEV.....	51
Figura 12	MEV da microcápsula 15 minutos formalizada. Diâmetro 1,70 mm.....	52
Figura 13 (a)	MEV as seção transversal da microcápsula formalizada 15 minutos.....	53
Figura 13 (b)	MEV da parede da microcápsula.....	53

Figura 13 (c)	Ampliação de 1.004 vezes da região interna da parede.....	54
Figura 14 (a)	Ampliação de 1.193 vezes do núcleo da microcápsula.....	55
Figura 14 (b)	Ampliação de 5.173 vezes do núcleo da microcápsula.....	56
Figura 15	MEV do EE microencapsulado.....	57
Figura 16 (a)	Ampliação de 2.206 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca o interstício entre a parede polimérica e o encapsulado.....	59
Figura 16 (b)	Ampliação de 974 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca a morfologia das proteínas do EE.....	60
Figura 16 (c)	Ampliação de 974 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca a morfologia da parede polimérica.....	60
Figura 17	MEV da microcápsula contendo a urease padrão tipo III.....	62
Figura 18	MEV da microcápsula contendo a urease padrão tipo VI.....	62
Figura 19	Exposição do EE a 27°C e a 50°C na presença de coagulante.....	65
Figura 20	Hidrólise da reação de 2 µmol/mL de uréia pelo EE.....	66
Figura 21	Dependência da formação do produto em função da concentração de substrato.....	67
Figura 22	Dependência da produção de amônia em função do volume de enzima.....	69
Figura 23	Gráfico de controle de precisão. Determinação da atividade enzimática utilizando-se EE livre.....	73
Figura 24	Curva de freqüência. Representação dos valores encontrados na determinação do teor de amônia na hidrólise da uréia catalisada pelo EE.....	73
Figura 25	Homogeneidade de microencapsulação.....	75

Figura 26 (a)	Efeito da temperatura sobre o EE livre em tampão acetato pH 5,75.....	80
Figura 26 (b)	Efeito da temperatura sobre o EE livre em tampão fosfato pH 6,8.....	81
Figura 27 (a)	Efeito da temperatura sobre o EE livre e microencapsulado em tampão acetato pH 5,75.....	82
Figura 27 (b)	Gráfico de Arrhenius para o EE livre e microencapsulado.....	84
Figura 28 (a)	Efeito da temperatura sobre a EP livre e microencapsulada em tampão acetato pH 5,75.....	83
Figura 28 (b)	Gráfico de Arrhenius para a EP livre e microencapsulada.....	84
Figura 29	Efeito do pH sobre o EE livre e microencapsulado.....	86
Figura 30	Efeito do pH sobre a EP livre e microencapsulada.....	87
Figura 31 (a)	Absorbância máxima da reação de hidrólise da uréia, em tampão acetato pH 5,75, pelo EE livre em função da concentração do substrato.....	90
Figura 31 (b)	Gráfico de Lineweaver-Burk, $1/Abs_{máx}$ versus $1/[Uréia]$, para o EE livre.....	92
Figura 32 (a)	Absorbância máxima da reação de hidrólise da uréia, em tampão acetato pH 5,75, pelo EE microencapsulado em função da concentração do substrato.....	91
Figura 32 (b)	Gráfico de Lineweaver-Burk, $1/Abs_{máx}$ versus $1/[Uréia]$, para o EE imobilizado.....	93
Figura 33	Estabilidade da urease a 4°C.....	95
Figura 34	Estabilidade da urease a -4°C.....	96
Figura 35	Tempo de contato antes da incubação para a reação de hidrólise da uréia com o EE livre e microencapsulado.....	97

Figura 36	Tempo de contato antes da incubação para a reação de hidrólise da uréia com a EP livre e microencapsulada.....	99
Figura 37	Decaimento da atividade de uma batelada de EE microencapsulado em função do número de vezes utilizada....	100
Figura 38	Gráfico de controle de qualidade - Determinação do teor de uréia no soro controle 1 utilizando o EE microencapsulado.....	103
Figura 39	Gráfico de controle de qualidade - Determinação do teor de uréia no soro controle 2 utilizando o EE microencapsulado.....	105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Classificação dos métodos de imobilização.....	13
Esquema 2	Determinação da atividade enzimática da urease livre.....	34
Esquema 3	Determinação da atividade enzimática da urease microencapsulada.....	35
Esquema 4	Determinação da dosagem da proteína no EE livre	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de resíduos de aminoácidos que compõem a urease Jack bean.....	10
Tabela 2	Relação das concentrações finais de amônia com as absorbâncias.....	36
Tabela 3	Relação das concentrações de proteína com as absorbâncias...	39
Tabela 4	Atividade da urease imobilizada com QTS-PVA com diferentes graus de desacetilação de QTS.....	46
Tabela 5	Relação das absorbâncias e das quantidades de amônia encontradas na hidrólise da uréia catalisada pelo EE, nas condições padronizadas.....	71
Tabela 6	Controle de precisão.....	72
Tabela 7	Índice de dispersão para o EE livre com a blenda e para o EE microencapsulado.....	75
Tabela 8	Atividade enzimática.....	76
Tabela 9	Determinação do teor de proteína no EE microencapsulado.....	78
Tabela 10	Energia de ativação para a urease livre e microencapsulada.....	85
Tabela 11	Medida das absorbâncias máximas da reação de hidrólise da uréia catalisada pelo EE livre e microencapsulado em função da concentração do substrato.....	89
Tabela 12	Parâmetros cinéticos para o EE livre e microencapsulado.....	93
Tabela 13	Relação das absorbâncias e das quantidades de uréia encontradas no soro controle 1. Análises realizadas com EE microencapsulado.....	102
Tabela 14	Índices de dispersão das dosagens realizadas no soro controle 1 obtido da Control-Lab, lote n. D-10.....	103

Tabela 15	Relação das absorbâncias e das quantidades de uréia encontradas no soro controle 2. Análises realizadas com EE microencapsulado.....	104
Tabela 16	Índices de dispersão das dosagens realizadas no soro controle 2 da Qualitrol, lote n. 421A, obtido da Merck.	105
Tabela 17	Valores de t para os dois soros controle. Exatidão do método.....	107
Tabela 18	Exame de urina de 24 horas do paciente X realizado com EE livre e microencapsulado pelo método Manual CE.....	108
Tabela 19	Exame de sangue do paciente Y realizado com EE livre e microencapsulado pelo método Manual CE.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amostra
CE	Colorimétrico enzimático
DG	Grau de desacetilação
E	Enzima
EE	Extrato bruto enzimático
EP	Enzima pura - Urease padrão
HMDA	Hexametilenodiamina
HU	Hospital Universitário
Km	Constante de Michaelis-Menten
LPL	Lipoproteína lipase
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
P	Padrão
PTN	Proteína
PVA	Álcool polivinílico
QTI	Quitina
QTS	Quitosana
S	Substrato
SC	Cloreto de sebacoíla
UV	Ultra violeta

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a microencapsulação da urease na forma de extrato bruto (EE) , através do método de coacervação salina, utilizando-se o sistema polimérico quitosana - PVA. A quitosana foi obtida a partir da quitina, que por sua vez foi extraída da casca do camarão e o EE foi extraído das sementes da *Cucurbita pepo* (abóbora).

Os parâmetros do processo de microencapsulação tais como composição e pH da blenda, temperatura e tempo de coagulação, foram ajustados afim de maximizar a atividade enzimática. Através da comparação do perfil de pH, dependência de temperatura e constante de Michaelis-Menten, demonstrou-se que o uso do EE é uma alternativa em relação à utilização da urease padrão (EP).

A microscopia eletrônica de varredura comprovou a encapsulação da urease. As determinações das atividades enzimáticas mostraram que a alta concentração salina, utilizada no processo de microencapsulação, não afetou a atividade da enzima. Os ensaios estatísticos mostraram que a enzima se distribui homogeneamente nas cápsulas durante o processo de microencapsulação e que há reprodutibilidade na determinação da atividade enzimática do EE.

A urease microencapsulada mostrou uma reusabilidade de 23 vezes e a estabilidade do EE no processo de estocagem foi maior quando comparada com a EP.

Ensaio *in vitro* mostraram que a determinação do teor de uréia em amostras de sangue e urina usando-se a urease microencapsulada são coerentes com os resultados obtidos, a partir das mesmas amostras, através do método espectrofotométrico, realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC.

ABSTRACT

The microencapsulation of the crude urease extract was performed by the saline coacervation method using the polymeric system of chitosan-PVA. The chitosan was obtained from the chitin which was extracted from the shrimp shells and the enzymatic extract was removed from the seeds of *Cucurbita pepo*.

The parameters of the microencapsulation process such as composition and pH of the blend, temperature and coagulation time were adjusted in order to maximise the enzymatic activity. By comparing the pH profile, the dependence of temperature and Michaelis-Menten constant, it was shown that the use of the enzyme as a crude extract is an alternative to the use of the standard urease.

The scanning electronic microscopy confirmed the encapsulation of the urease and the determinations of the enzymatic activities shown that the high saline concentration utilised in the microencapsulation process did not affect the activity of the enzyme. The statistical issues have shown that the enzyme is homogeneously distributed into the capsules during the microencapsulation process and that there is reproducibility in the determination of the enzymatic activities of the crude urease extract.

The urease microencapsulated has shown a reusability of 23 times and the stability of the crude extract in the storage process was greater than to the pure enzyme.

The test *in vitro* have shown that the determination of urea in samples of blood and urine employing the microencapsulated urease are coherent with the obtained results from the same samples, issued by spectrophotometric method in Clinical Analysis Laboratory of the University of the UFSC.

1. INTRODUÇÃO

1.1. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

1.1.1. Relevância do processo tecnológico

A comunidade científica, os órgãos governamentais do país e a sociedade brasileira de forma em geral, se preocupam com o meio ambiente, com a exploração da flora, com a contaminação ambiental, com a utilização de recursos naturais difíceis de serem renovados, com o reaproveitamento de espécies e também com a obtenção de novas tecnologias. É um desafio desenvolver novos processos que permitam o avanço tecnológico, quando se tem o domínio da tecnologia, e utilizar novos produtos quando se tem matéria prima disponível¹.

O desenvolvimento deste trabalho abre novas perspectivas diante destes aspectos. Foi proposto, no processo de **microencapsulação de enzimas**, um modelo, utilizando matérias-primas e recursos naturais de fontes renováveis e de baixo custo, que proporciona o aproveitamento de materiais.

Matéria-prima - Quitina - Quitosana

Uma das duas principais matérias-primas utilizadas foi originada de rejeito poluente da indústria pesqueira, o exoesqueleto do camarão². Os resíduos de animais marinhos ou são despejados no mar ou são enterrados. Quando são lançados nas águas marinhas, as proteínas constituintes da casca do camarão sofrem decomposição e os produtos resultantes dessa decomposição são poluentes e altamente tóxicos, principalmente a histamina. Quando enterrados, causam problemas com odores e com animais transmissores de doenças ao ser humano.

A recuperação de nutrientes a partir de resíduos originados na industrialização de gêneros alimentícios pode ter utilidade na alimentação humana

e na animal, além de baixar o custo dos insumos principais e minimizar problemas de poluição ambiental.

O interesse no aproveitamento das cascas de camarão pode ser justificado pela presença de pigmentos, sais de cálcio, proteínas e principalmente quitina^{3,4}.

A produção anual de quitina é estimada em 100 milhões de toneladas, aproximadamente, a mesma de celulose a nível mundial. A quantidade de quitina produzida pelo plâncton no Oceano Antártico é em torno de alguns bilhões de toneladas por ano. Quando este plâncton é utilizado como fonte de proteína, o aproveitamento da quitina torna-se indispensável⁵.

A preocupação com o meio ambiente, recursos renováveis e novas alternativas tem levado o QUITTECH (Grupo de Pesquisa de Quitinas e Aplicações Tecnológicas da UFSC) a desenvolver trabalhos de modificação da quitina, obtida a partir da casca de camarão, proveniente de resíduos da Indústria Pesqueira da região⁶⁻¹⁰.

O biopolímero **quitosana**, obtido por processo químico, através da desacetilação da quitina, possui certas características importantes que o qualificam como bom material polimérico para a preparação de microcápsulas com aplicações na imobilização de enzimas¹¹⁻¹⁵.

Matéria-prima - Urease

A outra matéria-prima bastante utilizada neste trabalho foi a enzima **urease**, obtida de fonte natural e renovável.

A enzima **urease** é de grande importância para as áreas biotecnológica, biomédica e de química analítica. A urease é um biocatalisador que possui a especificidade para catalisar a reação de hidrólise da uréia para amônia que por sua vez caracteriza uma forma importante de diagnóstico clínico de utilização mundial¹⁶⁻²⁰. Outras aplicações incluem a quantificação da uréia em efluentes

industriais, no tratamento de resíduos provenientes de fertilização de plantas e como parte de rim artificial objetivando a substituição da máquina de diálise²¹.

Para a determinação do teor de uréia no sangue ou na urina, os laboratórios de análises clínicas importam “Kits” contendo a enzima na forma purificada. Devido a desnaturação, a urease, mesmo mantida a baixa temperatura, e a pouca estabilidade, requer uma demanda imediata tornando o processo bastante oneroso se considerarmos a pequena capacidade diária dos laboratórios realizarem tais análises^{22,23}.

Esta enzima utilizada na forma de extrato bruto, extraída da semente de *Cucurbita pepo* (abóbora), possibilita um processo de análise clínica mais econômico, principalmente se microencapsulada.

Processo de Microencapsulação

O processo de microencapsulação consiste na obtenção de uma microcápsula a qual possui um núcleo, contendo uma espécie ativa, recoberto por uma membrana. Devido à sua versatilidade, tem-se variado não apenas a técnica de produção como também as características do encapsulado e da membrana encapsulante²⁴.

A imobilização de uma espécie química em um suporte com comprometimento dos sítios ativos tem sido estudada, principalmente quando esta espécie é uma enzima^{13,25}. No caso da microencapsulação, é necessário se ajustar a produção da microcápsula às condições de estabilidade do encapsulado e da membrana sem perder de vista o aspecto tecnológico quanto à operacionalidade, custo e aplicabilidade^{26,27}.

A membrana encapsulante deve possuir características tais como: ser porosa o suficiente para deixar permear o substrato e o produto, sem deixar sair a espécie encapsulada, e ser constituída de tal forma que proteja o material encapsulado contra agentes externos ou o proteja do meio em que se encontra o encapsulado²⁸.

A microencapsulação é considerada um importante processo de imobilização, por ser uma forma de confinar o material (enzima), sem o comprometimento do seus sítios ativos, causando uma maior proteção da enzima quanto à desnaturação e otimizando as condições de armazenamento e estabilidade do sistema^{13,29,30}.

1.1.2 Importância de imobilizar uma enzima

O uso de enzimas para propósitos analíticos têm sido limitado em função da sua instabilidade. Além disso, as enzimas perdem mais rapidamente a sua capacidade catalítica em soluções aquosas, não podendo ser recuperadas de tais soluções e não tendo suas atividades regeneradas. Estas dificuldades têm sido removidas ou minimizadas pelo desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas^{31,32}.

A enzima é imobilizada em uma matriz inerte, de tal forma que ela mantenha suas propriedades catalíticas por mais tempo que a enzima livre e possa ser utilizada em um maior número de análises.

As três razões mais importantes para imobilizar enzimas são :

1º) Serve como modelo para sistemas naturais “*in vivo*”. Grande parte do conhecimento científico sobre as vias metabólicas e, em essência, quase tudo o que se sabe dos detalhes moleculares dos mecanismos de regulação que operam ao nível de catalisadores, provém do estudo de enzimas. Na realidade, as áreas do metabolismo em que as enzimas envolvidas não foram isoladas são exatamente aquelas em que as informações são fragmentárias e controvertidas³³.

2º) Reutilidade - Em função da fácil desnaturação da enzima devido à sua instabilidade, a maioria delas possui um custo mais elevado que outros reagentes utilizados em análises. Muitas análises requerem uma dispendiosa quantidade desses materiais. A enzima imobilizada pode ser reutilizada muitas vezes, representando um fator econômico considerável.

3º) Maior estabilidade - Quando as enzimas são imobilizadas, se tornam mais duráveis do que no meio em que se encontram naturalmente. Muitos métodos de imobilização dão maior estabilidade às enzimas numa escala mais ampla de pH e a temperaturas mais elevadas^{33,34}.

Além dessas vantagens operacionais, a enzima imobilizada oferece uma variedade de aplicações em processo de fluxo contínuo; possibilita obter maior eficiência nas reações e permite o controle de formação do produto^{21,35}.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. BLENDAS QUITOSANA-PVA

A quitosana (QTS) é um biopolímero de alto peso molecular ($\sim 1,5 \times 10^5$ daltons), usualmente preparado pela purificação e desacetilação da quitina, através de uma reação de hidrólise básica³⁶. É constituída predominantemente de unidade de β - (1-4) - 2- amino - 2 -desoxi - D - glicose^{37,38}.

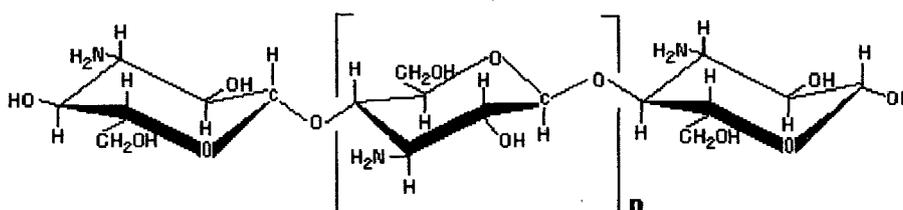


FIGURA 1 (a) - Estrutura química da quitosana.

O grau de polimerização (600 -1.800) da quitosana e o seu peso molecular são variáveis que dependem da origem de onde é extraída a quitina^{5,9,37}.

Os grupos amino conferem à quitosana solubilidade em uma faixa de pH (aproximadamente até 6,0), em solventes tais como ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, para formar soluções viscosas com características similares às glicosaminas, não tóxicas e biodegradáveis^{10,39}.

Em função destas características, a matriz de quitosana apresenta grande possibilidade de formar filmes, fibras⁴⁰ e membranas de microcápsulas^{41,42}, e tem sido investigada por diversos autores para aplicações biomédicas, tais como remoção de bilirrubina, membranas para hemodiálise e liberação controlada de drogas^{43,44}.

O álcool polivinílico (PVA) é um dos poucos polímeros comerciais de alto peso molecular solúveis em água. Suas propriedades dependem do peso molecular e do grau de hidrólise. Com o aumento de ambos, aumenta também a viscosidade, a tenacidade, a resistência à água e a adesão à superfícies hidrofílicas, mas diminui a flexibilidade e a solubilidade em água. A faixa ótima do grau de hidrólise para dissolver o PVA em água está em torno de 88% e o peso molecular em torno de 72.000⁴⁵.

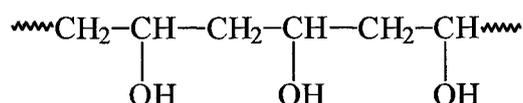


FIGURA 1 (b) - Estrutura química do álcool polivinílico.

A mistura de polímeros diferentes possibilita a obtenção de novos materiais com propriedades muitas vezes superiores às dos componentes puros. A compatibilidade e a otimização de sistemas poliméricos tem sido muito estudada⁴⁶⁻⁵⁰. O sucesso de preparar blendas miscíveis está na existência de interações específicas entre os polímeros desenvolvidos. Essas interações incluem pontes de hidrogênio, pares do tipo doador-aceptor com elétrons π e interações iônicas⁴⁶.

O estudo citado por Muzzarelli para preparação de fibras demonstrou que a blenda QTS-PVA, em relação aos componentes individuais, apresenta propriedades tais como: aumento do teor de umidade, aumento da resistência mecânica, aumento da elasticidade, e principalmente propriedades dielétricas. Tais características conferem à blenda melhores propriedades não só na formação de fibras mas também na formação de filmes e microcápsulas³⁷.

Kim *et alli*, usando a técnica de difração de raio X, justificam o aumento da interação da blenda QTS-PVA com água e o aumento da resistência elástica e mecânica da blenda em relação aos componentes individuais, devido a interação intermolecular causada pelos grupos funcionais -OH e -NH₂ existentes nos dois

polímeros. Os estudos de espectroscopia infravermelho comprovam essa interação^{47,50}.

2.2. ENZIMA - UREASE

Enzimas são catalisadores protéicos das reações orgânicas que aceleram a velocidade das reações metabólicas. As propriedades mais significativas das enzimas são seu alto poder catalítico e sua especificidade.

As primeiras evidências de que as enzimas são proteínas surgiram quando J.B. Sumner, em 1926, isolou e purificou a urease a partir de farinha de sementes da *Canavalia ensiformis*^{51,52}. A urease foi a primeira enzima obtida na forma cristalina, apresentando-se como cristais octaédricos. A extração foi realizada usando-se acetona como solvente e precipitada com sulfato de amônia. O estudo das propriedades mostrou tratar-se de uma enzima que não requer a presença de coenzima⁵¹.

Os métodos posteriores para a extração da urease envolveram o tratamento com acetona no processo de recristalização, conforme descrito por Hanabusa¹⁷.

A urease extraída de cucurbitáceas (abóboras), conforme Hargreaves, foi totalmente desnaturada pela presença de acetona, sendo portanto necessário desenvolver um novo método para extrair a enzima das sementes das cucurbitáceas. Hargreaves e colaboradores purificaram a enzima, extraíndo-a da semente macerada com água, por meio de solução saturada de cloreto de sódio, retirando o sal por diálise, e precipitando os cristais da enzima usando o sulfato de sódio. Os resultados encontrados mostraram a eficiência do método^{16,20}.

A atividade da urease é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de uréia/min sob condições padronizadas de pH 7,0 e temperatura de 25°C. A atividade da enzima varia de acordo com a fonte de onde é obtida.

Entre as proteínas são conhecidas hoje mais de 2.000 enzimas, muitas na forma pura e pelo menos 200 cristalizadas. Acima de 400 estão disponíveis comercialmente, e algumas destas são obtidas de até dez fontes diferentes⁵³⁻⁵⁵. Os estudos dessas proteínas elucidaram vários aspectos físicos, químicos e estruturais das enzimas, no entanto não esclareceram de que maneira as enzimas catalisam as reações químicas com eficiência, precisão e especificidade.

A urease pode ser encontrada em bactérias, em sementes de leguminosas, sendo particularmente ricas as sementes de certos tipos de feijão-soja, *Canavalia ensiformis* e *Canavalia obtusifolia*, de cucurbitáceas, como a melancia, *Citrullus vulgaris*, e outras (abóboras)²⁰.

{ A urease é uma das enzimas que quando obtida de fonte vegetal é estável na forma impura podendo ser usada por uma semana com atividade relativamente alta⁵⁶. }

A estrutura da urease Jack bean, conforme as investigações realizadas por Milton e Taylor⁵⁷, é constituída pelos grupos de aminoácidos listados na Tabela 1; a proporção desses aminoácidos também se encontra listada.

{ A urease é classificada entre as hidrolases que atuam sobre as ligações C-N não peptídicas e, segundo a nomenclatura internacional, se denomina “Uréia amido hidrolase” EC.3.5.1.5.^{16,55}. }

TABELA 1 - Número de resíduos de aminoácidos que compõem a urease Jack bean.

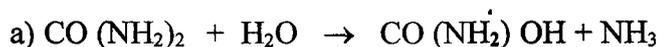
Aminoácido	Símbolo	n° / 100 g de proteína seca	n° mais aproximado / mol de proteína
Ácido aspártico	Asp	11-08	72
Treonina	Thr	6-09	45
Serina	Ser	4-53	39
Ácido glutâmico	Glu	10-72	62
Prolina	Pro	5-31	41
Glicina	Gly	4-85	64
Alanina	Ala	5-78	61
Valina	Vai	5-86	45
Cisteína	Cys	1-49	11
Metionina	Met	3-23	19
Isoleucina	Ile	7-64	51
Leucina	Leu	8-57	57
Tirosina	Tyr	3-56	16
Fenilalanina	Phe	3-81	19
Lisina	Lys	6-71	39
Histidina	His	3-71	20
Arginina	Arg	6-48	31
Triptofano	Trp	1-24	5

As enzimas possuem uma região na qual as substâncias reagentes (substratos) aderem e são quimicamente modificadas. Esta região das enzimas é chamada sítio ativo. As moléculas reagentes ajustam-se ao sítio ativo e um número de mudanças ocorre tanto no substrato como na proteína, com uma redução na barreira da energia de ativação para permitir a conversão do substrato ao produto⁵⁴.

De grande especificidade, a urease hidrolisa a uréia de acordo com a reação¹⁶:



que se processa nas seguintes etapas:



A constante de velocidade aparente de primeira ordem para essa reação em meio aquoso, na ausência de enzima, é de $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ a pH 8,0 e a 20°C. A constante de velocidade de primeira ordem para a formação dos produtos a partir do complexo uréia-urease, é de $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, nas mesmas condições. A urease acelera a reação de hidrólise da uréia não catalisada cerca de 10^{14} vezes⁵³.

2.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Uma enzima é imobilizada quando confinada ou localizada fisicamente, através de processos químicos ou físicos, durante a reação de maneira em que possa haver contato do substrato (S) com a enzima (E) e possa permitir a liberação do produto²⁴.

A ciência e a tecnologia de enzimas imobilizadas têm experimentado um fenômeno de crescimento nos últimos anos. Há mais de 50 anos, Nelson e Griffin, conforme cita Guilbaut, adsorveram invertase em carvão vegetal e notaram que a enzima imobilizada reteve a atividade biológica e pôde ser reusada muitas vezes. Recentemente têm sido publicados livros e muitos artigos sobre imobilização de enzimas para uso em análises químicas de várias substâncias nas áreas biológica, clínica e industrial³².

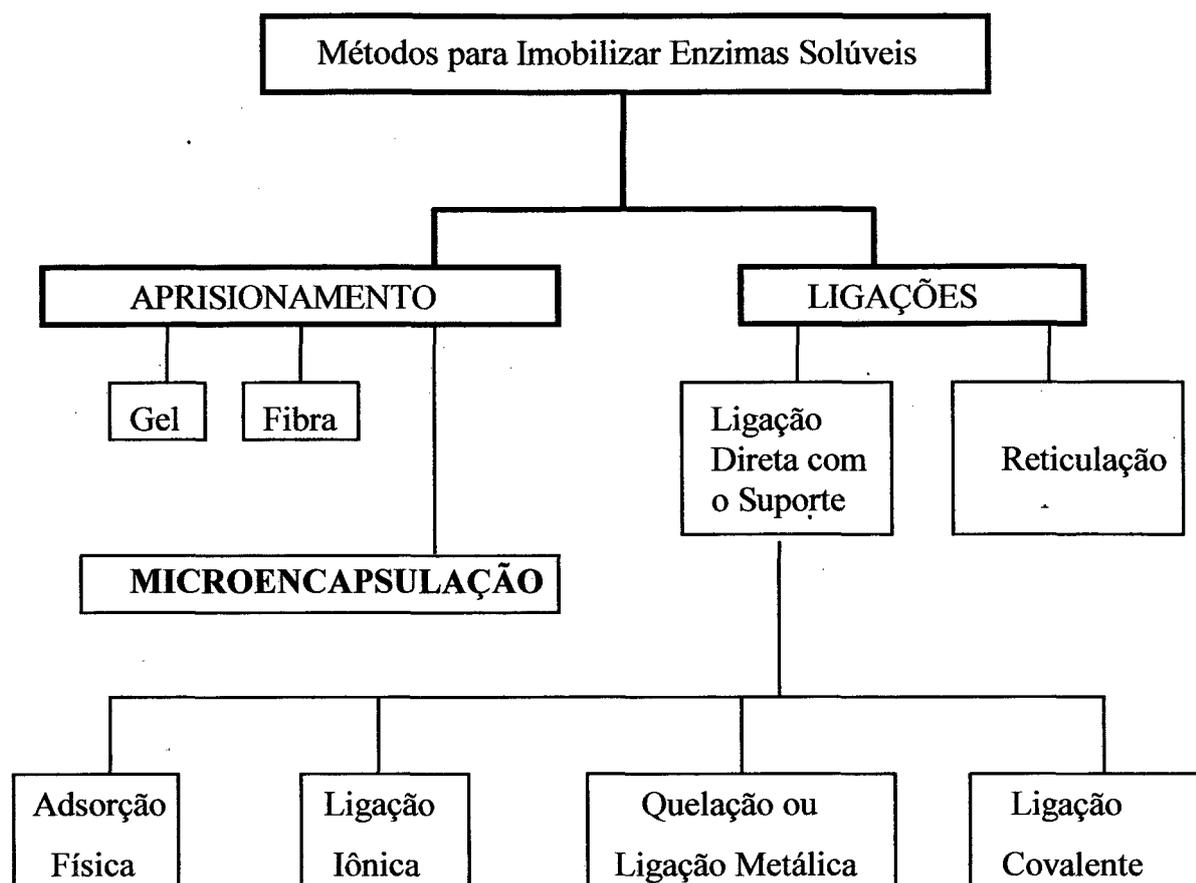
Há diversas maneiras para classificar os métodos de imobilização de enzimas, mas de forma geral eles estão incluídos em duas classes: químico e físico.

O método químico de imobilização inclui pelo menos uma ligação covalente entre os resíduos de uma enzima e um polímero funcionalizado insolúvel em água ou entre duas ou mais moléculas de enzima. Normalmente há mais que uma ligação covalente entre os participantes da reação. O método químico é irreversível e a enzima não pode ser regenerada.

O método físico inclui qualquer outra forma que não envolva uma ligação covalente. A imobilização das enzimas é realizada através de adsorção em matrizes insolúveis em água, oclusão da enzima em gel, aprisionamento em dispositivos feitos por membranas semipermeáveis, onde ocorrem interações físicas do tipo formação de ligações iônicas, interação eletrostática, interação proteína - proteína, etc. Em princípio o método físico de imobilização é reversível³³.

A classificação dos métodos pode ser também em função de uma combinação da natureza das interações responsáveis pela imobilização e da natureza do suporte^{32,34,58}.

O Esquema 1 descreve o sistema de classificação considerando os métodos de imobilização individualmente.



ESQUEMA 1 - Classificação dos métodos de imobilização

A imobilização por aprisionamento é baseada na localização da enzima em uma matriz polimérica gelatinosa ou em uma membrana de tal forma que permita a entrada do substrato, a saída do produto e impeça a liberação da proteína. O aprisionamento pode ser subclassificado em oclusão em gel, fibra e microencapsulação³².

O método descrito nesta seção será o de aprisionamento físico por microencapsulação que é objeto deste trabalho.

Microencapsulação

A microencapsulação é um método de aprisionamento físico. O método envolve o confinamento da enzima em pequenas esferas (microcápsulas) de

membranas poliméricas semipermeáveis com poros de tamanho variado, Figura 2. O diâmetro da microcápsula varia na ordem de 1 a 1.000 μm .

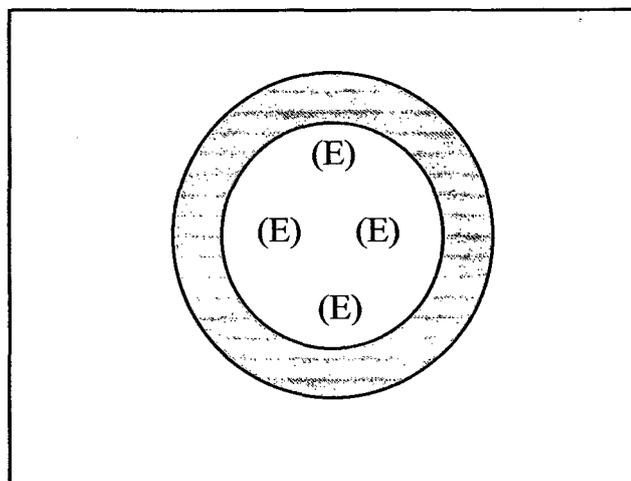


FIGURA 2 - Representação esquemática de uma microcápsula

A parte interna da microcápsula é chamada de núcleo. A espessura da parede, bem como o tamanho dos poros da microcápsula dependem do material que será utilizado, geralmente polímeros naturais ou sintéticos.

É um método que permite a imobilização de mais de uma enzima e possui a vantagem de manter alta a atividade da mesma. Além de enzimas, outros materiais podem ser microencapsulados. Durante o processo de imobilização, as propriedades das substâncias microencapsuladas podem ser alteradas²⁶.

Tais substâncias podem ser usadas em diferentes funções, e tem sido empregadas em muitos campos da tecnologia, freqüentemente associados com aplicações na qual o encapsulado é liberado em condições controladas²⁸. A liberação do componente microencapsulado pode ser controlada tanto no que se refere à quantidade como velocidade nas condições desejadas, isto é, pH, temperatura, etc. Por exemplo, o ácido acetil salicílico (aspirina) foi microencapsulado e mostrou que desta forma reduz a irritação gastrointestinal²⁴.

Outras vantagem do método: aumenta a vida útil do encapsulado; protege a substância no núcleo de efeitos de raios UV, umidade, oxigênio e previne reações químicas entre duas espécies ativas através da separação física. Como exemplo do conteúdo do núcleo microencapsulado, pode ser citada a vitamina A palmitato, que aumenta sua estabilidade, já que fica protegida dos efeitos atmosféricos, e o antibiótico ampicilina, que reduz a possibilidade de reações alérgicas a esse medicamento²⁴.

Resumindo, as principais razões para microencapsulação são: proteção do material encapsulado, reutilização e liberação controlada.

Existem diversas técnicas de microencapsulação (acima de 200) diferindo uma das outras em pequenos detalhes, dependendo da molhabilidade e solubilidade do núcleo, da elasticidade e permeabilidade da parede e das características adesivas da parede do polímero. De forma geral, os dois grupos mais importantes são: Separação de fase e Polimerização interfacial²⁶.

Na separação de fase, que resulta de um fenômeno de superfície, o material a ser encapsulado é colocado numa solução juntamente com o polímero ou emulsão polimérica. Neste processo, a microcápsula é formada devido à interação entre o polímero (emulsão polimérica) e um meio contendo um agente que induz a separação de fases. Este processo é chamado de coacervação. Existem diferentes formas de coacervação: simples, complexa e também o processo chamado “salting-out”²⁶.

Na coacervação simples é usado um solvente miscível em água, por exemplo o etanol, como agente indutor da formação da microcápsula.

Na coacervação complexa, ocorre uma interação de cargas (neutralização) presentes no suporte.

No processo “salting-out”, o agente indutor é um eletrólito em altas concentrações.

Na polimerização interfacial, o material a ser encapsulado é colocado numa solução juntamente com os monômeros. Neste processo, ocorre polimerização ao

mesmo tempo que ocorre a formação da microcápsula. Devido a esta característica, quando se utiliza um polímero natural, a técnica de microencapsulação tem que ser a da separação de fases^{24,26,27}.

2. 4. ENZIMA IMOBILIZADA EM QUITOSANA

O estudo da imobilização de enzimas tem recebido significantes avanços nas últimas décadas considerando a crescente utilização de enzimas em processos industriais como bioreatores, em sistemas analíticos e em terapia enzimática, fornecendo técnicas que também têm sido utilizadas para imobilizar outras espécies biologicamente ativas tais como: anticorpos, cloroplastos, antígenos e drogas terapêuticas, dentre outras¹⁵.

Um grande número de artigos têm sido publicados demonstrando a utilização da quitosana como suporte na imobilização de várias enzimas, justificados pelas características deste biopolímero, acrescido do interesse econômico gerado pela abundância da quitina, matéria-prima na obtenção da quitosana, por ser subproduto da indústria pesqueira e de processos de fermentação¹³.

A lipoproteína lipase (LPL) foi covalentemente imobilizada na superfície de cápsulas de quitosana e foram estudados o efeito do pH, concentração da LPL, estabilidade térmica e a estabilidade de estocagem da lipase imobilizada. A determinação da atividade relativa também foi determinada na presença de espaçadores de diferentes comprimentos e observou-se uma maior estabilidade da LPL sem a presença de espaçadores. O efeito de pH na atividade relativa foi estudado a 37°C e observou-se que não houve deslocamento do pH ótimo de 7,2, mas a LPL imobilizada apresentou uma maior estabilidade para valores de pH mais baixos. A imobilização também favoreceu a enzima imobilizada apresentando uma atividade de 3 a 4 vezes maior do que a enzima livre a 55°C durante 60 minutos¹⁵.

Proteases tais como papaína e bromelaína também foram imobilizadas em cápsulas de quitosana na presença de espaçadores e obteve-se comportamento semelhante para as enzimas imobilizadas, como as mencionadas anteriormente, em função das variáveis estudadas tais como efeito do pH, efeito da temperatura e estabilidade de estocagem. Os valores de K_m aparente foram maiores do que aqueles para a enzima livre, enquanto que os valores de V_m para as proteases imobilizadas foram menores do que as da enzima livre, sugerindo que a atividade relativa da protease imobilizada diminui durante o processo de fixação⁵⁹.

A quitosana tem sido utilizada como suporte cromatográfico na imobilização da lisozima. As condições ótimas de pH e de eluição foram determinadas no processo para isolar e recuperar a enzima numa forma ativa a partir de uma mistura de produtos naturais. A quitosana mostrou-se, neste caso, ser o suporte adequado por não sofrer hidrólise na presença de lisozima¹⁴.

Colunas cromatográficas de quitosana foram utilizadas para imobilizar fosfatase ácida e α - quimotripsina, sendo estudadas as condições ótimas de pH e de eluição para manter a atividade da enzima durante o uso prolongado da coluna com a presença de substratos¹¹.

2.5. UREASE IMOBILIZADA EM SUPORTES DIVERSOS

A urease foi imobilizada em cápsulas poliméricas previamente preparadas pelo método de polimerização partindo-se do estireno, etileno glicol dimetil-acrilato e divinilbenzeno como monômeros e a atividade enzimática foi determinada⁶⁰.

Filmes de quitosana têm sido usados como suporte na imobilização da urease covalentemente ligada à quitosana pré-tratada com glutaraldeído. A estabilidade, dependência de temperatura, de pH e reusabilidade foram estudadas⁶¹. A constante de Michaelis-Menten, K_m , foi encontrada 3 vezes maior para a urease imobilizada que reteve 94% da sua atividade original. Estudos da inibição da

atividade por fluoreto de sódio foram realizados para a urease imobilizada em membranas de quitosana. Foram propostos a formação de um complexo enzima - íon fluoreto seguida de lenta isomerização formando uma segunda espécie. As constantes de inibição para as duas espécies foram determinadas. Foi encontrado que a urease imobilizada é mais resistente à ação do inibidor⁶².

Metais pesados como inibidores da urease também foram estudados por Krajewska. A enzima foi covalentemente imobilizada em membranas de quitosana pré-tratada com glutaraldeído. A estabilidade da urease, contra a inativação por metais pesados, aumentou após a imobilização. O aumento da estabilidade foi atribuído a mudanças estruturais introduzidas na enzima pelo processo de imobilização e devido ao efeito quelante da quitosana⁶³.

Outros tipos de membranas têm sido usadas na imobilização da urease. Carboximetilcelulose foi utilizado por Sungur em que sulfato de cromo (III) e acetato de cromo (III) foram adicionados como agentes reticuladores. Reusabilidade, pH, concentração do agente reticulador e concentração da enzima foram fatores estudados em relação à atividade enzimática³⁰.

Krajewska imobilizou a urease em membranas modificadas de polisulfonas. Foram estudados efeito de pH, temperatura, inativação por calor e reusabilidade. O valor de Km obtido para urease imobilizada foi maior do que aquele para a enzima livre⁶⁴.

A urease tem sido covalentemente imobilizada em resinas de troca iônica, sendo usada como reator de batelada. A influência do pH e as cinéticas de dependência da concentração do substrato e do produto foram determinadas. O sistema é estudado teoricamente e experimentalmente sendo que o modelo de reação de difusão desenvolvido por Moynihan foi adaptado ao trabalho para calcular os fatores de efetividade para as partículas³⁵.

A urease foi também imobilizada sobre a crisotila por adsorção. A crisotila é um mineral de hábito fibroso e superfície hidroxilada, com boas propriedades de retenção. Foram estudados isotermas de adsorção, retenção, atividade catalítica,

estabilidade e reusabilidade. A urease adsorve de forma eficiente, rápida e irreversivelmente sobre o suporte e não ocorre a dessorção da enzima suportada. Entretanto a atividade da urease neste suporte variou de 1 a 4% em relação à enzima livre. Ocorreu redução da atividade da enzima imobilizada tanto na reutilização quanto após a estocagem³¹.

2.6. UREASE MICROENCAPSULADA

A microencapsulação também tem sido um método de imobilização largamente utilizada a partir dos experimentos de Chang que obteve uma microcápsula por polimerização interfacial do nylon⁶⁵.

A urease tem sido microencapsulada por Sundaram em microcápsulas obtidas por polimerização interfacial de nylon. A cinética da enzima encapsulada seguiu a equação de Michaelis-Menten. O valor da constante de Michaelis-Menten (Km) aumentou com a encapsulação, apresentando também influência pelo tamanho das cápsulas. Um tratamento teórico foi desenvolvido a partir do estudo dos efeitos difusionais e de transferência de massa na cinética de Michaelis-Menten da enzima encapsulada⁶⁶.

O método de polimerização interfacial também foi utilizado na microencapsulação da urease, em que a técnica empregada objetivava o controle do diâmetro das cápsulas através do uso de um aparato constituído por uma bomba peristáltica, uma válvula de controle de injeção de ar e um rotômetro⁶⁷. A solução aquosa atomizada, contendo a urease e hexametileno diamina (HMDA), foi emulsificada em solvente orgânico contendo cloreto de sebacoila (SC). A urease microencapsulada reteve 78% da atividade inicial e a Km não variou significativamente após a microencapsulação. A dependência do diâmetro médio com a velocidade do fluxo de ar e o efeito do pH na atividade da urease microencapsulada foram estudados⁶⁷.

Neufeld desenvolveu um método teórico, sob várias condições limitantes, para a hidrólise da uréia usando urease microencapsulada com membranas de nylon pelo método da polimerização interfacial em um reator de batelada fixo²¹.

Três fatores limitantes da velocidade de hidrólise da uréia - efeito cinético do pH, inibição do produto e a depleção do substrato - foram analisadas na performance do reator. Os estudos de simulação mostraram uma redução na conversão de uréia para as atividades da enzima sob consideração²¹.

Estudos da distribuição e das atividades da urease microencapsulada em membranas de poliamida pelo método da polimerização interfacial foram realizados por Neufeld⁶⁸. O valor médio do diâmetro das microcápsulas foi medido, 83% da urease foi microencapsulada com base na massa inicial e a concentração das cápsulas foi determinada. A fração da enzima intracapsular solúvel de 94% foi liberada em solução após a ruptura da membrana, indicando que 6% da massa ativa da urease permaneceu incorporada na membrana de nylon⁶⁸.

Estudos da urease microencapsulada também foram realizados em um reator de fluxo contínuo⁶⁹. A constante aparente de Michaelis-Menten foi determinada e observou-se um acréscimo de K_m quando determinada para urease microencapsulada com diferentes dias de estocagem. A velocidade de reação de hidrólise foi dependente da velocidade de fluxo através do reator. A atividade enzimática no reator de fluxo contínuo foi investigada e correlacionada com o modelo matemático derivado com base na cinética de Michaelis-Menten. Gráficos relacionando a conversão do substrato, à concentração de uréia e à capacidade do reator foram construídos e mostraram uma boa acuracidade, com um erro menor do que 15% dentro das condições experimentais estudadas⁶⁹.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Desenvolver um modelo de imobilização de enzimas utilizando o sistema polimérico QTS-PVA como membrana semipermeável no processo de microencapsulação da urease obtida na forma de extrato bruto de sementes de *Cucurbita pepo*, que são matérias-primas e recursos naturais de fontes renováveis e aplicáveis.

3.2. ESPECÍFICOS

- Preparar quitosana com diferentes grau de desacetilação a partir da hidrólise enérgica da quitina através de álcalis.
- Extrair a enzima urease, na forma de extrato bruto, a partir das sementes de *Cucurbita pepo*.
- Microencapsular o extrato bruto da urease através do processo de coacervação salina.
- Realizar ensaios clínicos e comparar os resultados com os obtidos através de “Kits” de diagnósticos comerciais.

- Determinar a composição da blenda QTS-PVA no sistema polimérico para a preparação de microcápsulas.
- Otimizar as condições experimentais para obtenção das microcápsulas contendo o extrato bruto: pH, temperatura, tamanho das partículas, velocidade de agitação, tempo de coagulação e meio coagulante.
- Microencapsular a enzima urease padrão Jack bean e comparar os resultados obtidos com o extrato bruto imobilizado da semente de abóbora.

- Comprovar, através de testes analíticos e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a encapsulação das enzimas.
- Determinar a estabilidade das espécies imobilizadas através do reuso das microcápsulas.
- Determinar as atividades enzimáticas e específicas da enzima livre e imobilizada.
- Determinar os parâmetros físico-químicos da urease livre e imobilizada.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

4.1.1. Equipamentos

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045. As determinações espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro Hitachi, modelo U.3000 e um espectrofotômetro digital Fluxo Mar Com. Imp. e Exp. Ltda., modelo -724 - visível. As medidas de pH foram feitas com um pH-metro marca Testa Tecnologia Eletrônica Ltda., modelo TPH-2.

Para extração da urease, foi utilizado um multiprocessador caseiro marca Arno, modelo PRO - CH e uma centrífuga Hitachi High Speed Miniature, modelo CF 15D rotor 15A7, com 15.000 rpm e 21.000 x gauss. A centrífuga Sigma Laborzentrifugen GmbH 3360 Osterode, modelo 2-15 rotor 11192, com 4500 rpm e 4147 x gauss, foi utilizada na centrifugação de amostras de urina no ensaio *in vitro* e na separação de partículas durante a determinação da atividade enzimática da urease microencapsulada.

As microcápsulas foram feitas utilizando-se uma bomba de seringa da Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., modelo MQBSG1-302 e, manualmente, com seringa descartável de 3 mL com agulha de 0,7 x 30 mm .

Para a coagulação das microcápsulas, utilizou-se um banho termostático, modelo MQBTZ 99- 20 - Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda. e um agitador magnético, modelo AMA 102 com velocidade controlada, da Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda.

A morfologia interna e da superfície das cápsulas e a análise elementar foram examinadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura marca Philips,

modelo XL 30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

4.1.2. Reagentes

Os reagentes de pureza analítica, tais como a albumina bovina, a urease padrão (Jack bean, *Canavalia ensiformis*) - adquiridos da SIGMA CHEMICAL CO - a uréia, o álcool polivinílico (PVA) e o soro controle liofilizado de origem humana, Qualitrol lote nº 421, adquiridos da MERCK CHEM, foram usados sem qualquer tratamento.

O soro controle da Control Lab, lote nº D 10, foi fornecido pelo Hospital Universitário da UFSC. Os principais ácidos, bases e sais utilizados eram de pureza analítica e foram obtidos da VETEC Química Fina Ltda. ou da MERCK CHEM.

A quitosana (QTS) obtida a partir da casca do siri, adquirida da SIGMA CHEMICAL CO., sofreu um processo de purificação que será descrito posteriormente.

O biopolímero quitina (QTI) extraído do exoesqueleto do camarão, utilizado na preparação da quitosana, foi fornecido pela KITO-Química Fina Ltda.

A urease extraída da *Cucurbita pepo* foi utilizada na forma de extrato bruto.

4.1.3. Soluções e reativos

As soluções utilizadas na formação da cápsula e na determinação das atividades enzimática e específica, foram preparadas previamente e estocadas a 4°C em geladeira, com exceção do coagulante que foi armazenado em temperatura ambiente. Para maior segurança, os reativos eram preparados a cada 30 dias.

Solução Coagulante

A solução de sulfato de sódio 20% p/v foi denominada de solução coagulante. O sulfato de sódio foi previamente purificado e reprecipitado em álcool etílico com o pH controlado e mantido em 7,0.

Solução Formalizante

A mistura de uma solução aquosa de aldeído fórmico (7% p/v), ácido sulfúrico (20% p/v) e sulfato de sódio (25% p/v) recebeu a denominação de solução formalizante³⁷.

Reagente Alcalino

O reagente alcalino consistiu de uma solução de 40 mL de hipoclorito comercial e 300 mL de hidróxido de sódio 2 N, diluídos a 1 litro de água destilada¹⁶.

Reagente Fenólico

O reagente fenólico foi preparado pela adição de 25 mL de uma solução de nitroprussiato de sódio (2,5% p/v) a 1 litro de uma solução fenólica (12,5% p/v)¹⁶.

Reativo de Folin - Ciocalteu

O reativo de Folin Ciocalteu foi preparado pela reação entre 25,00 g de tungstato de sódio, 6,25 g de molibdato de sódio, 175,00 mL de água destilada, 12,50 mL de ácido fosfórico concentrado e 25,00 mL de ácido clorídrico, colocados num balão de fundo redondo e deixados em refluxo por 10 horas ininterruptas. Depois de esfriado foram acrescentados 37,50 g de sulfato de lítio e 12,50 mL de água bromada. Após, foi fervido durante 15 minutos sem refluxo para

remover o excesso de bromo, esfriado, e o volume completado para um litro com água destilada⁷⁰.

Solução Cupro-Alcalina

A solução cupro-alcalina consistiu da mistura de 3 soluções na seguinte proporção: 100 volumes de carbonato de sódio (4% p/v), 1 volume de sulfato de cobre (2% p/v) e 1 volume de tartarato duplo de sódio e potássio (4% p/v), misturados imediatamente antes do uso⁷¹.

Solução Enzimática

A solução padrão de urease Jack bean (EP) foi feita com dois tipos de enzima: a tipo III, cuja atividade específica era originalmente 45.300 unidades por grama de sólido e a tipo VI, com atividade específica 120.000 unidades por grama de sólido. Cada unidade especificada libera 1,0 μmol de NH_3 de uréia por minuto a pH 7,0 e a 25°C. Ambas as soluções foram preparadas em água destilada na concentração de 0,2 mg/mL.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação e purificação da quitosana

A quitosana foi preparada controlando o grau de desacetilação da quitina⁷². O método consiste em refluxar a quitina com NaOH 50% (p/v). O refluxo foi feito na temperatura de 80°C num total de 9 horas. Esse processo pode ser repetido até a obtenção do produto com o grau de desacetilação desejado. Após três refluxos consecutivos o grau de desacetilação variou de 70% (primeiro refluxo) até 93% (terceiro refluxo).

A purificação da QTS foi feita dissolvendo-se primeiro o biopolímero em ácido acético 5% v/v depois filtrando a mistura para eliminar as impurezas insolúveis. Em seguida, reprecipitou-se a QTS com NaOH 1 M, lavando com água, até pH 7, e acetona para facilitar a secagem. Por último, a QTS foi colocada para secar em estufa à temperatura de 60°C. Depois deste estágio, o polímero foi triturado e passado em peneira de 100 mesh.

4.2.2. Determinação do grau de desacetilação

O teor de grupos amino da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica pelo método de Broussignac⁷³. A quantidade de amostra titulada foi de 2,007 g, dissolvida em 20,0 mL de solução padrão de HCl 0,300 M e depois diluída com 200 mL de água destilada. O método envolve a titulação da quitosana com NaOH 1 M em presença de um ácido forte. A titulação foi levada até o volume final de 100 mL de NaOH, conforme ilustra a Figura 3 (a); a derivada do gráfico de pH versus V_{NaOH} fornece dois picos que correspondem aos valores de NaOH nos dois pontos de equivalência, Figura 3 (b).

O grau de desacetilação pôde ser calculado através da equação de Broussignac⁷³, Equação 2. Nessa equação V_1 , V_2 , W e M_b , representam respectivamente o volume de base referente ao primeiro ponto de equivalência, o volume de base referente ao segundo ponto de equivalência, o peso original do polímero em grama e a molaridade da base.

$$\% \text{NH}_2 = 16,1 (V_2 - V_1) \times \frac{M_b}{W} \quad (\text{Equação 2})$$

A quitosana adquirida da Sigma apresentou uma porcentagem de grupos amino inicialmente de 70%, enquanto que a quitosana obtida no nosso laboratório pela desacetilação da quitina fornecida pela Kito-Química apresentou 80% destes grupos. Foi necessário realizar a purificação e o processo de contínuo refluxo até o grau de desacetilação de 93%.

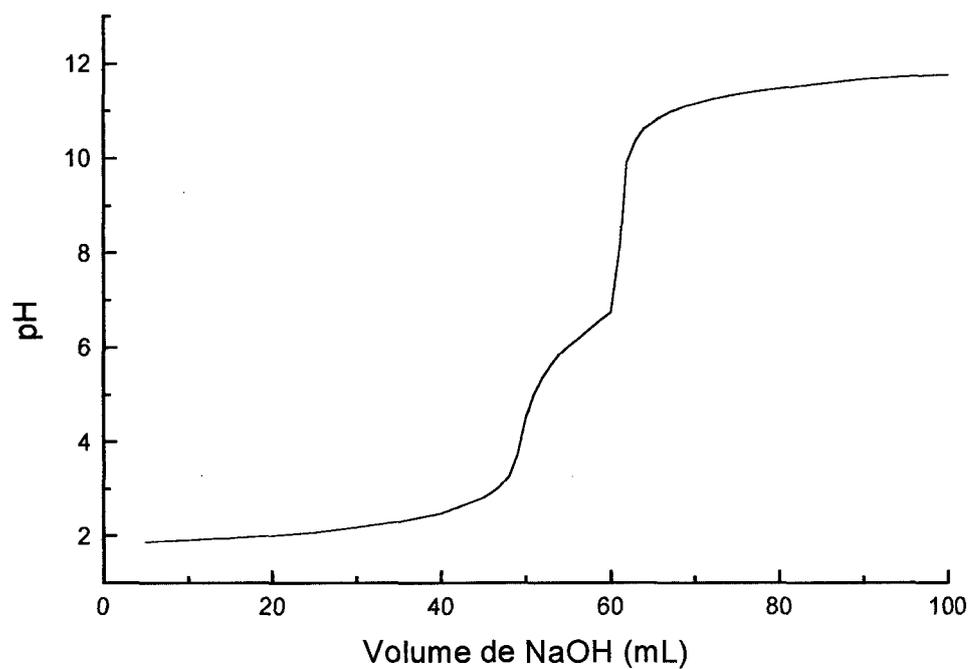


FIGURA 3 (a) - Curva de titulação potenciométrica da quitosana. Dependência do pH em função do volume de base.

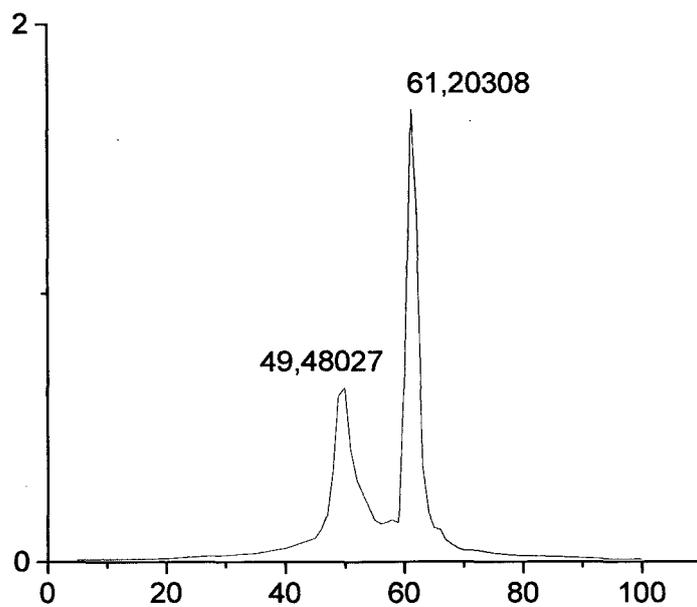


FIGURA 3 (b) - Derivada do gráfico pH *versus* volume de NaOH.

4.2.3. Determinação do peso molecular

A viscosidade reduzida (η_{red}) da quitosana, 93% desacetilada, foi determinada a partir da concentração (C) das soluções diluídas em ácido acético 5% na faixa de 0,15% a 0,02% p/v, utilizando-se o viscosímetro de Ostwald e seguindo-se o procedimento padrão citado por Polk *et alli*⁷⁴. Os valores encontrados para o tempo de escoamento do solvente (t_0) e o tempo de escoamento da solução de quitosana (t) em cada concentração foram aplicados na Equação 3.

$$\eta_{red} = \frac{(t - t_0)}{t_0 \cdot C} \quad \text{(Equação 3)}$$

Construindo um gráfico das viscosidades reduzidas *versus* concentração das soluções de quitosana obtém-se uma reta, Figura 4, cujo intercepto fornece a viscosidade intrínseca (η)^{42,74}.

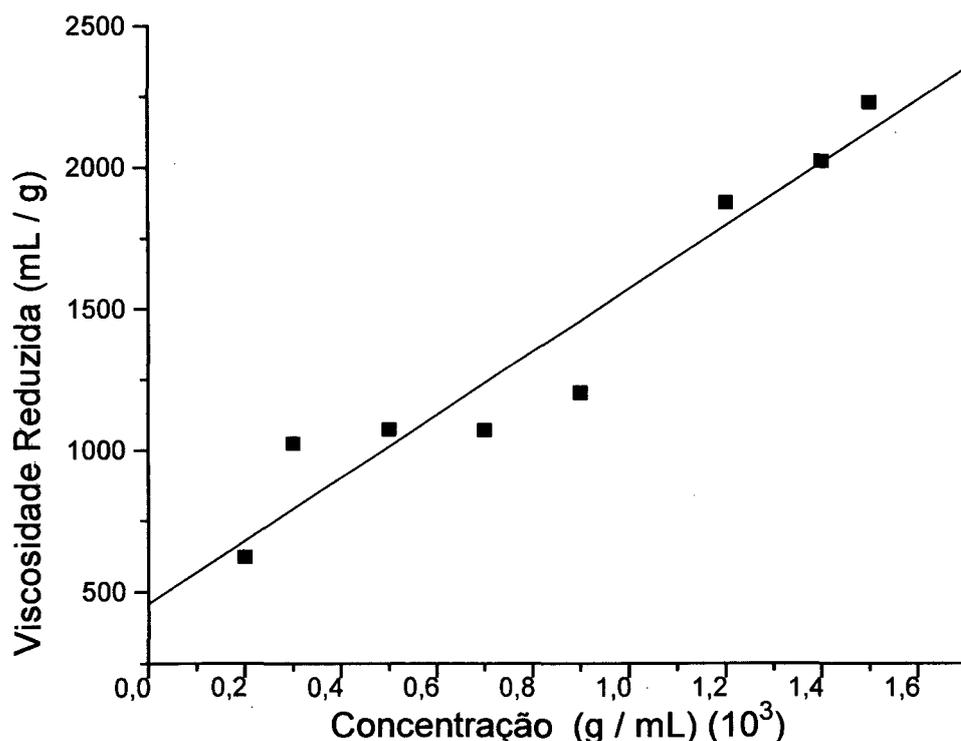


FIGURA 4 - Determinação da viscosidade intrínseca.

Para esse sistema, o valor encontrado para a viscosidade intrínseca foi de 460 mL/g. Usando-se os valores das constantes $K = 3,04 \times 10^{-5}$ e $a = 1,26$ ^{42,74} e aplicando-os na equação de Mark-Houwink, Equação 4, foi determinado o peso molecular (M_v), e o valor encontrado foi de $5,0 \times 10^5$. Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura^{40,42,75}.

$$\eta = K M_v^a \quad (\text{Equação 4})$$

4.2.4. Preparação da blenda QTS - PVA

O sistema polimérico (blenda) foi preparado a partir da mistura de duas emulsões. A primeira emulsão foi feita dissolvendo-se 0,7 g de quitosana 93% desacetilada em 50 mL de ácido acético 5% v/v, sob agitação e leve aquecimento. A temperatura foi controlada para não ultrapassar 60°C e o sistema mantido fechado para evitar a evaporação do ácido. A segunda emulsão foi preparada dissolvendo-se 6,8 g de PVA em 50 mL de água destilada, também sob aquecimento e agitação constante. Após a mistura das duas emulsões, a proporção final do polímero ficou em 7,5% p/v³⁷. O pH foi ajustado em 5,8 adicionando-se NaOH. Após essa etapa, o sistema foi levemente aquecido de forma que o volume final da blenda fosse de 100 mL.

4.2.5. Formação da microcápsula via coacervação salina

O processo de microencapsulação foi o da separação de fases via coacervação salina, "salting-out". Para as microcápsulas preparadas com a bomba de seringa partiu-se de 3 mL de blenda. A emulsão polimérica foi adicionada, gota a gota, numa cela especial com capacidade de 400 mL, acoplada a um banho termostático contendo a solução coagulante sob agitação constante. A temperatura foi mantida constante em 55°C. As microcápsulas formadas por este método ficaram perfeitamente esféricas e com diâmetro médio menores que 1 mm.

No entanto, quando uma espécie muito instável teve que ser encapsulada, obteve-se melhores resultados fazendo as cápsulas manualmente com uma seringa descartável. As cápsulas obtidas pelo método não automatizado foram feitas usando-se 1 mL de blenda, em 100 mL de coagulante; a temperatura do banho para encapsular a enzima urease foi de 27°C. A fim de evitar que as cápsulas coalescessem, adicionou-se 10 mL de álcool para cada 100 mL de solução.

O tempo de coagulação das microcápsulas variou de 30 minutos a 2 horas. Quando as mesmas sofreram um tratamento posterior, o da formalização, o tempo de coagulação foi de 30 minutos; quando as microcápsulas foram usadas para a determinação do reuso, o tempo de coagulação foi de 2 horas e, para as demais medidas, o tempo de coagulação foi de 1 hora e 30 minutos⁷⁶.

As microcápsulas foram armazenadas nas seguintes condições: quando formalizadas, o armazenamento foi em seco à temperatura ambiente; quando não sofreram nenhum tratamento, logo após serem retiradas da solução coagulante, foram espalhadas numa placa de petri e armazenadas a 0°C; e a última condição de armazenamento foi em 25 mL de solução de sulfato de sódio 10% p/v a 4°C.

4.2.6. Formalização da microcápsula

Denominou-se de processo de formalização o tratamento dado às microcápsulas com a solução formalizante objetivando a diminuição dos poros e o endurecimento das mesmas. Após o estágio de coagulação, as microcápsulas foram retiradas da solução salina, por filtração em gaze, e colocadas em 100 mL de solução formalizante sob agitação constante, na temperatura de 50°C. O tempo de formalização também variou entre 15 e 30 minutos. Depois, foram retiradas, lavadas com água e secas à temperatura ambiente.

4.2.7. Extração da enzima

A enzima de origem da semente da abóbora foi extraída pelo método desenvolvido por Hargreaves e colaboradores¹⁶ para as cucurbitáceas. A urease dessas sementes é extraída em meio aquoso macerando-se 20 gramas de sementes secas à temperatura ambiente e adicionando-se 40 mL de água destilada gelada, numa primeira extração, e mais 20 mL de água destilada gelada numa segunda etapa. Após cada etapa foi feita uma filtração; os dois filtrados foram misturados e centrifugados a 4°C e 13.000 rpm (19.000 x gauss) por 20 minutos, ocorrendo a separação da fase aquosa contendo o extrato bruto enzimático (EE).

4.2.8. Microencapsulação da enzima

Foi misturado e homogeneizado 0,1 mL do extrato bruto enzimático ou da solução padrão da urease com 1 mL de blenda, e o processo de microencapsulação procedeu conforme descrito no item 4.2.5.

Definiu-se como uma batelada as microcápsulas a partir de 1 mL de emulsão polimérica com 0,1 mL de enzima, o que corresponde em média a quantia de 100 microcápsulas, na temperatura de 27°C.

4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia interna e da superfície das microcápsulas formalizadas e sem tratamento químico, foi examinada através de fotomicrografias realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras foram preparadas da seguinte maneira: quando formalizadas, foram cortadas, utilizando-se um micrótomo, e a seção transversal colada em estabes; após, foram recobertas com ouro, fotomicrografadas e analisadas através da microsonda de energia dispersiva

de raio X-EDS. As microcápsulas não formalizadas foram congeladas antes de serem cortadas.

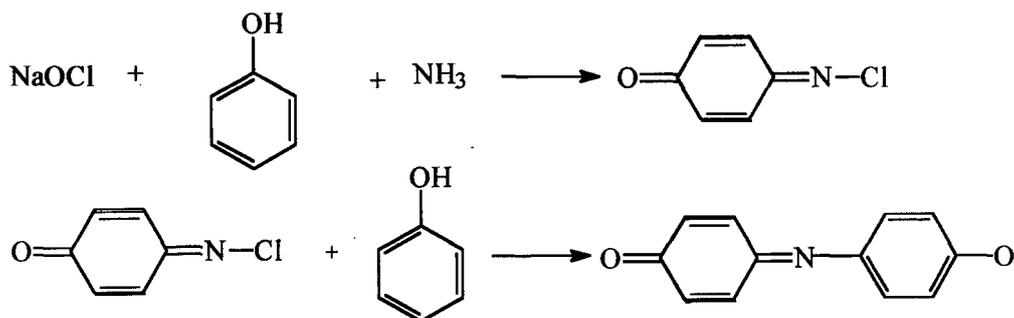
4.2.10. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da urease livre e da imobilizada foi determinada pela medida da quantidade de amônia liberada na hidrólise da uréia catalisada pela urease por unidade de tempo e expressa em μmol de NH_3/mL .

As medidas colorimétricas das amostras foram lidas acertando-se o zero com o branco. No branco havia 0,4 mL de tampão e todos os outros reagentes e reativos em igual quantidade, com exceção da enzima livre ou microencapsulada que não foi adicionada.

Método para determinação da atividade enzimática

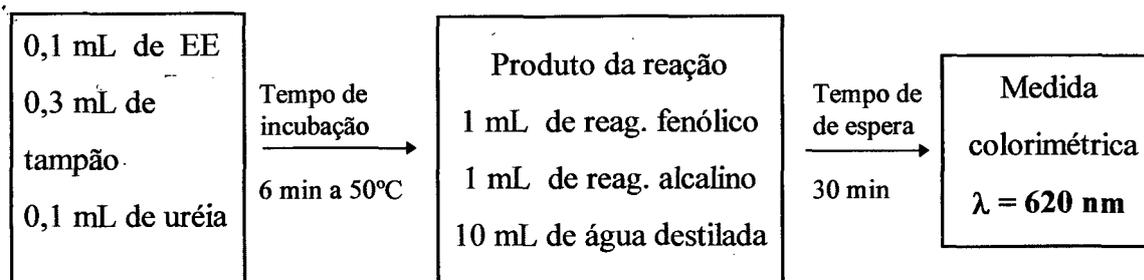
O método de dosagem adotado foi o do reagente fenol-hipoclorito em meio alcalino de Berthelot, conforme citado por Hargreaves¹⁶. O princípio do método consiste em tratar a solução onde o NH_3 está presente com hipoclorito de sódio, em meio alcalino, havendo formação de cloramina. Adicionando-se dois moles de fenol para um mol de NH_3 , em presença de um catalisador, nitroprussiato de sódio, ocorre a formação de azul de indofenol, Equação 5, que pôde ser medido colorimetricamente no comprimento de onda de 620 nm.



(Equação 5)

Método de dosagem - Urease livre

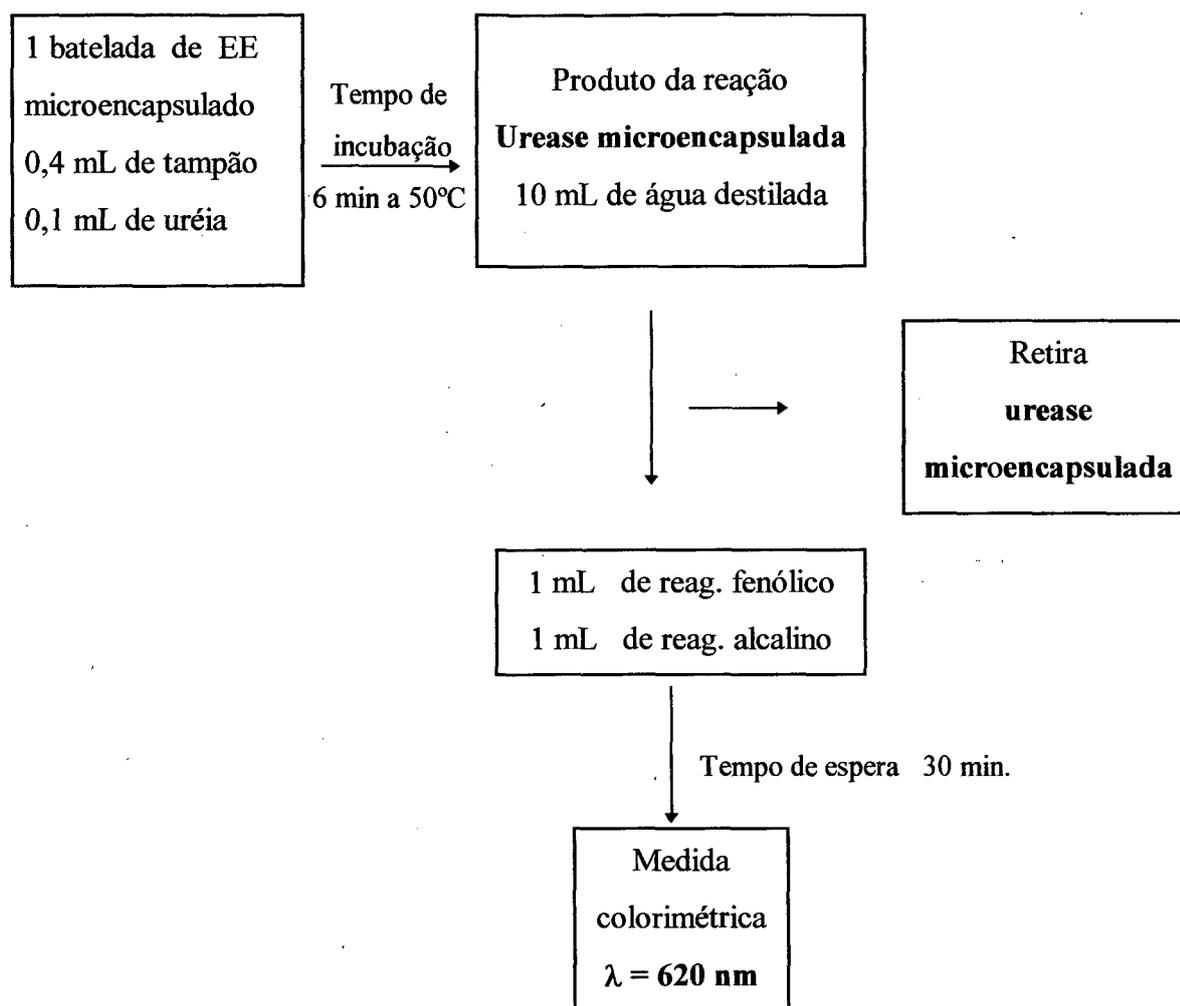
O Esquema 2 ilustra o procedimento adotado na determinação da atividade enzimática da urease livre. Os tampões utilizados foram o fosfato a pH 6,80 e o acetato a pH 5,75. A solução de uréia foi preparada imediatamente antes do uso. Após a incubação e antes da adição dos reativos, a mistura reacional foi posta em banho de gelo.



ESQUEMA 2 - Determinação da atividade enzimática da urease livre

Método de dosagem - Urease microencapsulada

O procedimento adotado para determinar a atividade enzimática da urease microencapsulada foi semelhante ao de dosagem da urease livre. O Esquema 3 ilustra o método de dosagem de amônia formada pela hidrólise da uréia catalisada pela urease imobilizada. O diferencial está na retirada da urease do sistema reacional. As microcápsulas foram retiradas por filtração em gaze, antes da adição dos reativos, a fim de que as mesmas não adsorvessem a cor, possibilitando principalmente sua reutilização. O tampão utilizado nesta dosagem foi o acetato pH 5,75.



ESQUEMA 3 - Determinação da atividade enzimática da urease microencapsulada

Homogeneidade de microencapsulação

A homogeneidade foi verificada para o EE livre na presença da blenda e para o EE microencapsulado. Para o EE livre, 1 mL da blenda contendo 0,1 mL de EE foi aleatoriamente distribuído em amostras de iguais quantidades, e a atividade foi determinada. Para o EE microencapsulado, a quantidade total de microcápsulas produzidas a partir de 1 mL de blenda com 0,1 mL de EE (uma batelada) foi aleatoriamente distribuída em quantidades iguais de 10 cápsulas e a atividade determinada conforme descrito anteriormente.

Determinação da quantidade de amônia liberada

A concentração do produto liberado, na reação de hidrólise da uréia usando 0,1 mL do extrato bruto livre ou uma batelada da enzima microencapsulada, em 6 minutos de incubação, foi calculada a partir da curva padrão da amônia.

A curva padrão da amônia foi construída a partir do gráfico de absorvância de diferentes soluções de amônia contendo 1 mL de reagente fenólico, 1 mL de reagente alcalino e 10 mL de água, obtendo-se as concentrações finais que constam na Tabela 2.

TABELA 2 - Relação das concentrações finais de amônia com as absorvâncias

Concentração de NH ₃ μmol de NH ₃ /mL	Absorvância λ = 620 nm
0,020	0,221
0,033	0,294
0,040	0,333
0,046	0,375
0,053	0,406
0,066	0,480
0,073	0,511

A leitura da absorvância foi feita após a diluição da solução de modo que a quantidade de amônia formada estivesse compreendida entre as concentrações do gráfico da Figura 5. Levando-se em conta a diluição, calculou-se o número de μmol de NH₃/mL formado em 6 minutos de incubação.

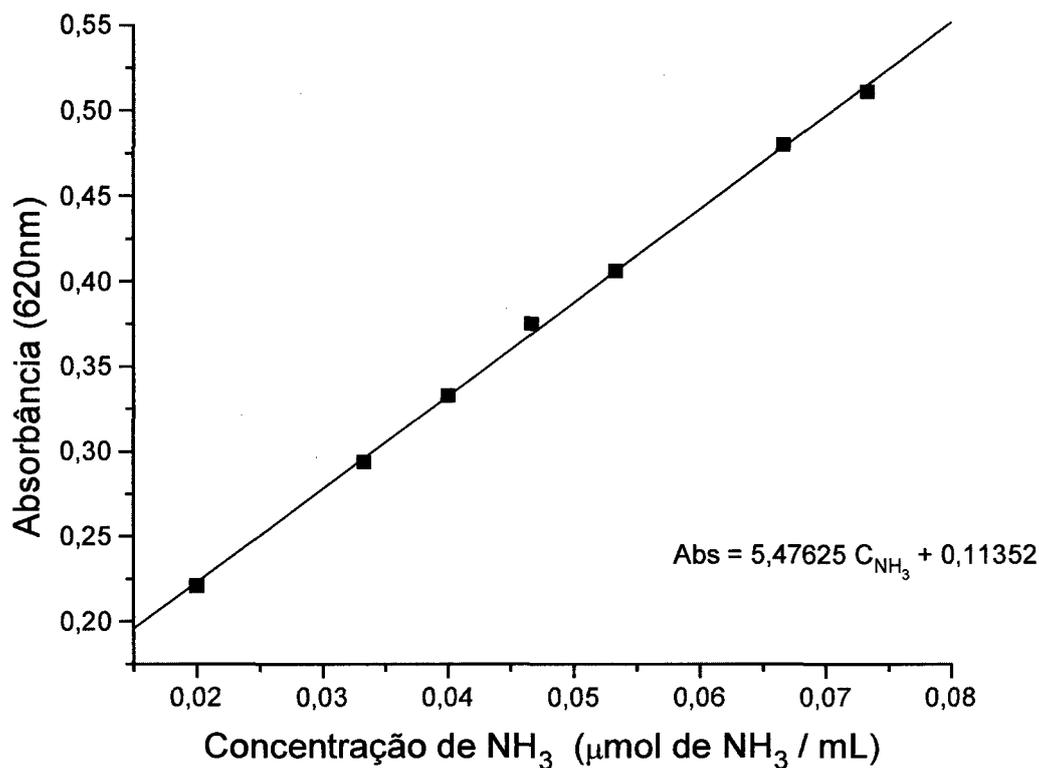


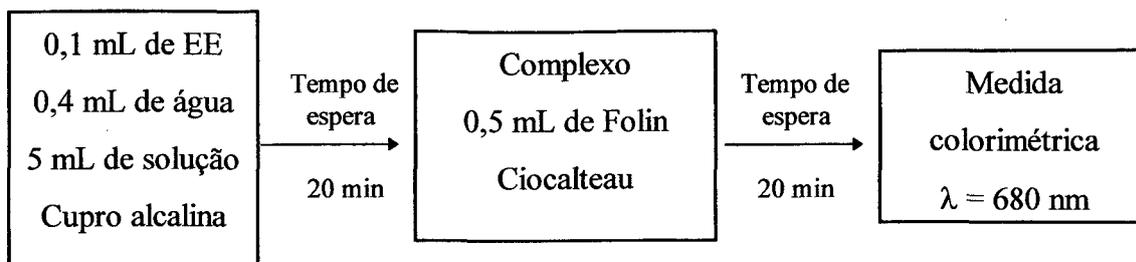
FIGURA 5 - Curva padrão da amônia

4.2.11. Determinação do teor de proteína

Na dosagem de proteínas (PTN) do EE livre ou microencapsulado, as medidas colorimétricas foram realizadas acertando-se o zero com o branco. O branco continha 0,5 mL de água e todos os outros reagentes e reativos em igual quantidade, com exceção do EE livre ou microencapsulado.

Dosagem da proteína no EE livre

A quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Lowry⁷⁷, cujo procedimento é ilustrado no Esquema 4.



ESQUEMA 4 - Determinação da dosagem de proteína no EE livre.

Dosagem da proteína no EE microencapsulado

O teor de proteína do EE microencapsulado foi dosado pelo método de Lowry em três condições diferentes:

- A) semelhante ao descrito para o EE livre, diferindo na etapa que precede a medida colorimétrica do complexo formado, em que a mistura reacional sofreu centrifugação por 5 minutos;
- B) às microcápsulas foram adicionados 5 mL de solução cupro alcalina e, após o tempo de espera de 20 minutos, as microcápsulas foram retiradas da solução. Nas demais etapas procedeu-se como descrito para o EE livre, diferindo novamente na etapa que precede à medida colorimétrica do complexo formado, em que a mistura reacional sofreu centrifugação por 5 minutos;
- C) as microcápsulas foram previamente destruídas com 5 mL de água e, após centrifugação por 5 minutos, foi dosado o teor de proteína como descrito para o EE livre.

Curva padrão da proteína

A quantidade de proteína foi calculada a partir da curva padrão de proteína construída com a albumina bovina nas concentrações constantes da Tabela 3. A medida do teor de proteína foi feita diluindo-se as amostras de modo que a absorbância estivesse compreendida entre as concentrações do gráfico da Figura 6. Levando-se em conta a diluição, calculou-se o número de mg de proteína por mL.

TABELA 3 - Relação das concentrações de proteína com as absorbâncias.

Concentração de proteína mg/mL (10^2)	Absorbância $\lambda = 680 \text{ nm}$
0,167	0,027
0,333	0,043
0,500	0,063
0,667	0,085
0,833	0,114
1,160	0,169
1,670	0,221

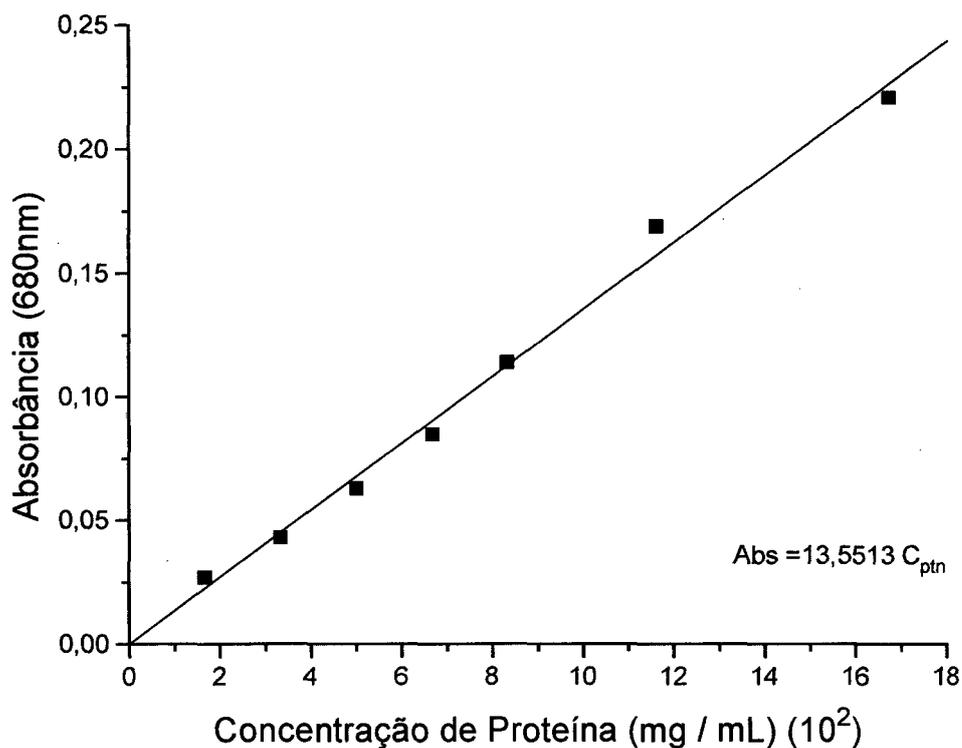


FIGURA 6 - Curva padrão da albumina para determinação do teor de proteína.

4.2.12. Determinação dos parâmetros físico-químicos da urease livre e microencapsulada

Exposição do EE a 27°C e 50°C

A inativação do EE livre foi analisada nas temperaturas de 27°C e 50°C, onde a enzima foi exposta por um período de 5 a 60 minutos, sendo, posteriormente, realizadas as determinações das atividades enzimáticas a pH 5,75 e 6,80. O estudo da inativação também foi acompanhado com a enzima exposta na presença de 0,5 mL da solução coagulante e a atividade medida a pH 5,75.

Tempo de incubação

A influência do tempo de incubação da reação de hidrólise catalisada pelo EE livre foi estudada incubando-se a mistura racional por um período de 2 a 15 minutos na temperatura de 50°C.

• Limitação do substrato

A fim de verificar se a concentração de uréia de 2 $\mu\text{mol/mL}$ não era limitante para o estudo em questão, foi variada a concentração do substrato mantendo-se fixa a quantidade de EE livre. Também variou-se o volume de EE de 0,075 mL a 0,3 mL mantendo-se a concentração de uréia constante.

Efeito da temperatura

As curvas de dependência de temperatura foram obtidas para o EE e a EP Jack bean livres e microencapsulados no pH 5,75. A mistura reacional foi incubada pelo período de 6 minutos nas temperaturas de 20°C até 70°C.

Efeito do pH

O efeito do pH na atividade enzimática do EE e da EP livres e microencapsulados, foi estudado na faixa de 3,5 a 8,0. A mistura reacional foi incubada durante 6 minutos a 50°C.

Parâmetros cinéticos

Os valores de K_m e V_m foram determinados para o EE livre no pH 5,75 e temperatura de 25°C, pelo método espectrofotométrico. Imediatamente após a adição dos reativos, a mistura reacional foi colocada na cela do espectrofotômetro

e foram determinadas as velocidades iniciais acompanhando-se cineticamente a formação do complexo a λ 620 nm.

Os valores de K_m e V_m também foram determinados através da leitura das absorbâncias máximas após 30 minutos da adição dos reativos. Esse mesmo procedimento foi aplicado para o EE microencapsulado no pH 5,75 e temperatura de 25°C.

Controle de estoque e de vazamento

A estabilidade do EE livre e microencapsulado e da EP livre, armazenados a 4°C, foi controlada por um período de 2 meses.

As soluções enzimáticas de EE livre e EP livre estavam distribuídas em amostras. O EE microencapsulado estava estocado em bateladas - em 25 mL de solução de sulfato de sódio 10% p/v - preparadas no mesmo dia.

Para a determinação das atividades enzimáticas, as amostras eram retiradas da geladeira previamente, a fim de atingir o equilíbrio térmico. As dosagens do teor de uréia foram realizadas a pH 5,75, e cada uma delas corresponde a uma amostra armazenada.

A estabilidade do EE livre e microencapsulado também foi acompanhada por um período de 19 dias, armazenados a -4°C. Neste caso, as microcápsulas foram estocadas na ausência de solução de sulfato de sódio.

O controle de vazamento foi realizado por um período de 2 meses dosando-se o teor de amônia e de proteína nos 25 mL de solução de sulfato de sódio onde estavam estocadas as bateladas de microcápsulas.

4.2.13. Reuso

A reusabilidade foi acompanhada para uma única batelada de EE microencapsulado. As medidas da atividade enzimática foram realizadas 14 vezes

num único dia e mais 7 vezes dois dias depois. Para evitar impregnação do produto nas cápsulas, após cada medida de atividade as microcápsulas eram lavadas várias vezes com 20 mL de solução de sulfato de sódio 10% p/v sob agitação. A solução de lavagem era também dosada para amônia até não acusar a presença do complexo. A partir desse momento era processado o reuso.

4.2.14. Ensaio *in vitro*

O poder catalítico da urease, na forma de extrato bruto, livre e microencapsulado, foram testados na análise clínica para determinação do teor de uréia na urina e no plasma. Os resultados foram comparados com os encontrados pelo método UV, realizados no Laboratório do Hospital Universitário (HU).

Dosagem de uréia nas amostras

Para a determinação da uréia nestas duas amostras adotou-se o método enzimático colorimétrico do fenol-hipoclorito, utilizando-se uma batelada de EE microencapsulado. Após a adição dos reativos, esperou-se 30 minutos e leu-se as absorbâncias das amostras e do padrão em 620 nm, acertando-se o zero com o branco.

A concentração da solução padrão de uréia foi a mesma utilizada em todas as experiências, 0,01 M ou 60 mg/dl, e o tampão foi o acetato para pH 5,75.

Os ensaios *in vitro* foram realizados também com 0,1 mL do extrato bruto livre em tampões acetato e fosfato.

Avaliação do método

Os dados estatísticos do processo analítico empregado foram avaliados através de medidas realizadas com dois soros controle. As medidas foram feitas

para os EE livre e imobilizado.

O soro foi adquirido liofilizado e fechado a vácuo. Um pouco antes do uso o frasco foi aberto e diluído a 5 mL com água bidestilada. Durante 30 minutos o soro ficou em repouso no escuro; após esse tempo, foi dissolvido com movimentos suaves, evitando-se a formação de espuma, e usado como uma amostra sérica normal.

A partir das dosagens realizadas em dias diferentes foram calculados os parâmetros estatísticos e a significância do método foi avaliada pelo Teste-t, de Student^{78,79}.

Preparação das amostras

As amostras biológicas ou espécimes foram processadas e utilizadas para análise seguindo as orientações do Farmacêutico Bioquímico Jorge Antonio Amaral, do Laboratório de Patologia Clínica do HU/UFSC.

A urina de 24 horas foi colhida em frasco, contendo 2,0 mL de HCl 50%, desprezando-se a primeira do primeiro dia e recolhendo-se até a primeira do dia seguinte. O volume total da urina foi medido e, depois, uma alíquota foi centrifugada durante 5 minutos a 2.500 rpm. Após a centrifugação, a amostra biológica foi diluída de 1:50.

O sangue foi colhido e preparado no Laboratório de Patologia Clínica do HU, e uma alíquota do plasma nos foi fornecido para análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FORMAÇÃO DA MICROCÁPSULA

Sistema polimérico

O sistema polimérico foi preparado a partir da mistura QTS-PVA na proporção final de 0,7% p/v de QTS e 6,8% p/v de PVA. A QTS é um biopolímero hidrofílico que, devido a presença dos grupos amino, é solúvel em soluções ácidas diluídas e forma hidrogel com a água. No entanto, a membrana adequada para formação da parede da microcápsula precisa ser insolúvel em ácido e em base. O PVA, por ser altamente polar^{45,80} e, portanto, bastante solúvel em água, forma blenda miscível e mais hidrofílica com a QTS^{81,82}. A blenda de QTS-PVA tende a aumentar a interação com a água, em função dos grupos OH do PVA e NH₂ da quitosana^{47,48}.

Também em função da interação intermolecular, causada pelos grupos funcionais existentes nos dois polímeros, há um aumento da resistência elástica e mecânica da blenda⁴⁶⁻⁴⁸. Essas características são necessárias e extremamente importantes na constituição da parede das microcápsulas, influenciando na porosidade desta parede, permitindo a permeação do substrato e do produto e retendo o encapsulado.

Ensaio utilizando cápsulas formadas apenas com quitosana na proporção 2% w/v (2 g de QTS em 100 mL de ácido acético 5%), ficaram quebradiças e aparentaram ter uma parede extremamente espessa, enquanto que as cápsulas formadas com a blenda QTS-PVA apresentaram uma flexibilidade e uma capacidade de inchamento adequada à microencapsulação da enzima.

Foram utilizadas blendas preparadas com QTS com diferentes graus de desacetilação (DG). Melhores resultados foram obtidos com a blenda formada com QTS mais desacetilada, principalmente no que se refere a permeação do substrato e

do produto. Contudo, as três blendas apresentaram a mesma capacidade de retenção do encapsulado. A atividade do EE microencapsulado em relação ao EE livre, usando-se QTS mais desacetilada, foi de 80%, e com a menos desacetilada foi de 60%, Tabela 4.

TABELA 4 - Atividade da urease imobilizada com QTS-PVA com diferentes graus de desacetilação de QTS.

DG da QTS, %	pH inicial da blenda	pH ^a final da blenda	Atividade relativa ^b do EE microencapsulado, %
71 ^c	4,75	5,8	60
85 ^d	4,17	5,8	---
93 ^d	3,72	5,8	80

a - pH ajustado por adição de base; b - Atividade relativa que corresponde à razão entre a atividade enzimática do EE microencapsulado e EE livre; c - QTS da Sigma; e d - QTS da Kito - Química.

Esse resultado pode ser atribuído a uma maior permeação do substrato e do produto na microcápsula formada com a blenda com QTS 93% desacetilada.

A maior quantidade de grupos NH₂ na QTS ocasiona um menor inchamento das cápsulas devido à menor disponibilidade de grupos OH do PVA para formarem pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Nestas condições ocorre uma maior formação de pontes de hidrogênio entre os grupos NH₂ da QTS e OH do PVA⁴⁸. No entanto, o menor grau de inchamento das cápsulas não afeta a permeação das espécies químicas de modo significativo, considerando que estas espécies, a uréia e a amônia, são moléculas de dimensões bastantes reduzidas.

Desta forma, o aumento da atividade em decorrência do aumento do grau de desacetilação pode ser atribuído à menor espessura da parede das cápsulas, ocasionando um menor tempo de permeação das moléculas.

As microcápsulas obtidas a partir da blenda com QTS 93% desacetilada apresentaram uma espessura média de 269 μm , conforme será discutido posteriormente⁷⁶, enquanto que as microcápsulas preparadas a partir da blenda com QTS 77% desacetilada apresentaram uma espessura média de parede de 350 μm ⁸³.

Por outro lado, foi constatado que a atividade enzimática é afetada pelo tempo de permeação como função da espessura da parede. Quando as cápsulas, contendo a urease, são mantidas em contato com a mistura reacional por um período mais longo, antes de se proceder a incubação, a atividade enzimática iguala-se à atividade da urease livre, conforme será discutido na seção 5.6.

Método de formação via coacervação salina

As microcápsulas formadas por esse método são esféricas, Figura 7, e apresentam um diâmetro que varia de 2 a 2.000 μm , conforme parâmetros tais como: tamanho da agulha (método de produção), viscosidade do sistema polimérico, pH da solução salina, pH da blenda, tempo de agitação, velocidade de agitação, temperatura e também ao tratamento químico que pode ser dado posteriormente a essa etapa⁸⁴

Neste processo, a formação das microcápsulas resulta de um fenômeno de superfície e ocorre devido a interação entre a emulsão polimérica e um meio contendo um eletrólito em altas concentrações que induz a separação de fase^{24,74,85}.

As Figuras 8 e 9 mostram as fotomicrografias das seções transversais das microcápsulas vazias sem sofrerem tratamento posterior à etapa de coacervação salina.

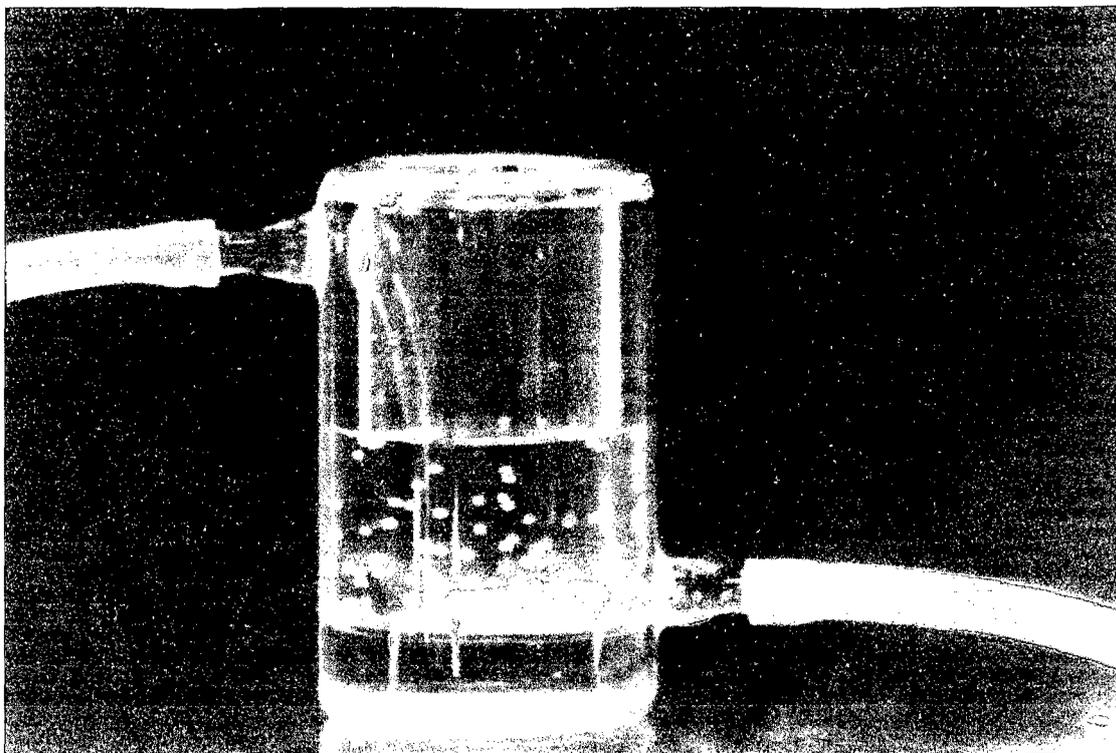


FIGURA 7 - Formação das microcápsulas via coacervação salina.



FIGURA 8 - MEV da seção transversal de uma microcápsula não formalizada.
Ampliação de 74 vezes.

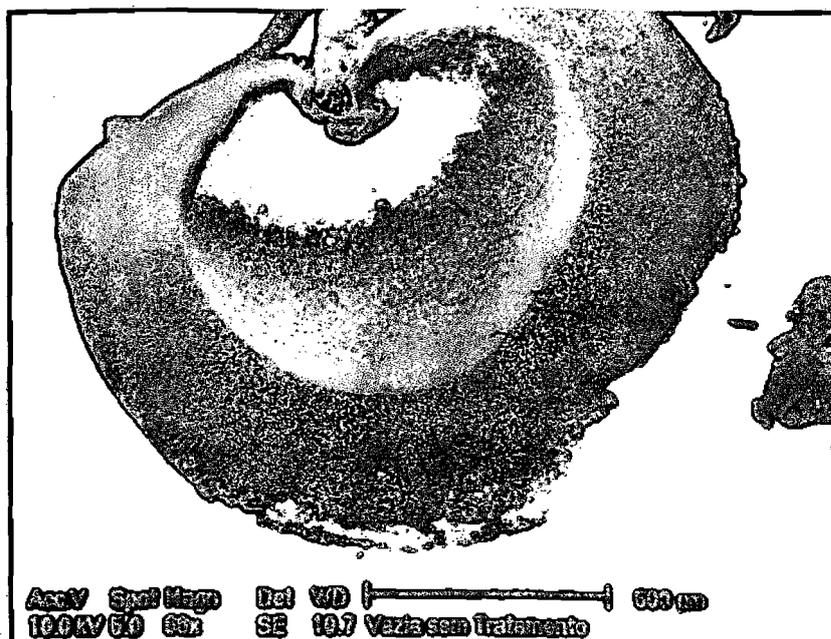


FIGURA 9 (a) - MEV da seção transversal da microcápsula não formalizada e congelada antes de ser seccionada. Ampliação de 66 vezes.

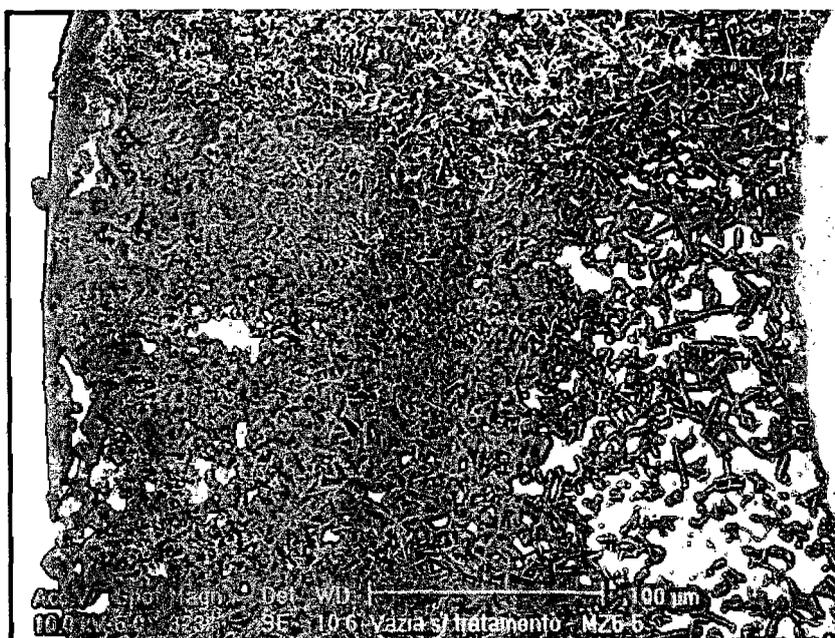


FIGURA 9 (b) - MEV da ampliação da parede da microcápsula não formalizada e congelada antes de ser seccionada. Ampliação de 323 vezes.

Observa-se um núcleo circundado por uma parede porosa com uma grande flexibilidade da microcápsula e a mesma morfologia em toda espessura da parede, Figura 9 (b). Na Figura 8, a deformação é mais evidente pelo fato de que as cápsulas foram seccionadas após o processo de coacervação e não foram congeladas. Quando congeladas, ocorreu a precipitação do sulfato de sódio nos poros da microcápsula tornando mais fácil manuseá-la e, conseqüentemente, não sofreram tanta deformação.

A literatura confirma que a parede da microcápsula pode ser reforçada e endurecida através do aumento da concentração iônica na solução coagulante⁸⁵.

Essa deformação é reversível. As cápsulas, quando são colocadas novamente em solução de Na_2SO_4 ou em tampão acetato, retomam sua forma esférica, mas se colocadas em tampão fosfato estão sujeitas a coalescer devido ao efeito “salting-in” causado por esse sal. Esse efeito foi observado e discutido na literatura por Schacht *et alli*⁸⁶.

A porosidade da superfície da parede é mostrada na Figura 10 e o espectro elementar confirma o excesso de Na_2SO_4 , sendo observado principalmente a existência de Na, S e O, Figura 11.

Essas microcápsulas apresentam uma porosidade natural que permite a retenção de espécies de alto peso molecular e a permeação de moléculas pequenas, o que torna o método aplicável à microencapsulação da enzima urease.

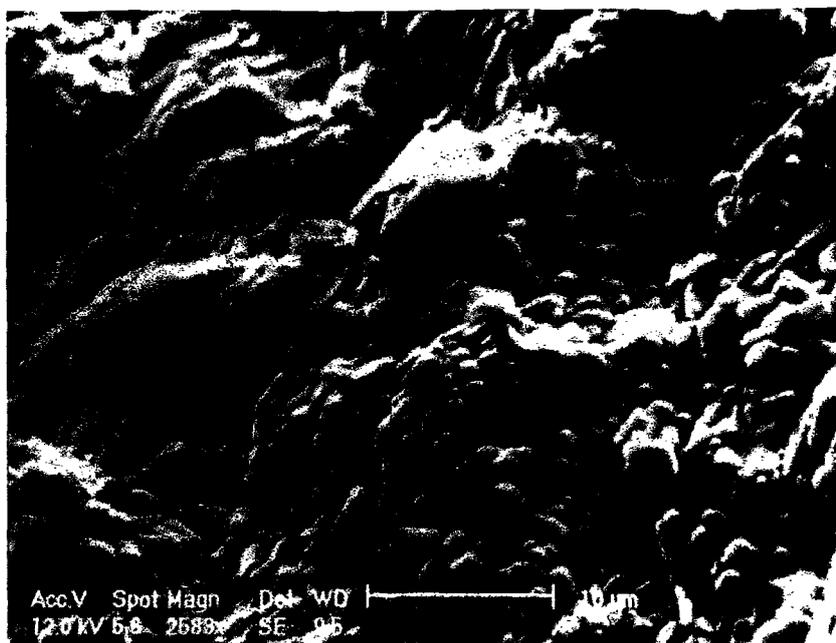


FIGURA 10 - MEV da superfície externa de uma microcápsula. Ampliação de 2.583 vezes.

Label A: morfologia da parede externa

Prst:100L

Lsec:100

14:59:46 9-15-96

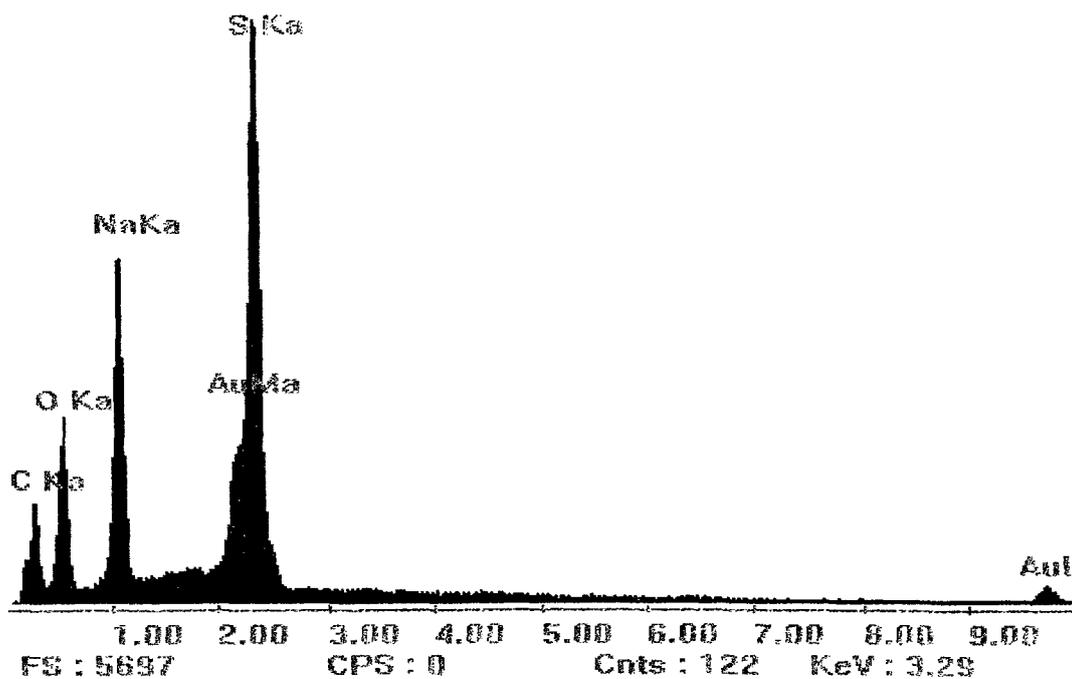


FIGURA 11 - Espectro elemental do sulfato de sódio presente na microcápsula, obtido através do MEV.

Formalização

As microcápsulas foram submetidas a um processo de formalização, que consiste no tratamento das cápsulas com aldeído fórmico na presença de ácido sulfúrico e causam endurecimento da parede e diminuição dos poros.

Esse mesmo tratamento tem sido realizado em cápsulas de gelatina⁸⁵ e em fibras³⁷, objetivando o aumento da resistência através do endurecimento.

A Figura 12 mostra a fotomicrografia de uma microcápsula vazia obtida pelo método de coacervação “salting-out” e submetida por 15 minutos ao processo de formalização. O diâmetro médio variou de 1.700 μm a 1.100 μm .

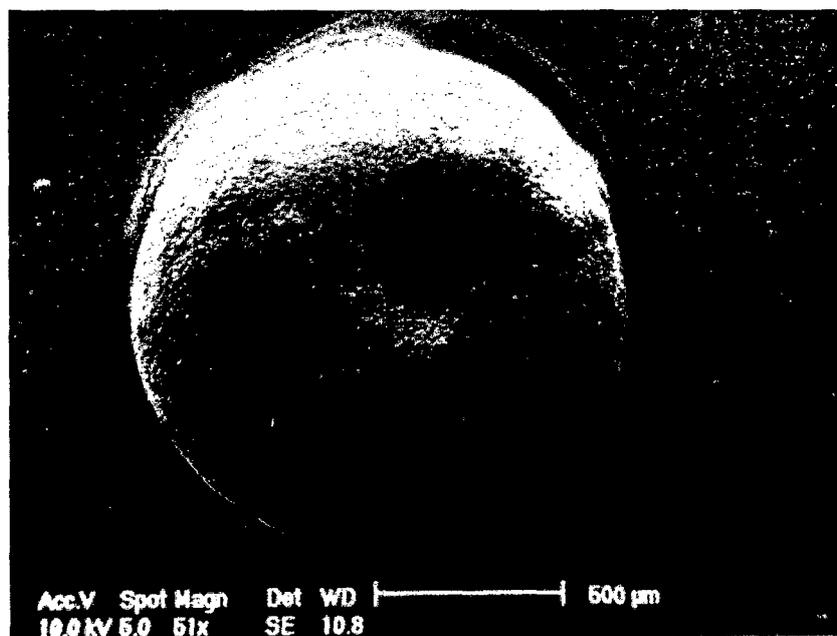


FIGURA 12 - MEV da microcápsula 15 minutos formalizada. Diâmetro 1.700 μm . Ampliação de 51 vezes.

O efeito causado pelo tratamento químico, no que se refere a porosidade, foi bem evidenciado na seqüência de fotomicrografias tiradas da seção transversal da microcápsula formalizada 15 minutos, Figura 13.

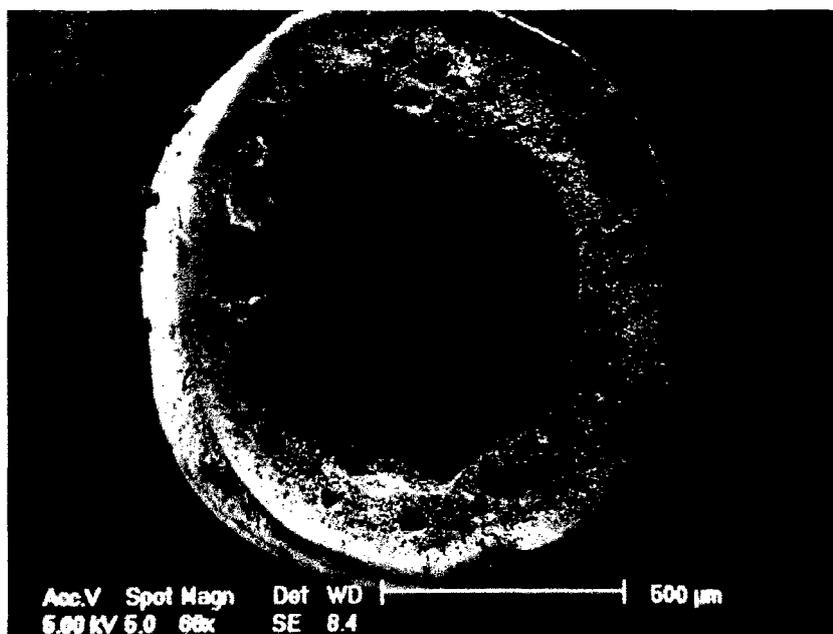


FIGURA 13 (a) - MEV da seção transversal da microcápsula formalizada 15 minutos. Ampliação de 66 vezes.

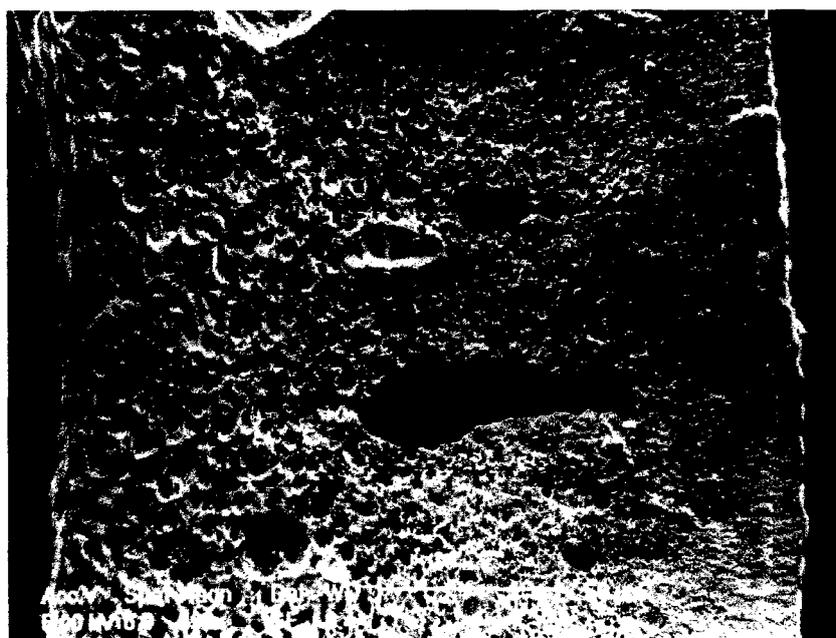


FIGURA 13 (b) - MEV da parede da microcápsula. Ampliação de 93 vezes.

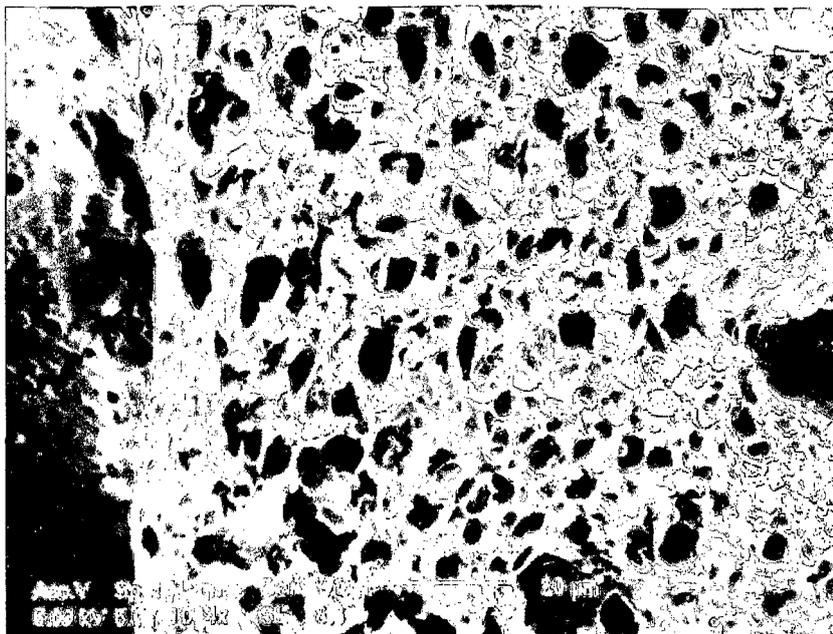
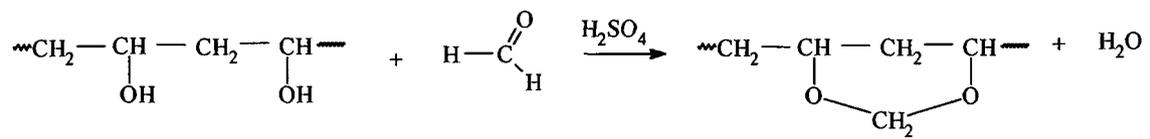


FIGURA 13 (c) - Ampliação de 1.004 vezes da região interna da parede.

Nesta seqüência, observa-se uma parede de espessura de 269 μm constituída de três zonas com diferentes morfologias:

- a zona externa, como pode ser vista na Figura 13 (b), é menos porosa e apresenta uma espessura aproximada de 57 μm ;
- a parte central, onde o tratamento com aldeído não foi tão intenso, com uma espessura de cerca de 109 μm ;
- a zona interna corresponde a parte mais porosa, com uma espessura de aproximadamente 103 μm , Figura 13 (c). Essa região da parede, mais próxima do núcleo, não foi afetada em 15 minutos de formalização.

A diferença de porosidade da parede é explicada em função da reação que envolve os grupos hidroxilas adjacentes, existentes no PVA. Os grupos OH reagem com aldeído fórmico formando um acetal por catálise ácida, conforme a Equação 6^{43,45,76,87}.



(Equação 6)

A Figura 14 mostra as fotomicrografias da ampliação do núcleo da microcápsula.

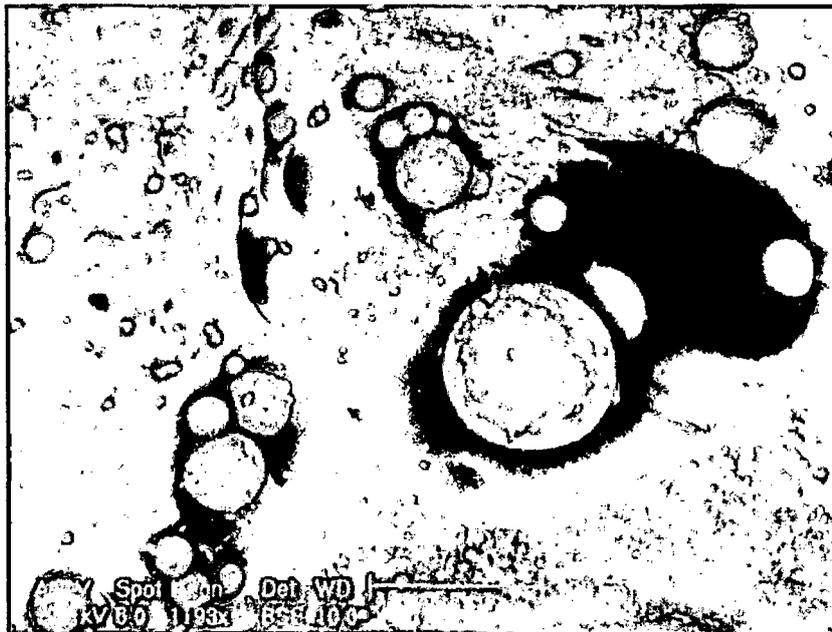


FIGURA 14 (a) - Ampliação de 1.193 vezes do núcleo da microcápsula.



FIGURA 14 (b) - Ampliação de 5.173 vezes do núcleo da microcápsula.

As pequenas esferas da Figura 14 (a) podem ser atribuídas ao excesso de sulfato de sódio durante a preparação e ao estoque das microcápsulas. Isto foi confirmado pelo espectro elementar que novamente identificou, principalmente, os elementos Na, S e O.

Através da Figura 14 (b) observamos que os poros da microcápsula não possuem uma homogeneidade na forma nem no tamanho.

As microcápsulas submetidas ao tratamento de formalização tornam-se mais resistentes a meios agressivos, como ácido sulfúrico concentrado e NaOH⁸⁸⁻⁹¹, sem sofrerem coalescência e não apresentam o efeito “salting-in” na presença de tampão fosfato⁷⁶.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA UREASE MICROENCAPSULADA

5.2.1. Urease extraída da *Cucurbita pepo*

A microencapsulação é afetada pelo processo de formação da microcápsula. O método de coacervação “salting-out” mostrou-se adequado para a imobilização da urease tanto no que se refere a manutenção da atividade da enzima como em relação a permeação do substrato e do produto.

A Figura 15 mostra uma seção da cápsula contendo as proteínas do extrato bruto juntamente com a enzima urease extraída da *Cucurbita pepo*, após o processo de formalização.

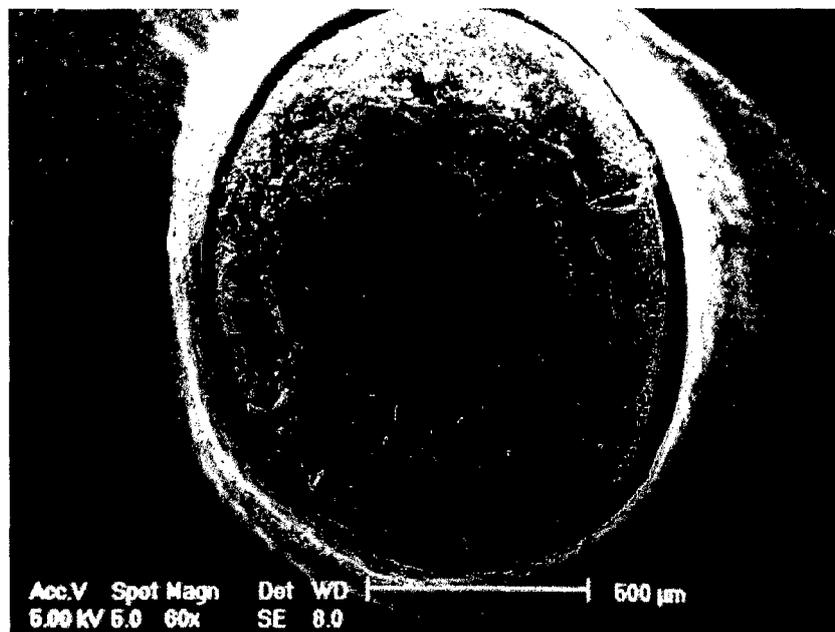


FIGURA 15 - MEV do EE microencapsulado. Ampliação de 60 vezes.

Neste caso, o tratamento químico foi feito para facilitar o manuseio e o corte da microcápsula objetivando obter as dimensões aproximadas da cápsula contendo a enzima. Conforme discutido anteriormente, a etapa de formalização foi realizada

em meio extremamente ácido provocando a desnaturação imediata da enzima, e a etapa de coagulação confere porosidade para reter moléculas como a urease e permitir a permeação do substrato (uréia) e do produto (amônia) da reação catalisada por esta enzima, conforme Equação 1.

Através da microscopia eletrônica de varredura, Figura 15, determinou-se as seguintes medidas:

- diâmetro total da cápsula 1.600 μm ;
- diâmetro do encapsulado 1.370 μm ;
- distância do encapsulado à parede da microcápsula denominada espessura do “gap” 63,2 μm ;
- espessura da parede da cápsula contendo a massa protéica 166,8 μm .

Essa última medida foi obtida por diferença entre o diâmetro total da cápsula e o diâmetro do encapsulado e a espessura do “gap”.

Com base nessas dimensões, observa-se que ocorreu uma compressão da parede da cápsula quando comparada com a espessura da cápsula vazia de 269 μm , correspondendo a uma compressão de 38%, Figura 13 (a).

A diferença entre as duas dimensões das paredes das cápsulas, é de 102,2 μm , que corresponde também a espessura da parte mais interna da parede da cápsula vazia, Figura 13 (b).

Este é mais um fator que demonstra que a formalização não afetou a região da parede mais próxima do núcleo e, portanto, não afetou a flexibilidade do material polimérico daquela região.

O volume de ocupação das proteínas do EE contendo a enzima foi calculado desconsiderando a espessura do “gap”. O valor encontrado foi de 62,7 %.

As morfologias da parede polimérica da cápsula e do material protéico, foram analisadas através das Figuras 15 e 16. O interstício observado entre a parede polimérica e o extrato bruto enzimático, na Figura 15, é melhor evidenciado

na Figura 16. Esse interstício corresponde a um “gap” devido a contração do material protéico após a secagem.

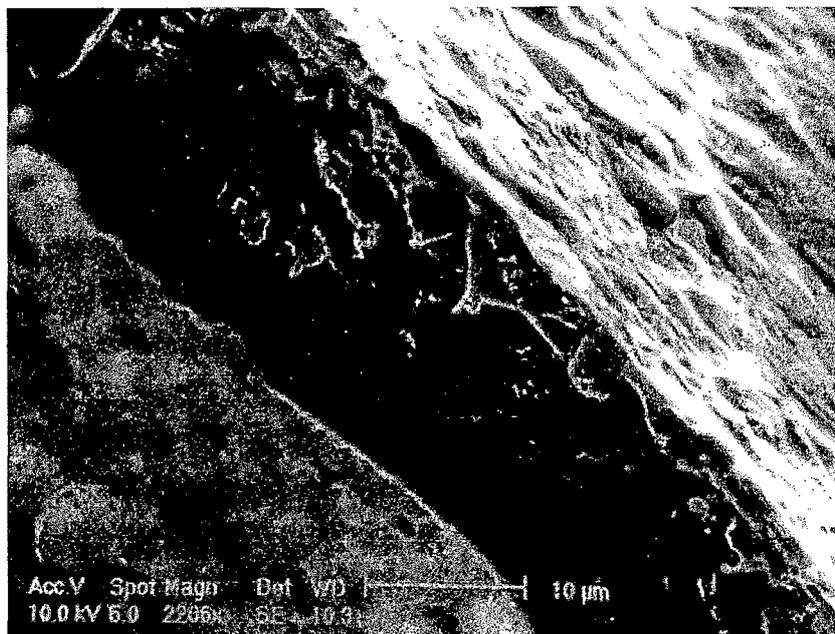


FIGURA 16 (a) - Ampliação de 2.206 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca o interstício entre a parede polimérica e o encapsulado.

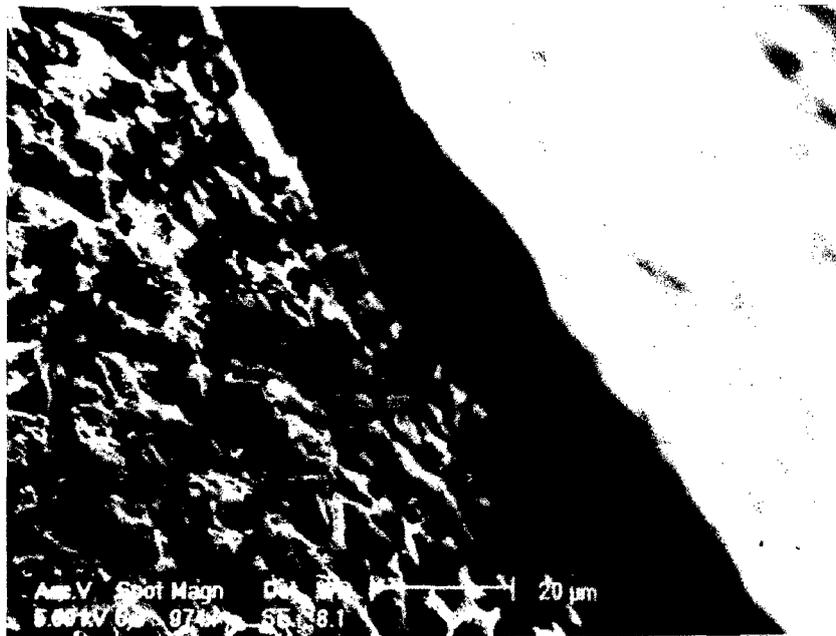


FIGURA 16 (b) - Ampliação de 974 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca a morfologia das proteínas do EE.

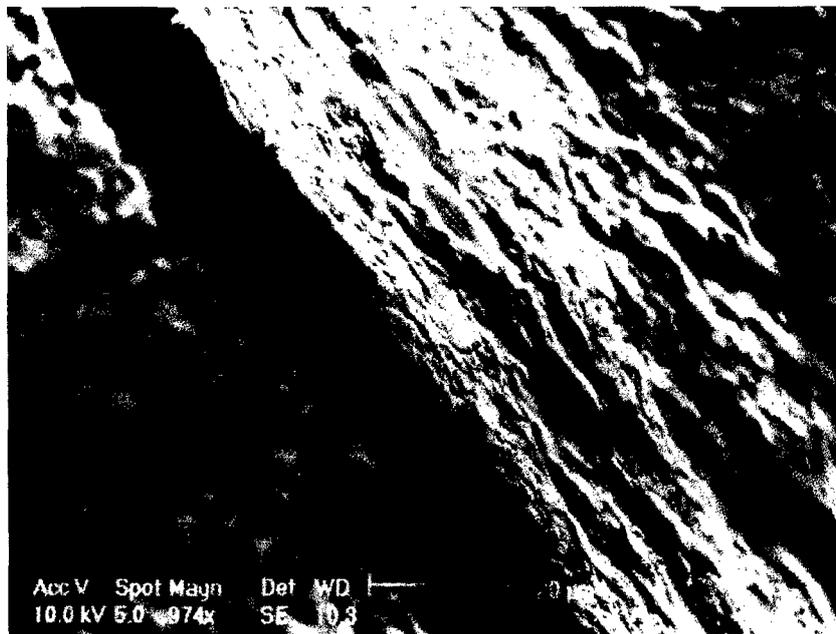


FIGURA 16 (c) - Ampliação de 974 vezes da seção transversal da cápsula contendo o material protéico. Destaca a morfologia da parede polimérica.

A Figura 16 (a) evidencia o confinamento das proteínas sem nenhum tipo de interação entre a parede da cápsula e a espécie microencapsulada. A morfologia do material protéico, Figura 16 (b), apresenta-se substancialmente diferente da morfologia da parede polimérica da cápsula, Figura 16 (c). Esta é outra evidência de que não há interação entre a parede da microcápsula e as proteínas do extrato bruto e que o encapsulado não se encontra disseminado na parede da microcápsula⁹²⁻⁹⁴.

A literatura destaca a contração do encapsulado, após secagem no processo de microencapsulação, como um fenômeno de grande importância para a área farmacêutica, de forma que medicamentos em soluções podem se converter em sólidos, evitando incompatibilidades e disfarçando odores desagradáveis⁸⁵.

A imobilização de enzimas tem sido amplamente estudada utilizando-se métodos onde ela é presa a um suporte com comprometimento de sítios ativos^{30,60,61,95}. Também tem sido reportados na literatura trabalhos utilizando cápsulas porosas de quitosana na imobilização de enzimas^{15,29,96}, mas da mesma forma a enzima é fixada covalentemente comprometendo os sítios ativos. Em relação à microencapsulação tem sido usados outros polímeros como suporte e geralmente a microencapsulação é via polimerização interfacial; e quando o suporte é a QTS o meio utilizado como agente precipitante tem sido o NaOH, que apresenta um pH inadequado para manter a atividade enzimática^{15,47,97}.

5.2.2. Urease padrão

Para efeito de comparação, a urease padrão Jack bean (*Canavalia ensiformes*) obtida da Sigma foi microencapsulada utilizando-se o mesmo método e analisada através da microscopia eletrônica de varredura.

As Figuras 17 e 18 mostram microcápsulas contendo a enzima urease padrão Jack bean tipo III com 45.000 U/g de sólido e tipo VI com 120.000 U/g de sólido, respectivamente, após o processo de formalização.

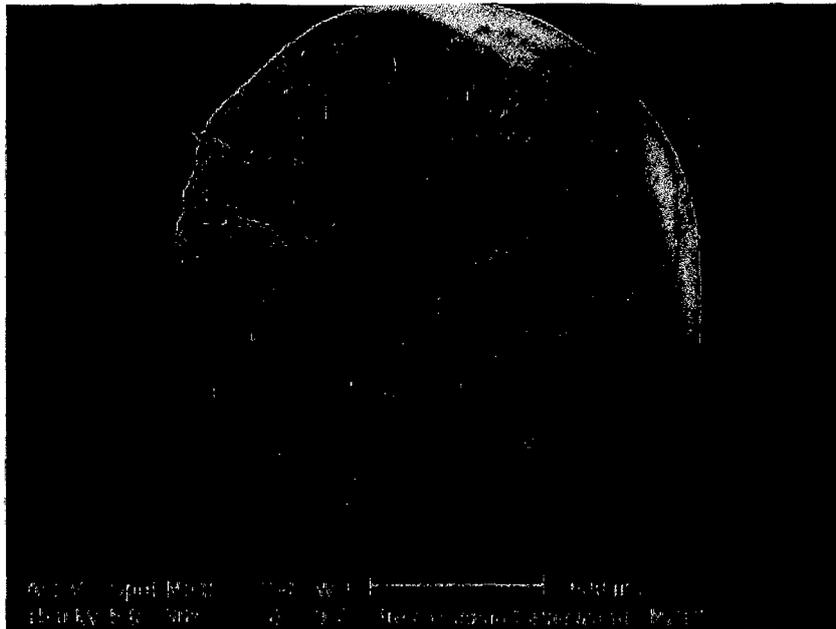


FIGURA 17- MEV da microcápsula contendo a urease padrão tipo III. Ampliação de 36 vezes.

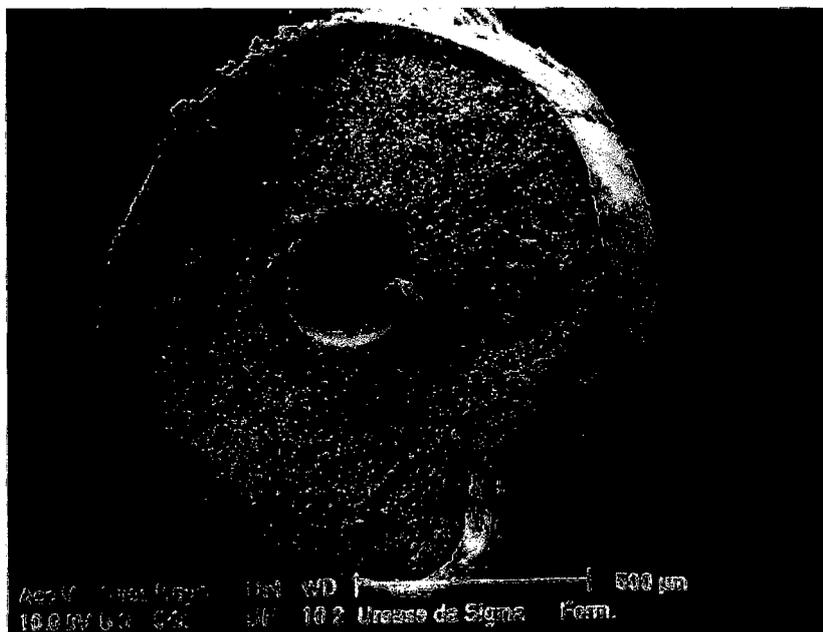


FIGURA 18 - MEV da microcápsula contendo a urease padrão tipo VI. Ampliação de 64 vezes.

Quando comparamos a microencapsulação da enzima pura com o extrato bruto da semente de abóbora, Figuras 15 e 16, são evidenciadas diferenças fundamentais: não se observa o “gap”, isto é, a separação entre a parede da microcápsula e a enzima, e nem se percebe a diferença da morfologia da parede interna da cápsula e do encapsulado. Estas diferenças podem ser atribuídas a difusão da urease pura pela parede da microcápsula e, portanto, a enzima fica acessível ao substrato já que se encontra mais exposta.

Os resultados encontrados no estudo do tempo de contato da enzima com o substrato, que será discutido na seção 5.6, confirmam estas observações.

Comparando-se ainda as Figuras 17 e 18, observa-se uma grande diferença de morfologia. Esta diferença pode ser atribuída aos diferentes graus de pureza da enzima, em que quanto mais pura a enzima, maior a difusão pela parede da cápsula.

Esse mesmo comportamento tem sido observado para moléculas menores nas quais estudos da microscopia eletrônica mostram uma fotomicrografia muito similar à Figura 18⁹⁸.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA UREASE LIVRE - EXTRAÍDA DA SEMENTE DA *Cucurbita pepo*

O processo da microencapsulação depende da técnica de produção e das características da espécie encapsulada^{47,99,100}. A enzima sofre desnaturação na presença de calor e agentes químicos, perdendo rapidamente a estabilidade quando se encontra na forma livre. Para manter a capacidade catalítica da enzima durante o processo de microencapsulação, de forma que o núcleo contivesse o material protéico com atividade, foi necessário determinar alguns parâmetros com o extrato bruto a fim de ajustar as condições de pH da blenda e do coagulante, temperatura e tempo de coagulação, e o método de produção (se manual ou com a bomba de seringa).

Esse parâmetros foram realizados acompanhando-se a atividade enzimática da urease através da quantidade de amônia liberada na hidrólise da uréia pelo método fenol-hipoclorito, descrito na seção 4.2.10.

Os parâmetros abaixo listam as condições em que a enzima foi estudada:

- Efeito da temperatura.
- Efeito do pH.
- Parâmetros cinéticos.
- Exposição do EE à 27°C e 50°C .
- Tempo de incubação.
- Limitação do substrato.

Alguns destes parâmetros, além de serem determinantes na escolha das condições para a realização do processo de microencapsulação, são importantes para mostrar a efetividade da enzima imobilizada e, portanto, serão apresentados e discutidos com detalhes durante a análise e comparação da urease livre e microencapsulada. A dependência da atividade enzimática com a temperatura, com o pH e com a concentração do substrato (constante de Michaelis-Menten), são exemplos desses parâmetros; eles são determinantes para o processo à medida que indicam como sendo 50°C a temperatura ótima e 6,0 o pH ótimo para a urease contida no extrato bruto da semente de abóbora, o que nos levou a ajustar o pH da blenda em 5,8.

5.3.1. Exposição do EE a 27°C e 50°C

A enzima, na forma de extrato bruto, antes de ser utilizada na hidrólise da uréia, foi exposta, na presença de 0,5 mL de solução coagulante, às temperaturas de 27°C e 50°C por um período de 5 a 60 minutos, que é o intervalo mínimo que as cápsulas ficaram coagulando. Após a exposição do EE nessas temperaturas, procedeu-se a hidrólise da uréia na presença de tampão acetato pH 5,75, Figura 19.

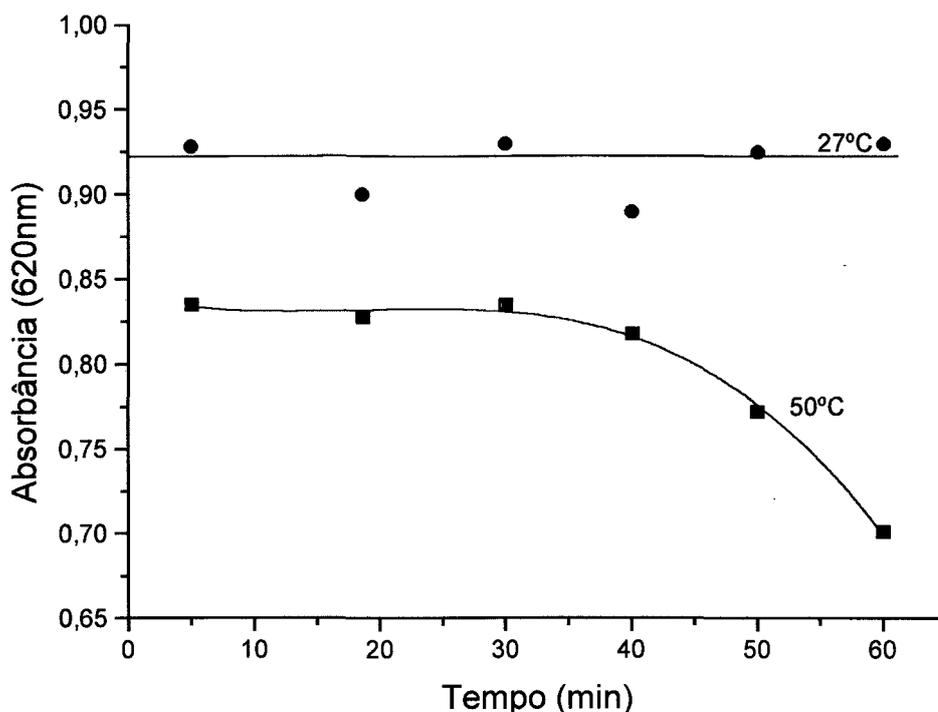


FIGURA 19 - Exposição do EE a 27°C e a 50°C na presença de coagulante. Posteriormente a hidrólise de 2 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia, foi realizada em tampão acetato pH 5,75,.

Os resultados encontrados, Figura 19, comprovaram que as enzimas se tornam inativas à medida que a temperatura é elevada. A desnaturação térmica do EE na presença da solução coagulante ocorreu de forma acentuada, à temperatura de 50°C, quando comparada com o EE exposto à temperatura de 27°C. A 50°C, ocorreu um decréscimo da atividade do EE em torno de 16%, enquanto que a 27°C a atividade se manteve constante. O efeito do calor na atividade da urease também foi observado por Krajewka, quando a urease pura foi exposta à temperatura de 70°C, havendo perda de 30% da atividade durante 60 minutos^{61,64}.

5.3.2. Tempo de incubação

A estabilidade térmica do extrato bruto foi também testada incubando-se a enzima na temperatura ótima, 50°C, e medindo-se a atividade com o tempo. Este ensaio foi realizado preliminarmente com o objetivo de se determinar se o tempo de 6 minutos para incubação da enzima padrão, utilizado por Hargreaves et al²⁰, era adequado para incubar o extrato enzimático extraído da semente de abóbora; por esta razão, a hidrólise da uréia foi efetuada em tampão fosfato pH 6,8. Os resultados encontrados estão representados na Figura 20. Observou-se um comportamento semelhante ao encontrado por Hargreaves et al²⁰; após 6 minutos a hidrólise se processa como sendo de ordem zero, isto é, independe do tempo de incubação.

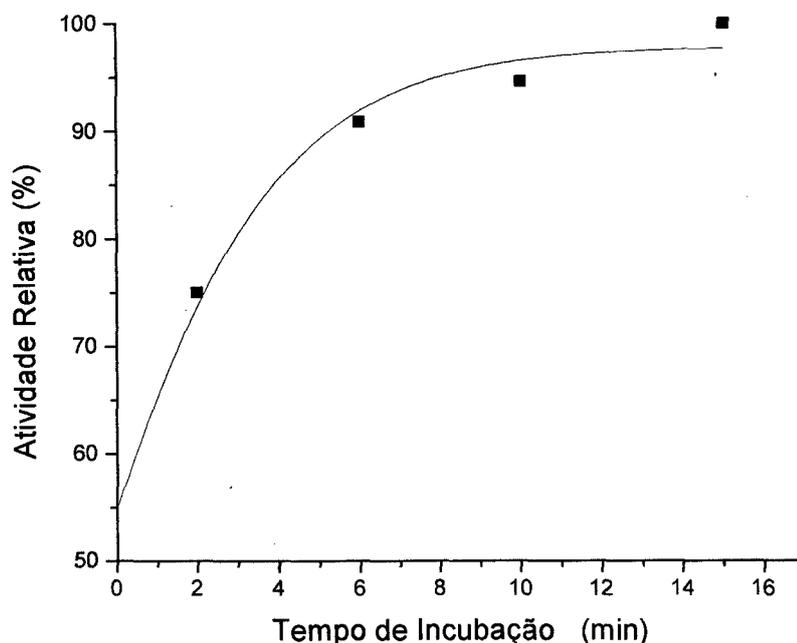


FIGURA 20 - Hidrólise da reação de 2 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia pelo EE incubado a 50°C no pH 6,8.

5.3.3. Limitação do substrato e do EE

No estudo da ação enzimática, a concentração do substrato é um fator crítico, considerando que não deve ser extremamente elevada, podendo causar uma ação inibidora na reação, nem muito pequena, podendo ser limitante para a reação catalisada pela enzima. A concentração da uréia deve estar em torno do valor em que a velocidade da reação é máxima nas condições padronizadas da experiência.⁷¹.

Diante dessas considerações, foi realizada uma série de experiências em que foram determinadas as quantidades de amônia formada em presença de concentrações crescentes de uréia, catalisada pelo extrato bruto obtido da semente de abóbora, Figura 21.

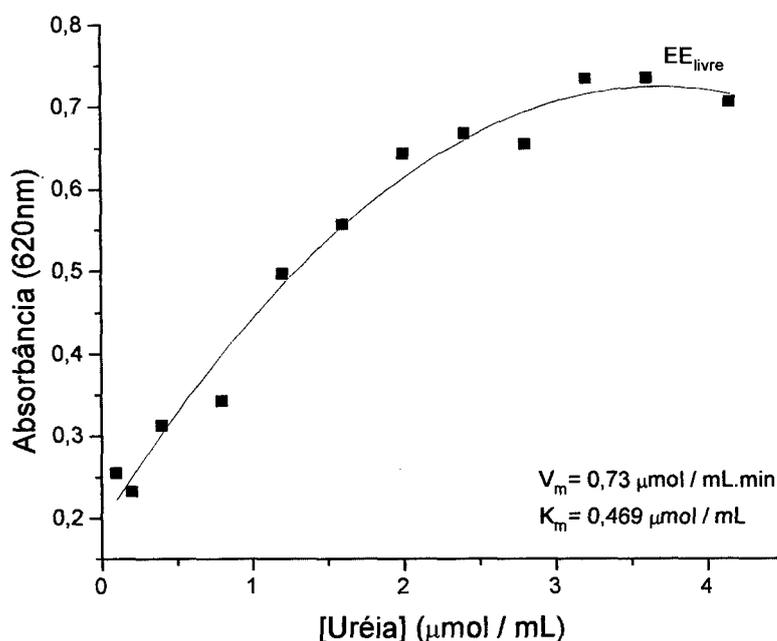


FIGURA 21 - Dependência da formação do produto em função da concentração de substrato, Incubado 6 minutos a 50°C, pH 5,75 .

Com base neste gráfico, a constante de Michaelis-Menten (K_m) pôde ser estimada em torno de 0,47 $\mu\text{mol}/\text{mL}$. Na concentração de uréia em 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, o

substrato não provoca a inibição da reação nem é limitante para o volume de 0,1 mL de extrato bruto utilizado. O valor exato de K_m foi determinado cineticamente e será discutido detalhadamente na seção 5.5.3 .

A concentração da enzima também influencia a atividade enzimática e a velocidade da reação, já que ocorre uma combinação entre a enzima e o substrato, embora a influência dependa também de outros fatores, quais sejam, o número de centros ativos por molécula da mesma enzima e a sua velocidade de circulação “turn over number”, isto é, o tempo necessário para que a molécula do complexo intermediário se rompa e a enzima volte a se combinar com outra molécula do substrato⁷¹. No caso específico deste trabalho, em que foi utilizando o EE, isto é, a enzima urease impura, esse fator torna-se mais importante. Estudou-se a ação da enzima na reação de hidrólise, variando-se a quantidade de EE e fixando-se a concentração de uréia em 2 $\mu\text{mol/mL}$ e 1 $\mu\text{mol/mL}$, Figura 22.

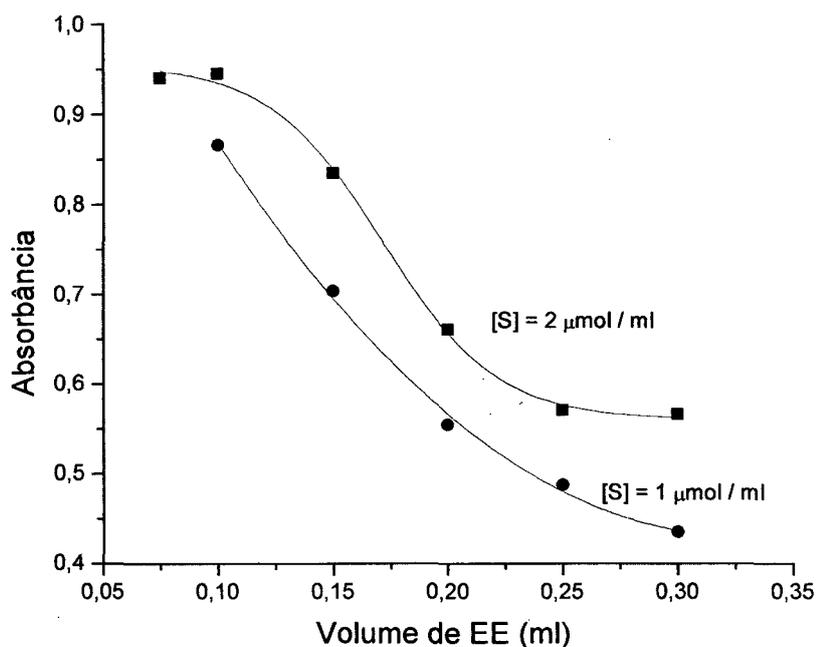


FIGURA 22 - Dependência da produção da amônia em função do volume de enzima. A reação foi incubada 6 minutos a 50°C, pH 5,75.

Observa-se um efeito inibidor conforme o aumento da quantidade da enzima. No entanto, para a concentração de uréia de 2 $\mu\text{mol/mL}$ a ação inibidora da urease é menos intensa. Efeito similar foi observado por Sungur³⁰ onde o aumento da concentração da enzima acarretou uma diminuição da atividade, tendo sido atribuído a uma interação enzima-enzima. Este mesmo efeito tem sido mencionado na literatura⁵⁵, onde a ação da concentração enzimática na velocidade da reação obedece uma dependência não linear, sendo atribuído à formação de um dímero da enzima.

5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECÍFICA DA UREASE

Após padronizar as condições de temperatura, pH, composição de tampão, concentração do substrato e quantidade de extrato bruto enzimático, procedeu-se a

avaliação da medida da atividade enzimática e específica da enzima livre e microencapsulada.

5.4.1. Atividade enzimática

A atividade enzimática foi expressa em unidades de $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$ nas seguintes condições padronizadas: temperatura de microencapsulação de 27°C , temperatura de incubação de 50°C , pH 5,75, tampão acetato, tempo de incubação de 6 minutos, concentração de uréia de $2 \mu\text{mol/mL}$ e volume de extrato bruto enzimático de 0,1 mL (no caso do EE livre) e uma batelada (para o EE microencapsulado). Algumas experiências com tampão fosfato no pH 6,8 ainda serão discutidas, principalmente as que se referem aos ensaios realizados anteriormente à microencapsulação, pois, conforme discutido na seção 5.1, este tampão provoca um efeito de coalescência nas microcápsulas. Conseqüentemente, não faz parte das condições padrões e será destacado no momento em que for usado.

O método utilizado para determinar a atividade enzimática foi o do fenol-hipoclorito^{16,101}, conforme descrito na seção 4.2.10.

As questões que serão discutidas preliminarmente neste item visam esclarecer duas perguntas:

A presença de outras proteínas além da urease no EE permite a reprodutibilidade da atividade enzimática?

Há uma homogeneidade na quantidade e na atividade do EE contido nas cápsulas que constituem uma batelada?

Reprodutibilidade da atividade enzimática do EE livre

A avaliação da atividade enzimática foi realizada com o EE extraído da semente da abóbora no intervalo de 8 semanas. A hidrólise da uréia foi processada

durante cinco dias consecutivos a partir do dia em que o EE foi extraído. No sexto dia, novamente, procedeu-se a extração do EE. Os valores encontrados estão listados na Tabela 5.

TABELA 5 - Relação das absorvâncias e das quantidades de amônia encontradas na hidrólise da uréia catalisada pelo EE, nas condições padronizadas.

Ordem	Abs	Atividade Enzimática $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$	Ordem	Abs	Atividade Enzimática $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$
1*	0,615	0,082	19	0,604	0,081
2	0,637	0,086	20	0,635	0,085
3	0,663	0,089	21*	0,611	0,081
4	0,684	0,092	22	0,622	0,082
5	0,697	0,094	23	0,613	0,082
6*	0,635	0,085	24	0,642	0,086
7	0,661	0,089	25	0,665	0,089
8	0,631	0,085	26*	0,635	0,085
9	0,606	0,081	27	0,657	0,088
10	0,650	0,087	28	0,601	0,080
11*	0,650	0,087	29	0,627	0,084
12	0,615	0,082	30	0,644	0,086
13	0,664	0,089	31*	0,601	0,080
14	0,626	0,083	32	0,603	0,080
15	0,657	0,088	33	0,637	0,086
16*	0,669	0,090	34	0,627	0,084
17	0,693	0,093	35	0,654	0,088
18	0,684	0,092	36*	0,658	0,088

* Valores determinados no dia em que foi extraído o EE.

Comparando-se os resultados obtidos individualmente observamos reprodutibilidade na quantidade de produto formado na reação catalisada pelo extrato bruto enzimático¹⁰². A precisão dessas determinações foi expressa quantitativamente pelos índices de dispersão listados na Tabela 6.

TABELA 6 - Controle de precisão.

Índices de dispersão	Atividade enzimática $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$
Média (\bar{x})	0,086
Mediana	0,086
Desvio padrão (s)	0,004
Valor máximo	0,094
Valor mínimo	0,081
Amplitude	0,013
Coefficiente de variação (CV)	4,47%

A tendência dos valores encontrados foi avaliada pelo gráfico típico de controle de qualidade, Figura 23, que representa os resultados na seqüência em que foram realizadas as medidas e pela curva de Gauss, Figura 24. A curva de Gauss, também chamada curva de frequência, é a representação gráfica da lei de distribuição normal, isto é, traduz a probabilidade dos valores que se encontrarem distribuídos simetricamente em torno da média.

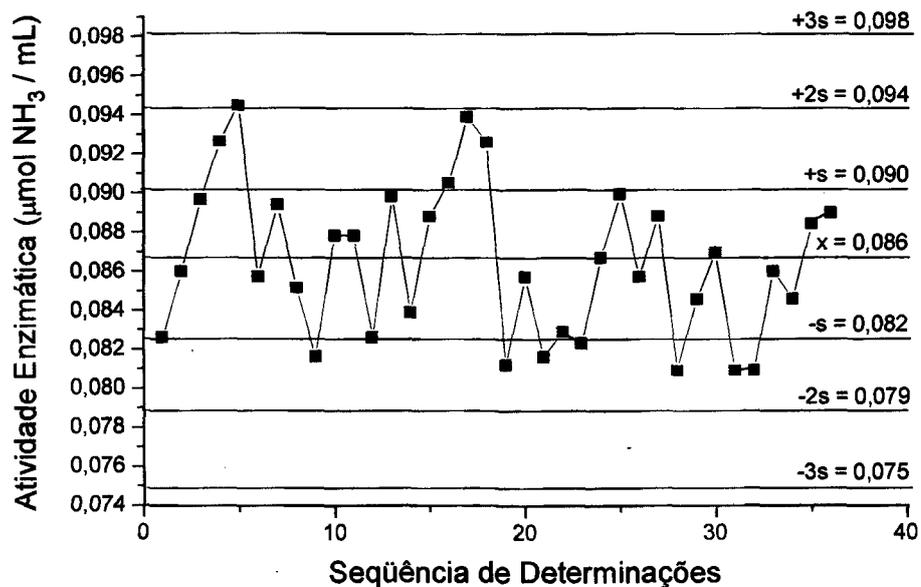


FIGURA 23 - Gráfico de controle de precisão. Determinação da atividade enzimática utilizando-se EE livre.

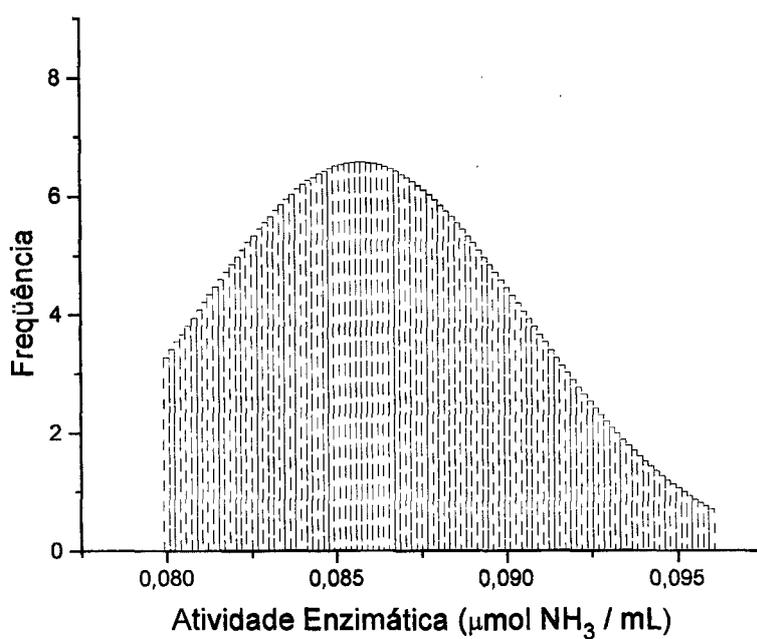


FIGURA 24 - Curva de frequência. Representação dos valores encontrados na determinação do teor de amônia na hidrólise da uréia catalisada pelo EE.

Com base nestes dois gráficos, Figuras 23 e 24, os critérios estatísticos que traduzem a confiabilidade do método e o caracterizam com bom desempenho são os seguintes^{78,79}:

- a maioria dos valores deve se encontrar entre os limites $\bar{x} \pm 2s$,
- metade dos resultados deve estar distribuída de cada lado da média,
- dois terços dos resultados devem estar distribuídos no limite de $\pm 1s$,
- não é aceitável haver cinco valores consecutivos em um mesmo lado da média, e
- dois valores consecutivos não poderão estar além dos limites de $\pm 2s$.

De acordo com estes critérios, pode-se verificar que o teor de uréia pode ser determinado através do extrato bruto enzimático dentro de um limite de confiança de $+2s$ e $-1,25s$.

Homogeneidade de microencapsulação

Para cada batelada de extrato bruto, o número médio de microcápsulas formadas foi em torno de 100. Para verificar a homogeneidade da quantidade e da atividade da enzima nessas cápsulas, a hidrólise da uréia foi realizada utilizando-se o EE de duas maneiras diferentes: na primeira, a catálise foi realizada utilizando-se a mistura de 1 mL de blenda com 0,1 mL de extrato enzimático distribuído aleatoriamente, em igual quantidade, em 10 tubos de ensaio, e, na segunda, foram distribuídas as microcápsulas contendo o EE de uma mesma batelada, também em igual quantidade, em 10 tubos de ensaio diferentes.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 25 e na Tabela 7.

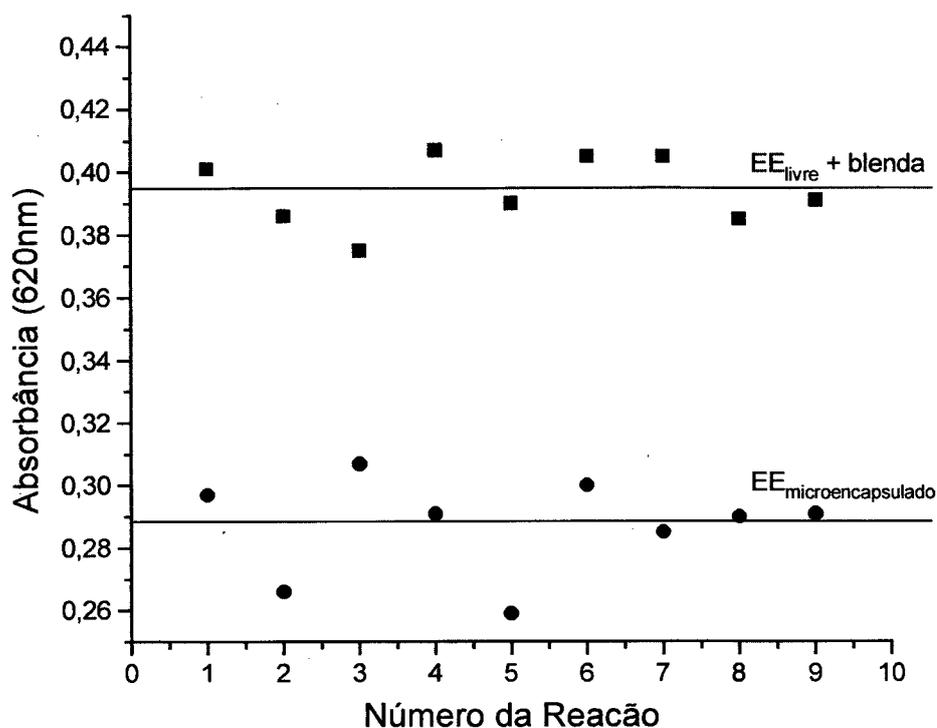


FIGURA 25 - Homogeneidade de microencapsulação ■ hidrólise da uréia catalisada por 1/10 do volume da mistura de 1mL de blenda com 0,1 mL de EE distribuído aleatoriamente. ● hidrólise da uréia catalisada por 10 cápsulas contendo EE retirados de uma mesma batelada.

TABELA 7 - Índice de dispersão para o EE livre com a blenda e para o EE microencapsulado.

Índices de dispersão	Abs ^a EE livre + blenda	Abs ^b EE microencapsulado
	$\lambda = 620\text{nm}$	$\lambda = 620\text{nm}$
Média (\bar{x})	0,394	0,287
Desvio padrão (s)	0,011	0,015
Mediana	0,391	0,291
Coefficiente de variação (CV)	2,86%	5,40%

a) 1/10 Volume da mistura EE + blenda em cada reação. b) 10 microcápsulas contendo EE de uma mesma batelada em cada reação.

Comparando as duas retas obtidas na Figura 25, observa-se que elas apresentam valores de absorbâncias, 0,393 e 0,286, para o EE misturado com a blenda e para o EE microencapsulado, respectivamente. Estes valores são praticamente iguais à média obtida através do tratamento estatístico das 10 medidas nos dois casos. O coeficiente de variação em ambas as experiências indica que a variação encontrada em torno da média está dentro do erro experimental nos dois casos. Isto indica que há uma homogeneidade na quantidade de enzima nas microcápsulas e na sua atividade durante o processo de microencapsulação^{103,104}.

Atividade enzimática

Os valores encontrados para a atividade enzimática da urease na forma de extrato bruto livre e microencapsulado representam, portanto, a média aritmética de uma série de medidas e estão listados na Tabela 8.

TABELA 8 - Atividade enzimática.

Tampão	Enzima	Abs (dil 1:3) $\lambda = 620\text{nm}$	Atividade enzimática $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$
Acetato	EE _{livre}	0,270	0,086
Acetato	EE _{microencapsulado}	0,239	0,069
Acetato	EP _{livre}	0,483	0,192
Acetato	EP _{microencapsulada}	0,249	0,071
Fosfato	EE _{livre}	0,451	0,185
Fosfato	EP _{livre}	0,488	0,205
Acetato	EE _{livre} + blenda	0,270	0,086
Acetato	EP _{livre} + blenda	0,189	0,041

Tampão acetato, pH 5,75. Tampão fosfato, pH 6,8.

Nesta Tabela, estão listadas as atividades enzimáticas:

- da EP tipo III na forma livre e microencapsulada, nas mesmas condições já padronizadas para o EE;
- do EE e da EP tipo III na forma livre, em tampão fosfato;
- do EE e da EP expostos na blenda pelo tempo de 1 hora nas condições padronizadas para o EE.

O EE microencapsulado, quando comparado com o EE livre, nas condições em que a mistura reacional é incubada imediatamente após a adição dos reagentes (tampão, enzima e substrato), manteve a atividade em 80%, atingindo o índice de 100 % ao deixar as cápsulas em contato com os reagentes durante 20 minutos, conforme será apresentado e discutido na seção 5.6. Na forma pura, a urease microencapsulada manteve a atividade em torno de 37% no pH 5,75.

Os valores reportados na literatura para a atividade da EP imobilizada covalentemente, utilizando-se agentes reticuladores, como glutaraldeído ou íons metálicos, variam entre 20% e 94%^{13,30,61,105-107} quando comparados com a enzima livre, portanto, inferiores aos encontrados neste trabalho para o EE.

No entanto, esses valores são superiores aos encontrados para a EP, Tabela 8. Tais resultados podem ser atribuídos ao fato de que as condições de microencapsulação não foram otimizadas para a EP e sim para o EE.

Em tampão fosfato, o EE livre e a EP livre apresentaram atividade maiores que em tampão acetato. O efeito do tampão nas reações catalisadas pela urease é freqüentemente ressaltado pela literatura^{19,108-110} e o tampão fosfato pH 7,0 tem sido o mais usado nas reações de hidrólise da uréia^{20,30,55,61,64,111}, contudo, devido a coalescência, este tampão não foi utilizado no processo de microencapsulação, conforme discutido anteriormente.

A presença da blenda afeta a atividade da EP devido ao fato de ela ter sido ajustada a um pH muito próximo do pH ótimo do EE e não da EP, conforme será apresentado na seção 5.5.2.

5.4.2. Atividade específica

Objetivando a determinação do número de unidades enzimáticas existentes na massa protéica extraída da semente de abóbora, procedeu-se a determinação da atividade específica do EE na forma livre e microencapsulada.

A atividade específica é definida pela relação entre a atividade enzimática e a quantidade de proteína expressa em mg de proteína/mL, conforme a Equação 7⁷¹.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\mu \text{ mol NH}_3 / \text{mL}}{\text{mg de proteína} / \text{mL}} \quad (\text{Equação 7})$$

O teor de proteína encontrado para o EE livre nas condições descritas na seção 4.2.11., p.37, foi 0,066 mg/mL, a atividade enzimática 0,086 $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$ e, sendo a atividade específica 1,30 $\mu\text{mol NH}_3/\text{mg}$, isto é, 2,13 $\mu\text{mol NH}_3/\text{mg}/\text{min}$ em cada 1 mL de EE.

O teor de proteína do EE microencapsulado foi determinado nas condições A, B e C, p. 38, apresentadas na seção 4.2.11, e os valores encontrados estão listados na Tabela 9.

TABELA 9 - Determinação do teor de proteína no EE microencapsulado.

Condições	Atividade enzimática $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL} (10^3)$	Teor de proteína $\text{mg}/\text{mL} (10^3)$
A	69	16
B	69	38
C	69	51

Os resultados de teor de proteína apresentados na Tabela 9 não significam uma perda de massa protéica. O baixo valor apresentado na condição A, quando comparado com as condições B e C, pode ser atribuído a uma oclusão do complexo

pelo polímero. Tal afirmação é também baseada na observação visual de que, à medida em que o polímero sedimentava, havia um arraste do complexo a um ponto em que a solução sobrenadante perde a coloração. Isto foi melhor evidenciado quando foi determinado o teor de proteína do EE livre na presença de blenda, apresentando um valor de 0,017 mg/mL, muito próximo daquele obtido na condição A.

Por outro lado, observa-se que o maior valor encontrado, 0,051 mg/mL, corresponde a uma situação em que as cápsulas foram previamente destruídas e o material polimérico foi retirado antes da adição dos reativos, aproximando-se do teor de proteína encontrado para o EE livre realizado nas mesmas condições.

A solução coagulante, onde foram obtidas as cápsulas, foi dosada para proteína e constatou-se que o encapsulado manteve-se na cápsula já que nenhuma proteína foi detectada nesta solução.

O que se conclui é que não procede o cálculo da atividade específica para o EE microencapsulado, uma vez que os valores encontrados para o teor de proteína não são representativos da quantidade total de proteína presente nas microcápsulas, devido à oclusão do complexo ou dos reativos pela massa polimérica.

5.5. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA UREASE LIVRE E MICROENCAPSULADA

5.5.1. Efeito da temperatura

Para analisar se o EE é sensível à temperatura ou admite uma faixa de temperatura, a mistura reacional, solução de uréia tamponada e enzima, foi incubada a temperaturas variadas entre 20°C e 70°C. As reações foram realizadas com 2 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia no pH 5,75 com tampão acetato e no pH 6,8 com tampão fosfato; todos os outros fatores foram mantidos constantes. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 26 (a) e 26 (b).

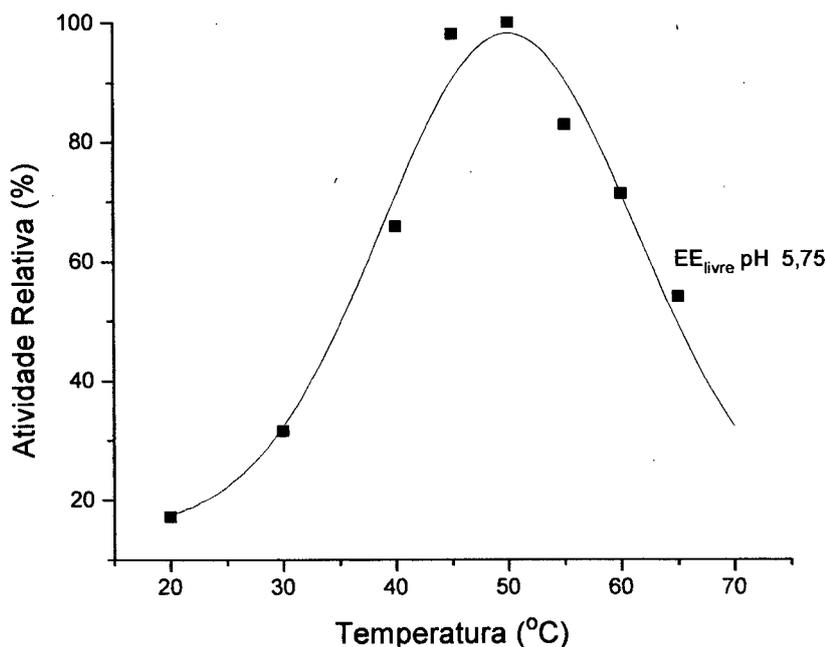


FIGURA 26 (a) - Efeito da temperatura sobre o EE livre em tampão acetato pH 5,75.

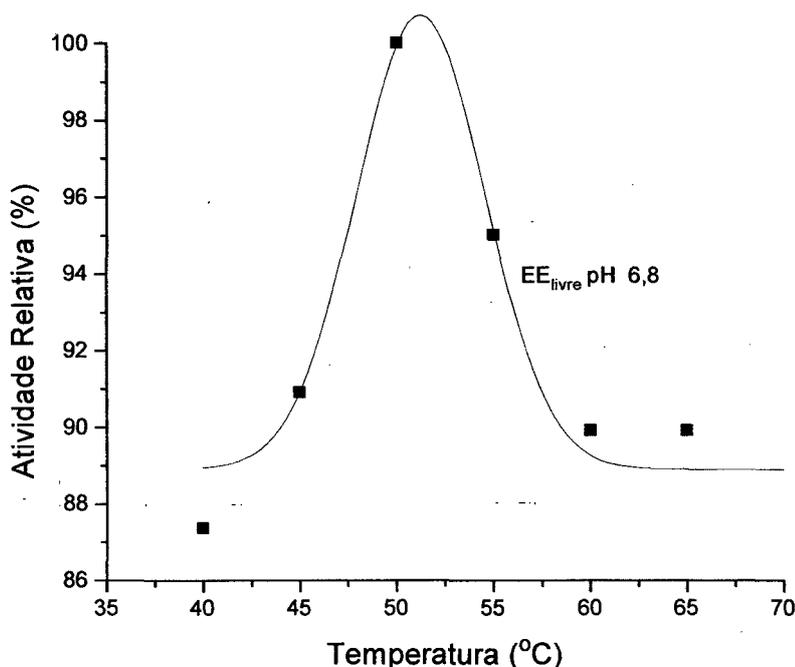


FIGURA 26 (b) - Efeito da temperatura sobre o EE livre em tampão fosfato pH 6,8.

A temperatura ótima do EE livre nos dois pH's foi em torno de 50°C. Observa-se que a estabilidade da enzima é maior no tampão fosfato pH 6,8, Figura 26 (b). A desnaturação nesse pH foi no máximo 10% em relação à temperaturas de 45°C e 65°C, enquanto que com o tampão acetato, Figura 26 (a), a desnaturação foi em torno de 40% na temperatura de 40°C e de 50% na temperatura de 65°C.

O efeito da temperatura no EE microencapsulado foi analisado na faixa de temperatura de 20°C a 80°C, Figura 27 (a). O tampão utilizado foi o acetato pH 5,75. A temperatura ótima para o EE microencapsulado foi em torno de 60°C. A urease contida no EE microencapsulado suporta uma variação de temperatura mais ampla: entre 50°C e 70°C, a desnaturação da enzima é de aproximadamente 10%. O EE livre apresenta uma temperatura ótima de 50°C e uma menor estabilidade: entre 40°C e 60°C a desnaturação é de aproximadamente 40%.

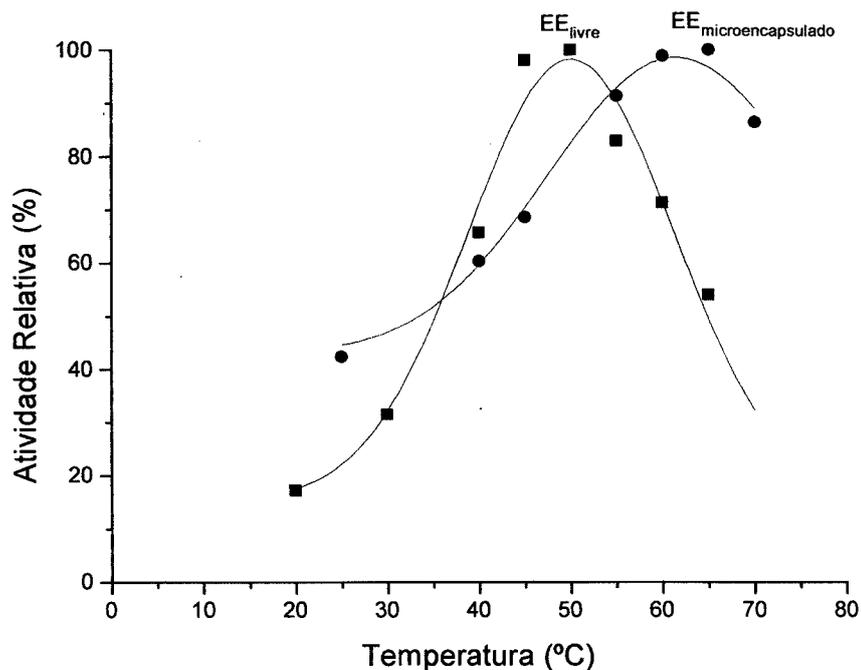


FIGURA 27 (a) - Efeito da temperatura sobre o EE livre e microencapsulado em tampão acetato pH 5,75.

Para efeito de comparação, o mesmo procedimento foi realizado com a enzima padrão da Sigma tipo III, livre e imobilizada, no intervalo de 0°C a 80°C, Figura 28 (a). Como pode ser visto, a EP livre apresenta o máximo de atividade na temperatura de 60°C, enquanto que para a EP microencapsulada esse máximo encontra-se na temperatura de 50°C.

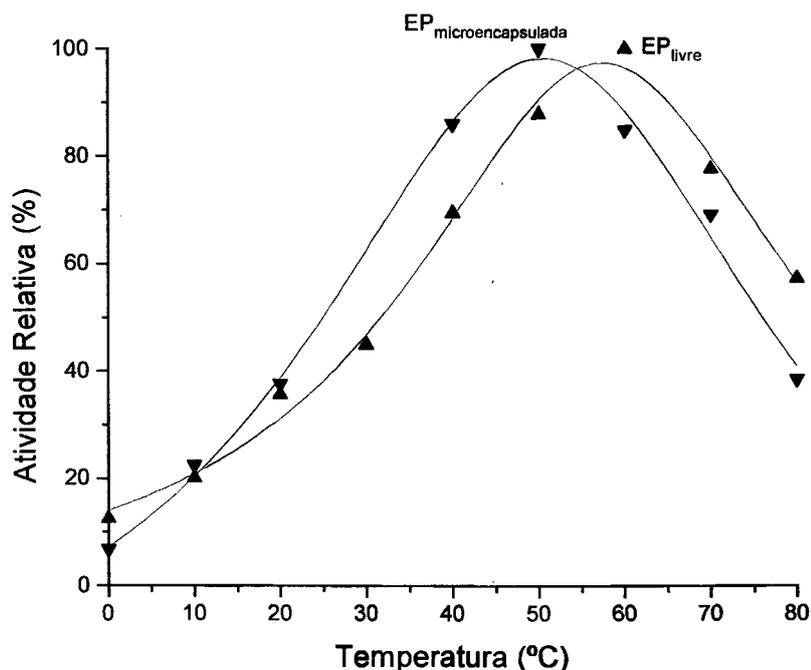


FIGURA 28 (a) - Efeito da temperatura sobre a EP livre e microencapsulada em tampão acetato pH 5,75.

Analisando os dois gráficos apresentados, observa-se que para o EE a microencapsulação provoca um deslocamento de + 10°C na temperatura ótima, Figura 27 (a), e para a EP esse deslocamento é de -10°C quando a urease é microencapsulada, Figura 28 (a).

Esse deslocamento da temperatura ótima da EP e do EE, observado após o processo de microencapsulação, pode ser atribuído a difusão da EP nas paredes da microcápsula, tornando-a mais exposta e mais suscetível a desnaturação com o calor, o que não acontece com o EE que se encontra totalmente contido no núcleo da microcápsula, Figura 15, conforme discutido na seção 5.2.

O aumento da atividade com o aquecimento até a temperatura ótima está presente no gráfico de Arrhenius, nas Figuras 27 (b) e 28 (b).

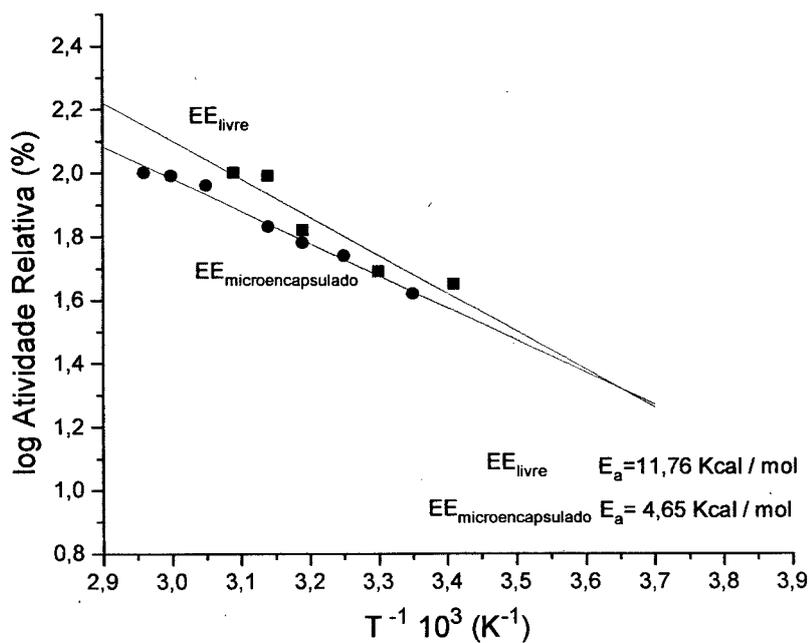


FIGURA 27 (b) - Gráfico de Arrhenius para o EE livre e microencapsulado

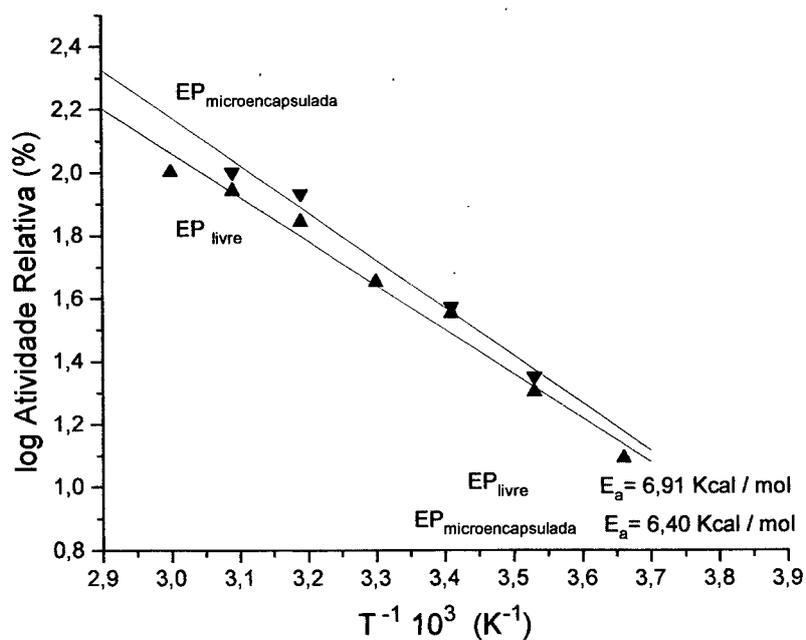


FIGURA 28 (b) - Gráfico de Arrhenius para a EP livre e microencapsulada.

Os gráficos são lineares e os valores das energias de ativação foram calculados através da equação de Arrhenius, Equação 8. O gráfico de $\log k$ versus $1/T$ fornece uma reta cuja inclinação é $-E_a / 2,303 R$.

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \text{constante} \quad (\text{Equação 8}),$$

Na Equação 7, k é a constante de velocidade, E_a é a energia de ativação de Arrhenius, R a constante dos gases e T a temperatura absoluta¹¹². Os valores calculados da energia de ativação estão listados na Tabela 10.

TABELA 10 - Energia de ativação para a urease livre e microencapsulada.

Enzima	E_a Kcal/mol
EE livre	11,76
EE microencapsulado	4,65
EP livre	6,91
EP microencapsulada	6,40

Tampão utilizado: acetato pH 5,75

A diminuição da energia de ativação para a enzima microencapsulada sugere que o método de imobilização não altera a estrutura da molécula da urease^{66,113,114}. A baixa energia de ativação do EE microencapsulado, com um conseqüente aumento da catálise enzimática em relação à livre, pode ser atribuída a uma menor dispersão da urease no volume total do meio reacional, aumentando a probabilidade de haver colisão eficaz entre as moléculas do substrato e da enzima.

5.5.2. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi estudado para o EE livre e microencapsulado na faixa de pH 3,5 a 8,0. A reação de hidrólise de 2,0 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada durante 6 minutos de incubação a 50°C, Figura 29.

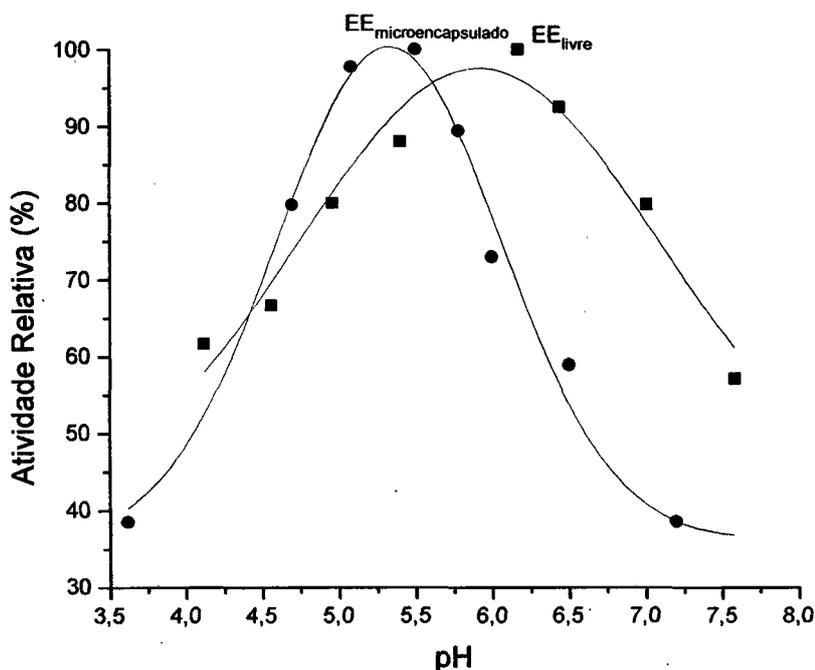


FIGURA 29 - Efeito do pH sobre o EE livre e microencapsulado. A reação de hidrólise de 2,0 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada durante 6 minutos de incubação a 50°C.

A curva de dependência de pH mostra um pH ótimo para o EE livre em torno de 6,0; abaixo ou acima desse pH ocorre um decréscimo acentuado da atividade, Figura 29.

Conforme apresentado na Tabela 4, o pH inicial da blenda utilizada no processo de microencapsulação foi em torno de 4. Tendo em vista que neste pH o EE sofre desnaturação em torno de 40%, Figura 29, o pH da blenda foi ajustado a 5,8 antes de microencapsular o EE. Esse pH foi o mais próximo possível do pH

ótimo do EE livre, de forma que não ocorresse precipitação da QTS na emulsão polimérica, cujo pK é em torno de 6,0.

A enzima imobilizada apresentou um máximo num pH mais baixo, em torno de 5,0. Em torno de 5,8, as curvas, para o EE livre e imobilizado, apresentaram a mesma atividade relativa e sofreram o mesmo percentual de desnaturação. Abaixo desse pH, a desnaturação da enzima livre foi mais pronunciada e acima, o decréscimo da atividade foi maior para o EE microencapsulado, Figura 29.

O efeito do pH também foi estudado para a EP tipo III livre e microencapsulado na faixa de pH de 4,0 a 8,0. A reação de hidrólise de 2,0 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada durante 6 minutos de incubação a 50°C, Figura 30.

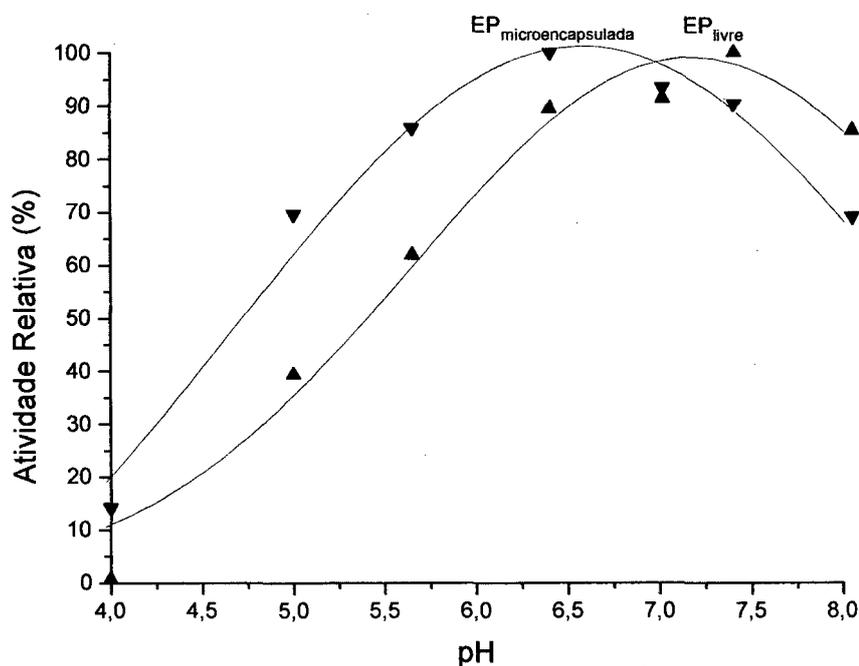


FIGURA 30 - Efeito do pH sobre a EP livre e microencapsulada. A reação de hidrólise de 2,0 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada durante 6 minutos de incubação a 50°C.

O mesmo comportamento foi observado para a EP livre quando comparada com a imobilizada, sendo que os valores de pH ótimo situam-se numa escala de menor acidez: para a EP livre foi em torno de 7,0, e para a microencapsulada em torno de 6,0, Figura 30.

Nos dois casos, a efetividade da enzima imobilizada é mostrada a medida que a microcápsula protege para pH's mais ácidos.

Nas Figuras 29 e 30, observa-se que a desnaturação da urease contida no EE é no máximo de 60% nos extremos de pH estudado, e para a EP essa desnaturação é de quase 100% no pH mais ácido.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura em que para a urease imobilizada ocorre um aumento da estabilidade para pH's mais baixos^{30,55,61,64}.

O deslocamento da curva de pH para a região mais ácida pode ser atribuído à característica de polieletrólito do suporte. A QTS, por ser um polieletrólito catiônico¹¹⁵, induzirá uma distribuição desigual de íons hidrogeniônicos entre a fase polieletrólito, na qual a enzima está imobilizada, e a solução externa. Conseqüentemente, a enzima imobilizada no suporte carregado apresentará uma concentração hidrogeniônica mais baixa³³.

5.5.3. Parâmetros cinéticos

A afinidade entre o EE, livre e microencapsulado, e o substrato foi medida através da constante de Michaelis-Menten, K_m .

Para o EE livre e microencapsulado, K_m foi determinada em tampão acetato no pH 5,75. Os valores encontrados das absorbâncias máximas estão listados na Tabela 11.

TABELA 11- Medida das absorvâncias máximas da reação de hidrólise de 2 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia, incubada por 6 minutos a 50°C, catalisada pelo EE livre e microencapsulado em função da concentração do substrato.

EE livre				EE microencapsulado			
[Uréia]	Abs _{máx}	[Uréia] ⁻¹	Abs _{máx} ⁻¹	[Uréia]	Abs _{máx}	[Uréia] ⁻¹	Abs _{máx} ⁻¹
$\mu\text{mol/mL}$	620nm	1/ $\mu\text{mol/mL}$	620nm	$\mu\text{mol/mL}$	620nm	1/ $\mu\text{mol/mL}$	620nm
0.10	0.125	10.00	8.000	0,00	0,000	--	--
0.16	0.167	6.25	5.988	0,10	0.190	--	--
0.20	0.192	5.00	5.208	0,15	0.319	0.66	3.130
0.25	0.212	4.00	4.717	0,20	0.488	0.50	2.049
0.30	0.244	3.33	4.098	0,21	0.430	0.48	2.325
0.35	0.277	2.85	3.610	0,30	0.559	0.33	1.789
0.50	0.313	2.00	3.190	0,42	0.752	0.24	1.329
1.00	0.446	1.00	2.240	0,56	0.793	0.18	1.260
1.20	0.496	0.83	2.016	0,62	0.903	0.16	1.107
1.60	0.556	0.62	1.798	0,70	0.876	0.14	1.141
2.00	0.633	0.50	1.579	0,80	0.870	0.12	1.149
2.40	0.667	0.42	1.499				
3.60	0.735	0.28	1.360				

A equação matemática que define a relação quantitativa entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato é a Equação 9 de Michaelis-Menten¹¹⁶.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde V representa a velocidade da reação, V_m a velocidade máxima, [S] a concentração inicial do substrato e K_m a constante de Michaelis-Menten.

As reações de hidrólise da uréia catalisada pelo EE livre, Figura 31 (a), e pelo EE microencapsulado, Figura 32 (a), foram acompanhadas através da leitura das absorbâncias máximas, que correspondem as velocidades máximas; as curvas hiperbólicas seguem a Equação 9 de Michaelis-Menten.

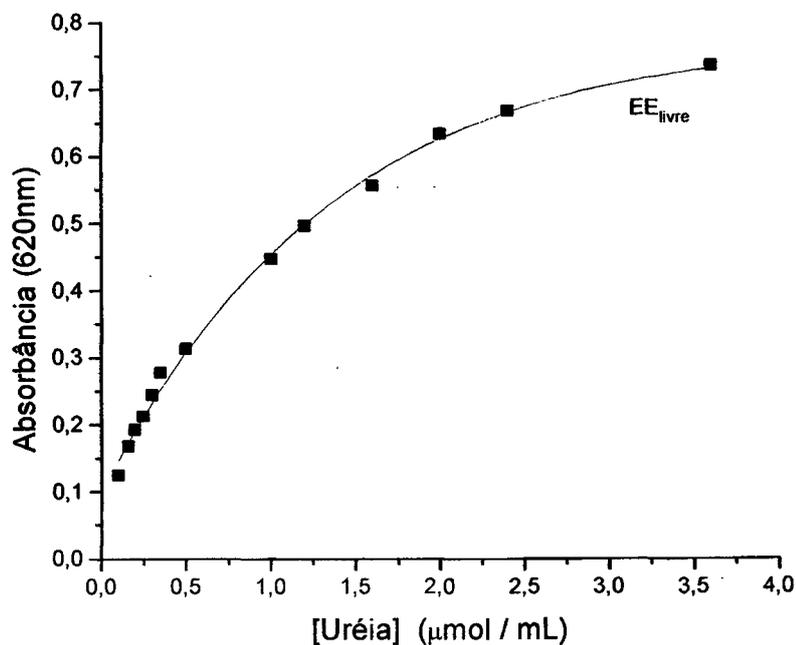


FIGURA 31 (a) - Absorbância máxima da reação de hidrólise da uréia, em tampão acetato pH 5,75, pelo EE livre em função da concentração do substrato, incubada durante 6 minutos a 50°C.

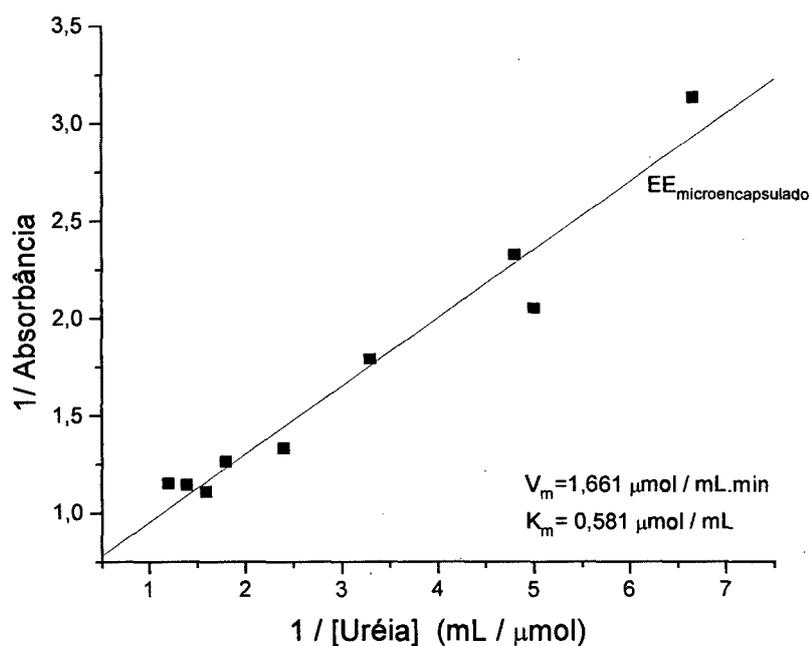


FIGURA 32 (a) - Absorbância máxima da reação de hidrólise da uréia, em tampão acetato pH 5,75, pelo EE microencapsulado em função da concentração do substrato, incubada durante 6 minutos a 50°C.

Observa-se que para baixas concentrações de substrato a cinética é de primeira ordem. À medida que aumenta a concentração a velocidade torna-se independente da concentração da uréia, sendo a cinética de ordem zero.

A Equação 9 pode ser transformada algebricamente em outras formas que são mais úteis na obtenção de dados experimentais. Uma transformação freqüente é deduzida substituindo-se os valores inversos em ambos os lados na equação de Michaelis-Menten, obtendo-se a equação de Lineweaver-Burk, Equação 10¹¹⁶.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{Equação 10})$$

Quando $1/V$ for posto em um gráfico contra $1/[S]$, obtém-se uma linha reta cuja a interseção será $1/V_m$ e a inclinação K_m/V_m , sendo que K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato e, portanto, torna-se um parâmetro importante nas reações enzimáticas.

Os parâmetros cinéticos obtidos para o EE livre e imobilizado estão presentes nas Figuras 31 (b) e 32 (b), como gráfico de Lineweaver-Burk, e listados na Tabela 12.

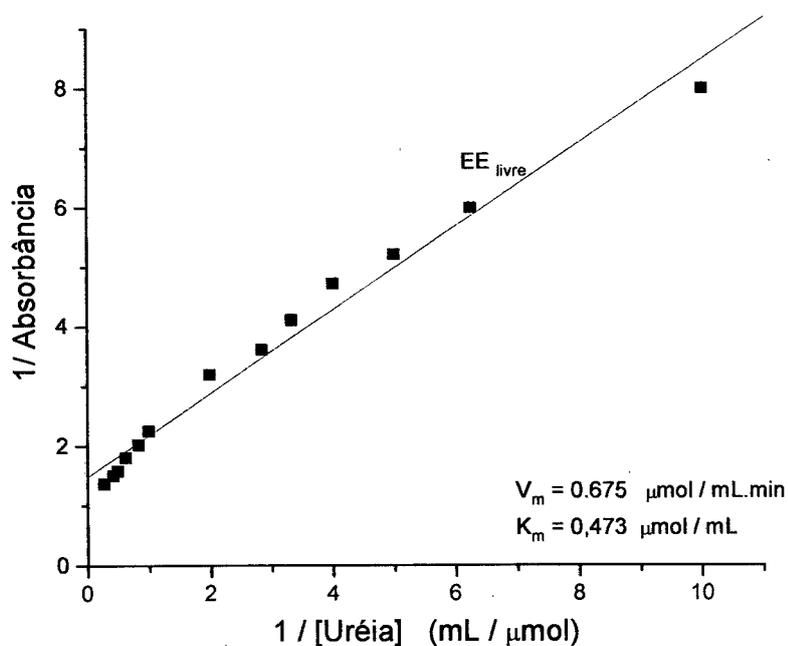


FIGURA 31 (b) - Gráfico de Lineweaver-Burk, $1/\text{Abs}_{\text{máx}}$ versus $1/[\text{Uréia}]$, para o EE livre.

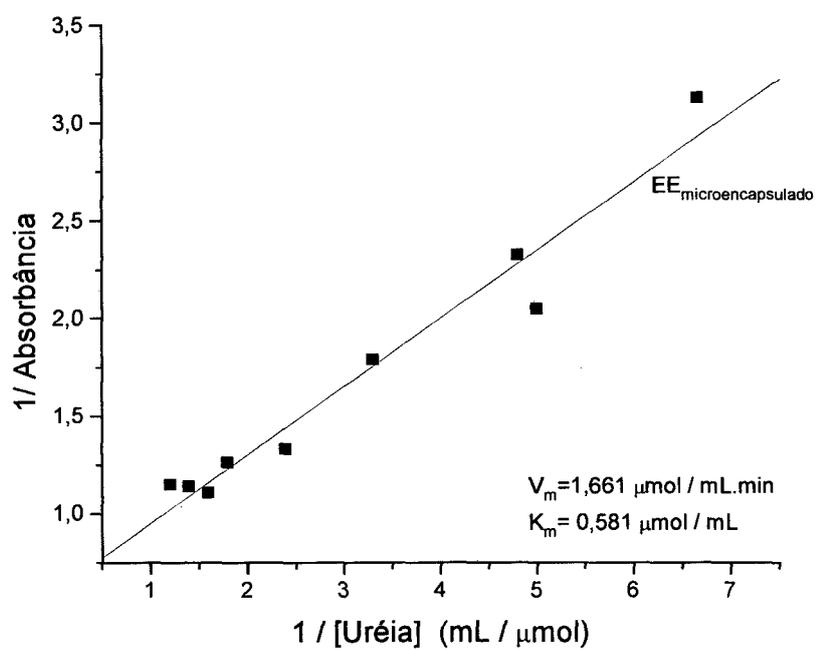


FIGURA 32 (b) - Gráfico de Lineweaver-Burk, $1/\text{Abs}_{\text{máx}}$ versus $1/[\text{Uréia}]$, para o EE imobilizado.

TABELA 12 - Parâmetros cinéticos para o EE livre e microencapsulado.

Parâmetros cinéticos	EE livre	EE microencapsulado
$K_m \mu\text{mol}/\text{mL}$	0,473	0,581
$V_m \mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$	0,675	1,661

A natureza linear do gráfico dos inversos mostra que a variação da concentração de uréia examinada para ambas, enzima livre e microencapsulada, segue a cinética de Michaelis-Menten .

EE microencapsulado exhibe um valor de K_m 1,23 vezes maior e de V_m 2,5 vezes mais alto do que o EE livre. O aumento de K_m e de V_m após a imobilização, foi observado por diversos pesquisadores^{62,88,113,117-119}. Krajewska, no processo de imobilização da urease ligada covalentemente ao suporte, observou que K_m apresentou um aumento de cerca de 5 vezes, após a imobilização⁶¹. Krajewska justifica o aumento da constante de Michaelis em função de alterações estruturais de enzima durante o processo de imobilização^{61,64}.

Neste trabalho, o pequeno aumento de K_m de 1,23 vezes pode ser atribuído à dificuldade do acesso do substrato aos sítios ativos da enzima microencapsulada causada pela espessura da parede da cápsula, gerando uma resistência difusional do substrato, também observado por Ikada⁵⁹, Mogensen e Vieth¹²⁰.

5.5.4. Controle de estoque e vazamento

A estabilidade apresentada e discutida nesse item se refere a manutenção da atividade do EE livre e microencapsulado quando estocados a 4°C e a -4°C.

A Figura 33 mostra o comportamento do EE e da EP armazenados a 4°C. O EE microencapsulado foi estocado em 25 mL de solução de sulfato de sódio 10% (p/v).

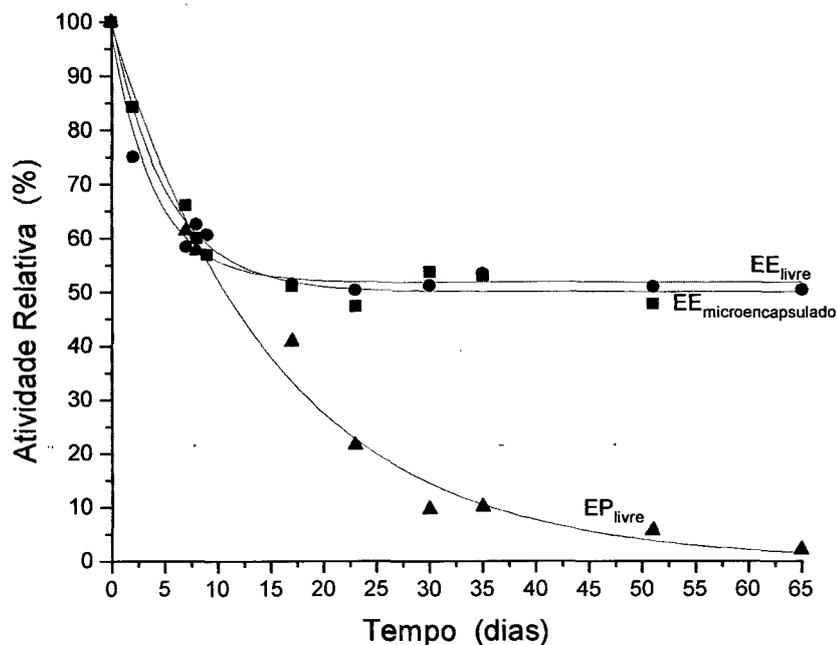


FIGURA 33 - Estabilidade da urease a 4°C. A reação de hidrólise de 2 $\mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada em tampão acetato pH 5,75, durante 6 minutos de incubação a 50°C.

Observa-se, na Figura acima que no período de 65 dias, tanto o EE livre como o microencapsulado mantêm suas atividades em 50%, quando estocados a 4°C, na geladeira, enquanto que a EP livre desnatura nesse mesmo período em 100 %.

A estabilidade do EE livre e microencapsulado armazenados a -4°C, no congelador, também foi estudada por um período de 19 dias. O EE microencapsulado foi estocado na ausência de solução de sulfato de sódio, Figura 34.

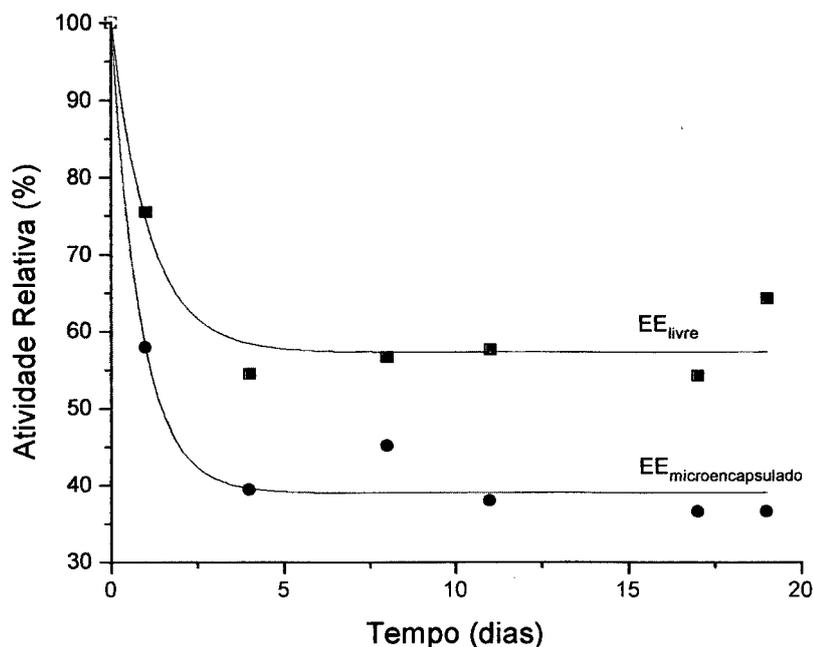


FIGURA 34 - Estabilidade da urease a -4°C . A reação de hidrólise de $2\ \mu\text{mol/mL}$ de uréia foi realizada em tampão acetato pH 5,75, durante 6 minutos de incubação a 50°C .

Quando os EE livre e imobilizado foram armazenados a -4°C , observou-se que o EE microencapsulado perde mais rapidamente seu poder catalítico. Em menos de 5 dias a atividade decaiu em 60%, enquanto que para o EE livre, no período de 19 dias, não parece fazer diferença armazená-lo a $+4^{\circ}\text{C}$ ou -4°C , Figuras 33 e 34, uma vez que em ambos os casos houve perda de atividade de 50%.

O controle de vazamento foi acompanhado durante o período de 65 dias em que as soluções de Na_2SO_4 , onde estavam armazenadas as microcápsulas, foram dosadas para amônia e para proteína e constatou-se que não houve vazamento do EE, uma vez que nenhuma proteína foi detectada na solução e o teste para atividade enzimática nessa solução apresentou um resultado negativo.

5.6. TEMPO DE CONTATO DA ENZIMA COM O SUBSTRATO

As velocidades de permeação do substrato e do produto durante a reação de hidrólise da uréia foram analisadas através da variação do tempo de contato da enzima com o substrato a pH 5,75 antes da mistura reacional ser incubada. Esse mesmo procedimento foi feito com o EE microencapsulado. Os resultados encontrados estão representados na Figura 35.

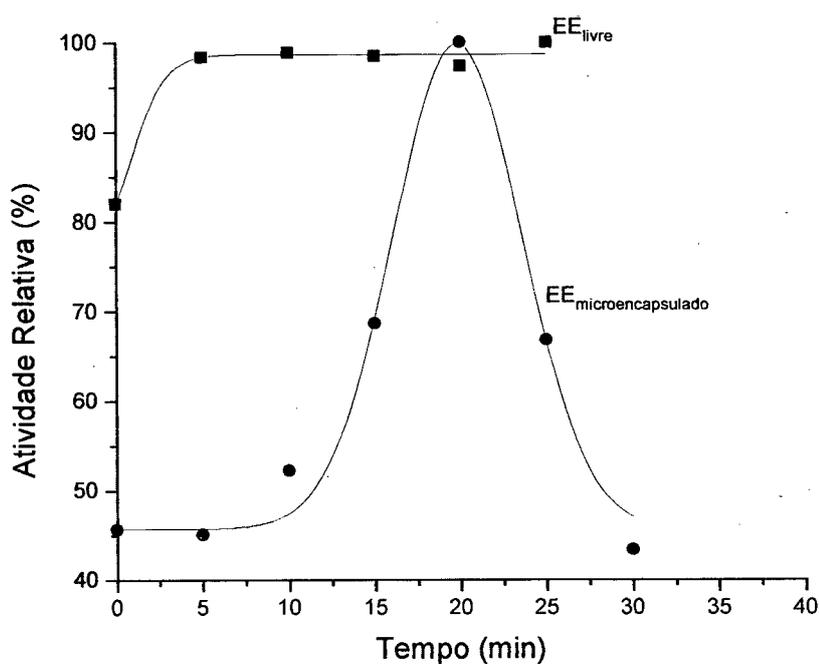


FIGURA 35 - Tempo de contato antes da incubação para a reação da hidrólise da uréia com o EE livre e microencapsulado.

Quando não houve espera entre a adição da enzima ao substrato e o tempo de incubação, a atividade enzimática do EE microencapsulado foi de 80% em relação ao EE livre, Tabela 8. Contudo, quando na reação catalisada pela urease, o tempo antes da etapa de incubação foi variado, e observou-se que em 20 minutos, Figura 35, tanto o EE livre como microencapsulado apresentam a mesma atividade.

Este resultado foi confirmado quando repetiram-se as determinações das atividades em valores absolutos, após 20 minutos de contato do substrato com o EE livre e com EE microencapsulado logo após a extração. Os valores encontrados para as absorvâncias foram 0,262 para o EE livre e 0,264 para o EE microencapsulado.

A parte ascendente da curva, mostrada na Figura 35, para o EE imobilizado pode ser atribuída ao tempo em que o substrato e o produto levam para permear através da parede da microcápsula. A partir de 20 minutos, a atividade enzimática do EE microencapsulado diminui. Esse comportamento pode ser atribuído a um efeito de inibição da urease devido a concentração do EE dentro do núcleo, que é maior quando comparada com o EE livre.

Para a determinação da atividade do EE livre, 0,1 mL do extrato permanece homogeneamente distribuído no volume total de 0,5 mL (0,1ml de substrato, 0,3 de tampão e 0,1 da enzima) ou 500 mm^3 e se mantém constante durante todo o tempo da reação, enquanto que o mesmo volume 0,1 mL de extrato enzimático, quando imobilizado, é distribuído em aproximadamente 100 cápsulas e está aprisionado dentro do núcleo, Figura 15. O volume ocupado por uma microcápsula foi calculado a partir do diâmetro do encapsulado, $1370 \mu\text{m}$, e apresentou o valor aproximado de $1,34 \text{ mm}^3/\text{cápsula}$. O número médio de cápsulas formadas com 1 mL de blenda era 100, portanto 0,1 mL de EE imobilizado ocupa o volume total em torno de 134 mm^3 . Esse efeito de inibição também foi observado quando foi aumentada a concentração de EE livre, conforme Figura 22^{102,121}.

A atividade da EP, livre e microencapsulada, também foi estudada em função do tempo de contato. Os resultados encontrados apresentaram um comportamento semelhante ao EE livre, Figura 36.

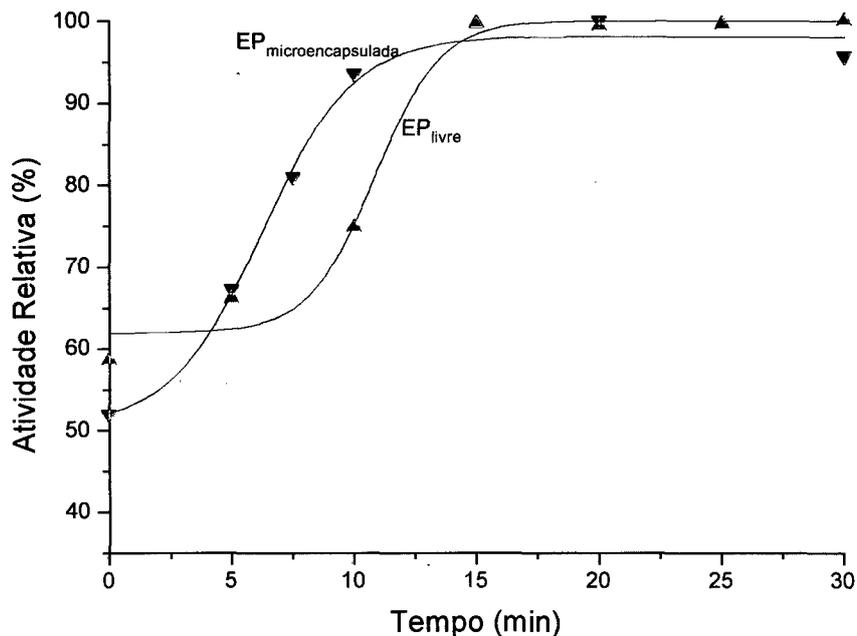


FIGURA 36 - Tempo de contato antes da incubação para a reação da hidrólise da uréia com a EP livre e microencapsulada.

Nesse caso, não se observa um efeito inibitório. Como era esperado, após um tempo de reação, as atividades tanto para a EP livre como para EP microencapsulada permanecem constantes. Essa diferença no comportamento das curvas nas Figuras 35 e 36 pode ser atribuída ao fato de que a EP quando microencapsulada, conforme apresentado na seção 5.5.2., está dispersa nas paredes da microcápsula, portanto, mais acessível ao substrato.

5.7. REUSO

Duas grandes dificuldades das reações catalisadas por enzimas ocorreram em função da perda da sua capacidade catalítica e da impossibilidade de separação do catalisador do meio reacional. Estas dificuldades foram superadas a medida que se desenvolveu um modelo no qual uma mesma batelada de EE microencapsulado pode ser separada do meio reacional e pode ser reutilizada conforme mostrado na Figura 37.

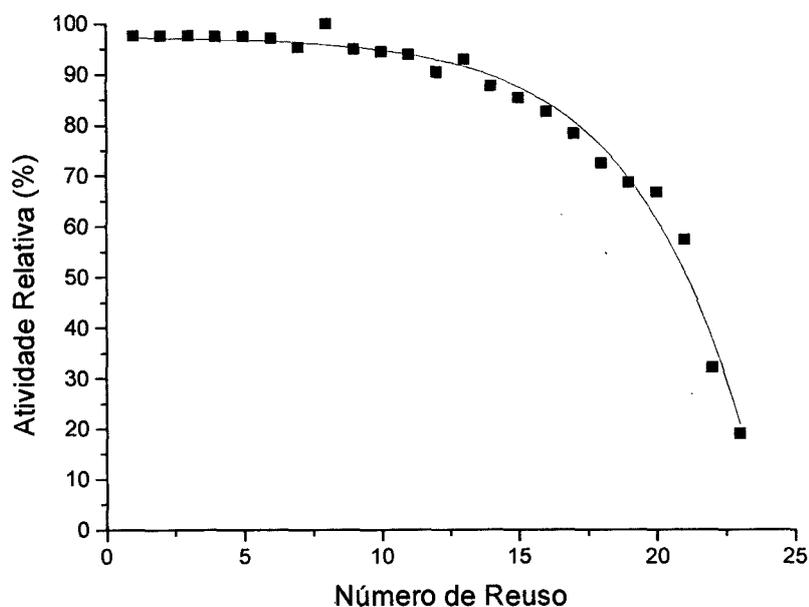


FIGURA 37 - Decaimento da atividade de uma batelada de EE microencapsulado em função do número de vezes utilizada.

As mesmas cápsulas contidas em uma solução coagulante puderam ser utilizadas por 23 vezes, mantendo 90% da atividade após 14 reutilizações¹²¹. Esse resultado é superior aos encontrados por outros autores que imobilizaram urease em membrana de quitosana, onde após 9 reusos ocorreu um decréscimo da

atividade em torno de 10% após cada utilização⁶¹, e após 17 reusos com perda de 40% da atividade⁶⁴.

5.8. ENSAIO *IN VITRO*

A realização dos ensaios clínicos se deu em duas etapas. Na primeira, objetivava-se a verificação da precisão e da exatidão da metodologia e do processo analítico empregado e, na segunda, procedeu-se a análise do teor de uréia na urina e no sangue de dois pacientes.

5.8.1. Controle de qualidade

A exatidão e a precisão dos resultados foram avaliadas através de medidas realizadas com o EE microencapsulado usando dois soros controle, o tampão acetato pH 5,75 e uma solução padrão de uréia com concentração conhecida, igual a 60 mg/dL.

A dosagem do teor de uréia presente nos soros controle foi realizada conforme o procedimento descrito na seção 4.2.15. e os resultados das medidas foram calculados através da relação entre as absorvâncias da amostra e do padrão, de acordo com a Equação 11, e expressos em mg/dl^{22,23} nas Tabelas 13 e 15.

$$C_{\text{uréia}} = \frac{\text{Absorbância da Amostra } (A_n)}{\text{Absorbância do Padrão } (P_n)} \times 60 \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \quad (\text{Equação 11})$$

O grau de concordância dos resultados individuais, dentro da série de medidas do teor de uréia no soro 1 e no soro 2 com o EE microencapsulado, foram expressos quantitativamente por meio dos índices de dispersão listados nas Tabelas 14 e 16. A significância do método foi avaliada pelo teste-t de Student e a tendência dos valores encontrados foi avaliada também pelo gráfico típico de

controle de qualidade (Figuras 38 e 39), que representam os resultados na seqüência em que foram realizadas as medidas.

TABELA 13 - Relação das absorbâncias e das quantidades de uréia encontradas no soro controle 1. Análises realizadas com o EE microencapsulado.

Seqüência das determinações	Abs Amostras	Abs Padrão	Teor de uréia mg/dL
1	0,321	0,362	53,204
2	0,342	0,362	56,685
3	0,594	0,637	55,949
4	0,507	0,637	47,755
5	0,574	0,637	54,065
6	0,594	0,615	55,902
7	0,574	0,615	56,000
8	0,577	0,640	54,093
9	0,479	0,566	50,777
10	0,572	0,618	55,533
11	0,357	0,388	55,206
12	0,503	0,604	49,966
13	0,476	0,491	58,167
14	0,479	0,491	58,533

TABELA 14 - Índices de dispersão das dosagens realizadas no soro controle 1 obtido da Control-Lab, lote nº D 10.

Índice de dispersão	Teor de uréia, mg/dL	
	Valores medidos	Valores referências
Média (\bar{x})	54,430	—
Valor verdadeiro (μ)	—	54,0
Desvio padrão (s)	3,102	2,7
Valor máximo	58,533	56,7
Valor mínimo	47,755	51,3
Amplitude (A)	10,778	5,4
Coefficiente de variação (CV)	5,699%	5,1%
Nº de Medidas (n)	14 dosagens	—

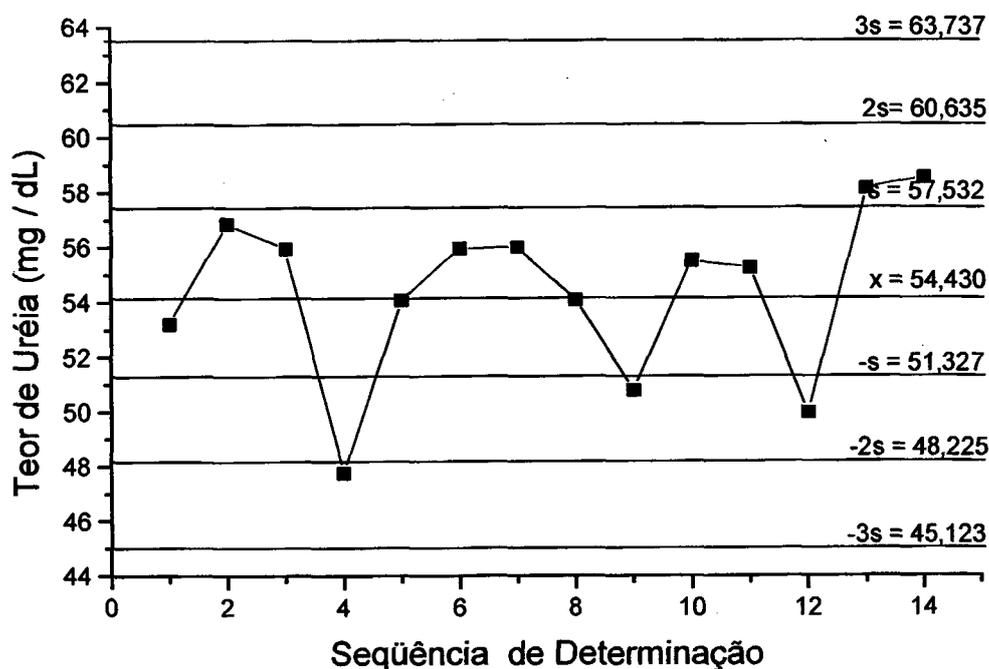


FIGURA 38 - Gráfico de controle de qualidade - Determinação do teor de uréia no soro controle 1 utilizando o EE microencapsulado.

TABELA 15 - Relação das absorvâncias e das quantidades de uréia encontradas no soro controle 2. Análises realizadas com o EE microencapsulado.

Seqüência das determinações	Absorbâncias amostras	Absorbâncias padrão	Teor de uréia mg/dL
1	0,330	0,409	48,411
2	0,292	0,409	42,836
3	0,312	0,409	45,770
4	0,322	0,409	47,237
5	0,386	0,506	45,770
6	0,251	0,409	41,222
7	0,130	0,169	46,158
8	0,129	0,169	45,799
9	0,140	0,169	49,704
10	0,216	0,269	48,178
11	0,149	0,201	44,478
12	0,156	0,201	46,567
13	0,130	0,169	46,154
14	0,353	0,462	45,844
15	0,318	0,391	48,798
16	0,229	0,300	45,800
17	0,553	0,735	45,143
18	0,262	0,351	44,786
19	0,294	0,351	50,256
20	0,350	0,462	45,454

TABELA 16 - Índices de dispersão das dosagens realizadas no soro controle 2 da Qualitrol, lote nº 421A, obtido da Merck.

Índice de dispersão	Teor de uréia mg/dL	
	Valores medidos	Valores referências
Média (\bar{x})	46,218	—
Valor verdadeiro (μ)	—	46,7
Desvio padrão (s)	2,165	—
Valor máximo	50,256	50,4
Valor mínimo	41,222	42,9
Amplitude (A)	9,034	7,5
Coefficiente de variação (CV)	4,684%	—
Nº de Medidas (n)	20 dosagens	—

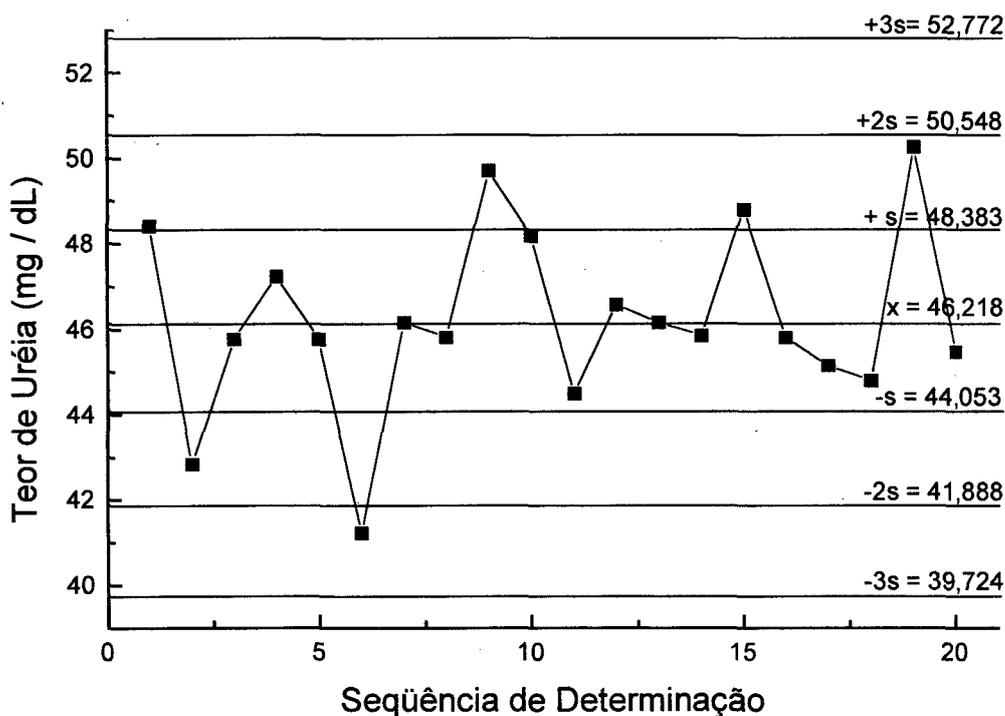


FIGURA 39 - Gráfico de controle de qualidade - Determinação do teor de uréia no soro controle 2 utilizando o EE microencapsulado.

Nas Tabelas 13,14,15 e 16, e nas Figuras 38 e 39, observa-se que, para os dois soros controle, os valores encontram-se numa faixa de dispersão aceitável conforme os critérios estatísticos estabelecidos para definir a reprodutibilidade, quais sejam: a maioria dos valores se encontram entre os limites $\bar{x} \pm 2s$; pelo menos dois terços dos resultados encontram-se no limite $\pm 1s$; não existem cinco valores consecutivos do mesmo lado da média e nem dois consecutivos além dos limites de $\pm 2s$.

Contudo o número de medidas (n) realizado com essas duas amostras é pequeno e, portanto, para analisar se os valores seguem a lei de distribuição normal e avaliar a significância e a fidelidade do método, é necessário considerar o número de graus de liberdade (n-1) através do teste-t de Student. A distribuição de t é simétrica e tende a distribuição normal a medida que N aumenta. Na prática, pode considerar-se como normal a distribuição para $n-1 > 120$.

Com os dois soros controle determinamos a probabilidade (p) da medidas, realizadas com o extrato bruto microencapsulado, situarem-se dentro de um certo limite em torno do valor verdadeiro^{78,79}, utilizando a razão de Student, Equação 12.

$$\pm t = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad \text{(Equação 12)}$$

Os valores de t retirados da literatura^{78,79}, para os graus de liberdade 13 e 19, e os calculados a partir dos índices de dispersão, em uma série de determinações aplicados na Equação 12, estão listados na Tabela 17.

TABELA 17 - Valores de t para os dois soros controle. Exatidão do método.

	N ^o de graus de liberdade	Valores de t calculados	Valores de t tabelado para p = 0,05
SORO 1	13	0,518	2,16
SORO 2	19	0,995	2,09

p = probabilidade de t ser maior que o valor da tabela a nível de 5%

Para os dois soros controle, o Teste -t mostra que a diferença entre a média de n determinações e o valor verdadeiro não é significativa a nível de 5%. O resultado de uma medida posterior, com qualquer um dos soros, tem 95% de probabilidade para se situar dentro do intervalo $\bar{x} \pm t . s$, isto é, entre os valores limites :

47,729 e 61,130 para o soro 1, e

41,693 e 50,743 para o soro 2.

5.8.2. Exame de sangue e de urina

Após o estudo da precisão e da exatidão do método, procedeu-se a avaliação final dos resultados encontrados neste trabalho através da análise do teor de uréia na urina e no sangue de dois pacientes.

As dosagens foram feitas pelo método Manual Colorimétrico Enzimático (Manual CE), com a enzima na forma de extrato bruto livre e microencapsulada em tampão acetato pH 5,75 e em tampão fosfato pH 6,8.

O procedimento usado para determinar o teor de uréia nessas amostras foi o mesmo adotado para os soros controle. A preparação das amostras foi descrita na seção 4.2.15. Os resultados foram calculados de acordo com a Equação 11, sendo que no caso da determinação da uréia urinária levou-se em conta o

volume total de 1590 mL de urina, a diluição de 50 vezes, sendo os valores expressos em g/24 horas.

Os resultados dos exames de urina do paciente X, de sangue do paciente Y e os valores de referências obtidos da literatura^{22,23} para ambas as amostras, estão listados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

TABELA 18 - Exame de urina de 24 horas do paciente X realizado com EE livre e microencapsulado pelo método Manual CE.

	Tampão	Abs da Urina	Abs do Padrão	Teor de Uréia (g/24 horas)
EE _{livre}	Acetato	0,403	0,609	31,5
EE _{livre}	Fosfato	0,153	0,403	31,4
EE _{microencapsulado}	Acetato	0,321	0,456	33,5
Valores referência				26 a 43

TABELA 19 - Exame de sangue do paciente Y realizado com EE livre e microencapsulado pelo método Manual CE.

	Tampão	Abs do Sangue	Abs do Padrão	Teor de Uréia (mg/dL)
EE _{livre}	Acetato	0,257	0,764	20,18
EE _{livre}	Fosfato	0,211	0,574	22,05
EE _{microencapsulado}	Acetato	0,188	0,456	24,73
Valores referência				15 a 40

Como pode ser visto nas Tabelas 18 e 19 os teores de uréia encontrados nos exames de urina e sangue feitos em dois pH's e com o extrato bruto livre e microencapsulado diferem muito pouco entre si e estão dentro da faixa de referência fornecida pela literatura para o método Manual CE .

Esses valores foram comparados com os exames dos mesmos pacientes realizados pelo Farmacêutico Bioquímico Jorge Antônio Amaral, do Laboratório de Patologia Clínica no Hospital Universitário, e os resultados, apresentados a seguir, mostram que há uma proximidade nos valores e que, também pelo método UV, encontram-se na faixa de normalidade.

LABORÁTORIO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO UFSC

Campus Universitário - Trindade

Florianópolis -SC

Protocolo: 0507288-3

Paciente: X

Prontuário:

Convênio: INSS

AMBULATÓRIO

Médico:

Entrada : 07 / 05 / 96

**** URÉIA URINÁRIA ****

Material : URINA DE 24 HORAS

V. Referência

Uréia na urina.....: 30,7 g / 24 h De 20 Até 35 g / 24 h

(UV)

Volume da urina: 1590 mL / 24 h

LABORÁTORIO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO UFSC

Campus Universitário - Trindade

Florianópolis -SC

Protocolo: 0507287-5

Paciente: Y

Prontuário:

Convênio: INSS

AMBULATÓRIO

Médico:

Entrada : 07 / 05 / 96

**** URÉIA ****

Material : SANGUE

V. Referência

Uréia: 33 mg / dL

De 12 Até 47 mg / dL

(UV)

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados neste trabalho pode-se concluir que:

A) Em relação ao desenvolvimento de um modelo, no processo de microencapsulação, utilizando matérias-primas e recursos naturais renováveis:

- a matéria-prima quitosana, com grau de desacetilação de 93%, obtida da quitina proveniente da casca do camarão, mostra ser excelente constituinte do suporte para imobilização da urease no processo proposto, tanto no que se refere a produção de cápsulas como na interação com a enzima;
- a matéria-prima urease, na forma de extrato bruto, após 36 determinações apresenta atividade média de $0,086 \mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$, com CV 4,47%, que é significativa para hidrolisar a uréia com boa reprodutibilidade;
- o processo escolhido para a microencapsulação, via coacervação salina, confere à membrana encapsulante porosidade suficiente para permitir a permeação do substrato e do produto sem deixar permear a urease encapsulada;
- o processo de formalização de 15 minutos permite a obtenção de microcápsulas mais resistentes e com uma variação de 3 regiões distintas na porosidade da parede, observadas por MEV, viabilizando a retenção de espécies de menor peso molecular;
- o processo de imobilização não afeta o sítio ativo da enzima urease na forma de extrato bruto, comprovadas pela diferença de morfologia entre a parede da microcápsula e a massa protéica, observados no MEV, em que o EE ocupa 62,7% da cápsula com um “gap” de $63,2 \mu\text{m}$ e pela atividade do EE microencapsulado ser 100% em relação ao EE livre;

- as fotomicrografias da EP microencapsulada mostram que quanto mais pura a enzima ocorre difusão da urease pela parede da cápsula;
- há uma homogeneidade no processo de microencapsulação, em cada 10 cápsulas de uma mesma batelada, apresenta uma absorbância média de 0,287 com CV de 5,4%.

B) Em relação à eficiência do modelo para imobilizar o EE:

- as condições de T, pH do coagulante e pH da blenda, são parâmetros ajustáveis e que dependem das características do agente ativo a ser microencapsulado;
- para o EE, os parâmetros de formação da cápsula (27°C, pH 7,0 de coagulante e pH 5,8 de blenda, proporção de 0,7% p/v de QTS e 6,8 % p/v de PVA) e de hidrólise da uréia (6 minutos de incubação a 50°C em tampão acetato pH 5,75) utilizados no trabalho foram os mais adequados a fim de manter a atividade enzimática;
- a urease na forma de extrato bruto microencapsulada pôde ser retirada do meio reacional e ser reutilizada 23 vezes;
- o processo de microencapsulação, via coacervação salina, não afeta a atividade enzimática do extrato bruto, a medida que a atividade se manteve em 0,086 $\mu\text{mol NH}_3/\text{mL}$ após a microencapsulação de 0,1 mL de EE com 1 mL de blenda;
- a urease na forma de extrato bruto apresenta as mesmas características da enzima pura com relação às curvas de dependência de T, pH ;
- os valores de Km, 0,473 $\mu\text{mol/mL}$ para o EE livre e 0,581 $\mu\text{mol/mL}$ para o EE microencapsulado, mostram a dificuldade de permeação do

substrato e do produto pela parede da microcápsula que possui uma espessura de 166,8 μ m;

- os ensaios realizados para a determinação do teor de uréia com o EE microencapsulado utilizando dois soros controle, mostram que a diferença entre a média de 14 determinações para o soro controle 1 e 20 determinações para o soro controle 2 não é significativa a nível de 5%;
- o ensaio com o EE microencapsulado, para a determinação do teor de uréia no sangue apresenta o valor de 24,73 mg/dL na faixa de referência de 15 a 40 mg/dL pelo método manual colorimétrico, coerente com o determinado laboratorialmente pelo método UV de 33 mg/dL na faixa de referência de 12 a 47 mg/dL;
- o ensaio com o EE microencapsulado, para a determinação do teor de uréia na urina, apresenta o valor de 33,5 g/24hs na faixa de referência de 26 a 43 g/24hs pelo método manual colorimétrico, também coerente com o determinado laboratorialmente pelo método UV de 30,7 g/24hs na faixa de referência de 20 a 35 g/24hs.

Desta forma, o modelo desenvolvido no processo de microencapsulação, além de eficiente, constitui uma alternativa de mais baixo custo, uma vez que a urease, na forma de extrato bruto, quando microencapsulada mantém a atividade da enzima em 100% .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KNORR, D. Dye binding properties of chitin and chitosan. **J. Food Sci.**, v. 48, 1983.
2. MURALIDHARA, H. S. Chitin from crab waste: separation of component fractions by physical means. **Res. Coacerv.**, v. 11, p. 273-278, 1985.
3. REVAAH - MOISEEV, S. Conversion of the enzymatic hidrolysate of shelfish waste chitin to single - cell protéin. **Biotec. Bioeng.**, v. 23, p. 1067-1078, 1981.
4. TENUTA FILHO, A . Cefalotórax de camarão - rosa, VI. Caracterização químico - nutricional do resíduo obtido após recuperação da proteína. **ABCTA**, v. 21, n. 314, p. 163-169, 1987.
5. MATHUR, N. K., NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals: **J. Chem. Educ.**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.
6. FÁVERE, V. T., LARANJEIRA, M. C. M. Adsorção de Cu (II), Cd (II), Ni (II) e Zn (II) pela quitina em soluções etanólicas e acetonicas. **Quím. Nova**, v. 14, n. 4, (suppl), p. 111-112, 1991.
7. LONGHINOTTI, E., FURLAN, L., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V.T. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitina. **Quím. Nova**, v. 19, n. 3, p. 221-224, 1996.
8. RODRIGUES, C. A., FÁVERE, V. T., STADLER, E., LARANJEIRA, M. C. M. Pre - concentration of anions on poly (N-acetyl-D-glucosamine) derivative - modified carbon paste electrode . **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 4, n. 1, p. 14-16, 1993.
9. FURLAN, L. **Copolímeros grafitzados de quitina e quitosana com monômeros acrílicos: estudos de adsorção de Ca(II) e aplicações na tecnologia do papel.** Florianópolis, 1993. Dissertação (Mestrado em

Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

10. FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas.** Florianópolis, 1994. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
11. MUZZARELLI, R. A. A., BARONTINI, G., ROCCHETTI, R. Immobilized enzymes on chitosan columns: α -chymotrypsin and acid phosphatase. **Biotech. Bioeng.**, v. 18, p. 1445-1454, 1976.
12. HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Prog. Polym. Sci.**, v. 19, p. 663-702, 1994.
13. MUZZARELLI, R. A. A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzy. Microb. Technol.**, v. 2, p. 177-184, 1980.
14. _____, BARONTINI, G., ROCCHETTI, R. Isolation of lysozyme on chitosan. **Biotech. Bioeng.**, v. 20, p. 87-94, 1978.
15. ITOYAMA, K., TOKURA, S., HAYASHI, T. Lipoprotein lipase immobilization onto porous chitosan beads. **Biotech. Prog.**, v. 10, p. 225-229, 1994.
16. HARGREAVES, A. B., MARCONDES, N., REGO, C. O., et al. Estudos sobre urease de sementes de *Citrullus vulgaris*. Método de extração e purificação da enzima. **Rev. Bras. Biol.**, v. 33, n. 1, p. 23-30, 1973.
17. HANABUSA, K. Preparation of urease crystal from Jack bean. **Nature**, v. 193, n. 17, p. 1078, 1962.
18. GORIN, G., FUCHUS, E., BUTLER, L.G. et al. Some properties of urease. **Biochem.**, v. 1, n. 5, p. 911-916, 1962.
19. BLAKELEY, R., WEBB, E. C., ZERNER, B. Jack bean urease (EC.3.5.1.5). A new purification and reliable rate assay. **Biochem.**, v. 8, n. 5, p. 1984-1990, 1969.

20. HARGREAVES, A .B., MARCONDES, N. Estudo da cinética da "uréia amido hidrolase" (urease) de sementes de *Citrullus vulgaris*. **Acad. Brasil. Cienc.**, v.45, p. 439-447, 1973.
21. LEE, K., BOADI, D. K., NEUFELD, R. J. Steady-state analysis of a fixed bed reactor for urea hydrolysis with microencapsulated urease. **Chem. Enging Sci.**, v. 50, n. 14, p. 2263-2273, 1995.
22. URÉIA método colorimétrico. In: **BIOCLIN**: reagentes para laboratórios de análises clínicas. Belo Horizonte: Quibasa, s/p.
23. UREIA CE. In: LABTEST sistema para diagnóstico. Belo Horizonte. Labtest, Ago. 1989. p. 87-88.
24. FINCH, C. A . Microencapsulation. In: _____ **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, Weinheim: VCH verlagsgesellschaft, 1990. v. A16, p. 575-588.
25. KOBAYASHI, T., OHMIYA, K., SHIMIZU, S. Immobilization of β -galactosidaze by polyacrylamide gel. In: WEETALL, H., SUZUKI, S. **Immobilized enzyme technology: research and applications**. New York: Plenum Press, 1975. p. 169-183.
26. SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: OTHMER K. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: J. Wiley, 1990. v. 15, p. 470-493.
27. NEWTON, D. W. Coacervations: Principles and applications. In: TARCHA, P. J. **Polymers for controlled drug delivery**. Boston: CRC Press, 1991. cap. 4, p.67-82.
28. CHANG, T. M. S., MACINTOSH, F. C.; MASON, S. G. Semipermeable aqueous microcapsules. I. Preparation and properties. **Can. J. Physiol. Pharm.**, v. 44, p. 115-129, 1966.
29. MIURA, Y., MIYAMOTO, K., FUJII, T. et. al. Activity of enzyme immobilized by microencapsulation. In: WEETALL, H.; SUZUKI, S. **Immobilized enzyme technology: research and applications**. New York: Plenum Press, 1975. p. 73-84.

30. SUNGUR, S., ELCIN, M., AKBULUT, U. Immobilization of urease into carboxymethylcellulose - gelatine system. **Macromol. Rep., A** 2° (Suppl.3), p.251-265, 1992.
31. COMERLATO, M. H. **Imobilização de enzimas no suporte crisotila.** Campinas, 1995. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, SP.
32. FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** 3. ed. Germany: Springer, 1997. cap.1, p.1-26.
33. ZABORSKY, O. **Immobilized enzymes.** New Jersey: CRC Press, 1974. 175p.
34. FATIBELLO FILHO, O., CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quím. Nova**, v. 15, n. 1, p. 27-39, 1992.
35. MOYNIHAN, H. J., LEE, C. K., CLARK, W. et al. Urea hydrolysis by immobilized urease in a fixed-bed reactor: analysis and kinetic parameter estimation.. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 34, p. 951-963, 1989.
36. SURYANARAYANA RAO, S.V., YASHODHA, K.P., MAHENDRAKAR, N. S. et al. Deacetylation of chitin at low temperature by a novel alkali impregnation technique. **Indian J. Technol.**, v. 25, p. 194-196, 1987.
37. MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin.** New York: Pergamon Press, 1977. cap. 6, p. 207-253.
38. BERKELY, R. C. W. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. In: _____ **Chitin, chitosan related enzymes.** [S.l.]: Academic Press, 1984. cap.9, p. 205-236.
39. MUZZARELLI, R. A. A. et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, v. 9, p. 247-252, 1988.
40. RATHKE, T. D., HUDSON, S. M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. **J. M. S. - Rev. Macromol. Chem. Phys.**, v. C34, n. 3, p. 375-437, 1994.

41. SANDFORD, P. A., HUTCHINGS, G. P. Chitosan a natural cationic biopolymer: commercial applications. In: YALPANI, M. **Industrial polysaccharides: genetic engineering structure/property relations and applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 363-376.
42. HUGUET, M. L., GROBOILLOT, A., NEUFELD, R. J. et al. Hemoglobin encapsulation in chitosan / calcium alginate beads. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 51, p. 1427-1432, 1994.
43. CHANDY, T., SHARMA, C. P. Preparation and performance of chitosan encapsulated activated charcoal (ACCB) adsorbents for small molecules. **J. Microencaps.**, v. 10, n. 4, p. 475- 486, 1993.
44. _____. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. **Biomaterials**, v. 14, n. 12, 1993.
45. CINCERA, D. L. Poly (vinyl alcohol) vinyl polymers. In: OTHMER K., **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1982. v. 23, p. 848-865.
46. SIQUEIRA, D. F., BRUNS, R. E., NUNES, S. P. Compatibilização e otimização de blendas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 2, p.15-18. 1993
47. KIM, J. H., KIM, J. Y., LEE, Y. M. et al. Properties and swelling characteristics of cross-linked poly (vinyl alcohol) / chitosan blend membrane. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 45, p. 1711-1717, 1992.
48. NAKATSUKA, S.; ANDRADY, A. L. Permeability of vitamin B-12 in chitosan membranes. Effect of crosslinking and blending with poly (vinyl alcohol) on permeability. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 44, p. 17-28, 1992.
49. KRAUSE, S. Polymer-polymer compatibility. In: PAUL, D. R., NEWMAN, S. **Polymers blends**. San Diego: Academic Press, 1978. cap.2, v. 1, p.16-106.

50. KIM, J. H., KIM, J. Y., LEE, Y. M., et al. Controlled release of riboflavin and insulin through crosslinked poly (vinyl alcohol) / chitosan blend membrane. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 44, p. 1823-1828, 1992.
51. SUMMER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **J. Biol. Chem.**, v. 69, p. 435-441, 1926.
52. LEADLAY, P. F. **An introduction to enzyme chemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. 81 p.
53. LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: componentes moleculares das células**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. cap. 8, v. 1, p. 126-145.
54. HARPER, H. A. **Manual de Química Fisiológica**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1977. cap. 8, p. 131-179.
55. GUILBAULT, G. G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York: Marcel Dekker. cap.1, 1984. p.1-76.
56. OLIVEIRA NETO, G., YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Quím. Nova**, v. 11, n. 4, p. 432-435, 1988.
57. MILTON, J. M., TAYLOR, I. P. E. The amino acid composition of Jack -bean urease. **Biochem. J.** addendum, v. 113, p. 678-680, 1969.
58. DRIOLI, E. Membranes and membrane processes in biotechnology. In: BUNGAY, P. M., LONSDALE, H. K., PINHO, M. N. **Synthetic membranes: science, engineering and applications**. [S.l.]: Reidel, 1986. v. 181, p. 667-699.
59. HAYASHI, T., IKADA, Y. Protease immobilization onto porous chitosan beads. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 42, p. 85-92, 1991.
60. OGAWA, N., KAWAUCHI, Y., NISHIMURA, K. et al. Continuous preparative method of relatively larger and uniform polymer beads and their application to immobilization of urease. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 35, p. 1283-1288, 1988.

61. KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., ZABORSKA, W. Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 48, p. 337-350, 1990.
62. LESZKO, M., ZABORSKA, W. Inhibition of activity of urease in native form and immobilized on chitosan membrane by sodium fluoride. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 57, p. 113-120, 1993.
63. KRAJEWSKA, B. Urease immobilized on chitosan membrane. Inactivation by heavy metal ions. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 52, p.152-162, 1991.
64. POZNIAK, G., KRAJEWSKA, Barbara, TROCHIMCZUK, W. Urease immobilized on modified polysulphone membrane: preparation and properties. **Biomaterials**, v. 16, p. 129-134, 1995.
65. CHANG, T. M. S. Semipermeable microcapsules. **Science**, v. 146, p. 524-525, 1964.
66. SUNDARAM, P. V. The kinetic properties of microencapsulated urease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 321, p. 319-328, 1973.
67. MIYAWAKI, O., NAKAMURA, K., YANO, T. Microencapsulation of urease by interfacial polymerization with liquid-air nozzle method. **Agric. Biol. Chem.**, v. 43, n. 5, p. 1133-1138, 1979.
68. MONSHIPOURI, M., NEUFELD, R. J. Active and distribution of urease following microencapsulation within polyamide membranes. **Enzy. Microb. Technol.**, v. 13, p. 309-313, 1991.
69. ORTMANIS, A., NEUFELD, R. J. Study of microencapsulated urease in a continuous feed, stirred tank reactor. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 6, p.135-139, 1984.
70. MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação. 2. ed. São Paulo: E. Blücher, 1983. 627 p. p. 172-173.

71. MARTELLI, H. L., PANEK, A. D. **Bioquímica Experimental**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1968. cap. 4/9, p. 33-59, 95-112.
72. BLAIR, H. S., GUTHRIE, J., LAW, T. K. et al. Chitosan and modified chitosan membranes I- Preparation and characterization. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 33, p. 641, 1987.
73. BROUSSIGNAC, J. Un hault polymère naturel per connu dans l'industrie le chitosane. **Chim. Ind.-Gén. Chim.**, v. 99, n. 9, p. 1211-1247, 1970.
74. POLK, A., AMSDEN, B., YAO, K., et al. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. **J. Pharma. Sci**, v. 83, n. 2, p. 178-185, 1994.
75. MAGHAMI, G. G., ROBERTS, G. A. F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. **Makromol. Chem.**, v. 189, p. 195-200, 1988.
76. MIGUEZ, M. J. B., RODRIGUES, B. C. R., SANCHEZ, M. N. M., LARANJEIRA, M. C. M. Preparation and scanning eletronic microscopy study of chitosan/polyvinyl (alcohol) encapsulated crude urease extract. **J. Microencap.**, v. 14, n.5, p.639-646, 1997.
77. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. F. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265- 275, 1951.
78. ANDERSON, S. C., COCKAYNE, S. **Clinical chemistry. Concepts and applications**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. cap. 4, p. 38-71.
79. CHRISTIAN, G. D. **Analytical chemistry**. 4. ed. New York: J. Wiley, 1986. cap. 3, p. 59-95.
80. KORSMEYER, R. W. Diffusion controlled systems: hydrogels. In: TARCHA, P. J. **Polymers for controlled drug delivery**. Boston: CRC Press, 1991. p. 15-37.

81. WU, Li -G., ZHU, C. -L., LIU, M. Study of a new pervaporation membrane Part 2: Performance test and analysis of the new membrane. **J. Memb. Sci.**, v. 90, p. 207-212, 1994.
82. _____. Study of a new pervaporation membrane Part 1: Preparation and characteristics of the new membrane. **J. Memb. Sci.**, v. 90, p. 199-205, 1994.
83. FIORI, S. Remoção seletiva de Ni (II) em cápsulas de quitosana/álcool polivinílico adsorvidas com o agente quelante dimetilglioxima. Florianópolis, 1996. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
84. FINCH, C. A. Industrial microencapsulation: polymers for microcapsule walls. In: KARSA, D.R.; STEPHENSON, R. A. **Encapsulation and controlled release**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 1-12.
85. VOIGT, R., MANFRED, B. Cápsulas. In: **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Espanha: Acribia Zaragoga, 1982. p. 259-269.
86. SCHACHT, E., VANDICHEL, J. C., LEMAHIEU, A. et al. The use of gelatin and alginate for the immobilization of bioactive agents. In: KARSA, D.R.; STEPHENSON, R. A. **Encapsulation and controlled release**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 18-34.
87. WITTCOFF, H. A., REUBEN, B.G. **Industrial organic chemicals in perspective**. Part two: technology, formulation, and use. New York: J. Wiley, 1980. p.173.
88. SAMALIGY, M. S., ROHDEWALD P., MAHMOUD H. A. Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 38, p. 216-218, 1985.
89. BECHARD, S., MCMULLEN, J. N. Pectin-gelatin microglobules: effect of a cross-linking agent (formaldeyde) on *in vitro* dissolution rate. **Int. J. Pharm.**, v. 31, p. 91-98, 1986.

90. HIRANO, S., TOBETTO, K., HASEGAWA, M. et al. Permeability properties of gels and membranes derived from chitosan. **J. Biom. Mat. Res.**, v. 14, p. 477-486, 1980.
91. _____, MATSUDA, N., MIURA, O. et al. N-Methylenechitosan gels, and some of their properties as media for gel chromatography. **Carbohydr. Res.**, v. 71, p. 344-348, 1979.
92. MIGUEZ, M. J. B., RODRIGUES, B. C., SANCHEZ, M. N. M. LARANJEIRA, M. C. M. Microencapsulação da urease pelo sistema quitosana-PVA. In: ENZITEC 95 - SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2. 1995, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1995. s/p.
93. _____ Microencapsulação da urease pelo sistema quitosana-PVA. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 18., 1995, Caxambú. **Anais...** Caxambú: Sociedade Brasileira de Química, 1995. QM 11.
94. _____ Microencapsulação da urease pelo sistema quitosana-PVA. In: SEMINÁRIO CATARINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995. 16.
95. YOKOTE, Y., KIMURA, K., SAMEJIMA, H. Glucose isomerase immobilized on phenol-formaldehyde resin. In: WEETALL, H. H., SUZUKI, S. **Immobilized enzyme technology: research and applications.** New York: Plenum Press, 1975. p. 53-67.
96. KOST, J., LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 6, p. 19-50, 1991.
97. SANCHEZ, D. R., RHA, C. Chitosan globules. **J. Food. Technol.**, v. 16, p. 469-479, 1981.
98. RODRIGUES, B. C., MIGUEZ, M. J. B., SANCHEZ, M. N. M., LARANJEIRA, M. C. M. Liberação controlada de rifampicina microencapsulada pelo sistema quitosana-PVA. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 20., 1997, Poços de

Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Química, 1997. v. 2, p. QB 8.

99. NAKAMURA, K., MORI, Y. Mass Transfer and reaction with the multicomponent microcapsules. In: WEETALL, H. H., SUZUKI, Shuichi. **Immobilized enzyme technology: research and applications** New York: Plenum Press, 1975. p. 99-110.
100. KHOURI, N., FESSI, H., ROBLOT-TREUPEL, J., et. al. Etude et mise au point d'un procédé original de préparation de nanocapsules de polyalkylcyanoacrylates par polymérisation interfaciale. **Pharma. Acta Helv.**, v. 61, n. 10, p. 274-281, 1986.
101. WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal. Chem.**, v. 39, p. 971-974, 1967.
102. MIGUEZ, M. J. B., SANCHEZ, M. N. M., KLUG, M., FÁVERE, V.T., LARANJEIRA, M. C M. An alternative process for the use of the urease as an enzymatic bioreactor. **J. Braz. Chem. Soc.** (Submetido em março de 1997)
103. OHLWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. cap. 15, p. 327-365.
104. VOGEL, A. et al. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. cap. 4/5, p. 92-106.
105. IYENGAR, L., RAO, A .V. S .P. Urease bound to chitin with glutaraldehyde. **Biotechnol. Bioeng.**, v.21, p. 1333-1343,1979.
106. RAGHNUNATH, K. RAO, K. P., JOSEFEPH, K. T. Preparation and characterization of urease immobilized on to collagen poly (glycidyl methacrylate) graft copolymer. **Biotechnol. Bioeng.**, v.26, p.104-109,1984.
107. KARUBE, I. SUZUKI, S. Electrochemical preparation of urease -collagen membrane. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.47, p. 51-54, 1972.

108. GOLDSTEIN, L., LEVY, M. Kinetics of multilayer immobilized enzyme-filter reactors: behavior of urease-filter reactors in different buffers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, p. 1485-1499, 1983.
109. DIXEM, N. E., GAZZOLA, C., WATTERS, J. J. et. al. Inhibition of Jack bean urease (EC.3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, n. 14, p. 4130-4133, july. 1975.
110. BLAKELEY, R. L., HINDS, J. A., KUNZE, H. E. et. al. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. **Biochemistry**, v. 8, n. 5, p. 1991-2000, 1969.
111. SUZUKI, S., AIZAWA, M., KARUBE, I. Electrochemical preparation of enzyme-collagen membrane and its application. In: WEETALL, H. H., SUZUKI, S. **Immobilized enzyme technology: research and applications**. New York: Plenum Press, 1975. p. 253-267.
112. LATHAM, J. L. **Cinética elementar de reação**. São Paulo. E. Blücher, 1974. cap 4, p.21-29
113. RAMACHANDRAN, K. B. PERLMUTTER, D. D. Effects of immobilization on the kinetics of enzyme - catalyzed reactions. II. Urease in a packed - column differential reactor system. **Biotechnol. Bioeng.**, v.18, p. 685-699, 1976.
114. SUNDARAM, P. V. HORNBY, W. E. Preparation and properties of urease chemically attached to nylon tube. **FEBS Letters**, v.10, p. 325-327, 1970.
115. OTTENBRITE, R. M. Biologically active polymers. In: DUNN, R. L., OTTENBRITE, R. M. **Polymeric drugs and drug delivery systems**. Whashington: American Chemical Society, 1991. cap. 1, p. 3-10.
116. STRYER, L. **Biochemistry**. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1988. cap. 8, p. 177-200.

117. MADEIRA, V. M. C. Incorporation of urease into liposomes. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 499, p. 202-211, 1977.
118. ONYEZILI, F. N. ONITRI, A. C. The effect of substrate flow - rate on immobilized urease assays. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 659, p. 244-248, 1981.
119. MIYAMA, H. , KAWATA, M. NOSAKA, Y. Immobilization of enzyme on dimethyl- aminated nylon gels. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p. 1403-1410, 1985.
120. MOGENSEN, A. O., VIETH, W. R. Mass transfer and biochemical reaction with semipermeable microcapsules. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 15, p. 467-481, 1973.
121. MIGUEZ, M. J B., SANCHEZ, M. N. M., RODRIGUES, B.C., LARANJEIRA, M. C. M. Estabilidade do extrato bruto da urease microencapsulada em matriz de quitosana-PVA In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 20., 1997, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Química, 1997. v. 2, p. QB 17.