



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ DE IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE UTILIZANDO GELATINA DE DIFERENTES *BLOOMS*
ADICIONADA DE PLASTIFICANTES HIDROFÍLICOS**

ANIELA PINTO KEMPKA

FLORIANÓPOLIS

2012

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Aniela Pinto Kempka

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ DE IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE UTILIZANDO GELATINA DE DIFERENTES *BLOOMS*
ADICIONADA DE PLASTIFICANTES HIDROFÍLICOS**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kempka, Anieli Pinto

Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes Blooms adicionada de plastificantes hidrofílicos [tese] / Anieli Pinto Kempka; orientadora, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza ; co-orientadora, Antônio Augusto Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2012.

209 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. gelatina. 3. Bloom. 4. imobilização. 5. lipase. I. Souza, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de. II. Souza, Antônio Augusto Ulson de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase
utilizando gelatina de diferentes blooms adicionada de
plastificantes hidrofílicos**

Por

Aniela Pinto Kempka

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Dr^ª. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza
orientadora

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
co-orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
coordenador

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Sayer

Prof^ª. Dr^ª. Débora de Oliveira

Prof^ª. Dr^ª. Edna Regina Amante

Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Wisbeck

Prof^ª. Dr^ª. Eunice Valduga

Florianópolis, 25 de maio de 2012

**Aos meus pais,
Ao meu esposo.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em toda a minha vida;

Aos meus pais, Dalila e Gabriel, e família, pelos ensinamentos, apoio e incentivo;

Ao meu esposo, Luciano, pela paciência, ajuda e apoio constante;

A minha professora orientadora, Prof^ª. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e ao meu professor coorientador, Prof^º. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza, pelos conhecimentos repassados e orientações, fundamentais para que este estudo pudesse ser realizado;

Aos membros da banca, pelas correções, considerações e observações que acrescentaram muito neste trabalho;

As empresas Gelnex e Granotec, pela gentileza em disponibilizar as gelatinas e a lipase;

A Universidade do Estado de Santa Catarina;

Ao pessoal do LABMASSA, pelo convívio nos momentos em que estive presente;

A minha grande amiga Rosa Cristina Prestes, pela ajuda fundamental, pela amizade, pelas longas conversas sobre colágeno, gelatina e análise estatística!

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O emprego de enzimas imobilizadas vem aumentando devido às vantagens que as mesmas oferecem como, por exemplo, a possibilidade de reúso. A gelatina é uma proteína solúvel em água, de baixo valor agregado, que tem a capacidade de formar gel e seu uso associado com plastificantes vem sendo estudado no desenvolvimento de biofilmes. Neste trabalho foi realizado um estudo de imobilização de lipase comercial em gelatinas de diferentes valores de *Bloom* adicionadas de plastificantes hidrofílicos. Foram testadas amplas faixas de concentrações para as gelatinas e baixas concentrações dos plastificantes glicerol e manitol buscando avaliar a influência do valor de *Bloom*, bem como dos plastificantes na eficiência de imobilização. As gelatinas foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos, perfil de aminoácidos e interações dos géis formados com a água. Após a imobilização, avaliou-se a migração para as diversas combinações de gelatina e plastificante, sendo avaliados os plastificantes individualmente, obtidos os rendimentos de imobilização e realizadas microscopias das matrizes. A estabilidade de imobilização em relação aos parâmetros operacionais foi verificada para posterior estudo do comportamento na hidrólise de óleo de oliva para a lipase livre e imobilizada e o reúso da lipase imobilizada. Os resultados indicaram a necessidade de reticulação dos géis com glutaraldeído devido à alta solubilidade em água e razão de inchamento, justificada pelo perfil de aminoácidos que confirma a solubilidade da gelatina. O manitol apresentou maior eficiência na imobilização da lipase, com estruturas mais porosas e de poros mais uniformes. Estas estruturas também sofreram influência da concentração de gelatina, onde maiores concentrações desta associadas com concentrações intermediárias de plastificante proporcionaram matrizes com maior rendimento de imobilização. Através das análises de Difração de Raios-X, pode-se perceber uma estrutura semicristalina para as matrizes de imobilização, sendo que a maioria apresentou o pico correspondente às triplas hélices formadas durante a etapa de resfriamento do gel de gelatina, com maior intensidade para a matriz E8-280-M (correspondente ao experimento 8, com gelatina de 280 *Bloom* e manitol), levando a maior estabilidade à temperatura. A estabilidade de imobilização foi afetada por valores de pH, temperatura e agitação, sendo somente as matrizes E8-280-M e E9/10-280-M (correspondentes aos experimentos 9 e 10, com gelatina de 280 *Bloom* e manitol) mais estáveis. Nas reações de hidrólise de óleo

de oliva, a atividade enzimática para a lipase livre e imobilizada foi estudada em relação à temperatura, pH e tempo, sendo 42 °C a melhor temperatura para a lipase livre e imobilizada. Para a lipase livre, o pH ótimo foi 7,0, para a lipase imobilizada em E8-280-M o pH ótimo de atividade ficou na faixa de 5,5 – 7,5 e para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, o pH ótimo ficou entre 6,5 e 7,5. Ao longo do tempo, avaliado até 720 minutos, tanto a lipase livre como a imobilizada apresentaram perdas de atividade enzimática. Foram possíveis 10 ciclos de reuso, sendo que até o 5º ciclo a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 77,66 % da atividade inicial e para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, em 63,09 % da atividade inicial. A maior retenção de atividade na etapa de manutenção foi para a lipase imobilizada a 25 °C na matriz E8-280-M com 71,76 % de atividade relativa após 30 dias de armazenamento. Foi possível a hidrólise de diferentes substratos com a lipase livre e imobilizada nas matrizes E8-280-M e E9/10-280-M, sendo o maior percentual de hidrólise obtido para a primeira matriz de imobilização para o óleo de canola.

Palavras-chave: gelatina, *Bloom*, plastificante, imobilização, lipase.

ABSTRACT

The use of immobilized enzymes is increasing due to the advantages that they offer such as the possibility of reuse. Gelatin is a water-soluble protein, low value, which has the ability to form gel and its association with plasticizers has been studied in the development of biofilms. In this paper we present a study of lipase immobilization of commercial gelatins of different values of hydrophilic plasticizers *Bloom* added. Were tested wide ranges of concentrations for the gelatin and low concentrations of the plasticizers glycerol and mannitol by assessing the influence of the Bloom value, as well as plasticizers in the efficiency of immobilization. The gels were characterized am physico-chemical parameters, amino acid profile and interactions of the gels formed with water. After immobilization, the migration was evaluated for various combinations of gelatin and a plasticizer, the plasticizer being evaluated individually, obtained yields of immobilization and performed microscopy of arrays. The stability of immobilization with respect to operating parameters was observed for further study of the behavior in the hydrolysis of olive oil for free and immobilized lipase and the reuse of immobilized lipase. The results indicated the necessity of crosslinking of the gels with glutaraldehyde due to high water solubility and rate of swelling, justified by the profile of amino acids confirming the solubility of the gelatine. Mannitol had a higher efficiency in the immobilization of lipases, with structures more porous and more uniform pores. These structures also influenced by the concentration of gelatin, where higher concentrations associated with this intermediate concentrations of plasticizer matrices provided with a greater yield of immobilization. By analysis of X-ray diffraction, it can be noticed a semicrystalline structure to immobilization matrices, and most showed a peak corresponding to triple helices formed during the cooling step the gelatin gel with greater intensity for E8-array 280-M (8 corresponding to the experiment with 280 *Bloom* gelatin and mannitol), leading to better temperature stability. The stability of restraint is affected by pH, temperature and agitation, with only the dies E8-280-M and E9/10-280-M (trials corresponding to 9:10, with a 280 Bloom gelatin and mannitol) more stable . In the hydrolysis of olive oil, the enzymatic activity for the free and immobilized lipase was studied in relation to temperature, pH and time, and 42 °C. The optimum temperature for free and immobilized lipase. For free lipase, the optimum pH was 7.0 for the immobilized lipase at E8-280-M the optimum pH of activity was in the range 5.5 to

7.5 and for immobilized lipase in E9/10-280 -M, the pH optimum was between 6.5 and 7.5. Over time, measured up to 720 minutes, both free and immobilized lipase showed loss of enzyme activity. 10 cycles were possible reuse, and by the 5th cycle, the immobilized lipase at E8-280-M remained with 77.66% of initial activity and the lipase immobilized on E9/10-280-M in 63.09% the initial activity. The higher retention of activity in the upkeep for the immobilized lipase was 25 ° C in the matrix E8-280-M with 71.76% of relative activity after 30 days of storage. Could the hydrolysis of different substrates with free and immobilized lipase matrices in E8-280-M and E9/10-280-M, the largest percentage of hydrolysis obtained for the first immobilization matrix for the canola oil.

Keywords: gelatin, *Bloom*, plasticizer, immobilization lipase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes métodos de imobilização de enzimas.	37
Figura 2 – Aspecto da imobilização de enzimas por aprisionamento. .	38
Figura 3 – Geometrias da imobilização de enzimas por aprisionamento.	39
Figura 4 – Aspectos químicos dos processos ácido e alcalino de obtenção da gelatina.	41
Figura 5 – Diagrama de fluxo simplificado do processo de obtenção de gelatina.	42
Figura 6 – Formação da rede tridimensional do gel de gelatina após o resfriamento.....	45
Figura 7 – Inchamento de amostras de gel de proteína de soja e gelatina após a imersão em água.	47
Figura 8 – Estruturas de ligações cruzadas utilizando vários agentes de modificação.	49
Figura 9 – Mecanismo de formação da ligação entre a gelatina e o glutaraldeído via ligações cruzadas em gelatina de cadeia longa.....	50
Figura 10 – Mecanismo de incorporação do glicerol em gel de gelatina.	56
Figura 11 – Microscopia via ATR/FT-IR de géis de kefiran adicionados de plastificantes.	56
Figura 12 – Estrutura química da molécula de glicerol.....	61
Figura 13 – Estrutura química da molécula de D-manitol.	61
Figura 14 – Diferentes reações catalisadas por lipases.	63
Figura 15 – Aspecto da gelatina após a adição de água e hidratação...	81
Figura 16 – Aspecto do gel de gelatina e plastificante após o resfriamento.....	81
Figura 17 – Corte do gel em cubos e verificação do tamanho da aresta.	82
Figura 18 – Lavagem do gel com água destilada após o corte dos cubos.	82
Figura 19 – Aspecto dos géis de gelatina obtidos nos testes prévios. ..	83

Figura 20 – Ensaios de determinação da migração.....	86
Figura 21 – Aspecto dos cubos após 60 minutos em condições controladas para determinação da migração.	86
Figura 22 – Teste de atividade enzimática para verificação da migração.....	87
Figura 23 – Solubilidade dos géis de gelatina em água após 24 horas (a) gelatina de <i>Bloom</i> 200 g (b) gelatina de <i>Bloom</i> 220 g (c) gelatina <i>Bloom</i> 240 g (d) gelatina <i>Bloom</i> 280 g.....	101
Figura 24 – Razão de inchamento dos géis de gelatina após 240 minutos (a) gelatina de <i>Bloom</i> 200 g (b) gelatina de <i>Bloom</i> 220 g (c) gelatina de <i>Bloom</i> 240 g (d) gelatina de <i>Bloom</i> 280 g.	105
Figura 25 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planeamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 200 g e glicerol.	108
Figura 26 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planeamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 220 g e glicerol.	108
Figura 27 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planeamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol.	109
Figura 28 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planeamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.	109
Figura 29 – Diagrama de Pareto referente aos experimentos utilizando a gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol.	114
Figura 30 – Diagrama de Pareto referente aos experimentos utilizando a gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.	114
Figura 31 – Superfície de resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol na elaboração das matrizes.	116
Figura 32 – Curva de contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol na elaboração das matrizes.	116
Figura 33 – Superfície de resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol na elaboração das matrizes.	117

Figura 34 – Curva de contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol na elaboração das matrizes.	117
Figura 35 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 200 g e manitol.....	118
Figura 36 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 220 g e manitol.....	118
Figura 37 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.....	119
Figura 38 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.....	119
Figura 39 – Diagrama de Pareto referentes aos experimentos utilizando a gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	123
Figura 40 – Diagrama de Pareto referentes aos experimentos utilizando a gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	124
Figura 41 – Superfície de Resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol na elaboração das matrizes.....	126
Figura 42 – Curva de Contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol na elaboração das matrizes.	126
Figura 43 – Superfície de Resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol na elaboração das matrizes.....	127
Figura 44 – Curva de Contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol na elaboração das matrizes.	127
Figura 45 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.....	130
Figura 46 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.....	130

Figura 47 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.	131
Figura 48 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	131
Figura 49 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	132
Figura 50 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.	132
Figura 51 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	133
Figura 52 – Microscopia do experimento E8 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	134
Figura 53 – Microscopia do experimento E9/E10 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	134
Figura 54 – Microscopia do experimento E9/E10 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.	134
Figura 55 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol.	136
Figura 56 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	137
Figura 57 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.	137
Figura 58 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	137
Figura 59 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	138
Figura 60 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.	138
Figura 61 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	138
Figura 62 – Difratoograma do experimento E8 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	139

Figura 63 – Difratoograma do experimento E9/E10 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	139
Figura 64 – Difratoograma do experimento E9/E10 utilizando gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	139
Figura 65 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização E9/10-240-M, E8-280-M e E9/10-280-M com a temperatura.	141
Figura 66 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização com o pH.	143
Figura 67 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização com a agitação.	145
Figura 68 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M utilizando diferentes temperaturas.	148
Figura 69 – Perfis obtidos através linearização dos dados de atividade enzimática e temperatura.	150
Figura 70 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M utilizando diferentes pHs.	153
Figura 71 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M ao longo do tempo.	155
Figura 72 – Estabilidade térmica na temperatura de 42 °C para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.	156
Figura 73 – Linearização dos dados de atividade enzimática em relação à concentração de substrato utilizando o modelo de Lineweaver-Burk para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.	159
Figura 74 – Reúso da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.	162
Figura 75 – Atividade relativa da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M mantida na temperatura de 4 °C durante 30 dias.	163
Figura 76 – Atividade relativa da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M mantida na temperatura de 25 °C durante 30 dias.	164
Figura 77 – Percentual de hidrólise obtido para diferentes substratos utilizando a lipase livre e imobilizada.	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicação de gelatina na imobilização de enzimas	52
Tabela 2 – Plastificantes utilizados em filmes de polissacarídeos e proteínas.....	58
Tabela 3 – Seletividade de lipases de diferentes fontes.....	67
Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases nos mais diversos tipos de suportes/matrizes.....	70
Tabela 5 – Delineamento composto central rotacional 2 ² para obtenção dos géis – valores das variáveis e níveis.....	80
Tabela 6 – Proporção de plastificante (%) em relação à massa de gelatina utilizada para os experimentos do planejamento.....	83
Tabela 7 – Características físico-químicas das gelatinas utilizadas no desenvolvimento das matrizes de imobilização.....	96
Tabela 8 – Perfil de aminoácidos das gelatinas utilizadas no desenvolvimento das matrizes de imobilização.....	98
Tabela 9 – Médias de atividade enzimática, desvio padrão e Teste de Tukey para os experimentos de determinação de migração utilizando glicerol e as gelatinas de <i>Bloom</i> 200 g a 280 g.....	111
Tabela 10 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol	113
Tabela 11 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.....	113
Tabela 12 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e glicerol.....	115
Tabela 13 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e glicerol.....	115

Tabela 14 – Médias de atividade enzimática, desvio padrão e Teste de Tukey para os experimentos de determinação de migração utilizando manitol e as gelatinas de <i>Bloom</i> 200 g a 280 g.	121
Tabela 15 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	122
Tabela 16 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de 280 <i>Bloom</i> e manitol.	123
Tabela 17 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 240 g e manitol.	124
Tabela 18 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de <i>Bloom</i> 280 g e manitol.	125
Tabela 19 – Rendimento de imobilização (%) para os experimentos com matrizes adicionadas de glicerol ou manitol que não apresentaram migração.	128
Tabela 20 – Atividade enzimática a diferentes temperaturas para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M....	146
Tabela 21 – Coeficientes de correlação da equação de Arrhenius utilizando as equações obtidas na linearização dos dados de atividade enzimática e temperatura.	149
Tabela 22 – Atividade enzimática a diferentes pHs para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M.	151
Tabela 23 – Atividade enzimática ao longo do tempo para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M.	154
Tabela 24 – Resultados de atividade enzimática para obtenção da estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.	156
Tabela 25 – Constante de inativação térmica, tempo de meia vida e fator estabilidade da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M, a 42 °C.	157

Tabela 26 – Atividade enzimática da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M em função da concentração de óleo de oliva.....	158
Tabela 27 – Valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.....	160
Tabela 28 – Resultados de atividade enzimática em relação ao reúso da lipase imobilizada nas matrizes E8-280-M e E9/10-280-M.	161

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius
% – percentual
μ – micro
Da – Dalton
E.C. – Enzyme Comission
g – gramas
K – Kelvin
kDa – kiloDalton
Kg – kilograma
kJ – kiloJoule
K_m – constante de Michaelis-Menten
L – litro
m/V – massa por volume
mg – miligramas
mL – mililitro
MM – massa molecular
mm – milímetro
mM – milimolar
pH – potencial hidrogeniônico
pI ou IEP – ponto isoelétrico
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
T – temperatura
U – unidades de atividade enzimática
v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	35
3.2	GELATINA	39
3.2.1	Definição e características gerais	39
3.2.2	Detalhamento dos processos de obtenção da gelatina	43
3.2.2.1	Processo ácido - gelatina tipo A.....	43
3.2.2.2	Processo alcalino - gelatina tipo B	43
3.2.3	Propriedades físico-químicas da gelatina e dos géis de gelatina... 44	
3.3	USO DE GELATINA COMO AGENTE IMOBILIZANTE DE ENZIMAS	48
3.4	PLASTIFICANTES.....	55
3.4.1	Definição e características gerais	55
3.4.2	Propriedades de géis de gelatina adicionados de plastificantes.....	59
3.4.3	Glicerol e manitol	60
3.5	LIPASES.....	62
3.5.1	Características gerais e modo de ação.....	62
3.5.2	Propriedades bioquímicas das lipases	64
3.5.2.1	Influência ambiental: pH, temperatura e atividade de água.....	64
3.5.2.2	Especificidade e seletividade	66
3.5.2.3	Metais, surfactantes e inibidores	67
3.5.3	Imobilização de lipases	68
3.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
4	MATERIAL E MÉTODOS	75
4.1	LOCAIS	75
4.2	MATERIAIS.....	75
4.2.1	Lipase e substratos	75

4.2.2	Gelatinas e plastificantes	76
4.2.3	Reagentes	76
4.3	EQUIPAMENTOS	76
4.4	MÉTODOS	76
4.4.1	Caracterização físico-química das gelatinas	76
4.4.1.1	Proteína	76
4.4.1.2	Umidade	77
4.4.1.3	Lipídeos	78
4.4.1.4	Cinzas	78
4.4.1.5	Atividade de Água (A_w)	79
4.4.1.6	pH	79
4.4.1.7	Formação de gel	79
4.4.1.8	Ponto de Fusão	79
4.4.2	Perfil de aminoácidos das gelatinas	80
4.4.3	Obtenção dos géis de imobilização	80
4.4.4	Caracterização dos géis de imobilização	83
4.4.4.1	Solubilidade em água	83
4.4.4.2	Razão de inchamento	84
4.4.5	Imobilização da lipase	84
4.4.6	Determinação da atividade enzimática	85
4.4.7	Verificação da migração da lipase após a imobilização	86
4.4.8	Rendimento de imobilização	87
4.4.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	88
4.4.10	Difração de Raios-X	88
4.4.11	Verificação da estabilidade da imobilização	88
4.4.12	Ensaio para a determinação dos parâmetros operacionais para a lipase livre e imobilizada	89
4.4.13	Cálculos para a lipase livre e imobilizada	89
4.4.13.1	Estabilidade térmica e tempo de meia vida	89
4.4.13.2	Fator estabilidade (FE)	90
4.4.13.3	Energia de ativação	91
4.4.13.4	K_m e $v_{máx}$	91

4.4.14	Reúso da lipase imobilizada.....	92
4.4.15	Manutenção da atividade da lipase imobilizada.....	92
4.4.16	Especificidade da lipase livre e imobilizada frente a diferentes ácidos graxos.....	92
4.4.17	Tabulação dos resultados e análise estatística.....	93
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS GELATINAS.....	95
5.1.1	Características físico-químicas.....	95
5.1.2	Perfil de aminoácidos das gelatinas.....	97
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS COM AS DIFERENTES GELATINAS E PLASTIFICANTES COM E SEM O USO DE GLUTARALDEIDO.....	100
5.2.1	Solubilidade em água.....	100
5.2.2	Razão de inchamento.....	104
5.3	IMOBILIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO DA LIPASE.....	107
5.3.1	Imobilização e determinação da migração utilizando glicerol como plastificante.....	108
5.3.1.1	Efeitos das variáveis e coeficientes de regressão obtidos a partir dos resultados experimentais.....	112
5.3.2	Imobilização e determinação da migração utilizando manitol como plastificante.....	118
5.3.2.1	Efeitos das variáveis e coeficientes de regressão obtidos a partir dos resultados experimentais.....	122
5.4	RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO (RI).....	128
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)....	130
5.6	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DAS MATRIZES DE IMOBILIZAÇÃO.....	135
5.7	VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	140
5.7.1	Estabilidade da enzima imobilizada com temperatura.....	141
5.7.2	Estabilidade de imobilização com o pH.....	142
5.7.3	Estabilidade de imobilização com a agitação.....	144
5.7.4	Estabilidade de imobilização com o tempo.....	145

5.8	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E CINÉTICOS PARA A LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA ...	145
5.8.1	Determinação da atividade enzimática utilizando diferentes temperaturas	146
5.8.2	Determinação da atividade enzimática utilizando diferentes pHs	150
5.8.3	Determinação da atividade enzimática ao longo do tempo	153
5.8.4	Estabilidade térmica, tempo de meia vida e fator estabilidade para a lipase imobilizada	155
5.8.5	Determinação de K_m e $v_{m\acute{a}x}$	158
5.9	REÚSO DA LIPASE IMOBILIZADA	160
5.10	MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	162
5.11	ESPECIFICIDADE DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA EM RELAÇÃO AO SUBSTRATO.	165
6	CONCLUSÕES.....	169
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	173
	REFERÊNCIAS	175
	ANEXOS.....	191
	Anexo 1 – Ficha técnica da lipase.	193
	Anexo 2 – Fichas técnicas das gelatinas.....	195
	Anexo 3 – Cromatogramas das gelatinas de 200, 220, 240 e 280 <i>Bloom</i> obtidos na determinação do perfil de aminoácidos.	199
	Anexo 4 – Resultados de solubilidade em água (%) para os géis com e sem glutaraldeído.	205
	Anexo 5 – Resultados da razão de inchamento (%) para os géis com e sem glutaraldeído.	207
	Anexo 6 – Resultados de atividade enzimática para os ensaios de manutenção.	209

1 INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas compreende técnicas que possibilitam sua recuperação e reúso nos mais diversos processos industriais. Dentre as técnicas, a imobilização por aprisionamento em matrizes de polissacarídeos e proteínas foi extensivamente estudada e continua em estudo atualmente. Dentre as proteínas para o aprisionamento de enzimas, a gelatina constitui uma das mais utilizadas, porém, a imobilização com esta proteína requer cuidados em relação à estabilidade de imobilização.

A gelatina é uma proteína de origem animal, economicamente acessível e biocompatível com as enzimas, possui a capacidade de gelificação quando em contato com a água e calor e posterior resfriamento. Por ser solúvel em água, o gel formado possui a característica de ser instável, dissolvendo-se em água com facilidade, o que faz com que para o seu uso como agente de imobilização sejam necessárias altas concentrações e, geralmente, agentes de reticulação. Muitos trabalhos mostram o uso de gelatina em concentrações elevadas como agente de imobilização com sucesso, porém, a maioria destes não mostra o valor de *Bloom* da gelatina utilizada e as características físico-químicas. O valor de *Bloom* diz respeito à força do gel formado, sendo que no mercado estão disponibilizadas gelatinas de baixo, médio e alto valor de *Bloom*. As características físico-químicas podem influenciar na formação e estabilidade do gel, podendo ser diferentes para gelatinas de mesma origem de matéria prima, de acordo com a distribuição de aminoácidos e processo de extração empregado.

O uso de gelatina para produção de biofilmes está em pleno desenvolvimento. Estes filmes são utilizados como barreiras e para produção de embalagens, com a vantagem de serem biodegradáveis e originados de matéria prima de produção de baixo custo. Para a produção de biofilmes com boas propriedades mecânicas e estabilidade em diferentes condições de pH, água, presença de sais, variação de temperatura, dentre outras, são utilizados plastificantes.

Os plastificantes são moléculas adicionadas a géis em concentrações geralmente acima de 20 % cujas principais finalidades são a promoção de características reológicas e mecânicas específicas em biofilmes para embalagens de alimentos. A maioria dos plastificantes utilizados são hidrofílicos. O aumento do volume livre e a mobilidade molecular acarretada nos géis pelo uso do plastificante podem vir a auxiliar na imobilização e estabilidade de imobilização de enzimas em

géis. O uso de plastificantes em géis de polissacarídeos e proteínas para a imobilização de enzimas é algo a ser explorado. Sua incorporação nos géis de gelatina pode proporcionar maior estabilidade para a matriz de imobilização.

O presente foi motivado por testes prévios para imobilização de lipase em gelatina utilizando metodologias disponibilizadas em artigos científicos, onde se verificou que o rendimento de imobilização chegava a 100 %, mas que a estabilidade do gel formado não permanecia com o passar do tempo, e que pode ser justificado pela instabilidade e derretimento do gel. Verificou-se também que diversos são os tipos de gelatinas existentes e que a maioria dos trabalhos não especifica o tipo nem as características das gelatinas utilizadas. Percebeu-se que o uso de plastificantes em géis de gelatina para a produção de biofilmes se dá em uma faixa de 20 a 50 %, sendo que para a imobilização o uso destes é desconsiderado e que as concentrações de gelatina para a imobilização estão em torno de 80 % (em relação à massa de água). Diante disso, existem lacunas em relação a estudos que verifiquem a influência e possibilidade de uso de plastificantes na imobilização, seu uso em concentrações menores, seus efeitos na imobilização bem como faixas de concentração mais amplas para a gelatina.

Outro fator importante na imobilização de enzimas e que não é apresentado de forma clara é a migração desta para o meio após a imobilização. Como as metodologias de imobilização envolvem aprisionamento, adsorção e interações físicas, fatores como agitação, temperatura e pH podem influenciar na estabilidade da imobilização, promovendo rompimento ou derretimento da matriz, quebrando ligações ou outras alterações. A investigação mais detalhada da estabilidade da imobilização deve ser feita visando garantir que a imobilização seja eficiente e permita o reúso da enzima mantendo-a imobilizada.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a influência do valor de *Bloom* de gelatinas de mesma origem de matéria prima e de mesmo processo industrial adicionadas de plastificantes na imobilização de lipase, devido a esta enzima ser muito utilizada em diversos ramos industriais, bem como as metodologias para detecção da sua atividade envolverem processos mais simplificados. Estudou-se através de testes de solubilidade e razão de inchamento, a necessidade de reticulação. Buscou-se estudar uma ampla faixa de concentrações para a gelatina e concentrações abaixo de 10 % (em relação à massa de água) para os plastificantes, percentual este inferior ao utilizado em estudos para produção de biofilmes, onde a porosidade deve ser minimizada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma matriz de imobilização de lipase comercial utilizando gelatinas de diferentes valores de *Bloom* adicionadas de plastificantes hidrofílicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as gelatinas de *Bloom* 200, 220, 240 e 280 quanto a parâmetros físico-químicos e perfil de aminoácidos;
- Otimizar as concentrações de gelatina e plastificante para a imobilização da lipase, considerando-se como resposta a migração da lipase e as variáveis que poderiam influenciar na migração;
- Obter o rendimento de imobilização para a(s) amostra(s) otimizadas na etapa migração;
- Verificar a estabilidade da lipase imobilizada em diferentes condições operacionais (temperatura, pH, agitação e tempo);
- Determinar as melhores condições operacionais (temperatura, pH e tempo) para a lipase livre e imobilizada;
- Estudar o reuso da lipase imobilizada.
- Estudar a estabilidade da enzima imobilizada frente ao armazenamento.
- Caracterizar as matrizes de imobilização em relação a sua estrutura e morfologia.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentada uma fundamentação teórica baseada em referências bibliográficas sobre a imobilização de enzimas, sendo abordada de forma mais detalhada a imobilização por aprisionamento. Serão apresentados conceitos sobre gelatina, suas características gerais, propriedades do gel, bem como o uso para a imobilização de enzimas e os plastificantes como coadjuvantes na formação de géis mais estáveis. Serão apresentadas ainda as características gerais das lipases, modo de ação, a imobilização desta enzima e sua aplicação industrial e por fim, as considerações finais em relação ao exposto neste tópico.

3.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O uso de algumas enzimas como catalisadores de processos industriais torna-se limitado pelo elevado custo de produção e armazenamento. Durante o uso das mesmas, sua estabilidade diminui devido a mudanças ao longo do processo como, por exemplo, alterações de pH, da temperatura, entre outros fatores que levam a mudanças conformacionais e a demais efeitos cumulativos destes fatores. Uma vez que as enzimas são solúveis, sua recuperação a partir da mistura de substrato e produto não é economicamente viável (KOTWAL e SHANKAR, 2009). Diante disso, a imobilização de enzimas torna-se uma alternativa para a minimização ou eliminação de alguns dos problemas citados.

Enzimas imobilizadas são definidas como biocatalisadores que estão contidos ou localizados em um micro ambiente e que ainda mantém suas propriedades catalíticas, sendo, portanto, a imobilização, um método utilizado para a manutenção da estabilidade das enzimas, tornando-as mais atrativas para a indústria (MORENO-PIRAJAN e GIRALDO, 2011). Além da estabilidade, biocatalisadores imobilizados são, em geral, mais fáceis de manusear e podem ser utilizados repetidamente em uma série de reações operadas em regime batelada ou regime contínuo (WHITAKER *et al.*, 2003).

O uso de enzimas imobilizadas possui muitas vantagens, dentre elas a possibilidade de controle das reações, estabilidade mecânica (NAKHLA *et al.*, 2006) e ainda a eliminação da necessidade de uma inativação da enzima após a sua ação, fato este que se realizado pode ser

prejudicial a alguns produtos como, por exemplo, agentes de sabor (WHITAKER *et al.*, 2003). A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de enzimas imobilizadas, além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo (SEBRÃO *et al.*, 2007). Ainda, enzimas imobilizadas podem levar a maior produtividade por unidade de enzima, melhor controle ao longo da reação, possibilidade de operação contínua e automatização do processo, menor manipulação de materiais, obtenção de um produto que não contém o biocatalisador, estabilização da atividade da enzima e a produção de um único produto (WHITAKER *et al.*, 2003).

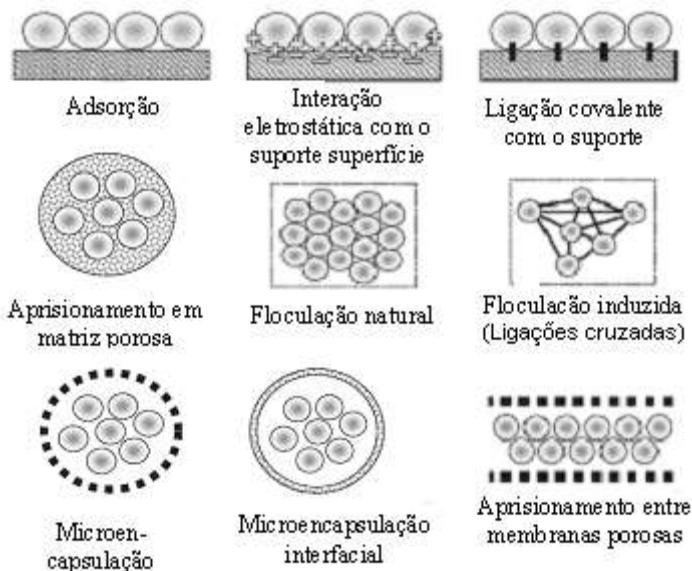
Técnicas e materiais utilizados como suportes têm sido estudados. Vários parâmetros são importantes e devem ser considerados quando se imobiliza uma enzima: resistência mecânica, estabilidade química e física, caráter hidrofóbico/hidrofílico e custo, entre outros (CONTESINI *et al.*, 2010).

A imobilização de enzimas pode ser realizada de várias maneiras, porém deve-se observar o método de imobilização, que pode afetar a atividade da mesma. Na Figura 1 são mostrados, resumidamente, os métodos mais utilizados para a imobilização de enzimas e micro-organismos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Adsorção, ligação covalente ou ligação eletrostática a um suporte, e o aprisionamento dentro de matrizes orgânicas ou inorgânicas inertes são as técnicas mais comuns para a imobilização de enzimas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Técnicas de adsorção são fáceis de serem aplicadas, porém as ligações entre enzima e suporte podem ser fracas, muitas vezes levando à lixiviação da fase ativa. A ligação covalente pode ocasionar maior grau de estabilização entre a enzima e o sólido. No entanto, a ligação covalente requer etapas químicas diversas que são, frequentemente, acompanhadas de perda de atividade enzimática. A imobilização de enzimas por interação eletrostática oferece algumas vantagens em relação a ligação covalente como estabilidade da enzima, regeneração fácil do suporte e menor perda de atividade enzimática. Porém, deve-se considerar que a enzima suportada deve operar com valor de pH compatível com o ponto isoelétrico, pois poderá haver mudanças de conformação da enzima em função do pH (MACARIO *et al.*, 2009).

Figura 1 – Diferentes métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptação de KOURKOUTAS *et al.*, (2004).

O aprisionamento é uma das técnicas de imobilização definida como uma restrição física da enzima dentro de um espaço confinado ou de uma rede (WON *et al.*, 2005) que permite a transferência de massa (substrato e produtos). As enzimas imobilizadas desta forma apresentam maior resistência à desnaturação térmica e química, bem como maior resistência ao armazenamento, estabilidade operacional, podendo ainda, reduzir o efeito de inibidores (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BETANCOR e LUCKARIFT, 2008; YANG *et al.*, 2009). A desnaturação química da enzima também é minimizada na imobilização por aprisionamento devido à inexistência de interações químicas entre a enzima e o polímero (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Segundo Moreno-Pirajan e Giraldo (2011), lipases imobilizadas por aprisionamento são mais estáveis do que as lipases imobilizadas por adsorção.

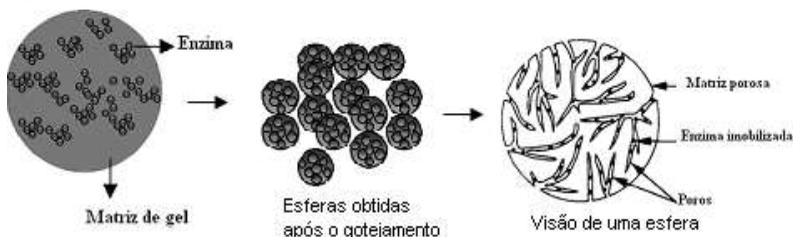
Os biocatalisadores imobilizados são destinados a uma grande variedade de reações, incluindo síntese, transformação, degradação ou ensaios com compostos de propriedades químicas diferentes. Desta forma, é desejável que os géis utilizados para o aprisionamento possuam características físico-químicas adequadas para satisfazer às diferentes

demandas. A natureza química dos compostos utilizados para a obtenção das matrizes de imobilização é de grande importância. Em geral, os precursores dos géis de imobilização são hidrofílicos e compatíveis com a enzima (CAO, 2005).

Exemplos de matrizes porosas utilizadas para este tipo de imobilização são os géis de polissacarídeos (alginatos, carragena, ágar, quitosana), gelatina, e outros (KOURKOUTAS *et al.*, 2004). Os géis formados a partir destas matrizes são caracterizados por não serem tóxicos e pela facilidade de execução dos métodos utilizados para a sua gelificação. Os alginatos são os polissacarídeos mais utilizados para a imobilização por aprisionamento, pois as partículas esféricas, onde as enzimas ficarão confinadas, podem ser obtidas por gotejamento em uma solução contendo íons carregados positivamente ou através da polimerização térmica. Estas esferas, geralmente, são transparentes e mecanicamente estáveis (PANESAR *et al.*, 2006).

As grandes vantagens da imobilização por aprisionamento são a execução rápida, econômica e fácil, sendo que o processo envolve condições amenas. As principais limitações do aprisionamento são: o possível vazamento lento das enzimas durante o uso contínuo e os fenômenos de transferência de massa que podem ser dificultados se a taxa de difusão for influenciada por diferentes condições da matriz (VILLENEUVE *et al.*, 2000; PANESAR *et al.*, 2006). Para a enzima aprisionada, as restrições de difusão aplicadas estão ligadas ao tamanho da matriz, a porosidade e o tamanho dos poros, o que pode causar a baixa atividade (CAO, 2005). Na Figura 2 pode-se observar a característica da imobilização por aprisionamento em relação à porosidade da matriz.

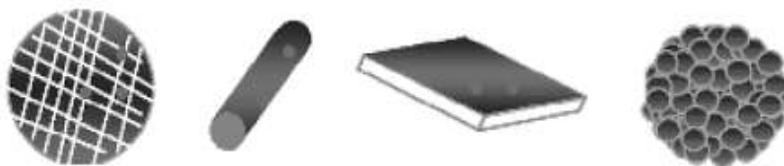
Figura 2 – Aspecto da imobilização de enzimas por aprisionamento.



Fonte: DORÁN, (1995); CAO, (2005); adaptada.

As propriedades geométricas das enzimas podem ser facilmente adaptadas a diversas formas de matrizes como cápsulas, filmes, fibras, etc., dependendo da aplicação e do método de aprisionamento. Embora a difusão possa ser uma limitação, há enzimas que quando aprisionadas em matrizes apresentam uma boa retenção da atividade ao longo do tempo. As possíveis formas geométricas para a imobilização por aprisionamento estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Geometrias da imobilização de enzimas por aprisionamento.



Fonte: CAO, (2005).

3.2 GELATINA

3.2.1 Definição e características gerais

Do ponto de vista químico, a gelatina é composta por grandes cadeias de aminoácidos, ligados por ligações peptídicas e estes aminoácidos contêm grupos funcionais ácidos e básicos (OCKERMAN e HANSEN, 1994). É uma proteína solúvel em água, obtida pela hidrólise controlada (65 a 68 °C) do colágeno (tecido conectivo branco fibroso) que inicialmente é insolúvel em água (BARBUT e MITTAL, 1991; OCKERMAN e HANSEN, 1994; DEMAN, 1999; DAMODARAN *et al.*, 2010).

Existem três tipos de gelatina: α , com massa molar de 80.000 a 125.000 Da; β , com massa molar de 160.000 a 250.000 Da; e γ , com massa molecular de 240.000 a 375.000 Da (POPPE, 1992). Comercialmente misturam-se as gelatinas para a obtenção de produtos com determinadas aplicações industriais (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

O objetivo na elaboração de gelatina é controlar a hidrólise do colágeno e converter o produto resultante em um material solúvel com

propriedades físicas e químicas desejáveis, entre elas a consistência do gel, aderência, cor e transparência (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

A estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina). Quanto mais elevado o conteúdo destes aminoácidos, maior a estabilidade das hélices. O colágeno desnatura a temperaturas superiores a 40 °C gerando uma mescla de espécies com uma, duas ou três cadeias polipeptídicas enroladas ao acaso (WONG, 1995). O resfriamento controlado (abaixo da temperatura de fusão) conduz à recuperação de uma estrutura helicoidal. Os géis formados pela gelatina podem ser considerados como um retorno parcial das moléculas para um estado ordenado (GIRARD, 1991).

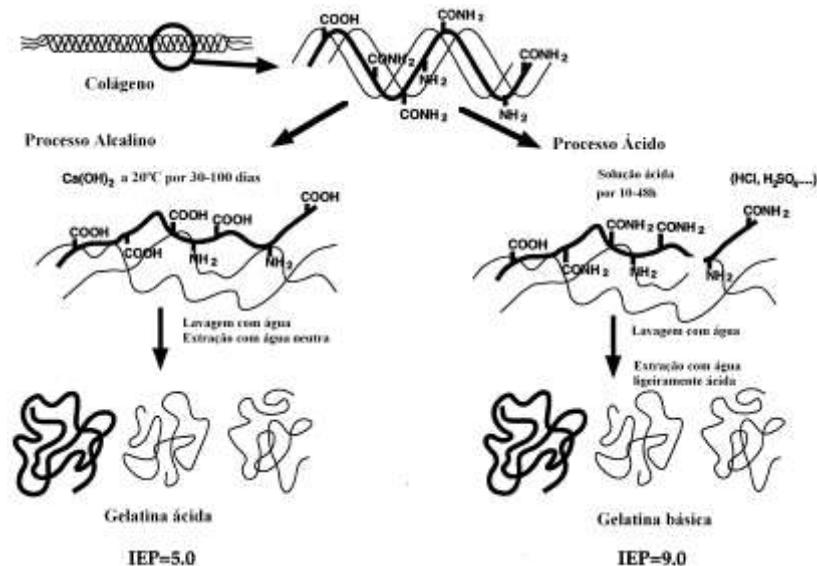
Para fins de produção industrial, a gelatina é obtida a partir da matéria prima por hidrólise parcial via ácida e alcalina (SCHRIEBER e GAREIS, 2007; DENIS *et al.*, 2008).

As fontes mais abundantes de gelatina são: pele de suínos (46 %), couro bovino (29,4 %) e ossos bovinos e suínos (23,1 %). Em 2007, a gelatina de peixe representava menos de 1,5 % da produção total de gelatina, mas este percentual foi o dobro no mercado em 2010, indicando que a produção de gelatina a partir de origem de não-mamíferos vem sem tornando cada vez mais importante (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos e no Brasil, para elaboração da gelatina comestível, utiliza-se basicamente a pele suína. A matéria prima é pré-tratada durante 8 a 12 semanas submersa na temperatura de 15-20 °C em uma solução de 2 a 5 % de hidróxido de cálcio, seguida de neutralização ou ação de ácido mineral diluído (< 5 %, pH 3,5 - 4,5) durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente e posterior lavagem (WONG, 1995; SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

O processo alcalino é amplamente utilizado para o pré-tratamento do couro bovino e tratamento ácido para a pele suína. A gelatina obtida pelo método ácido é denominada Tipo A e pelo método básico é do Tipo B. O tratamento despolimeriza o colágeno rompendo as ligações cruzadas inter e intramoleculares (WONG, 1995). Os dois tipos de gelatina diferem em sua viscosidade e na capacidade de combinar com hidrocolóides carregados negativamente, como exemplo a carragena (DEMAN, 1999). Na Figura 4 são mostradas as alterações no colágeno a partir dos processos ácido e alcalino de obtenção da gelatina.

Figura 4 – Aspectos químicos dos processos ácido e alcalino de obtenção da gelatina.



Fonte: Adaptação de TABATA e IKADA, (1998).

Essencialmente o processo consiste em três etapas fundamentais: separação do colágeno do restante dos componentes da matéria prima com a mínima alteração possível, hidrólise controlada do colágeno para sua conversão em gelatina, recozimento e secagem do produto final. É necessária uma hidrólise controlada para converter o colágeno (cujas massa molar oscila entre 345.000 e 360.000 Da) em gelatina (com uma margem de massa molar de 10.000 a 65.000 Da, e só em alguns casos chegando a 250.000 Da).

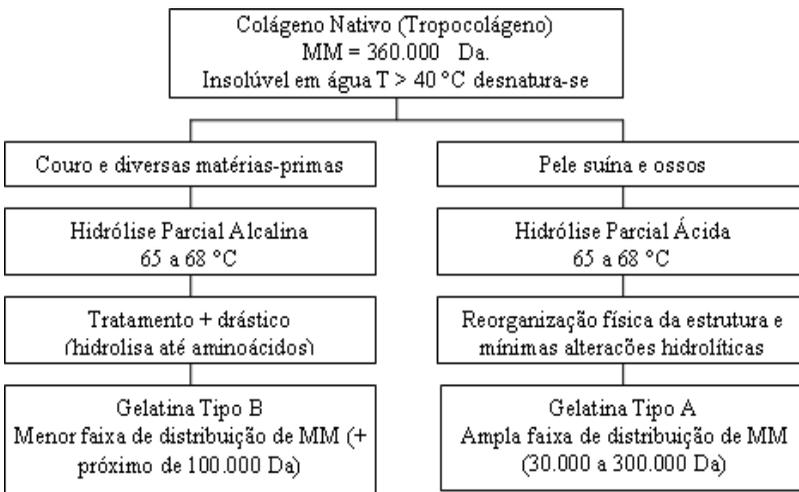
Uma hidrólise prolongada provoca a redução dos rendimentos e das propriedades desejáveis. A natureza e as condições da matéria prima podem influenciar no produto final (OCKERMAN e HANSEN, 1994). Segundo estes mesmos autores, além dos processos já citados, existe ainda o processo sob pressão com vapor.

A extração a temperaturas elevadas segue rompendo as ligações cruzadas, no entanto, sobretudo destrói as ligações de hidrogênio que são o papel chave da estabilidade da estrutura do colágeno (WONG, 1995).

O processo de transformação de colágeno em gelatina envolve as três seguintes alterações: ruptura de um número limitado de peptídeos, ruptura ou desorganização das ligações entre as cadeias laterais e mudança na configuração da cadeia. A última delas é a única mudança fundamental para conversão de colágeno em gelatina (DEMAN, 1999).

Segundo Deman (1999), as condições empregadas durante a produção de gelatina determinam suas características. Se há uma ruptura extensa de peptídeos, muitos resíduos laterais podem permanecer intactos e fragmentos solúveis são produzidos. Se muitas ligações laterais são destruídas, as moléculas de gelatina podem ter comprimentos de cadeia relativamente longos. Assim, há uma grande variedade de gelatinas. O retorno a uma estrutura altamente organizada não é possível (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). A Figura 5 mostra, resumidamente, um diagrama de fluxo da obtenção da gelatina. A gelatina extraída pelos dois processos segue para as etapas de filtração, evaporação, esterilização e secagem para a obtenção de um produto final em pó.

Figura 5 – Diagrama de fluxo simplificado do processo de obtenção de gelatina.



Fonte: Adaptação de SCHRIEBER e GAREIS, (2007).

3.2.2 Detalhamento dos processos de obtenção da gelatina

3.2.2.1 Processo ácido - gelatina tipo A

Aplicado, principalmente, para pele suína e ossos. No processo ácido ocorre uma reorganização física da estrutura do colágeno com um mínimo de alterações hidrolíticas. Como consequência há um ligeiro aumento dos grupos amino primários e dos grupos carboxílicos livres (OCKERMAN e HANSEN, 1994). O método ácido é o menos eficaz, mas como a matéria prima pele suína apresenta colágeno com menor grau de ligações inter cruzadas, este método acaba sendo adequado (WONG, 1995).

A massa molar dos produtos obtidos por este método é de 70.000 a 90.000 Da, com ponto isoelétrico em pH 8 - 9 (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). As gelatinas obtidas de pele suína apresentam géis mais transparentes e melhor cor do que as obtidas de couro bovino pelo processo alcalino. Segundo Ockermann e Hansen (1994), a gelatina obtida no processo ácido mantém muitas ligações cruzadas do colágeno e tem sido sugerido que este tipo de produto seja chamado de colágeno hidrolisado solúvel.

3.2.2.2 Processo alcalino - gelatina tipo B

É o sistema mais empregado em nível comercial. Qualquer material com colágeno (peles, nervos e osseína dos ossos) pode ser processado com esta técnica. A alcalinidade faz com que as substâncias distintas do colágeno como queratina, globulinas, mucopolissacarídeos, elastina, mucina e albuminas se modifiquem tornando-se mais solúveis. Os lipídeos se convertem em produtos polares. Com isso, quando submetidos à lavagem, estes produtos são facilmente removidos (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

O processo alcalino promove alterações químicas (reações hidrolíticas) no colágeno e o processo térmico tem a função de romper as ligações que mantêm a estrutura fibrilar do colágeno. Este procedimento libera amônia que é proveniente dos grupos amino do colágeno. Depois deste processo, as fibras ficam inchadas e a coesão interna se reduz. Este fato possibilita a ruptura de certas ligações peptídicas e a introdução de novos grupos iônicos nas moléculas (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

Alguns grupos específicos se rompem dando lugar à hidrólise das ligações cruzadas que mantêm as unidades de tropocolágeno; assim se

mantém as ligações intramoleculares das unidades básicas e o produto solubiliza-se facilmente em água. O processo alcalino pode gerar moléculas ligeiramente ramificadas com massas moleculares de 10.000 a 60.000 Da (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

O tratamento alcalino hidrolisa também a glutamina e a asparagina porque o ponto isoelétrico da gelatina, preparada por este processo, é de, aproximadamente, 5,0 em contraste com a gelatina obtida pelo método ácido (pH ~ 9,0) (WONG, 1995).

3.2.3 Propriedades físico-químicas da gelatina e dos géis de gelatina

A gelatina é praticamente insípida e inodora, sólida com aspecto vítreo, de uma massa específica de 1,3 a 1,4 Kg.L⁻¹. Quando submersa em água fria, hidrata na forma de partículas inchadas e quando estas partículas são aquecidas fundem na forma de dispersão. A gelatina é composta de carbono (50,5 %), hidrogênio (6,8 %), nitrogênio (17 %) e oxigênio (25,2 %) (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

As gelatinas Tipo A têm ponto isoelétrico entre 7 e 9 e do Tipo B entre 4,7 a 5,5. Através de modificações no processo podem ser obtidas gelatinas com ponto isoelétrico intermediário entre os tipos A e B. As diferenças de massa molecular podem influenciar diretamente nas propriedades físicas (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

A gelatina pode ter caráter anfótero, ou seja, dependendo do pH pode ter características negativas ou positivas. A umidade pode variar de 7 a 15 % de acordo com o grau de secagem. O conteúdo de cinzas deve ser inferior a 2 % (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

A gelatina forma géis reversíveis induzidos por frio que são estabilizados por ligações de hidrogênio. No entanto, a dissociação e a agregação do colágeno em gelatina solúvel (o componente de gelificação) necessitam de umidade e calor prolongados (DAMODARAN *et al.*, 2010).

A conversão de tropocolágeno em gelatina requer a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam a tripla hélice, transformando-a em uma configuração ao acaso que é característica da gelatina. O produto hidrolisado depende das ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas e os grupos reativos, livres amino ou carboxílicos terminais, que se formam (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

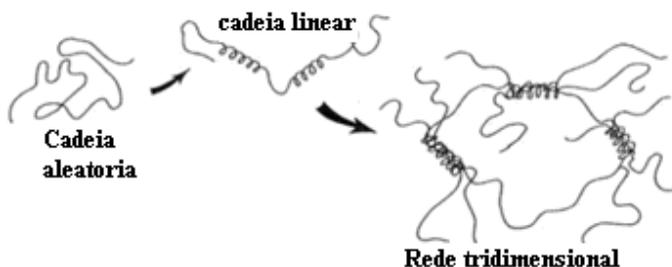
A distribuição das massas molares da gelatina determinará características como dispersibilidade em água, viscosidade, aderência e resistência do gel (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

Quanto maior a concentração de moléculas de baixa massa molar, menor a viscosidade e a resistência do gel. Este efeito se deve à exposição do colágeno e da gelatina a temperaturas elevadas ou à acidez ou alcalinidade elevada, o que pode também ser influenciado pela qualidade da matéria prima e tempo de maceração em álcali (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

Quando a gelatina é colocada em água fria, absorve 5 a 10 vezes sua própria massa em água e incha. Quando este material é aquecido acima do ponto de fusão, entre 27 e 34 °C, a gelatina dissolve-se. Este estado de transformação sol-gel é reversível. O ponto de fusão e de gelificação da gelatina estão correlacionados com a proporção de prolina e hidroxiprolina no colágeno original (HAUG *et al.*, 2004).

O gel obtido a partir de gelatina consiste em longas cadeias lineares, cada uma delas com ligações cruzadas com outras moléculas, em diversas posições no decorrer da cadeia. O gel se aproxima muito de um gel entrópico ideal. As cadeias moleculares flexíveis entre as ligações cruzadas são longas, o que faz com que o gel seja extensível. É um gel predominantemente elástico, pois as ligações cruzadas são permanentes (em temperaturas mais baixas) (DAMODARAN *et al.*, 2010). A Figura 6 mostra a formação do gel após o resfriamento.

Figura 6 – Formação da rede tridimensional do gel de gelatina após o resfriamento.



Fonte: Adaptação de SCHRIEBER e GAREIS, (2007).

Poppe (1992) descreveu que o mecanismo de formação de gel envolve a reversão de uma estrutura de bobina para hélice. Após o resfriamento, as regiões ricas em ácido imino de diferentes cadeias formam uma estrutura helicoidal, que é estabilizada por ligações de hidrogênio. Então ocorre a formação do gel tridimensional da matriz.

A gelificação da gelatina dissolvida permite um retorno da estrutura do colágeno por parte das moléculas desorganizadas da gelatina. No entanto, a gelatina comercial tem uma composição e uma estrutura heterogênea relacionada com as condições do processo de obtenção e da matéria prima. A obtenção pelo método alcalino contém mais grupos carboxílicos do que a obtida pelo tratamento ácido (WONG, 1995; SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

A nucleação que afeta as seções ricas em aminoácidos proporciona zonas de união para estabelecimento de uma rede tridimensional de gel. Durante o resfriamento posterior se produz um ordenamento adicional via ligações intra e interquaternárias. O enrolamento e repregueamento dão origem a um retorno da estrutura típica do colágeno e isto reforça a rigidez do gel. O resultado é, essencialmente, uma rede aberta formada através da associação de cadeias nas zonas de união, ricas em grupos amino, reforçadas por regiões nas quais se tem reconstituída a estrutura helicoidal do colágeno (WONG, 1995).

A qualidade da gelatina para uma determinada aplicação depende em grande parte de suas propriedades reológicas. Além das propriedades físico-químicas básicas como composição, solubilidade, transparência, cor, odor e sabor, os melhores atributos que definem a qualidade comercial da gelatina são a força do gel e a estabilidade térmica (temperaturas de fusão e gelificação). Para padronização, a força do gel é determinada utilizando um teste chamado de *Bloom* (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

A resistência do gel (força de *Bloom*) é uma medida de dureza, consistência, firmeza e compressibilidade de um gel a uma determinada temperatura, avaliada através da carga em g (gramas) requerida para produzir uma depressão no gel em condições normais. A resistência do gel também depende da concentração e da massa molar. As gelatinas comerciais oscilam de 50 a 300 g (*Bloom*) (OCKERMAN e HANSEN, 1994; SCHRIEBER e GAREIS, 2007). Segundo Segtnan e Isaksson (2004), a força de *Bloom* é o somatório das frações α e β da estrutura molecular da gelatina.

A temperatura de extração da gelatina afeta o índice de *Bloom*. O aumento do índice de *Bloom* leva a uma notável melhoria das propriedades mecânicas e a uma redução significativa da capacidade de absorção de água (LAI, 2009). De um modo geral, a gelatina extraída em baixa temperatura é mais dura, e apresenta maior valor do índice de *Bloom* (BIGI *et al.*, 2004).

Gelatinas com valores de *Bloom* altos possuem maiores pontos de fusão e gelificação, a cor é mais clara e o odor mais neutro (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

A natureza higroscópica da gelatina é a sua principal desvantagem para poder ser utilizada em filmes, cuja função é a de barreira de proteção. Estes filmes tendem a inchar ou dissolver quando em contato com a água. Consequentemente, a tendência atual na concepção de materiais à base de gelatina está focada no desenvolvimento de melhores propriedades de resistência mecânica e de resistência à água, através da combinação de gelatina com biopolímeros com diferentes características tais como lipídeos, proteína isolada de soja e polissacarídeos, plastificantes hidrofóbicos e hidrofílicos, polímeros sintéticos e agentes de modificação química (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Portanto, algumas determinações são importantes para caracterizar o comportamento de um gel de gelatina em relação ao meio onde está inserido. Razão de inchamento e a solubilidade em água interferem na aplicabilidade de géis de gelatina.

A razão de inchamento reflete a capacidade da gelatina em absorver água. O inchamento de amostras de gel provenientes de proteína isolada de soja e de gelatina é apresentado na Figura 7. Segundo Guerreiro *et al.* (2011), um maior inchamento ocorreu na matriz desenvolvida com soja e gelatina e em relação à matriz desenvolvida sem a gelatina devido à maior capacidade de interação da gelatina com a água (GUERRERO *et al.*, 2011).

Figura 7 – Inchamento de amostras de gel de proteína de soja e gelatina após a imersão em água.



Fonte: Adaptação de GUERRERO *et al.*, (2011).

Para reduzir a solubilidade em água de filmes à base de gelatina, alguns autores têm modificado a matriz, sendo a reticulação e o uso de plastificantes as alternativas mais estudadas. Jiankang *et al.* (2007) afirmam que a razão de inchamento de géis de gelatina reticulados (*cross-linking*) é menor do que em géis não reticulados. O uso destas alternativas pode modificar outras propriedades do gel de gelatina, o que deve ser observado em relação à aplicação deste gel, que passa a não ser mais comestível (VANIN *et al.*, 2005).

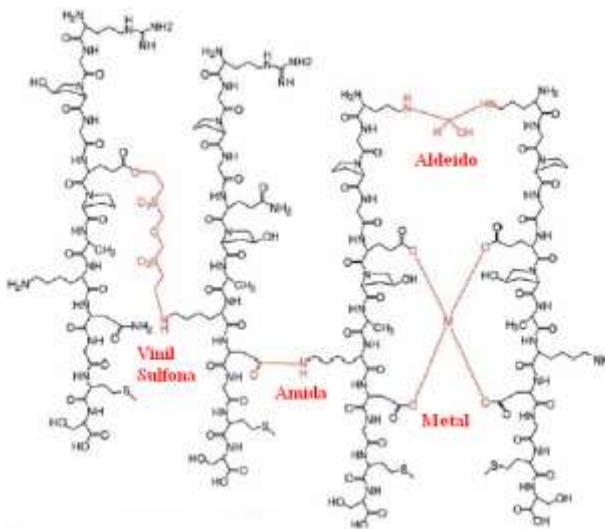
3.3 USO DE GELATINA COMO AGENTE IMOBILIZANTE DE ENZIMAS

O uso de gelatina como agente imobilizante de enzimas é econômico, biocompatível e sua estrutura facilita múltiplas combinações de interações moleculares. A gelatina é utilizada sozinha ou misturada a outros agentes imobilizantes (SHEELU *et al.*, 2008, GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011), sendo a maioria dos estudos apresentados desta forma. A grande maioria dos trabalhos que utiliza gelatina como imobilizante não especifica o valor de *Bloom* (como pode ser visualizado na Tabela 1, apresentada mais adiante).

O uso potencial de gelatina como matriz de imobilização foi estudado em 1980 e mostrado pelo grupo de pesquisadores Gianfreda, Parascandola e Scardi. A principal vantagem do uso da gelatina, apresentada pelo grupo de pesquisadores foi a facilidade na formação de gel sem inativação do biocatalisador confinado (VUJČIĆ *et al.*, 2011). A gelatina oferece a vantagem de uma grande variedade de grupos amino que podem ser úteis para a realização da imobilização (MAALEJ-ACHOURI *et al.*, 2009).

Geralmente os géis de gelatina podem ser modificados através de seus grupos amino, carboxila e hidroxila, sendo que a maioria das modificações ocorre na lisina, hidroxilisina e nos grupos amino N-terminal. As modificações utilizando poli-funcionais como dialdeídos baseiam-se na reação com vários grupos laterais da gelatina, levando a ligações cruzadas (Figura 8), ou seja, o gel adquire mais resistência mecânica, melhor estabilidade e resistência à água (MARTUCCI *et al.*, 2006, SCHRIEBER e GAREIS, 2007; GUO *et al.*, 2012). Por outro lado, a transferência de massa é dificultada com o uso de concentrações altas de agentes reticulantes (DRURY e MOONEY, 2003).

Figura 8 – Estruturas de ligações cruzadas utilizando vários agentes de modificação.



Fonte: Adaptação de SCHRIEBER e GAREIS (2007).

Dos produtos químicos utilizados na reticulação de gelatina, o glutaraldeído tem sido amplamente utilizado, pois tem a vantagem de ação rápida no endurecimento (menos de 1 minuto com concentrações de 10 a 20 %) e ainda, é facilmente disponível e econômico (MARTUCCI *et al.*, 2006).

Normalmente, a imobilização de uma enzima em uma matriz de gelatina é feita através da mistura de soluções enzimáticas com o gel de gelatina e com o agente reticulante. O gel resultante contém enzimas ocluídas, parcialmente ligadas à gelatina através da formação de base de *Schiff* (SHEELU *et al.*, 2008). O glutaraldeído, um agente reticulante, possui dois grupos funcionais capazes de se ligar a grupos amina livre de lisina e hidroxilisina, resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas em moléculas de gelatina. Todos os grupos amina livres reagem com grupos aldeído do glutaraldeído para formar bases de *Schiff* (MOZAFARI e MOZTARZADEH, 2010). Na Figura 9 pode-se observar o mecanismo de formação da ligação entre a gelatina e o glutaraldeído via ligações cruzadas em gelatina de cadeia longa.

Figura 9 – Mecanismo de formação da ligação entre a gelatina e o glutaraldeído via ligações cruzadas em gelatina de cadeia longa.

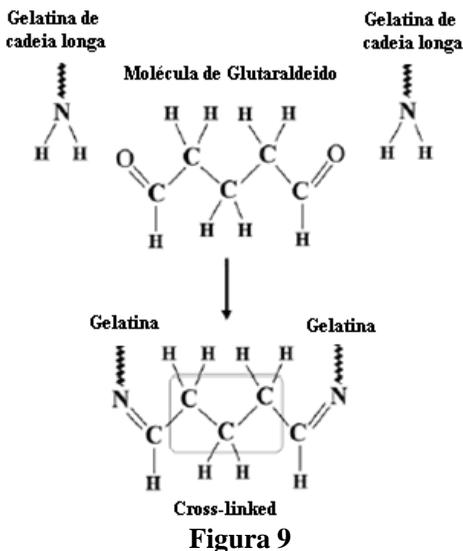


Figura 9

Fonte: Adaptação de MOZAFARI e MOZTARZADEH, (2010).

Diversos são os trabalhos disponíveis na literatura que utilizam a gelatina, com e sem reticulação, ou adicionada de outros materiais para a imobilização de enzimas.

Paula *et al.* (2008), aplicando gelatina na imobilização de inulinase para a hidrólise de sacarose e testando a enzima livre e imobilizada, obtiveram como temperaturas ótimas de processo 55 e 60 °C, respectivamente. O valor de pH ótimo para ambas as enzimas foi de 3,5. A partir dos resultados obtidos os autores sugerem o uso potencial da gelatina para a imobilização de inulinase.

Maalej-Achouri *et al.* (2009) utilizando xilanase de *Talaromyces thermophilus* imobilizada em diferentes compostos para a produção de xilo-oligossacarídeos a partir de resíduos agroindustriais, obtiveram como melhor resultado para a imobilização em gelatina (10 %) a utilização de glutaraldeído como agente de reticulação. O rendimento de imobilização foi de 98,8 % e a recuperação de atividade foi de 99,2 %. A enzima imobilizada apresentou mudança no pH ótimo de 7,0 para 8,0, porém a temperatura ótima não foi afetada. A imobilização também

reteve 94 % da atividade catalítica inicial da enzima, após ser utilizada durante 13 vezes consecutivas.

Tastan *et al.* (2011), em estudo sobre a imobilização de lacase para utilização em biossensor para detecção de compostos fenólicos tóxicos, testaram diferentes massas de gelatina (5, 7,5 e 10 mg) dissolvidas em 200 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0. Verificaram que a atividade da enzima imobilizada foi baixa para a maior proporção de gelatina (10 mg), apresentando um gel denso que pode ter causado limitação ao processo de difusão. Já para a menor massa de gelatina testada (5 mg/200 μL), os autores afirmam que houve instabilidade mecânica, sendo o gel facilmente rompido quando inserido o eletrodo utilizado no biossensor. Concluíram que para a imobilização de lacase em gel de gelatina, a concentração de 7,5 mg/200 μL de gelatina possibilitou uma estabilidade mecânica suficiente.

A eficiência de imobilização de lecitinase em gelatina para posterior aplicação na degomagem de óleo foi estudada por Sheelu *et al.* (2008). Obtiveram um rendimento para a lecitinase imobilizada de 80 %, em gel contendo 43,5 % de gelatina reticulada com glutaraldeído.

O desenvolvimento de uma membrana de eletrodos onde são presas em um gel de gelatina uma enzima e uma proteína mediadora foi estudado por De Wael *et al.* (2011). A enzima, uma peroxidase, foi imobilizada em gelatina obtendo sucesso na detecção de peróxido de hidrogênio.

A Tabela 1 apresenta um resumo de mais alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas enzimas em gelatina ou gelatina combinada com outros polímeros, com ou sem reticulação.

Tabela 1 – Aplicação de gelatina na imobilização de enzimas (continua)

Objetivo	Condições experimentais	Resultados	Referências
Avaliar o efeito dos sais de cromo na imobilização de invertase	Misturas de gelatina fotográfica e carboximetilcelulose foram adicionadas de invertase e reticuladas com acetato de cromo, sulfato de cromo e sulfato de cromo e potássio. Alíquotas da mistura foram colocadas em filme de poliéster e deixadas secar por 24 horas. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	O melhor agente de reticulação foi o sulfato de cromo, com 78 % de atividade relativa.	EMREGUL <i>et al.</i> , (1996).
Imobilização de β -galactosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Mistura de alginato e gelatina (250 <i>Bloom</i>) e com o uso de glutaraldeído.	A imobilização resultou em 56 % de atividade relativa, mantida por 35 dias. As condições ótimas de temperatura e pH permaneceram as mesmas das enzimas livres, 50 °C e 4,5.	TANRISEVEN e DOGAN, (2002)
Imobilização de lipase de pâncreas suíno.	Mistura de alginato de sódio (5 %) com gelatina (3 %) reticulada com glutaraldeído. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	Enzimas imobilizadas ficaram estáveis e foram reutilizadas várias vezes sem perda significativa de atividade enzimática.	FADNAVIS <i>et al.</i> , (2003).
Imobilização de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	O gel de gelatina foi preparado pela dissolução de 0,75g de gelatina em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3) e a este foi adicionado 13,09 mg de lactase, obtendo um volume final de 10 mL. O glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante. Não indica o valor de Bloom.	As condições ótimas de operação para a enzima imobilizada foram de pH 6,5 e temperatura de 40 °C. A atividade relativa obtida para enzima imobilizada, cujo valor foi de 80 %, manteve-se durante 17 usos e 34 dias.	NUMANOGLU e SUNGUR, (2004).

Tabela 1 – Aplicação de gelatina na imobilização de enzimas (continuação)

Objetivo	Condições experimentais	Resultados	Referências
Imobilização de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	O gel de gelatina foi preparado pela dissolução de 0,75g de gelatina em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3) e a este foi adicionado 13,09 mg de lactase, obtendo um volume final de 10 mL. O glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	As condições ótimas de operação para a enzima imobilizada foram de pH 6,5 e temperatura de 40 °C. A atividade relativa obtida para enzima imobilizada, cujo valor foi de 80 %, manteve-se durante 17 usos e 34 dias.	NUMANOGLU e SUNGUR, (2004).
Imobilização de invertase em sistema de poliacrilamina-gelatina	Misturas de gelatina e poliacrilamida adicionadas de invertase foram reticuladas com acetato de cromo, sulfato de cromo e sulfato de cromo e potássio. Alíquotas da mistura foram colocadas em filme de poliéster de deixadas secar por 24 horas. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	O melhor agente de reticulação foi o acetato de cromo, com 77 % de atividade relativa. Os valores de K_M foram 86 mmol.L^{-1} para a invertase livre e 166 mmol.L^{-1} para a imobilizada. O reúso foi de 20 vezes durante 2 meses.	EMREGUL <i>et al.</i> , (2006).
Imobilização de α -galactosidase em blenda de gelatina e alginato para redução de oligossacarídeos em soja.	Mistura de 0,5 g de alginato, 0,8 g de gelatina, 4 mL de glicerol e 2 mL de tampão acetato (0,2 mol.L^{-1} pH 4,8) que foi gotejada em solução composta por CaCl_2 adicionada de glutaraldeído (5 % v/v). <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	A atividade máxima para a enzima imobilizada foi obtida em 50 °C, a mesma encontrada para a enzima livre. Após 24 horas de processo à temperatura de 50 °C, a enzima livre permaneceu com 44 % de atividade residual e a imobilizada, com 75 %.	NAGANAGOUDA e MULIMANI, (2006).

Tabela 1 – Aplicação de gelatina na imobilização de enzimas (conclusão)

Objetivo	Condições experimentais	Resultados	Referências
Imobilização de α -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> em gelatina e sua aplicação na remoção de rafinose em extrato hidrossolúvel de soja.	Dissolução da gelatina e posterior uso de formaldeído para reticulação. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	O pH ótimo da enzima imobilizada foi de 5,4 (livre 4,8). A temperatura ótima passou de 50 °C (livre) para 54 °C (imobilizada), sendo a operação em modo contínuo a mais eficiente na remoção de rafinose do leite de soja.	NAGANAGOUDA <i>et al.</i> , (2007).
Imobilização de glicoamilase	Gelatina bovina (200 Bloom) reticulada com poliglutaraldeído (25 %).	O rendimento de imobilização foi de 70 %. Sob condições ótimas, não houve migração da enzima para o tampão.	TANRISEVEN e ÖLÇER, (2008).
Remoção de corantes reativos utilizando lacase imobilizada	Mistura de alginato de sódio e gelatina (concentrações de 0 a 4,0 %) e alginato de sódio (2,0 %) adicionadas de polietilenoglicol (PEG) reticuladas com glutaraldeído. <i>Não indica o valor de Bloom.</i>	Obtiveram um aumento na capacidade de descoloração pela lacase chegando a 25 %. Afirmaram ainda que a estabilidade térmica e o pH foram sensivelmente melhorados em comparação à lacase livre.	WANG <i>et al.</i> , (2008).

3.4 PLASTIFICANTES

3.4.1 Definição e características gerais

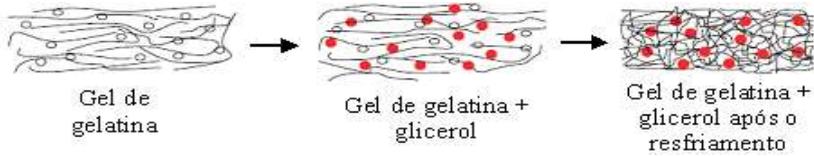
Plastificantes são substâncias de baixa massa molar que são incorporadas em uma matriz de polímero (proteína ou polissacarídeo), aumentando a flexibilidade e a processabilidade dos filmes (SOTHORNVIT e KROCHTA, 2000).

Os plastificantes, geralmente, são necessários na incorporação de filmes à base de polissacarídeos e proteínas, sendo que as proteínas são geralmente superiores aos polissacarídeos na sua capacidade de formar filmes com melhores propriedades mecânicas e de barreira (SOTHORNVIT e KROCHTA, 2000; VANIN *et al.*, 2005; JIMÉNEZ *et al.*, 2012).

A compatibilidade entre o plastificante e o polímero é de grande importância para a plastificação ocorrer de forma eficaz e vários parâmetros podem ser determinados para verificar este aspecto como a polaridade, constante dielétrica, ligações de hidrogênio e a solubilidade. Outro fator importante é a hidratação, pois plastificantes com valores de solubilidade próximos a do polímero requerem menos energia para fundir. A temperatura de fusão ou gelificação está relacionada com a força de solvatação do plastificante e ao tamanho da molécula. Ainda, a permanência no meio está relacionada à volatilidade e resistência à migração e extração em água e uma baixa taxa de difusão no polímero (VIEIRA *et al.*, 2011).

A adição de plastificantes em filmes confere algumas características como o aumento de processabilidade e resistência dos filmes, capacidade de aumento do volume livre e mobilidade molecular dos polímeros, pois estes reduzem as forças de coesão nos filmes através da limitação das forças intermoleculares responsáveis pelas interações de cadeia para cadeia (SOTHORNVIT e KROCHTA, 2000; VANIN *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2011; JIMÉNEZ *et al.*, 2012). A Figura 10 mostra o mecanismo de incorporação do glicerol em gel de gelatina. A incorporação do manitol em gel de gelatina é muito semelhante ao apresentado na Figura 10 para o glicerol.

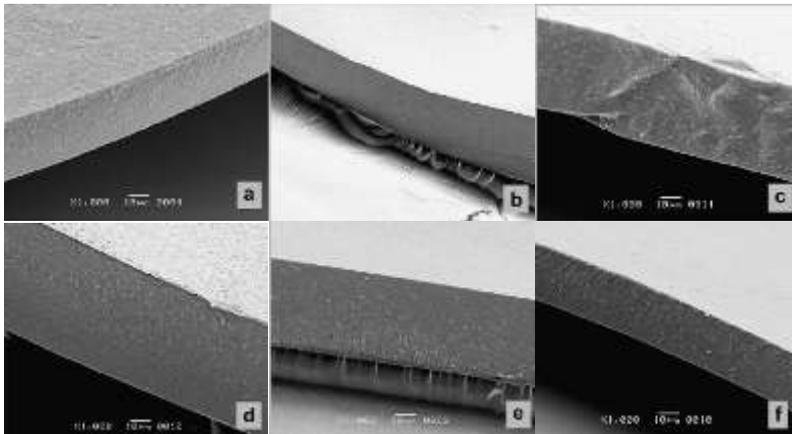
Figura 10 – Mecanismo de incorporação do glicerol em gel de gelatina.



Fonte: Adaptação de HOQUE et al., (2011).

Estes plastificantes reduzem a tensão de deformação, dureza e cargas eletrostáticas. Afetam também o grau de cristalinidade, claridade ótica, condutividade elétrica, interferem ainda na resistência à degradação biológica, evitam fissuras e, em altas concentrações, podem evitar a formação de poros (VIEIRA *et al.*, 2011). A Figura 11 mostra a característica morfológica em amostras de filmes de kefiran adicionadas de plastificantes: sem plastificante (a), plastificado com 25 g de galactose (b) glicose (c), sacarose (d), glicerol (e), sorbitol (f) por 100 g de polissacarídeo (PIERMARIA *et al.*, 2011). Pode-se observar que a morfologia dos géis de kefiran apresentam-se sem porosidade, resultado este característico de géis onde foram utilizando plastificantes em concentrações mais elevadas.

Figura 11 – Microscopia via ATR/FT-IR de géis de kefiran adicionados de plastificantes.



Fonte: PIERMARIA et al., (2011).

Os plastificantes podem ser divididos em duas classes, quanto à solubilidade em água: hidrofílicos e hidrofóbicos. Plastificantes hidrofílicos dissolvem-se em meios aquosos e se adicionados em altas concentrações podem levar ao aumento da difusão de água em um polímero. Ao contrário, os plastificantes hidrofóbicos fecham microvazios existentes no filme, levando a uma diminuição na absorção de água e podem, ainda, causar separação de fases levando à formação de zonas de descontinuidade no filme (VIEIRA *et al.*, 2011).

Kowalczyk e Baraniak (2011) testaram os efeitos de glicerol (3 - 7 %) e sorbitol (4 - 8 %) em filmes de proteínas isoladas de ervilhas (10 %). Verificaram que os filmes plastificados com sorbitol apresentaram menor permeabilidade do vapor de água e maior solubilidade, comparando-se com o glicerol. Nos filmes contendo glicerol, o incremento deste levou ao aumento da permeabilidade do vapor de água, mas não afetou a solubilidade dos filmes, diferença esta justificada pela diferença de higroscopicidade dos plastificantes. Verificaram também que a variação de pH (7,0; 9,0 e 11,0) não afetou a significativamente a permeabilidade do vapor de água e a solubilidade.

Na Tabela 2 alguns plastificantes utilizados em filmes de polissacarídeos e proteínas são apresentados. A maioria dos trabalhos citados na Tabela 3 utiliza proporções de plastificante acima de 20 % em relação à massa de proteína ou polissacarídeo, o que acarreta em uma grande permeabilidade do vapor de água e maior extensibilidade do filme. A literatura ainda é escassa em relação a concentrações menores de plastificantes.

Tabela 2 – Plastificantes utilizados em filmes de polissacarídeos e proteínas.

Plastificante	Biopolímero	Referência
Ribose, xilose, glicose, frutose, manose, sacarose, maltose, isomaltose, trealose, xilitol, manitol e sorbitol.	<ul style="list-style-type: none"> • Amido de milho 	BAEK <i>et al.</i> , (2004).
Glicerol	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina e gelana; • Amidos (mandioca, milho e inhame); • Gelatina; • Quitosana, amido de mandioca e gelatina • Gelatina e álcool polivinílico • Proteína isolada de soja e gelatina 	LEE <i>et al.</i> , (2004); MALI <i>et al.</i> ; (2006); BERGO e SOBRAL, (2007); COPPOLA <i>et al.</i> , (2008); ZHONG e XIA, (2008); RIVERO <i>et al.</i> , (2010); HOQUE <i>et al.</i> , (2011); ALVES <i>et al.</i> , (2011); GUERRERO <i>et al.</i> , (2011).
Glicerol, etilenoglicol, dietileno e propilenoglicol.	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina 	VANIN <i>et al.</i> , (2005)
Sorbitol, glicerol	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina • β-lactoglobulina • Proteína isolada de ervilhas 	THOMAZINE <i>et al.</i> , (2005); CHANASATTRU <i>et al.</i> , (2008); KOWALCZYK e BARANIAK, (2011).
Sorbitol	<ul style="list-style-type: none"> • Caseína e pululana 	KRISTO e BILIADERIS, (2006).
Tributilcitrate, acetiltributilcitrate, trietilcitrate, acetiltriethylcitrate	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina 	ANDREUC CETTI <i>et al.</i> , (2009).
Sorbitol, polietilenoglicol	<ul style="list-style-type: none"> • Amido de mandioca 	ABDORREZA <i>et al.</i> , (2011).

3.4.2 Propriedades de géis de gelatina adicionados de plastificantes

A capacidade de proteínas para formar uma matriz contínua tem sido estudada há muito tempo sendo diversas as proteínas de origem animal e vegetal que têm recebido atenção na tecnologia de filmes. As proteínas são interessantes como biomaterial, pois possuem uma estrutura específica com base em 20 aminoácidos que conferem uma ampla gama de propriedades funcionais e de formação de película em função de várias condições extrínsecas ou intrínsecas, como por exemplo, o tipo de plastificante e concentração (VANIN *et al.*, 2005).

A gelatina foi uma das primeiras proteínas empregadas na formação de biomateriais. Este biopolímero desperta ainda muito interesse por ser uma matéria prima abundante, produzida praticamente em todo o mundo. Outras razões são: o custo relativamente baixo e excelentes propriedades funcionais e filmogênicas (THOMAZINE *et al.*, 2005).

Filmes de gelatina são plastificados geralmente por compostos hidroxil, sendo os polióis frequentemente citados como bons materiais para plastificação. Estes compostos possuem a capacidade de reduzir a ligação de hidrogênio enquanto aumentam o espaçamento intermolecular pela redução das forças, aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, melhorando a flexibilidade do filme e diminuindo a temperatura de transição vítrea (CAO *et al.*, 2009; RIVERO *et al.*, 2010).

A seleção do plastificante utilizado em géis em geral baseia-se, normalmente, na compatibilidade entre o plastificante e a proteína, na permanência no filme e na quantidade necessária para a plastificação. Apesar das diferentes possibilidades de plastificantes que podem ser usados em filmes, o sorbitol e o glicerol são os mais utilizados (VANIN *et al.*, 2005).

Além de influenciar nas propriedades dos filmes, alguns plastificantes, como o sorbitol, também podem cristalizar dentro do filme, dependendo das condições de armazenamento e o material pode perder completamente suas características. Então, plastificantes antigos e novos devem ser continuamente estudados (VANIN *et al.*, 2005).

Cao *et al.* (2009), em estudo sobre o efeito de diferentes plastificantes (sacarose, ácido tartárico, ácido málico, PEG, manitol, sorbitol, etilenoglicol, dietilenoglicol, trietilenoglicol, etanolamina e dietanolamina) nas propriedades mecânicas e de barreira de filme de gelatina, observaram que o sorbitol e o manitol favoreceram a obtenção de um filme homogêneo e transparente. Porém, após o armazenamento

por cerca de 10 dias, o manitol tendeu a uma recristalização na superfície da película. A separação de fases de filmes implica que não houve mistura total entre o plastificante e o biopolímero. O mesmo não ocorreu com o sorbitol. Os autores afirmam que, para o filme em estudo, a proporção ideal foi de 0,2 g de sorbitol/g de gelatina.

A influência das concentrações de glicerol, etilenoglicol, dietileno e propilenoglicol em filmes de gelatina foi testada por Vanin *et al.* (2005). Foram testadas cinco diferentes proporções dos plastificantes: 10, 15, 20, 25 e 30 g plastificante/100 g de gelatina. Como resultados observaram que todos os plastificantes testados apresentaram boa compatibilidade com a gelatina. Afirmam, ainda, que o aumento do plastificante nas condições testadas acarretou em um aumento da permeabilidade do vapor de água através dos géis.

Resultado semelhante foi encontrado por Jongjareonrak *et al.* (2005) ao estudarem o efeito dos plastificantes glicerol, sorbitol, etilenoglicol e polietilenoglicol em géis com 25, 50 e 75 % adicionados em géis obtidos de gelatinas de peixes. O aumento mais significativo da permeabilidade do vapor de água ocorreu quando a proporção de glicerol passou de 25 % para 50 % e apenas ocorreu um aumento discreto quando passou de 50 % para 75 % de plastificante.

O aumento da concentração de plastificante resulta no aumento da permeabilidade do vapor de água, pois a inserção do mesmo entre as cadeias de macromoléculas aumenta o volume livre do sistema e favorece a estrutura do filme, tornando-o menos denso e mais permeável. De acordo com o plastificante utilizado, pode-se obter diferentes valores de permeabilidade da água, o que pode ser justificado por diferenças na natureza higroscópica dos mesmos (JONGJAREONRAK *et al.*, 2005).

Concentrações de misturas de glicerol e sorbitol de 25 e 55 g/100g de gelatina e de 2 g de gelatina para 100 mL de água para a elaboração de filmes foram testadas por Thomazine *et al.* (2005). Verificaram que o aumento do plastificante levou a filmes com características de diminuição da rigidez e aumento da extensibilidade que se deve à redução nas interações entre as cadeias do biopolímero.

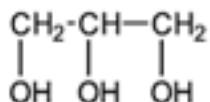
Portanto, dependendo das características desejadas para filmes de gelatina, deve-se observar a quantidade de plastificante a ser utilizada.

3.4.3 Glicerol e manitol

Glicerol (1,2,3 propanotriol) é um álcool simples, muito utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentos, farmacêutica, papel e celulose,

dentre outras. Também é conhecido como glicerina (WANG *et al.*, 2001). Quando puro, é incolor, viscoso e inodoro com sabor doce. Como mostrado na Figura 12, o glicerol possui 3 hidroxilas que são responsáveis pela sua solubilidade em água e sua natureza higroscópica (SILVA *et al.*, 2009; RAHMAT *et al.*, 2010).

Figura 12 – Estrutura química da molécula de glicerol.



Fonte: SILVA *et al.*, (2009).

Além de ser extensivamente estudado ao longo dos anos como plastificante, o glicerol, atualmente, constituiu uma fonte de carbono versátil com aplicações possíveis em fermentações industriais (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011). Estudos de novas aplicações para este álcool devem-se ao fato da grande produção de biodiesel, sendo que a utilização deste como matéria prima pode representar uma alternativa ambientalmente correta.

O D-manitol é um poliálcool (hexitol) muito abundante na natureza. Hexitóis são compostos naturais que contêm seis átomos de carbono agrupados com grupos hidroxila que ocorrem nas formas acíclicas ou cíclicas. Entre os mais comuns hexitóis encontrados na natureza estão o manitol (derivado da manose), o sorbitol (derivado basicamente da glicose e frutose) e o galactitol (derivado da galactose) (BRANCO *et al.*, 2010). A estrutura química do D-manitol está apresentada na Figura 13.

Figura 13 – Estrutura química da molécula de D-manitol.

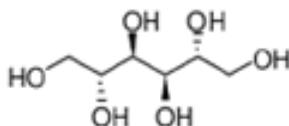


Figura 13

Fonte: OLIVEIRA *et al.*, (2009).

O D-manitol é encontrado sob a forma de pó branco. Quando cristaliza, apresenta a forma de prismas ortorrômbicos e, eventualmente,

aglomerados de agulhas finas. O sabor é levemente doce, inodoro e provoca certo frescor ao entrar em contato com nosso paladar. Seu ponto de fusão é entre 165-168 °C, sua massa específica é aproximadamente 1,52 g/mL a 20 °C e é altamente solúvel em água e piridina, bem como em álcool a quente. É pouco solúvel em álcool a frio e insolúvel em éter etílico. O manitol é um isômero do sorbitol (WISSELINK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Este poliól pode ser obtido a partir de processos fermentativos utilizando bactérias, leveduras e fungos ou pode ser extraído de uma vasta quantidade de plantas, como abóboras, salsão, cebola, ervas e azeitonas. Maná, o exudado produzido por *Fraxinus ornus*, foi a fonte comercial de manitol por muitos anos. Atualmente, o manitol é produzido industrialmente pela hidrogenação catalítica de glicose e frutose (1:1), utilizando como catalisador níquel e gás hidrogênio em alta temperatura (120 – 160 °C) e pressão. Nesta reação, a glicose é completamente convertida em sorbitol, a α -frutose em manitol e a β -frutose em sorbitol. A composição da mistura é cerca de 25 % manitol e 75 % sorbitol. O manitol é recuperado por cristalização, pois é menos solúvel do que o sorbitol (WISSELINK *et al.*, 2002; SAHA e RACINE, 2011).

Esforços têm sido feitos para a produção em escala industrial de manitol a partir de processos fermentativos. Bactérias acidoláticas homo e heterofementativas, leveduras e fungos são conhecidos por produzir manitol a partir de glicose e frutose (SAHA e RACINE, 2011).

3.5 LIPASES

Lipases são caracterizadas como enzimas hidrolíticas (quando exógenas) e apresentam três características importantes comuns às enzimas: são proteínas (exceto por um pequeno grupo de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas), são catalisadores e exibem seletividade sobre substratos. Caracterizam-se por ser a forma mais comum e ubíqua de catálise biológica (DAMODARAN *et al.*, 2010; NELSON e COX, 2011).

3.5.1 Características gerais e modo de ação

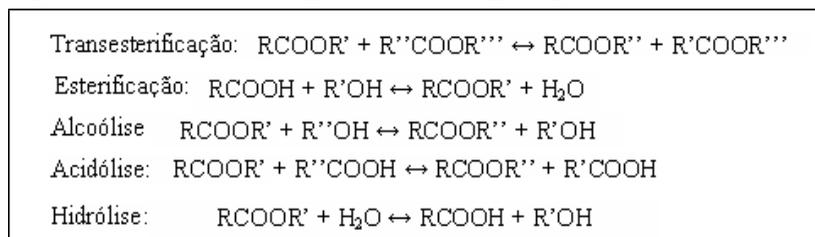
Lipases (triacilglicerol hidrolase) (E.C. 3.1.1.3) são distintas de outras carboxilesterases por agirem apenas na interface óleo-água (KOBLOITZ, 2008; DAMODARAN *et al.*, 2010). Estas enzimas

catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol, na interface óleo-água, fenômeno conhecido como ativação interfacial (CONTESINI *et al.*, 2010).

A função biológica das lipases é catalisar a hidrólise de ésteres para produzir ácidos graxos livres, di e monoglicerídeos e glicerol. As lipases também são capazes de catalisar a reação inversa, atingindo esterificação, acidólise, transesterificação, interesterificação e alcoólise (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Um esquema das principais reações catalisadas por lipases está apresentado na Figura 14.

Enquanto as lipases exógenas costumam estar associadas à hidrólise de acilgliceróis liberando os ácidos graxos, as lipases endógenas envolvem a liberação de ácidos graxos de cadeia curta e o rearranjo de grupos acil graxo ao longo do esqueleto do glicerol, criando triacilgliceróis (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Figura 14 – Diferentes reações catalisadas por lipases.



Fonte: KOBLITZ, (2008).

A hidrólise total das ligações éster de triacilgliceróis pode ser realizada a altas temperaturas e pressão, na presença de vapor ou catalisadas quimicamente. No entanto, o uso de lipases na presença de água é mais atraente já que a reação se processa em condições brandas de pressão e temperatura e com especificidade (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Lipases microbianas são o segundo maior grupo de biocatalisadores industriais, perdendo somente para as amilases bacterianas (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). Existem em animais, plantas e micro-organismos (CONTESINI *et al.*, 2010). Quando obtidas de fontes diferentes, possuem propriedades diferentes no que diz respeito à especificidade, termoestabilidade, pH ótimo de atividade e liberação de ácidos graxos. Particularmente, as enzimas

microbianas são mais estáveis do que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente (HASAN *et al.*, 2006).

Cerca de 90 % de todos os biocatalisadores industriais são produzidos via fermentação submersa, muitas vezes utilizando meios otimizados e micro-organismos geneticamente modificados (CONTESINI *et al.*, 2010). A otimização das condições de fermentação diz respeito principalmente às fontes de carbono e nitrogênio e sua relação, indutores, temperatura, etc. (LI e ZONG, 2010).

As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido, principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (HASAN *et al.*, 2006).

3.5.2 Propriedades bioquímicas das lipases

As propriedades bioquímicas das lipases são essenciais para que se possa otimizar ou conduzir um processo de forma efetiva. Consideram-se como propriedades bioquímicas, o pH e a temperatura ótimos de atuação e atividade de água, caracterizados como influência ambiental, a presença de inibidores, a especificidade e a seletividade.

3.5.2.1 Influência ambiental: pH, temperatura e atividade de água

As enzimas têm uma dependência característica de estabilidade em relação ao pH, sendo que duas tendências gerais merecem atenção: (1) o intervalo de pH de estabilidade enzimática no geral é mais amplo do que o intervalo de pH para a atividade enzimática e (2) a estabilidade da enzima diminui rapidamente em valores de pH de desestabilização, pois a desestabilização por pH é um processo cooperativo (DAMODARAN *et al.*, 2010). Assim, as lipases possuem intervalos de pH ótimos para a sua estabilidade e pHs ótimos para maximizar a sua atividade de acordo com sua origem.

Geralmente, as lipases bacterianas têm pH ótimo de atuação neutro ou alcalino com exceção da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, que tem um pH ótimo de atuação de 4,8. Lipases bacterianas possuem estabilidade em uma ampla faixa de pH, de 4,0 a 11,0 (GUPTA *et al.*, 2004). Lipases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* são estáveis em pHs de 7,0 a 9,0. Porém, algumas enzimas mantêm plena atividade após 24 horas de incubação em pHs entre 5,0 e 11,0. A maioria das

lipases de *Bacillus*, *Geobacillus* em particular, são termoestáveis e têm a sua temperatura ótima entre 45 e 50 °C (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

A maioria das lipases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* possuem atividade em valores de pH ótimo entre 5,0 e 6,0. A temperatura ótima encontra-se entre 40 e 60 °C, possuindo estabilidade térmica em uma ampla faixa de valores de pH (CONTESINI *et al.*, 2010).

A temperatura tem efeitos previsíveis e opostos sobre a atividade de enzimas. A sua elevação aumenta a energia livre no sistema; o resultado líquido é a diminuição da barreira de energia para a ocorrência das reações, que são aceleradas. A temperatura ótima para a atividade de uma enzima resulta dos efeitos líquidos da temperatura sobre a ativação e inativação. Enquanto a ótima é aquela em que a velocidade da reação da enzima é maior, essa condição tem duração limitada e, com o tempo, a desnaturação progressiva logo predomina e muito da atividade original é perdida (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Os valores de temperatura ótimos para as lipases, assim como os de pH, variam de acordo com a origem. A maioria das lipases de origem bacteriana possui temperatura ótima na faixa de 30-60 °C. A estabilidade térmica das lipases pode ser aumentada com o uso de substâncias orgânicas como, por exemplo, sorbitol e glicerol, sendo a atividade mantida em meios a 70 °C durante 150 minutos. Lipases de *Pseudomonas* podem manter a estabilidade em temperaturas que chegam a 100 °C, com meia vida de poucos segundos. Lipase obtida de *Bacillus stearothermophilus*, caracterizada como termotolerante, possui um tempo de meia vida de 15-25 minutos a 100 °C (GUPTA *et al.*, 2004).

Os principais efeitos da redução a água é a redução do meio de difusão e/ou cosubstrato. A extensão da redução do conteúdo de água é caracterizada pelo termo termodinâmico atividade de água (A_w), pois este termo mostra como ela se comporta em relação aos solutos. Para as enzimas hidrolíticas, à medida que a A_w é reduzida dentro do intervalo de 0,90 a 0,35, o progresso das reações é reduzido, e aproxima-se a uma posição de quase equilíbrio de hidrólise em extensão limitada. Quando a A_w é aumentada, retoma-se o progresso da reação de modo que é representativo daquele ocorrido na A_w anterior. Portanto, esse efeito é reversível (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Kempka *et al.* (2008.a), utilizando a técnica de superfície de resposta no estudo sobre a otimização da produção e caracterização de lipase utilizando o fungo *Penicillium verucosum* em fermentação em

estado sólido utilizando farelo de soja como substrato, obtiveram como valores ótimos de processo a temperatura de 27,5 °C; umidade inicial do substrato de 55 % para um rendimento de enzima de 40 U/g de farelo seco. A atividade enzimática ótima do extrato enzimático bruto foi obtida em temperaturas de 30 a 45 °C e pH 7,0.

3.5.2.2 Especificidade e seletividade

A importância do uso de enzimas em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente, sendo que grande versatilidade de reações catalisadas, condições brandas de reação, natureza regio, quimio e enantiosseletiva são algumas de suas vantagens (CARVALHO *et al.*, 2005). A especificidade é uma das mais importantes propriedades das enzimas, principalmente a especificidade em relação ao substrato e a especificidade em relação à posição da ligação (LI e ZONG, 2010).

A regiosseletividade é a capacidade de reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato. As lipases são classificadas como lipases não-específicas e 1(3)-específicas, sendo que as primeiras hidrolisam de forma aleatória o triglicérideo, liberando os ácidos graxos de qualquer ligação com o glicerol, e as últimas hidrolisam os ácidos graxos das ligações 1 ou 3. A Tabela 3 mostra a seletividade de lipases de diferentes fontes (KOBELITZ, 2008).

Seletividade de substrato é a propriedade de reconhecer um tipo de ácido graxo e hidrolisar as ligações nas quais ele está envolvido com exclusividade ou com maior rapidez e a enantiosseletividade caracteriza-se como a propriedade de reagir com um determinado isômero do substrato exclusiva ou mais rapidamente do que com outros isômeros da mesma substância (KOBELITZ, 2008).

Em geral, as lipases produzidas por *Bacillus* apresentam alta tolerância a solventes orgânicos, sendo muito úteis na síntese de ésteres para a indústria de alimentos, cosméticos e produção de biodiesel. Apresentam seletividade diversa em relação ao comprimento da cadeia do lipídeo e poucas apresentam especificidade posicional (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

Tabela 3 – Seletividade de lipases de diferentes fontes.

Fonte da lipase	Seletividade de substrato	Regiosseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	C, M, L	1, 3 >>2
<i>Candida lipolytica</i>	C, M, L	1, 3 >2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C, M, L	1, 3 >>2
<i>Mucor javanicus</i>	M, L >>L	1, 3 >2
Pancreática	C > M, L	1, 3
<i>Penicillium roqueforti</i>	C, M >> L	1, 3
Pré-gástrica	C, M >> L	1, 3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M, L >>C	1, 3 >2
<i>Pseudomonas</i> sp.	C, M, L	1, 3 >2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C > M, L	1 > 3 >>2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C, M > L	1, 3
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >>C	1, 3 >>2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M, L > C	1, 3 >2
<i>Rhizopus niveus</i>	M, L > C	1, 3 >2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L > C	1, 3 >>>2

C: ácidos graxos de cadeia curta; M: de cadeia média; L: de cadeia longa.

Fonte: KOBLITZ, (2008).

Fungos do gênero *Penicillium* são bons produtores de lipases extracelulares. Nas últimas duas décadas, as lipases produzidas por estes fungos foram estudadas extensivamente (LI e ZONG, 2010). O gênero *Aspergillus* produz lipases com grande potencial e diversidade das suas propriedades, tendo grande estabilidade e seletividade. Assim, produtos de alto valor (produtos farmacêuticos, agrotóxicos, compostos aromáticos, etc.) podem ser obtidos com o uso de diversas subespécies de *Aspergillus* (CONTESINI *et al.*, 2010).

3.5.2.3 Metais, surfactantes e inibidores

A atividade das lipases pode sofrer efeitos estimulatórios ou inibitórios com a presença de íons metálicos, embora, geralmente cofatores não sejam necessários para a atividade catalítica destas

enzimas. Vários estudos apresentam os efeitos de estimulação ou inibição pela adição de íons no meio. A lipase produzida a partir de *Penicillium chrysogenum* foi ligeiramente ativada com a presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} , enquanto Sn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} causaram inativação moderada (LI e ZONG, 2010). A lipase obtida de *Pseudomonas aeruginosa*, MB5001, foi fortemente inibida por 1 mmol.L^{-1} de ZnSO_4 (94% de inibição) porém foi estimulada pela adição de 10 mmol.L^{-1} de CaCl_2 . Os íons também podem estimular ou inibir a produção de lipases. A produção de lipases de *Bacillus sp.* obteve melhores resultados quando íons de magnésio, ferro e cálcio foram adicionados ao meio de produção. O rendimento de lipases produzidas por *Aspergillus niger* também foi potencializado pelo uso de Mg^{2+} no meio de cultivo (SHARMA *et al.*, 2001).

Assim, cátions divalentes, como cálcio, muitas vezes estimulam a atividade das lipases; em contrapartida, a atividade é drasticamente inibida pela presença de metais pesados como Co^{2+} , Ni^{2+} e Sn^{2+} e ligeiramente inibida pela presença de Zn^{2+} e Mg^{2+} (GUPTA *et al.*, 2004).

Os surfactantes são, geralmente, utilizados para a preparação da emulsão no ensaio de atividade da lipase e também na purificação das enzimas. Estes podem destruir as estruturas terciárias das enzimas, levando à desnaturação. Por outro lado, a agregação das enzimas seria minimizada pelo uso destes compostos, o que melhoraria a atividade (LI e ZONG, 2010; GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). Diversos estudos já foram realizados para determinar o efeito de surfactantes sobre lipases, sendo que a influência destes sobre a atividade das enzimas variou muito. Como por exemplo, podem-se citar estudos com o uso de Triton X-100, Tween 20, Tween 80, nas mais variadas concentrações (LI e ZONG, 2010).

3.5.3 Imobilização de lipases

A versatilidade das lipases leva a múltiplas aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, cosméticos, proteção ambiental, agrotóxicos, biossensores e produção de biodiesel. A imobilização deste biocatalisador é uma possibilidade de torná-lo ainda mais atraente para o uso industrial (YÜCEL, 2012.).

Pelo fato das lipases serem espontaneamente solúveis em soluções aquosas (por serem uma proteína) seus substratos naturais não têm esta característica. O uso de um solvente apropriado ou de um agente emulsionante ajuda a superar o problema de contato íntimo entre

a enzima e o substrato, portanto, a utilização prática de lipases em sistemas pseudohomogêneos implica em dificuldades tecnológicas. Ocorrem restrições em relação ao produto (características finais do produto dependem as condições de processamento) e restrições em relação ao processo. Se a lipase é imobilizada, torna-se uma fase independente dentro do sistema de reação (BALCÃO *et al.*, 1996).

A imobilização de lipases permite que esta seja fisicamente separada do meio reacional e prontamente reutilizada. Além disso, oferece alguns benefícios para a aplicação industrial como estabilidade ao pH, temperatura, fácil recuperação e a redução da inibição pelos produtos, tornando possível seu uso em operações contínuas. No entanto, o custo elevado das lipases imobilizadas, comercialmente disponíveis, dificultam sua utilização em grande escala (PALLA *et al.*, 2011).

Na literatura existem muitos artigos que relatam técnicas de imobilização de lipases, tais como adsorção física em um material suporte, aprisionamento ou microencapsulação e ligação covalente em uma matriz sólida. Os materiais típicos utilizados para este fim incluem quitina, celulose, sílica e polissacarídeos (KHARRAT *et al.* 2011).

O aprisionamento da lipase implica na retenção da mesma em uma estrutura/matriz de um polímero. A lipase imobilizada por aprisionamento é mais estável do que a lipase fisicamente adsorvida, além de ser um método simples, permitindo que a lipase mantenha grande parte de sua atividade e estabilidade (MORENO-PIRAJAN e GIRALDO, 2011).

Na Tabela 4 pode-se observar alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases em diversos tipos de suportes. Verifica-se que na atualidade existe uma preferência pela imobilização de lipases utilizando adsorção, daí a necessidade da continuidade de estudos que envolvam o aprisionamento de lipases.

Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases nos mais diversos tipos de suportes/matrizes (continua)

Objetivo	Tipo de lipase e agente de imobilização	Resultados	Referências
Imobilização de lipase em polímeros hidrofílicos.	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada por aprisionamento em géis de vários polímeros (alginato, quitosana e agarose).	Ocorreu maior atividade para a lipase imobilizada em esferas de quitosana do que para a lipase imobilizada com alginato. A agarose apresentou uma absorção excessiva de água o que levou a desestabilização da matriz, não sendo, portanto, utilizada na imobilização da lipase.	BETIGERI e NEAU, (2002).
Imobilização de lipase por aprisionamento e a hidrólise de óleo de oliva em sistema bifásico.	Lipase pancreática de origem suína imobilizada em esferas de k-carragena tratadas com polietilenoimina.	A atividade relativa da enzima imobilizada foi de 50 % após 5 ciclos de reutilização.	DESAI <i>et al.</i> , (2004).
Imobilização em fibra de poliéster e aplicação na hidrólise de alguns óleos vegetais.	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em fibra de poliéster ativada com glutaraldeído.	O pH ótimo da enzima foi deslocado de 6 para 7 com a imobilização. A temperatura ótima foi 40 °C. O armazenamento a 4 °C da lipase imobilizada reteve 90 % da atividade após 60 dias, sendo que a livre permaneceu com 75 % da atividade nas mesmas condições de armazenamento.	YIGITOGU e TEMOÇIN, (2010).

Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases nos mais diversos tipos de suportes/matrizas (continuação)

Objetivo	Tipo de lipase e agente de imobilização	Resultados	Referências
Imobilização em sílica.	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em aerogel contendo sílica via adsorção.	A temperatura ótima para a lipase livre e imobilizada foi mesma. A imobilização aumentou a estabilidade em relação à temperatura e manteve sua atividade após 4 meses de armazenagem a 4 °C.	KHARRAT <i>et al.</i> , (2011)
Preparação e modificação de quitosana para imobilização de lipase	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em partículas de quitosana obtidas pela precipitação e modificação por aminação redutiva, com incorporação de 12 átomos de carbono aos grupos amina nativos.	As partículas modificadas tornaram-se mais hidrofóbicas do que as não modificadas. Houve uma hiperativação da enzima na ordem de 3 vezes mais, sendo mantida a conversão elevada durante 7 ciclos de reutilização (168 horas), sendo a modificação da quitosana eficaz para a imobilização.	PALLA <i>et al.</i> , (2011).
Obtenção de ácidos graxos poliinsaturados através da hidrólise de óleo de peixe.	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp. imobilizada em fase aquosa com o uso de tampão e octano.	O grau de hidrólise foi de 12 % para a lipase livre e 40 % para a imobilizada. Após 5 ciclos de uso, a lipase imobilizada manteve 80 % de atividade relativa.	YAN <i>et al.</i> , (2011).

Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases nos mais diversos tipos de suportes/matrizas (continuação)

Objetivo	Tipo de lipase e agente de imobilização	Resultados	Referências
Imobilização de lipase em sílica mesoporosa	Lipase pancreática de origem suína imobilizada via adsorção em sílica mesoporosa sintetizada com silicato de sódio e gelatina biodegradável como agente de estrutura.	A sílica mesoporosa obtida foi caracterizada como amorfa. As condições ótimas de atividade para a lipase imobilizada foram pH 8,0 e temperatura de 45 °C, superiores a lipase livre. A atividade relativa da lipase imobilizada foi de 45 % após a incubação a 60 °C por 2 horas e da lipase livre de 20 %.	WANG <i>et al.</i> , (2011).
Incremento da atividade catalítica e da estabilidade da lipase por imobilização em organobentonita	Lipase pancreática de origem suína (atividade de 15-35 U/mg). A imobilização foi em 2 tipos de organobentonitas com hidrofobicidades diferentes via adsorção.	Os suportes foram eficientes para a imobilização da lipase sendo ajustadas a estrutura e a hidrofobicidade da bentonita e havendo um incremento de atividade. Houve um declínio na Ea na reação catalisada pela lipase imobilizada em relação à lipase livre.	DONG <i>et al.</i> (2012).

Tabela 4 – Resumo de alguns trabalhos existentes na literatura onde foram imobilizadas lipases nos mais diversos tipos de suportes/matrizas (conclusão)

Objetivo	Tipo de lipase e agente de imobilização	Resultados	Referências
Imobilização de lipase via ligação covalente em quitosana e quitosana-gel utilizando diferentes protocolos de ativação.	Lipase de <i>Candida antarctica</i> via ligação covalente em quitosana e quitosana-alginato utilizando como protocolos de ativação glicidol, glutaraldeído e etilenodiamina.	Foram obtidas atividades de $422,44 \pm 50,40$ e $378 \pm 34,70$ U/g de suporte para a lipase imobilizada em quitosana e quitosana-alginato, respectivamente, sendo que os melhores resultados de estabilidade térmica foram para a lipase imobilizada em quitosana-alginato ativada com glutaraldeído 2 %.	SILVA <i>et al.</i> , (2012).
Imobilização de lipase microbiana em bagaço de oliva	Lipase comercial denominada Lipozyme TL 100L (atividade 16,05 U/mL). A imobilização foi por adsorção física utilizando glutaraldeído como agente de reticulação em bagaço da produção de óleo de oliva.	As condições ótimas de imobilização foram com 9,0 % (v/v) de lipase em pH 7,5. A lipase imobilizada permaneceu com 80 % de atividade após 10 usos consecutivos.	YÜCEL, (2012).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de enzimas em processos industriais está cada vez mais difundida e são notórias as vantagens oferecidas por estes biocatalisadores. As lipases são enzimas que vêm se destacando em relação às propriedades que apresentam e aos produtos que podem catalisar. Na revisão de literatura apresentada, percebe-se que a imobilização das enzimas é algo muito útil no reúso das mesmas e na manutenção de propriedades catalíticas, que podem ser afetadas quando a enzima é disposta de forma livre no meio reacional. Diversas são as formas e suportes de imobilização, sendo que na imobilização por aprisionamento as matrizes de polissacarídeos predominam como material mais utilizado.

O uso da gelatina é amplamente difundido em estudos de desenvolvimento de filmes para coberturas e embalagens. Na imobilização, existem trabalhos com o uso desta proteína, porém os mesmos não especificam de forma clara as características da matriz de imobilização, havendo, portanto, lacunas na literatura em relação à imobilização de enzimas utilizando gelatina. Os plastificantes podem vir a contribuir na obtenção de uma matriz de imobilização mais estável, pois interagem com a proteína. Verificou-se pela revisão de literatura que não existem trabalhos que relacionem a imobilização de enzimas em matrizes adicionadas de plastificantes.

Novos estudos que possibilitem o uso da gelatina com diferentes valores de *Bloom* bem e dos plastificantes no desenvolvimento de matrizes de imobilização de enzimas, estudos das concentrações, tipos de plastificantes e o comportamento da enzima imobilizada nas mais diversas condições de processo, caracterizam-se por objetivos deste trabalho e o justificam. A escolha da lipase para a imobilização se deu pelo seu amplo uso e pela facilidade de obtenção da sua atividade, podendo-se utilizar a técnica de hidrólise de ácidos graxos em óleo de oliva, técnica descrita no próximo capítulo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo faz-se uma descrição dos diversos métodos experimentais que foram empregados na caracterização das gelatinas e das matrizes de imobilização, testes de imobilização e migração, e determinação de parâmetros operacionais para a lipase imobilizada. Também serão apresentados os materiais, reagentes e equipamentos.

4.1 LOCAIS

Os experimentos de imobilização foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC e no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. As Microscopias Eletrônicas de Varredura e a Difração de Raios-X foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural – LCM do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e a cromatografia dos aminoácidos, no Laboratório de Fontes Proteicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

4.2 MATERIAIS

4.2.1 Lipase e substratos

Para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática, utilizou-se uma lipase comercial cuja ficha técnica está apresentada no Anexo 1. Como substrato principal, foi utilizado azeite de oliva (La Violetera), com acidez total menor do que 1 %, sendo que todo volume utilizado ao longo dos experimentos foi obtido de um mesmo lote. Para os ensaios e obtenção de ácidos graxos, utilizou-se como substratos além do azeite de oliva (La Violetera), óleo de soja (Soya), óleo de canola (Salada), óleo de milho (Liza), óleo de girassol (Liza), efluente de laticínio e efluente de frigorífico de suínos.

4.2.2 Gelatinas e plastificantes

As gelatinas utilizadas como agentes imobilizantes caracterizam-se por gelatinas de origem de pele bovina, granulometria de 30 mesh, com valores de *Bloom* de 200, 220, 240 e 280 g (Gelnex), cujas fichas técnicas estão apresentadas no Anexo 2.

Como plastificantes, foram utilizados glicerol e manitol (Vetec), ambos de padrão analítico, caracterizados por serem plastificantes hidrofílicos, sendo estes compatíveis com a proteína utilizada. Definiu-se o uso de glicerol tomando como base seu amplo uso em trabalhos de pesquisa como plastificante e sua recente produção, já o manitol, ainda trata-se de um poliol pouco aplicado como plastificante em filmes de gelatina.

4.2.3 Reagentes

Os principais reagentes utilizados foram: acetona, etanol (99 %), éter, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, sulfato de cobre, sulfato de potássio, hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, todos de padrão analítico.

4.3 EQUIPAMENTOS

Dentre os equipamentos que foram utilizados, citam-se os principais: Banho-maria Quimis; pHmetro de bancada (Quimis); Incubadora com agitação orbital (Solab); Câmara de germinação (Solab); Estufa com circulação interna (Solab); Estufa (Alpax 400-4ND), Balança analítica (Marte); Aparelho para medição de atividade de água (Aqualab[®]) modelo CX2; Centrífuga Q-222B2 (Quimis), mufla (Quimis), HPLC, microscópio eletrônico de varredura modelo XL30 marca Philips, difratômetro marca Philips, X'Pert.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Caracterização físico-química das gelatinas

4.4.1.1 Proteína

Para a determinação da proteína foi utilizado o método de Kjeldahl clássico. Pesou-se 1 g da amostra em papel de seda.

Transferiu-se para o balão de Kjeldahl (papel + amostra). Adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 g de mistura catalítica. Levou-se ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução tornar-se azul-esverdeada e livre de material não digerido. Aqueceu-se por mais uma hora. Deixou-se esfriar. Procedeu-se a destilação mergulhando-se a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Adicionou-se ao frasco com a amostra digerida solução de hidróxido de sódio a 30 %. Aqueceu-se até a ebulição e destilou-se até obter cerca de 250-300 mL do destilado. Titulou-se o ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹ com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹, usando vermelho de metila como indicador. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo da proteína (BRASIL, 2005).

$$\text{Proteínas(\%)} = \frac{V.0,14.f}{M} \quad (\text{Equação 1})$$

onde V é a diferença entre o volume, em mL, de ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹ e o volume, em mL, de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ gastos na titulação, M é a massa da amostra, em gramas e f é o fator de conversão de nitrogênio total em proteína (5,55 para gelatina).

4.4.1.2 Umidade

A determinação da umidade foi realizada utilizando-se o método gravimétrico. Foram pesadas 2 a 10 g de amostras em cápsulas de porcelana. Colocaram-se as amostras em estufa de recirculação a 105 °C por, aproximadamente 4 horas. Resfriaram-se as amostras em dessecador e pesou-se. Repetiu-se o procedimento de aquecimento e resfriamento até massa constante. A determinação foi realizada em triplicata. Utilizou-se a Equação 2 para o cálculo da umidade (BRASIL, 2005).

$$U(\%) = \frac{100.N}{M} \quad (\text{Equação 2})$$

onde U (%) é a umidade ou substâncias voláteis em percentual, N é a massa final da amostra, em gramas, quanto atingida a massa constante e M é a massa de amostra, em gramas, antes do aquecimento.

4.4.1.3 Lipídeos

Foram determinados através do método de extração direta em Soxhlet. Pesou-se 2 a 5 g de amostra em papel de filtro e amarrou-se com fio de lã previamente desengordurado de forma a se obter um cartucho. Transferiu-se o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet e acoplou-se ao extrator um balão de fundo chato previamente dessecado em estufa a 105 °C. Adicionou-se éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Manteve-se, sob aquecimento em chapa elétrica, a extração contínua por 8 horas. Retirou-se o cartucho e destilou-se o éter. Transferiu-se o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105 °C e manteve-se por cerca de uma hora. Resfriou-se em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Pesou-se e repetiram-se as operações de aquecimento por 30 minutos em estufa e resfriamento até massa constante. A Equação 3 foi utilizada para a quantificação dos lipídeos (BRASIL, 2005).

$$\text{Lipídeosou extrato etéreo(\%)} = \frac{100 \cdot A_1}{A} \quad (\text{Equação 3})$$

onde A_1 é a massa do resíduo obtido após o resfriamento (calculado pela diferença da massa, do balão contendo o resíduo e do balão vazio), em gramas, quando atingido a massa constante e A é a massa, em gramas, de amostra.

4.4.1.4 Cinzas

Foram obtidas pelo método de incineração em mufla a 550-570 °C. Pesou-se de 5 a 10 g da amostra em cápsula, previamente aquecida em mufla. Refriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se. A Equação 4 foi utilizada para a quantificação das cinzas (BRASIL, 2005).

$$\text{Cinzas(\%)} = \frac{100 \cdot A_1}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

onde A_1 é a massa do resíduo obtido após o resfriamento (calculado pela diferença da massa da cápsula contendo o resíduo e da cápsula vazia), em gramas, quando atingida a massa constante e A é a massa, em gramas, de amostra.

4.4.1.5 Atividade de Água (A_w)

Obteve-se com o auxílio de aparelho Aqualab[®], modelo CX2 (Decagon Device inc.) devidamente calibrado onde foram determinadas as atividades de água a uma temperatura de aproximadamente 20 °C, em triplicata. O equipamento AquaLab[®] utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado para medir a A_w de uma amostra.

4.4.1.6 pH

De acordo com a metodologia de Schrieber e Gareis (2007), utilizou-se um potenciômetro de pH onde o eletrodo foi inserido em soluções de gelatina a 6,67 % à temperatura de 55–60 °C, sendo determinado para todos os *Blooms* de gelatinas.

4.4.1.7 Formação de gel

Avaliou-se visualmente a partir da dissolução de 5 g de amostra em 30 mL de água destilada à temperatura de 50 °C. A mistura foi vertida em placas de Petri e colocada em refrigeração à temperatura de 8 °C durante 24 horas. Foram consideradas as amostras que formaram gel as que puderam ser retiradas da placa de Petri sem que houvesse rompimento (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

4.4.1.8 Ponto de Fusão

Para a determinação do ponto de fusão das gelatinas e dos géis de imobilização, foi utilizada a metodologia de Choi e Regenstein (2000). Para tanto, foram preparadas soluções das gelatinas puras (todos os *Blooms*) a 6,67 %. Uma alíquota de 5 mL de cada solução foi transferida para tubos de vidro. Estes tubos, vedados com parafilme, foram aquecidos em banho-maria a 60 °C por 15 minutos. Após, os tubos foram imediatamente resfriados em água gelada e deixados a 10 °C por 16 a 18 horas para maturação. Passado este período, cinco gotas de uma mistura de clorofórmio 75 % e de corante alaranjado de metila (25 %) foram adicionadas sobre a superfície do gel. Os tubos foram colocados novamente em banho-maria a 10 °C e aquecidos a 0,2-0,4 °C por minuto. Foi determinada a temperatura do banho utilizando-se termômetro de mercúrio com escala de 0 a 100 °C sendo que o ponto de

fusão foi obtido na temperatura onde as gotas começaram a mover-se livremente para o interior do gel.

4.4.2 Perfil de aminoácidos das gelatinas

Para a obtenção do perfil de aminoácidos primeiramente foi realizada uma hidrólise ácida utilizando ácido clorídrico. Em seguida a composição de aminoácidos das gelatinas foi determinada através da derivatização pré-coluna, com PITC, seguida de cromatografia por HPLC, segundo a metodologia de White *et al.* (1986).

4.4.3 Obtenção dos géis de imobilização

Foram testadas para a imobilização quatro gelatinas de diferentes valores de *Bloom*: 200 g, 220 g, 240 g e 280 g, visando verificar a influência deste parâmetro na imobilização. Na Tabela 5 está apresentada a matriz do delineamento composto central rotacional 2² para a obtenção dos géis de imobilização, com valores reais das variáveis e os codificados (entre parêntesis).

Tabela 5 – Delineamento composto central rotacional 2² para obtenção dos géis – valores das variáveis e níveis.

Experimento	Plastificante % (m/V)	Gelatina % (m/V)
E1	2,5 (-1,0)	30 (-1,0)
E2	2,5 (-1,0)	80 (1,0)
E3	7,5 (1,0)	30 (-1,0)
E4	7,5 (1,0)	80 (1,0)
E5	1,5 (-1,41)	55 (0,0)
E6	8,5 (1,41)	55 (0,0)
E7	5,0 (0,0)	19,8 (-1,41)
E8	5,0 (0,0)	90,3 (1,41)
E9	5,0 (0,0)	55 (0,0)
E10	5,0 (0,0)	55 (0,0)

OBS: percentuais de plastificante e gelatina em relação a água.

Todos os experimentos do planejamento apresentados na Tabela 5 foram realizados para cada *Bloom* de gelatina estudado, em duplicata. Primeiramente, foram obtidos os géis e estes caracterizados em relação à

solubilidade em água e razão de inchamento, sendo avaliados todos os experimentos com o uso e sem o uso de glutaraldeído como agente de reticulação.

Para a obtenção dos géis, adicionou-se a água destilada, a temperatura ambiente na massa de gelatina (a massa de cada variável adicionada foi calculada em relação ao volume de água adicionado para a formação do gel e as umidades das gelatinas corrigidas) para que ocorresse a hidratação da mesma. Posteriormente, a esta mistura adicionou-se o plastificante e esta foi levada à temperatura de 50 °C para a formação do gel. Para os géis onde se utilizou glutaraldeído, após o resfriamento, fez-se a adição na superfície do gel de 10 mL de uma solução 2,5 % (v/v) de glutaraldeído (PAULA *et. al.*, 2008) e deixou-se em repouso por 30 minutos. Após, procedeu-se a lavagem do gel com água destilada. Os géis foram cortados em cubos com aproximadamente 2 mm de aresta (medida esta determinada com o uso de um paquímetro). As Figuras 15 a 18 mostram o procedimento de obtenção dos géis.

Figura 15 – Aspecto da gelatina após a adição de água e hidratação.



Figura 16 – Aspecto do gel de gelatina e plastificante após o resfriamento.



Figura 17 – Corte do gel em cubos e verificação do tamanho da aresta.



Figura 18 – Lavagem do gel com água destilada após o corte dos cubos.



Em paralelo aos experimentos do planejamento foram realizados experimentos caracterizados como controle (C) somente com a gelatina (55 %, ponto central do planejamento experimental, sem plastificante) e gelatina reticulada com glutaraldeído. Os resultados deste experimento serão apresentados juntamente com os resultados dos experimentos do planejamento experimental.

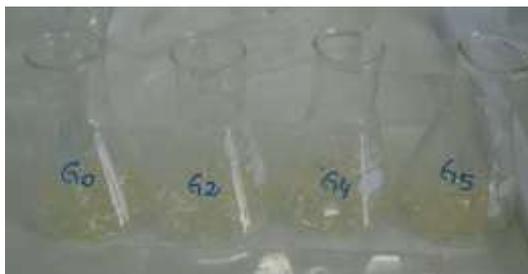
As concentrações de gelatina foram definidas buscando-se avaliar uma ampla faixa, pois existem lacunas na literatura quanto ao comportamento da mesma em várias concentrações tanto em relação ao gel quanto em relação à imobilização de enzimas. A definição das concentrações de plastificantes baseou-se nos estudos de Vanin *et al.* (2005), Thomazine *et al.* (2005), Bergo e Sobral (2007) e Rivero *et al.* (2010). Na Tabela 6 estão as proporções de plastificante em relação à massa de gelatina utilizada para cada experimento do planejamento experimental apresentado na Tabela 5.

Tabela 6 – Proporção de plastificante (%) em relação à massa de gelatina utilizada para os experimentos do planejamento.

Experimento	% de plastificante
E1	8,3
E2	3,1
E3	25,0
E4	9,4
E5	2,7
E6	15,5
E7	25,3
E8	5,5
E9	9,1
E10	9,1

Testes prévios foram realizados com géis cujas concentrações de gelatina variaram de 1 a 20 % (m/V), reticulados e não reticulados, sendo que os mesmos não permaneceram estáveis por mais de 24 horas. A Figura 19 mostra o aspecto dos géis obtidos nos testes preliminares.

Figura 19 – Aspecto dos géis de gelatina obtidos nos testes prévios.



4.4.4 Caracterização dos géis de imobilização

4.4.4.1 Solubilidade em água

Porções de gel de aproximadamente 4 cm² foram colocadas em cadinhos de alumínio ou porcelana e secas a 105 °C por 24 horas. Posteriormente adicionou-se 15 mL de água destilada e deixou-se a 20

°C por 15 horas. Depois de decorrido o tempo, os géis foram filtrados e secos novamente a 105 °C por 24 horas. A solubilidade do gel em água foi calculada pela Equação 5 (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2011, modificada).

$$SG(\%) = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde SG é a solubilidade do gel expresso em percentual, A_0 é a massa inicial em gramas do gel, expressa em matéria seca e A_f é a massa em gramas do resíduo não dissolvido do gel após a secagem. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

4.4.4.2 Razão de inchamento

A razão de inchamento foi obtida utilizando-se a metodologia de Yan *et al.* (2011). As amostras de gel foram cortadas em pedaços de aproximadamente 4 cm² e colocadas em água destilada a 20 °C. Os géis foram agitados a 25 rpm e removidos para a pesagem a cada 1 hora, sendo preliminarmente colocados em peneira para a retirada do excesso de água. A Razão de Inchamento foi determinada utilizando-se a Equação 6.

$$RI(\%) = \frac{A_t - A_0}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{Equação 6})$$

onde RI é a Razão de Inchamento expressa em percentual, A_t é a massa em gramas do gel hidratado em um tempo t, A_0 é a massa inicial do gel, em gramas. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

4.4.5 Imobilização da lipase

Para a imobilização da lipase, efetuou-se o mesmo procedimento descrito para a obtenção do gel (item 4.4.3), porém, durante o resfriamento dos géis, a aproximadamente 30 °C, adicionou-se a lipase e procedeu-se a homogeneização. A adição da lipase foi realizada em cada copo Béquer correspondente a um experimento, sendo pesada à massa correspondente a gelatina e plastificante individualmente para cada ensaio, mantendo-se as quantidades de gelatina, plastificante e lipase fixas. Após a homogeneização, fez-se a adição do glutaraldeído 2,5 % e

deixou-se em repouso durante 30 minutos. Retirou-se o glutaraldeído e fez-se a lavagem do gel, sendo o mesmo, posteriormente, cortado em cubos com aproximadamente 2 mm de aresta. Os cubos foram lavados novamente com água destilada por repetidas vezes e armazenados a 20 °C para secagem e posterior uso.

4.4.6 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática utilizou-se a metodologia de Freire *et al.* (1997) com modificações. Como substrato, utilizou-se uma emulsão com óleo de oliva 10 % (m/V) e goma arábica 5 % (m/V) homogeneizados em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A 18 mL desta emulsão foram adicionados 2 mL de solução enzimática contendo 5 mg/mL de enzima. Incubou-se por 60 minutos, a 37 °C e 160 rpm de agitação.

Após, decorrido o tempo de hidrólise, a reação foi interrompida e realizou-se a extração dos ácidos graxos adicionando-se 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). A solução com os ácidos graxos liberados durante a reação foi então titulada com uma solução de NaOH 0,02 mol.L⁻¹ até atingir pH 11. Juntamente com os meios reacionais, foram preparados os brancos utilizando-se o mesmo procedimento, porém sem a adição da enzima que foi substituída por 2 mL de água destilada.

Todas as dosagens de atividade enzimática foram feitas em duplicata. Salienta-se que uma Unidade de Atividade Enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas. Após a titulação dos meios reacionais e dos brancos, a determinação da atividade se deu através da Equação 7 (FREIRE *et al.*, 1997).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot V_c} \quad (\text{Equação 7})$$

onde A é a atividade enzimática em U/mL; V_a é o volume de hidróxido de sódio adicionado na amostra durante a titulação, em mL; V_b é o volume de hidróxido de sódio adicionado ao branco durante a titulação, em mL; V_c é o volume de amostra gasto na reação, em mL; M é a molaridade do hidróxido de sódio, em mmol.L⁻¹, e t é o tempo de reação (minutos).

4.4.7 Verificação da migração da lipase após a imobilização

Após a imobilização, verificou-se a eficiência da lipase quanto à migração da enzima para o meio, sendo considerados para as próximas etapas apenas os experimentos que não apresentaram migração. Os cubos contendo a lipase foram incubados em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} pH 7,0 a 37°C e 160 rpm de agitação. Foram conduzidos ensaios onde determinou-se a atividade enzimática na fase aquosa. Para tanto, alíquotas de 2 mL de tampão fosfato de sódio foram retiradas após 60 minutos de incubação sendo posteriormente determinada a atividade enzimática utilizando-se a metodologia descrita no item 4.4.6.

Foram considerados, como migração, os experimentos que apresentaram atividade enzimática (U/mL) após o tempo de incubação (60 minutos) devido à presença da enzima no meio. Desconsiderou-se a determinação de proteína como metodologia para a verificação da migração devido à matriz de imobilização ser uma proteína. As Figuras 20 a 22 ilustram o teste de determinação da migração.

Figura 20 – Ensaio de determinação da migração.



Figura 21 – Aspecto dos cubos após 60 minutos em condições controladas para determinação da migração.



Figura 22 – Teste de atividade enzimática para verificação da migração.



4.4.8 Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado através da relação entre a atividade enzimática da enzima imobilizada pela atividade da enzima livre, apresentada na Equação 8 (WON *et al.*, 2005).

$$RI(\%) = \frac{a_{\text{imobilizada}}}{a_{\text{livre}}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde RI é o rendimento de imobilização (%), $a_{\text{imobilizada}}$ é a atividade enzimática da lipase imobilizada (U/mL) e a_{livre} é a atividade da enzima livre (U/mL).

No rendimento de imobilização, os cubos contendo a lipase imobilizada foram incubados em substrato de acordo com a metodologia descrita no item 4.4.6. A atividade da lipase imobilizada foi determinada da mesma maneira que a atividade da lipase livre, pois, na imobilização, foram feitos géis com a concentração de lipase imobilizada igual à concentração da lipase livre (os géis foram feitos individualmente para cada experimento).

4.4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a verificação da morfologia das matrizes de imobilização, foram realizadas as fotomicrografias utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura, em aparelho modelo XL30 marca Philips. O recobrimento foi efetuado com ouro em um *Sputter Coater* marca BAL-TEC, modelo SCD 005, durante 120 segundos. As fotomicrografias foram realizadas da superfície, na face reticulada, e da seção transversal de cada matriz de imobilização que não apresentou migração da lipase.

4.4.10 Difração de Raios-X

Para a obtenção dos difratogramas de raios X foi utilizado um difratômetro marca Philips, X'Pert, com radiação $\text{CuK}\alpha$, operado a 40kV e 30mA. As medidas foram feitas com velocidade de varredura de 0,05°/s, de 2theta 3 a 118.

4.4.11 Verificação da estabilidade da imobilização

Após a definição do tipo de gelatina em relação ao valor de *Bloom* e da combinação de gelatina e plastificante, foram realizados testes para a verificação da estabilidade das matrizes de imobilização frente a parâmetros operacionais: temperatura (°C), pH, agitação e tempo (minutos).

Para o estudo da estabilidade da matriz de imobilização em relação à temperatura, verificou-se a ocorrência de migração, através da atividade enzimática (U/mL) nas temperaturas de 25 a 65 °C, com incrementos de 5 °C. Manteve-se o pH 7,0 (pelo uso de tampão fosfato de sódio 100 mM neste pH), o tempo de processo em 60 minutos e a agitação em 160 rpm (parâmetros utilizados no estudo da migração).

A estabilidade da matriz de imobilização da lipase com o pH foi estudada em uma faixa de valores de pH de 4,0 a 10,0 com incrementos de 0,5, utilizando-se diferentes soluções tampão. A temperatura foi fixada em 37 °C, o tempo de processo em 60 minutos e a agitação em 160 rpm.

Diferentes valores de agitação também foram estudados em relação à estabilidade de imobilização. Estes variaram de 80 a 240 rpm, com incrementos de 60 rpm.

Para a verificação da ocorrência de migração ao longo do tempo, submeteram-se as matrizes ao processo em intervalos de tempo de 120 minutos, totalizando 720 minutos.

Como resposta para todos os parâmetros operacionais, buscou-se novamente a migração da enzima. Esta etapa se faz necessária para a confirmação da eficiência da matriz em manter a lipase confinada. Foram utilizadas faixas amplas de valores de temperatura, pH, agitação e tempo para, posteriormente, avaliar o comportamento da enzima imobilizada frente a estes mesmos parâmetros comparando-se com a enzima livre (item 4.4.7).

4.4.12 Ensaios para a determinação dos parâmetros operacionais para a lipase livre e imobilizada

Foram realizados ensaios para a determinação dos parâmetros operacionais da lipase livre e imobilizada a fim de se obter as melhores condições experimentais para o processo de hidrólise do azeite de oliva e verificar a ocorrência de possíveis diferenças de comportamento entre a lipase livre e a imobilizada em relação às condições do meio. A resposta observada foi a atividade enzimática específica (U/mL). As variáveis investigadas foram: temperatura, pH e tempo de hidrólise.

Para a verificação da influência da temperatura, foram conduzidos ensaios variando-se a mesma de 27 a 54 °C, com incrementos de 3 °C. Utilizou-se como substrato uma mistura de azeite de oliva, goma arábica (emulsificante) e tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A influência do pH foi verificada através da condução dos ensaios a diferentes pHs, cujos valores foram de 4,5 a 9,0 com incrementos de 0,5. O pH do meio foi ajustado através do valor do pH do tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹. Todos os ensaios foram conduzidos por 60 minutos. Quanto a influência do tempo, foram retiradas amostras de 2 em 2 horas e determinada a atividade através da metodologia descrita no item 4.4.6.

4.4.13 Cálculos para a lipase livre e imobilizada

4.4.13.1 Estabilidade térmica e tempo de meia vida

O efeito da temperatura (estabilidade térmica) foi avaliado através da incubação de 2 mL (5 mg/mL de enzima) da lipase livre e imobilizada em 2 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A temperatura de incubação foi de 42 °C (temperatura ótima da enzima obtida no item 4.4.12). Em intervalos de 30 minutos, amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Posteriormente foi determinada a atividade enzimática através da metodologia descrita

no item 4.4.6. A uma dada temperatura, a inativação da lipase pode ser calculada segundo a Equação 9.

$$\frac{dA_t}{dt} = -k_d \cdot A_t + k_r \cdot [d] \quad (\text{Equação 9})$$

onde k_d e k_r são a constante de inativação e a constante de renovação, respectivamente, t é o tempo (min) e A_t é a atividade residual. Assumindo que a reação é irreversível, tem-se que $k_r=0$. Assim, a Equação 5 pode ser simplificada para Equação 10.

$$y = \exp(-k_d \cdot t) \quad (\text{Equação 10})$$

As constantes de inativação da lipase livre e imobilizada foram calculadas, supondo que a perda de atividade da lipase, dentro de uma faixa determinada de temperatura, é uma função linear do tempo, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pôde ser calculado. O valor de k_d foi obtido, portanto, através da Equação 11 (YANG *et al.*, 2010):

$$\ln 2 = -k_d \cdot t_{1/2} \quad (\text{Equação 11})$$

onde $t_{1/2}$ é o tempo necessário para a conversão da metade do substrato inicialmente presente em produto (min).

4.4.13.2 Fator estabilidade (*FE*)

Para a determinação do Fator Estabilidade, foi calculada a relação entre o tempo de meia vida da enzima imobilizada e da enzima livre, conforme a Equação 12 (BISSWANGER, 2008).

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ livre}} \quad (\text{Equação 12})$$

onde *FE* é o fator estabilidade, $t_{1/2}$ *imobilizada* é o tempo de meia vida da enzima imobilizada (h) e $t_{1/2}$ *livre* é o tempo de meia vida da enzima livre (h).

4.4.13.3 Energia de ativação

Para a obtenção da Energia de ativação (E_a), foram utilizados os resultados de atividade enzimática em diferentes temperaturas, cuja metodologia está descrita no item 4.4.12. Para o cálculo, utilizou-se a equação de Arrhenius (Equação 13), dada por

$$A = A_0 \cdot \exp(-E_a / RT) \quad (\text{Equação 13})$$

Os resultados experimentais foram plotados como $\ln A$ versus $1/T$, de acordo com a Equação 14, na faixa de temperatura de 27 a 54 °C.

$$\ln A = \ln A_0 - E_a / RT \quad (\text{Equação 14})$$

onde A_0 é o fator de frequência, A é a atividade da lipase, R é a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), E_a é a energia de ativação ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura (K).

4.4.13.4 K_m e $v_{m\acute{a}x}$

Para a obtenção dos valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ para a lipase livre e imobilizada, determinou-se a atividade enzimática utilizando diferentes concentrações de substrato (óleo de oliva), com mínimo de 5 mg/mL e máximo de 80 mg/mL. A temperatura utilizada para as reações de hidrólise foi 37 °C e a agitação de 160 rpm. Formas lineares da equação de Michaelis-Menten (Equação 15) fornecem os valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ (BISSWANGER, 2008).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Equação 15})$$

onde v é a velocidade inicial, $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração inicial de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

Para tanto, utilizou-se o modelo de Lineweaver-Burk (Equação 16).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{v_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 16})$$

Graficou-se $1/v$ em fun\c{c}\~{a}o de $1/S$, e atrav\~{e}s da equa\c{c}\~{a}o obtida dos dados linearizados, obteve-se os valores de $v_{m\acute{a}x}$ e K_m .

4.4.14 Re\~{u}so da lipase imobilizada

Para avaliar o re\~{u}so da lipase imobilizada, ao final da rea\c{c}\~{a}o de hidr\~{o}lise, procedeu-se a lavagem com \c{a}gua destilada dos cubos contendo as enzimas e os mesmos foram estocados a 20 °C at\~{e} a secagem em estufa de DBO (Solab). Ap\~{o}s verificada a secagem (aproximadamente 1 hora de estocagem), estes cubos foram utilizados novamente. Esta etapa foi realizada at\~{e} a verifica\c{c}\~{a}o da m\~{i}nima atividade da lipase.

4.4.15 Manuten\c{c}\~{a}o da atividade da lipase imobilizada

Para a determina\c{c}\~{a}o da manuten\c{c}\~{a}o da atividade da lipase, a mesma foi armazenada imobilizada nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. A atividade foi determinada a cada 48 horas, utilizando-se a metodologia descrita no item 4.4.6, nas condi\c{c}\~{o}es operacionais de 37 °C, pH 7,0, agita\c{c}\~{a}o de 160 rpm e 10 % de substrato durante 30 dias.

4.4.16 Especificidade da lipase livre e imobilizada frente a diferentes \c{a}cidos graxos

Para avaliar a gera\c{c}\~{a}o de \c{a}cidos graxos em diferentes substratos utilizou-se a lipase livre e imobilizada nas rea\c{c}\~{o}es de hidr\~{o}lise. Para tanto, utilizou-se como substratos de origem vegetal o azeite de oliva, \c{a}leo de soja, \c{a}leo de canola, \c{a}leo de milho e o \c{a}leo de girassol e ainda substratos de origem animal, sendo efluente de frigor\~{i}fico de su\~{i}nos e de latic\~{i}nio.

Para determina\c{c}\~{a}o do teor de \c{a}cidos graxos dos substratos de origem vegetal, os mesmos foram emulsionados com goma ar\c{a}bica 5 % (m/V) e homogeneizados em tamp\~{a}o fosfato de s\~{o}dio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A esta emuls\~{a}o foram adicionados 2 mL de solu\c{c}\~{a}o enzim\c{a}tica contendo 5 mg/mL de enzima. Para os efluentes, apenas fez-se a adi\c{c}\~{a}o da enzima, sem a etapa de emulsifica\c{c}\~{a}o. As condi\c{c}\~{o}es de processo

foram as otimizadas nas etapas descritas no item 4.4.12. Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL. Foram determinados os teores de AGL dos substratos antes da hidrólise e os valores obtidos foram subtraídos do valor encontrado após a hidrólise enzimática. A determinação dos ácidos graxos livres (AGL) obtidos na hidrólise foi calculada utilizando a Equação 17 (FREIRE *et al.*, 1997):

$$\text{AGL} = \frac{V_a \cdot M \cdot 1000}{V_c} \quad (\text{Equação 17})$$

onde *AGL* são os ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/mL}$), V_a é o volume de hidróxido de sódio adicionado na amostra durante a titulação, em mL; V_c é o volume de amostra utilizado na reação, em mL; M é a molaridade do hidróxido de sódio, em mmol.L^{-1} , e t é o tempo de reação (minutos).

4.4.17 Tabulação dos resultados e análise estatística

A tabulação dos resultados, cálculo de médias e desvio padrão foram realizados utilizando o Microsoft Excel® 2003 (Microsoft Co.). A análise estatística do planejamento experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica® 6.0 (STATSOFT, INC.) em nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$), onde foram buscados os efeitos isolados e de interação entre as variáveis do planejamento proposto. Realizou-se também a Análise de Variância e o Teste de Tukey, com nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) utilizando-se o mesmo software.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GELATINAS

5.1.1 Características físico-químicas

A composição centesimal e características físico-químicas das gelatinas foram determinadas. Na Tabela 7 estão os valores obtidos e o Teste de Tukey a nível de 95 % de confiança. A análise de proteína demonstrou diferenças entre a quantidade de proteína nas gelatinas, sendo que os valores variaram de 94,60 g/100g a 99,17 g/100 g, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) a gelatina de *Bloom* 280 das demais. A gelatina de *Bloom* 280 g apresentou um maior valor, o que caracteriza que o processo de extração da gelatina foi mais eficiente. Isto pode ser confirmado pelo valor de lipídeos, obtido para a gelatina de *Bloom* 200 g, também estatisticamente diferente das demais. Bueno (2008), ao caracterizar gelatina de origem suína, encontrou valores próximos para umidade, proteína e lipídeos, sendo estes 10,5 %, 90 g/100g, 0,1 g/100g e respectivamente. O conteúdo de cinzas obtido para as gelatinas deste estudo diferiram do autor, que obteve 0,2 %, mas ficaram abaixo de 2 %, o que é o recomenda para gelatinas. Os valores de umidade, entre 10 e 14 %, ficaram próximos aos 15,06 % obtidos por Alves e Prudêncio-Ferreira (2002), justificando os valores de A_w próximos entre 0,3 e 0,6.

Tabela 7 – Características físico-químicas das gelatinas utilizadas no desenvolvimento das matrizes de imobilização.

Análise	Gelatina			
	<i>Bloom 200 g</i>	<i>Bloom 220 g</i>	<i>Bloom 240 g</i>	<i>Bloom 280 g</i>
Proteína * (g/100g de amostra)	94,60 ^a ± 0,10	96,40 ^a ± 0,15	97,39 ^b ± 0,10	99,17 ^c ± 0,10
Umidade (%)	12,28 ^b ± 0,04	12,20 ^b ± 0,04	14,42 ^a ± 0,02	10,09 ^c ± 0,05
Atividade de água (Aw)	0,543 ^b ± 0,002	0,531 ^c ± 0,001	0,641 ^a ± 0,005	0,353 ^d ± 0,003
Lipídeos* (g/100g de amostra)	1,52 ^a ± 0,03	0,73 ^b ± 0,01	0,22 ^d ± 0,02	0,46 ^c ± 0,01
Cinzas (%)	1,79 ^a ± 0,12	0,74 ^c ± 0,05	0,94 ^b ± 0,06	0,63 ^d ± 0,05
pH	5,6	5,5	5,7	5,4
Formação de gel	Sim	Sim	Sim	Sim
Ponto de fusão (°C)	38	34	38	38

* Determinação em base seca. Letras minúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias iguais para uma mesma análise, em nível de 95% de confiança, pelo Teste de Tukey.

Por serem caracterizadas como gelatinas tipo B (SCHRIEBER e GAREIS, 2007) de acordo com os resultados de pH, a matéria prima que dá origem às mesmas passa por processo alcalino, que, de acordo com a eficiência, pode retirar maiores ou menores quantidades de outros compostos que podem interferir na composição centesimal, como polissacarídeos e proteínas não colagenosas como albumina e globulina. Mesmo havendo os compostos citados, segundo Schrieber e Gareis (2007), no processo alcalino, poucos resíduos permanecem na gelatina se comparado ao processo ácido onde cerca de 5 % de proteína não colagenosa e gorduras permanecem na gelatina, o que faz com que, por exemplo, na indústria fotográfica, que necessita de gelatina de alto grau de pureza, seja utilizada a gelatina tipo B.

A formação de gel está intimamente relacionada com as propriedades de estrutura, massa molecular e temperatura do sistema. Apesar do colágeno e da gelatina ser formas diferentes da mesma molécula, muitas vezes são confundidos. O mecanismo de gelificação da gelatina, bem como a estrutura da rede de gel formada diferem consideravelmente do colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). O

ponto de fusão das gelatinas (34 a 38 °C) foi inferior ao encontrado por Gómez-Estaca *et al.* (2011), que obteve como valor de ponto de fusão para a gelatina bovina *Bloom* 200-220 g 52,58 °C.

5.1.2 Perfil de aminoácidos das gelatinas

As gelatinas são polímeros de aminoácidos com cada resíduo de aminoácido unido a seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente. O conhecimento da sequência de aminoácidos de uma proteína pode oferecer informações sobre as características da mesma como solubilidade e estrutura tridimensional. Na Tabela 8 estão os perfis de aminoácidos obtidos para as gelatinas do presente estudo. Os cromatogramas correspondentes as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g e o laudo de análise estão apresentados no Anexo 3.

Percebe-se que as composições de aminoácidos para as gelatinas seguem o mesmo perfil. Quase todos os aminoácidos encontrados nas amostras de gelatinas são classificados como aminoácidos comuns (exceto a hidroxiprolina, produto da hidroxilação da prolina), ou seja, são α -aminoácidos que possuem um grupo carboxil e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α – centro quiral). Diferem uns dos outros pelas suas cadeias laterais, as quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando na solubilidade dos aminoácidos em água (NELSON e COX, 2011).

Os aminoácidos que estão em maior quantidade nas quatro gelatinas testadas (*Blooms* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g) são a glicina, seguida da prolina, e com quantidades próximas a hidroxiprolina, o ácido glutâmico, a arginina e a alanina. Cadeias laterais amidas de asparagina e glutamina são hidrolisadas a aspartato e glutamato e amônia livre; estes, segundo Devlin (2011), são incluídos no conteúdo de ácido glutâmico e ácido aspártico. Não ocorre a presença de triptofano devido a possível degradação do mesmo na etapa de hidrólise empregada no método adotado para a obtenção do perfil de aminoácidos.

Tabela 8 – Perfil de aminoácidos das gelatinas utilizadas no desenvolvimento das matrizes de imobilização.

Aminoácido	Composição de aminoácidos (g/100g de amostra)			
	Bloom 200 g	Bloom 220 g	Bloom 240 g	Bloom 280 g
Ácido aspártico	4,42	4,81	5,04	4,92
Ácido glutâmico	8,91	9,20	9,29	9,37
Hidroxiprolina	9,23	9,43	9,41	9,84
Serina	3,17	3,48	3,30	3,60
Glicina	22,42	23,36	23,20	24,2
Histidina	0,70	0,92	0,71	1,11
Arginina	8,55	9,21	9,01	8,82
Treonina	1,62	1,67	1,73	1,74
Alanina	8,90	9,05	9,19	9,88
Prolina	12,91	13,02	13,43	14,22
Tirosina	0,58	0,60	0,61	0,49
Valina	1,99	2,26	2,26	2,32
Metionina	0,70	0,74	0,76	0,70
Cistina	0,48	0,62	0,46	0,49
Isoleucina	1,39	1,43	1,52	1,62
Leucina	2,68	2,94	3,05	3,01
Fenilalanina	1,81	2,23	2,29	1,91
Lisina	3,29	3,35	3,35	3,49
Total	93,75	98,32	98,61	101,72

Gómez-Estaca *et al.* (2011) afirmam que 50-60 % das cadeias da gelatina são constituídas por glicina-XY, onde X geralmente é a prolina e Y é a hidroxiprolina, o que garante a formação da tripla hélice e a estabilização do gel de gelatina pela formação de ligações de H com os grupos-OH da hidroxiprolina.

Sobral *et al.* (2001), ao caracterizarem gelatina de origem bovina, encontraram a glicina como sendo o aminoácido predominante (22,16 g/100g de amostra), seguindo da alanina (12,92 g/100g de amostra) e do ácido glutâmico (11,98 g/100g de amostra). O perfil de aminoácidos de gelatina de origem suína foi investigado por Haug *et. al* (2004). A

glicina, prolina e alanina foram os aminoácidos encontrados em maior quantidade. Isto demonstra que existem diferenças em relação à composição de aminoácidos de gelatinas.

Os aminoácidos que estão presentes em quantidades baixas são: a histidina (pI 7,59), a tirosina (pI 5,66), a metionina (pI 5,74) e a cistina, que segundo Souza *et al.* (2004), é o produto da ligação covalente de moléculas de cisteína via ligações dissulfeto (-S-S-) formadas a partir do grupo tiol (-SH-), fortemente hidrofóbicas.

Aminoácidos podem ser agrupados em classes em relação às propriedades dos seus grupos R no que diz respeito à polaridade, ou seja, capacidade de interação com a água. Dos aminoácidos presentes nas gelatinas, são classificados como apolares alifáticos os aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina e prolina. A glicina possui uma estrutura mais simples e sua cadeia lateral não chega a contribuir de forma significativa para as interações hidrofóbicas. Os aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina são relativamente hidrofóbicos. Serina e treonina caracterizam-se por serem polares não carregados. Aminoácidos carregados positivamente (básicos) são a lisina, arginina, histidina, sendo mais hidrofílicos (NELSON e COX, 2011).

A partir da composição de aminoácidos presentes na amostra foi possível calcular a energia teórica envolvida nas interações intermoleculares tomando como base 25 kJ/mol para as interações polares não-ionizáveis, 62 kJ/mol para as iônicas, 8 kJ/mol para as hidrofóbicas e 350 kJ/mol para as covalentes, valores sugeridos por Souza *et al.* (2004). Para todas as amostras de gelatinas, predominou a possível presença de ligações polares ionizáveis (47,5 % para a gelatina *Bloom* 200 g, 49,2 % para a gelatina *Bloom* 220 g, 49,4 % para a gelatina *Bloom* 240 g e 51,8 % para a gelatina *Bloom* 280 g). Segundo Monterrey-Quintero e Sobral (1998), a alta densidade de interações iônicas juntamente com as ligações de hidrogênio contribuem para a alta solubilidade em água das gelatinas, cujos pHs estão na faixa ácida. O percentual médio obtido para as amostras de gelatina em relação às ligações hidrofóbicas foi de 5 %. No presente estudo, os aminoácidos obtidos neste estudo em maior quantidade são os que apresentam maiores valores de solubilidade em água, sendo a glicina com valor de 249,9 g/L, prolina com valor de 1.620 g/L, a arginina com valor de 855,6 g/L e a alanina com valor de 167,2 g/L. Somente o ácido glutâmico apresenta uma menor solubilidade sendo de 8,5 g/L.

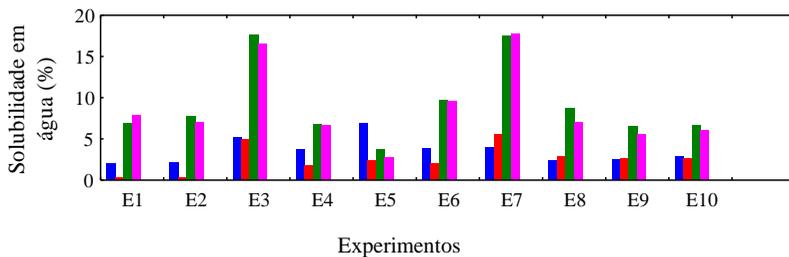
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS COM AS DIFERENTES GELATINAS E PLASTIFICANTES COM E SEM O USO DE GLUTARALDEÍDO

As propriedades de solubilidade em água e razão de inchamento foram investigadas buscando-se avaliar diferenças e semelhanças entre os géis com somente a adição de gelatina, géis com gelatina reticulada com glutaraldeído e géis adicionados de plastificantes, reticulados e não reticulados. Diferentes proporções de gelatina e plastificantes foram testadas, visando assim definir, de acordo com os resultados obtidos, as melhores combinações para a imobilização da lipase em relação à estabilidade do gel.

5.2.1 Solubilidade em água

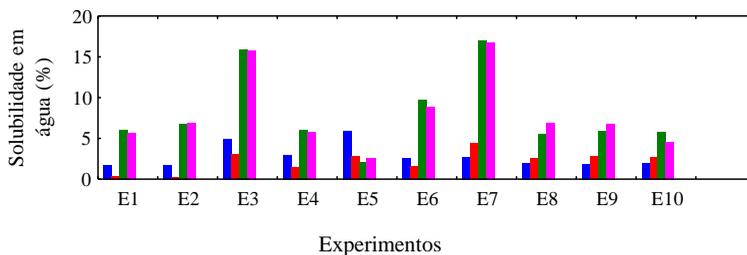
A solubilidade em água é uma propriedade dos géis que demonstra a tolerância à água e que pode afetar a matriz de imobilização. O comportamento das proteínas quanto à solubilidade é muito heterogêneo e depende do número de grupos polares e apolares. Geralmente, as proteínas são mais solúveis em solventes polares, como por exemplo, a água (BELITZ e GROSCH, 1997). Com a solubilização do gel em água, as enzimas que estavam confinadas tendem a ficar livres no meio reacional. Portanto, a determinação da solubilidade das matrizes de imobilização é de fundamental importância. A Figura 23 apresenta os perfis de solubilidade em água para as matrizes de imobilização com gelatina de *Bloom* 200 g (a), 220 g (b), 240 g (c) e 280 g (d), com o uso e sem o uso de glutaraldeído. Os resultados de solubilidade de todos os experimentos do planejamento e do experimento Controle (C) podem ser visualizados no Anexo 4.

Figura 23 – Solubilidade dos géis de gelatina em água após 24 horas (a) gelatina de Bloom 200 g (b) gelatina de Bloom 220 g (c) gelatina Bloom 240 g (d) gelatina Bloom 280 g.



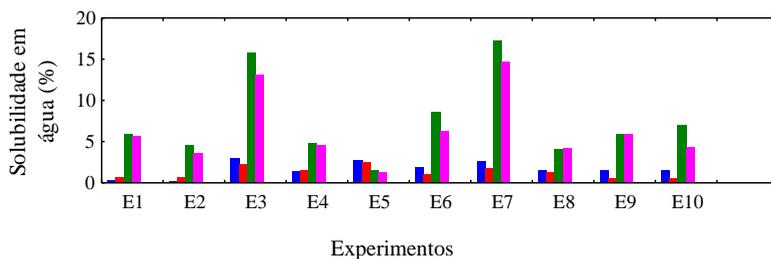
(a)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



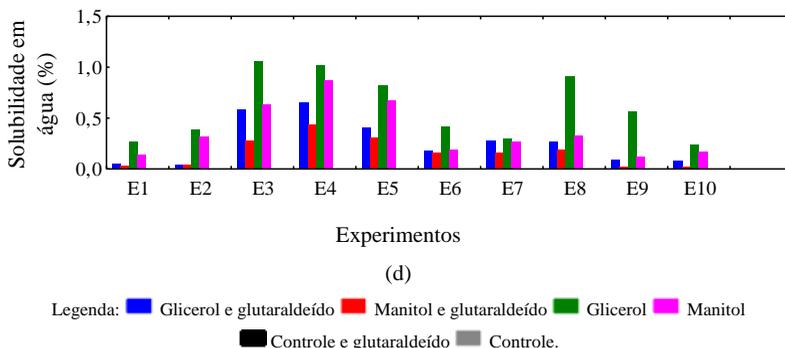
(b)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



(c)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



E1= 2,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E2= 2,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E3 = 7,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E4 = 7,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E5 = 1,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E6 = 8,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E7 = 5,0 % de plastificante e 19,8 % de gelatina; E8 = 5,0 % de plastificante e 90,3 % de gelatina; E9/E10 = 5,0 % de plastificante e 55 % de gelatina.

Observa-se que com o aumento do valor de *Bloom* da gelatina, ocorreu uma diminuição da solubilidade dos géis em água, independente do experimento. Este comportamento era esperado devido a valores de *Bloom* mais altos originarem géis mais estáveis.

Para os experimentos Controle (55% de gelatina e sem a adição de plastificante, não apresentados nas Figuras), os valores de solubilidade em água foram de 99,94, 78,88, 59,94 e 36,88 % para as gelatinas de *Bloom* 200, 220, 240 e 280 g, respectivamente. Nestes experimentos não houve a adição de plastificante nem reticulação, o que comprova que somente a força de *Bloom* já é suficiente para diferir a solubilidade de uma gelatina e da outra. Estes valores de solubilidade obtidos para os géis de gelatina sem reticulação e sem plastificante são valores considerados altos. Para a gelatina de *Bloom* 200 g, houve praticamente a solubilização total do gel na água. Nenhum dos géis obtidos para o experimento controle (C) sem reticulação foi apropriado para ser utilizado na imobilização da lipase tomando como base esta propriedade.

Os experimentos sem reticulação, mas adicionados de plastificantes (concentrações até 8,5%), apresentaram menor solubilidade em relação ao experimento C (com somente a adição de gelatina). Como a água também é um plastificante, a presença dos

plastificantes utilizados no presente estudo na matriz de imobilização pode ter interferido da interação entre a água e a proteína, diminuindo a solubilização em água. Modificações estruturais na rede do gel ocorrem pela ação dos plastificantes, que podem retardar ou facilitar a transmissão de umidade de acordo com a sua concentração (PIERMARIA *et al.*, 2011). Segundo Al-Hassan e Norziah (2011), filmes plastificados com sorbitol (isômero do manitol) apresentam maiores forças intermoleculares e possuem uma menor capacidade de interação com a água.

Quando reticulados com glutaraldeído, os experimentos C (Controle + glutaraldeído) apresentaram menor solubilidade em água, sendo os valores obtidos de 82,53 %, 55,88 %, 19,16 % e 6,02 %, para as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g, respectivamente. O uso do glutaraldeído diminuiu em 17,42 % a solubilidade do gel de gelatina de 200 *Bloom*, 29,16 % a solubilidade da de 220 *Bloom*, 68,04 % a solubilidade da de *Bloom* 240 g e 83,68 % da de *Bloom* 280 g. Segundo Vanin *et al.* (2005), para reduzir a solubilidade em água de filmes à base de gelatina, alguns autores têm modificado as propriedades físicas e químicas destes filmes de gelatina, utilizando agentes de reticulação como glutaraldeído e formaldeído, não sendo, portanto, considerados comestíveis, mas muito interessantes para outras aplicações, inclusive por serem biodegradáveis.

A Figura 23a apresenta os resultados dos experimentos realizados utilizando gelatina de *Bloom* 200 g. Os maiores valores de solubilidade em água ocorreram para os experimentos E3 (7,5 % de plastificante e 30 % de gelatina) e E7 (5,0 de plastificante e 19,8 % de gelatina), seguidos do experimento E6 (5,5 % de plastificante e 55 % de gelatina), cujos valores de solubilidade em água foram de 17,76 % sem reticulação e 5,57 % com reticulação. Estes experimentos caracterizam-se por serem os experimentos do planejamento que apresentam a maior proporção de plastificante em relação à massa de gelatina utilizada e nenhum deles utilizou o percentual de gelatina acima de 55 %, o que faz com que ocorra maior presença de água. Comportamento semelhante foi verificado para as gelatinas de *Bloom* 220 g (Figura 23b) e 240 g (Figura 23c), onde, obteve-se, para a primeira, um máximo de solubilidade de 16,98 % sem reticulação (E7 com glicerol) e 4,94 % (E3 com glicerol) com reticulação e 17,29 % (E7 com glicerol) sem reticulação e 2,95 % (E3 com glicerol) com reticulação para a segunda.

Para os experimentos com a gelatina de *Bloom* 280 g (Figura 23d), os valores de solubilidade em água sem reticulação e com reticulação não ultrapassaram 1,06 % (E3 e glicerol) e 0,646 % (E4 e

glicerol), respectivamente, o que demonstra uma boa estabilidade do gel para a imobilização da lipase. Os experimentos cujos géis foram reticulados e que apresentaram menor solubilidade em água foram E1, E2, E9 e E10 para o glicerol e para o manitol.

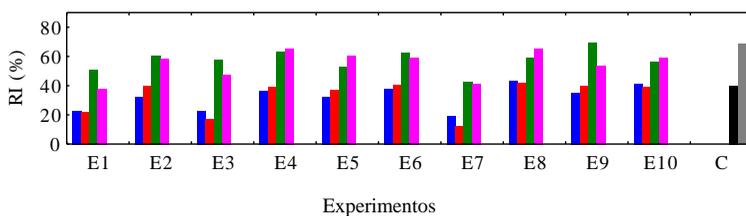
Uma tendência fica evidenciada em relação à solubilidade em água dos géis de gelatina de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g: os géis que apresentaram maior solubilidade em água foram os que continham glicerol como plastificante. Segundo Al-Hassan e Norziah (2011), o glicerol tem menor massa molar (92,08 g/mol) e é mais higroscópico em relação ao sorbitol e manitol.

5.2.2 Razão de inchamento

A razão de inchamento (RI) reflete a capacidade de absorção de água dos géis. A Figura 25 apresenta os resultados da razão de inchamento para os géis de gelatinas de *Bloom* 200 g (a), 220 g (b), 240 g (c) e 280 g (d), respectivamente, após 240 minutos.

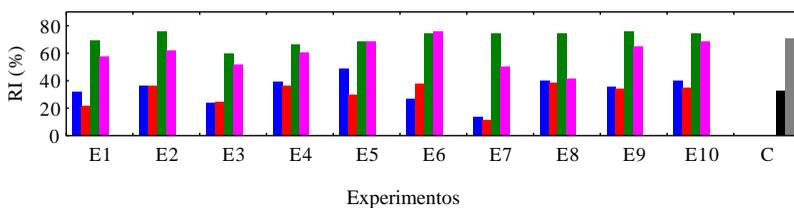
Verifica-se, na Figura 24, que todos os géis apresentaram razão de inchamento inferior a 100 %, o que caracteriza uma baixa absorção de água, pois a gelatina tem capacidade de absorção de água de 5 a 10 vezes o sua massa. Para as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220g e 240g, o comportamento em relação à razão de inchamento foi muito próximo. Para a gelatina de *Bloom* 280 g, a razão de inchamento foi ligeiramente inferior.

Figura 24 – Razão de inchamento dos géis de gelatina após 240 minutos (a) gelatina de Bloom 200 g (b) gelatina de Bloom 220 g (c) gelatina de Bloom 240 g (d) gelatina de Bloom 280 g.



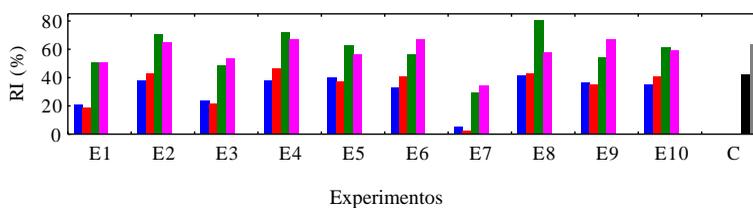
(a)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



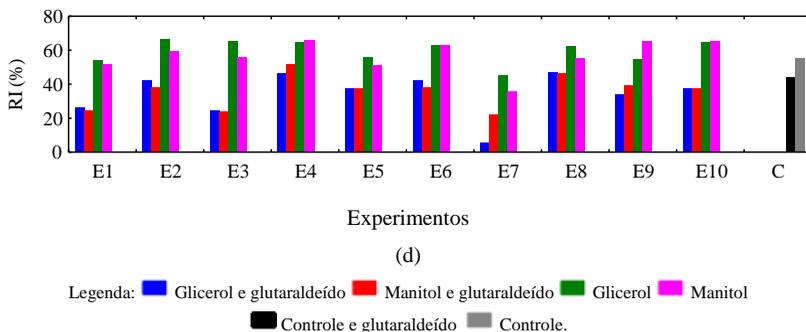
(b)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



(c)

Legenda: ■ Glicerol e glutaraldeído ■ Manitol e glutaraldeído ■ Glicerol ■ Manitol
■ Controle e glutaraldeído ■ Controle.



E1= 2,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E2= 2,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E3 = 7,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E4 = 7,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E5 = 1,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E6 = 8,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E7 = 5,0 % de plastificante e 19,8 % de gelatina; E8 = 5,0 % de plastificante e 90,3 % de gelatina; E9/E10 = 5,0 % de plastificante e 55 % de gelatina.

Para os experimentos Controle (somente gelatina) sem reticulação, os valores de razão de inchamento foram 68,71 , 70,71, 62,96 e 55,29 % (para as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g, respectivamente). Verifica-se que os valores para as gelatinas de 200 g e 220g foram próximos, diminuindo a *RI* conforme aumenta o valor do *Bloom*. De acordo com Lai *et al.* (2009), o aumento do valor de *Bloom* da gelatina provoca uma redução da razão de inchamento e uma notável melhora nas propriedades mecânicas de filmes.

Os experimentos Controle com reticulação apresentaram *RI* inferior em relação aos não reticulados. Os valores obtidos para as gelatinas de 200, 220, 240 e 280 *Bloom* correspondem a 39,67, 32,26, 42,20 e 46,77 %, respectivamente, onde se verifica que não há uma tendência em relação ao valor de *Bloom*, mas pode-se afirmar que os géis que foram reticulados apresentaram a razão de inchamento menor (menor absorção de água) do que os géis não reticulados. Comparando-se as matrizes não reticuladas com o experimento C (sem reticulação), para todas as gelatinas, verifica-se que as matrizes com adição de plastificante chegaram a valores de razão de inchamento próximos e/ou superiores. De acordo com Thomazine *et al.* (2005), o aumento da concentração de plastificante provoca o aumento na interação com a água devido a uma reorganização da rede proteica com consequente aumento de volume livre.

Todas as matrizes com reticulação apresentaram razão de inchamento inferior às sem reticulação, com valores de razão de inchamento inferiores a 50 %, sendo os experimentos E1 e E7 os que apresentaram menor razão de inchamento. Para a maioria das matrizes, o uso de glicerol acarretou em maior razão de inchamento do que o uso de manitol. Isto pode ser justificado pela maior higroscopicidade do glicerol frente ao manitol. As matrizes com maior concentração inicial de gelatina apresentaram maior razão de inchamento devido aos maiores espaçamentos e nucleações formadas pelas interações proteína-proteína (ANDREUCETTI *et al.*, 2009).

Farris *et al.* (2011) investigaram a razão de inchamento de géis de gelatina e glicerol, gelatina pectina e glicerol e gelatina e glicerol reticulado com glutaraldeído. Verificaram que a absorção de água foi significativamente maior para as amostras de gel de gelatina e glicerol, enquanto que para as amostras de gel de gelatina, pectina e glicerol e de gel de gelatina, glicerol e glutaraldeído, as diferenças foram insignificantes até 120 minutos, sendo que atingiram o equilíbrio em 240 minutos. O filme reticulado com glutaraldeído inchou aproximadamente dez vezes menos do que os filmes não reticulados, confirmando uma maior resistência a água.

Através dos testes de solubilidade em água e razão de inchamento, verificou-se a necessidade de reticulação das matrizes como forma de manter a estabilidade das mesmas. Para a próxima etapa, todas as matrizes serão reticuladas. O experimento controle, que mesmo reticulado não apresentou boa estabilidade frente aos testes, não será utilizado na imobilização da lipase.

5.3 IMOBILIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO DA LIPASE

Neste tópico estão apresentados os resultados obtidos para as diferentes gelatinas e os plastificantes glicerol e manitol utilizados na imobilização da lipase e verificação da migração. A verificação da migração da enzima para o meio mostra a capacidade de retenção da matriz. Caso ocorra a migração, pode-se quantificar atividade de enzimas de forma errônea em experimentos, pois a mesma estará atuando de forma livre, o que poderá interferir no valor do rendimento de imobilização.

A migração foi obtida através da incubação da lipase imobilizada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 durante 60 minutos e posteriormente

a determinação da atividade enzimática em uma amostra do líquido foi realizada pela quantificação dos ácidos graxos via titulação. Em virtude da matriz de imobilização ser uma proteína, não foi possível obter a migração através da quantificação de proteína.

5.3.1 Imobilização e determinação da migração utilizando glicerol como plastificante

As Figuras 25 a 28 apresentam os resultados de atividade lipásica correspondentes à migração para as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g, adicionadas de glicerol.

Figura 25 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 200 g e glicerol.

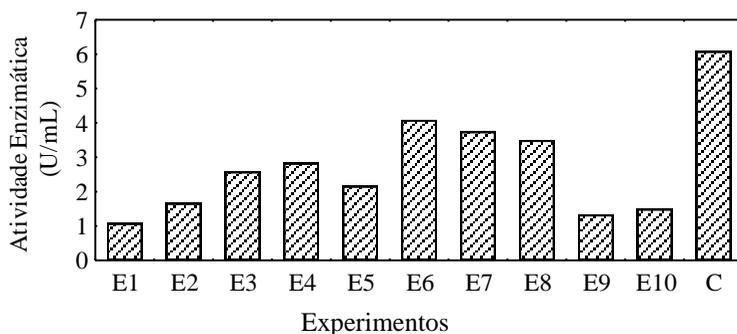


Figura 26 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 220 g e glicerol.

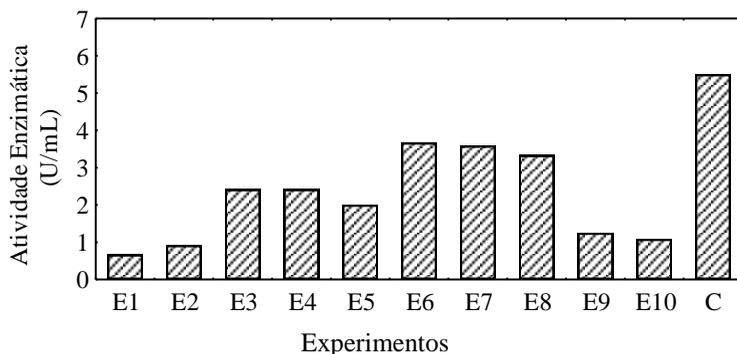


Figura 27 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 240 g e glicerol.

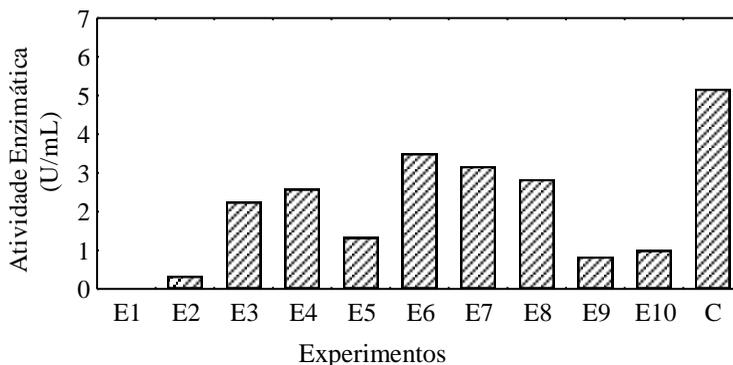
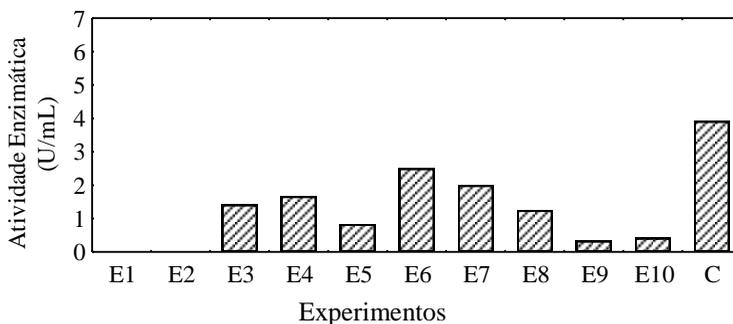


Figura 28 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol.



Os experimentos onde não houve migração foram E1 (2,5 % de glicerol e 30 % de gelatina) para a gelatina de *Bloom* 240 g e E1 e E2 (2,5 % de glicerol e 80 % de gelatina) para a gelatina de *Bloom* 280 g. Para as gelatinas de valores de *Bloom* 200 g e 220 g, todos os experimentos apresentaram migração, sendo as matrizes de imobilização, elaboradas com estas gelatinas, ineficientes na imobilização da lipase. As gelatinas de *Bloom* 200 g e 220 g apresentaram solubilidade em água mesmo reticuladas com glutaraldeído. Verifica-se que os experimentos onde houve as menores

migrações são equivalentes aos experimentos onde houve as menores solubilidades em água utilizando glicerol, sendo o E1, E2, E9 e E10.

A Tabela 9 apresenta os resultados das médias de atividade enzimática específica para os experimentos de imobilização, o desvio padrão e o Teste de Tukey em nível de 95 % de confiança. Analisando-se os resultados de atividade enzimática para um mesmo experimento em relação a diferentes gelatinas, verifica-se que a gelatina de *Bloom* 280 g apresentou resultados diferentes da maioria das gelatinas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). O único experimento que apresentou resultados iguais estatisticamente foi o E1 ($p > 0,05$), com zero de atividade enzimática para a gelatina de *Bloom* 240 g e para a gelatina de *Bloom* 280 g. Para todos os experimentos, a gelatina com valor de *Bloom* 280 g diferiu estatisticamente da gelatina de valor de *Bloom* 200 g. Dos resultados de atividade enzimática obtidos para esta, apenas em E3 (7,5 % de glicerol e 30 % de gelatina), E4 (7,5 % de glicerol e 30 % de gelatina) e E8 (5,0 % de glicerol e 90,3 % de gelatina) podem ser considerados iguais estatisticamente ($p > 0,05$) aos resultados obtidos para a gelatina de valor de *Bloom* 240 g. Isto demonstra que o valor de *Bloom* interfere na imobilização da lipase. Este comportamento também fica evidenciado nos resultados de atividade enzimática obtidos para o experimento C, sem adição de glicerol.

Tabela 9 – Médias de atividade enzimática, desvio padrão e Teste de Tukey para os experimentos de determinação de migração utilizando glicerol e as gelatinas de *Bloom* 200 g a 280 g.

Experimento	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio Padrão			
	<i>Bloom</i> 200 g	<i>Bloom</i> 220 g	<i>Bloom</i> 240 g	<i>Bloom</i> 280 g
E1	1,08 ^{aC} ± 0,12	0,67 ^{aB} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,12	0,00 ^{aA} ± 0,00
E2	1,67 ^{bD} ± 0,00	0,92 ^{abC} ± 0,12	0,33 ^{aB} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00
E3	2,58 ^{cdB} ± 0,12	2,42 ^{cB} ± 0,12	2,25 ^{dB} ± 0,12	1,42 ^{eA} ± 0,12
E4	2,83 ^{eB} ± 0,00	2,42 ^{cB} ± 0,12	2,58 ^{deB} ± 0,12	1,67 ^{eA} ± 0,24
E5	2,17 ^{cC} ± 0,00	2,00 ^{cC} ± 0,00	1,33 ^{cB} ± 0,00	0,83 ^{cdA} ± 0,00
E6	4,08 ^{fC} ± 0,12	3,67 ^{dBC} ± 0,24	3,50 ^{gB} ± 0,00	2,50 ^{gA} ± 0,00
E7	3,75 ^{efC} ± 0,12	3,58 ^{dC} ± 0,12	3,17 ^{fgB} ± 0,00	2,00 ^{fA} ± 0,00
E8	3,50 ^{eB} ± 0,24	3,33 ^{dB} ± 0,00	2,83 ^{efB} ± 0,24	1,25 ^{deA} ± 0,12
E9	1,33 ^{abC} ± 0,00	1,25 ^{bC} ± 0,12	0,83 ^B ± 0,00	0,33 ^{bA} ± 0,00
E10	1,50 ^{abC} ± 0,00	1,08 ^{abB} ± 0,12	1,00 ^{bB} ± 0,00	0,42 ^{bcA} ± 0,12
C*	6,08 ^{gC} ± 0,12	5,50 ^{eBC} ± 0,00	5,17 ^{hB} ± 0,24	3,92 ^{hA} ± 0,12

Atividade enzimática da lipase livre: 7,33 U/mL

E1 - 2,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E2 - 2,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E3 - 7,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E4 - 7,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E5 - 1,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E6 - 8,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E7 - 5,0 % de plastificante e 19,8 % de gelatina; E8 - 5,0 % de plastificante e 90,3 % de gelatina; E9/E10 - 5,0 % de plastificante e 55 % de gelatina. Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para diferentes gelatinas em relação ao valor de *Bloom* em nível de 95 % de confiança, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para uma mesma gelatina em nível de 95% de confiança, pelo Teste de Tukey. * C significa Controle. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

Conforme aumenta o valor de *Bloom*, menor é a migração, sendo que para a gelatina de *Bloom* 280 g o valor de 3,92 U/mL, que corresponde à migração, difere estatisticamente dos valores obtidos para o experimento C das demais gelatinas. Os resultados de *Bloom* 240 g diferem dos resultados de 200 g, porém *Bloom* 220 g é igual a 200 g e 240 g. Os valores de migração obtidos para a matriz de imobilização refletem os valores obtidos de solubilidade em água.

Para a gelatina com valor de *Bloom* de 240 g, E1 (zero de atividade enzimática e, portanto, sem migração) apresenta-se igual estatisticamente a E2 (0,33 U/mL de atividade enzimática). Para a gelatina de *Bloom* 280 g, apenas E1 e E2 são iguais estatisticamente.

O experimento que apresentou menor atividade enzimática para a gelatina de *Bloom* 280 g foi E1, seguido de E9. E1 caracteriza-se por conter 2,5 % de glicerol e 30 % de gelatina (níveis inferiores do planejamento experimental); já E9 contém 5,0 % de glicerol e 50 % de gelatina (ponto central do planejamento experimental). Na menor concentração de glicerol ou na concentração intermediária, obtêm-se as menores atividades enzimáticas. Comportamento semelhante foi obtido para as demais gelatinas.

Em relação às maiores atividades obtidas, gelatina de *Bloom* 280 g, E6 (8,5 % de glicerol e 55 % de gelatina), E7 (5,0 % de glicerol e 19,8 % de gelatina) e E8 (5,0 % de glicerol e 90,3 % de gelatina) foram os experimentos que apresentaram maiores migrações. Todas as demais gelatinas apresentaram o mesmo comportamento.

5.3.1.1 Efeitos das variáveis e coeficientes de regressão obtidos a partir dos resultados experimentais

Após a realização do planejamento experimental, foram obtidos os efeitos das variáveis de estudo em relação à migração da lipase (através das respostas de atividade enzimática), sendo analisados apenas os resultados das gelatinas de *Bloom* de 240 g e 280 g, por apresentarem experimentos sem migração. As Tabelas 10 e 11 apresentam os principais efeitos e efeito de interação entre as variáveis do planejamento proposto para as gelatinas de *Bloom* 240 g e 280 g, respectivamente. Estes efeitos podem ser melhor visualizados nas Figuras 29 e 30, Diagramas de Pareto.

Na Tabela 12, que corresponde aos efeitos das variáveis para os experimentos com a gelatina de *Bloom* 240 g, verifica-se que a concentração de glicerol (L) e a concentração de gelatina (L) exerceram efeito significativo ($p < 0,05$), sendo este positivo para o processo. Como

a variável de interação não apresentou efeito, uma análise individual das variáveis pode ser realizada. O efeito positivo para a gelatina e para o glicerol significa que, quando se passa do nível -1 para o nível +1 do planejamento experimental, ocorre um aumento da atividade da lipase, ou seja, ocorre maior migração. Efeitos semelhantes ocorreram para a migração da lipase na matriz de gelatina de *Bloom* 280 g (Tabela 13), sendo que as variáveis glicerol (L) e (Q) e gelatina (L) exerceram efeitos significativos positivos em relação à atividade enzimática.

Tabela 10 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 240 g e glicerol

	Efeito	Erro padrão	t(14)	P
Média	0,925035*	0,394576	2,344378	0,034329
(1) Glicerol (%) (L)	1,873490*	0,395171	4,740958	0,000316
Glicerol (%) (Q)	0,793109	0,523982	1,513620	0,152367
(2) Gelatina (%) (L)	0,028418	0,395171	0,071913	0,943689
Gelatina (%) (Q)	1,379934*	0,523982	2,633555	0,019650
(1)(L) x (2)(L)	0,041667	0,558025	0,074668	0,941535

* Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol.

	Efeito	Erro padrão	T(14)	P
Média	0,380251	0,259137	1,467376	0,164377
(1) Glicerol (%) (L)	1,362386*	0,259528	5,249483	0,000123
Glicerol (%) (Q)	0,850194*	0,344124	2,470607	0,026953
(2) Gelatina (%) (L)	-0,202477	0,259528	-0,780176	0,448277
Gelatina (%) (Q)	0,808278*	0,344124	2,348802	0,034041
(1)(L) x (2)(L)	0,125000	0,366481	0,341082	0,738107

* Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Figura 29 – Diagrama de Pareto referente aos experimentos utilizando a gelatina de *Bloom* 240 g e glicerol.

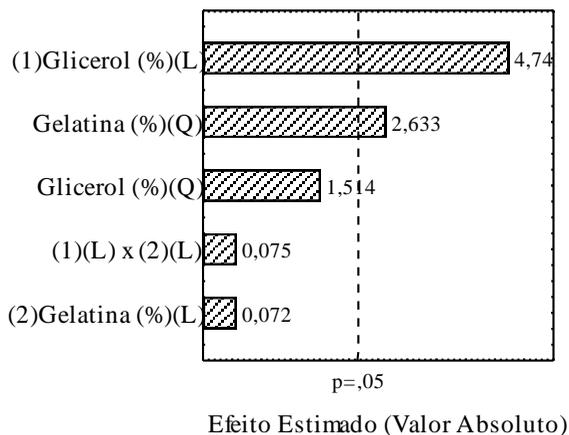
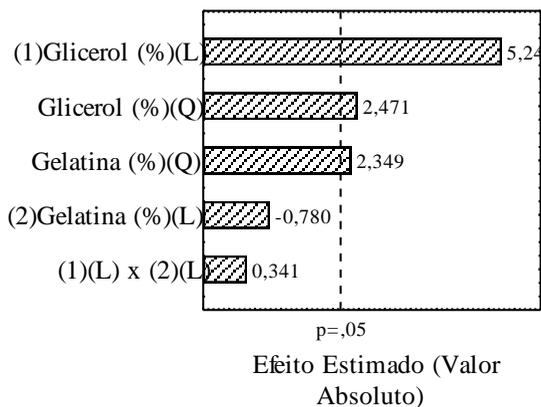


Figura 30 – Diagrama de Pareto referente aos experimentos utilizando a gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol.



Para a obtenção do modelo matemático que represente a migração (em termos de atividade enzimática), considerando as variáveis concentração de gelatina e de glicerol, foram calculados os coeficientes de regressão, apresentados nas Tabelas 12 e 13, para as gelatinas de *Bloom* 240 g e 280 g, respectivamente.

Tabela 12 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de Bloom 240 g e glicerol

	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T(14)	P
Média	0,925035*	0,394576	2,344378	0,034329
(1) Glicerol (%) (L)	0,936745*	0,197586	4,740958	0,000316
Glicerol (%) (Q)	0,396555	0,261991	1,513620	0,152367
(2) Gelatina (%) (L)	0,014209	0,197586	0,071913	0,943689
Gelatina (%) (Q)	0,689967*	0,261991	2,633555	0,019650
(1)(L) x (2)(L)	0,020833	0,279012	0,074668	0,941535

*Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$). $R^2 = 0,72$.

Tabela 13 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de Bloom 280 g e glicerol.

	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(14)	P
Média	0,380251	0,259137	1,467376	0,164377
(1) Glicerol (%) (L)	0,681193*	0,129764	5,249483	0,000123
Glicerol (%) (Q)	0,425097*	0,172062	2,470607	0,026953
(2) Gelatina (%) (L)	-0,101239	0,129764	-0,780176	0,448277
Gelatina (%) (Q)	0,404139*	0,172062	2,348802	0,034041
(1)(L) x (2)(L)	0,062500	0,183241	0,341082	0,738107

*Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$). $R^2 = 0,70$.

Nas equações 18 e 19 estão os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes à imobilização da lipase para gelatina *Bloom* 240 g e 280 g, respectivamente, em termos de atividade enzimática.

$$A = 0,925 + 0,937GLI + 0,690G^2 \quad (\text{Equação 18})$$

$$A = 0,380 + 0,681GLI + 0,425GLI^2 + 0,404G^2 \quad (\text{Equação 19})$$

onde A é a atividade enzimática em U/mL, GLI é a concentração de glicerol (%) e G é a concentração de gelatina (%).

A análise estatística, através do modelo matemático empírico, permitiu a construção das Superfícies de Resposta, sendo apresentadas nas Figuras 31 e 33, e Curvas de Contorno, apresentadas nas Figuras 32 e 34, para as gelatinas com valores de *Bloom* de 240 g e 280 g, respectivamente.

Figura 31 – Superfície de resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 240 g e glicerol na elaboração das matrizes.

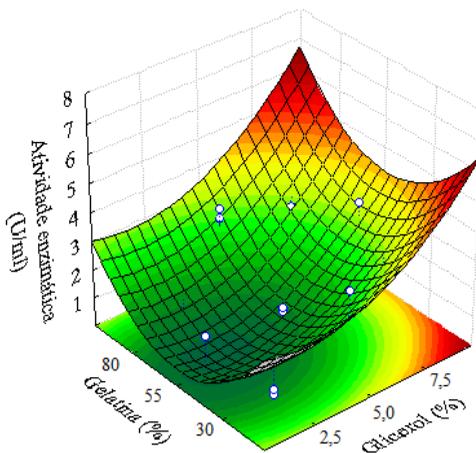


Figura 32 – Curva de contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 240 g e glicerol na elaboração das matrizes.

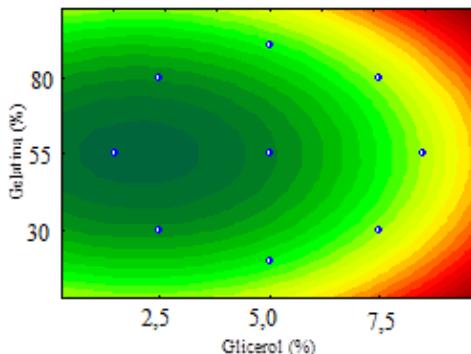


Figura 33 – Superfície de resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol na elaboração das matrizes.

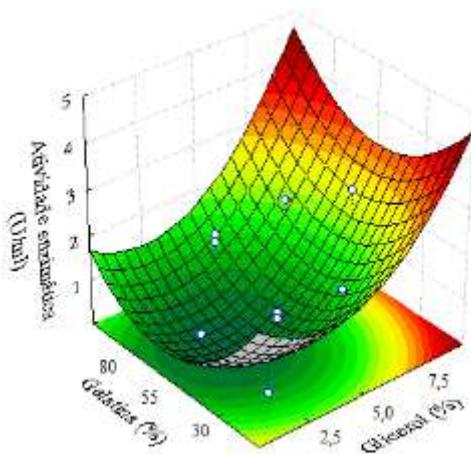
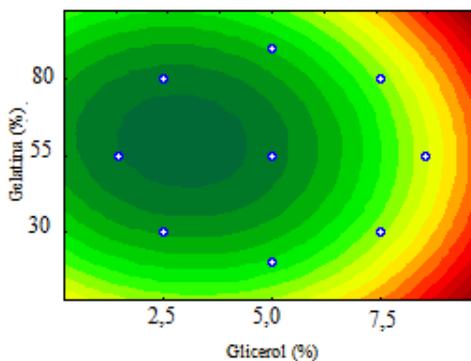


Figura 34 – Curva de contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol na elaboração das matrizes.



Através das Figuras 31 a 34, fica evidenciado que menores concentrações de glicerol levam a menores atividades da lipase, e por consequência, menor migração. Mesmo para a gelatina apresentando efeito significativo positivo, verifica-se que para qualquer concentração de gelatina, com concentrações de glicerol abaixo de 5 %, a migração tende a ser menor. Portanto, para os experimentos com glicerol como

plastificante, apenas E1 para gelatina de *Bloom* 240 g e E1 e E2 para a gelatina de *Bloom* 280 g podem ser utilizados na imobilização da lipase nas condições testadas (pH 7,0, temperatura de 37 °C e 160 rpm de agitação).

5.3.2 Imobilização e determinação da migração utilizando manitol como plastificante

As Figuras 35 a 38 apresentam os resultados de atividade lipásica correspondentes à migração para as gelatinas de *Bloom* 200 g, 220 g, 240 g e 280 g, respectivamente, adicionadas de manitol.

Figura 35 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 200 g e manitol.

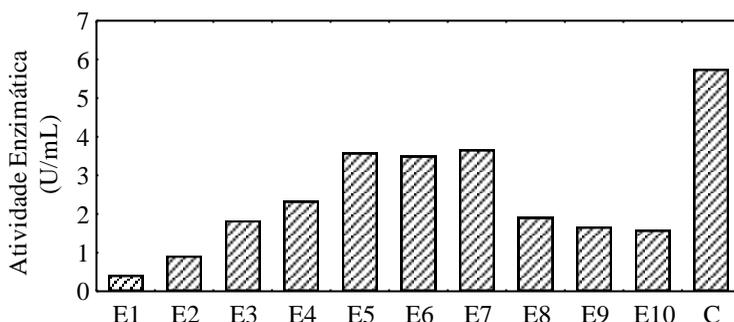


Figura 36 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 220 g e manitol.

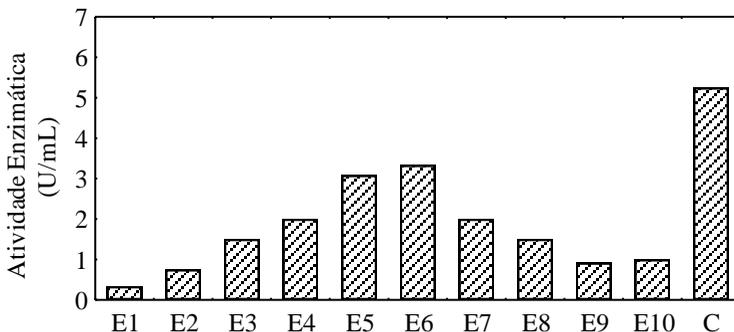


Figura 37 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 240 g e manitol.

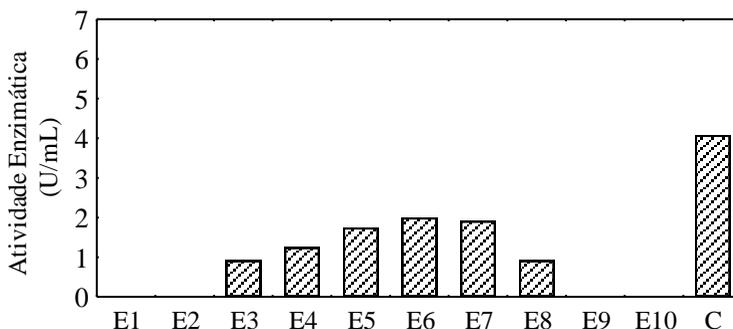
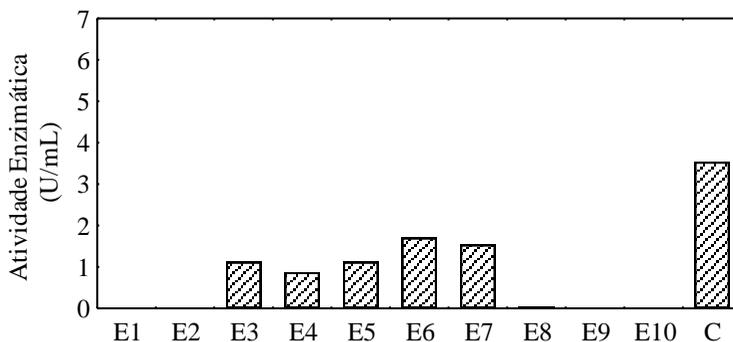


Figura 38 – Resultados da migração da lipase, em termos de atividade enzimática, para as matrizes do planejamento experimental elaboradas com gelatina de *Bloom* 280 g e manitol.



Para as gelatinas com valor de *Bloom* de 200 g e 220 g, houve migração da lipase em todos os experimentos, como o ocorrido para os géis adicionados de glicerol, sendo mais evidenciado este comportamento nos experimentos E5, E6 e E7 para a gelatina de *Bloom* 200 g e E5 e E6 para a gelatina de *Bloom* 220 g. Para as gelatinas de *Bloom* 240 g e 280 g, os experimentos E1, E2 e E9/10 não apresentaram migração (atividade lipásica igual a zero).

Para a verificação da igualdade entre os experimentos, realizou-se novamente o Teste de Tukey em nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). A Tabela 14 apresenta os resultados das médias de atividade enzimática específica para os experimentos de imobilização, o desvio padrão e o Teste de Tukey.

Através dos resultados da Tabela 14, verifica-se que, para um mesmo experimento em relação a diferentes gelatinas, a maioria dos experimentos com gelatina de *Bloom* 240 g e 280 g são iguais estatisticamente ($p > 0,05$) e diferem dos experimentos com *Bloom* 200 g e 220 g ($p < 0,05$). Todos os experimentos com gelatina de *Bloom* 200 g apresentaram diferença significativa dos mesmos experimentos utilizando-se gelatina de *Bloom* 280 g. O mesmo ocorre com os experimentos com gelatina de *Bloom* 220 g, com exceção do E7, igual, estatisticamente para as gelatinas de *Bloom* 220 g, 240 g e 280 g e diferente da gelatina de *Bloom* 200 g.

Os experimentos que apresentaram maior migração para a gelatina de *Bloom* 200 g e 240 g foram E7 (5,0 % de manitol e 19,8 % de gelatina), E5 (1,5 % de manitol e 55 % de gelatina) e E6 (8,5 % de plastificante e 55 % de gelatina). Para a gelatina de *Bloom* 220 g, além dos anteriores, o experimento E4 apresentou migração igual, estatisticamente, ao experimento E7. A maior migração ocorreu nos experimentos E6, E7, E5 e E3 para a gelatina de *Bloom* 280 g. Novamente as maiores migrações seguem o perfil das maiores solubilidades em água. Para a gelatina de *Bloom* 280 g, os experimentos considerados iguais pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$) foram E1, E2, E8, E9 e E10.

Percebe-se que para os experimentos com a adição de manitol, mais matrizes de imobilização foram eficientes se comparado com o glicerol. Isto evidencia a maior interação que o glicerol possui com a água, favorecendo a migração da enzima.

Tabela 14 – Médias de atividade enzimática, desvio padrão e Teste de Tukey para os experimentos de determinação de migração utilizando manitol e as gelatinas de *Bloom 200 g* a 280 g.

Experimento	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio Padrão			
	<i>Bloom 200 g</i>	<i>Bloom 220 g</i>	<i>Bloom 240 g</i>	<i>Bloom 280 g</i>
E1	0,42 ^{aB} ± 0,12	0,33 ^{aB} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00
E2	0,92 ^{abB} ± 0,12	0,75 ^{bB} ± 0,12	0,00 ^{aA} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00
E3	1,83 ^{cC} ± 0,00	1,50 ^{cB} ± 0,00	0,92 ^{bA} ± 0,12	1,13 ^{bcA} ± 0,06
E4	2,33 ^{cC} ± 0,00	2,00 ^{dC} ± 0,00	1,25 ^{bcB} ± 0,12	0,88 ^{bA} ± 0,06
E5	3,58 ^{dB} ± 0,12	3,08 ^{eB} ± 0,12	1,75 ^{cdA} ± 0,12	1,13 ^{bcA} ± 0,29
E6	3,50 ^{dB} ± 0,24	3,33 ^{eB} ± 0,00	2,00 ^{dA} ± 0,00	1,71 ^{dA} ± 0,00
E7	3,67 ^{dB} ± 0,00	2,00 ^{dA} ± 0,24	1,92 ^{dA} ± 0,12	1,54 ^{cdA} ± 0,06
E8	1,92 ^{cC} ± 0,59	1,50 ^{cC} ± 0,00	0,92 ^{bB} ± 0,12	0,04 ^{aA} ± 0,06
E9	1,67 ^{bcC} ± 0,24	0,92 ^{bB} ± 0,12	0,00 ^{aA} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,06
E10	1,58 ^{bcC} ± 0,12	1,00 ^{bB} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00	0,00 ^{aA} ± 0,00
C*	5,75 ^{eB} ± 0,12	5,25 ^{fB} ± 0,12	4,08 ^{eA} ± 0,35	3,54 ^{eA} ± 0,18

Atividade enzimática da lipase livre: 7,33 U/mL

E1- 2,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E2 - 2,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E3 - 7,5 % de plastificante e 30 % de gelatina; E4 - 7,5 % de plastificante e 80 % de gelatina; E5- 1,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E6 - 8,5 % de plastificante e 55 % de gelatina; E7 – 5,0 % de plastificante e 19,8 % de gelatina; E8 – 5,0 % de plastificante e 90,3 % de gelatina; E9/E10 – 5,0 % de plastificante e 55 % de gelatina. Letras maiúsculas, na horizontal, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para diferentes em nível de 95 % de confiança, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para uma mesma gelatina em nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey. * C significa Controle. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

5.3.2.1 Efeitos das variáveis e coeficientes de regressão obtidos a partir dos resultados experimentais

Novamente para a verificação da influência das variáveis de obtenção das matrizes de imobilização frente à atividade enzimática, e consequentemente à migração, fez-se a verificação dos efeitos isolados e de interação destas, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Assim como para os experimentos contendo glicerol, somente verificaram-se os efeitos em relação aos resultados dos experimentos com gelatina de *Bloom* 240 g e 280 g, apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Para os experimentos com a gelatina de *Bloom* 240 g, apenas a concentração de manitol apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), sendo este positivo. Isto significa que a passagem do nível -1 para +1 no planejamento experimental ocasiona em maiores atividades enzimáticas. Não há efeito da concentração de gelatina, bem como não há efeito da interação entre as variáveis. Portanto, para a gelatina de *Bloom* 240 g, apenas as maiores concentrações de manitol levam à migração.

Tabela 15 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 240 g e manitol.

	Efeito	Erro padrão	t(14)	P
Média	0,006628	0,344405	0,019245	0,984917
(1)Manitol (%) (L)	0,631671	0,344925	1,831330	0,088412
Manitol (%) (Q)	1,319242*	0,457357	2,884493	0,012004
(2) Gelatina (%) (L)	-0,269970	0,344925	-0,782692	0,446846
Gelatina (%) (Q)	0,858165	0,457357	1,876359	0,081608
(1)(L) x (2)(L)	0,166667	0,487071	0,342181	0,737297

* Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 16 – Efeitos das variáveis e efeito de interação entre as variáveis para os resultados de atividade enzimática referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de 280 Bloom e manitol.

	Efeito	Erro padrão	t(14)	P
Média	0,003634	0,227255	0,01599	0,987468
(1) Manitol (%) (L)	0,707730*	0,227598	3,10957	0,007685
Manitol (%) (Q)	1,114291*	0,301786	3,69233	0,002414
(2) Gelatina (%) (L)	-0,593014*	0,227598	-2,60554	0,020752
Gelatina (%) (Q)	0,485550	0,301786	1,60892	0,129944
(1)(L) x (2)(L)	-0,125000	0,321393	-0,38893	0,703177

* Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Os efeitos significativos para a gelatina de *Bloom* 280 g foram a concentração de manitol e a concentração de gelatina, sendo a concentração de manitol com efeito significativo positivo, ou seja, aumentos na concentração levam a maiores valores de atividade enzimática e a concentração de gelatina com efeito significativo negativo, onde maiores concentrações de gelatina levam a menores valores de atividade enzimática. As Figuras 39 e 40 demonstram mais claramente estes efeitos das variáveis.

Figura 39 – Diagrama de Pareto referentes aos experimentos utilizando a gelatina de *Bloom* 240 g e manitol.

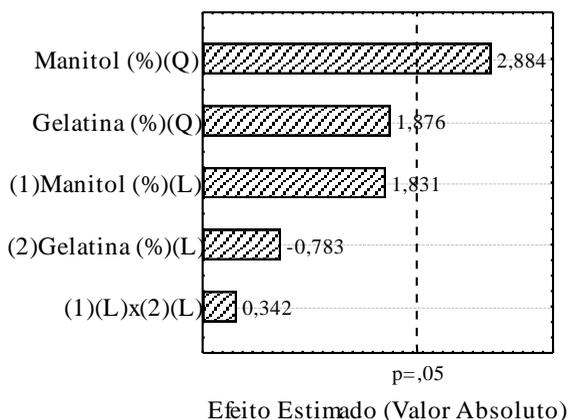
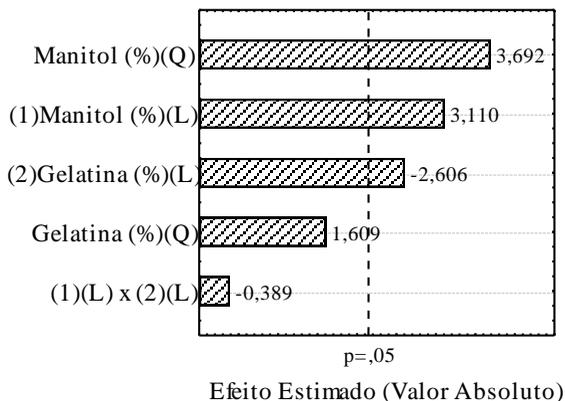


Figura 40 – Diagrama de Pareto referentes aos experimentos utilizando a gelatina de *Bloom* 280 g e manitol.



Os coeficientes de regressão foram determinados, em nível de 95 % de significância, a fim de se obter o modelo matemático referente à migração, sendo apresentados nas Tabelas 17 e 18, para as gelatinas com valores de *Bloom* 240 g e 280 g, respectivamente.

Tabela 17 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 240 g e manitol.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(14)	p
Média	0,006628	0,344405	0,019245	0,984917
(1) Manitol (%) (L)	0,315835	0,172462	1,831330	0,088412
Manitol (%) (Q)	0,659621*	0,228678	2,884493	0,012004
(2) Gelatina (%) (L)	-0,134985	0,172462	-0,782692	0,446846
Gelatina (%) (Q)	0,429083	0,228678	1,876359	0,081608
(1) (L) x (2) (L)	0,083333	0,243536	0,342181	0,737297

* Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$). $R^2 = 0,69$.

Tabela 18 – Coeficientes de regressão referentes à migração da lipase imobilizada em matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 280 g e manitol

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(14)	p
Média	0,003634	0,227255	0,01599	0,987468
(1) Manitol (%) (L)	0,353865*	0,113799	3,10957	0,007685
Manitol (%) (Q)	0,557146*	0,150893	3,69233	0,002414
(2) Gelatina (%) (L)	-0,296507*	0,113799	-2,60554	0,020752
Gelatina (%) (Q)	0,242775	0,150893	1,60892	0,129944
(1)(L) x (2)(L)	-0,062500	0,160696	-0,38893	0,703177

*Significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$). $R^2 = 0,72$.

Nas Equações 20 e 21 estão os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes à imobilização da lipase para gelatina *Bloom* 240 g e 280 g, respectivamente, em termos de atividade enzimática.

$$A = 0,007 + 0,659MAN^{\frac{2}{3}} \quad (\text{Equação 20})$$

$$A = 0,004 + 0,354MAN - 0,296G + 0,557MAN^{\frac{2}{3}} \quad (\text{Equação 21})$$

onde A é a atividade enzimática em U/mL, MAN é a concentração de manitol (%) e G é a concentração de gelatina (%).

A análise estatística, através do modelo matemático empírico permitiu a construção das Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno, apresentadas nas Figuras 41 a 44.

Verifica-se nas Figuras 41 e 42 que a região que corresponde ao menor valor de atividade enzimática é a região equivalente ao ponto central do planejamento experimental (região verde escura), correspondente aos experimentos utilizando gelatina de 240 *Bloom*. Nas Figuras 43 e 44, o comportamento é semelhante, com um pequeno deslocamento em direção aos níveis -1 para manitol e +1 para gelatina. Assim, para os experimentos utilizando manitol e gelatina, os melhores resultados em termos de migração, foram para os experimentos E1, E2, E9/10 para a gelatina de *Bloom* 240 g, e E1, E2, E8, E9/10 para a gelatina de *Bloom* 280 g. Fica evidenciado que o manitol apresentou

melhor desempenho na retenção da lipase do que o glicerol. Em relação à concentração de gelatina, valores extremos das variáveis do planejamento apresentaram ausência de migração.

Figura 41 – Superfície de Resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 240 g e manitol na elaboração das matrizes.

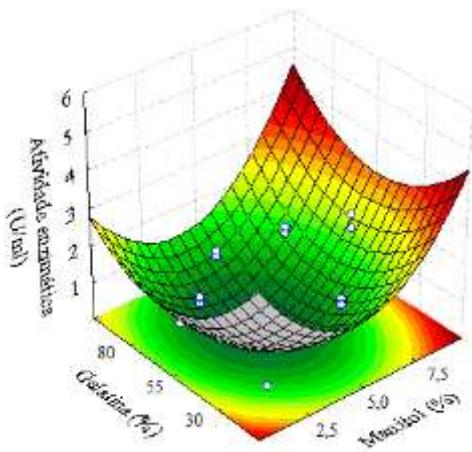


Figura 42 – Curva de Contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 240 g e manitol na elaboração das matrizes.

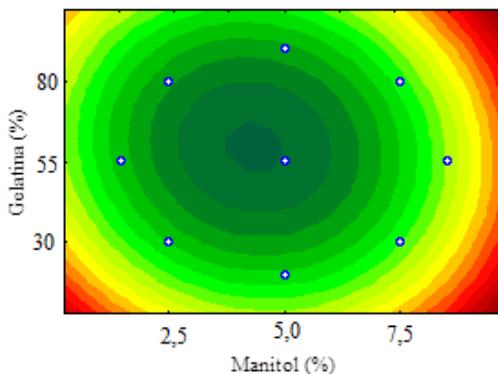


Figura 43 – Superfície de Resposta correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 280 g e manitol na elaboração das matrizes.

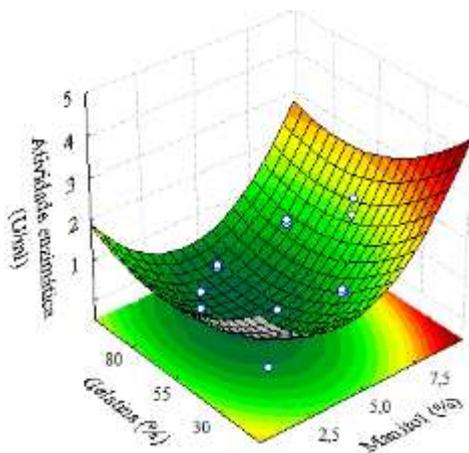
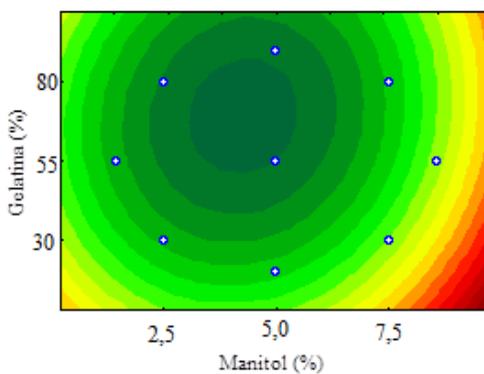


Figura 44 – Curva de Contorno correspondente aos experimentos utilizando gelatina de *Bloom* 280 g e manitol na elaboração das matrizes.



5.4 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO (RI)

Após a obtenção dos experimentos onde não houve migração, realizou-se a determinação do rendimento de imobilização. A Tabela 19 apresenta os resultados para os experimentos com glicerol e manitol e o Teste de Tukey, em nível de 95 % de confiança.

Tabela 19 – Rendimento de imobilização (%) para os experimentos com matrizes adicionadas de glicerol ou manitol que não apresentaram migração.

Experimento	RI (%) ± Desvio Padrão
E1-240-G	6,06 ^e ± 1,31
E1-240-M	7,20 ^c ± 1,74
E1-280-G	3,79 ^e ± 1,31
E1-280-M	3,03 ^c ± 1,31
E2-240-M	53,81 ^{cd} ± 2,63
E2-280-G	57,60 ^c ± 1,31
E2-280-M	52,30 ^d ± 2,27
E8-280-M	87,92 ^a ± 1,31
E9/10-240-M	77,31 ^b ± 2,27
E9/10-280-M	81,70 ^b ± 0,47

Letras iguais na vertical correspondem a médias iguais em nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey. Valores de 280 e 240 correspondem ao *Bloom* da gelatina, M significa manitol e G significa glicerol. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

Pode-se observar na Tabela 19 que os experimentos que obtiveram maior rendimento de imobilização foram E8-280-M, seguido dos experimentos E9/10-280-M e E9/10-240-M, sendo estes últimos iguais estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 95 % de confiança e diferentes do primeiro. Rendimentos intermediários, na ordem de 55 %, foram obtidos para os experimentos E2 (2,5 % de plastificante e 80 % de gelatina), sendo que E2 que contém manitol difere estatisticamente de E2 que contém glicerol.

Trabalhos apresentados na literatura onde foram imobilizadas diferentes enzimas em gelatina ou mistura de gelatina ou gelatina reticulada apresentam resultados muito semelhantes. Assis *et al.* (2004a;

2004b), em estudo de vários suportes reticulados com glutaraldeído 2,5 % para a imobilização de extrato de pectinametilsterase, obtiveram os maiores rendimentos de imobilização em Sepharose de 81,7 %, seguido do gel de gelatina, 78,0 %, após 48 horas de processo. Afirmam que como a gelatina é consideravelmente mais economicamente viável que a Sepharose, torna-se mais adequada à imobilização, mesmo com uma pequena diferença em relação ao rendimento de imobilização. Naganagouda *et al.* (2007), ao imobilizarem α -galactosidase em uma mistura de gelatina, alginato de sódio e glicerol reticulada com uma solução de glutaraldeído a 5 %, obtiveram um rendimento de imobilização de 64,3 %. Tanriseven e Olcer (2008), ao imobilizarem glicocamilase em gelatina reticulada com poliglutaraldeído, obtiveram um rendimento de imobilização de 85 %.

Percebe-se que os menores rendimentos de imobilização, entre 3,03 e 7,20 %, correspondem ao experimento com menor concentração de gelatina, E1 (2,5 % de plastificante e 30 % de gelatina). Estes experimentos caracterizam-se por conter a menor concentração de gelatina dissolvida em mesma quantidade de água do que os experimentos com maior concentração de gelatina. A ausência de atividade enzimática nos testes de migração e o baixo rendimento de imobilização podem ser justificados devido a menores concentrações de gelatina associadas a plastificantes darem origem a filmes mais compactos, com mínima quantidade de poros, o que pode ser característico de E1. Assim, a ausência de migração pode se dar pela homogeneidade da matriz, sendo a enzima aprisionada e a difusão comprometida.

Por outro lado, os maiores rendimentos de imobilização, correspondentes aos experimentos com concentração de gelatina superior a 55 %, podem ser justificados de acordo com Van Vlierberghe *et al.* (2007), que afirmam que uma maior concentração de gelatina pode resultar em um aumento da taxa de nucleação e, portanto, em um maior número de poros. Isto se deve ao fato de que, nas soluções de gelatina, quando aquecidas, moléculas assumem conformação tipo bobina aleatória. Após o resfriamento, inicia-se uma reorganização e surgem os núcleos, devido a interações helicoidais (TOSH *et al.*, 2003).

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para auxiliar no entendimento dos resultados do rendimento de imobilização, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura das matrizes de imobilização que não apresentaram migração.

As Figuras 45 a 48 apresentam as fotomicrografias para o experimento E1, em quatro condições diferentes em relação aos valores de *Bloom* da gelatina e em relação aos plastificantes.

Figura 45 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 240 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.

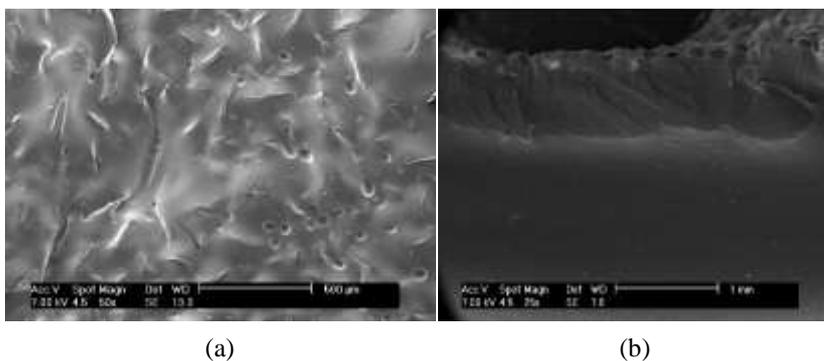


Figura 46 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.

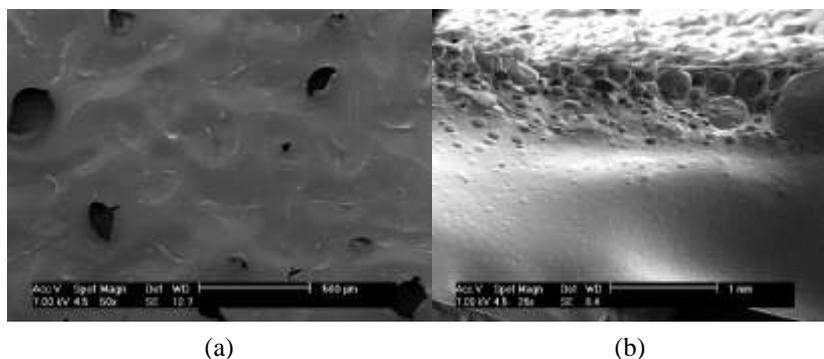


Figura 47 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 280 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.

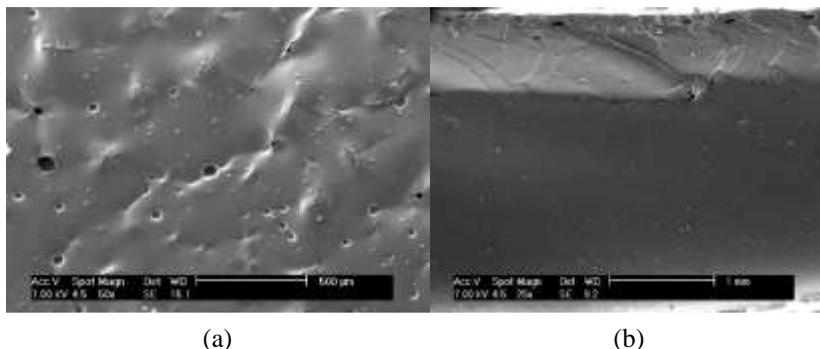
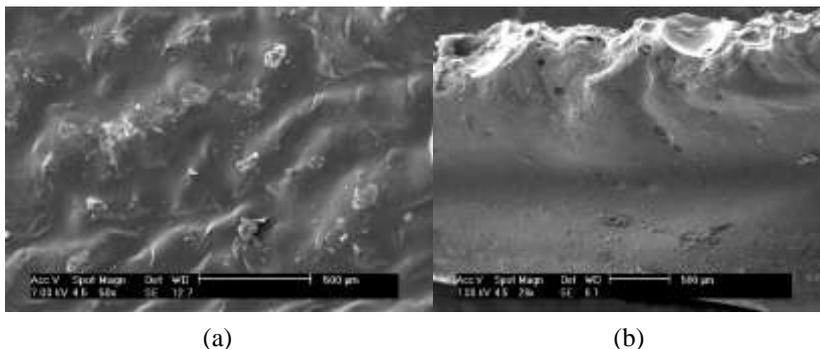


Figura 48 – Microscopia do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.



Observa-se que na superfície onde a gelatina foi reticulada com glutaraldeído ocorre a presença de poros, principalmente nas Figuras 45 e 46, que correspondem aos rendimentos de imobilização de 6,06 % e 7,20 %, respectivamente. Através do corte da seção transversal, pode-se verificar que estes poros concentram-se na parte superior do gel. Nas Figuras 47 e 48, verifica-se pouca porosidade na superfície e no corte, o que justifica o rendimento de imobilização na ordem de 3 %, confirmando a afirmação de que menores concentrações de gelatina associadas a plastificantes originam filmes mais compactos. Nestas figuras, a presença de poros ao longo do corte não é verificada. Portanto, a migração da lipase não ocorreu pela formação de um filme uniforme e

sem poros. De acordo com Kowalczyk e Baraniak (2011), uma estrutura compacta ocorre provavelmente pelas forças de coesão que se acentuam principalmente durante a secagem de materiais de base aquosa. Portanto, as matrizes de imobilização obtidas dos experimentos E1-240-G, E1-240-M, E1-280-G e E1-280-M não foram utilizadas para a imobilização da lipase nas etapas posteriores devido ao baixo rendimento de imobilização e às suas características morfológicas.

Nas Figuras 49 a 51 estão as fotomicrografias para o experimento E2, com gelatinas de *Bloom* 240 g e 280 g e com manitol e glicerol como plastificantes.

Figura 49 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de *Bloom* 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.

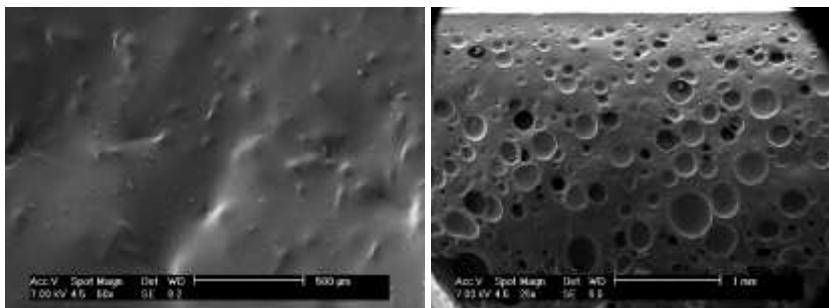


Figura 50 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de *Bloom* 280 g e glicerol. (a) superfície (b) seção transversal.

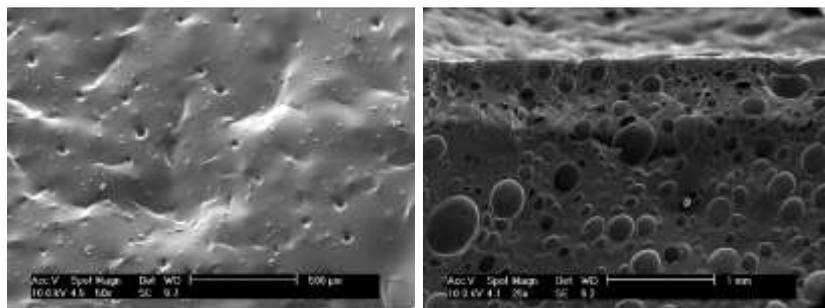
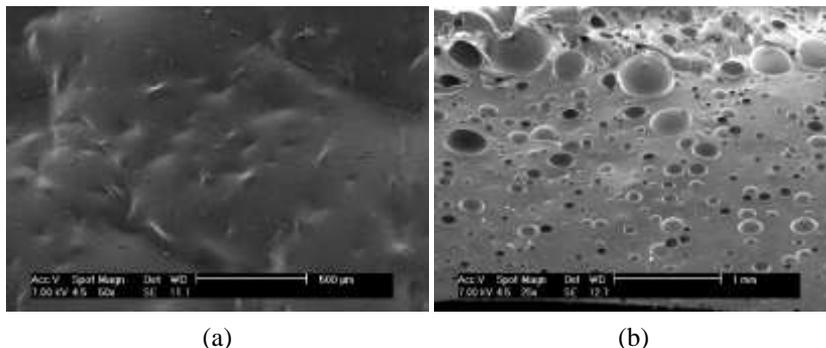


Figura 51 – Microscopia do experimento E2 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.



Os experimentos caracterizados por E2 contêm 80 % de gelatina e 2,5 % de plastificante, ou seja, uma alta concentração de gelatina e baixa concentração de plastificante. Neste caso, verifica-se que as superfícies (50a, 51a e 52a) apresentam-se com menor porosidade em relação aos experimentos E1. O experimento E2 com glicerol como plastificante (Figura 50) apresentou maior porosidade na superfície entre os experimentos E2 apresentados. Através das imagens de seção transversal, percebe-se que para todos os experimentos E2 ocorreu a formação de poros irregulares, com a presença de poros grandes e pequenos ao longo do corte e espaços compactos. Na Figura 51, percebe-se através da imagem 51b, que a distribuição dos poros ao longo da seção transversal também é desigual. Ocorre a presença de poros maiores e em maior quantidade próximo à superfície reticulada e na medida em que se afasta desta superfície, os poros tendem a apresentar tamanhos menores.

A morfologia dos géis correspondentes aos experimentos E8 (5,0 % de manitol e 90,3 % de gelatina) e E9/E10 (5,0 % de manitol e 55 % de gelatina), que apresentaram maiores rendimentos de imobilização, está apresentada nas Figuras 52 a 54. Observa-se que as superfícies da matriz apresentam-se com menores rugosidades e com poros também menores. Para a matriz do experimento E9/10 com a gelatina de *Bloom* 240 g, Figura 53, percebe-se que os poros são um pouco maiores e irregulares do que os poros das matrizes E8 e E9/10 com gelatina de *Bloom* 280 g, onde a profundidade dos poros parece mais evidenciada, o que pode ter facilitado a transferência de massa o qual pode levar a maiores rendimentos de imobilização pelo contato da enzima com o substrato ser facilitado.

Figura 52 – Microscopia do experimento E8 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.

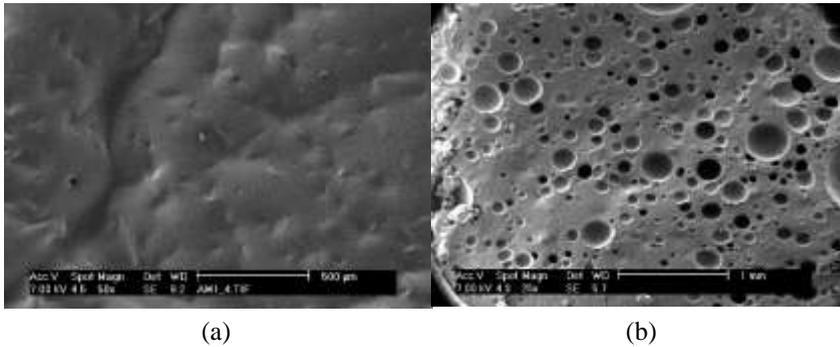


Figura 53 – Microscopia do experimento E9/E10 utilizando gelatina de Bloom 240 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.

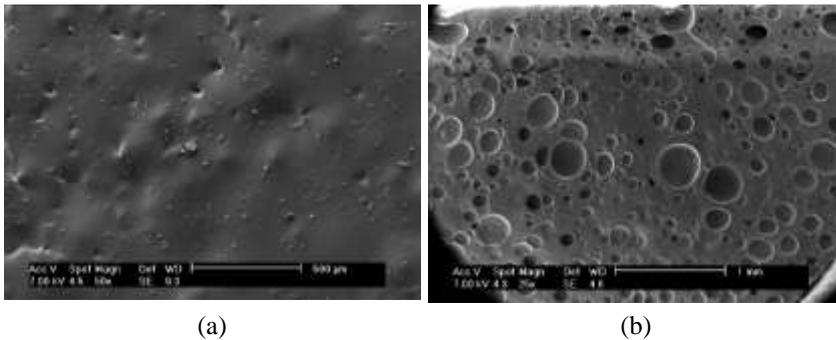
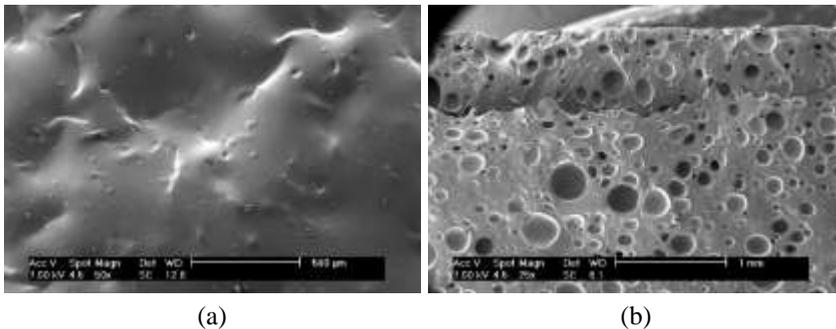


Figura 54 – Microscopia do experimento E9/E10 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol. (a) superfície (b) seção transversal.



Percebe-se que a morfologia de géis adicionados de plastificantes pode ser afetada de acordo com as concentrações utilizadas de biopolímero e/ou plastificante. Al-Hassan e Norziah (2011) testaram a concentração de 25 % de plastificante (glicerol ou sorbitol) em filmes obtidos pela mistura de amido de mandioca e gelatina de peixe em diferentes proporções (1:0, 2:1, 3:1, 4:1 e 5:1) e verificaram a morfologia dos mesmos. Neste estudo, os autores encontraram resultados semelhantes, mesmo a concentração de plastificantes sendo maior do que a do presente estudo. Verificaram que filmes com menor teor de proteína apresentaram superfícies mais lisas e menos porosas.

Devido ao rendimento de imobilização obtido, na ordem de 80 %, bem como as características morfológicas, optou-se por testar, na etapa descrita no item 5.7, os experimentos E9/10 com gelatina de *Bloom* 240 g adicionados de manitol, E8, com gelatina de *Bloom* 280 g adicionado de manitol e E9/10 com gelatina de *Bloom* 280 g e manitol, ou seja, E9/10-240-M, E8-280-M, E9/10-280-M, respectivamente.

5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DAS MATRIZES DE IMOBILIZAÇÃO

Todos os difratogramas, apresentados nas Figuras 55 a 64, ocorre a presença de um pico no ângulo de 20° . Rivero *et al.* (2010) ao realizar a Difração de Raios-X de amostra de gelatina tipo B, mesma classificação da gelatina utilizada no presente trabalho, afirma que a mesma apresenta característica de difração de um material parcialmente cristalino, com pico largo localizado em $2\theta=20^\circ$. Os valores dos ângulos obtidos para os picos apresentados ficaram na faixa de $2\theta=19,63^\circ$ a $2\theta=21,78^\circ$. As matrizes correspondentes as Figuras 58, 60, 63 e 64 apresentaram valores de ângulos deslocados, ligeiramente abaixo ou acima de 20° , que pode ser justificado pelas propriedades do glicerol e do manitol e afinidade com a água bem como sua interação com o polímero. O pico da Figura 62, correspondente ao experimento com maior percentual de gelatina, apresentou maior intensidade em relação aos das demais Figuras, sendo que os menores picos estão apresentados nas Figuras 55, 56, 57 e 58, experimentos com a menor concentração de gelatina. A intensidade do pico está relacionada com a cristalinidade da amostra, o que demonstra que os experimentos E1 com diferentes gelatinas e plastificantes (Figuras 55, 56 e 57) apresentaram menor cristalinidade que os demais experimentos.

Ainda, ocorre a presença de outro pico, cujos ângulos variaram de $2\theta=6,77^\circ$ a $2\theta=7,82^\circ$. Cabe salientar que na Figura 55, não ocorre este pico e na Figura 58, não está nítida a sua presença. Segundo Tanioka *et al.* (1996), estes picos indicam a reconstituição da estrutura de tripla hélice do colágeno e, de acordo com Rivero *et al.*, (2010), picos próximos a 8° estão relacionados com o diâmetro da tripla hélice e sua intensidade estaria associada ao teor de triplas hélices nos filmes. Verifica-se que as maiores intensidades determinadas em relação ao pico próximo a 8° estão apresentadas na Figura 62, seguida da Figura 64, correspondentes aos experimentos E8 (5,0 % de manitol e 90,3 % de gelatina de 280 Bloom) e E9/E10 (5,0 % de manitol e 55 % de gelatina de 280 Bloom). Isto pode caracterizar estas matrizes como mais estáveis, pois, ao resfriar, no gel de gelatina ocorre o enrolamento e o repregueamento das ligações, retornando a estrutura típica do colágeno e isto reforça a rigidez do gel. O resultado é essencialmente uma rede aberta formada através da associação de cadeias nas zonas de união, ricas em grupos amino, reforçadas por regiões nas quais se tem reconstituída a estrutura helicoidal do colágeno (WONG, 1995). De acordo com Boanini *et al.* (2010), um aumento das estruturas de tripla hélice pode estar relacionada com o aumento da estabilidade térmica de géis de gelatina.

Figura 55 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 240 g e glicerol.

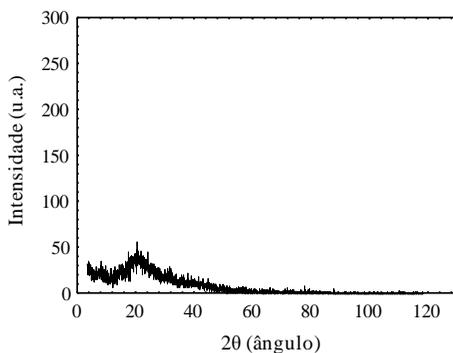


Figura 56 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 240 g e manitol.

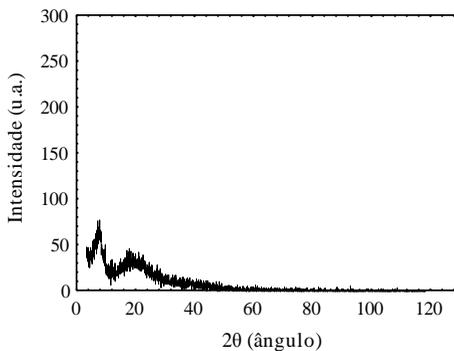


Figura 57 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 280 g e glicerol.

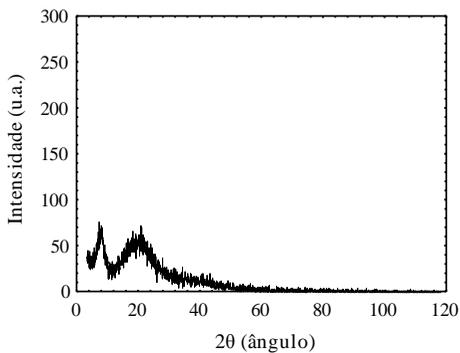


Figura 58 – Difratoograma do experimento E1 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol.

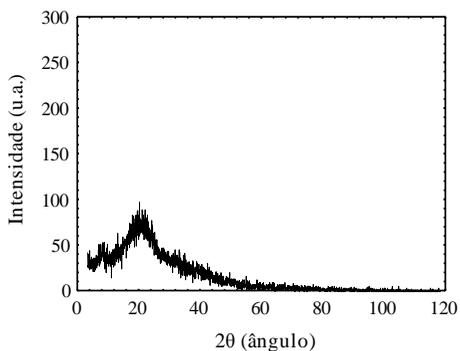


Figura 59 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de Bloom 240 g e manitol.

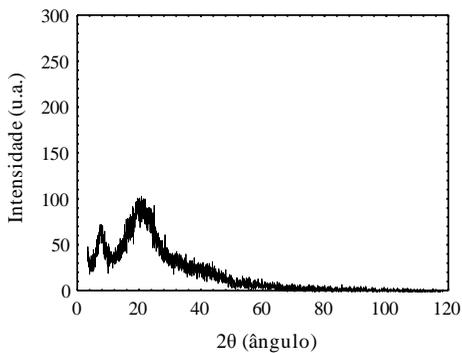


Figura 60 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de Bloom 280 g e glicerol.

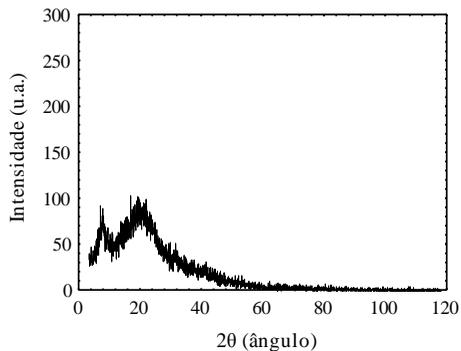


Figura 61 – Difratoograma do experimento E2 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol.

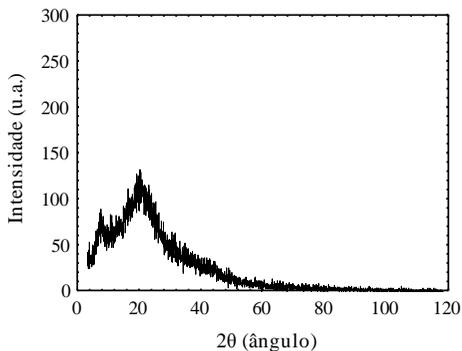


Figura 62 – Difratoograma do experimento E8 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol.

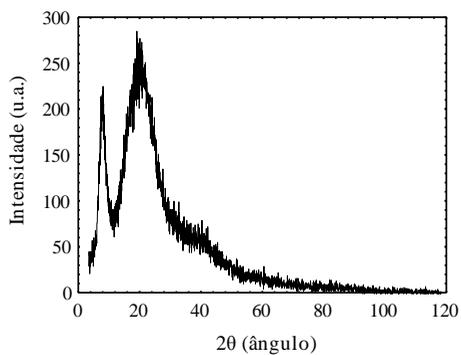


Figura 63 – Difratoograma do experimento E9/E10 utilizando gelatina de Bloom 240 g e manitol.

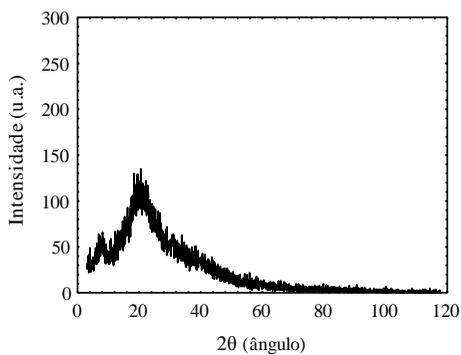
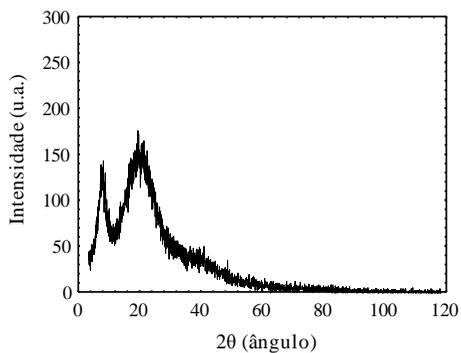


Figura 64 – Difratoograma do experimento E9/E10 utilizando gelatina de Bloom 280 g e manitol.



Bergo e Sobral (2007), ao estudarem o efeito de plastificantes nas propriedades de géis de gelatina de pele suína, verificaram que a adição de 0, 15, 30 ou 45 % de glicerol nos géis não levaram a estruturas diferenciadas. Todos os difratogramas apresentaram caráter amorfo, indicando que não há tendência a recristalização, provavelmente devido à umidade crescente nos filmes, evitando qualquer tendência a formar regiões semicristalinas. Este comportamento diferenciado em relação ao presente estudo pode ser justificado pela baixa concentração de gelatina utilizada no estudo citado, sendo 2 g de gelatina para 100 mL de água.

Filmes de gelatina plastificados com glicerol nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 g por 100 g de gelatina foram desenvolvidos por Rivero *et al.* (2010). Os autores obtiveram picos muito semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Os filmes plastificados com 0 % (não plastificado) e com 20 % de glicerol apresentaram 2 picos, sendo o primeiro próximo a $2\theta=8^\circ$ e o segundo próximo a $2\theta=20^\circ$. Com a concentração de 100 % de glicerol não ficou evidente o primeiro pico, apenas o segundo, o que pode ser devido a um afastamento das características do gel de gelatina pela alta concentração de plastificante, levando a uma estrutura diferenciada, sem a presença ou com pouca presença de triplas hélices.

Piermaria *et al.* (2011) ao desenvolverem filmes de kefiram adicionados de glicerol verificaram que os padrões dos picos obtidos para as diferentes concentrações mostraram um deslocamento na posição do primeiro pico relacionado ao conteúdo de glicerol.

5.7 VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA

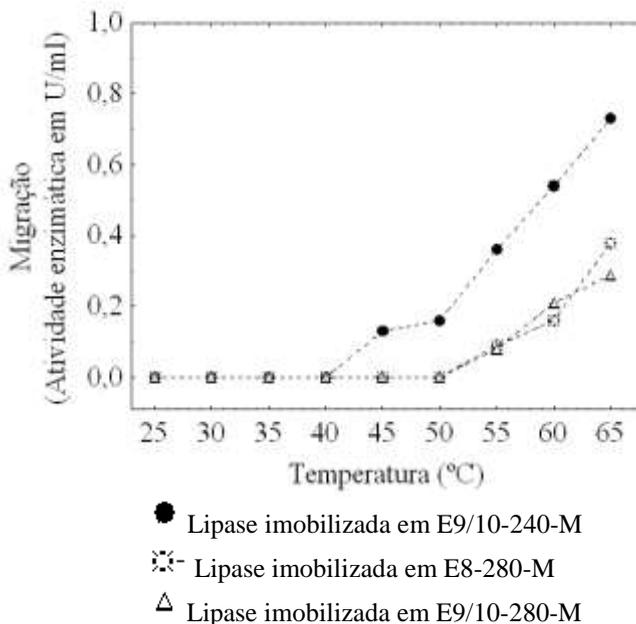
Nas etapas de verificação da migração, os experimentos foram conduzidos em pH 7,0 e temperatura de 37 °C, 160 rpm e 60 minutos. Em experimentos de hidrólise, geralmente, parâmetros como pH, temperatura e tempo de processo são investigados para a otimização, e a matriz onde a lipase está imobilizada deve manter-se estável durante as reações. Para a verificação da estabilidade da matriz de imobilização quanto à capacidade de manter a lipase imobilizada, buscou-se verificar a ocorrência de migração em diferentes temperaturas, pHs, tempos e condições de agitação, a fim, de posteriormente, determinar as condições ótimas (parâmetros operacionais) para a lipase imobilizada e livre. As matrizes de imobilização estudadas nesta etapa foram E9/10-240-M, E8-280-M e E9/10-280-M.

5.7.1 Estabilidade da enzima imobilizada com temperatura

Para a verificação da ocorrência de migração, tendo como resposta a atividade enzimática (U/mL), submeteu-se as matrizes a diferentes temperaturas de processo através da incubação em tampão fosfato de sódio pH 7,0. O tempo de processo continuou fixado em 60 minutos e a agitação em 160 rpm. A Figura 65 mostra os perfis obtidos de atividade enzimática (U/mL).

Existem diferenças quanto à estabilidade da imobilização para as matrizes E9/10-240M, E8-280-M e E9/10-280-M. A matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 240 g, a partir da temperatura de 40 °C, apresentou migração da lipase para o meio, o que caracteriza a instabilidade da matriz. Para as matrizes E8-280-M e E9/10-280-M, cujo valor de *Bloom* é maior (280 g), a migração começa a ocorrer na temperatura de 50 °C. Gómez-Estaca *et al.* (2011) obtiveram como valor de ponto de fusão para a gelatina bovina de *Bloom* 200-220 g 52,58 °C.

Figura 65 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização E9/10-240-M, E8-280-M e E9/10-280-M com a temperatura.



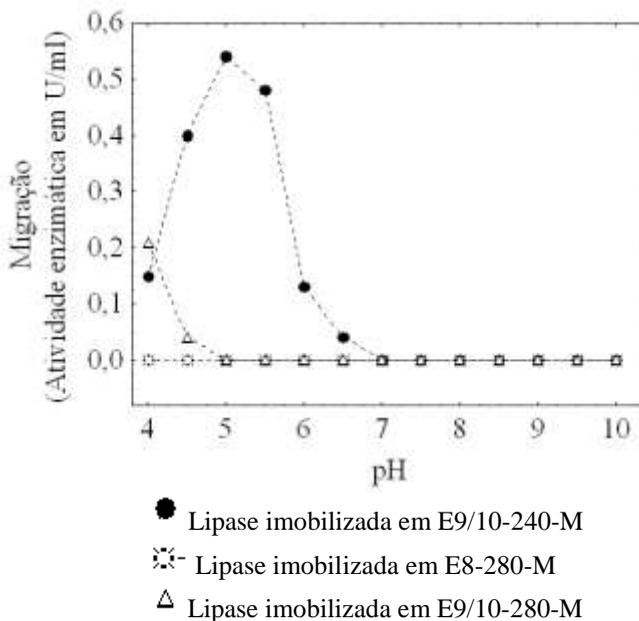
Através dos testes de Difração de Raios-X, percebe-se nos difratogramas correspondentes as matrizes E8-280-M, E9/10-240M e E9/10-280-M (Figuras 62, 63 e 64, respectivamente) que o pico correspondente a $2\theta=8^\circ$ apresenta-se com maior intensidade para a matriz E8-280-M, seguida da matriz E9/10-280-M e E9/10-240M. Como já visto, estes picos correspondem ao teor de triplas hélices formadas durante o resfriamento do gel de gelatina e que o aumento das triplas hélices, caracterizado pela intensidade do pico pode estar relacionado à estabilidade térmica de géis de gelatina (BOANINI *et al.*, 2010), justificando o comportamento frente à temperatura das matrizes de imobilização.

Portanto, para utilização em etapas posteriores, a matriz E9/10-240-M pode ser utilizada apenas em reações com temperatura igual ou abaixo de 40°C devido à sua instabilidade. As demais matrizes podem ser utilizadas em reações com temperatura igual ou inferior a 50°C , levando-se em consideração as demais condições de processo. Pode-se afirmar que o uso do plastificante bem como de concentrações maiores de gelatina na elaboração das matrizes de imobilização levam a um aumento em relação à estabilidade da matriz, pois, como já visto, as temperaturas de fusão das gelatinas puras cujos géis foram elaborados com 6,67 % de gelatina tiveram como ponto de fusão temperaturas inferiores a 40°C .

5.7.2 Estabilidade de imobilização com o pH

Para a verificação da ocorrência de migração em diferentes pHs, submeteu-se as matrizes em meios com pH variando de 4,0 a 10, com incrementos de 0,5. A temperatura foi fixada em 37°C , o tempo de processo, em 60 minutos e a agitação, em 160 rpm. A Figura 66 apresenta os perfis obtidos de atividade enzimática (U/mL).

Figura 66 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização com o pH.



Seguindo a tendência apresentada para a temperatura, em relação ao pH, a matriz que apresentou maior instabilidade foi a elaborada com gelatina de *Bloom* 240 g. A migração teve início em pH abaixo de 7,0, atingindo um valor máximo em pH 5,0. Em valores de pH abaixo de 5,0, a migração ocorreu, porém os valores de atividade enzimática obtidos foram menores, o que pode ser justificado pela desnaturação da enzima no meio e não pela possível diminuição da migração da enzima.

Para a matriz de imobilização E9/10-280-M, em valores de pH abaixo de 5,0, a desestabilização da matriz de imobilização proporcionou a migração da lipase que apresentou, em pH 4,5 o valor de atividade próximo ao obtido para a lipase imobilizada em E9/10-240-M, o que sugere novamente a desnaturação da lipase neste valor de pH.

Para a matriz elaborada com gelatina de *Bloom* 280 g e correspondente ao experimento E8 (E8-280-M), não se verificou migração da lipase em nenhum dos valores de pH testados, o que sugere que esta matriz possui estabilidade frente a este parâmetro.

A gelatina possui a capacidade de mudar sua carga de acordo com o pH do meio. Segundo Schrieber e Gareis (2007), se o pH em torno da gelatina corresponde ao seu ponto isoelétrico, a gelatina caracteriza-se por carga neutra. Se o pH é mais elevado, a gelatina é carregada negativamente e se for inferior, carregada positivamente. Abaixo de 5,0, todos os tipos de gelatina (A e B) são carregadas positivamente e acima de 9,0, todas são carregadas negativamente.

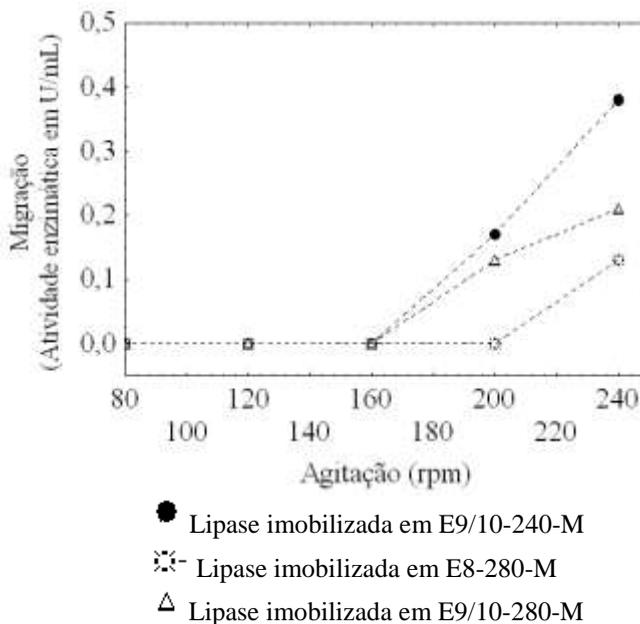
Neste estudo, a gelatina utilizada caracteriza-se por tipo B, onde o ponto isoelétrico encontra-se em torno do pH 5,0. Ao submeter as matrizes de imobilização em diferentes valores de pH, pode-se ter alterado a característica de carga da gelatina. Ainda Segundo Schrieber e Gareis (2007), o ponto isoelétrico de uma gelatina influencia na sua capacidade de atuar como estabilizador de sistemas complexos.

Nas reações de hidrólise, ocorre um abaixamento do valor de pH (se o meio não estiver tamponado). Esta acidificação ocorre pelo rompimento (através da lipase) das ligações entre os ácidos graxos e o glicerol, que compõem a molécula de lipídeos e a disponibilização destes ácidos graxos no meio reacional. Kempka (2008.b), ao estudar a variação do pH para reações de hidrólise de gordura de efluente de frigorífico de suínos utilizando lipase comercial, com pH inicial 7,0, chegou ao valor de pH mínimo 3,5 em 24 horas de reação. A estabilidade da matriz de imobilização é um fator que pode afetar o processo, liberando a lipase para o meio reacional e comprometendo o reuso desta enzima.

5.7.3 Estabilidade de imobilização com a agitação

A agitação levou a migração da lipase para as três matrizes de imobilização testadas, como demonstrado na Figura 67. Verifica-se que as matrizes correspondentes ao experimento E9/10 apresentaram migração em valores de agitação de 160 a 240 rpm. A matriz E8-280-M apresentou maior estabilidade frente a este parâmetro, com migração da lipase a partir de 200 rpm de agitação. A matriz E8-280-M apresentou morfologia mais uniforme em relação aos poros formados. Esta uniformidade pode ter mantido a enzima confinada com mais eficiência do que a lipase confinada em E9/10-280-M, que apresentou poros menos uniformes e de vários tamanhos.

Figura 67 – Verificação da ocorrência de migração nas matrizes de imobilização com a agitação.



5.7.4 Estabilidade de imobilização com o tempo

Para a verificação da ocorrência de migração ao longo do tempo, submeteu-se as matrizes ao processo em intervalos de tempo de 120 minutos, totalizando 720 minutos. A temperatura foi fixada em 37 °C, pH em 7,0 e agitação em 160 rpm. Não ocorreu migração para nenhuma das matrizes testadas, sendo estas estáveis em relação ao tempo de processo de até 720 minutos ou 12 horas.

Portanto, de acordo com os resultados desta etapa, optou-se, pela continuidade no estudo, as matrizes E8-280-M e E9/10-280-M devido a maior estabilidade apresentada em relação aos parâmetros estudados.

5.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E CINÉTICOS PARA A LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA

Com o estudo de estabilidade de imobilização e a verificação dos valores de temperatura, pH, agitação e tempo onde as matrizes de

imobilização permanecem estáveis, realizou-se a determinação dos parâmetros operacionais para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M através de reações de hidrólise de óleo de oliva e a determinação da atividade enzimática neste substrato.

5.8.1 Determinação da atividade enzimática utilizando diferentes temperaturas

O estudo de temperatura ótima para a lipase foi realizado variando-se a temperatura de 27 a 48 °C, com incrementos de 3 °C. Estes intervalos foram escolhidos de acordo com os resultados da estabilidade das matrizes de imobilização com a temperatura. A Tabela 20 apresenta os resultados de atividade enzimática (U/mL) para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.

Tabela 20 – Atividade enzimática a diferentes temperaturas para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M.

Temperatura (°C)	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão		
	Enzima livre	E8-280-M	E9/10-280-M
27	5,33 ^{aA} ± 0,47	4,68 ^{aAB} ± 0,02	4,08 ^{aB} ± 0,12
30	6,00 ^{aA} ± 0,00	5,21 ^{abB} ± 0,18	4,46 ^{abC} ± 0,18
33	6,33 ^{abA} ± 0,47	5,42 ^{baB} ± 0,12	4,83 ^{bbB} ± 0,24
36	7,33 ^{bcdA} ± 0,00	6,42 ^{cbB} ± 0,12	5,92 ^{cdC} ± 0,12
39	7,67 ^{cdA} ± 0,24	6,71 ^{cbB} ± 0,06	6,21 ^{deB} ± 0,06
42	8,42 ^{dA} ± 0,35	6,79 ^{cbB} ± 0,18	6,75 ^{fbB} ± 0,12
45	6,42 ^{abcA} ± 0,12	6,71 ^{caA} ± 0,06	6,71 ^{efA} ± 0,06
48	5,50 ^{aA} ± 0,47	6,69 ^{cbB} ± 0,04	5,58 ^{caB} ± 0,12

Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para lipase livre ou imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95% de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

A lipase livre e imobilizada apresentaram um incremento no valor de atividade enzimática com o aumento da temperatura. Para a lipase livre, o máximo de atividade enzimática foi obtido temperatura de

42 °C, havendo posteriormente um declínio desta atividade. Para a lipase imobilizada em E8-280-M, o máximo de atividade enzimática obtido foi para as temperaturas de 36 a 48 °C (médias de atividades nestas temperaturas foram iguais, estatisticamente). Para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, a máxima atividade foi obtida nas temperaturas de 42 e 45 °C.

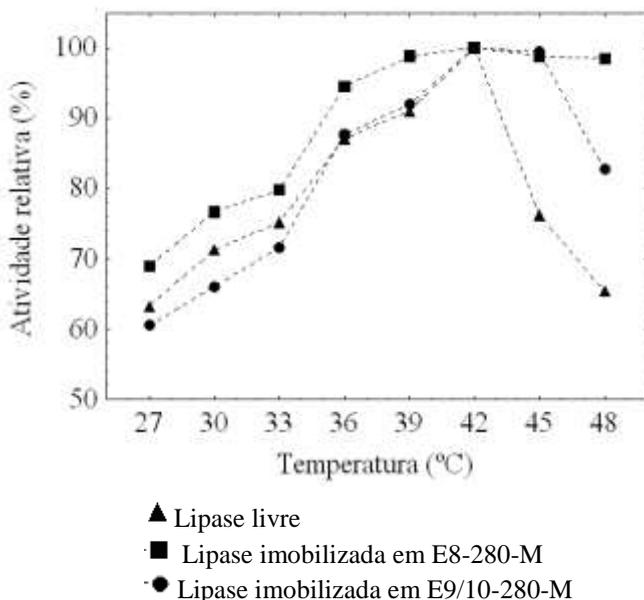
Os valores de atividade enzimática mínimos obtidos para a lipase livre são iguais estatisticamente e correspondem às temperaturas de 27 °C, 30 °C, 33 °C, igual ao valor obtido para 36 °C, 45 °C e 48 °C. O valor de atividade enzimática obtido na temperatura de 27 °C pode ser justificado pelo afastamento da temperatura ótima para a enzima; já para os valores nas maiores temperaturas, além do afastamento do ponto ótimo, pode ter ocorrido a desnaturação da enzima pelo calor.

Para a lipase imobilizada em E8-280-M, verifica-se um incremento no valor de atividade lipásica com o aumento da temperatura, sendo os valores obtidos para as temperaturas de 36 a 48 °C iguais estatisticamente ($p < 0,05$).

Os valores de atividade enzimática obtidos para a lipase imobilizada em E9/10-280-M aumentaram com a temperatura até 45 °C e, posteriormente, diminuíram quando a temperatura aumentou. Este comportamento foi semelhante à lipase livre e pode ser justificado pela maior quantidade de água utilizada na elaboração da matriz que acarretou em poros maiores, o que pode facilitar a transferência de calor, iniciando o processo de desnaturação da enzima em maiores temperaturas.

Percebe-se que os valores de atividade enzimática para a lipase livre diferem estatisticamente, para a maioria das temperaturas testadas, dos valores de atividade enzimática da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280. A Figura 68 apresenta os perfis de atividade relativa para as condições testadas.

Figura 68 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M utilizando diferentes temperaturas.



Ocorre um aumento gradativo da atividade relativa para as condições testadas, sendo que até 48 °C a lipase imobilizada em E8-280-M mantém a atividade relativa constante. Não foi possível determinar o comportamento da enzima em valores maiores de temperatura devido à migração ocorrida em 50 °C.

Para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M, os valores mínimos de atividade relativa foram de 63,34 %, 68,97 % e 60,49 % para a temperatura de 27 °C, e 65,32 %, 98,55 %, 82,72 % e para a temperatura de 48 °C, respectivamente. Os valores de atividade relativa próximos a 60 % para 27 °C podem ser justificados pela temperatura estar afastada da faixa de temperatura ótima para a lipase, que, de acordo com a Figura 68, está em torno de 42 °C. Valores de atividade relativa, para a lipase imobilizada testada a 48 °C, superiores ao valor obtido para a lipase livre, demonstra uma maior estabilidade térmica da lipase imobilizada.

Desai *et al.* (2004) obtiveram para lipase imobilizada em k-carragena uma melhor estabilidade térmica frente à lipase livre. Após a

incubação a 50 °C, a lipase livre manteve a atividade de 52 % e a imobilizada, de 79 %.

Bhushan *et al.* (2008), ao imobilizarem lipase de *Arthrobacter* sp. em alginato de cálcio, verificaram que a estabilidade térmica da lipase imobilizada aumentou comparativamente à lipase livre. A lipase livre foi completamente desnaturada na temperatura de 40 °C e a lipase imobilizada não apresentou qualquer alteração no valor de atividade relativa em até 40 °C. Yigitoglu e Temoçin (2010) obtiveram o mesmo valor de temperatura como sendo ótimo para as lipases livre e imobilizada, na temperatura de 40 °C.

Com os valores de atividade enzimática em relação a temperatura, calculou-se a energia de ativação. Segundo Nelson e Cox (2011), a energia de ativação é caracterizada pela diferença entre os níveis energéticos do estado basal e do estado de transição. A velocidade da reação reflete esta energia, sendo que uma energia de ativação maior corresponde a uma reação mais lenta.

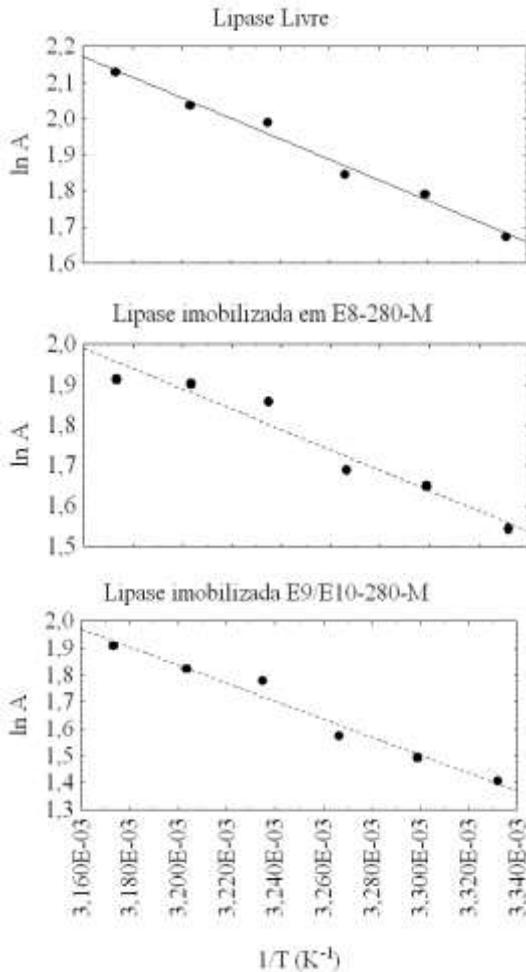
Através da linearização dos dados de atividade enzimática e da temperatura (K) (27-42 °C), obtiveram-se os perfis apresentados na Figura 69. Para cada perfil, de posse da equação da reta correspondente, correlacionou-se com a Equação 10, sendo calculados os valores da energia de ativação para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, cujos valores estão apresentados na Tabela 21. Como pode ser observado, as energias de ativação da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M foram semelhantes, o que indica que a taxa de reação foi minimamente influenciada pelo processo de imobilização.

Tabela 21 – Coeficientes de correlação da equação de Arrhenius utilizando as equações obtidas na linearização dos dados de atividade enzimática e temperatura.

	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	Coefficiente de Linearidade
Lipase livre	-2857,1	23,75	0,9858
Lipase imobilizada em E8-280-M	-2517,8	20,93	0,9417
Lipase imobilizada em E9/10-280-M	-3347,1	27,83	0,9732

Temperatura: 27- 42 °C

Figura 69 – Perfis obtidos através linearização dos dados de atividade enzimática e temperatura.



5.8.2 Determinação da atividade enzimática utilizando diferentes pHs

O comportamento de uma enzima pode ser modificado de acordo com o seu microambiente. Uma enzima em solução pode ter um pH ótimo diferente da mesma enzima imobilizada em uma matriz sólida.

Segundo Devlin (2011), como praticamente todas as enzimas envolvem catálise ácido/base, espera-se que a velocidade da reação seja afetada pelo pH.

Em geral, a atividade lipásica é facilmente influenciada pela variação do pH do meio de reação, devido a flexibilidade de reações que a lipase pode catalisar. A imobilização pode ajudar a melhorar a estabilidade ao pH e também modificar o pH ótimo da lipase, devido a alteração do microambiente em torno da enzima (DONG *et al.*, 2012).

Para a verificação do valor de pH ótimo para a enzima em relação à atividade enzimática, variou-se o mesmo de 4,5 a 9,0 com incrementos de 0,5. Não se verificou a atividade enzimática para os pHs 4,5 e 5,0 com a lipase imobilizada em E9/10-280-M devido ter ocorrido a migração da lipase nestes valores de pH. A Tabela 22 apresenta os resultados de atividade enzimática para a lipase livre e imobilizada.

Tabela 22 – Atividade enzimática a diferentes pHs para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M.

pH	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão		
	Enzima livre	E8-280-M	E9/10-280-M
4,5	4,83 ^{cdA} ± 0,00	5,08 ^{bcA} ± 0,12	-
5,0	5,92 ^{bcA} ± 0,59	5,83 ^{abA} ± 0,00	-
5,5	6,00 ^{bcA} ± 0,24	6,13 ^{abA} ± 0,18	5,67 ^{abA} ± 0,24
6,0	6,33 ^{abA} ± 0,47	6,08 ^{abA} ± 0,12	5,75 ^{abA} ± 0,12
6,5	7,42 ^{abA} ± 0,12	6,04 ^{abB} ± 0,29	5,83 ^{abB} ± 0,24
7,0	7,50 ^{abA} ± 0,24	6,13 ^{abB} ± 0,18	6,08 ^{abB} ± 0,12
7,5	5,17 ^{bcdA} ± 0,24	6,00 ^{abA} ± 0,24	5,92 ^{abA} ± 0,12
8,0	4,42 ^{da} ± 0,12	5,46 ^{abcB} ± 0,18	5,42 ^{bbB} ± 0,12
8,5	4,33 ^{db} ± 0,24	5,08 ^{bcA} ± 0,12	3,42 ^{cc} ± 0,12
9,0	4,25 ^{da} ± 0,35	4,92 ^{ca} ± 0,35	2,75 ^{db} ± 0,12

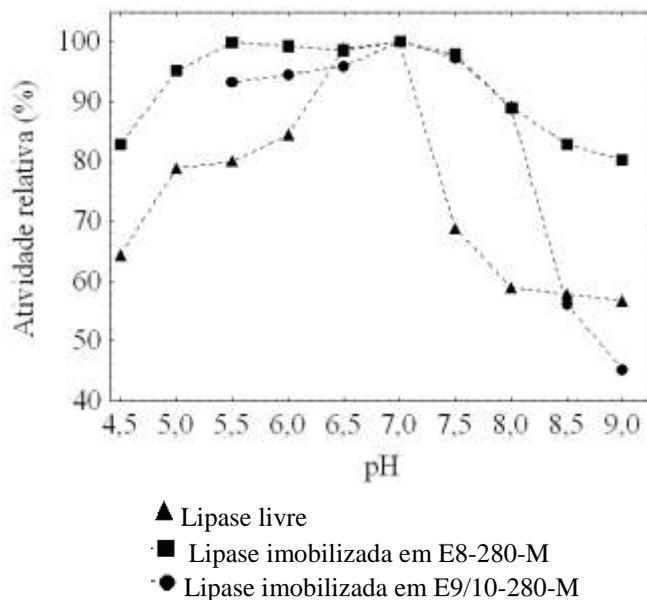
Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividades enzimáticas iguais para lipase livre ou imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95% de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: temperatura de 37 °C e 160 rpm de agitação.

Verifica-se que, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), os valores de atividade para pHs inferiores e superiores são iguais, diferindo, estatisticamente conforme o pH se aproxima da neutralidade. Para a lipase livre, o valor máximo de atividade enzimática obtido foi em pH 7,0, sendo igual estatisticamente ao valor de atividade obtido para pH 6,5 e 6,0. Para a lipase imobilizada em E8-280-M, verifica-se uma maior estabilidade da lipase com o pH, onde o máximo valor obtido foi também em pH 7,0, porém o valor de atividade é igual estatisticamente aos valores obtidos para pHs 5,0 a 8,0. Comportamento semelhante ocorre para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, com valores de atividade enzimática iguais estatisticamente em pHs 5,5 a 7,5.

A Figura 70 apresenta o perfil de atividade relativa (%) em relação ao valor de pH obtido para a lipase livre e imobilizada. Os perfis de atividade para a lipase livre e imobilizada diferem entre si. Percebe-se que a atividade da lipase livre é afetada por valores de pH abaixo de 6,5 e acima de 7,0, caracterizando este intervalo como pH ótimo. O mínimo de atividade relativa obtido para a lipase livre, em meio alcalino, pH 9,0, foi de 56,67 % em pH 9,0 e, em meio ácido, de 64,44 % para pH 4,5. Para a lipase imobilizada, verifica-se uma maior estabilidade da atividade em relação a valores de pH inferiores a 6,5 e superiores a 7,0, sendo que a lipase quando imobilizada em E8-280-M apresentou-se mais estável à mudança de pH, com valor mínimo de atividade relativa de 80,02 %, para o pH 9,0, e 82,93 %, para o pH 4,5. A lipase imobilizada em E9/10-280-M demonstrou uma maior estabilidade ao pH frente à lipase livre, porém, menor em relação a lipase imobilizada em E8-280-M. Foram obtidos os valores mínimos de atividade relativa de 80,87 %, para pH 4,5, e comportamento semelhante ao obtido para a temperatura, onde a lipase imobilizada em E8-280-M se mostrou mais estável. O valor de atividade relativa obtido para o pH 5,5 foi de 93,20 % e para o pH 9,0, 43,25 %.

Segundo Yigitoglu e Temoçin (2010), mudanças de pH ótimo de uma lipase livre e imobilizada podem ser justificadas pela distribuição de íons hidrogênio e hidroxila ser diferente na matriz e na solução. Estes mesmos autores, em estudo do pH ótimo para lipase de *Candida rugosa* imobilizada em PET (polietileno tereftalato) tratado com glutaraldeído, obtiveram o valor de pH 6,0 como sendo ótimo para lipase livre e pH 7,0, para a lipase imobilizada.

Figura 70 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M utilizando diferentes pHs.



5.8.3 Determinação da atividade enzimática ao longo do tempo

A obtenção da atividade enzimática (U/mL) da lipase ao longo do tempo teve como objetivo a verificação do tempo de hidrólise para etapas posteriores, bem como da estabilidade da enzima. Os valores de atividade enzimática ao longo do tempo estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Atividade enzimática ao longo do tempo para a lipase livre e imobilizada nos suportes E8-280-M e E9/10-280-M.

Tempo (min)	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão		
	Enzima livre	E8-280-M	E9/10-280-M
15	6,49 ^{cA} ± 0,02	5,75 ^{bB} ± 0,06	5,39 ^{bC} ± 0,06
60	7,38 ^{aA} ± 0,06	6,46 ^{aB} ± 0,06	5,92 ^{aC} ± 0,12
120	7,08 ^{abA} ± 0,12	6,33 ^{abB} ± 0,24	5,75 ^{abB} ± 0,12
240	6,92 ^{ba} ± 0,12	6,29 ^{abB} ± 0,06	5,71 ^{aC} ± 0,06
360	6,25 ^{cA} ± 0,12	6,21 ^{aA} ± 0,18	5,04 ^{bB} ± 0,06
480	5,63 ^{dA} ± 0,06	6,08 ^{abB} ± 0,12	4,96 ^{bcC} ± 0,06
600	4,92 ^{eA} ± 0,12	6,08 ^{abB} ± 0,12	4,58 ^{cdA} ± 0,12
720	3,75 ^{fA} ± 0,12	5,29 ^{bB} ± 0,06	4,29 ^{dC} ± 0,18

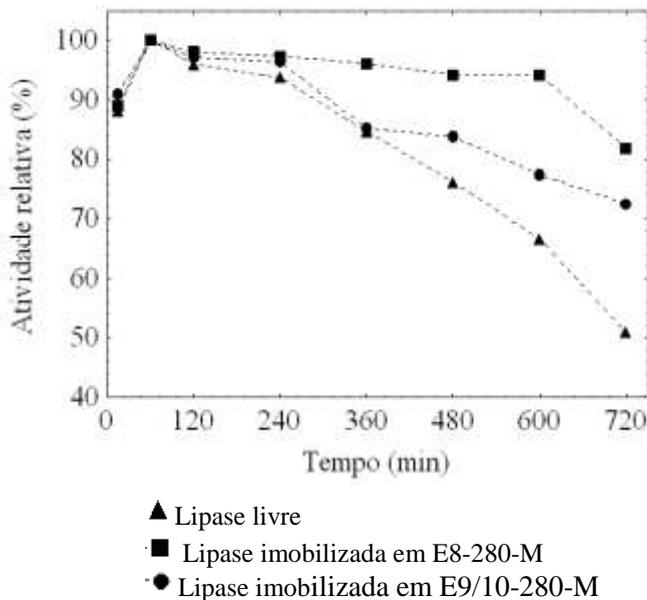
Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para lipase livre ou imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

Tanto para a lipase livre quanto para a imobilizada, verifica-se que nos primeiros 15 minutos ocorre um aumento de atividade relativa até 60 minutos, posteriormente ocorrendo uma queda no valor de atividade relativa até 720 minutos. Para a lipase livre, após 720 minutos, a atividade enzimática diminuiu para aproximadamente a metade do valor de atividade inicial (correspondente a 60 minutos onde se obteve atividade relativa máxima). Para a lipase imobilizada em E8-280-M, percebe-se a perda gradativa da atividade, porém, estatisticamente ($p > 0,05$), os valores mantiveram-se iguais de 60 a 600 minutos. Para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, os valores de atividade mantiveram-se iguais para os tempos de 60 a 240 minutos e 360 a 480 minutos.

A Figura 71 apresenta o perfil de atividade relativa (%) obtido ao longo do tempo para as lipases livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M, onde se pode perceber a maior estabilidade da atividade enzimática ao longo do tempo para a enzima imobilizada. Até 720 minutos, os valores de atividade relativa para a lipase livre e imobilizada

em E8-280-M e E9/10-280-M foram de 50,80 %, 81,90 % e 72,50 %, respectivamente. Portanto, para reações de hidrólise de óleo de oliva, o tempo de processo pode ser fixado em 60 minutos, onde se obtém a máxima atividade relativa.

Figura 71 – Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M ao longo do tempo.



5.8.4 Estabilidade térmica, tempo de meia vida e fator estabilidade para a lipase imobilizada

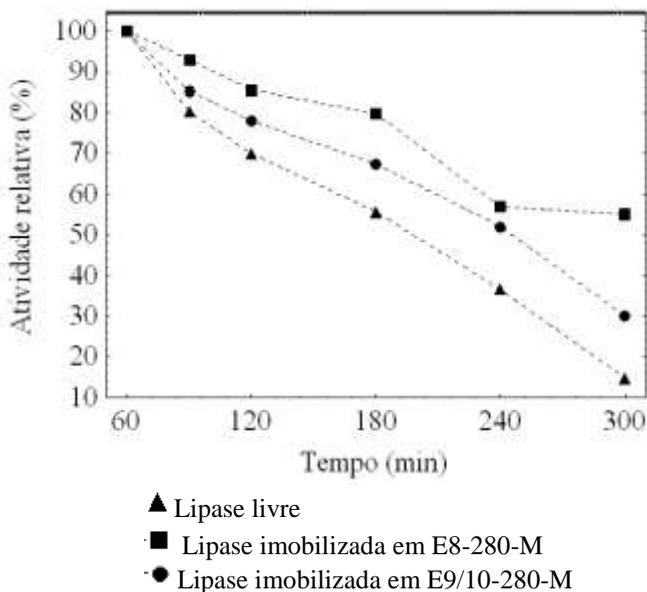
Na Tabela 24 estão apresentados os resultados de atividade enzimática para a obtenção da estabilidade térmica a 42 °C, temperatura em que as matrizes de imobilização permanecem estáveis e temperatura ótima obtida para a lipase, tanto livre quanto da imobilizada. A Figura 72 apresenta os perfis de atividade relativa para o estudo de estabilidade térmica.

Tabela 24 – Resultados de atividade enzimática para obtenção da estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.

Tempo (min)	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão		
	Enzima livre	E8-280-M	E9/10-280-M
60	8,46 ^{aA} ± 0,06	6,67 ^{aB} ± 0,12	6,25 ^{aB} ± 0,12
90	6,79 ^{bA} ± 0,06	6,21 ^{bB} ± 0,06	5,33 ^{bC} ± 0,01
120	5,92 ^{cA} ± 0,12	5,71 ^{cA} ± 0,06	4,88 ^{bB} ± 0,18
180	4,71 ^{dA} ± 0,06	5,32 ^{dB} ± 0,09	4,21 ^{cA} ± 0,18
240	3,08 ^{eA} ± 0,12	3,79 ^{eB} ± 0,06	3,25 ^{dA} ± 0,12
300	1,25 ^{fA} ± 0,12	3,67 ^{eC} ± 0,01	1,88 ^{eB} ± 0,06

Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias iguais de atividade enzimática para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias iguais de atividade enzimática para lipase livre ou imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: temperatura de 42 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

Figura 72 – Estabilidade térmica na temperatura de 42 °C para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.



De acordo com os valores da Tabela 24, na temperatura de 42 °C, ocorre perda gradativa da atividade enzimática com o tempo de processo. Para a lipase livre, todos os valores de atividade ao longo do tempo diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Para a lipase imobilizada em E8-280-M, apenas os valores obtidos para 240 e 300 minutos são considerados iguais pelo Teste de Tukey, ocorrendo o mesmo para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, para os tempos de 90 e 120 minutos.

Comparando-se os valores de atividade obtidos para a lipase livre e imobilizada, percebe-se que os valores obtidos para a lipase imobilizada diferem estatisticamente dos valores obtidos para a lipase livre, nos primeiros 60 minutos de processo. No final dos 300 minutos, a lipase livre manteve 14,77 % da atividade enzimática, a lipase imobilizada em E8-280-M manteve 55,02 % e a lipase imobilizada em E9/10-280-M manteve 30,08 % da atividade enzimática inicial. Isto demonstra uma maior estabilidade da lipase imobilizada, também na temperatura de 42 °C.

De posse dos dados de estabilidade térmica na temperatura de 42 °C para as três condições da enzima (livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M), calculou-se a constante de inativação térmica, o tempo de meia vida e o fator estabilidade, cujos valores são apresentados na Tabela 25. A constante de inativação térmica diminuiu para a lipase imobilizada comparando-se com a lipase livre. Isto confirma a maior estabilidade térmica da lipase imobilizada comparativamente a lipase livre. Em relação à lipase imobilizada, a imobilização na matriz E8-280-M leva a uma maior estabilidade térmica do que a imobilização em E9/10-280-M. O tempo de meia vida, caracterizado por ser o tempo necessário para que a enzima perca 50 % de sua atividade inicial, foi maior para a lipase imobilizada em relação à lipase livre, sendo maior para a lipase imobilizada em E8-280-M do que para a lipase imobilizada em E9/10-280-M. Um comportamento semelhante ocorreu para o fator estabilidade.

Tabela 25 – Constante de inativação térmica, tempo de meia vida e fator estabilidade da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M, a 42 °C.

	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	FE
Lipase livre	0,44	1,58	-
Lipase imobilizada em E8-280-M	0,16	4,28	2,71
Lipase imobilizada em E9/10-280-M	0,27	2,57	1,63

5.8.5 Determinação de K_m e $v_{m\acute{a}x}$

Na Tabela 26 estão os resultados obtidos de atividade enzimática (U/mL) para a lipase livre e imobilizada em relação à concentração de substrato. A atividade enzimática da lipase aumentou na concentração de substrato de 5 mg/mL para 80 mg/mL. Devido a este aumento de velocidade com o aumento da concentração de substrato, pode-se afirmar que a reação catalisada pela lipase comportou-se como uma reação de 2ª ordem.

Tabela 26 – Atividade enzimática da lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M em função da concentração de óleo de oliva.

Substrato (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão		
	Enzima livre	E8-280-M	E9/10-280-M
5	4,71 ^{aA} ± 0,06	3,79 ^{aB} ± 0,06	2,92 ^{aC} ± 0,12
10	7,25 ^{bA} ± 0,12	6,29 ^{bB} ± 0,18	5,88 ^{bB} ± 0,06
15	7,96 ^{bA} ± 0,06	7,04 ^{cB} ± 0,06	6,25 ^{bC} ± 0,12
20	8,42 ^{bA} ± 0,12	7,58 ^{dB} ± 0,12	6,88 ^{cC} ± 0,06
30	11,67 ^{cdA} ± 0,94	9,38 ^{eAB} ± 0,18	8,92 ^{dC} ± 0,12
40	11,25 ^{cA} ± 0,12	9,70 ^{efB} ± 0,05	9,08 ^{deC} ± 0,12
50	11,50 ^{cdA} ± 1,18	10,08 ^{fA} ± 0,12	9,42 ^{eA} ± 0,12
60	12,08 ^{cdA} ± 0,82	10,79 ^{gAB} ± 0,06	9,88 ^{fC} ± 0,06
70	13,50 ^{deA} ± 0,24	11,67 ^{hB} ± 0,24	10,46 ^{gC} ± 0,18
80	14,75 ^{eA} ± 0,12	12,58 ^{iB} ± 0,12	10,79 ^{gC} ± 0,06

Letras maiúsculas iguais, na horizontal, correspondem a médias de atividade iguais para a lipase livre, imobilizada em E8-280-M e imobilizada em E9/10-280-M, letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para lipase livre ou imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

Para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M, verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey para os valores de atividade obtidos para 70 mg/mL e 80 mg/mL de substrato. Para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, os resultados de atividade

enzimática para as concentrações de substrato de 70 mg/mL e 80 mg/mL foram iguais, estatisticamente. A velocidade diminui durante o curso da reação porque a concentração de substrato está diminuindo ou o produto acumulando no meio.

Analisando-se os valores de atividade obtidos para uma mesma condição, segundo o Teste de Tukey, houve diferença significativa para os valores de atividade da lipase livre, e imobilizada. Este resultado é justificado pelo rendimento de imobilização. Com a imobilização da enzima em matrizes, por aprisionamento, o contato com o substrato pode ser prejudicado devido à limitação da difusão.

A Figura 73 apresenta os perfis de linearização para os dados de atividade enzimática, as equações correspondentes a cada linha e os valores de R^2 , utilizando-se o modelo de Lineweaver-Burk para o cálculo de K_m e $v_{m\acute{a}x}$, cujos valores estão na Tabela 27.

Figura 73 – Linearização dos dados de atividade enzimática em relação à concentração de substrato utilizando o modelo de Lineweaver-Burk para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.

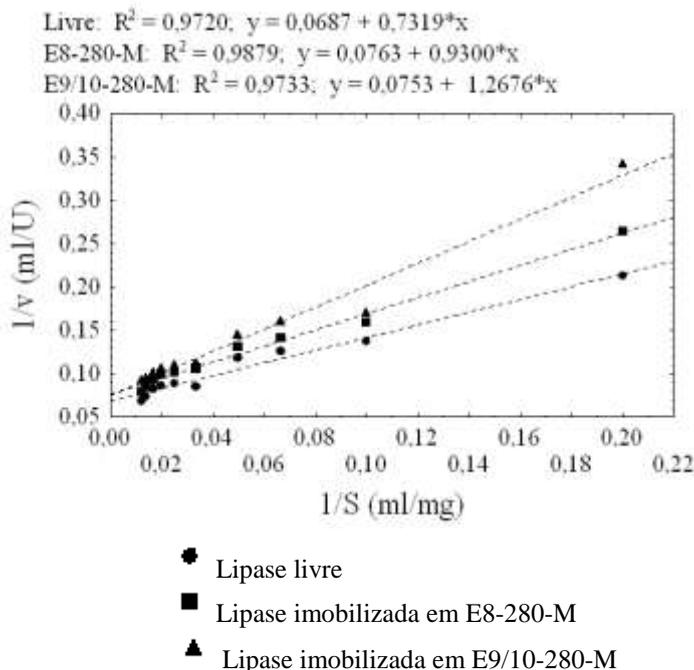


Tabela 27 – Valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.

	K_m (mg/mL)	$v_{m\acute{a}x}$ (U/mL)
Lipase livre	10,65	14,55
Lipase imobilizada em E8-280-M	12,19	13,11
Lipase imobilizada em E9/10-280-M	16,84	13,28

Para a lipase imobilizada em E8-280-M, o valor de K_m foi inferior ao valor obtido para a lipase imobilizada em E9/10-280-M. Os valores de K_m obtidos para a lipase imobilizada foram superiores ao obtido para a lipase livre. Este aumento pode ter ocorrido devido a mudanças estruturais na enzima, onde as moléculas podem ter assumido uma conformação inativa, ou pela menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima pela limitação da difusão (YANG *et al.*, 2010; YIGITOGU e TEMOÇIN, 2010). O valor de K_m corresponde a afinidade que a enzima tem com o substrato. Percebe-se que pelo aumento do valor deste parâmetro, a afinidade da enzima com o substrato diminuiu, devido, provavelmente, a forma de imobilização que afeta na difusão do substrato e no contato deste com a enzima.

5.9 REÚSO DA LIPASE IMOBILIZADA

A viabilidade do processo de imobilização depende da possibilidade de reúso da enzima. Durante a reutilização de enzimas imobilizadas, é comum a perda de atividade enzimática ao longo dos ciclos, e esta perda de atividade deve ser determinada para que se possa fixar o número de reúsos máximo, sem afetar a produtividade do processo de forma significativa. A Tabela 28 mostra os resultados do reúso da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.

Os valores de atividade enzimática obtidos para E8-280-M durante os 2 primeiros ciclos permanecem iguais estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo o valor obtido no 3º ciclo estatisticamente igual ao obtido no 2º. Estes resultados sugerem uma estabilidade da atividade lipásica quando reutilizada até 3 vezes. A partir do 5º ciclo (igual estatisticamente ao 4º e ao 6º), ocorre a perda gradativa da atividade enzimática. Para a matriz E9/10-280-M, a perda gradativa da atividade enzimática ocorre desde os primeiros ciclos, onde se verifica que para o 2º ciclo ocorre diferença significativa em relação ao 1º.

Tabela 28 – Resultados de atividade enzimática em relação ao reuso da lipase imobilizada nas matrizes E8-280-M e E9/10-280-M.

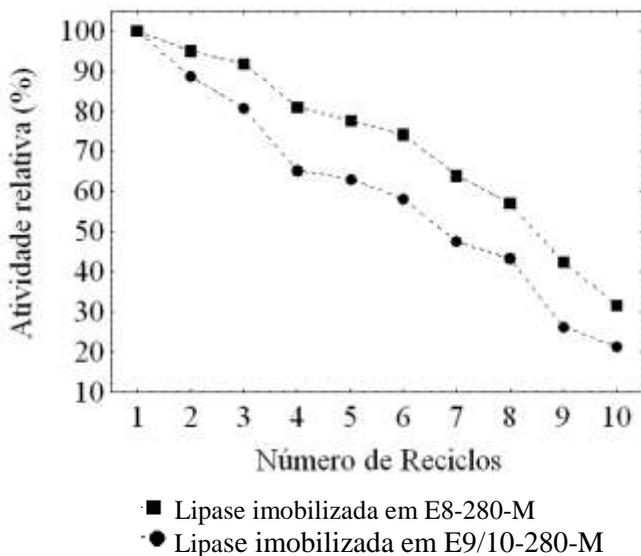
Reciclo	Atividade enzimática (U/mL) ± Desvio padrão	
	E8-280-M	E9/10-280-M
1	6,58 ^a ± 0,12	5,88 ^a ± 0,06
2	6,25 ^{ab} ± 0,12	5,21 ^b ± 0,06
3	6,04 ^b ± 0,18	4,75 ^c ± 0,12
4	5,33 ^c ± 0,12	3,83 ^d ± 0,24
5	5,11 ^{cd} ± 0,08	3,71 ^d ± 0,06
6	4,88 ^d ± 0,06	3,42 ^d ± 0,12
7	4,21 ^e ± 0,06	2,79 ^e ± 0,06
8	3,75 ^f ± 0,12	2,54 ^e ± 0,06
9	2,79 ^g ± 0,06	1,54 ^f ± 0,06
10	2,08 ^h ± 0,12	1,25 ^f ± 0,12

Letras minúsculas iguais, na vertical, correspondem a médias de atividade enzimática iguais para a lipase imobilizada em E8-280-M ou imobilizada em E9/10-280-M, em nível de 95 % de confiança, pelo Teste de Tukey. Condições de processo: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.

A Figura 74 mostra os perfis de atividade relativa (%) obtidos para as duas matrizes de imobilização em relação ao reuso.

Ocorreu perda gradativa da atividade relativa ao longo do reuso da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M, sendo o perfil semelhante para as duas matrizes. A lipase imobilizada em E8-280-M manteve 77,66 % de sua atividade inicial no 5º ciclo e 31,61 % no 10º ciclo. A lipase imobilizada em E9/10-280-M manteve 63,09 % da atividade inicial no 5º ciclo e 21,26 % no 10º ciclo. Esta perda de atividade da enzima ocorre pela inativação das mesmas em virtude da desnaturação proteica.

Figura 74 – Reúso da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M.



Won *et al.* (2005), ao avaliarem o reuso em três ciclos de utilização da lipase imobilizada em alginato, mistura de alginato e quitosana e mistura de alginato e silicato, obtiveram, 72 %, 77 % e 87 % da atividade inicial, respectivamente, sendo estes valores próximos aos obtidos para a lipase imobilizada em E8-280-M no 5º ciclo. Desai *et al.* (2004), ao imobilizarem lipase em k-carragena, obtiveram aproximadamente 60 % de atividade da enzima no 5º ciclo, valor este inferior ao obtido neste estudo para a lipase imobilizada em E8-280-M (77,06 %) e próximo ao valor obtido para a lipase imobilizada em E9/10-280-M (63,09 %).

5.10 MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para verificação da possibilidade de estocagem da lipase imobilizada nas matrizes E8-280-M e E9/10-280-M, realizou-se o estudo da manutenção da lipase imobilizada em diferentes temperaturas, 4 °C e 25 °C. As Figuras 75 e 76 mostram, respectivamente, os perfis de

atividade relativa (%) obtidos para as duas matrizes de imobilização em relação ao tempo de estocagem para as temperaturas de 4 °C e 25 °C. Os valores das atividades enzimáticas obtidas para cada temperatura estão no Anexo 6.

Verifica-se na Figura 75, que o perfil de queda de atividade da lipase imobilizada nas matrizes E8-280-M e E9/10-280-M foram semelhantes. Após 30 dias de armazenamento, a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 43,47 % da sua atividade inicial e a lipase imobilizada em E9/10-280-M permaneceu com 38,85 % da sua atividade inicial, expressa em atividade relativa (%). Até o 26° dia, a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com atividade relativa acima de 50 %, já para a lipase imobilizada em E9/10-280-M este comportamento ocorreu até o 20° dia. Percebeu-se ao longo do armazenamento, a formação de cristais, provavelmente decorrentes do manitol nas duas matrizes de imobilização.

Figura 75 – Atividade relativa da lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M mantida na temperatura de 4 °C durante 30 dias.

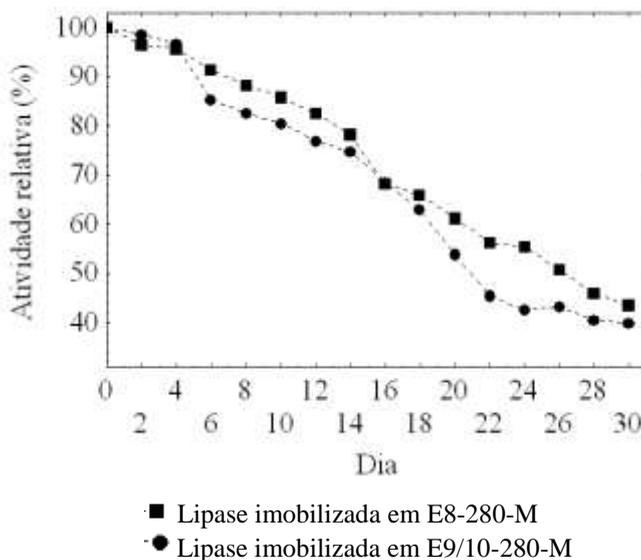
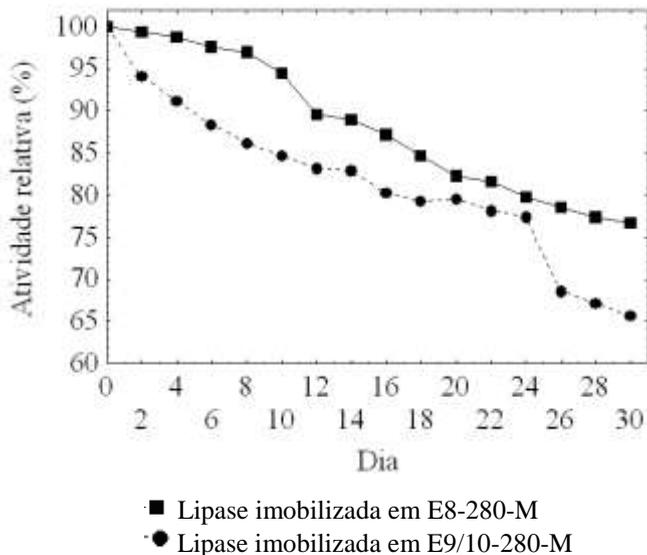


Figura 76 – Atividade relativa da lipase immobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M mantida na temperatura de 25 °C durante 30 dias.



A imobilização de lipase via adsorção em organobentonita foi estudada por Dong *et al.* (2012). Os autores verificaram que a lipase imobilizada reteve 80,7 % de sua atividade inicial quando armazenada em solução tampão a 4 °C por 8 dias. No presente estudo, a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 88,18 % de atividade relativa e a lipase imobilizada em E9/10-280-M permaneceu com 82,49 % de atividade relativa.

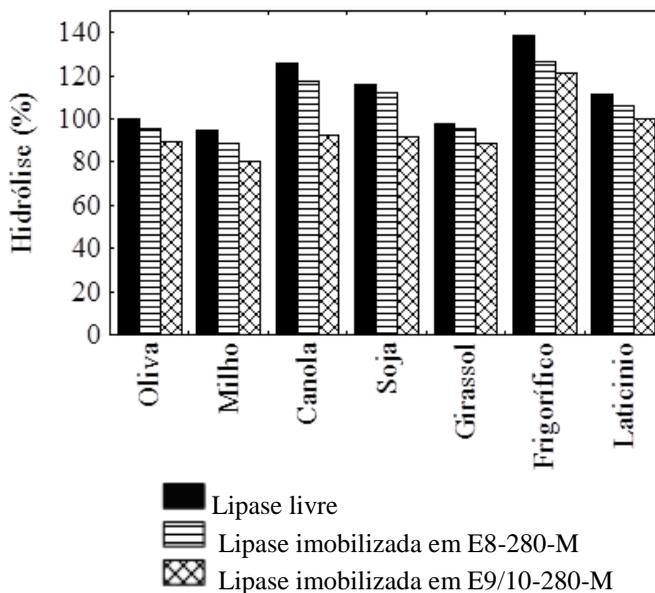
Para a lipase imobilizada mantida na temperatura de 25 °C (Figura 76) percebe-se também uma queda acentuada na atividade relativa, porém, quando comparada a lipase imobilizada mantida a 4 °C, esta variação de atividade relativa foi menor, para as duas matrizes de imobilização. Após 30 dias de armazenamento, a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 77,76 % de atividade relativa e a lipase imobilizada em E9/10-280-M permaneceu com 65,67 % de atividade relativa.

Yang *et al.* (2009) ao estudarem a imobilização por encapsulamento de lipase de *Arthrobacter* sp. em materiais hidrofóbicos, visando a melhoria das propriedades catalíticas, verificaram que a lipase imobilizada manteve 54 % da atividade inicial após 60 dias.

5.11 ESPECIFICIDADE DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA EM RELAÇÃO AO SUBSTRATO.

Os ácidos graxos são os principais componentes utilizados na obtenção de uma grande variedade de produtos, como sabões, agentes tensoativos, lubrificantes, plastificantes, tintas, revestimentos, produtos farmacêuticos, alimentos e produtos agrícolas (SATYARTHI *et al.*, 2011). A obtenção dos ácidos graxos pode ser via hidrólise enzimática, utilizando lipases. Na literatura, tem sido relatado que a atividade hidrolítica é a característica básica de uma lipase (CONTESINI *et al.*, 2010). No entanto, a lipase pode ter diferentes atividades hidrolíticas em lipídeos de diferentes origens. Na etapa de hidrólise dos substratos, foram fixados os valores de temperatura, 42 °C, pH 7,0, agitação de 160 rpm e tempo de processo de 60 minutos de acordo com os resultados obtidos nas etapas descritas nos itens 5.8.1 a 5.8.4. Os resultados da hidrólise dos substratos estão apresentados na Figura 77, onde os percentuais obtidos foram calculados tomando como base os AGL obtidos para o azeite de oliva utilizando a lipase livre.

Figura 77 – Percentual de hidrólise obtido para diferentes substratos utilizando a lipase livre e imobilizada.



Os resultados foram expressos tomando-se como base o percentual de 100 % de hidrólise para o óleo de oliva e a lipase livre. Verifica-se na Figura 78 que para a lipase livre o percentual de hidrólise obtido foi superior ao obtido para a lipase imobilizada em E8-280-M e E9/10-280-M. Tanto a lipase livre como para a lipase imobilizada em E8-280-M, o maior percentual de hidrólise obtido foi para o efluente de frigorífico de suínos (138,83 % para a lipase livre e 126,46 % para a lipase imobilizada), seguido pelo óleo de canola (125,77% para a lipase livre e 117,53 % para a lipase imobilizada) e pelo óleo de soja (115,81 % para a lipase livre e 112,17 % para a lipase imobilizada). Comportamento ligeiramente distinto foi obtido para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, onde o maior percentual de hidrólise foi obtido para o efluente de frigorífico (120,96 %) seguido do efluente de laticínio (100,34 %).

As gorduras animais são constituídas de gorduras de depósito que contêm quantidades elevadas de ácidos graxos C16 e C18 e ácidos graxos insaturados, onde prevalecem os ácidos linoleico e oléico. Os ácidos graxos predominantes na gordura presente no leite são o ácido palmítico, oléico e esteárico e ainda quantidades apreciáveis de ácidos graxos de cadeia curta C4-C12. A fração oleosa presente nos óleos de milho, girassol e oliva são compostas por ácidos oléico e linoleico e menos de 20 % dos ácidos estão saturados. Os óleos de soja e canola contêm grandes quantidades de ácido linoleico (FENNEMA, 2000).

Percebe-se que a imobilização fez com que houvesse uma diminuição do percentual de hidrólise obtido em relação a lipase livre. Isto é característico da imobilização por aprisionamento, onde a difusão do substrato é dificultada. A diferença de percentual de hidrólise entre os substratos pode ser justificada pela característica química dos mesmos, porém, para os efluentes, onde a quantidade de sólidos dissolvidos é maior em relação aos demais substratos, percebe-se que a hidrólise foi maior, sugerindo um possível uso desta enzima, livre e/ou imobilizada como coadjuvante no tratamento de efluentes. Os substratos vegetais foram emulsificados para posterior hidrólise. A emulsificação é caracterizada como dispersões de um líquido em outro estabilizada por um agente emulsificante que forma um filme superficial nas gotículas da fase dispersa promovendo a estabilidade com a fase dispersante (FENNEMA, 2000).

Ramani *et al.* (2010) utilizando lipase de *Pseudomonas gessardii* livre obteve o maior percentual de hidrólise gordura bovina (146 %) seguida de gordura de cabra (112 %) e de azeite de oliva (100 %). Afirma que pela capacidade da lipase de hidrolisar todos os substratos

estudados (além dos já citados, óleo de palma, de girassol, de rícino, de amendoim, de coco, óleo residual de fritura, gordura de cabra e gordura de ovelha) esta apresenta grande potencial de aplicação na hidrólise de lipídeos para o tratamento de efluentes.

A imobilização de lipase de *Candida rugosa* em fibra de poliéster e posterior aplicação na hidrólise de óleos vegetais foi estudada por Yigitoglu e Temoçin (2010). Verificaram que a maior quantidade de ácidos graxos foi obtida para o óleo de canola, seguido dos óleos de oliva, milho, girassol e soja. Neste estudo, a lipase imobilizada obteve uma maior geração de ácidos graxos livres do que a lipase livre. Isto pode ser justificado pela forma de imobilização empregada, a adsorção.

Portanto, entre as matrizes de imobilização utilizadas, a matriz E8-280-M apresentou-se como mais eficiente na obtenção de ácidos graxos livres, levando a maiores percentuais de hidrólise do que a matriz E9/10-280-M.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo de gelatinas de diferentes valores de *Bloom* e diferentes percentuais de plastificantes na imobilização de lipase. Foram caracterizadas as gelatinas quanto à composição centesimal e à composição de aminoácidos e pode-se verificar que as gelatinas utilizadas possuem valores semelhantes para estes parâmetros.

Para a obtenção das matrizes de imobilização, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos onde se avaliou uma ampla faixa de concentrações de gelatina e plastificantes, sendo estes o glicerol e manitol, com e sem reticulação. Nestas matrizes foram realizados testes de solubilidade em água e razão de inchamento onde se verificou que matrizes reticuladas com glutaraldeído a 2,5 % apresentaram, para estes parâmetros, resultados inferiores aos obtidos para as matrizes sem reticulação. Verificou-se também que as matrizes com maior concentração de plastificante apresentam maiores solubilidades em água e razão de inchamento. Comparando-se os plastificantes, o glicerol promoveu maiores solubilidades em água.

Nos testes de migração da lipase imobilizada, foram utilizadas as matrizes com reticulação. Para o glicerol, somente as gelatinas de 240 e 280 *Bloom* resultaram em matrizes sem migração (E1 com gelatina de 240 *Bloom*, e E1 com gelatina de 280 *Bloom*), sendo as gelatinas de 200 e 220 *Bloom* ineficientes para manter a lipase imobilizada. Para o manitol, além dos experimentos que não apresentaram migração para o glicerol, os experimentos E2 (240 *Bloom*), E2 (280 *Bloom*), E8 (280 *Bloom*), E9/10 (280 *Bloom*), não apresentaram migração. As gelatinas de 200 e 220 *Bloom* não mantiveram a lipase imobilizada.

O rendimento de imobilização foi obtido para todos os experimentos que não apresentaram migração, sendo que os experimentos E9/10-240-M, E9/10-280-M e E8-280-M tiveram rendimentos de imobilização de 87,92 % e 81,70 %, respectivamente. Os experimentos E1, tanto com glicerol quanto com manitol, apresentaram rendimentos de imobilização inferiores a 10 %.

Foram feitas micrografias dos experimentos que não apresentaram migração. Os experimentos com menor concentração de gelatina acarretaram em matrizes sem a presença de poros ao longo da seção transversal, com uma pequena concentração de poros na camada superior, sendo estas matrizes correspondentes aos experimentos com baixo rendimento de imobilização. As matrizes que apresentaram

maiores rendimentos de imobilização foram as que apresentaram maior quantidade de poros sendo estes mais uniformes.

Na Difração de Raios-X, a matriz E8-280-M seguida da matriz E9/10-280-M apresentaram os picos na ordem de $2\theta=20^\circ$ com maior intensidade que as demais matrizes, o que indica uma maior cristalinidade. Também apresentaram os picos mais intensos em $2\theta=8^\circ$, correspondente ao pico onde são demonstradas as triplas hélices. Quanto maior este pico, maior a densidade de triplas hélices podendo, então, estas matrizes serem mais resistentes a temperatura que as demais.

As variações de temperatura, pH, agitação e tempo foram testadas individualmente para as matrizes de imobilização E9/10-240-M, E9/10-280-M e E8-280-M para a verificação da estabilidade. Variando-se a temperatura de 25°C a 65°C , a matriz E9/10-240-M apresentou migração para a temperatura de 40°C , enquanto as matrizes E9/10-280-M e E8-280-M, para a temperatura de 50°C , confirmando o resultado obtido na Difração de Raios-X. A matriz E9/10-240-M se mostrou instável em pHs abaixo de 7,0 e a matriz E9/10-280-M, em pHs abaixo de 5,0. A matriz E8-280-M não apresentou instabilidade com o pH. Para a agitação, valores superiores a 200 rpm apresentaram migração para E9/10-240-M e E9/10-280-M e valores acima de 240 rpm, para E8-280-M. Quanto ao tempo, todas as matrizes mantiveram-se estáveis em 720 minutos de processo. A matriz de imobilização E9/10-240-M foi considerada ineficiente para posteriores reações de hidrólise de óleo de oliva.

Nas reações de hidrólise de óleo de oliva, a atividade enzimática para a lipase livre e imobilizada foi estudada em relação à temperatura, pH e tempo. Em relação à temperatura, foram realizados testes para a temperatura em uma faixa de $27 - 48^\circ\text{C}$. Tanto para a lipase livre quanto para a lipase imobilizada, a temperatura ótima foi de 42°C . A maior estabilidade para a lipase imobilizada com a temperatura foi obtida para a matriz E8-280-M. A variação de pH foi de 4,5 a 9,0 para a lipase livre e imobilizada em E8-280-M. Para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, a faixa de estudo de pH foi de 5,5 – 9,0, devido à migração ocorrida para pHs inferiores no estudo de estabilidade. Para a lipase livre, o pH ótimo foi 7,0; para a lipase imobilizada em E8-280-M o ótimo de atividade ficou na faixa de pH 5,5 – 7,5 e para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, o valor ótimo de pH ficou 6,5 e 7,5. Ao longo do tempo, avaliado até 720 minutos, tanto a lipase livre quanto a imobilizada apresentaram perdas de atividade enzimática. Para a lipase livre, após os 720 minutos, a atividade relativa remanescente ficou em

50,80 %, para a lipase imobilizada em E8-280-M, a atividade relativa foi de 81,90 % e para a lipase imobilizada em E9/10-280-M, em 72,50 %.

Em relação ao reuso, foram possíveis 10 ciclos, sendo que até o 5º ciclo a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 77,66 % da atividade inicial e a lipase imobilizada em E9/10-280-M, em 63,09 % da atividade inicial.

A manutenção da atividade da enzima foi obtida com melhores resultados para a temperatura de 25 °C, onde, após 30 dias de armazenamento, a lipase imobilizada em E8-280-M permaneceu com 71,76 % de atividade relativa e a lipase imobilizada em E9/10-280-M permaneceu com 65,67 % de atividade relativa.

Na etapa de hidrólise de diversos substratos, obteve-se o maior percentual de hidrólise para a lipase imobilizada em E8-280-M, em relação às matrizes utilizadas, porém a lipase livre obteve maior percentual de hidrólise para todos os substratos. O substrato onde mais se obteve ácidos graxos livres foi o efluente de frigorífico de suínos.

Com as concentrações de gelatinas e plastificantes utilizadas e os diversos testes efetuados durante a realização deste trabalho, concluiu-se que a imobilização de lipase com gelatina e o uso de plastificante é possível. Verificou-se que o valor de *Bloom* da gelatina exerce influência na manutenção da lipase imobilizada, sendo que maiores valores de *Bloom* são mais efetivos para a imobilização. Em relação aos plastificantes, o manitol apresentou o resultado satisfatório, obtendo-se rendimentos de imobilização superiores a outros trabalhos que utilizam a técnica de aprisionamento como forma de imobilização. A lipase mantém-se estável com as variações de condições experimentais sendo o reuso da enzima possível por até 10 ciclos, mesmo considerando a redução da atividade relativa e a sua manutenção ser em temperatura de 25 °C, podendo ser aplicada para hidrolisar diversos substratos.

Portanto, em relação aos resultados obtidos a matriz de imobilização que melhor apresentou estabilidade e rendimento para a imobilização foi a matriz elaborada com 90,3 % de gelatina de *Bloom* 280 g, 5,0 % de manitol como plastificante e reticulada com glutaraldeído 2,5 %.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem novas pesquisas utilizando gelatina e plastificantes no desenvolvimento de matrizes de imobilização, sendo:

- Uso de gelatinas produzidas a partir de diferentes fontes de matérias primas, como a gelatina de peixe, amplamente estudada atualmente;
- Uso de outros tipos de plastificantes hidrofílicos também pode ser explorado, como por exemplo, o sorbitol e o etilenoglicol, amplamente estudados no desenvolvimento de filmes para coberturas e embalagens. Ainda, o uso de plastificantes hidrofóbicos também pode ser estudado no desenvolvimento de matrizes de imobilização.
- Com as matrizes desenvolvidas, sugere-se o estudo da imobilização de outras enzimas bem como a imobilização de micro-organismos.
- Como etapa complementar a caracterização das matrizes de imobilização, sugere-se a realização de ensaios para determinação da porosidade, sendo determinados o volume dos poros e quantidade e poros nas matrizes.
- Realizar a cromatografia dos ácidos graxos formados na hidrólise dos óleos vegetais e gordura animal.
- Testar a lipase imobilizada em outras reações, como esterificação.
- Reticulação em todos as faces dos cubos.

REFERÊNCIAS

- ABDORREZA, M.N.; CHENG, L.H.; KARIM, A.A. Effects of plasticizers on thermal properties and heat sealability of sago starch films. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 56-60, 2011.
- AL-HASSAN, A.A.; NORZIAH, M.H. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, p.1-10, 2011.
- ALVES, P.M.A.; CARVALHO, R.A.; MORAES, I.C.F.; LUCIANO, C.G.; BITTANTE, A.M.Q.B.; SOBRAL, P.J.A. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 1751-1757, 2011.
- ALVES, S.G.T.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.3, 2002.
- ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, p. 1113–1121, 2009.
- ASSIS, S. P.; FERREIRA, B.S.; FERNANDES, P.; GUAGLIANONI, D.G.; CABRAL, J.M.S; OLIVEIRA, O.M.M.F. Gelatin-immobilized pectinmethylesterase for production of low methoxyl pectin. **Food Chemistry**, v.86, p.333–337, 2004a.
- ASSIS, S.A.; FERNANDES, P.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FARIA OLIVEIRA, O.M.M.F Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 277-280, 2004b.
- BAEK, M.H.; YOO B.; Lima, S.-T. Effects of sugars and sugar alcohols on thermal transition and cold stability of corn starch gel. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 133–142, 2004.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.392-416, 1996.

BARBUT, S.; MITTAL, G.S. Effect of heat processing delay on the stability of poultry meat emulsions containing 1,5 and 2,5 % salt. **Poultry Science**, v.70, p.2538-2543, 1991.

BELITZ, H-D; GROSCH, W. **Química de Los Alimentos**. Acribia. 2ª Edición, 1997, 1067 p.

BERGO, P.; SOBRAL, P.J.A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1285–1289, 2007.

BETIGERI, S.S.; NEAU, S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, p. 3627–3636, 2002.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H.R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. **Trends in Biotechnology**, v.26 p. 566-572, 2008.

BIGI, S.; PANZAVOLTA, K.; RUBINI, A. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, p. 5675–5680, 2004.

BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics. Principles and Methods**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2nd Ed., 2008, 301p.

BOANINI, E.; RUBINI, K.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A. Chemicophysical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. **Acta Biomaterialia**, v.6, p. 383–388, 2010.

BRANCO, A.; SANTOS, J. D. G.; PIMENTEL, M. M.A.M; OSUNA, J.T.A.; LIMA, L.S.; DAVID, J. M. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 507–510, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Ministério da Saúde, 2005, 1018p**

BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G.N.; GUPTA, V.K. Immobilization of Lipase by Entrapment in Ca-alginate Beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, p.552-562, 2008.

BUENO, C.M.M. **Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa.** Dissertação de Mestrado. Mestrado em Alimentos e Nutrição. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2008.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes.** Principles, Applications and Design. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, 551 p.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 729–735, 2009.

CARVALHO, P. de O.; CALAFATTI, S.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. da; CONTESINI, F.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, p.614-621, 2005.

CHANASATTRU, W.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. Impact of cosolvents (polyols) on globular protein functionality: Ultrasonic velocity, density, surface tension and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1475–1484, 2008.

CHATZIFRAGKOU, A; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v.36, p. 1097-1108, 2011.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, p.194-199, 2000.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. da G.; CARVALHO, P. de O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163–171, 2010.

COPPOLA, M.; DJABOUROV, M.; FERRAND, M. Phase diagram of gelatin plasticized by water and glycerol. **Macromolecular Symposia**, v. 273, p. 56–65, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**, Artmed, 2010, 900p.

DE WAEL, K.; BASHIR, Q.; VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL P., HEERING, H. A.; ADRIAENS, A. Electrochemical determination of hydrogen peroxide with cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c entrapped in a gelatin hydrogel. **Bioelectrochemistry**, 2011.

DEMAN, J.M. **Principles of Food Chemistry**. Aspen: Maryland, 1999. 147-149p.

DENIS, A.; BRAMBATI, N.; DESSAUVAGES, B.; GUEDJI, S.; RIDOUX, C.; MEFFRE, N.; AUTIER, C. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.989-994, 2008.

DESAI, P.D.; DAVE, A.M.; DEVI, S. Entrapment of lipase into K-Carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, p.143–150, 2004.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 7ª Edição. Blucher. 2011. 1199p.

DONG, H.; LI, J.; LI, Y.; HU, L.; LUO, D. Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. **Chemical Engineering Journal**, v.181–182, p. 590–596, 2012.

DORÁN, P. **Bioprocess Engineering Principles**. Elsevier Science & Technology Books. 1995. 430 p.

DRURY, J. L.; MOONEY; D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v.24, p. 4337–4351, 2003.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Effect of chromium salts on invertase immobilization onto carboxymethylcellulose-gelatine carrier system. **Biomaterials**, v.17, p. 1423-1427, 1996.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, v. 97, p. 591–597, 2006.

FADNAVIS, N. W.; SHEELU G.; KUMAR, B. M.; BHALERAO M. U.; DESHPANDE, A. A. Gelatin Blends with Alginate: Gels for Lipase Immobilization and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 557–564, 2003.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin–pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 61-70, 2011.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2ª Edición. Editorial Acribia. 2000. 1258 p.

FREIRE, D.M.G.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA Jr., G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a laboratory scale fermentor: media composition, agitation and aeration. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.63, p.409–421, 1997.

GIRARD, J.P. **Tecnología de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza: Acribia, 1991, 231-241p.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatine chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 1461-1469, 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, p. 1-15, 2011.

GUERRERO, P.; STEFANI, P.M.; RUSECKAITE, R.A.; CABA, K. de la. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p.65–72, 2011.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p.1–21, 2011.

GUO J.; ZHANG, Y; YANG, X-Q. A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 277-285, 2012.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p. 763–781, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 235-251, 2006.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 203-213, 2004.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 82-90, 2011.

JIANKANG, H.; DICHEN, L.; YAXIONG, L.; BO, Y.; BINGHENG, L.; QIN, L.. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures. **Polymer**, v.48, p. 4578-4588, 2007.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J., TALENS, P., CHIRALT, A.. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 302 -310, 2012.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. **European Food Research and Technology**, v.222, p. 229-235, 2005.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. OLIVEIRA, D. de. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 31, n.2, p. 119-125, 2008 (a).

KEMPKA, A.P. **Uso de lipase e fosfolipase como auxiliares no tratamento biológico de efluentes de frigoríficos de suínos.** Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária Regional de Chapecó. 2008 (b).

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2008.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y –T.; KARRA-CHAABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1083–1089, 2011.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v.21, p. 377–397, 2004.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 311–322, 2009.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. **Journal of Food Engineering**, v.105, p. 295–305, 2011.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G. Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1057–1071, 2006.

LAI, J-Y. The Role of Bloom Index of Gelatin on the Interaction with Retinal Pigment Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3442-3456, 2009.

LAI, J-Y.; LIN, P-K.; HSIUE, G-H.; CHENG, H-Y.; HUANG, S-J, LI, Y-T. Low Bloom Strength Gelatin as a Carrier for Potential Use in Retinal Sheet Encapsulation and Transplantation. **Biomacromolecules**, v.10, p. 310–319, 2009.

LEE, K.Y., SHIM, J., LEE H.G. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p. 251–254, 2004.

LI N.; ZONG, M-H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43–54, 2010.

MAALEJ-ACHOURI, I.; GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 145–152, 2009.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.118, p. 334–340, 2009.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E; GARCÍA, M.A; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p.453–460, 2006.

MARTUCCI, J.F.; RUSECKAITE, R.A.; VAZQUEZ, A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. **Materials Science and Engineering A**, v. 435–436, p.681–686, 2006.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos. 2009.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para a elaboração de biofilmes: solubilidade das proteínas em função do pH. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais.** Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998. p.2086-2089.

MORENO-PIRAJAN, J.C.; GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p.55–62, 2011.

MOZAFARI, M.; MOZTARZADEH, F. Controllable synthesis, characterization and optical properties of colloidal PbS/gelatin core-shell nanocrystals. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.351, p. 442–448, 2010.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1903–1907, 2006.

NAGANAGOUDA, K.; PRASHANTH, S.J.; SHANKAR, S.K.; DHANANJAY, S.K.; MULIMANI, V.H. Immobilization of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase in gelatin and its application in removal of flatulence-inducing sugars in soymilk. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1131–1137, 2007.

NAKHLA, G.; JEGANATHAN, J.; BASSI, A. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials**, v.137, p. 121–128, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Editora Artmed S.A., 2011, 1274 p.

NUMANOGLU, Y.; SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 703–709, 2004.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza : Acribia, 133 – 160p., 1994.

OLIVEIRA, P. S. M. de; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. V. N. de. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, p. 441- 452, 2009.

PALLA, C.A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M.E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v.55, p. 199– 207, 2011.

PANESAR, P.S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p.530–543, 2006.

PAULA, F. C. de; CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 691– 695, 2008.

PIERMARIA, J.; BOSCH, A.; PINOTTI, A.; YANTORNO, O.; GARCIA, M.A.; ABRAHAM, A.G. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 1261-1269, 2011.

POPPE, J. **Gelatin: In Thickening and gelling agents for food**. London: Blackie Academic and Professional, 1992.

RAHMAT, N.; ABDULLAH, A. Z.; MOHAMED, A. R. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 987–1000, 2010.

RAMANI, K.; KENNEDY, L. J.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.45, p.1683–1691, 2010.

RIVERO, S.; GARCÍA, M.A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p. 369–375, 2010.

SAHA, B. C.; RACINE, F. M. Biotechnological production of mannitol and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 879–891, 2011.

SATYARTHI, J.K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v.391, p. 427–435, 2011.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industry Practice**. Hardcover, 371p. 2007.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. da G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química. Nova**, v. 30, p. 1182-1187, 2007.

SEGTNAN, V.H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.1–11, 2004.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627–662, 2001.

SHEELU, G.; KAVITHA, G.; FADNAVIS, N.W. Efficient immobilization of Lecitase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 739–748, 2008.

SILVA, G. P. DA; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30–39, 2009.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p. 16– 24, 2012.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.15, p. 423-432, 2001.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of β -Lactoglobulin Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6298-6302, 2000.

SOUZA, S. M. A. de; SOBRAL, P. J. do A.; MENEGALLI, F.C. Extração de proteínas miofibrilares de carne bovina para elaboração de filmes comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24(4), p.619-626, 2004.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p. 287–301, 1998.

TANIOKA, A., MIYASAKA, K., ISHIKAWA, K. Reconstitution of collagen fold structure with stretching gelatin film. **Biopolymers**, v.15, p. 1505–1511, 1996.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for the immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v.38, p. 27- 30, 2002.

TANRISEVEN, A.; OLCER, Z. A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 430–434, 2008.

TASTAN, E.; ONDER, S.; KOK, F. N. Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction. **Talanta**, v. 84, p. 524–530, 2011.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P.J.A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 70, p.172-176, 2005.

TOSH, S. M.; MARANGONI, A. G.; HALLETT, F. R.; BRITT, I. J. Aging dynamics in gelatin gel microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 503–513, 2003.

VAN VLIERBERGHE, S.; CNUUDE, V.; DUBRUEL, P.; MASSCHAELE, B.; COSIJNS, A.; PAEPE, I. D.; JACOBS, P. J. S.; HOOREBEKE, L. V. H.; REMON, J. P.; SCHACHT, E. Porous Gelatin Hydrogels: 1. Cryogenic Formation and Structure Analysis. **Biomacromolecules**, v.8; p. 331-337, 2007.

VANIN, F.M.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 899–907, 2005.

VIEIRA, M. G. A.; SILVA, M. A. da; SANTOS, L. O. dos; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 254–263, 2011.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p.113–148, 2000.

VUJČIĆ, Z.; MILORADOVIĆ, Z.; MILOVANOVIĆ, A.; BOŽIĆ, N. Cell wall invertase immobilization within gelatin gel. **Food Chemistry**, v.126, p. 236-240, 2011.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201–223, 2001.

WANG, P.; FAN, X.; CUI, L., WANG, Q.; ZHOU, A. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blend with PEG. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1519–1522, 2008.

WANG, X.; ZHOU, G.; ZHANG, H.; DU, S.; XU, Y.; WANG, C. Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, p. 3027–3032, 2011.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D.W. S. **Handbook of Food Enzymology**. Marcel Dekker, Inc. 2003.

WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151–161, 2002.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; KRY, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal Automated Methods and Management in Chemistry**, v.8, p. 170-177, 1986.

WON, K.; KIM, S.; KIM, K-J.; PARK, H. W.; MOON, S-J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v.40, p. 2149–2154, 2005.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. Zaragoza: Acribia, p.109-116, 1995.

YAN, J.; LIU, S.; HU, J.; GUI, X.; WANG, G.; YAN, Y. Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7154–7158, 2011.

YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; YI, J. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 907- 914, 2011.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol–gel materials. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4311–4316, 2009.

YANG, J.; MA, X.; ZHANG, Z.; CHEN, B.; LI, S.; WANG, G. Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption-cross-linking methods: A comparative study. **Biotechnology Advances**, v. 28, p.644–650, 2010.

YIGİTOĞLU, M.; TEMOÇİN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p. 130–135, 2010.

YÜCEL, Y. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, p. 39–44, 2012.

ZHONG, Q.P.; XIA, W.S. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 262–269, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – Ficha técnica da lipase

ANEXO 2 – Fichas técnicas das gelatinas

ANEXO 3 – Cromatogramas das gelatinas de 200, 220, 240 e 280 *Bloom* obtidos na determinação do perfil de aminoácidos

ANEXO 4 – Resultados de solubilidade em água (%) para os géis com e sem glutaraldeído

ANEXO 5 – Resultados da razão de inchamento (%) para os géis com e sem glutaraldeído

ANEXO 6 – Resultados de atividade enzimática para os ensaios de manutenção

ANEXO 1 – Ficha técnica da lipase.

OIGRANOLAS		PT		EGRANOTEC		
SPRING FLIP BR						
CÓDIGO	REVISÃO	ELABORADOR	APROVADOR	DEPARTAMENTO	DATA APROVAÇÃO	PÁGINA
PT-01-01-0004	01	ULIANA DO ROCCO FRANCO DA PAZ	DANIELA CRIVARI DE REZENDES	Resposta e Desenvolvimento	2016/0029	1/1

Isento de registro conforme Resolução RDC Nº. 278 de 22/09/2003

Descrição:	Preparação enzimática de lipase purificada de <i>Fusarium sporisorium</i> soada por fermentação submersa de <i>Aspergillus oryzae</i> (Conforma RDC Nº. 205, de 14 de novembro de 2006)
Aplicação:	Molinos de Trigo, Molinos de Pães e de Melhoradores.
Efeitos:	Substituição de Óleo, Polisorbato 80, SSL, CSL Acréscimo de tolerância à fermentação Acréscimo de volume dos pães
Composição:	Enzima lipase Ácido de molinos/molinos de moinho
Especificações:	Atividade enzimática lipase mín.: 120.000 UPL/g Umidade máxima: 8% pH ótimo de atuação: 4,0 – 7,5 Temperatura ótima de atuação: 30 – 45°C Temperatura de inativação acima de 90°C
Dosagem:	10ppm – 50ppm sobre o peso da farinha 0,2g – 2,2g/100g de farinha Uso de 1% da quantidade habitual de Emulsificantes, para substituição pela SPRING FLIP BR em sua dosagem ótima definida pelas características tecnológicas da farinha de trigo, pelas demais ingredientes utilizados nas formulações, pelo processo e pelas especificações dos produtos finais.
Embalagem/ Estocagem:	Válido por 1 ano. Cartelas de papelão com 15 em 20g. Unidades individuais (packs). Válido por 12 meses (18 meses para produto embalado em sachê). O produto conserva suas características funcionais, desde que armazenado em local seco e fresco e livre de contaminação química e biológica. Manter e embalagem fechada imediatamente após o uso do produto.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL* POR 100g	
Valor Calórico	319 Kcal
Carboidratos	70 g
Proteínas	8,7 g
Gorduras Totais	0,7 g
Gorduras saturadas	0 g
Gorduras trans	0 g
Fibra Alimentar	0,7 g
Sódio	1,5 mg

*Referência: Resolução RDC Nº. 360 de 23/12/03
*Tais valores são baseados em especificações, podendo ser considerados como valores típicos.

LIMITES DE GARANTIA

Parâmetro	Limite máx. (ppm)
Amido (A%)	3
Chumbo (Pb)	10
Metas pesadas (como Pb)	50

Referência: Resolução Nº. 247/CNMPA – Item 12

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetro	Limite
Presença de Salmonella (g/25g)	Ausente
Psudomonas aeruginosa	Ausente
Contagem de Coliformes a 45°C (MPN/g)	< 50
Atalaxias (mg/g)	< 5
Contagem Total (mg) (UFC/g)	< 5 x 10 ⁷
Atividade antibiótica	Ausente

Referência: Resolução Nº. 247/CNMPA – Item 12, Resolução Nº. 12, de 02/01/01 – Item 23 letra h.

Condições de uso:

Identificação de perigo: A inalação de pó pode ser nociva às vias aéreas, privando do funcionamento, pode provocar a sensibilização, portanto evitar respirar orgânicos em ambientes ventilados. O contato prolongado com o pó pode causar irritações menores.

Segurança: Durante a aplicação utilizar máscara de proteção para tipo P2 (P2) contra poeiras, e sempre lavar imediatamente de forma a evitar a absorção de poeira no sistema para os olhos, a fim de evitar o contato com a pele e mucosas. **Faixas de segurança:** Utilização: lavar e enxaguar para o uso final, é necessária assistência médica no caso de dificuldades de respiração. Cuidado com o pó: evitar que fique aderente, evitar os olhos, evitar contato com a pele, evitar contato com o sistema circulatório. Evitar imediatamente todo o material contaminado. Contato com os olhos: lavar os olhos com água abundante com água abundante. Em seguida, consultar imediatamente um médico (Oftalmologista). Ingestão: lavar água, enxaguar e tomar líquidos frescos. No caso de inalação, consultar um médico.

Medidas de controle e medidas: Produto extinto: Água ou álcool. Usar sempre respirador com filtro de ar independente do ambiente.

ANEXO 2 – Fichas técnicas das gelatinas.

		CERTIFICADO DE ANÁLISES		22000-2005	
		Nº 1005-10	Data 29-Nov-10		
Produto :	Gelatina de Pele Bovina				
Tipo :	200 Bloom 30 Mesh				
Número do Lote :	M 3195				
Quantidade do Lote :	1 Kg				
Data de Fabricação:	25-Mai-10				
Data de Validade :	25-Mai-15				
Testes Físico-Químicos	Unidade	Min.	Max.	Resultado do Teste	Método
Bloom	gramas	190	210	207	GMA ⁽¹⁾
Viscosidade	mpa	25	35	30	GMA
Limidez	%	-	12	11	GMA
Cinzas	%	-	2	±2	GMA
pH	N/A	4,7	6,5	5,5	GMA
Dódo de Erosão	ppm	-	40	±40	GME ⁽²⁾
Arsénio ⁽³⁾	ppm	-	0,6	± 0,6	AOAC ⁽⁴⁾
Cobalto ⁽³⁾	ppm	-	30	±30	AOAC
Cromo ⁽³⁾	ppm	-	2	± 2	AOAC
Chumbo ⁽³⁾	ppm	-	5	± 5	AOAC
Cádmio ⁽³⁾	ppm	-	0,5	± 0,5	AOAC
Merúrio ⁽³⁾	ppm	-	0,15	± 0,15	AOAC
Zinco ⁽³⁾	ppm	-	50	± 50	AOAC
Metais Pesados ⁽³⁾	ppm	-	50	± 50	AOAC
Pentaclorotoleno ⁽³⁾	ppm	-	0,3	± 0,3	Cromatografia
Neogénio ⁽³⁾	%	15	-	± 15	Kjeldahl
Testes Microbiológicos	Unidade	Limite Esp.	Resultado do Teste	Método	
Contagem Total de Bactérias	/1g	≤ 1000	≤ 1000	USP ⁽⁵⁾	
E. coli	/10g	Negativo	Negativo	USP	
Salmonella	/25g	Negativo	Negativo	USP	
<small> (1) Testamento aprovado USP do laboratório de análises de açúcar e gelatina sintética de América (2) GMA - Gelatin Manufacturers Institute of America (3) AOAC - Association of Official Analytical Chemists (4) USP - United States Pharmacopoeia & National Formulary </small>					

	CERTIFICADO DE ANÁLISES		<small>Qualidade e Segurança</small> 22000:2005
	No: 1000-10	Data: 28-Nov-10	

Produto : Gelatina de Pele Bovina
 Tipo : 220 Bloom 30 Mesh
 Número do Lote : M 2196
 Quantidade do Lote : 1 Kg
 Data de Fabricação: 12-Fev-09
 Data de Validade : 12-Fev-14

Testes Físico-Químicos	Unidade	Min.	Max.	Resultado do Teste	Método
Bloom	gramas	210	230	221	GMIA *
Viscosidade	mpa	28	38	34	GMIA
Umidade	%	-	12	10	GMIA
Cinzas	%	-	2	≤ 2	GMIA
pH	N/A	4,7	6,5	5,4	GMA
Doação de Emoxite	ppm	-	40	≤ 40	GME *
Ársênio*	ppm	-	0,8	≤ 0,8	AOAC **
Cádmio*	ppm	-	30	≤ 30	AOAC
Cobalto*	ppm	-	2	≤ 2	AOAC
Cromo*	ppm	-	5	≤ 5	AOAC
Cádmio*	ppm	-	0,5	≤ 0,5	AOAC
Mercúrio*	ppm	-	0,15	≤ 0,15	AOAC
Zinco*	ppm	-	50	≤ 50	AOAC
Metais Pesados*	ppm	-	50	≤ 50	AOAC
Pentaclorofeno*	ppm	-	0,3	≤ 0,3	Cromatografia
Nitrogênio*	%	15	-	≥ 15	Kjeldahl

Testes Microbiológicos	Unidade	Limite Esp.	Resultado do Teste	Método
Contagem Total de Bactérias	/1g	≤ 1000	≤ 1000	USP **
E. coli	/10g	Negativo	Negativo	USP
Salmonella	/25g	Negativo	Negativo	USP

* - Os dados foram obtidos com um método de análise de rotina e não servem de referência.

(1) GMIA - Gelatin Manufacturers Institute of America

(2) GME - Gelatin Manufacturers Institute of Europe

(3) AOAC - Association of Official Analytical Chemists

(4) USP - United States Pharmacopoeia & National Formulary



Etina Trade
Controle de Qualidade

	CERTIFICADO DE ANÁLISES		FORMULAÇÃO 2010-11
	No: 1887-10	Data: 29-fev-10	22000:200%

Produto : Gelatina de Pele Bovina
Tipo : 240 Bloom 30 Mesh
Número do Lote : M 2197
Quantidade do Lote : 1 Kg
Data de Fabricação: 30-Mai-10
Data de Validade : 30-Mai-15

Testes Físico-Químicos	Unidade	Min.	Max.	Resultado do Teste	Método
Bloom	gramas	230	250	244	GMA *
Viscosidade	mpa	31	43	37	GMA
Umidade	%	-	12	12	GMA
Cinzas	%	-	2	≤ 2	GMA
pH	N/A	4,7	5,5	5,7	GMA
Óxido de Enxofre	ppm	-	40	≤ 40	GME *
Arseni ^o *	ppm	-	0,8	≤ 0,8	AOAC *
Cobalt ^o *	ppm	-	30	≤ 30	AOAC
Cromo ^o *	ppm	-	2	≤ 2	AOAC
Chumbo ^o *	ppm	-	5	≤ 5	AOAC
Cádmio ^o *	ppm	-	0,5	≤ 0,5	AOAC
Mercúrio ^o *	ppm	-	0,15	≤ 0,15	AOAC
Zinco ^o *	ppm	-	50	≤ 50	AOAC
Metais Pesados ^o *	ppm	-	50	≤ 50	AOAC
Pentaclorofenil ^o *	ppm	-	0,3	≤ 0,3	Cromatografia
Nitrogênio ^o *	%	15	-	≥ 15	Kjeldahl

Testes Microbiológicos	Unidade	Limite Esp.	Resultado do Teste	Método
Contagem Total de Bactérias	/1g	≤ 1000	≤ 1000	USP *
E. coli	/10g	Negativo	Negativo	USP
Salmonella	/25g	Negativo	Negativo	USP

* Os métodos mencionados são os adotados pelo Instituto de Controle e Defesa do Consumidor de Anápolis.

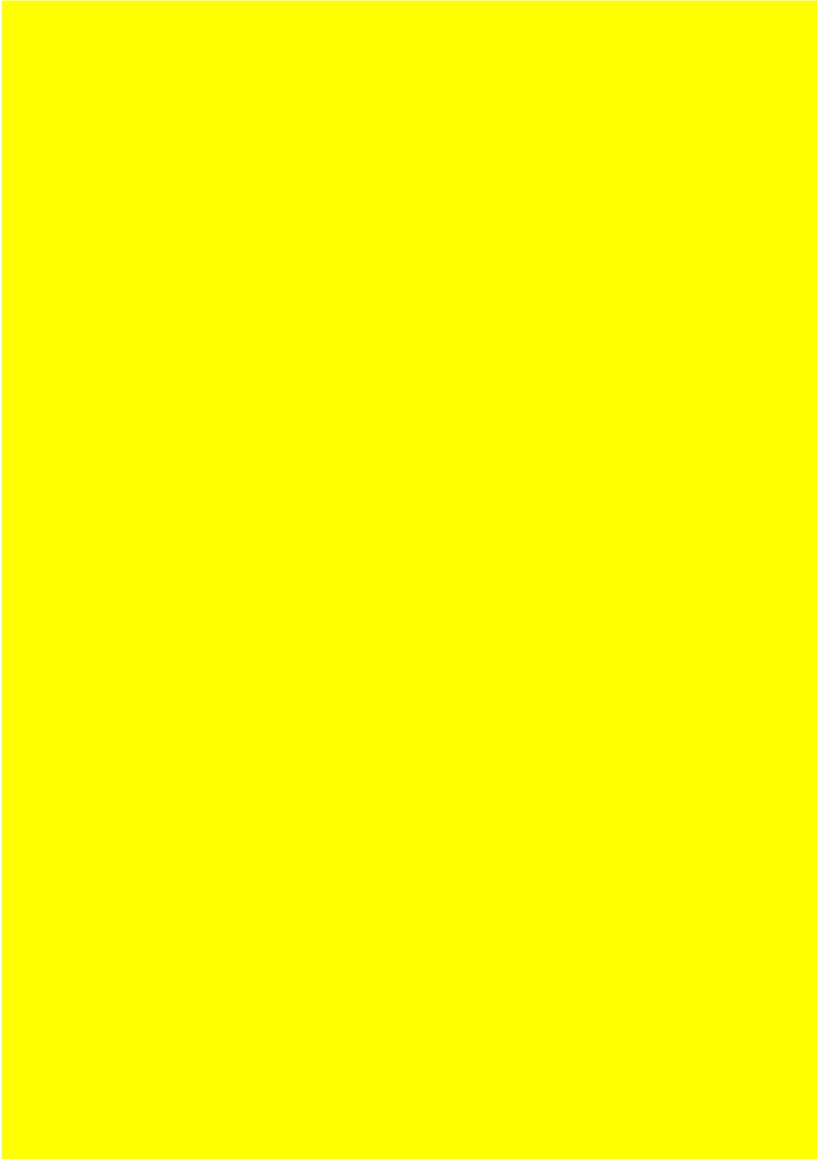
(1) GMA - Gelatin Manufacturers Institute of America

(2) GME - Gelatin Manufacturers Institute of America

(3) AOAC - Association of Official Analytical Chemists

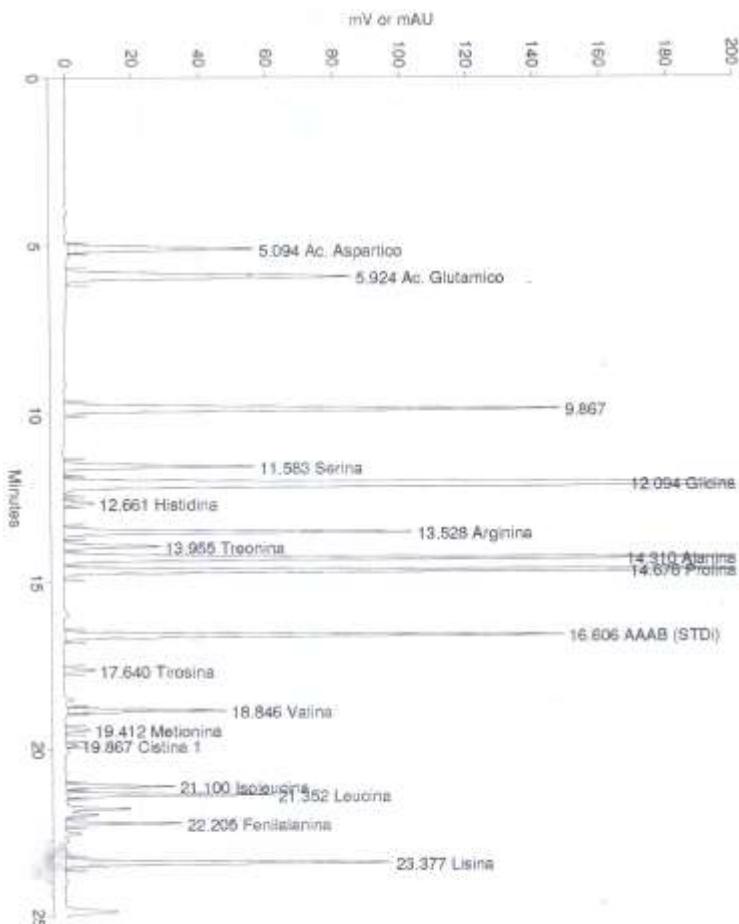
(4) USP - United States Pharmacopoeia & National Formulary


Fábrica Brasil
 Controle de Qualidade

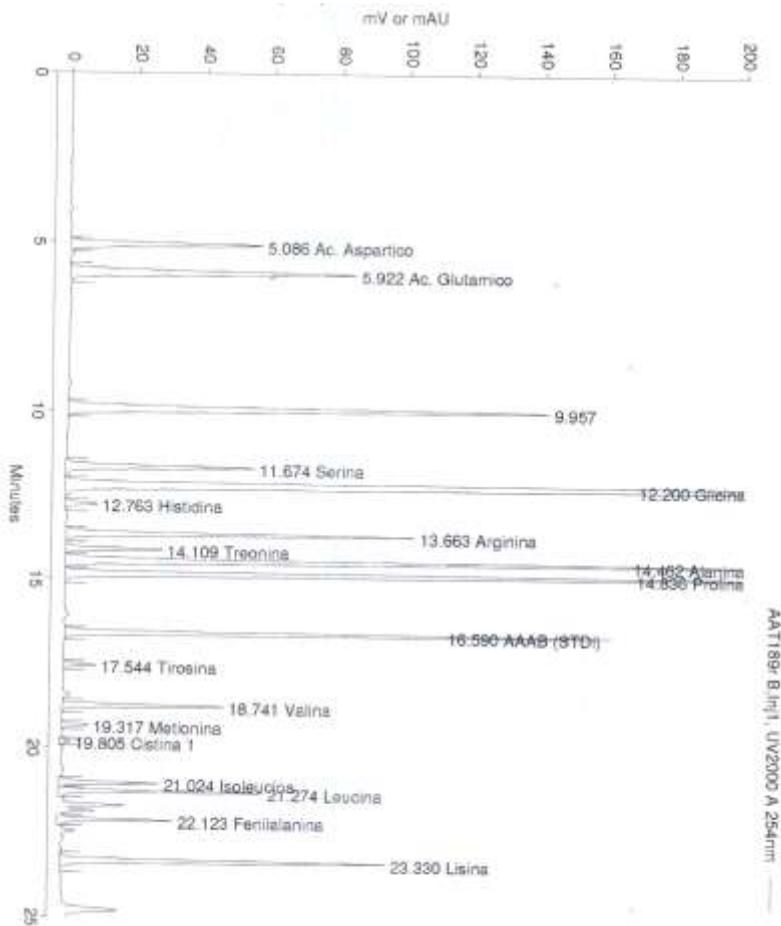


ANEXO 3 – Cromatogramas das gelatinas de 200, 220, 240 e 280 *Bloom* obtidos na determinação do perfil de aminoácidos.

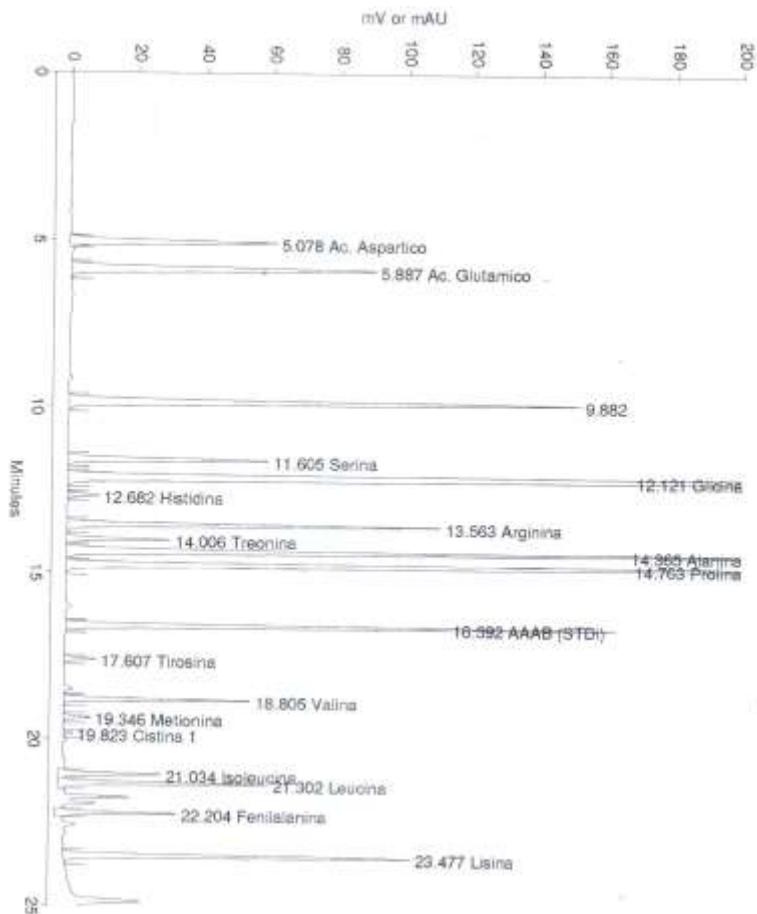
Cromatograma da gelatina de 200 *Bloom*:



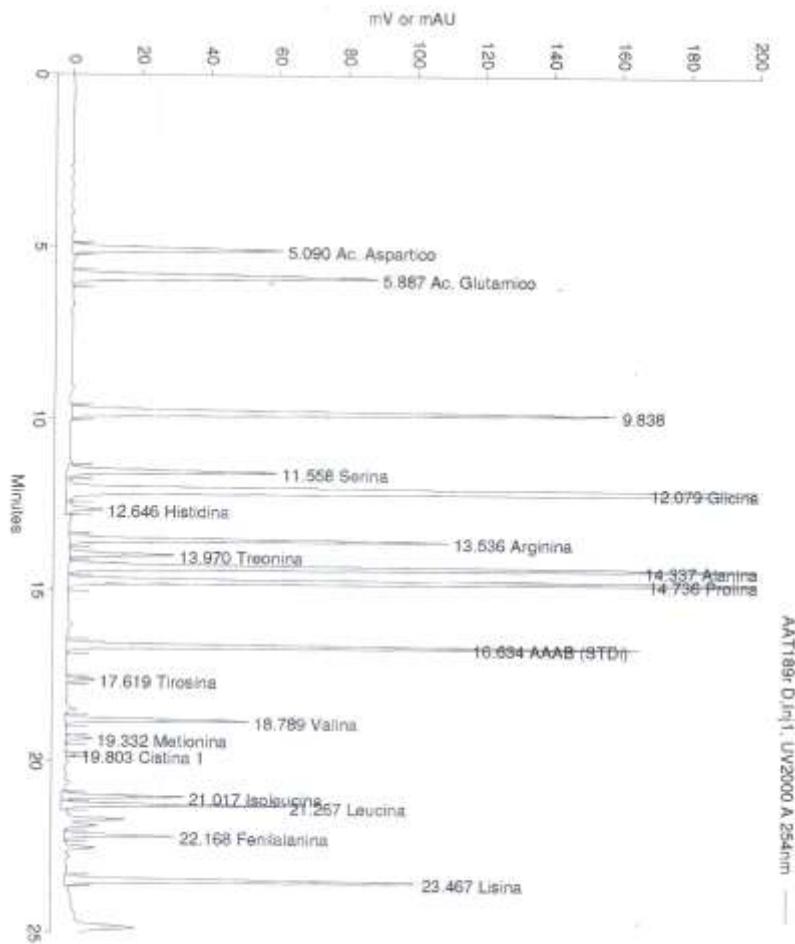
Cromatograma da gelatina de 220 Bloom:



Cromatograma da gelatina de 240 Bloom:



Cromatograma da gelatina de 280 Bloom:



Laudo

Cliente: Aniela Pinto Kempka, Universidade do Estado de Santa Catarina

Trabalho: AAT189

Método: HPLC

Descrição das amostras

A Gelatina de pele bovina 200

B Gelatina de pele bovina 220

C Gelatina de pele bovina 240

D Gelatina de pele bovina 280

Resultados em g/100g de amostra

ID	ASP	GLU	H- PRO	SER	GLI	HIS	ARG	TRE	ALA	PRO	TIR	VAL	MET	CIS	ILEU	LEU	FEN	LIS	Total
A	4,42	8,91	9,23	3,17	22,42	0,70	8,55	1,62	8,90	12,91	0,58	1,99	0,70	0,48	1,39	2,68	1,81	3,29	93,75
B	4,81	9,20	9,43	3,48	23,36	0,92	9,21	1,67	9,05	13,02	0,60	2,26	0,74	0,62	1,43	2,94	2,23	3,35	98,32
C	5,04	9,29	9,41	3,30	23,20	0,71	9,01	1,73	9,19	13,43	0,61	2,26	0,76	0,46	1,52	3,05	2,29	3,35	98,61
D	4,92	9,37	9,84	3,60	24,2	1,11	8,82	1,74	9,88	14,22	0,49	2,32	0,70	0,49	1,62	3,01	1,91	3,49	101,72

média

O método cromatográfico é baseado na seguinte referência:

White JÁ, Hart RJ, Kry JC. **An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials.** J

Automatic Chem, vol 8, pp170-177, 1986. Modificações:

ANEXO 4 – Resultados de solubilidade em água (%) para os géis com e sem glutaraldeído.

Gelatina Bloom 200

Experi-mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	2,009 ± 0,009	0,364 ± 0,003	6,886 ± 0,006	7,867 ± 0,006
E2	2,176 ± 0,002	0,289 ± 0,011	7,767 ± 0,001	6,973 ± 0,006
E3	5,236 ± 0,003	4,987 ± 0,008	17,654 ± 0,004	16,454 ± 0,001
E4	3,772 ± 0,003	1,783 ± 0,001	6,774 ± 0,004	6,655 ± 0,004
E5	6,882 ± 0,004	2,434 ± 0,001	3,662 ± 0,006	2,767 ± 0,005
E6	3,782 ± 0,001	2,032 ± 0,005	9,654 ± 0,002	9,554 ± 0,004
E7	3,911 ± 0,010	5,565 ± 0,006	17,545 ± 0,006	17,756 ± 0,001
E8	2,34 ± 0,001	2,878 ± 0,004	8,756 ± 0,001	6,972 ± 0,009
E9	2,467 ± 0,003	2,654 ± 0,006	6,545 ± 0,004	5,554 ± 0,006
E10	2,882 ± 0,004	2,563 ± 0,003	6,665 ± 0,004	5,988 ± 0,001

Controle e glutaraldeído: 82,533 ± 0,049

Controle: 99,938 ± 0,088

Gelatina Bloom 220

Experi-mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	1,726 ± 0,008	0,272 ± 0,008	6,003 ± 0,010	5,575 ± 0,008
E2	1,737 ± 0,001	0,179 ± 0,004	6,786 ± 0,002	6,863 ± 0,005
E3	4,937 ± 0,006	3,004 ± 0,008	15,900 ± 0,007	15,674 ± 0,004
E4	2,893 ± 0,003	1,478 ± 0,001	5,998 ± 0,006	5,785 ± 0,005
E5	5,894 ± 0,007	2,779 ± 0,006	2,049 ± 0,006	2,574 ± 0,004
E6	2,544 ± 0,007	1,612 ± 0,012	9,746 ± 0,004	8,767 ± 0,001
E7	2,673 ± 0,006	4,333 ± 0,003	16,982 ± 0,003	16,775 ± 0,006
E8	1,978 ± 0,001	2,564 ± 0,007	5,456 ± 0,006	6,802 ± 0,004
E9	1,836 ± 0,005	2,788 ± 0,007	5,902 ± 0,001	6,675 ± 0,003
E10	1,986 ± 0,006	2,634 ± 0,004	5,756 ± 0,007	4,524 ± 0,003

Controle e glutaraldeído: 55,885 ± 0,021

Controle: 78,885 ± 0,021

Gelatina Bloom 240

Experi-mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	0,266 ± 0,006	0,688 ± 0,003	5,857 ± 0,009	5,685 ± 0,010
E2	0,161 ± 0,001	0,625 ± 0,004	4,530 ± 0,001	3,621 ± 0,002
E3	2,950 ± 0,001	2,191 ± 0,006	15,708 ± 0,001	13,119 ± 0,004
E4	1,353 ± 0,004	1,529 ± 0,001	4,848 ± 0,007	4,595 ± 0,006
E5	2,773 ± 0,004	2,465 ± 0,006	1,501 ± 0,004	1,298 ± 0,001
E6	1,810 ± 0,003	1,044 ± 0,006	8,526 ± 0,003	6,196 ± 0,006
E7	2,557 ± 0,002	1,706 ± 0,003	17,228 ± 0,011	14,660 ± 0,008
E8	1,455 ± 0,006	1,282 ± 0,003	4,096 ± 0,004	4,205 ± 0,006
E9	1,488 ± 0,001	0,534 ± 0,001	5,822 ± 0,003	5,866 ± 0,011
E10	1,554 ± 0,001	0,519 ± 0,004	7,010 ± 0,001	4,287 ± 0,001

Controle e glutaraldeído: 19,164 ± 0,008

Controle: 59,939 ± 0,098

Gelatina Bloom 280

Experi-mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	0,044 ± 0,001	0,027 ± 0,003	0,266 ± 0,002	0,141 ± 0,005
E2	0,043 ± 0,001	0,041 ± 0,002	0,388 ± 0,003	0,318 ± 0,006
E3	0,583 ± 0,002	0,280 ± 0,008	1,061 ± 0,001	0,634 ± 0,006
E4	0,646 ± 0,003	0,432 ± 0,006	1,018 ± 0,003	0,872 ± 0,003
E5	0,407 ± 0,004	0,308 ± 0,001	0,820 ± 0,003	0,673 ± 0,001
E6	0,177 ± 0,002	0,155 ± 0,006	0,414 ± 0,009	0,184 ± 0,004
E7	0,271 ± 0,002	0,155 ± 0,008	0,294 ± 0,006	0,269 ± 0,001
E8	0,263 ± 0,001	0,188 ± 0,001	0,904 ± 0,003	0,322 ± 0,003
E9	0,085 ± 0,001	0,021 ± 0,005	0,558 ± 0,000	0,122 ± 0,002
E10	0,081 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,236 ± 0,001	0,163 ± 0,004

Controle e glutaraldeído: 6,017 ± 0,025

Controle: 36,885 ± 0,021

ANEXO 5 – Resultados da razão de inchamento (%) para os géis com e sem glutaraldeído.

Gelatina Bloom 200

Experi- mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	22,15 ± 0,45	21,51 ± 2,46	50,75 ± 2,63	37,80 ± 16,51
E2	32,36 ± 1,60	39,45 ± 1,23	60,37 ± 4,23	58,40 ± 2,28
E3	22,08 ± 0,11	17,02 ± 2,24	57,51 ± 4,61	47,33 ± 0,42
E4	36,12 ± 4,20	38,88 ± 0,12	63,14 ± 0,23	64,83 ± 2,28
E5	31,80 ± 2,28	36,83 ± 1,23	52,47 ± 1,49	60,10 ± 6,39
E6	37,28 ± 4,95	40,51 ± 1,62	62,41 ± 0,09	59,08 ± 4,08
E7	18,84 ± 0,52	11,87 ± 0,35	42,69 ± 1,36	40,74 ± 1,34
E8	43,04 ± 0,28	41,56 ± 0,78	59,10 ± 4,03	65,02 ± 7,81
E9	35,10 ± 1,23	39,50 ± 2,51	69,45 ± 0,44	53,39 ± 3,86
E10	40,68 ± 0,55	38,81 ± 0,51	56,41 ± 1,72	59,05 ± 0,77

Controle e glutaraldeído: 39,67 ± 2,40

Controle: 68,71 ± 0,71

Gelatina Bloom 220

Experi- mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	31,77 ± 3,47	21,67 ± 1,45	69,08 ± 6,66	57,71 ± 10,01
E2	36,09 ± 1,36	35,82 ± 5,06	75,75 ± 4,35	61,57 ± 0,97
E3	23,67 ± 2,16	24,69 ± 1,30	59,44 ± 0,38	51,19 ± 1,58
E4	39,16 ± 2,09	35,83 ± 0,52	66,07 ± 2,13	60,46 ± 7,18
E5	48,21 ± 5,57	29,63 ± 3,27	68,02 ± 2,63	67,92 ± 0,92
E6	26,32 ± 1,18	37,27 ± 0,08	74,24 ± 1,01	75,88 ± 1,28
E7	13,38 ± 1,36	11,15 ± 2,65	74,38 ± 1,26	50,00 ± 5,04
E8	40,08 ± 0,52	37,93 ± 0,07	73,77 ± 1,68	41,12 ± 10,30
E9	35,50 ± 0,47	33,64 ± 0,08	75,75 ± 3,97	64,44 ± 8,91
E10	39,65 ± 2,50	34,58 ± 1,74	74,29 ± 4,94	68,31 ± 3,14

Controle e glutaraldeído: 32,25 ± 1,35

Controle: 70,71 ± 3,48

Gelatina Bloom 240

Experi- mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	20,65 ± 0,07	18,91 ± 0,19	50,83 ± 1,26	50,67 ± 0,10
E2	37,95 ± 1,34	42,63 ± 2,09	70,35 ± 2,24	64,77 ± 1,56
E3	23,33 ± 1,60	21,40 ± 0,85	48,35 ± 1,96	53,21 ± 3,92
E4	37,68 ± 1,20	46,01 ± 5,17	72,15 ± 1,57	66,95 ± 3,08
E5	40,08 ± 0,93	36,71 ± 0,99	62,60 ± 3,19	56,11 ± 1,87
E6	32,40 ± 5,24	40,27 ± 2,87	56,02 ± 2,46	67,16 ± 1,55
E7	4,79 ± 3,32	2,24 ± 0,63	28,90 ± 0,86	34,22 ± 1,83
E8	41,44 ± 2,47	42,74 ± 0,89	80,36 ± 3,12	57,66 ± 3,89
E9	36,13 ± 2,85	34,83 ± 1,80	54,26 ± 1,77	66,48 ± 12,31
E10	34,87 ± 1,15	40,49 ± 0,10	60,99 ± 2,06	58,68 ± 1,86

Controle e glutaraldeído: 42,20 ± 1,62

Controle: 62,96 ± 8,36

Gelatina Bloom 280

Experi- mento	Glicerol e Glutaraldeído	Manitol e Glutaraldeído	Glicerol	Manitol
E1	26,26 ± 2,66	24,07 ± 0,63	53,74 ± 1,01	51,30 ± 2,83
E2	41,98 ± 0,54	38,04 ± 0,32	66,10 ± 7,50	59,43 ± 6,63
E3	24,35 ± 1,74	23,93 ± 0,77	65,33 ± 1,62	55,65 ± 4,31
E4	46,30 ± 3,59	51,47 ± 7,20	64,60 ± 1,92	65,76 ± 0,56
E5	37,46 ± 2,31	37,42 ± 0,15	55,42 ± 1,00	51,17 ± 1,65
E6	41,96 ± 2,92	37,99 ± 0,01	62,65 ± 1,30	62,91 ± 0,09
E7	5,45 ± 1,83	21,67 ± 0,40	45,33 ± 2,94	35,67 ± 3,25
E8	46,80 ± 3,36	46,00 ± 1,80	62,49 ± 1,45	54,80 ± 0,09
E9	33,56 ± 8,09	39,19 ± 1,42	54,21 ± 5,52	64,95 ± 11,74
E10	37,49 ± 0,64	37,09 ± 3,17	64,52 ± 2,73	65,33 ± 7,70

Controle e glutaraldeído: 46,77 ± 1,73

Controle: 55,29 ± 1,70

ANEXO 6 – Resultados de atividade enzimática para os ensaios de manutenção.

Atividade enzimática (U/mL)				
Dia	4 °C		25 °C	
	E8-280-M	E9/10-280-M	E8-280-M	E9/10-280-M
0	6,71 ± 0,06	5,96 ± 0,06	6,79 ± 0,06	5,71 ± 0,06
2	6,46 ± 0,06	5,88 ± 0,18	6,75 ± 0,12	5,38 ± 0,18
4	6,42 ± 0,12	5,75 ± 0,12	6,71 ± 0,18	5,21 ± 0,18
6	6,13 ± 0,06	5,08 ± 0,12	6,63 ± 0,18	5,04 ± 0,06
8	5,92 ± 0,12	4,92 ± 0,12	6,58 ± 0,12	4,92 ± 0,12
10	5,75 ± 0,12	4,79 ± 0,06	6,42 ± 0,12	4,83 ± 0,00
12	5,54 ± 0,06	4,58 ± 0,12	6,08 ± 0,12	4,75 ± 0,12
14	5,25 ± 0,12	4,46 ± 0,18	6,04 ± 0,06	4,73 ± 0,09
16	4,58 ± 0,12	4,08 ± 0,12	5,92 ± 0,12	4,58 ± 0,12
18	4,42 ± 0,12	3,75 ± 0,12	5,75 ± 0,12	4,53 ± 0,08
20	4,11 ± 0,15	3,21 ± 0,06	5,58 ± 0,12	4,54 ± 0,06
22	3,78 ± 0,15	2,71 ± 0,06	5,54 ± 0,18	4,46 ± 0,06
24	3,71 ± 0,06	2,54 ± 0,06	5,42 ± 0,12	4,42 ± 0,12
26	3,42 ± 0,12	2,58 ± 0,12	5,33 ± 0,00	3,92 ± 0,12
28	3,08 ± 0,12	2,42 ± 0,12	5,25 ± 0,12	3,83 ± 0,00
30	2,92 ± 0,12	2,38 ± 0,06	5,21 ± 0,06	3,75 ± 0,12

Condições de processo para obtenção da atividade enzimática: temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 160 rpm de agitação.