

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDRÉ WÜST ZIBETTI

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA REACIONAL DE
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA PARA APLICAÇÃO
EM BIOSSENSOR INDICADOR DE TEMPO TEMPERATURA**

FLORIANÓPOLIS – SC

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDRÉ WÜST ZIBETTI

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA REACIONAL DE
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA PARA APLICAÇÃO
EM BIOSSENSOR INDICADOR DE TEMPO-TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado

FLORIANÓPOLIS, 2008.

Desenvolvimento de um sistema reacional de hidrólise enzimática de tributirina para aplicação em biossensor indicador de tempo-temperatura

André Wüst Zibetti

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, na área de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Co-orientador

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antônio

Prof. Dr. Marinho Bastos Quadri

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto

Dedico a minha família que tanto me apoiou durante minha jornada. Pai, Mãe e meus irmãos, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Esta página é reservada para que eu possa expressar os sentimentos experimentados durante os anos de trabalho e agradecer a possibilidade de conviver com tantas pessoas.

Quero expressar a minha mais sincera gratidão aos meus professores orientadores. A Prof^ª. Mara G. N. Quadri pela oportunidade em trabalhar ao seu lado, confiança, paciência, pela sempre disponibilidade, orientação firme, segura e clara, com grande incentivo e determinação. Ao Prof. Ricardo A. F. Machado, pelas oportunidades, amizade, confiança em mim depositada, incentivo e crescimento pessoal.

Agradeço muito aos meus pais Geraldo e Solange pelo amor incondicional, por terem sabido compreender o valor da educação e por terem feito de suas vidas a realização de seus filhos. Agradeço aos meus irmãos, Marcelo, Marcus e Fabíola, pelo apoio, carinho, amor fraterno e dedicação.

Agradeço aos membros da banca pelas correções e sugestões importantes para finalização do trabalho.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pelos momentos de descontração e concentração. Funcionários do EQA/UFSC com quem tive a satisfação de conviver neste tempo.

Agradeço à amiga Alessandra Marangoni pela amizade sincera, apoio e preocupação, por acompanhar sempre próxima e acolher-me como um irmão junto a sua família.

Agradeço à Amanda pelo carinho, compreensão e ajuda.

Agradeço aos meus primos, Eduardo e Tiago pelo companheirismo e grande amizade em todos os momentos. A minha tia Sonia pelo carinho, apoio e dedicação.

Agradeço a Ledir pela prestatividade, sensatez e favores.

A empresa Novozymes, pelas amostras das enzimas lipase gentilmente cedidas para a realização deste trabalho. A empresa Solvay Chemicals, pelas amostras de PVC gentilmente cedidas.

Agradeço a Deus por tudo e por todos, pela jornada de evolução que exigiu muito mais do que o convencional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 EMBALAGENS INTELIGENTES	19
3.2 BIOSSENSORES INDICADORES DE TEMPO-TEMPERATURA, TTI	19
3.2.1 Indicadores de temperatura crítica, CTI	20
3.2.2 Indicadores de tempo e temperatura crítica, CT/TI	20
3.2.3 Indicadores de tempo-temperatura, TTI	20
3.3 TIPOS DE INDICADORES DE TEMPO-TEMPERATURA (TTI)	21
3.3.1 Método difusivo (<i>TIPO I</i>)	21
3.3.2 Método enzimático (<i>TIPO II</i>)	22
3.4 ENZIMA	26
3.4.1 Lipase	27
3.4.1.1 <i>Efeito dos sais, pH e temperatura na ação da lipase</i>	28
3.4.1.2 <i>Especificidade das enzimas lipolíticas</i>	29
3.5 SUBSTRATO	31
3.5.1 Tributirina	31
3.5.2 Efeito da concentração de substrato	32
3.5.3 Substrato adsorvido em suporte sólido	33
3.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TRIGLICERÍDEOS	34
3.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	36
3.7.1 Princípio da reação envolvida na hidrólise da tributirina	36
3.7.2 Cinética das reações enzimáticas	37
3.7.3 Taxa da reação	39
3.7.4 Dependência da taxa da reação com a temperatura	39
3.7.5 Ordem da reação	40
3.7.6 Aplicação dos indicadores de tempo-temperatura, TTI	42
3.7.7 Indicador Universal e Cor	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAL	47
4.2.1 Matérias-Primas e Reagentes	47
4.2.2 Equipamentos	48
4.3 MÉTODOS	50
4.3.1 Avaliação da cinética e energia de ativação da hidrólise enzimática da tributirina	50

4.3.2	Modelagem da cinética de degradação e da energia de ativação do sistema de hidrólise da tributirina livre	53
4.3.3	Estudo da mudança da cor no meio reacional.....	53
4.3.3.1	<i>Elaboração da referência de cor</i>	54
4.3.3.2	<i>Teste de mudança de cor</i>	55
4.3.4	Avaliação do tamanho de gotícula em reação	56
4.3.5	Aderência do substrato em suporte sólido polimérico	57
4.3.6	Cinética de aderência de tributirina em suporte sólido polimérico	57
4.3.7	Determinação das condições operacionais do processo de aderência da tributirina em suporte sólido polimérico.....	58
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	59
4.4.1	Quantificação de triglicerídeos pelo método da Sulfovanilina	59
4.4.2	Quantificação de proteína pelo método de BRADFORD.....	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	INTRODUÇÃO	62
5.2	Quantificação de proteína pelo método de BRADFORD	62
5.3	Energia de ativação da hidrólise enzimática de tributirina livre	62
5.4	Efeito da concentração de substrato na taxa da reação e na energia de ativação	70
5.5	Cinética de aderência de óleo em suporte sólido polimérico.....	72
5.6	Determinação das condições experimentais do processo de aderência de tributirina em suporte polimérico sólido.....	74
5.7	Ensaio de hidrólise enzimática de tributirina aderida em suporte sólido polimérico.....	77
5.8	Estudo da cinética da mudança de cor do sistema.....	79
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFÊRENCIAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Modelos comerciais de TTI tipo I, baseado em difusão (3M Monitor Mark e Freeze Watch).	22
Figura 3.2. Modelo comercial de biossensor TTI Tipo II (Vitsab Inc.).....	24
Figura 3.3. TTI comercial CheckPoint I (Vitsab Inc.).....	25
Figura 3.4. Mecanismo de funcionamento do CheckPoint I (Vitsab Inc.)	25
Figura 3.5. Fórmula estrutural da tributirina.	31
Figura 3.6. Efeito teórico da concentração de substrato em uma mesma concentração enzimática, (A) baixa, (B) saturado e (C) alta.	33
Figura 3.7. Representação esquemática das variações das concentrações de substrato e de produto durante uma reação enzimática. Medida de velocidades iniciais.	38
Figura 3.8. Aproximação sistemática para aplicação do TTI como um monitor da qualidade do alimento.	43
Figura 3.9. Coordenadas do sistema CIELab.	45
Figura 4.1 Célula utilizada na reação enzimática de hidrólise da tributirina.	50
Figura 4.2 Esquema de aquisição de imagem digital.	54
Figura 4.3 Metodologia de aquisição dos parâmetros de cor padrão.	55
Figura 4.4 Aquisição dos parâmetros de cor	56
Figura 4.5 Esquema do sistema utilizado para realizar as fotografias com câmara digital.	57
Figura 5.1 Comparação dos valores de k e a energia de ativação.....	63
Figura 5.2 Distribuição dos resíduos em função da energia de ativação.	67
Figura 5.3 Superfície de resposta do planejamento para energia de ativação; A- contornos da superfície com valores da energia de ativação sobre os contornos; B superfície do planejamento em 3D.	67
Figura 5.4 Imagens obtidas através de fotografia digital das gotículas de tributirina na reação de hidrólise enzimática: A – tributirina livre; B – tributirina + Triton X-305; C – tributirina + Goma Gelana; D – tributirina + Tween 80.....	69
Figura 5.5 Cinética de aderência a 60°C de tributirina em PEAD e PVC.	72
Figura 5.6 Aspecto do polímero PEAD GD 4960 com 1174 μm m, (a) puro; (b) com tributirina aderida, aspecto úmido, com óleo residual presente.	77
Figura 5.7 Aspecto do polímero PEAD GD 4960 com 70 μm , (a) puro; (b) com tributirina aderida, aspecto seco, sem óleo residual presente.	77
Figura 5.8 Cinética de mudança de cor à 25, 15, 10 e 4°C.	82

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 3.1. Energia de ativação das reações de deterioração em alimentos</i>	24
<i>Tabela 3.2. Características físico-químicas da tributirina</i>	31
<i>Tabela 3.3. Parâmetros das reações</i>	41
<i>Tabela 4.1 Fatores e níveis do planejamento experimental</i>	51
<i>Tabela 4.2 Planejamento experimental composto central</i>	52
<i>Tabela 5.1 Quantificação de proteína das amostras de enzimas pelo método de BRADFORD</i>	62
<i>Tabela 5.2 Energia de ativação dos tratamentos para a hidrólise da tributirina livre</i>	64
<i>Tabela 5.3 Efeitos estimados do planejamento experimental</i>	65
<i>Tabela 5.4 Análise da variância (ANOVA) do modelo de regressão</i>	66
<i>Tabela 5.5 Tamanho médio de gotículas de tributirina durante o ensaio</i>	68
<i>Tabela 5.6. Energia de ativação da hidrólise da tributirina em baixa concentração</i>	71
<i>Tabela 5.7 Parâmetros cinéticos da aderência de tributirina em PVC e PEAD</i>	73
<i>Tabela 5.8 Tamanho médio de partícula dos suportes sólidos</i>	73
<i>Tabela 5.9 Efeito da pressão sobre processo de aderência da tributirina em suporte sólido (60°C)</i> ...	74
<i>Tabela 5.10 Recuperação de solvente com diferentes polímeros e granulometrias</i>	75
<i>Tabela 5.11 Dados de ensaio do processo de aderência de tributirina em suporte sólido polimérico</i>	75
<i>Tabela 5.12 Valores médios da constante da taxa de hidrólise da tributirina em SSP PVC S-367K</i> ...	78
<i>Tabela 5.13 Valores médios e desvio padrão da constante da taxa de reação para a tributirina livre e, aderida em PVC</i>	79
<i>Tabela 5.14 Parâmetros de cor a 25°C</i>	80
<i>Tabela 5.15 Parâmetros de cor a 15°C</i>	80
<i>Tabela 5.16 Parâmetros de cor a 10°C</i>	80
<i>Tabela 5.17 Parâmetros de cor a 4°C</i>	81
<i>Tabela 5.18 Parâmetros cinéticos da mudança de cor</i>	82

NOMENCLATURA

[E]	Concentração enzimática
[S]	Concentração de substrato
ANOVA	Análise da variância
CTI	Indicador de Temperatura Crítica
CT/TI	Indicador de Tempo e Temperatura Crítica
DG	Diglicerídeo
E_a	Energia de ativação
HE	Hidrólise enzimática
HETBL	Hidrólise enzimática da tributirina livre
k	Taxa de reação
k_{obs}	Taxa da reação observada
LU	<i>Lipase Unit</i>
M	Molaridade
MG	Monoglicerídeo
MM	Massa molar
O/A	Óleo/Água
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PVC	Cloreto de polivinila
R	Constante universal dos gases
RGB	Red Green Blue
S/E	Substrato/Enzima
SSP	Suporte Sólido Polimérico
T	Temperatura
t	tempo
TB	Tributirina
TC	Temperatura Crítica
T_{eff}	Temperatura efetiva
TG	Triglicerídeo
TTI	Indicador de Tempo-Temperatura (Time Temperature Integrator)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar condições de reação de hidrólise enzimática de um substrato oleoso, a tributirina, visando a aplicação em indicadores de tempo-temperatura para embalagens de alimentos. Primeiramente foi avaliado o comportamento de um sistema reacional de hidrólise de tributirina com lipase em meio aquoso, a diferentes concentrações, definidas por um planejamento experimental composto central. Em cada condição definida, foram obtidas cinéticas de degradação por medida da diminuição do pH em 4 temperaturas diferentes, as quais foram ajustadas equações da taxa de degradação de 1ª ordem. As constantes resultantes foram associadas à temperatura por meio de uma equação tipo Arrhenius e a energia de ativação E_a , foi obtida para cada ensaio do planejamento experimental. Com o objetivo de aumentar os valores da E_a obtidos, foi estudado o efeito da redução na concentração de substrato. Para controlar a repetibilidade dos ensaios desenvolvidos com a tributirina livre em meio aquoso, o substrato oleoso foi imobilizado em pellets poliméricos, de modo a obter controle sobre a área superficial de óleo na reação. Foram avaliadas a melhor condição de operação e os efeitos do tipo de polímero (PEAD e PVC) e do tamanho de partícula sobre a aderência da tributirina nos diferentes suportes. Cinéticas de primeira ordem foram ajustadas ao processo de adesão óleo-polímero. Em uma nova etapa do trabalho, foram realizadas reações enzimáticas utilizando o substrato imobilizado. A repetibilidade da reação foi avaliada, comparando os valores das constantes da taxa de degradação com aqueles provenientes em condições de tributirina livre. Para finalizar o trabalho, observou-se um sistema de degradação enzimática monitorado pela cor, avaliando os parâmetros de coloração de um sistema de reação aquoso, formado com tributirina livre, enzima e indicador universal de pH. O planejamento experimental mostrou que concentrações de 8 a 100 mg.mL⁻¹ de tributirina e 0,3 a 50 µg.mL⁻¹ de Lipozyme TL 100, produzem valores de energia de ativação (E_a) de 3,75 a 11,37 kcal.mol⁻¹, nos quais somente a concentração de substrato teve influência significativa. O modelo de segunda ordem, ajustado aos resultados de energia de ativação, mostrou representatividade dos resultados experimentais. A redução da concentração de substrato revelou que 4 mg.mL⁻¹ de tributirina aumenta a E_a para 18,56 kcal.mol⁻¹, valor este aplicável para indicadores de reações enzimáticas e

oxidativas. A reação desenvolvida em tributirina aderida ao PVC, mostrou melhor repetibilidade com valores do desvio padrão menores que 5%, para $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de lipase, e $8,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ de tributirina, face aos desvios padrão de 14 a 22% do valor médio encontrado para a tributirina na forma livre. A aderência do substrato sobre o suporte polimérico foi mais efetiva para o PVC de $70 \mu\text{m}$ de diâmetro da partícula, com processo desenvolvido a 60°C em pressões de vácuo de 300 a 600 mmHg. A cinética de degradação da tributirina livre, monitorada pela variação de cor, forneceu uma energia de ativação de $17,12 \text{ kcal.mol}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,989, superior àqueles obtidos com a monitoração do pH.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate conditions of an enzymatic hydrolysis reaction of an oily substrate directly on implementation of a time-temperature indicators. First was assessed the behavior of a reactive system of tributyrin hydrolysis with lipase in aqueous media, in different concentrations, defined by a central composite design. In each condition was obtained the degradation kinetics by measurement of the pH decrease in 4 different temperatures, which were adjusted by a first-order degradation rate. The constant resulting was associated with temperature through an Arrhenius equation, and the activation energy, E_a , was obtained for each test of the experimental design. With the objective of increasing the values of the E_a obtained, was studied the effect of concentration decrease of substrate. To control the repeatability of developed tests with tributirina in free form in aqueous media, the substrate was adhered in polymer support to obtain control over a surface area of oil in the reaction. Were evaluated the best operation condition and the effects of the type of polymer (HDPE and PVC) and particle size on the adherence of tributyrin on different solid supports. The first order kinetics was adjusted to the adherence process of oil-polymer. In a new phase of the work were made enzymatic reactions using support adhered substrate, and the repeatability of reaction was evaluated by comparing the degradation rate constants values thus obtained with those with tributyrin in free form. To finish, a comparison of a enzymatic degradation system monitored by the color, assessing the color parameters of a aqueous reaction system formed with tributyrin in a free form, enzyme and pH universal indicator. The experimental design showed that the tributyrin concentrations of 8 to 100 mg.mL⁻¹, and 0.3 to 50 µg.mL of Lipozyme TL-100, produced energy activation values (E_a) of 3.75 to 11.37 kcal.mol⁻¹, in which only the substrate concentration had statistical influence. The second order model was adjusted to the results of the energy activation showed representativeness of the experimental results. Increasing the substrate concentration showed that the 4 mg.mL⁻¹ of tributyrin increases the E_a to 18,56 kcal.mol⁻¹, this value could be applied to indicators of enzymatic and oxidative reactions. The reaction developed in adhered tributyrin showed better repeatability, with the values of standard deviation less than 5% to 25 µ g.mL⁻¹ of lipase and 8,6 mg.mL⁻¹ of tributyrin, compared with the standard deviations of 14 to 22% found for

tributyryn in free form. The substrate adhered on polymer support was more effective to PVC with 70 μm in particle diameter, with process developed at 60 °C in vacuum pressure of 300 to 600 mmHg. The kinetics degradation of tributyrin in free form monitored by variation of color, provided an energy activation of 17,12 kcal.mol⁻¹ with correlation coefficient of 0,989 higher than those obtained with the pH monitoring.

1. INTRODUÇÃO

Um produto alimentício tem sua qualidade e vida de prateleira dependente de seu histórico de temperatura de exposição, da produção, da cadeia de distribuição e da estocagem. Um rigoroso monitoramento da temperatura de exposição durante a distribuição, bem como uma otimizada rotatividade de estoque nos pontos de venda, levando em consideração a temperatura de cada produto, ao invés do tradicional prazo de validade, levariam a um melhor controle de qualidade e significativo decréscimo na perda de alimentos (TAOUKIS *et al.*, 1989). Dentre as embalagens inteligentes os indicadores de tempo-temperatura (TTI¹) podem servir como ferramentas para atingir esses objetivos.

As embalagens inteligentes contêm um sensor interno ou externo utilizado para monitorar e preservar a qualidade dos produtos, aumentando assim o seu valor comercial e possibilitando ainda maior conveniência, oferecendo proteção contra adulterações e deterioração (KRUIJF *et al.*, 2002; AHVENAINEN *et al.*, 1998).

Um dos principais objetivos dos indicadores de qualidade é informar quando a mesma está diminuindo nos produtos embalados, preferencialmente antes da sua deterioração, passando a constituir-se como um recurso útil para monitorar a vida de prateleira dos alimentos.

Atualmente, existem no mercado inúmeros tipos e modelos de embalagens inteligentes, com a função de monitorar e preservar a qualidade dos alimentos. Sua classificação muda de acordo com o parâmetro monitorado, sendo conhecidos os indicadores de tempo-temperatura (TTI), de oxigênio, frescor, crescimento microbiano, pH e associação de um ou mais parâmetros (KRUIJF *et al.*, 2002; SMOLANDER, 2002; AHVENAINEN *et al.*, 1998). Ainda, podem ser aplicados tanto para monitorar as condições de processamento (HONG & PARK, 2000; TORRES & OLIVEIRA, 1999; VAN LOEY *et al.*, 1996), como de armazenamento (TAOUKIS *et al.*, 2004; JAWAHEER *et al.*, 2003; TAOUKIS & LABUZA, 1989).

Existe um amplo consenso, baseado na experiência e em estudos, de que a temperatura durante o processo de manufatura e distribuição de produtos

¹ TTI – sigla em inglês para Time-Temperature Indicator

alimentos resfriados, muitas vezes se desvia do recomendado. Frequentemente existe variação na temperatura de exposição até mesmo de alguns produtos dentro de uma mesma unidade de transporte.

O emprego de um método para monitorar individualmente as condições de temperatura de produtos alimentícios, por toda a rede de distribuição, indicando seu real estado de qualidade, levaria a um controle efetivo na cadeia de frio, o que conseqüentemente otimizaria a rotação do estoque e reduziria as perdas, fornecendo ainda uma indicação da vida de prateleira remanescente de cada produto. Desse modo, os indicadores de tempo-temperatura (TTI) poderiam responder a essas necessidades.

Os indicadores inteligentes, em especial os TTI's, vêm sendo desenvolvidos como um meio alternativo para avaliação e monitoramento de produtos, devido às limitações e desvantagens dos meios tradicionais de controle de produtos estocados sob refrigeração (VAN LOEY *et al.*, 1996).

Um TTI pode ser definido como um dispositivo simples e barato que apresenta uma forma fácil de medida das condições ambientais, refletindo o histórico da mudança de temperatura do produto (TAOUKIS & LABUZA, 1989a). O princípio de operação de um TTI pode ser mecânico, químico, eletroquímico, enzimático ou microbiológico, com mudança irreversível e geralmente expressa como uma resposta visível (TAOUKIS *et al.*, 1991). A taxa de mudança da resposta depende da temperatura, aumentando com a mesma. Assemelha-se assim à maioria das reações físico-químicas do alimento. A visibilidade da resposta fornece uma indicação cumulativa da exposição a certas temperaturas.

O pré-requisito de um método de controle, usando um TTI como monitor da qualidade de um alimento, é conhecer o comportamento da perda da qualidade do sistema alimentício durante a vida de prateleira, e expresso quantitativamente por modelos cinéticos confiáveis (TAOUKIS & LABUZA, 1997). Cinéticas precisas da resposta de um TTI também são necessárias.

Diante do exposto, o presente trabalho se propõe a realizar uma avaliação de um sistema reacional aplicado ao desenvolvimento de um possível biossensor indicador de tempo-temperatura, baseado em uma reação de hidrólise enzimática de um triglicerídeo através da enzima lipase.

No capítulo III deste trabalho, é apresentada uma revisão da literatura e de tópicos de interesse relacionados aos biossensores indicadores de tempo e

temperatura, suas características, classificações e aplicações. Também são apresentadas as propriedades das enzimas lipase e o processo de hidrólise enzimática de triglicerídeos. Por fim, são expostos os fundamentos teóricos da cinética enzimática e da aplicação dos indicadores de tempo-temperatura.

No capítulo IV, apresenta-se uma descrição detalhada dos materiais e métodos experimentais utilizados e análises quantitativas e qualitativas para avaliação dos processos experimentais.

No capítulo V, apresentam-se os resultados referentes aos ensaios experimentais em batelada da hidrólise enzimática da tributirina. Também são apresentados os dados dos ensaios de aderência da tributirina em suporte sólido polimérico de PVC e PEAD. Um estudo de modelagem dos dados experimentais obtidos foi efetuado e é mostrado nesse capítulo.

No capítulo VI, apresentam-se as conclusões do estudo realizado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema de reação enzimática como base para um dispositivo biossensor Indicador de Tempo-Temperatura (TTI) com a finalidade de monitorar a exposição de alimentos a abusos de temperatura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a energia de ativação e a taxa de reação de um sistema tributirina/lipase a diferentes concentrações;
- b) Avaliar o sistema S/E sob diversas condições de temperatura;
- c) Comparar a energia de ativação do sistema com as reações de degradação de alimentos;
- d) Determinar as condições e parâmetros operacionais para a aderência de substrato em suporte sólido polimérico PVC e PEAD;
- e) Avaliar a taxa de reação de hidrólise de tributirina aderida em polímero e sua repetibilidade;
- f) Avaliar o efeito da concentração de substrato na hidrólise da tributirina livre sobre a energia de ativação;
- g) Avaliar o uso de tensoativos no sistema reacional;
- h) Avaliar a cinética de mudança de cor na hidrólise enzimática utilizando indicador universal de pH.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será descrito o que são embalagens inteligentes para alimentos e onde os biossensores Indicadores de Tempo-Temperatura (TTI) se enquadram nessa denominação. Será dada a classificação dos TTI, seus métodos de funcionamento e ainda os fundamentos teóricos relacionados à sua construção, modelagem da cinética de reação e os princípios físico-químicos envolvidos.

3.1 EMBALAGENS INTELIGENTES

As embalagens inteligentes podem ser definidas como um sistema que monitora a condição do alimento, fornecendo informações sobre a qualidade do produto embalado durante o transporte e estocagem (KRUIJF *et al.*, 2002). Contém um indicador ou sensor interno ou externo, que expõe a qualidade do produto (AHVENAINEN *et al.*, 1998). Essas embalagens possuem mais propriedades do que somente proteção. Elas podem interagir com o produto e/ou responder a mudanças do ambiente que o afetam (HONG & PARK, 2000 apud ROONEY, 1995). As embalagens inteligentes aferem um componente e sinalizam o resultado desta aferição (SARANTÓPOULOS & FERNANDES, 2001).

Dentre as embalagens inteligentes classificadas como indicadores de tempo-temperatura, existem algumas diferenças não somente quanto à resposta, mas também quanto a distintos tipos e princípios de funcionamento.

3.2 BIOSSENSORES INDICADORES DE TEMPO-TEMPERATURA, TTI

O TTI pode ser definido como um dispositivo pequeno, destinado a demonstrar a dependência do tempo-temperatura de maneira fácil e precisa na mudança irreversível de resposta, que represente o atributo de qualidade ao qual ele está associado. Como exemplos desse tipo de biossensor estão os indicadores de temperatura crítica, tempo e temperatura crítica e tempo-temperatura.

3.2.1 Indicadores de temperatura crítica, CTI

Os indicadores de temperatura crítica (CTI's) mostram a exposição a uma temperatura diferente daquela de referência. Eles envolvem um elemento de tempo, respondem em poucos minutos ou até em algumas horas, mas não possuem a intenção de mostrar o histórico de exposição de temperatura acima ou abaixo de sua temperatura de referência. Meramente indicam que um produto foi exposto a uma temperatura indesejável por um tempo suficiente para causar uma mudança crítica na qualidade ou segurança do alimento, como resultado de uma reação físico-química ou biológica. São exemplos a deterioração irreversível na textura causada por uma mudança de fase, como o descongelamento de alimentos, congelamento de produtos frescos ou resfriados, derretimento do chocolate, desnaturação de uma proteína acima da temperatura crítica e crescimento de microorganismos patogênicos acima de 7°C (45°F). Alternativas sugeridas para o termo “temperatura crítica” usadas nestes indicadores são “descongelamento” ou “abuso”. O CTI foi o primeiro tipo de indicador desenvolvido. Um modelo comercializado atualmente pela 3M MonitorMark é o Freeze Watch que monitora a temperatura de congelamento, abaixo da temperatura de referência, indicando quando esta foi ultrapassada.

3.2.2 Indicadores de tempo e temperatura crítica, CT/TI

Os CT/TI's indicam uma resposta que reflete uma exposição cumulativa de tempo e temperatura acima da referência crítica. Eles são úteis para a qualidade ou segurança quando reações importantes ocorrem a uma taxa mensurável acima da temperatura crítica. Suas respostas podem ser traduzidas em uma exposição equivalente de tempo a uma temperatura crítica (TC). São exemplos o crescimento microbiano ou atividade enzimática, que é mínima abaixo da TC. Combinações de mais de um CT/TI podem dar uma aproximação discretizada da história real de tempo-temperatura dos alimentos.

3.2.3 Indicadores de tempo-temperatura, TTI

Os TTI's fornecem uma resposta contínua da dependência térmica. Eles integram, em uma única medida, a história total de tempo-temperatura desde a sua

ativação, e podem ser usados para indicar uma “média efetiva” da temperatura (T_{eff}) durante a distribuição.

O primeiro TTI foi patenteado em 1933 (Midgley, 1933). Desde então, mais de 60 patentes foram criadas nos EUA. Destas, poucas saíram do protótipo, e um número ainda menor foi comercializado, existindo entre eles diferentes tipos, baseados em seus princípios de funcionamento.

Atualmente no Brasil existem 5 pedidos de patente referentes a indicadores de tempo-temperatura, todos feitos por empresas estrangeiras. Até este momento, nenhum desses pedidos foi concedido e alguns se encontram indeferidos. Dentre as empresas que entraram com pedido de patente no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), estão a *Avery Dennison Corporation* (US), *3M Innovative Properties Company* (US), a *Oscar Mayer Foods Corporation* (US) e outras duas também com sede nos Estados Unidos.

3.3 TIPOS DE INDICADORES DE TEMPO-TEMPERATURA (TTI)

Dois modelos de TTI serão descritos, os tipos I e II. O projeto da dissertação foi baseado no princípio do modelo tipo II. Existe ainda um terceiro modelo (tipo III), baseado em uma reação de polimerização, que não será discutida nesta revisão.

3.3.1 Método difusivo (TIPO I)

É um indicador que se baseia no fenômeno de difusão (MonitorMark, 3M[®]), cujos detalhes da construção foram descritos por Manske (1976) em sua patente. O indicador consiste em um reservatório saturado com uma mistura química migrante. Sobreposto ao reservatório se encontra uma trilha, que serve de caminho poroso, através do qual, o indicador (composto químico) pode migrar. Na Figura 3.1 são apresentados dois modelos de TTI Tipo I comercial da empresa 3M[®].

Antes do uso ou ativação, o reservatório se encontra separado da trilha por uma barreira que impede a difusão do composto indicador. Na ativação, por remoção mecânica da barreira, a difusão inicia se caso a temperatura esteja acima do ponto de fusão do composto químico. Alguns ésteres de ácidos graxos e sais são misturados com um corante. Os tipos de compostos químicos usados como

indicador são o estearato de butila (ponto de fusão de 12°C), fitalato de dimetila (-1,1°C) e octanato de octila (-17°C) (TAOUKIS, *et al.*, 1991).

A resposta desse indicador é medida pela distância percorrida pelo composto químico desde a sua origem (Figura 3.1), após a ativação. A difusão da substância pode ser vista através de uma abertura ao longo da etiqueta. Segundo Taoukis (1991) a variação do tipo e concentração do éster empregado como composto indicador, apresenta diferentes pontos de fusão, onde auxiliados pela variação do comprimento da “trilha” geram diferentes níveis de resposta e conseqüentemente valores de energia de ativação diferenciados, podendo este ser modelado e aplicado para monitorar vários tipos de reação de degradação de alimentos. Assim, esse indicador pode ser usado como um CTTI, no caso da temperatura crítica ser igual ao ponto de fusão do composto, ou ainda como um TTI, se a temperatura de fusão for menor do que a faixa de temperatura do alimento estocado.

Taoukis e Labuza (1989a) apresentaram valores da distância da difusão que segue a relação de Arrhenius como uma função da temperatura. Através desse modelo a energia de ativação do dispositivo foi determinada entre 8-12 kcal.mol⁻¹, e assim esse dispositivo se torna adequado para monitorar reações enzimáticas ocorrida em alimentos. Fu *et al.*, demonstraram a aplicação de uma reação de coloração simultânea, ao longo do caminho pelo qual segue a difusão, o que amplia a disponibilidade para serem criados novos dispositivos com maiores energias de ativação acima de 30 kcal.mol⁻¹. Uma primeira e significativa aplicação foi a utilização dos dispositivos pela *World Health Organization* para monitorar a distribuição de vacinas para regiões tropicais.



Figura 3.1. Modelos comerciais de TTI tipo I, baseado em difusão (3M Monitor Mark e Freeze Watch).

3.3.2 Método enzimático (TIPO II)

O indicador enzimático tipo II é baseado em uma mudança de cor causada por um decréscimo do pH resultante de uma reação de hidrólise enzimática de um substrato lipídico. O indicador consiste em dois compartimentos separados na forma de mini reservatórios. Um contém uma solução aquosa da enzima lipolítica, por exemplo, a lipase pancreática, e o outro contém o substrato lípido adsorvido em um suporte de cloreto de polivinila pulverizado, suspenso em uma fase aquosa, com um indicador de pH (Blix *et al*, 1977). Diferentes combinações de enzima-substrato e concentrações podem ser utilizadas, originando uma variedade muito grande na resposta e na dependência térmica. Os substratos mais comuns encontradas na literatura são: glicerina tricaprônica (tricaproína), tripelargonina, bis-3,5,5-trimetil hexalipato (THA), misturas de ésteres de alcoóis polivalentes e ácidos orgânicos.

O indicador é ativado pelo rompimento da barreira que separa os dois compartimentos, onde é necessário exercer uma força mecânica manual, ou utilizando um dispositivo especial, a fim de misturar enzima e o substrato para dar início à reação de hidrólise do triglicerídeo. A hidrólise do substrato (tricaproína) causa a liberação de ácidos graxos (ácido caprónico), que no meio aquoso, ocasiona a queda do pH, traduzido em uma mudança de cor devido a presença de um indicador. Cores como verde, amarelo, laranja e vermelho são impressas ao redor do compartimento de reação a fim de permitir uma comparação visual e medida da mudança de cor. Essa mudança contínua de cor também pode ser medida instrumentalmente por um colorímetro portátil.

O I-Point[®] um TTI enzimático fabricado pela empresa Vitsab (Suíça), tem sua construção, características e princípios, descritos por Blix (1977) em sua patente.

Este tipo de TTI tem uma vida de prateleira de 1,5 anos antes de sua ativação, se mantido a 4°C. Devido à grande variedade de substrato e enzimas que podem ser empregadas na reação, tem-se como resultado que as energias de ativação podem também variar amplamente. Segundo dados da literatura, foram obtidos valores da energia de ativação de 15-35 kcal.mol⁻¹ (Labuza, 1989). De qualquer modo, os indicadores tipo II avaliados comercialmente são geralmente de 25 – 30 kcal.mol⁻¹, o que é muito adequado para monitorar reações de degradação em alimentos, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Energia de ativação das reações de deterioração em alimentos

Reação	Energia de ativação [kcal.mol ⁻¹]
Rancidez oxidativa	10-25
Reações enzimáticas	10-30
Perdas de vitaminas	20-30
Escurecimento não enzimático	25-50
FDA - Patógenos*	45

Fonte: Sewald, 2006.

*FDA – Food and Drug Administration

Na Figura 3.2 um modelo comercial de um biossensor TTI enzimático é apresentado afixado em um produto alimentício.

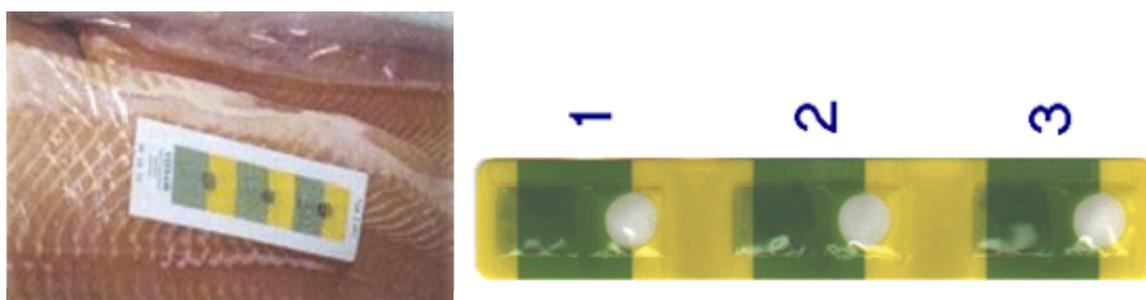


Figura 3.2. Modelo comercial de biossensor TTI Tipo II (Vitsab Inc.)

Segundo a Vitsab (Malmö, Suécia), o TTI CheckPoint[®] I é um dispositivo de baixo custo, com dimensões reduzidas e baixa espessura, que pode ser afixada em qualquer superfície. Sendo sensível ao calor, monitora a exposição a possíveis temperaturas fora do padrão de referência para conservação. A etiqueta necessita ser ativada para iniciar o monitoramento, aplicando uma pressão mecânica sobre ela, o que promove o rompimento da barreira de separação entre os dois compartimentos Figura 3.3.

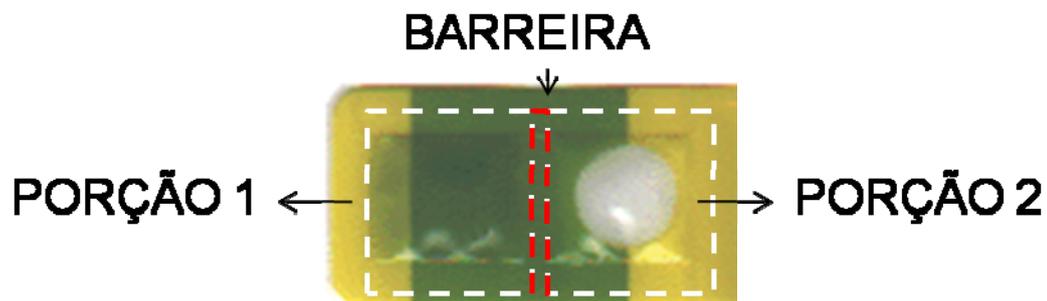


Figura 3.3. TTI comercial CheckPoint I (Vitsab Inc.)

A etiqueta é configurada de tal modo que a cor produzida pela reação é visível na face frontal da mesma. Durante a fase inicial do procedimento de ativação, o TTI fornece uma cor amarela ou laranja-avermelhada no círculo branco (○→●) no momento inicial da abertura interna da barreira entre as porções. Após a mistura dos fluidos forma-se uma coloração verde clara. A figura seguinte demonstra como o mecanismo interno funciona, Figura 3.4.

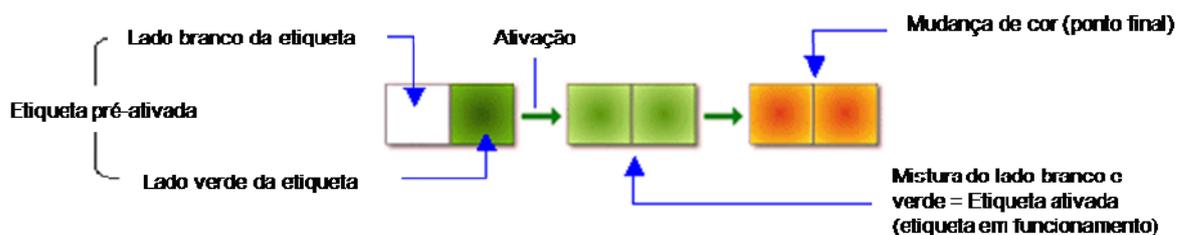


Figura 3.4. Mecanismo de funcionamento do CheckPoint I (Vitsab Inc.)

Ao misturar as soluções, a reação enzimática se inicia a uma taxa condizente com sua temperatura. À medida que há um incremento na temperatura, esse reflete em um aumento na taxa de reação e em uma maior quantidade de produto formado, nesse caso, o ácido graxo, que se traduz por uma alteração da cor do meio em função da alteração no pH da solução. A cor do meio é dependente do pH, essa se altera no decorrer da reação, conforme ocorre o aumento da concentração de ácido graxo, até o equilíbrio (cor laranja). A cor do sistema está em função do tipo de indicador de pH utilizado.

A etiqueta de três pontos (círculos) Figura 3.2 apresenta três pares de compartimentos, onde todos são ativados de uma única vez, pelo mesmo processo.

Os três pontos mudam suas cores ●→● em sucessão, e mostram se a temperatura atingiu limites acima do seguro durante o transporte e/ou subsequente armazenamento. O tempo necessário para que essa mudança de cor ●→● ocorra

depende do tempo e da temperatura. Todos os 3 pontos (círculos) ao final tornam-se laranja-avermelhada. Este é o “final” para a atividade de monitoramento.

O processo de etiquetagem pode ser feito no momento da distribuição, anexando as etiquetas às caixas antes do envio da remessa. A sucessiva mudança de cor nos círculos 1, 2 e 3 é configurada para indicar estágios na vida de prateleira remanescente ou para indicação progressiva relativa à segurança do alimento.

A etiqueta com apenas um círculo de monitoramento (um ponto) da empresa Vitsab Figura 3.3, pode ser usada para indicar uma eminente perda de qualidade do produto alimentício, sendo especialmente útil para embalagens de alimentos.

Desse modo as etiquetas TTI apresentam uma ampla variedade. São moduladas para monitorar diferentes tipos de alimentos, como carnes moídas, hambúrgueres, leite, saladas preparadas entre outros. Dentre essas, existem ainda as destinadas a produtos congelados, com tempo de monitoramento de 1 a 120 dias (VITSAB International, 2006)

Sendo assim, a cinética enzimática, a enzima, e a ação dessas sobre um determinado substrato, necessita ser investigada a fim de se compreender o funcionamento intrínseco do TTI Tipo II.

3.4 ENZIMA

As enzimas são biocatalisadores, proteínas, formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas. A maioria das enzimas sintetizadas por células são retidas para funções intracelulares. As enzimas extracelulares são subseqüentemente secretadas para fora dos limites da membrana celular. Enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Além disto, participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples (ZANOTTO, 2003).

De acordo com Sharma *et al.* (2001) são conhecidas quase 4000 enzimas, e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo que a maioria é de origem microbiana. A demanda mundial de enzimas é satisfeita por 12 produtores principais e por 400 fornecedores menores. Cerca de 60% da fonte total de enzimas industriais são produzidas na Europa. Em torno de 75% de todas as enzimas

industriais (incluindo as lipases) são de ação hidrolítica. Segundo a Novozymes (2005), o mercado mundial de enzimas gira em torno de US\$ 2,4 bilhões, com um crescimento médio anual entre 4 e 5%. A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais, nos quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada.

3.4.1 Lipase

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol (JAEGER, *et al.*, 1994; LEAL, *et al.*, 2000). Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras) (CARVALHO, *et al.*, 2003).

As lipases catalisam a reação de hidrólise de triacilglicerídeos (TG) presentes na interface óleo-água, resultando na formação de diacilglicerídeos (DG), monoacilglicerídeos (MG), ácidos graxos (AG) e glicerol. Entretanto, dependendo das condições reacionais, as lipases podem também catalisar a síntese reversa, ou seja, pode ocorrer a síntese do MG, DG ou TG a partir de ácidos graxos e glicerol (KILARA, 1985).



A maioria das pesquisas sobre lipases está focalizada na caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, cinética, seqüenciamento e clonagem de genes codificantes das lipases e características gerais de sua atividade (SHARMA *et al.*, 2001).

As razões do enorme potencial biotecnológico dessa classe de enzima incluem segundo CASTRO *et al.*, 2004:

- I) sua alta estabilidade em solventes orgânicos;
- II) não requerem a presença de co-fatores;
- III) possuem uma ampla especificidade pelo substrato;
- IV) exibem uma alta enantiosseletividade.

As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiológica (KILARA, 1985). De origem animal, existem as lipases lácteas e lipase pancreática. As de origem vegetal são usualmente extraídas da soja, do centeio e do algodão. As lipases microbianas podem ser produzidas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* (BENZOANA & ESPÓSITO, 1975), pelos fungos filamentosos *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Humicola* e pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Staphylococcus*.

3.4.1.1 Efeito dos sais, pH e temperatura na ação da lipase

Os sais afetam as lipases de diferentes maneiras. O cloreto de sódio até 7 mM aumenta a atividade da lipase pancreática de porco, o que não é observado com a lipase pancreática bovina. Cálcio e sais biliares estimulam a atividade lipolítica, reduzindo o efeito inibitório dos sabões (SHAHANI, 1975). Triantafyllou et al. (1997), demonstraram que a inclusão de sais ou KCl aumentou a atividade catalítica da lipase liofilizada *Candida antarctica* quatro vezes mais que sem a adição de sal e a água desempenhou um papel muito importante na atividade enzimática (TRIANTAFYLLOU et al, 1997).

Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise.

Os sítios ativos nas enzimas são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo, liguem-se aos substratos, ou catalisem a reação. Além disso, os próprios substratos podem conter grupos ionizáveis e somente uma forma iônica deste substrato pode se ligar à enzima ou sofrer catálise.

A estabilidade de uma enzima ao pH depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos (por exemplo, glicerol e compostos sulfidrílicos), concentração de íons metálicos contaminantes, de substratos ou cofatores da enzima e da própria enzima.

A maioria das reações químicas ocorre a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura fornece maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produzidas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas se comportam de modo semelhante. As enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade

catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada, que justapõe os grupamentos R específicos dos aminoácidos, de tal modo a formar sítios estereo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. A estrutura terciária de uma enzima é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas. Em termos práticos, uma molécula de enzima é uma estrutura muito delicada e frágil. Se a molécula absorve energia demais, a estrutura terciária romper-se-á e a enzima ficará desnaturada, isto é, perderá a atividade catalítica. Logo, a medida que a temperatura aumenta, ocorre um esperado crescimento na velocidade da reação resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato, e é compensado pelo aumento da velocidade de desnaturação (GLAZER, *et al.* 1994).

Conseqüentemente, um gráfico da velocidade da reação vs. temperatura, em geral, apresenta um pico algumas vezes chamado de “temperatura ótima”. A “temperatura ótima” depende do tempo escolhido para a realização das medidas. A verdadeira temperatura “ótima” para uma determinação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo pelo menos tão longo quanto o tempo da determinação (BROCK, 1997).

O efeito da temperatura em uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH e a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos freqüentemente protegem a enzima da desnaturação pelo excesso de calor. Enzimas de baixo peso molecular compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes de dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alto peso molecular. Em geral, uma enzima será mais estável ao calor em preparações brutas livres de células que contenham uma alta concentração de outras proteínas, desde que na ausência de proteases (BROCK, 1997).

3.4.1.2 *Especificidade das enzimas lipolíticas*

As enzimas lipolíticas apresentam vários tipos de especificidade em relação ao substrato, os quais têm grande importância quando se objetiva a obtenção de ácidos graxos característicos. Como fator mais significativo, na tecnologia de formação de compostos lipolíticos, Nelson (1977) indica a descoberta e a aplicação de uma variedade de sistemas de lipases, com diferentes especificidades para o tamanho

dos ácidos graxos, tipo de molécula do glicerídeo e condições físicas do substrato. A disponibilidade de enzimas lipolíticas específicas para ácidos graxos de cadeia curta, tornou possível o desenvolvimento de vários produtos com características diferentes, a partir da modificação de gorduras. Várias técnicas e sistemas enzimáticos lipolíticos, para desenvolvimento de produtos de valor agregado têm sido patenteados (ARNOLD *et al*, 1975; KILARA, 1985; NELSON, 1972). A interdependência da forma física do substrato e a especificidade da enzima lipolítica são de extrema importância na escolha do sistema enzimático (KILARA, 1985; NELSON, 1972).

As enzimas lipolíticas podem apresentar diferentes tipos de especificidades, tais como substrato específica, posicional e tipo de ácido graxo.

Essa característica se refere a diferentes taxas de atividade enzimática apresentada por uma mesma lipase sobre triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, contendo ácido graxos de cadeia longa ou curta. A lipase pancreática apresenta maior taxa de hidrólise sobre o triglicerídeo (TG) e a atividade hidrolítica vai decrescendo na ordem dos substratos 1,2 ou 2, 3 diglicerídeo (DG), 1,3 – DG e 1 ou 3 monoglicerídeo (MG) (CONSTANTIN *et al*, 1960; BROCKERHOFF e JENSEN, 1974). O aparecimento de 1,3 DG e 1 ou 3 MG é dado pela migração acil espontânea. A lipase do leite apresenta maior atividade sobre a tributirina do que a trioleína, ao passo que a lipase do *Achromobacter lipolyticum* exibe atividade oposta sobre aqueles substratos (KHAN, 1974). Triglicerídeos contendo ácido butírico foram hidrolisados mais rapidamente do que aqueles com maior peso molecular. Richardson *et al* (1971) afirmam que a lipase gástrica de carneiro hidrolisa mono e di-butirinas mais rapidamente do que a lipase pré-gástrica (oral) do mesmo animal. Outra importante característica da especificidade para substrato está relacionada com sua forma física em solução ou emulsificada.

Algumas lipases hidrolisam preferencialmente ácidos graxos esterificados nos carbonos 1 ou 3 do glicerol, liberando ácidos graxos e 1, 2 ou 2, 3 – DG e 2 – MG. Os 1,2 (2,3) – DG e 1 (3) MG, podem sofrer migração acil espontânea convertendo-se em 1-3-DG e 1(3)-MG, os quais são substrato para as lipases. Assim, incubações em tempos prolongados, podem levar a uma completa hidrólise do TG (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974). A especificidade posicional 1,3 é observada nas lipases produzidas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas*,

Humícola lanuginosa, lipase pancreática e esterase pregástrica (KILARA, 1985, SHAHANI, 1975).

3.5 SUBSTRATO

O substrato hidrolisado pela enzima lipase são triglicerídeos, os quais quimicamente são ésteres carboxílicos derivados de um único álcool, o glicerol. Os triglicerídeos podem apresentar diferentes derivações, dependendo do ácido carboxílico ligado à sua cadeia. As gorduras são constituídas de triglicerídeos derivados de numerosos ácidos graxos, podendo esses ser diferentes entre si.

3.5.1 Tributirina

O substrato oleoso tributirina (Glicerol tributirato), é encontrado na forma líquida, que é insolúvel em água, mas muito solúvel em alcoóis e em éteres. É preparada pela esterificação do glicerol com ácido butírico em excesso (ALDRICH, 2007), sendo composto de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido butírico. Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 3.5, e suas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 3.2.

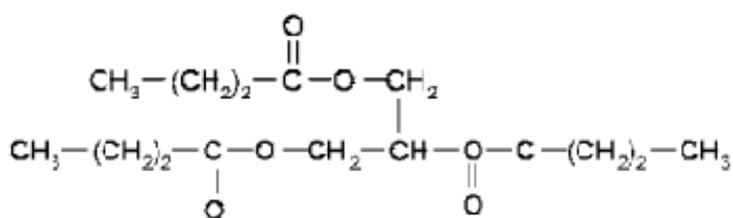


Figura 3.5. Fórmula estrutural da tributirina.

Tabela 3.2. Características físico-químicas da tributirina.

Propriedades físico-químicas da tributirina	
Massa molecular:	302,37
Ponto de fusão:	-75°C (1 atm)
Ponto de ebulição:	307,5°C (1 atm)
Densidade:	1,0350 Kg.L ⁻¹ (20°C)

A tributirina oferece inúmeras vantagens como um substrato para a lipase. É facilmente dispersa sem o uso de detergentes e o produto formado na reação de hidrólise é solúvel em água (RAPP, *et al.*, 1978). Apresenta em sua cadeia 3 ácidos graxos de mesma massa molar ($88 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o ácido butírico ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), onde em solução aquosa se ioniza originando 1 próton (H^+) por molécula.

3.5.2 Efeito da concentração de substrato

Na Figura 3.6 é mostrado um esquema do efeito da concentração de substrato na hidrólise enzimática, onde em (A) a enzima está presente em baixa concentração de substrato, em (B) o substrato está saturado, e em (C) o substrato está em uma alta concentração.

Em baixa concentração de substrato embora haja um número elevado de enzimas presentes no meio, a velocidade com que estas moléculas se encontraram para iniciar a reação será menor, porém a influência de altas temperaturas pode fazer com que esse processo seja acelerado. Quando o substrato satura o meio em relação à enzima, a taxa com que essa reação deve ocorrer será superior quando comparada à uma menor concentração no meio; e por fim, quanto maior for a quantidade de substrato maior a taxa de reação. Existe um limite para a ação da enzima, no qual o aumento do substrato não altera a velocidade da reação (LEHNINGER, 2000).

² (FERRATO, *et al.*, 1997)

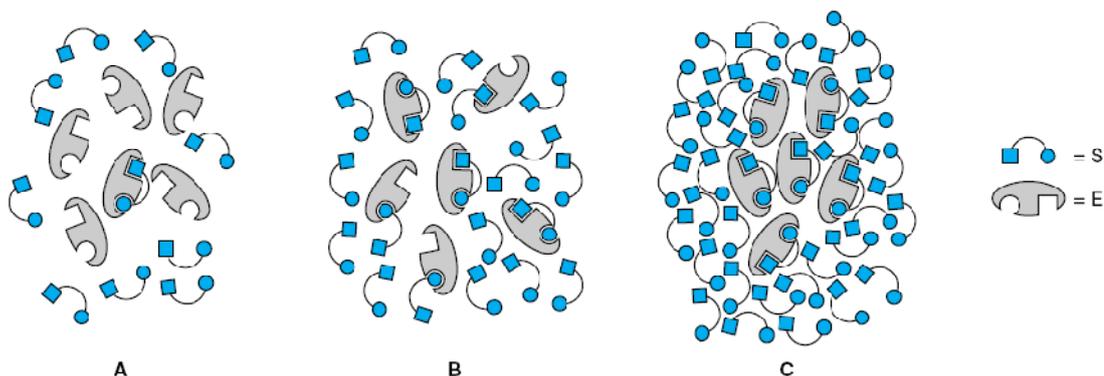


Figura 3.6. Efeito teórico da concentração de substrato em uma mesma concentração enzimática, (A) baixa, (B) saturado e (C) alta.

Fonte: Garret (1999)

Nem todo o substrato se encontra inteiramente disponível à ação enzimática, pois apresentam partes das pontes de ésteres de hidrogênio em fase orgânica, o que dificulta a ação da enzima (GARRETT, 1999).

3.5.3 Substrato adsorvido em suporte sólido

Em reações enzimáticas, nas quais um substrato sofre uma modificação (comumente degradação), ambos, substrato e enzima, estão na forma de uma solução e, em alguns casos de uma suspensão. Muitas vantagens podem advir quando um desses compostos puder ser fornecido sobre um suporte sólido.

Existem aplicações em que o substrato é unido covalentemente ao suporte ou é aplicado livremente sobre ele, podendo ser removido facilmente pela ação da água (ORTH & BRÜMMER, 1972). Alguns autores propõem métodos de preparação do substrato “adsorvido” em um suporte sólido polimérico (BLIXT *et al*, 1977).

A taxa de reação de hidrólise enzimática é fortemente influenciada pela área superficial do triglicerídeo disponível para a atuação da enzima (Sulaiman *et al*, 2002). Sugere-se que a aplicação desse método tem o intuito de disponibilizar o óleo depositado sobre um suporte sólido, com uma área superficial determinada por ele, disponível para a atuação da enzima de forma homogênea e regular, visando melhorar a hidrólise do triglicerídeo pela ação da enzima lipase (BLIXT *et al*, 1977).

3.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TRIGLICERÍDEOS

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando taxas de hidrólise mais elevadas (BALCÃO, *et al.*, 1996). Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras usando lipases como catalisadores (OLIVEIRA, *et al.*, 1999).

A hidrólise do óleo de palma foi investigada para obtenção de mono e diacilgliceróis empregando preparações de lipases de fontes microbiana (*Candida rugosa*), vegetal (gérmen de trigo) e animal (pâncreas de porco). Entre as lipases testadas, as taxas de conversão de hidrólise mais elevadas foram obtidas com a lipase de *Candida rugosa*, com atividade ótima a 37 °C e pH = 7,5 (KHOR, *et al.*, 1986).

Estudos com a hidrólise de sebo e óleos de coco e oliva, utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, foram realizados onde a reação em emulsão foi conduzida em sistemas de frascos agitados, obtendo-se altos valores de conversão (97-99% em 72 h) (LINFIELD, *et al.*, 1984). Em outro trabalho, Linfield *et al.* utilizando os mesmos óleos e lipase de *Candida rugosa*, abordaram a influência do pH, da temperatura, e de aditivos sobre a atividade enzimática, determinando também uma quantidade mínima de enzima necessária para o alcance de taxas de hidrólise superiores a 95% em 72 h.

Foi estudado a hidrólise de óleo de soja com diferentes tipos de lipase por Park *et al.*, tendo como principal objetivo a comparação das atividades dessas enzimas em sistemas isolados e combinados. Após 10 h de reação, verificou-se que os sistemas combinados de lipases microbianas, tais como *Penicillium sp.* e *Rhizopus niveous* ou *Penicillium sp.*, forneceram rendimentos mais elevados (98,0 e 99,5% de hidrólise) que os obtidos em sistemas contendo apenas uma lipase (7,2 e 44,4% de hidrólise) (PARK, *et al.*, 1988).

O uso de solventes no meio reacional também tem sido descrito como um fator responsável no aumento das taxas de hidrólise dos triacilgliceróis. Segundo Mukataka *et al.* 1985, diferentes solventes foram testados no processo de hidrólise de óleos em sistema com emulsão, e o isoctano foi considerado como o mais

adequado (MUKATAKA, *et al.*, 1985). A hidrólise do óleo de oliva catalisada pela lipase de *Candida rugosa*, em um sistema emulsificado apenas por agitação mecânica, apresenta taxas de hidrólise similares às obtidas nos sistemas reacionais contendo emulsificante (Y. J. WANG, 1988).

A hidrólise enzimática em ácidos graxos, a partir de óleos comerciais de alta acidez como o de coco, soja, mostarda, girassol e arroz, foi investigada por Ghosh e Bhattacharyya (GHOSH e BHATTACHARYYA, 1995). Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez, foram hidrolisados por lipase de *Candida rugosa* quase completamente, num período máximo de 48 h. O óleo de coco, com acidez inicial de 69,2% em ácido láurico, foi hidrolisado numa temperatura de 35 °C durante 48 h, atingindo acidez final de 80%.

Considerando que inúmeras variáveis podem estar envolvidas nesse tipo de processo, observa-se uma tendência pelo emprego da metodologia de planejamento estatístico, que possibilita verificar a influência das variáveis e suas interações no rendimento de um determinado processo com grande economia de tempo, material e recursos (GHOSH e BHATTACHARYYA, 1995).

Oliveira *et al.* 1999, analisaram a influência da concentração de lipase e do tempo de reação no desempenho da hidrólise da gordura de babaçu por lipase comercial, empregando a metodologia de superfície de resposta, sendo obtidas taxas de conversão entre 6,52 e 41,44%. O ponto ótimo do processo (maior porcentagem de hidrólise no menor tempo possível), entretanto, não foi alcançado, tendo em vista que o planejamento fatorial proposto não cobriu a faixa correspondente a maiores tempos de reação (OLIVEIRA, GIOIELLI *et al.*, 1999).

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (GANDHI, 1997; PANDEY *et al.*, 1999).

A cinética da hidrólise enzimática da tributirina, usando lipase, foi investigada por (AL-ZUHAIR, 2006), onde a taxa inicial da reação foi determinada experimentalmente sob diferentes concentrações de substrato. O modelo cinético da influência da concentração de substrato de Michaelis-Menten foi proposto para prever a taxa inicial da hidrólise da tributirina em um sistema de micro-emulsão. Os parâmetros cinéticos foram estimados por três métodos: Lineweaver-Burk, Edie-Hofstee e Hanes. O modelo de Michaelis-Menten, com as taxas de reação inicial

preditas pelos modelos de Edie-Hofstee e Hanes, sob várias concentrações de substrato, foi o melhor deles.

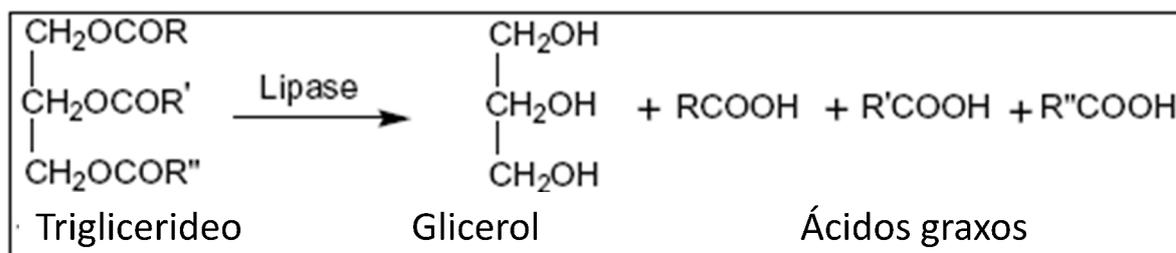
Wu e colaboradores estudaram a hidrólise da tributirina usando a lipase (*Pseudomonas fluorescens* CCRC-17015) imobilizada em PMAA, em sistemas (batelada) líquido-líquido e líquido-sólido-líquido. As condições do sistema como, concentração de tributirina, temperatura, agitação e pH, foram avaliadas para atingir um valor ótimo de reação para enzima imobilizada e livre. Os parâmetros cinéticos na reação obtidos para os dois sistemas (enzima livre e imobilizada), foram de 29 e 5.7 s⁻¹, respectivamente. Os valores experimentais revelaram uma boa estabilidade térmica a altos valores de pH para a enzima imobilizada no sistema líquido-sólido-líquido (WU, *et al.*, 2004).

3.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

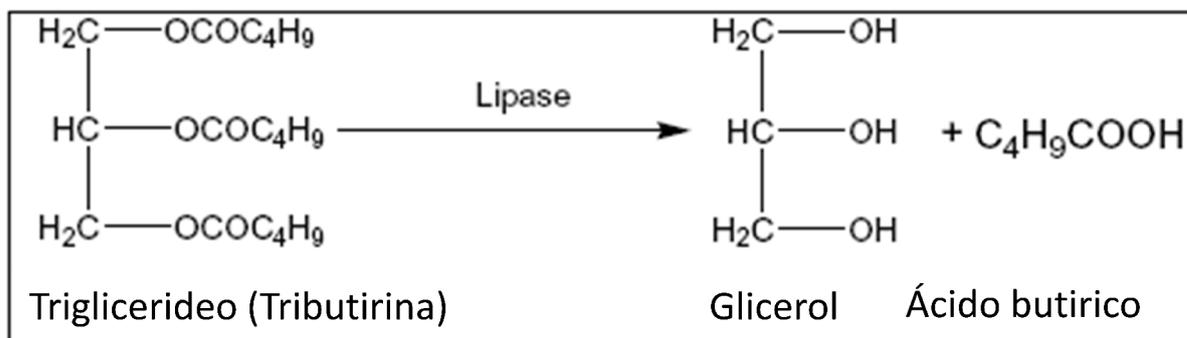
Nessa seção será descrita a fundamentação teórica dos temas utilizados no presente projeto de dissertação. Estes são relacionados à modelagem da reação de hidrólise enzimática da tributirina a ser aplicada para construção de um TTI enzimático.

3.7.1 Princípio da reação envolvida na hidrólise da tributirina

Triglicerídeos são ésteres de glicerol com cadeias de ácidos graxos os quais quando hidrolisados pela enzima lipase fornecem glicerol e ácidos graxos (REDDY, 2003). R, R' e R'' representam três diferentes grupos alquil (RCOOH). A reação base de biocatálise química considerada neste trabalho é a seguinte:



Na tributirina o R, R' e R'' = C₄H₉ é o ácido butírico (C₄H₉COOH) formado na hidrólise como segue o esquema abaixo.



3.7.2 Cinética das reações enzimáticas

A cinética enzimática pode ser entendida como a análise quantitativa do efeito, dos fatores que influenciam a atividade enzimática e sua velocidade de reação. É o estudo das velocidades com que as reações catalisadas por enzimas ocorrem, diferenciando-se das outras reações químicas em inúmeros aspectos.

A cinética enzimática é determinada pela concentração da enzima, cofatores, inibidores (quando presentes), substrato, pH, temperatura e força iônica.

As velocidades de reação são mais elevadas em reações catalisadas por enzimas, e podem ser 10⁶ a 10¹² vezes mais rápidas que uma reação não catalisada e várias ordens de grandeza maiores que uma reação catalisada por um catalisador inorgânico. Estas reações ocorrem em condições relativamente suaves, com temperaturas abaixo de 100°C, pressão atmosférica, e pH próximos da neutralidade, contrariamente, à catálise química que freqüentemente requer temperaturas e pressões elevadas, bem como valores de pH extremos.

As enzimas têm uma especificidade de reação muito maior quanto aos substratos (reagentes) e produtos que os catalisadores químicos. Ou seja, as reações enzimáticas raramente apresentam produtos secundários. Por exemplo, na síntese enzimática de proteínas que ocorre nos ribossomos sintetizam-se, sem erros, polipeptídios muito maiores que 1000 unidades de aminoácidos. Por outro lado, na síntese química de polipeptídios ocorrem reações secundárias e incompletas, o que limita o comprimento das cadeias polipeptídicas que podem ser

produzidas por este método a comprimentos de cerca de 100 aminoácidos, com erros suficientes para diminuir o rendimento.

As atividades catalíticas de muitas enzimas variam em resposta às concentrações dos diferentes substratos. Os mecanismos destes processos de regulação incluem o controle alostérico, a modificação covalente das enzimas e a variação nas quantidades de enzima sintetizada.

Vários mecanismos cinéticos de catálise da lipase em sistema de emulsão óleo/ água têm sido propostos; eles relacionam a atividade da lipase tanto em medidas interfaciais qualitativa (área interfacial por unidade de volume) como quantitativa (características físico-químicas da interface).

O caso mais simples é aquele em que um substrato (S) é transformado em produtos (P), (Q), etc., em uma reação catalisada por uma enzima (E); é onde a concentração do substrato ou um dos produtos varia com o tempo a partir do instante em que a reação teve início. Essas medidas conduzirão a curvas semelhantes às representadas na Figura 3.7. Essas curvas mostram que a velocidade de consumo de substrato ou de formação de produto, variam com o tempo, por que variam as condições em que o sistema se encontra (BORZANI, *et al.*, 1975). A rigor, o único instante em que são conhecidas as condições experimentais é o instante inicial. Por esse motivo a velocidade da reação enzimática deve ser calculada sempre que possível no instante zero.

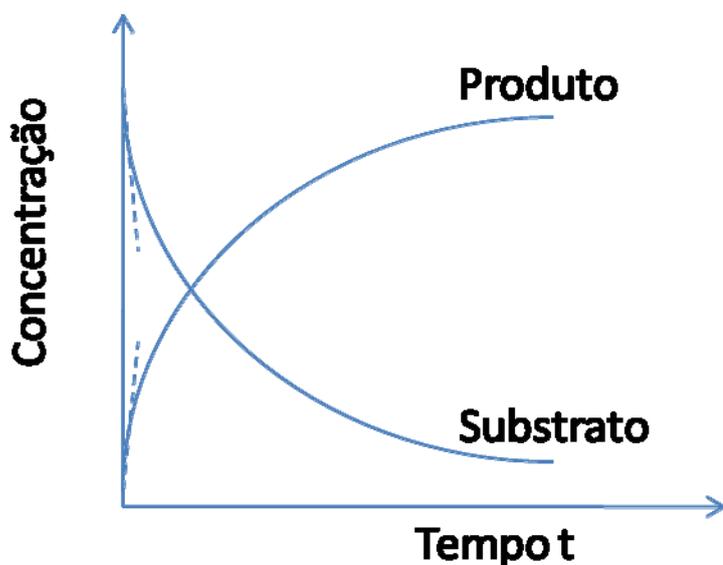


Figura 3.7. Representação esquemática das variações das concentrações de substrato e de produto durante uma reação enzimática. Medida de velocidades iniciais.

3.7.3 Taxa da reação

A taxa de reação para reações reversíveis quase sempre depende da concentração dos reagentes e dos produtos. A relação entre a taxa da reação e a concentração dos componentes no sistema, comumente a uma temperatura, pressão e outras condições do ambiente constante, é chamada de taxa de reação. A interpretação dos dados cinéticos é comumente baseada na Lei da conservação das massas. Em soluções diluídas, a taxa de uma reação é proporcional à concentração dos reagentes elevado à potência de seus coeficientes estequiométricos, e independentes de outras concentrações e reações. Assim a reação é:



Sua equação da taxa, de acordo com a Lei da conservação das massas, será:

$$v = kc_A^a c_B^b \quad (2)$$

A constante de proporcionalidade k é chamada de *constante da taxa de reação* (ou taxa específica). A constante k é independente da concentração de A, B..., mas pode depender de fatores do sistema, tais como a temperatura e o tipo de solvente, e sua grandeza depende da reação em particular que está sendo estudada. A potência a é chamada de ordem da reação com referência ao reagente A, e b é a ordem com referência a B, sendo a soma ($a + b$) a ordem da reação. A unidade da taxa de reação depende da ordem da mesma (CONNORS, 1990)

3.7.4 Dependência da taxa da reação com a temperatura

As taxas da maioria das reações são sensíveis à temperatura, e o entendimento do fundamento molecular dessa dependência é um objetivo fundamental na investigação teórica da cinética da reação. A taxa da reação pode ser relacionada com a temperatura, pela Equação (3), conhecida como equação de Arrhenius.

$$k = -Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (3)$$

Onde R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal. mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ou $8,314472 \text{ J. mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta. A equação contém dois parâmetros: A , chamado de fator pré-exponencial e E_a , a energia de ativação

experimental. As reações em soluções apresentam comumente valores de E_a em uma faixa entre $10 - 30 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Esses valores correspondem grosseiramente ao princípio básico de que a taxa da reação aumenta de um fator de 2 a 3 para cada 10°C no aumento da temperatura (CONNORS, 1990).

3.7.5 Ordem da reação

A taxa de reação é o número em unidades de massa de um reagente que é transformado em produto por unidade de tempo e por unidade de volume de um sistema. A taxa de uma reação homogênea fechada, isto é, sem perda ou ganho de material durante a reação, é determinada pela composição da mistura, temperatura e pressão.

Reação de ordem zero:

Considera-se uma reação como sendo de ordem zero quando

$$-\frac{dc}{dt} = k \quad (4)$$

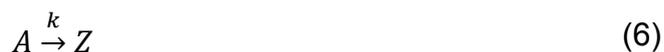
Integrando os limites de $c = c_0$ quando $t = 0$ e $c = c$ no tempo $t = t$ tem-se a equação integrada da taxa de ordem zero.

$$c = c^0 - kt \quad (5)$$

Assim a equação de ordem zero apresenta um gráfico linear de $c \times t$ sendo a declividade igual a k . A unidade da constante da taxa de reação de uma equação de ordem zero é ($M s^{-1}$).

Reação de primeira ordem:

A Equação (6) é a equação estequiométrica para uma reação de primeira ordem elementar, e a Equação (7) é a equação diferencial da taxa correspondente.



$$-\frac{dc_A}{dt} = -k_{c_A} \quad (7)$$

Separando as variáveis e integrando entre os limites C_A^0 e C_A tem-se formas equivalentes das equações das taxas de primeira ordem, Equações (8),(9) e (10).

$$\int_{c_A^0}^{c_A} \frac{dc_A}{c_A} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{c_A}{c_A^0} = -kt \quad (8)$$

$$\log \frac{c_A}{c_A^0} = -\frac{kt}{2,303} \quad (9)$$

$$c_A = c_A^0 e^{-kt} \quad (10)$$

Para a equação de primeira ordem, o gráfico de $\ln c_A \times t$ é linear, e a constante da taxa de reação de primeira ordem pode ser obtida a partir da declividade. A constante da taxa de primeira ordem tem sua unidade no valor de tempo, comumente em segundos⁻¹.

Reação de segunda ordem:

Para uma reação onde,



a equação diferencial da taxa é,

$$-\frac{dc_A}{dt} = kc_A^2 \quad (12)$$

O coeficiente estequiométrico 2 é comumente omitido da expressão, devido a existir apenas uma espécie de reagente. Separando as variáveis e integrando entre os limites, teremos (Equação 13).

$$\frac{1}{c_A} = \frac{1}{c_A^0} + kt \quad (13)$$

Então, para uma reação de segunda ordem, um gráfico de $1/c_A \times t$ é linear com declividade k . A unidade da constante da taxa desse tipo de reação de segunda ordem é expressa em litro por mol segundo ($M^{-1}s^{-1}$).

A Tabela 3.3 mostra um resumo das ordens de reação e suas respectivas expressões matemáticas e unidades.

Tabela 3.3. Parâmetros das reações

	<i>Ordem zero</i>	<i>Primeira ordem</i>	<i>Segunda ordem</i>
Lei da velocidade	$-\frac{d[A]}{dt} = k$	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$	$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$

Lei da velocidade integrada	$[A] = [A]_0 - kt$	$[A] = [A]_0 e^{-kt}$	$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$
Unidade da constante de velocidade k	$\frac{M}{s}$	$\frac{1}{s}$	$\frac{1}{M \cdot s}$
Construção do gráfico linear para determinar k	$[A] \text{ vs. } t$	$\ln([A]) \text{ vs. } t$	$\frac{1}{[A]} \text{ vs. } t$
Meia-vida	$t_{\frac{1}{2}} = \frac{[A]_0}{2k}$	$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k}$	$t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{[A]_0 k}$

3.7.6 Aplicação dos indicadores de tempo-temperatura, TTI

O princípio básico de aplicação de um TTI para o monitoramento da qualidade foi detalhado por Taoukis e Labuza (1989a,1989b,1997). Tal princípio foi introduzido para permitir a correlação da resposta X de um TTI a um índice de qualidade A do alimento X pode expresso como uma função do tempo:

$$F(X) = kt = k_1 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) t \quad (14)$$

Onde $F(X)$ é a função resposta de um TTI, t é o tempo e k é a taxa constante da resposta; a constante k_1 e a energia de ativação E_a , são parâmetros da equação de Arrhenius, onde T é a temperatura absoluta. Para uma distribuição de temperatura variável, $T(t)$, a função resposta pode ser expressa como:

$$F(X)_t = \int_0^t k dt = k_1 \int_0^t \exp\left(-\frac{E_a}{RT(t)}\right) dt \quad (15)$$

Definindo como temperatura efetiva, T_{ef} , a temperatura constante que causa a mesma resposta ou mudança como a temperatura variável $T(t)$, onde temos:

$$F(X) = k_1 \exp\left(-\frac{E_a}{RT_{ef}}\right) t \quad (16)$$

Analogamente, a mudança da qualidade, A , do alimento também pode ser modelada. Definindo a função qualidade $f(A)$ tal que $f(A) = kt$ (a forma de $f(A)$ depende da ordem da reação, no caso de primeira ordem seria $f(A) = \ln\left(\frac{A_0}{A_t}\right)$) e usando os parâmetros de Arrhenius k_A e E_a para o alimento, as Equações (14) e

(15) podem ser aplicadas para $f(A)$. Para um TTI seguir a mesma distribuição de temperatura, $T(t)$ como a do alimento monitorado, o valor de $F(X)$, deve ser conhecido através da resposta X ; e a T_{ef} pode ser calculada da Equação (16). A T_{ef} e o conhecimento dos parâmetros cinéticos da deterioração do alimento permitem a avaliação da $f(A)$ e assim, a perda de qualidade do produto. Esta aproximação sistemática é mostrada na Figura 3.8.

$$\begin{array}{c}
 X_t \Rightarrow f(X)_t \xrightarrow{\text{Eq. para o TTI}} T_{ef} \\
 T_{ef} \xrightarrow{\text{Eq. para o Alimento}} f(A)_t \Rightarrow A_t
 \end{array}$$

Figura 3.8. Aproximação sistemática para aplicação do TTI como um monitor da qualidade do alimento.

Segundo Labuza, (1989b) esse esquema foi aplicado a TTI comercial enzimático tipo II, o qual é baseado na mudança de cor, causada pela redução do pH devido a uma hidrólise enzimática controlada de um substrato lipídico. A mudança da cor foi mensurada e os valores a^* (medida do vermelho) do sistema L,a,b da escala de Hunter foi usado, fornecendo valores de 0 a 40, onde X foi definido como $X = a/40$.

3.7.7 Indicador Universal e Cor

O indicador universal é obtido pela mistura de indicadores de pH, de modo a obter viragens de cor sobre uma parte considerável da faixa de pH. No entanto, a mudança de coloração é gradual e a determinação do pH de viragem de cor não é precisa (VOGEL, 1992).

A cor é um fenômeno óptico provocado pela ação de um feixe de fótons sobre células especializadas da retina, e que transmitem através de informação pré-processada no nervo óptico, impressões para o sistema nervoso.

A cor de um material é determinada pelas médias de frequência dos pacotes de onda que as suas moléculas constituintes refletem. Um objeto terá determinada cor se não absorver justamente os raios correspondentes à frequência daquela cor.

A representação de uma cor pode ser feita de acordo com diversos sistemas escolhidos de maneira a atender às peculiaridades de cada aplicação. Representar

cores em um determinado sistema significa reduzir o espaço espectral de cor para um sistema de coordenadas de dimensão finita (GOMES & VELHO, 1994).

O sistema CIELab (CIE 1976) descreve as cores baseadas na teoria oponente da visão de cor, que diz que as cores não podem ser percebidas ao mesmo tempo, como o vermelho e o verde, ou amarelo e azul. Entretanto as cores podem ser percebidas como combinações de vermelho e amarelo, vermelho e azul, verde e amarelo, e verde e azul.

As coordenadas retangulares do espaço de cor CIELab são dadas por:

- a) L^* : luminosidade de um objeto, que varia do 0 (para o preto) até 100 (para o branco);
- b) a^* : medida do vermelho (a^* positivo) ou do verde (a^* negativo);
- c) b^* : medida do amarelo (b^* positivo) ou do azul (b^* negativo).

Por meio destas três coordenadas, pode-se posicionar uma cor no espaço. Ao se obter os valores L^* , a^* e b^* de um padrão e L^* , a^* e b^* de uma amostra, é possível calcular as diferenças entre um padrão e a amostra em cada coordenada, e também uma diferença total de cor, ΔE^* , dada através da Equação 17.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*{}^2 + \Delta a^*{}^2 + \Delta b^*{}^2)} \quad (17)$$

Onde $\Delta L^* = L^*_{amostra} - L^*_{padrão}$; $\Delta a^* = a^*_{amostra} - a^*_{padrão}$ e $\Delta b^* = b^*_{amostra} - b^*_{padrão}$.

Estas coordenadas podem ser simétricas, com mesmos valores no sentido positivo ou negativo, ou então assimétrico, quando podem ser permitidas variações para determinada cor. Na Figura 3.9 são apresentadas as coordenadas do sistema CIELab.

Outra forma de caracterizarmos uma cor e através do espaço de coordenadas polares L^* , C, H onde temos a coordenada Luminosidade (L^*), que é exatamente a mesma do espaço L^* , a^* , b^* , a coordenada do C que é definida como sendo a Saturação e o H, que é o ângulo total dentro do espaço L^* , C, H. As expressões 13 e 14 são utilizadas para calcular C e H a partir de a, b (LINDBLOOM, 2007).

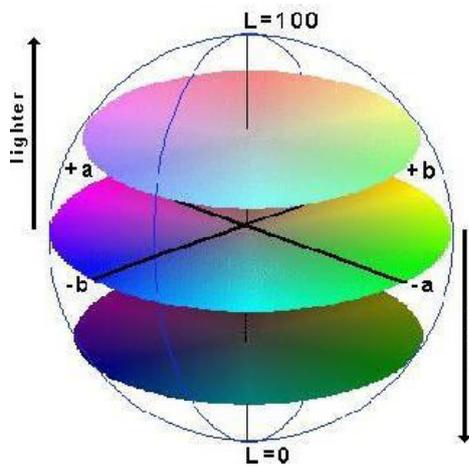


Figura 3.9. Coordenadas do sistema CIE Lab.

A tonalidade, H, que corresponde ao comprimento de onda predominante, é o atributo da percepção visual onde uma cor é percebida como vermelho, amarelo etc. Os brancos, pretos e cinzas não possuem tonalidade e saturação. A luminosidade, L^* , por sua vez, está relacionada à intensidade da energia eletromagnética. É o atributo da percepção visual onde uma área parece emitir mais ou menos luz. A saturação C, depende das proporções ocupadas por cada comprimento de onda na radiação eletromagnética, é o atributo que indica o grau de pureza da cor (quanto maior o grau mais saturado ou vívido é a cor). O olho humano é capaz de detectar tanto variações de tonalidade, como de luminosidade e saturação (MELCHIADES e BOSHI, 1999).

O Índice de cor pode ser definido como uma diferença entre as magnitudes medidas em duas bandas fotométricas, e é dado pela Equação 18:

$$IC = \frac{2000a^*}{L\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}} \quad (18)$$

Existem diversos equipamentos e métodos de medição utilizados na colorimetria, que são escolhidos em função da sua aplicação. Estes equipamentos permitem que sejam medidas as informações de cor de um objeto ou fonte de iluminação sem necessidade da presença de um observador humano. Dentre os mais utilizados temos:

a) Espectrofotômetros: medem os valores da radiação refletida por um objeto colorido por faixas de comprimento de onda ao longo do espectro visível da luz. Para cada faixa selecionada, os valores da radiação da luz refletida são divididos pelos valores da radiação da iluminação utilizada, que possui características conhecidas.

Em seguida, os valores de tristimulus e as coordenadas de cromaticidade são calculados por funções de ajuste de cor;

b) Colorímetros: se baseiam no ajuste de cor. Nestes sistemas, parte do campo é ocupada pelo objeto a ser medido e parte é formada por uma superfície branca. O objeto a ser medido é iluminado por uma fonte de luz branca com características bem conhecidas e a superfície branca, por três fontes de iluminação (tipicamente R, G e B). A luminância destas três fontes é regulada, até que se obtenha um bom ajuste entre a referência e o objeto a ser medido. A utilização deste tipo de dispositivo não é simples e exige habilidade e experiência por parte do operador;

c) “Fotocolorímetros Tristimulus”: utilizam três diferentes filtros de cor e funcionam de maneira similar ao modelo de percepção de cor pelo olho humano (MALACARA, 2002).

d) Métodos digitais: associam câmeras Cybershot e softwares apropriados, que transformam a imagem digital em parâmetro de cor.

O uso de equipamentos para representar as cores é muito importante devido à dificuldade em estabelecer um padrão de cor para referência, pois o nosso sistema sensorial faz emergir todo um contínuo muito vasto de cores com as diferenças de tonalidades que nós aprendemos a categorizar.

Um estudo sistemático de variação da cor em função do pH e temperatura, associada à elaboração de uma referência fixa de cor a ser aplicada em TTI's enzimático foi feito por Deboni (2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo estão apresentados os materiais e os métodos utilizados nos procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos nos Laboratórios de Processamento de Alimentos (PROALI), Sistemas Porosos (LASIPO) e Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 MATERIAL

Os materiais utilizados na fase experimental estão aqui descritos, sendo classificados como Matérias-Primas e Reagentes, e Equipamentos.

4.2.1 Matérias-Primas e Reagentes

a) Enzimas:

Foram utilizadas preparações enzimáticas comerciais de origem microbiana fornecidas pela Novozymes Brasil, PR:

- Lipase (Lecitase Ultra) com atividade declarada de 10 KLU/g, organismo de produção *Aspergillus oryzae*, organismo doador *Thermomyces lanuginosus*.
- Lipase (Lipozyme TL 100 L) com atividade declarada de 100 KLU/g organismo de produção *Aspergillus oryzae*, organismo doador *Thermomyces lanuginosus*.

b) Reagentes:

Os reagentes em grau analítico utilizados nos ensaios experimentais, e seus respectivos fabricantes, estão listados abaixo:

- 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS, $C_4H_{11}NO_3$), Nuclear;
- Ácido clorídrico (HCl), Nuclear, P.A;
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), Nuclear, 80%;
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), Nuclear, P.A;
- Água destilada;

- Albumina de soro bovino (BSA), Merck;
- Azul Brilhante de Comassie G-250, Vetec;
- Clorofórmio, Nuclear, P.A;
- Etanol 95%, Vetec;
- Goma Gelana, CPKelco;
- Indicador Universal de pH;
- Filme de parafina, Parafilm, US;
- Surfactante não iônico Triton X-305, Dow Chemical Company;
- Surfactante não iônico Tween 80 (Polietileno glicol Sorbitano monoolerato);
- Tributirina, grau de pureza >98%, fabricado por Fluka e ScienceLab, US;
- Vanilina, Vetec;

c) Suportes sólidos poliméricos:

- Cloreto de polivinila (PVC – S-367 NK), Solvay Chemicals, Brasil, tamanho médio de partícula: 60-100 μm , densidade: $1,33 \pm 0,04 \text{ g.cm}^{-3}$, área superficial específica: $1,6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$;
- Poliestireno de alta densidade (PEAD - GD 4960), Ipiranga Petroquímica, tamanho médio de partícula: 1190-70 μm , densidade: $0,962 \pm 0,003 \text{ g.cm}^{-3}$, área superficial específica: $0,6-1,0 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$;
- Poliestireno de alta densidade (PEAD - GF 4456), Ipiranga Petroquímica, tamanho médio de partícula: 1190-80 μm , densidade: $0,956 \pm 0,003 \text{ g.cm}^{-3}$, área superficial específica: $0,6-1,0 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$;

Todas as soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas e normalizadas segundo procedimentos descritos em bibliografia e segundo Morita e Assumpção (1995).

4.2.2 Equipamentos

- Termômetro
- Evaporador rotativo (Rotovapor Fisatom, modelo 804);
- Bomba de vácuo de jato d'água (Fisatom, modelo 830);
- Banho Termostático com agitação (Shaker Dist modelo 940)
- Balança eletrônica de precisão analítica $\pm 0,0001$ (Biorad, modelo 200);
- Espectrofotômetro Genesys 10-VIS (Thermo Scientific);
- Cubeta de vidro (5 mL);

- Pipetador automático;
- Seladora térmica manual;
- Agitador magnético (Micro Turret, mod. 102);
- Vortex (Biomixer, QL 901);
- pHmetro Digital Microprocessado Analion AN-2000 com as especificações: resolução $\pm 0,001$ (0,000 – 14,000); com eletrodo combinado de pH de corpo de vidro, sistema referencial Ag/AgCl (Prata/Cloreto de Prata), faixa de pH 0-14, faixa de temperatura 0-120°C, blindado, com junção cerâmica anular (periférica), cristais de KCl em excesso, gel interno selado, bulbo semi-esférico reforçado, cabo e conector BNC, e um termo compensador PT 100 para compensação automática da temperatura de corpo de vidro e faixa de atuação entre -10 a 120°C.
- Incubadora B.O.D com controle digital de temperatura Fullgauge, resolução $\pm 0,1^\circ\text{C}$ (0 – 40°C)
- Célula de vidro com tampa de teflon com furações destinadas ao eletrodo de pH e ao sensor de temperatura, e entrada e saída de ar/gás. A Figura 4.1 mostra um esquema da célula construída para o desenvolvimento de ensaios de hidrólise enzimática com suas respectivas dimensões.
- Câmera Digital Samsung Slim 5.1 Mpixel.

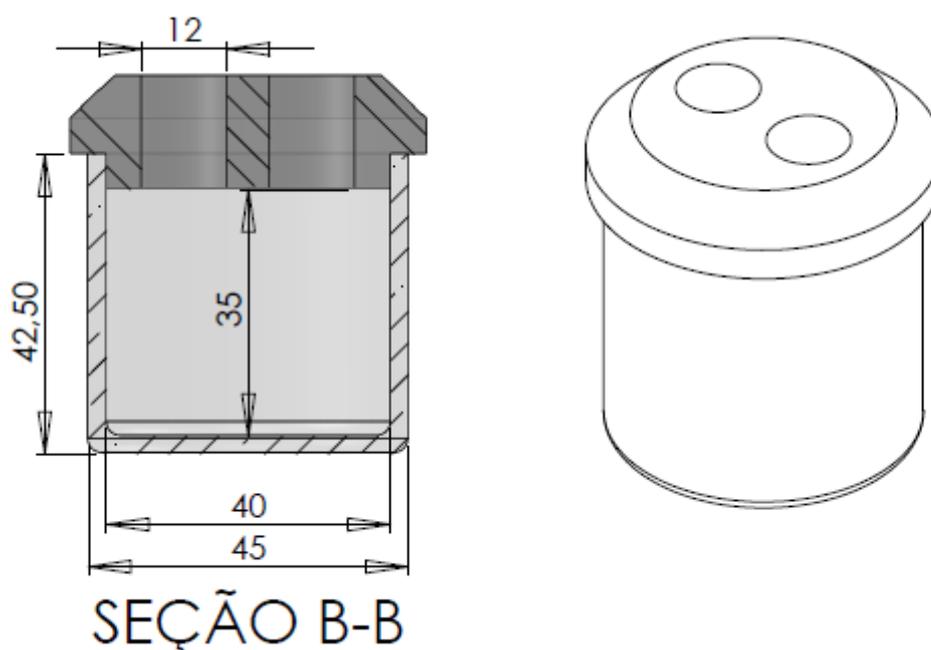


Figura 4.1 Célula utilizada na reação enzimática de hidrólise da tributirina.

4.3 MÉTODOS

A metodologia experimental da reação de hidrólise enzimática da tributirina, aderência de óleo em suporte sólido, ajustes cinéticos da reação, modelagem, ensaios de cor, montagem e teste de protótipo de um TTI Tipo II são aqui mostrados.

4.3.1 Avaliação da cinética e energia de ativação da hidrólise enzimática da tributirina

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com Lipozyme TL 100 L, sob temperatura constante, em uma estufa B.O.D, na faixa entre 2 – 40°C. Estes testes foram realizados em batelada utilizando a célula de reação previamente apresentada. Os ensaios foram desenvolvidos na ausência de agitação, visando simular a reação que ocorre em biossensores comerciais.

Foram utilizadas as enzimas lipase de origem microbiana, fornecidas pela Novozymes, Lecitase Ultra e Lipozyme TL 100 L, previamente diluídas à concentração do ensaio em solução tampão TRIS-HCl 0,025M. Na célula de reação foram adicionados 24 mL da solução tampão TRIS-HCl 0,025M pH 9,5 (TRIS pKa = 8,5). A mistura foi agitada vigorosamente na célula de reação tampada;

simultaneamente os sensores de pH e temperatura foram fixados, e o sistema foi colocado em estufa B.O.D a temperaturas pré-estabelecidas. Depois de alcançado o equilíbrio térmico, foi adicionado 1 mL da solução enzimática previamente preparada na concentração do tratamento; a solução foi novamente agitada para completa homogeneização dos compostos, procedendo-se à aquisição da variação do pH e da temperatura da solução a intervalos pré-estabelecidos, até que o equilíbrio fosse atingido. As cinéticas de hidrólise enzimática foram avaliadas a temperaturas de 2, 10, 15 e 25°C. As concentrações enzimáticas (E) dos ensaios foram de 0,3 - 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,03 - 5 LU.mL^{-1}) e de substrato (S) de 8 - 100 mg.mL^{-1} , respectivamente. As faixas de concentração de E e S estudadas variaram de ensaio para ensaio, sendo a mesma especificada pelo planejamento experimental descrito a seguir. O tempo necessário para que o equilíbrio do pH fosse atingido variou entre 12 e 36 horas, e os intervalos de coleta de dados variaram de 60 a 300 segundos, dependendo do ensaio.

Um planejamento experimental fatorial composto central, com três repetições no ponto central, foi realizado para cada uma das 4 temperaturas. Os fatores estudados foram as concentrações de E e S, cujas codificações são mostradas na Tabela 4.1. A resposta dos planejamentos para cada temperatura foi a constante da taxa de hidrólise da tributirina k, calculada de acordo com o item 4.3.2. Assim, para cada um dos ensaios, foram obtidas 4 constantes da taxa de hidrólise: $k_{2^{\circ}\text{C}}$, $k_{10^{\circ}\text{C}}$, $k_{15^{\circ}\text{C}}$ e $k_{25^{\circ}\text{C}}$, como mostra a Tabela 4.2.

A E_a foi calculada pela equação de Arrhenius (item 4.3.2), associando-se os valores de k nas 4 temperaturas para cada ensaio do planejamento experimental e foi possível obter o efeito das concentrações de enzima e substrato na E_a (Tabela 4.2).

Os resultados foram analisados estatisticamente com a análise da variância (ANOVA) a um nível de significância de 95%.

Tabela 4.1 Fatores e níveis do planejamento experimental

Fator\nível	- α (alpha)	-1	0	+1	+ α (alpha)
[S] (mg.mL^{-1})	8	23	55	86	100
[E] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,3	7,6	25	43	50

Tabela 4.2 Planejamento experimental composto central

Ensaio	T	[E]	[S]	k	E_a
1	2°C	-1	-1	k _{1,2°C}	E_{a1}
	10°C			k _{1,10°C}	
	15°C			k _{1,15°C}	
	25°C			k _{1,25°C}	
2	2°C	-1	1	k _{2,2°C}	E_{a2}
	10°C			k _{2,10°C}	
	15°C			k _{2,15°C}	
	25°C			k _{2,25°C}	
3	2°C	1	-1	k _{3,2°C}	E_{a3}
	10°C			k _{3,10°C}	
	15°C			k _{3,15°C}	
	25°C			k _{3,25°C}	
4	2°C	1	1	k _{4,2°C}	E_{a4}
	10°C			k _{4,10°C}	
	15°C			k _{4,15°C}	
	25°C			k _{4,25°C}	
5	2°C	-α	0	k _{5,2°C}	E_{a5}
	10°C			k _{5,10°C}	
	15°C			k _{5,15°C}	
	25°C			k _{5,25°C}	
6	2°C	+α	0	k _{6,2°C}	E_{a6}
	10°C			k _{6,10°C}	
	15°C			k _{6,15°C}	
	25°C			k _{6,25°C}	
7	2°C	0	-α	k _{7,2°C}	E_{a7}
	10°C			k _{7,10°C}	
	15°C			k _{7,15°C}	
	25°C			k _{7,25°C}	
8	2°C	0	+α	k _{8,2°C}	E_{a8}
	10°C			k _{8,10°C}	
	15°C			k _{8,15°C}	
	25°C			k _{8,25°C}	
9	2°C	0	0	k _{9,2°C}	E_{a9}
	10°C			k _{9,10°C}	
	15°C			k _{9,15°C}	
	25°C			k _{9,25°C}	

10	2°C			k_{10,2°C}	E_{a10}
	10°C	0	0	k_{10,10°C}	
	15°C			k_{10,15°C}	
	25°C			k_{10,25°C}	
11	2°C			k_{11,2°C}	E_{a11}
	10°C	0	0	k_{11,10°C}	
	15°C			k_{11,15°C}	
	25°C			k_{11,25°C}	

4.3.2 Modelagem da cinética de degradação e da energia de ativação do sistema de hidrólise da tributirina livre

As curvas de variação do pH, em função do tempo, devido à hidrólise enzimática da tributirina, foram ajustadas nas cinéticas de ordem zero, 1ª e 2ª ordem para cada um dos ensaios realizados, de modo a observar o melhor ajuste (Equações 19 a 21).

Ordem zero:

$$pH = pH_0 - k \cdot t \quad (19)$$

Primeira ordem:

$$pH = (pH_0 - pH_f) \cdot e^{-k \cdot t} + pH_f \quad (20)$$

Segunda ordem:

$$pH = \frac{1}{1 + pH_0 \cdot k \cdot t} \quad (21)$$

Onde k é a constante da taxa de reação a ser obtida, t é o tempo, pH_0 é o pH em $t = 0$, e o pH_f é o pH no final da reação. Cada cinética apresenta um comportamento característico em função da composição do meio e da temperatura. Os ajustes foram efetuados em todas as reações para cada tratamento.

4.3.3 Estudo da mudança da cor no meio reacional

Os biossensores TTI enzimáticos comerciais mostram a validade do produto que monitoram através de uma cor de referência, conforme descrito no capítulo 3.

Para avaliar o sistema reacional em função da mudança de cor, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática com o Indicador Universal de pH. Esse

indicador de pH tem a característica de apresentar diferentes colorações em função do pH ao qual está submetido. Sendo um indicador composto, a mudança de cor do meio em que este indicador está presente varia do azul para o verde, amarelo e laranja, nesta ordem, quando o meio passa do alcalino ao ácido.

Os testes de mudança de cor nas reações de hidrólise, quantificaram-na em soluções aquosas de pH conhecido. Estes testes também foram feitos no indicador universal de pH em meio aquoso, para que fossem determinadas as referências de mudança de cor, a fim de serem comparadas às reações.

A determinação dos parâmetros das cores foi feita através de imagens obtidas por fotografia digital com o uso de uma câmera digital Samsung Slim 5.1 MegaPixel, com modo de operação manual, velocidade do obturador 1/90 e abertura do diafragma f/3.6, em ambiente de luminosidade controlada, como mostra o esquema na Figura 4.2.

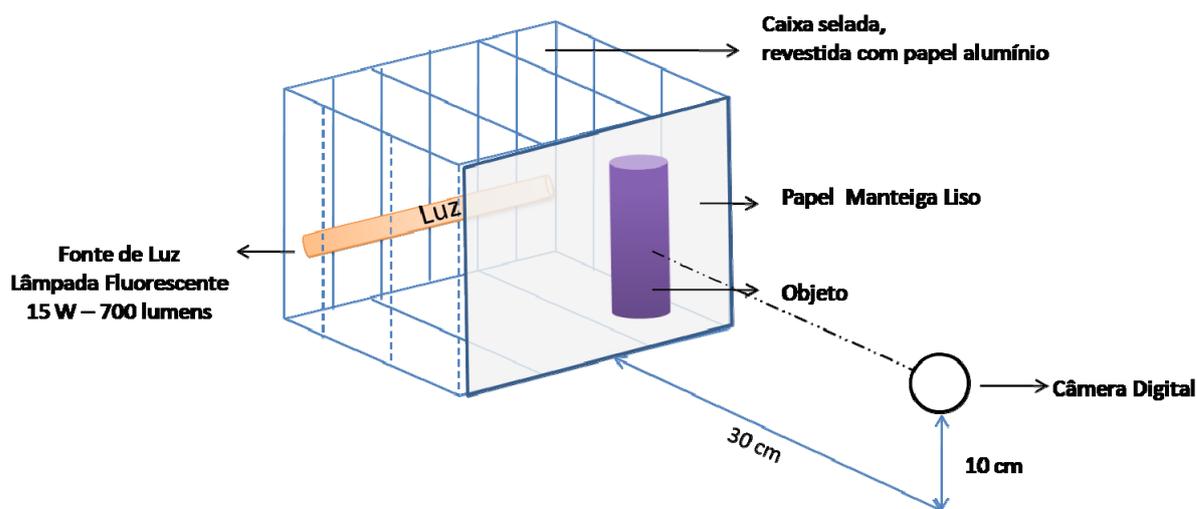


Figura 4.2 Esquema de aquisição de imagem digital.

Após a aquisição das imagens em RGB (Red Green Blue) as mesmas foram processadas via software, onde foi determinada a intensidade média de cada cor no sistema RGB, pixel a pixel, de cada uma das imagens. Estes parâmetros foram convertidos em sistema de cor CIELab e CIECH.

4.3.3.1 Elaboração da referência de cor

Foram preparadas soluções com diferentes valores de pH em presença do indicador universal para a representação das cores. Estas soluções foram mantidas em temperatura de 25°C, fotografadas (Figura 4.2) e processadas para a obtenção dos parâmetros de cor referente a cada valor de pH. Os parâmetros pH, cor RGB, e L*, a*, b*, C e H obtidos por essa metodologia foram considerados como padrão. O esquema do método de obtenção dos parâmetros é mostrado na Figura 4.3.

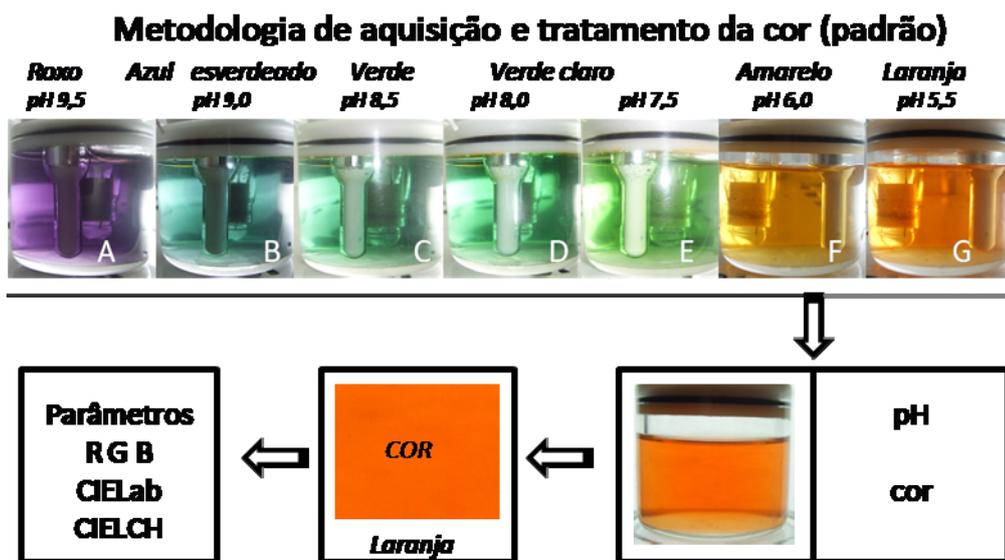


Figura 4.3 Metodologia de aquisição dos parâmetros de cor padrão.

4.3.3.2 Teste de mudança de cor

O grau de alteração da coloração com o tempo, de um sistema reacional em batelada, foi avaliado para uma formulação contendo: enzima (Lipozyme TL 100; 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), substrato (Tributirina; 8 mg.mL^{-1}), indicador universal de pH e tampão TRIS-HCl 0,025M pH 8,5. A alteração da cor em função do tempo foi ocasionada pela liberação de ácido butírico na hidrólise enzimática da tributirina realizada a 25, 15, 10 e 4°C.

Os parâmetros de cor para cada amostra foram obtidos através do esquema da Figura 4.4. Ajustados os dados do índice de cor (IC) em uma cinética de ordem zero, os valores da constante da taxa de mudança de cor para as 4 temperaturas foram determinados. Como resultado obteve-se os parâmetros $k_{\text{cor},25^\circ\text{C}}$, $k_{\text{cor},15^\circ\text{C}}$, $k_{\text{cor},10^\circ\text{C}}$, $k_{\text{cor},4^\circ\text{C}}$ e $E_{a,\text{cor}}$.

Metodologia de aquisição e tratamento da cor

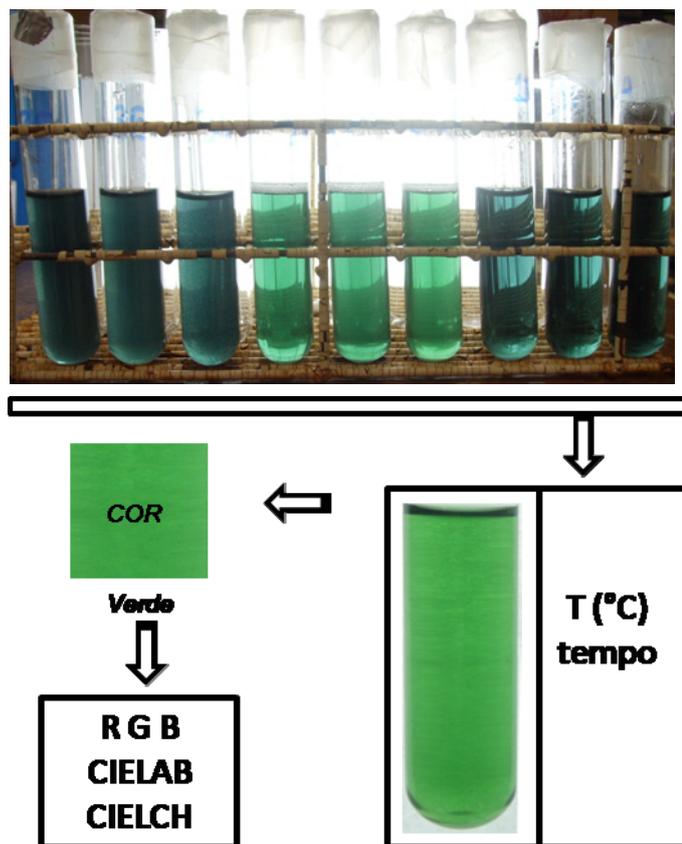


Figura 4.4 Aquisição dos parâmetros de cor

4.3.4 Avaliação do tamanho de gotícula em reação

O tamanho de gotícula do substrato foi avaliado através da metodologia de câmera digital, computador e software (SizeMeter®).

A Figura 4.5 apresenta o esquema utilizado para determinação do tamanho de gotícula. Foi utilizada uma câmera digital Samsung Slim, resolução de 5.1 MPixel. A lente da câmera foi posicionada perpendicularmente à superfície da reação, a uma distância de 5 cm, e ajustou-se o balanço de branco para luz do dia. Para iluminação do objeto, utilizou-se um sistema de iluminação com duas fontes D65 (Yellow Star, MD8A-11W luz do dia), incidindo em ângulo de 45° sobre a amostra que foi colocada sobre um fundo branco.



Figura 4.5 Esquema do sistema utilizado para realizar as fotografias com câmara digital.

Foram realizadas as fotografias de diferentes ensaios contendo tributirina na forma livre, tributirina + Triton X-305, tributirina + Tween 80 e tributirina + Goma Gelana, cada um destes em triplicata. A concentração de tributirina utilizada nos ensaios foi de 8 mg.mL^{-1} em solução tampão TRIS-HCl $0,025\text{M}$.

4.3.5 Aderência do substrato em suporte sólido polimérico

O método de aderência/imobilização do óleo em suporte sólido foi baseado no método de aderência de um substrato sobre um suporte sólido, utilizado por Blixt *et al* (1977). Os suportes sólidos utilizados foram os polímeros PVC e o PEAD.

4.3.6 Cinética de aderência de tributirina em suporte sólido polimérico

Para as cinéticas de aderência os experimentos foram conduzidos em batelada à temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$, com mesmo volume de solução (150mL) e mesma concentração de adsorbato. Os frascos fechados foram colocados em um banho termostático com agitação de 60 RPM.

A concentração de tributirina foi de 66 mg.L^{-1} e a massa de adsorvente utilizada foi 5 vezes superior.

Os experimentos cinéticos foram realizados em sistema estático, com massa conhecida de polímero, em contato com uma solução alcoólica de etanol, contendo

66 mg.L⁻¹ de tributirina, em um volume total de 150mL; os experimentos se estenderam por até 8 horas. Em intervalos de tempo pré-determinados foram coletadas amostras de 0,3 mL, que foram analisadas para triglicerídeos pelo Método da Sulfovanilina.

A quantidade de triglicerídeo aderida por unidade de massa de adsorvente foi calculada pela Equação (22)

$$q = \frac{(C_0 - C) \cdot V}{w} \quad (22)$$

Onde:

q = quantidade de tributirina aderida (mg.g⁻¹)

C = Concentração de tributirina (TB) determinada espectrofotometricamente após a aderência (mg.L⁻¹)

C₀ = Concentração inicial de tributirina em solução (mg.L⁻¹)

V = Volume inicial da solução de tributirina (L)

w = Massa de adsorvente (g)

4.3.7 Determinação das condições operacionais do processo de aderência da tributirina em suporte sólido polimérico

Cem gramas (100g) de suporte sólido polimérico de granulometria conhecida, lavado com etanol, foram vagorosamente misturados, sob agitação, a uma solução contendo 20g de tributirina e 300mL de etanol 95% pré-aquecido a 60°C, em um balão de fundo redondo (evaporativo) com volume de 1L. Após completa suspensão do suporte sólido, o balão foi conectado a um evaporador rotativo. A temperatura foi mantida a 60°C com ajuda de um banho termostatizado com água, onde o etanol foi evaporado a uma pressão reduzida com auxílio de uma bomba de vácuo. Após a evaporação do solvente, foram medidas as massas de sólido e de solvente recuperado. Os dados de operação como pressão de vácuo, tempo de processo, % de solvente recuperado, tipo de polímero, granulometria e estado final do produto (aspecto físico), foram anotados para cada ensaio.

O sólido composto de tributirina aderida sobre o polímero foi armazenado em frasco hermeticamente fechado com atmosfera de nitrogênio e protegido da luz com papel alumínio.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Quantificação de triglicerídeos pelo método da Sulfovanilina

A determinação de triglicerídeos foi feita de acordo com a metodologia descrita por POSTMA & STROES (1968).

Em 0,1 mL de amostra foram adicionados 2,0 mL de ácido sulfúrico em tubo de ensaio, aquecido por 10 minutos em banho maria, à temperatura de ebulição, sendo posteriormente resfriado em água gelada. Retirou-se 0,1 mL desse material, ao qual foram adicionados 2,0 mL de ácido fosfórico e 0,5 mL da solução de vanilina. Após a homogeneização, o tubo de ensaio foi colocado em banho maria a 37°C por 15 minutos. Procedeu-se de maneira análoga para o teste em branco, onde a amostra foi substituída por etanol 95%. A absorbância foi lida em um comprimento de onda de 537 nm, dentro de um intervalo de tempo de 10 minutos contra o teste em branco.

Para a curva padrão foram diluídas frações de tributirina em etanol 95% nas seguintes concentrações de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 mg.L⁻¹.

A curva de calibração ($R^2 = 0,997$) obtida foi

$$Abs = 0,000054 * C \quad (23)$$

Onde C é a concentração (mg.L⁻¹) e Abs é a absorbância lida para cada amostra a 537 nm.

4.4.2 Quantificação de proteína pelo método de BRADFORD

O método de Bradford é amplamente utilizado para medidas rápidas e precisas da concentração de proteína em soluções. A determinação da quantidade de proteína nas amostras de enzima foi realizada por este método (BRADFORD, 1976; STOSCHECK, 1990).

Bradford baseia-se no fato do corante Coomassie Blue G-250 coexistir em duas formas de cores diferentes: vermelho e azul. A sua forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra, por ligação da parte cromófora do corante às proteínas. Assim é observado um deslocamento batocrômico das soluções deste corante de 465 nm para 595 nm. A reação de ligação do corante à proteína é um processo bastante rápido, e a cor adquirida é estável durante 1 hora.

Preparação dos reagentes

- *Reagente estoque Bradford*: Foram dissolvidos 100 mg de Azul Brilhante Coomassie G-250 em 50 mL de etanol 95%, adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). A mistura foi diluída para 200 mL com água destilada. A concentração final dos reagentes foi de 0,5 mg/mL de Azul Brilhante de Coomassie, 25% de etanol e 42,5% de ácido fosfórico. A solução é estável por longos períodos armazenada em vidro escuro a 4°C.
- *Reagente Bradford*: O reagente foi preparado diluindo 1 volume da solução de estoque Bradford com 4 volumes de água destilada. A solução apresentou coloração marrom escura.

Curva padrão de proteína

Para a construção da curva padrão de proteína foi utilizada Albumina de soro bovino (BSA) diluída em uma solução de 2% NaCl (p/v), com BSA nas concentrações de 0, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/mL para ensaios padrão usados para altas concentrações de proteína, e 0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL para baixas concentrações de proteína.

Procedimento para ensaio padrão (200 - 2000 µg/mL de proteína)

Foram preparadas seis soluções padrão contendo 0, 250, 500, 1000, 1500 and 2000 µg/mL de BSA. O espectrofotômetro foi ajustado para coletar espectros de comprimento de onda na faixa de 400 a 700 nm e sobre uma faixa entre 0 e 2 unidades de absorbância. Foi utilizado uma cubeta de vidro (4 mL) com água destilada como branco sobre essa faixa de comprimento de onda.

Para as amostras BSA no ensaio padrão foi utilizado:

- 2.0 mL reagente de análise Bradford
- 0.04 mL da solução padrão de BSA previamente preparada, iniciando da amostra com menor concentração de proteína.

A cubeta foi coberta com Parafilm e gentilmente invertida varias vezes para homogeneização da solução, em seguida foi feita a leitura e registrado os valores obtidos para a faixa de 595 nm, o mesmo foi feito para as amostras.

Procedimento para micro-ensaio (<50 µg/mL de proteína)

Foram preparadas seis soluções padrão contendo 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de BSA. O procedimento foi o mesmo descrito acima para o ensaio padrão, onde foram modificadas as quantidades adicionadas a cubeta, como segue:

- 0.2 mL reagente estoque Bradford
- 0.8 mL da solução padrão de BSA para micro-ensaio, previamente preparada, iniciando da amostra com menor concentração de proteína.

Procedimento para as amostras

Foi feito o mesmo procedimento descrito nas seções anteriores, porém utilizando-se as amostras de enzimas fornecidas pela Novozymes, onde estas foram diluídas em frações 1:3, 1:6, 1:9 em água destilada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo tem como objetivo apresentar e discutir os resultados da hidrólise enzimática da tributirina sob várias condições de temperatura, concentração de enzima e substrato, assim como determinar o grau de repetibilidade das reações e propor formas de aprimoramento para evitar essa variação. Foram determinados os parâmetros experimentais para a aderência da tributirina em suporte sólido, formado de pellets polimérico de PVC e PEAD, bem como a hidrólise enzimática desse substrato aderido, avaliando sua repetibilidade na taxa de reação. Foi avaliada a mudança de cor no sistema de reação, com o uso do indicador universal de pH, visando o desenvolvimento de um protótipo TTI tipo II. Assim, realizou-se uma análise na mudança de cor da reação com uma das composições estudada.

5.2 Quantificação de proteína pelo método de BRADFORD

As soluções enzimáticas de lipase foram avaliadas quanto ao teor protéico, onde os valores encontrados estão na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 *Quantificação de proteína das amostras de enzimas pelo método de BRADFORD.*

Enzima	Conc. proteína [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	Atividade Declarada*
Lecitase Ultra	9079,90 \pm 34,32	10 KLU.g ⁻¹
Lipozyme 100 L	8351,87 \pm 65,45	100 KLU.g ⁻¹

* *Fonte: Novozymes*

Conforme os dados apresentados, a Lecitase apresentou uma maior concentração de proteína em sua composição, porém os valores de atividade enzimática da Lipozyme 100L são superiores.

5.3 Energia de ativação da reação de hidrólise enzimática da tributirina livre

A energia de ativação dos ensaios de hidrólise para a tributirina livre, com a Lipozyme TL 100, foi obtida em quatro temperaturas: 2, 10, 15 e 25°C para cada um dos tratamentos, conforme o planejamento experimental.

Os valores resultantes do ajuste da equação da taxa de reação pela cinética de 1ª ordem forneceram as constantes k (h^{-1}) e a energia de ativação E_a ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) resultante do ajuste da equação de Arrhenius com os valores de k , para cada ensaio mostrado na Tabela 5.2.

Na Figura 5.1 são mostrados os valores de $\ln k \times 1/T$ para os ensaios 1 e 3 com um ajuste linear e os valores da E_a de 3,75 ($R^2=0,990$) e 11,37 ($R^2=0,974$) $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

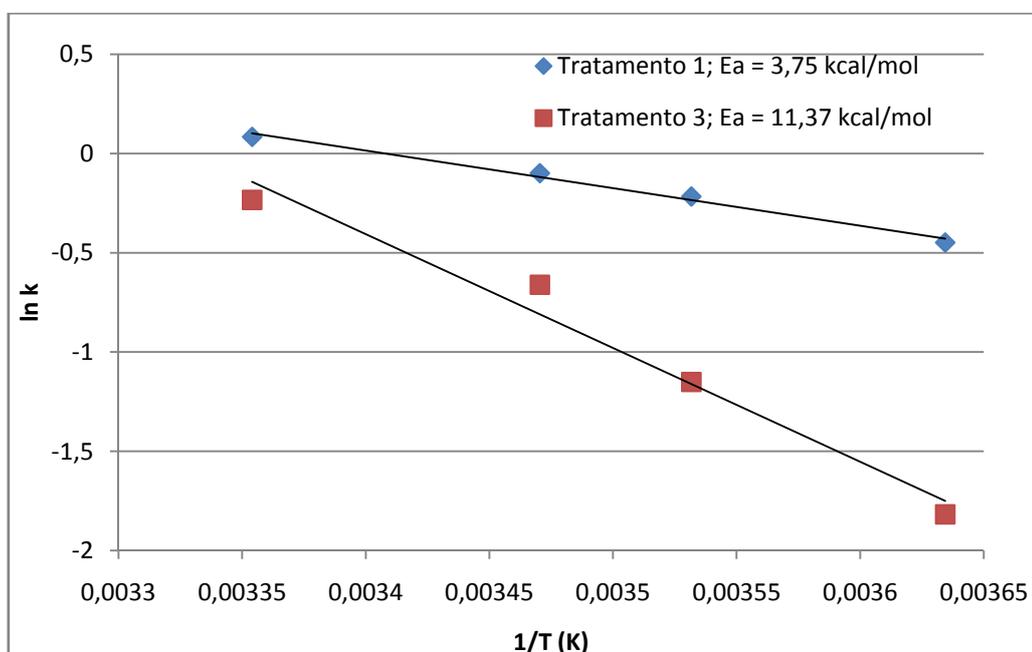


Figura 5.1 Comparação dos valores de k e a energia de ativação.

Para uma determinação confiável do valor da E_a são necessários os valores das constantes (k) para 4 ou mais diferentes temperaturas. O comportamento da constante da taxa de reação (k) em cada temperatura ocorre de maneira diferente. O grau de grandeza do valor da constante (k) não é relevante, pois para a determinação da E_a é avaliada a diferença entre estes valores em cada temperatura. A existência de uma variação em maior proporção entre estes valores, indica uma reta com uma declividade mais acentuada, matematicamente, refletindo um resultado de E_a na mesma proporção, ou seja, quando a diferença entre os valores de k é grande, a energia de ativação é maior, como pode ser observado na Figura

5.1. Desse modo o sistema não pode ser representado simplesmente pela constante da taxa de hidrólise (k), mas pela energia de ativação, E_a .

Na Tabela 5.2 são mostrados os valores de k e E_a para cada um dos tratamentos, onde foram obtidos coeficientes de determinação R^2 superiores a 0,970.

Tabela 5.2 Energia de ativação dos tratamentos para a hidrólise da tributirina livre.

Ensaio	[E]	[S]	k (h^{-1})	E_a ($kcal.mol^{-1}$)
1	-1	-1	$k_{25} = 0,661800$	10,85
			$k_{15} = 0,429588$	
			$k_{10} = 0,262903$	
			$k_2 = 0,152379$	
2	-1	1	$k_{25} = 0,660383$	8,12
			$k_{15} = 0,415878$	
			$k_{10} = 0,285956$	
			$k_2 = 0,167117$	
3	1	-1	$k_{25} = 1,006491$	9,81
			$k_{15} = 0,612689$	
			$k_{10} = 0,431136$	
			$k_2 = 0,327537$	
4	1	1	$k_{25} = 1,386064$	8,27
			$k_{15} = 0,958842$	
			$k_{10} = 0,709402$	
			$k_2 = 0,432976$	
5	- α	0	$k_{25} = 0,478733$	5,81
			$k_{15} = 0,334910$	
			$k_{10} = 0,274945$	
			$k_2 = 0,211676$	
6	α	0	$k_{25} = 0,838602$	7,18
			$k_{15} = 0,560413$	
			$k_{10} = 0,439362$	
			$k_2 = 0,305241$	
7	0	- α	$k_{25} = 0,791897$	11,37
			$k_{15} = 0,516326$	

			$k_{10} = 0,316431$	
			$k_2 = 0,162345$	
			$k_{25} = 1,087784$	
8	0	α	$k_{15} = 0,905894$	3,75
			$k_{10} = 0,805523$	
			$k_2 = 0,638727$	
			$k_{25} = 1,099610$	
9	0	0	$k_{15} = 0,790486$	6,34
			$k_{10} = 0,651574$	
			$k_2 = 0,439571$	
			$k_{25} = 0,900011$	
10	0	0	$k_{15} = 0,549972$	7,14
			$k_{10} = 0,428517$	
			$k_2 = 0,331678$	
			$k_{25} = 0,838015$	
11	0	0	$k_{15} = 0,579972$	7,89
			$k_{10} = 0,395028$	
			$k_2 = 0,289319$	

($\alpha = 1,41$)

Os efeitos dos fatores do planejamento experimental para o modelo quadrático da concentração de enzima E, e de substrato S, sobre a energia de ativação, são dados na Tabela 5.3, onde é observado que todos os efeitos são positivos, exceto o termo linear da variação de substrato. Quando esse varia de -1 a +1, a E_a diminui. A concentração linear de substrato é o único efeito estatisticamente significativo.

Tabela 5.3 Efeitos estimados do planejamento experimental.

	Efeito	DP_E	p
Média	7,12333	0,447524	0,003924
(1) [E] (L)	0,26187	0,548103	0,679937
[E] (Q)	0,48918	0,652375	0,531557
(2) [S] (L)	-3,76158	0,548103	0,020579
[S] (Q)	1,55418	0,652375	0,140097

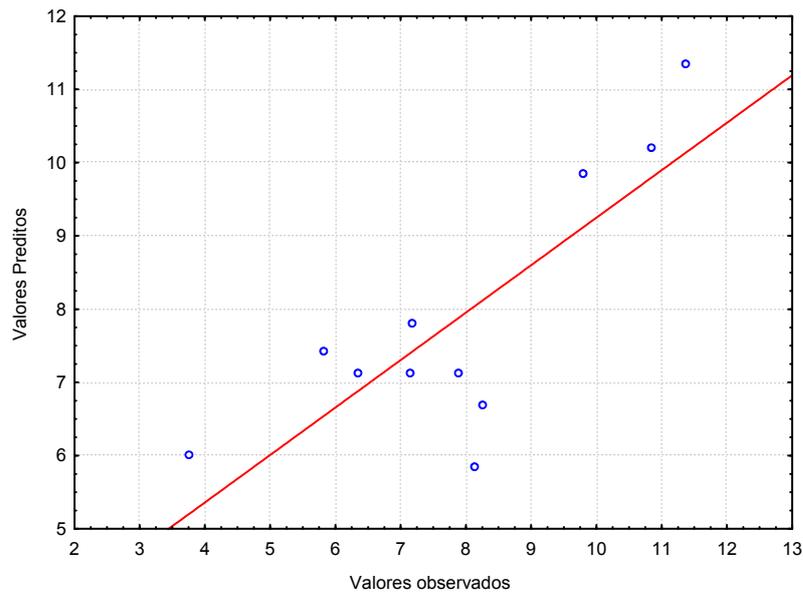


Figura 5.2 Valores preditos e observados.

Na Figura 5.3 é mostrada a superfície de resposta do planejamento. Observa-se uma tendência ao aumento da E_a quando a concentração de substrato é reduzida no meio reacional para toda a faixa de concentração enzimática estudada. Também se observa que as concentrações avaliadas de Lipozyme TL 100 não influenciaram na alteração da E_a .

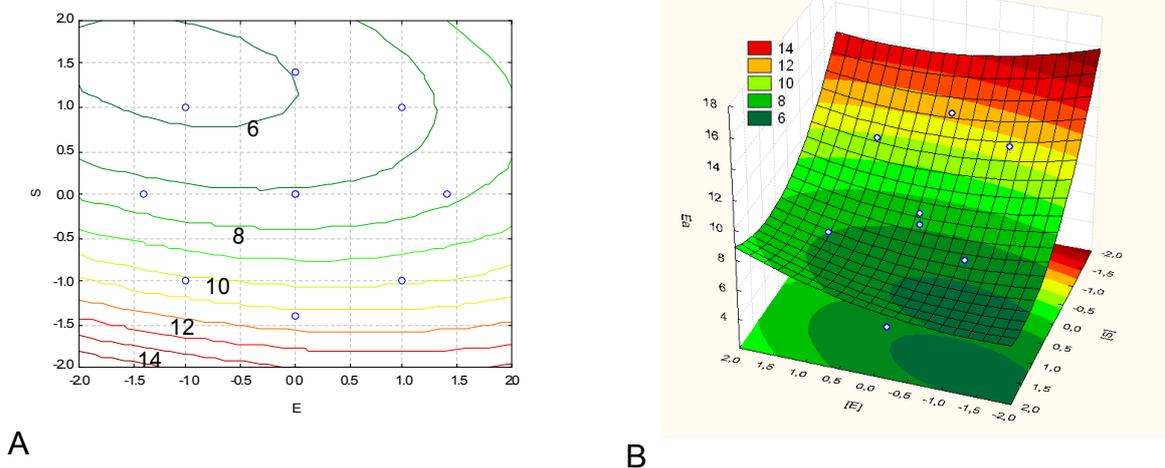


Figura 5.3 Superfície de resposta do planejamento para energia de ativação; A- contornos da superfície com valores da energia de ativação sobre os contornos; B superfície do planejamento em 3D.

Os valores de E_a encontrados no presente estudo apresentam uma faixa de variação de E_a entre 4 – 12 kcal.mol⁻¹.

No sistema aqui apresentado, os valores da energia de ativação são mais baixos que aqueles encontrados na literatura (Tabela 3.1) para deterioração de certos alimentos, como por exemplo, peixe e carne bovina crua, vegetais (saladas prontas) e alimentos preparados (Vitsab Inc., 2006) que apresentam uma E_a superior a 20 (kcal.mol⁻¹), e considera a reação de crescimento de microorganismos patogênicos como parâmetro de deterioração e final da vida de prateleira. Para este sistema ser diretamente aplicado a alimentos é necessário uma composição de 8 mg.mL⁻¹ de tributirina e 25 µg.mL⁻¹ de enzima, de modo a obter E_a s maiores que 10 kcal.mol⁻¹, energias estas encontradas em reações enzimáticas e de rancidez oxidativa (Tabela 3.1). Estas reações que ocorrem com facilidade, mesmo sob condições de temperaturas de conservação entre 2 a 10°C, desqualificam o alimento, embora não sejam prejudiciais à saúde.

Foi observado nos pontos centrais um desvio padrão de $\pm 0,775$ kcal.mol⁻¹ para a E_a , que é 11% do valor médio. Segundo Labuza (1989), recomenda-se uma variação máxima de 5%, o que indica que o presente sistema necessita aprimoramento.

Um dos fatores que pode ter sido responsável por essa variabilidade foi a formação de gotículas de óleo com diferentes tamanhos. Tendo em vista que a hidrólise enzimática da tributirina depende da área superficial de óleo disponível, quando ocorre uma variação entre essas áreas superficiais de ensaio para ensaio, as taxas de reação sofrem uma modificação resultando em um desvio dos valores finais da E_a para uma mesma condição. Jurado (2006) sugeriu um modelo cinético da hidrólise enzimática da tributirina levando em conta a área superficial das pontes de ésteres acessíveis a ação enzimática.

A Tabela 5.5 mostra os valores médios dos diâmetros das gotículas nos ensaios de hidrólise enzimática da tributirina, em quatro composições distintas do meio, sendo eles o substrato na forma livre em tampão, com o surfactante Triton X-305 e com a Goma Gelana.

Tabela 5.5 Tamanho médio de gotículas de tributirina durante o ensaio.

Disposição do Substrato	Ensaio.	Ø médio de gotícula	Média do Ø	% DP
-------------------------	---------	---------------------	------------	------

		(mm,DP)	médio	
Tributirina livre em tampão	A1	1,679 ± 0,338	2,0397 ± 0,344	16,8
	A2	2,365 ± 0,533		
	A3	2,075 ± 0,487		
Tributirina + Triton X- 305	B1	0,390 ± 0,164	0,3537 ± 0,032	9,2
	B2	0,327 ± 0,149		
	B3	0,344 ± 0,045		
Tributirina + Goma Gelana	C1	0,519 ± 0,274	0,5897 ± 0,071	12,0
	C2	0,661 ± 0,123		
	C3	0,589 ± 0,208		

DP – Desvio padrão

Observa-se que, com o uso da Goma Gelana e do Triton X-305, o tamanho médio das gotículas é reduzido em comparação à tributirina livre, devido às propriedades emulsificantes desses compostos, o que representa uma maior área superficial de substrato. O ensaio B apresentou a menor porcentagem do desvio padrão, 9,2%, e o ensaio com a tributirina livre teve a maior, 16,8%, indicando a possível causa da falta de repetibilidade da constante da taxa de reação e conseqüente E_a entre os ensaios de hidrólise enzimática com essa disposição do substrato.

Imagens das gotículas de tributirina obtidas através de fotografia com câmera digital são apresentadas na Figura 5.4 com ampliação de 4 vezes, mostrando o padrão característico de ensaios com quatro composições diferentes.

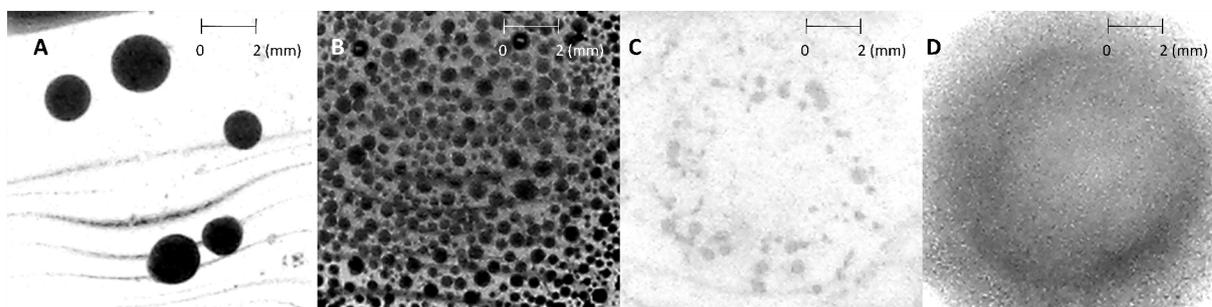


Figura 5.4 Imagens obtidas através de fotografia digital das gotículas de tributirina na reação de hidrólise enzimática: A – tributirina livre; B – tributirina + Triton X-305; C – tributirina + Goma Gelana; D – tributirina + Tween 80.

Ao analisar as imagens, pode-se observar que nos ensaios com a tributirina livre em tampão (Figura 5.4-A) o tamanho das gotículas é ligeiramente maior do que

em outras composições, comprovado pelo valor médio do diâmetro de gotícula medido entre os ensaios, 2,039 mm. Uma maior homogeneidade dos diâmetros de gotículas foi obtida com o uso do Triton X-305, e pode ser percebido pela Figura 5.4-B. Ainda, é possível observar irregularidades no formato das gotículas de óleo nos ensaios com a Goma Gelana (Figura 5.4-C). A estimativa dos diâmetros de gotícula do sistema com o Tween 80 (Figura 5.4-D) não foram possíveis com a metodologia empregada.

Os dados obtidos na hidrólise enzimática com o uso dos dois surfactantes não iônicos, o TWEN 80 e o Triton X-305, na tentativa de homogeneizar a área superficial de tributirina no sistema, a fim de eliminar as diferenças oferecidas por essa falta de uniformidade no tamanho das gotículas da tributirina na reação em sua forma livre, não foram satisfatórios. A hidrólise da tributirina não ocorreu em presença desses surfactantes sob baixas concentrações de enzima. Um possível motivo é que o Tween 80 em reações bifásicas foi identificado primeiramente como um formador de uma solução micelar com hidrocarbonetos, aos quais a enzima não possui acesso direto (Stringfellow, *et al.*, 1999; Monticello, 2000). Entre os tensoativos não iônicos, alguns como o "Tween" e o "Span" podem não ser adequados à determinação da atividade lipolítica porque, em virtude de possuírem ligações éster nas suas moléculas, podem sofrer ataque por parte da lipase. Sendo assim, foi proposta uma nova metodologia na tentativa de homogeneizar primeiramente a área superficial do óleo no sistema. Essa metodologia visou depositar/aderir a tributirina sob um suporte sólido polimérico, de tamanho regular, homogêneo, sendo este hidrofóbico, e sem a capacidade de oxidar o substrato oleoso. Para o depósito/aderência foram testados métodos e parâmetros para realizar tal procedimento, assim como os testes de hidrólise para verificação e validade da aplicação da metodologia para esse trabalho como segue no item 5.4.

5.4 Efeito da concentração de substrato na taxa da reação e na energia de ativação

Sendo a concentração de substrato a única variável estatisticamente significativa no sistema apresentado, a partir dos resultados anteriores, foi avaliado o seu efeito na taxa de reação a temperaturas de 15, 25 e 35°C em concentração enzimática de 0,3 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (0,03 $\text{LU}.\text{mL}^{-1}$).

A Tabela 5.6 mostra os resultados da energia de ativação para a hidrólise enzimática da tributirina a 1, 2, 4 e 8 mg.mL⁻¹. Os valores encontrados estão na faixa de 11 – 18 Kcal.mol⁻¹ em um sistema reacional com o substrato na forma livre.

Foi observado que nas concentrações de substrato menores que 4 mg.mL⁻¹ os valores de pH no equilíbrio está em torno de 7,5, devido à baixa concentração de ácido butírico total formado no sistema. Os ensaios com concentrações de substrato superiores a 4 mg.mL⁻¹ atingem valores de pH até 5,5 no equilíbrio, a partir de 9,5 - o valor inicial do pH. Para efeito de visualização do processo de hidrólise, são utilizados indicadores de pH. O indicador adequado a esta faixa de pH é o Indicador Universal. A cor azul esverdeado surge no início da reação (pH 9,5) e a laranja no equilíbrio (pH 5,5). Outros indicadores de pH, com mudança de cor entre 9,5 e 7,5, como por exemplo o vermelho de cresol e o azul de timol, poderiam ser utilizados para concentrações menores que 4 mg.mL⁻¹.

No presente trabalho foi utilizado o indicador universal por permitir melhor visualização do sistema. Quando a reação se inicia, tem-se uma coloração azul esverdeado (pH 9,5) com tendência ao verde escuro e quando se aproxima o final da reação (pH 5,5) a coloração passa do verde para o amarelo, chegando ao laranja, cor esta facilmente notada e diferenciada do verde inicial, o que a torna adequada a uma aplicação comercial.

Tabela 5.6. Energia de ativação da hidrólise da tributirina em baixa concentração

[S] mg·mL ⁻¹	[E] ug·mL ⁻¹	E _a (kcal·mol ⁻¹)	R
1	0,3	12,89	0,813
2	0,3	15,71	0,841
4	0,3	18,56	0,977
8	0,3	11,24	0,959

Os ensaios realizados nas concentrações, 1 e 2 mg.mL⁻¹ atingiram o valor de equilíbrio de 7,5, acima do valor daqueles realizados a concentrações maiores que 4 mg.mL⁻¹. Nestas concentrações de substrato os valores da correlação (R) foram menores, o que diminui a confiabilidade nas respostas deste sistema.

O comportamento dos dados mostrados na Tabela 5.6, revela um ponto de máximo na E_a em uma concentração de 4 mg.mL⁻¹. Onde, nas concentrações de

substrato de 1, 2 e 4 mg.mL⁻¹, o valor da E_a teve um incremento e logo após se reduziu, indicando um comportamento característico nessa faixa estudada.

5.5 Cinética de aderência de óleo em suporte sólido polimérico

Foram realizados experimentos cinéticos com o objetivo de avaliar o processo de aderência de óleo em suporte sólido polimérico (SSP). Para isso foram testados dois suportes, o PVC e o PEAD de baixa granulometria, onde o substrato oleoso depositado foi a tributirina.

O resultado da concentração de tributirina aderida ao suporte sólido em função do tempo de contato a 60°C é mostrado na Figura 5.5.

Nos dados experimentais foi ajustado um modelo matemático de decaimento exponencial para a aderência da tributirina em suporte sólido polimérico de PVC e PEAD, conforme a Equação (25).

$$q_t = q_f(1 - e^{-\lambda t}) \quad (25)$$

Onde q_t (mg.g⁻¹) é a quantidade de tributirina aderida a quantidade de suporte, q_f (mg.g⁻¹) é quantidade final de massa aderida ao suporte e λ (h⁻¹) é a constante da taxa (velocidade) de aderência.

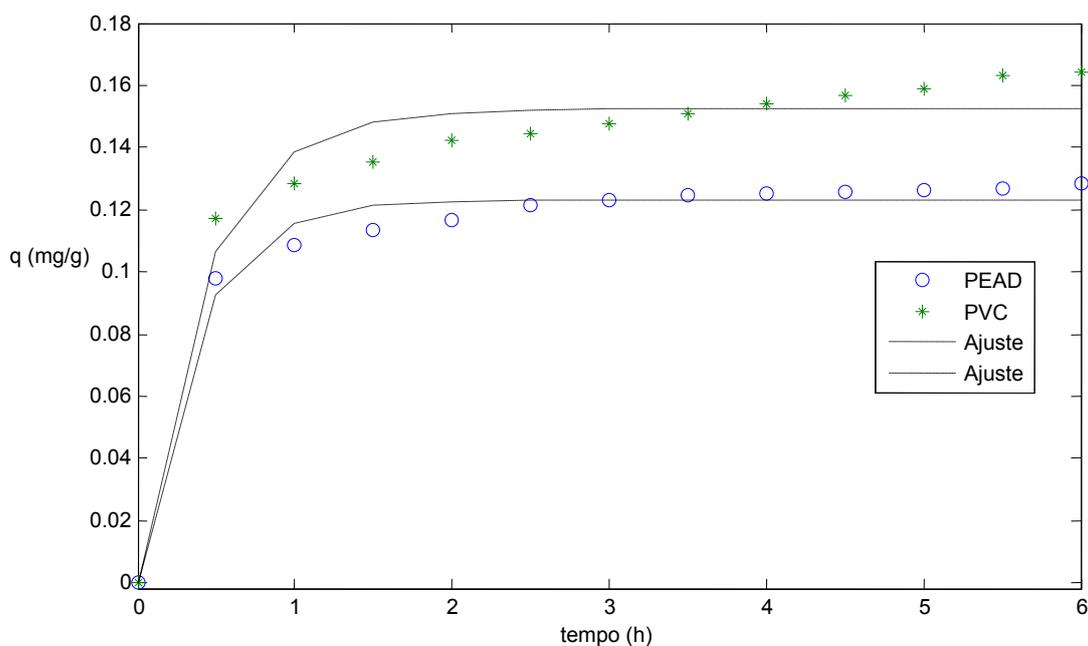


Figura 5.5 Cinética de aderência a 60°C de tributirina em PEAD e PVC.

Os experimentos cinéticos foram realizados em batelada, por um período de 7 horas, com concentração inicial de tributirina de 66 mg.mL^{-1} , a uma temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$.

Observou-se (Figura 5.5) que o maior percentual de aderência ocorre após um período de aproximadamente 1 hora, portanto, para este caso é necessário um tempo de contato superior ou igual a esse período, entre os adsorventes testados e a solução de tributirina.

Os parâmetros cinéticos provenientes do ajuste do modelo apresentado para a cinética de aderência da tributirina em suporte sólido polimérico (Equação (25)) são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 Parâmetros cinéticos da aderência de tributirina em PVC e PEAD

Polímero	$q_t \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$	$\lambda \text{ (h}^{-1}\text{)}$	R
PEAD	0,1232	2,7878	0,9956
PVC	0,1523	2,3934	0,9903

A partir da Tabela 5.7 observa-se que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais, com valores do coeficiente de correlação (R) maiores que 0,99.

É reportado por diversos autores que, em geral, a cinética de adsorção é rápida inicialmente, em virtude de ocorrer principalmente na superfície externa, seguida por uma etapa lenta de adsorção na superfície interna do adsorvente. Se o adsorvente tem baixa porosidade, não permitindo acesso às moléculas do adsorbato, a cinética de adsorção é mais rápida quando comparada com adsorventes com grande volume de poros.

Os tamanhos médios de partícula dos polímeros utilizados e as massas aderidas às mesmas são mostrados na Tabela 5.8 abaixo.

Tabela 5.8 Tamanho médio de partícula dos suportes sólidos.

Polímero	Tamanho médio de partícula (μm)	Massa total de tributirina aderida ao polímero (mg.g^{-1})
PEAD GD-4960	70	0,13
PVC S-367 NK	65	0,17

O polímero PVC S-367 NK mostrou uma maior capacidade de aderência da tributirina ($0,17 \text{ mg.g}^{-1}$), cerca de 30% maior que o PEAD GD 4960 ($0,13 \text{ mg.g}^{-1}$), nas mesmas condições experimentais. Acredita-se que esta diferença ocorra devido não somente a um diâmetro de partícula menor, mas também a uma maior afinidade do óleo pelo PVC.

5.6 Determinação das condições experimentais do processo de aderência de tributirina em suporte polimérico sólido

Nesta primeira etapa do processo de aderência de tributirina, foi selecionado o polímero PVC (Solvin 367 NK) como suporte sólido, devido a sua maior capacidade em retê-la.

O parâmetro testado nos ensaios de aderência de tributirina em suporte sólido polimérico foi a pressão de vácuo do sistema de evaporação rotativa, onde avaliou-se uma faixa entre 50 e 600 mmHg. O processo foi realizado em batelada, sendo determinado o tempo necessário para obtenção de um maior rendimento de recuperação de solvente.

A Tabela 5.9 mostra os resultados dos ensaios de aderência de tributirina em PVC S-367 com os respectivos parâmetros de pressão de vácuo testados no procedimento, à temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$. Em todos os ensaios foram utilizados 20g de tributirina sobre 100g de PVC.

Tabela 5.9 Efeito da pressão sobre processo de aderência da tributirina em suporte sólido (60°C)

Polímero	Pressão de vácuo	Tempo (h)	Solv. recuperado
PVC S-367	50 – 100 mmHg	7	70 %
PVC S-367	100 – 200 mmHg	7	78%
PVC S-367	200 – 300 mmHg	5	85%
PVC S-367	300 – 400 mmHg	3	97%
PVC S-367	450 – 600 mmHg	1,5	98%

Pode-se observar que pressões de vácuo maiores recuperam maior quantidade de solvente em um tempo menor de processo. A 600 mmHg praticamente todo o solvente foi removido da mistura em um tempo inferior à 2 h,

enquanto que na faixa de 50 a 200 mmHg o tempo necessário chega a 7h, com remoção de no máximo 78% do solvente adicionado.

Os valores da recuperação de solvente em ensaios com PEAD GD 4960, PEAD GD 4456 e PVC S-367 mostram que polímeros com menor granulometria retêm menos solvente e conseqüentemente imobilizam uma quantidade maior de tributirina. Em granulometrias maiores, o solvente pode estar sendo absorvido pelo polímero, mostrado pela dificuldade em removê-lo durante o processo evaporativo, prejudicando a aderência.

Tabela 5.10 Recuperação de solvente com diferentes polímeros e granulometrias.

Polímero	Tamanho de partícula (μm)	Solv. recuperado
PEAD GD4960	70	93%
PEAD GD4960	1174	85%
PEAD GF4456	82	95%
PEAD GF4456	1182	76%
PVC S-367	65	98%

A Tabela 5.11 traz a descrição da aparência do produto após o processo de aderência do óleo. O aspecto físico final do polímero foi utilizado como um indicador para a aplicação do produto em uma reação de hidrólise enzimática de tributirina através da enzima lipase.

Tabela 5.11 Dados de ensaio do processo de aderência de tributirina em suporte sólido polimérico.

Ensaio	Polímero	Granulometria (μm)	Estado final
1	PEAD GD4960	70	aspecto seco, sem resíduo oleoso aparente
2	PEAD GF4456	82	aspecto seco, sem resíduo oleoso aparente
3	PEAD GD4960	1174	aspecto úmido, grande quantidade de óleo

			residual
4	PEAD GF4456	1182	aspecto úmido, grande quantidade de óleo residual
5	PVC S-367	65	aspecto seco, sem resíduo oleoso aparente

Pode-se observar que os ensaios 1, 2 e 5, resultaram em um produto seco de aspecto similar ao polímero em seu estado inicial, diferentemente dos testes 3 e 4, nos quais o produto apresenta óleo residual não aderido ao suporte, com resíduo de tributirina no fundo do balão, caracterizando o fato de que nem todo o substrato está depositado ou aderido ao polímero. Isso pode ser explicado pelo maior diâmetro de partícula destas amostras, e conseqüente menor área superficial disponível, entre outros fatores, como porosidade e rugosidade, estes não detalhados nesse trabalho. Isso pode ser comprovado quando comparamos os resultados obtidos nos testes 1 e 3 para PEAD GD4960, 2 e 4 para PEAD GF4456 onde o mesmo polímero foi empregado com diferente diâmetro de partícula, caracterizando o efeito positivo sobre a aderência quando áreas superficiais maiores são utilizadas.

As Figuras 5.6 e 5.7 mostram o efeito da granulometria 1170 e 70 μ m sobre a aderência do óleo em PEAD GD 4960. Pode-se observar que a aparência final do produto com a maior granulometria apresentou tributirina residual no balão evaporativo, além de um excesso de oleosidade sobre a superfície do polímero, sendo esta de fácil remoção com o manuseio. Entretanto o mesmo polímero com uma granulometria média de 70 μ m (Figura 5.7) mostrou um produto de aparência seca, sem óleo residual e de aspecto semelhante ao polímero no seu estado anterior ao processamento.

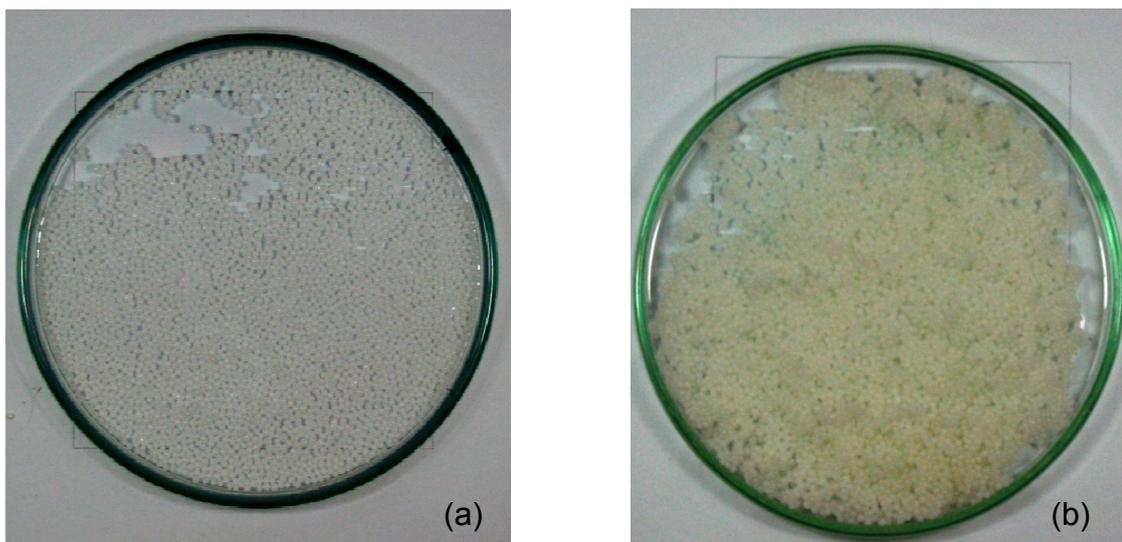


Figura 5.6 Aspecto do polímero PEAD GD 4960 com 1174 μm m, (a) puro; (b) com tributirina aderida, aspecto úmido, com óleo residual presente.

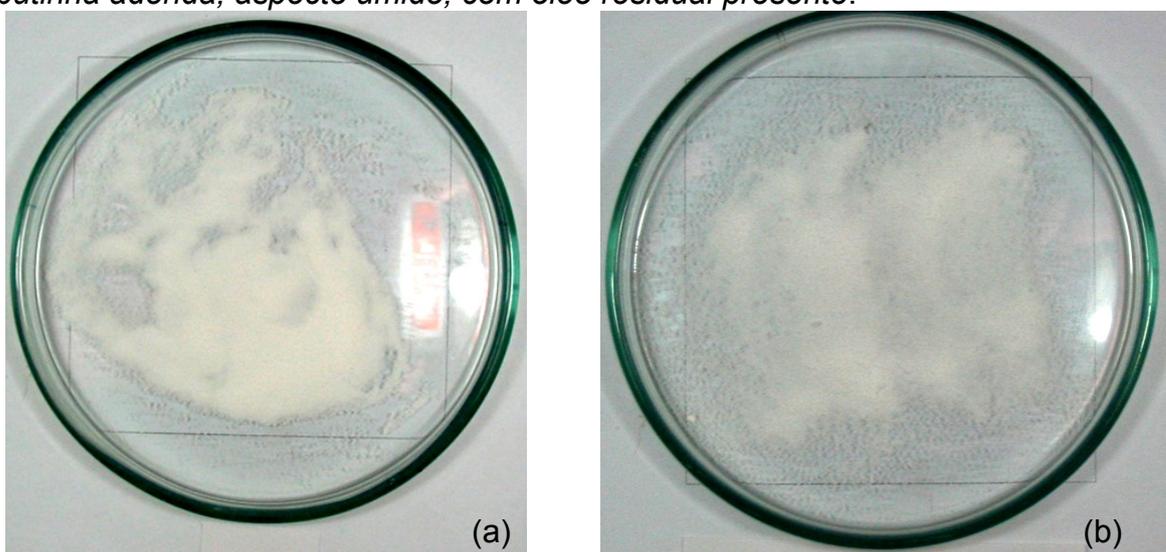


Figura 5.7 Aspecto do polímero PEAD GD 4960 com 70 μm , (a) puro; (b) com tributirina aderida, aspecto seco, sem óleo residual presente.

Conclui-se que é necessária a utilização de material polimérico de baixa granulometria para obter uma boa aderência da tributirina.

As imagens com os ensaios com o PVC não são mostradas aqui, mas possuem aspecto similar aos da Figura 5.7.

5.7 Ensaio de hidrólise enzimática de tributirina aderida em suporte sólido polimérico

Foram realizados experimentos de hidrólise enzimática do triglicerídeo depositado em suporte sólido polimérico (SSP), de modo a comprovar a eficácia

desta metodologia na repetibilidade dos ensaios. Foram utilizados dois tipos de enzimas, fornecidas pela Novozymes, Lipozyme TL 100 e Lecitase Ultra, ambas em baixas concentrações. A constante da taxa de reação foi determinada através de uma cinética de primeira ordem. Os ensaios foram realizados a 35°C em triplicata.

Tabela 5.12 Valores médios da constante da taxa de hidrólise da tributirina em SSP PVC S-367K.

Enzima	[E] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	[S] mg.mL^{-1}	k (h^{-1})	% do desvio
Lecitase	0,3	8,65 \pm 0,02	0,034 \pm 0,002	8,31
Lipozyme	0,3	8,63 \pm 0,04	0,098 \pm 0,004	8,28
Lecitase	25	8,63 \pm 0,08	0,258 \pm 0,021	4,33
Lipozyme	25	8,65 \pm 0,01	0,333 \pm 0,006	1,94

Pode-se observar que o maior valor da constante da taxa de reação foi encontrado para a enzima Lipozyme a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida pela Lecitase à mesma concentração. Ainda é possível notar o aumento sensível no valor da constante da reação quando a concentração enzimática teve um incremento de 0,3 para 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. É possível que ocorra o incremento na constante da taxa de reação, com o método de aderência do substrato no polímero (PVC), através do aumento da área superficial de óleo disponível à ação da enzima.

Com base nas análises de variância, ANOVA, do tipo e concentração de enzima na hidrólise da tributirina aderida em suporte de PVC S-367K, a um nível de significância 0,05, pode-se afirmar que existe influência estatisticamente significativa da concentração e do tipo de enzima na constante da taxa de reação da hidrólise da tributirina em PVC, a uma temperatura de 35°C. Os desvios descobertos nesse sistema foram menores dos encontrados com a tributirina livre ($\pm 0,137$), com uma porcentagem de 14,4%.

No que diz respeito ao tipo de enzima, quando a Lipozyme é usada, a constante da taxa de reação aumenta em 0,009 h^{-1} , isso deve-se a sua atividade enzimática superior a Lecitase.

O aumento na repetibilidade pode ser melhor observado quando os valores do desvio padrão da constante da taxa de reação para os ensaios com tributirina aderida em PVC são comparados a ensaios com a tributirina livre (Tabela 5.13), valores já apresentados anteriormente em tabelas.

Tabela 5.13 Valores médios e desvio padrão da constante da taxa de reação para a tributirina livre e, aderida em PVC.

Tributirina aderida em PVC				
Enzima - [ug.mL ⁻¹]	k médio	Desvio padrão	% do desvio	T(°C)
Lecitase – [0,3]	0,03442	0,00286	8,31	35
Lecitase – [25]	0,25885	0,02143	4,33	35
Lipozyme – [0,3]	0,09855	0,00427	8,28	35
Lipozyme – [25]	0,33341	0,00646	1,94	35
Tributirina livre				
Lipozyme – [0,3]	0,945879	0,136696	14,45	25
Lipozyme – [0,3]	0,640143	0,131062	20,47	15
Lipozyme – [0,3]	0,491706	0,139458	28,36	10
Lipozyme – [0,3]	0,353523	0,077471	21,91	2

Observa-se que os desvios padrão da constante da taxa de reação para a tributirina livre em diferentes temperaturas (25, 15, 10 e 2°C) se mantêm muito próximos. Enquanto a repetibilidade na tributirina aderida ao PVC, com desvio padrão médio em torno de 0,13, é cerca de 5%; para a tributirina livre é próximo de 22%. Sendo assim há uma melhora muito grande na repetibilidade das reações, mesmo estas sendo avaliadas em diferentes temperaturas. O principal motivo para a esse fenômeno é a homogeneização da área superficial de tributirina à ação enzimática, com o uso desses aderido em suporte sólido polimérico (PVC).

5.8 Estudo da cinética da mudança de cor do sistema

Esse estudo avaliou a mudança da coloração do meio reacional durante a hidrólise enzimática da tributirina livre. Foram obtidas imagens digitais dos ensaios em intervalos de tempo regular, onde se extraíram os parâmetros de cor médio de cada imagem com auxílio de softwares. Os parâmetros de cor foram obtidos para cada uma das temperaturas de 25, 15, 10 e 4°C (Tabela 5.14 a 5.17), a intervalos de tempo regulares onde os parâmetros cinéticos da constante da taxa de mudança de cor, k_{cor} (Figura 5.8) e $E_{a,cor}$ (Tabela 5.18) foram calculados. O laranja obtido como cor final da reação apresenta um pH na faixa de 5,7 a 5,4.

As Tabelas 5.14 a 5.17 mostram os valores dos parâmetros de cor extraídos a cada uma das 4 temperaturas a partir da variação do índice de cor (IC).

Tabela 5.14 Parâmetros de cor a 25°C

Tempo (min)	R	G	B	L*	a*	b*	C	H	IC	Cor
0	40	136	87	50	-38	18	71	149	-36,1495	
2	45	130	74	48	-37	23	65	140	-35,3869	
20	83	142	67	54	-31	33	53	107	-25,3584	
40	99	143	56	55	-27	40	61	90	-20,3445	
80	120	146	45	57	-21	48	69	75	-14,0638	
100	142	149	35	60	-13	55	77	64	-7,66752	
120	163	153	25	63	-6	61	85	56	-3,10756	
150	211	138	12	64	23	67	94	38	10,14641	
180	219	114	10	60	38	66	95	30	16,63215	
200	225	104	8	59	45	66	96	27	19,09616	

Tabela 5.15 Parâmetros de cor a 15°C

Tempo (min)	R	G	B	L*	a*	b*	C	H	IC	Cor
0	45	130	82	48	-35	18	65	146	-37,0537	
60	60	135	74	51	-34	26	54	130	-31,1513	
120	65	142	67	53	-37	32	54	122	-28,542	
180	97	188	76	69	-44	47	60	109	-19,8094	
240	180	210	45	80	-25	71	79	71	-8,30313	
300	210	200	35	80	-8	74	83	57	-2,68705	
360	220	152	25	68	20	68	89	39	8,29901	
420	240	102	12	61	52	68	95	24	19,9164	

Tabela 5.16 Parâmetros de cor a 10°C

Tempo (min)	R	G	B	L*	a*	b*	C	H	IC	Cor
0	45	130	82	48	-35	18	65	146	-37,0537	
120	47	128	80	48	-34	19	63	144	-36,3726	
300	59	138	70	51	-37	29	57	128	-30,8649	
420	95	180	61	66	-43	50	66	103	-19,7588	
600	120	200	55	73	-43	60	73	93	-15,9594	
720	179	145	40	62	6	57	78	45	3,376929	
840	200	150	27	66	12	65	87	43	5,501439	
960	220	90	19	55	50	61	91	21	23,05193	

Tabela 5.17 Parâmetros de cor a 4°C

Tempo (min)	R	G	B	L*	a*	b*	C	H	IC	Cor
0	45	128	78	48	-35	20	65	144	-36,1768	
300	56	120	71	45	-30	20	53	134	-36,98	
600	67	138	65	52	-35	32	53	118	-28,3857	
900	117	174	54	65	-34	52	69	88	-16,8384	
1200	143	198	48	74	-34	63	76	82	-12,836	
1500	192	127	35	59	21	56	82	35	11,90249	
1800	225	108	30	60	44	61	87	24	19,50017	
2100	241	85	21	58	59	64	91	17	23,37251	

O índice a^* indica a variação de verde a vermelho ($a^* < 0 \rightarrow a^* > 0$). Observa-se nas tabelas, que os valores de a^* trocam de negativo para positivo em diferentes tempos na reação, em cada uma das temperaturas testadas. Em 25°C a troca ocorre em aproximadamente 120 min, em 15°C em 300 min, em 10°C em 720 min e em 4°C em 1500 min. Assim, nas temperaturas mais baixas a troca de sinal de a^* ocorreu no maior tempo decorrido de reação, mostrando uma reação mais lenta a temperaturas mais baixas.

O índice de cor (IC), tem o mesmo comportamento do índice a^* , apresenta valores mais baixos para cores frias (azul, verde), e valores mais altos para cores quentes (laranja, vermelho). A variação do índice de cor reflete a mudança da coloração da reação. Esta apresentou uma variação de $-36,6 \pm 0,5$ (verde) a $21,4 \pm 2,2$ (laranja) em seu valor inicial e final respectivamente.

A variação do índice de cor (IC) de cada ensaio, nas temperaturas de 25, 15, 10 e 4°C, em função do tempo, é mostrado na Figura 5.8. Os valores de k_{cor} foram obtidos por um ajuste linear, onde $E_{a,cor}$ foi obtida através de equação de Arrhenius. Os dados calculados e os obtidos pelos ajustes são mostrados na Tabela 5.18.

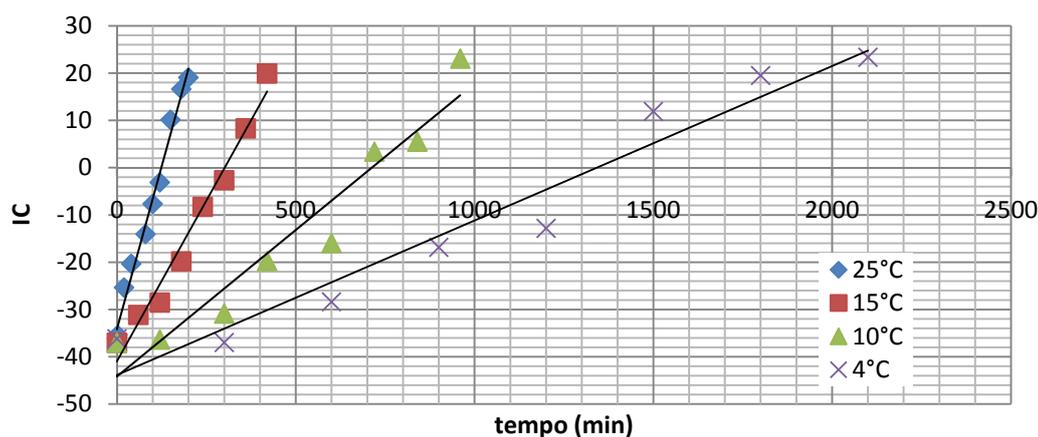


Figura 5.8 Cinética de mudança de cor à 25, 15, 10 e 4°C.

Nota-se uma maior variação em um menor tempo nos valores de IC nas reações realizadas em temperaturas mais altas (25, 15°C), onde a taxa de reação é maior devido ao aumento da atividade da lipase, com o aumento da temperatura. Desse modo, temperaturas mais baixas mostraram uma mudança de cor menos acelerada.

Tabela 5.18 Parâmetros cinéticos da mudança de cor.

T(°C)	k_{cor} (min ⁻¹)	R	$E_{a,cor}$ (kcal.mol ⁻¹)	R
25	0,275	0,993		
15	0,135	0,988		
10	0,061	0,964	17,122	0,989
4	0,032	0,973		

Comparativamente aos ensaios realizados para a medida do pH para uma mesma condição, observa-se uma diferença de cerca de 34% nos valores da energia de ativação. Além disso, os altos valores do coeficiente de correlação ($R > 0,96$) indicam a boa correlação do sistema, o que mostra que o sistema visual pela cor é menos variável, mais repetitivo e confiável. A E_a quando avaliada em relação ao pH é muito influenciada por pequenas variações do sistema, promovendo coeficientes de correlação mais baixos e menor repetibilidade.

Os resultados obtidos nos ensaios mostraram a capacidade do sistema em fornecer, em uma única medida de cor, a resposta do sistema reacional frente a diferentes temperaturas. Ainda é bastante promissora a determinação de uma boa

correlação entre a energia de ativação da reação que monitora a qualidade do alimento com a energia de ativação desta reação.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que sistemas formados com Lipozyme TL 100 e tributirina na forma livre, são independentes da concentração da enzima, como mostrado no planejamento experimental desenvolvido, mostrando valores de E_a que variam de 3,75 a 11,37 kcal.mol⁻¹. A redução da concentração de substrato permitiu aumentar a E_a a valores de 18,56 kcal.mol⁻¹; valor este aplicável a sistemas alimentícios que possuem como parâmetros de qualidade as reações enzimáticas e/ou de oxidação de lípidos. O mesmo planejamento experimental mostrou uma variabilidade de 11% em relação à média no ponto central, quando a medida de pH foi utilizada para obtenção dos parâmetros da reação, valor esse ainda alto para aplicação em TTI's.

Para aumentar a repetibilidade do sistema, a tributirina foi imobilizada (aderida) em diferentes suportes poliméricos. A utilização de PVC S-367K, com diâmetro de partícula de 70 µm apresentou os melhores resultados no aumento da repetibilidade do sistema reacional.

A avaliação da E_a , através da variação da cor do meio a 0,3 µg.mL⁻¹ e 8 mg.mL⁻¹ de enzima e substrato respectivamente, utilizando indicador de pH, mostrou valores maiores que aquele encontrado pela medida do pH. Isto provavelmente se deve a menor sensibilidade do sistema à variável escolhida, a cor.

Os ensaios realizados utilizando o indicador universal de pH, apresentaram uma boa resposta no grau de mudança de cor, como uma referência da cor laranja para o final da reação, destacando-se do verde, coloração inicial, onde essa diferença pode ser facilmente visualizada sem o uso de equipamentos, necessitando apenas de uma cor referencial indicativa na embalagem ou no local de onde a reação estiver ocorrendo. Este trabalho serve como base, para a orientação no desenvolvimento de um Biossensor Indicador de Tempo-Temperatura tipo II (enzimática) a diversos tipos de produtos.

7. REFÊRENCIAS

AHVENAINEN, R., HURME, E., SMOLANDER, M. Active and Smart Packaging for Food Products. **Technisch-Wissenschaftliche Beilage**, v.49, n 7, p.36-40,1998.

ALDRICH Sigma-Aldrich. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/Local/SA_Splash.html>. Acessado em: 24 de Abril de 2007.

ALFORD, J.A., PIERCE, D.A., SUGGS, F.G. Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. **J. Lipid**. v.5, n. 3, p.390, 1964.

AL-ZUHAIR S, HASAN M. e RAMACHANDRAN K.B. Kinetic Hydrolysis of palm Oil Using Lipase. **Process Biochemistry**. v.23, p.1155-1163, 2003.

AL-ZUHAIR SULAIMAN. Kinetics of hydrolysis of tributyrin by lipase. *Journal of Engineering Science and Technology*. v.1, p. 50-58, 2006.

ANTONIAN E. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. **Journal Lipids**. v.23, p.1101–1106, 1988.

ARNOLD, R.G.; SHAHANI, K. M., DWIVEDI, B. K. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. **J. Dairy Sci.**, v. 58, p. 127-1143, 1975.

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

BENZOANA, G., ESPOSITO, S. On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. **Bloch Biophys. Acta**. v. 231, p. 15-22, 1975.

BORZANI W., LIMA U. e AQUARONE E.. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1975, v.3.

BROCK, T. **Biology of Microorganisms: Industrial Microbiology**. Prentice-Hall Inc. 1997.

BROCKERHOFF, H., JENSEN, R. G. **Lipolytic Enzymes**, Academic Press, (N.Y), 1974.

CARVALHO P. O. *et al.* Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**. v.26, p.75-80, 2003.

CASTRO H. F., MENDES A. A e SANTOS J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**. v. 27, 2004.

CONNORS , K. **Chemical Kinetics: A study of reaction rates in solutions**. Madison. VCH Publisher, 1990.

DEBONI, T. M., QUADRI, M. G. N., MACHADO, A. F., ZIBETTI, A.W. Desenvolvimento de um sistema de cor para aplicação em TTI enzimático. *Artigo submetido e aceito no COBEQ 2008*.

FERRATO, F. *et al.* A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in Enzymology**. v.286, p.327-347, 1997.

FU, B., TAOUKIS, P. S., LABUZA, T. P. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators. **Journal of Food Science**, v.56, p.1209-1215, 1991.

GAN, Q. *et al.* Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system. **Catalysis Today**. v.56, p.179-190, 2000.

GANDHI, N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.6, p.621-634. 1997.

GARRETT, R.H; GRISHAM, C.M. **Biochemistry**, 2° edição, 1999.

GHOSH, S. E D. BHATTACHARYYA. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.72, n.12, p.1541-1544. 1995.

GLAZER, A. N. & NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology, fundamentals of applied Biotechnology**. University of California, Berkeley. W. H. Freeman & Company, N.Y, 1994.

HONG, S. I.; PARK, W. S. Use of color indicators as an active packaging system for evaluating kimchi fermentation. **Journal of Food Engineering**, v.46, p.67-72, 2000.

JAEGER K. E. e WOHLFARTH S. Bacterial lipases: biochemistry, molecular genetics and applications in biotechnology. **Bioengineering**. v.9, p.39-46, 1993.

JAEGER K.E. *et al.* Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**. v.15, p.29-63, 1994.

JAWAHEER, S., WHITE, S. F., RUGOOPUTH, S. D. D. V., CULLEN, D. C. Development of a common biosensor format for enzyme based array to monitor fruit quality. **Biosensors and Bioelectronics**. v.18 (1), p.1429-1437, 2003.

JURADO, E. *et al.* Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions. **J. Chemical engineering science**. v. 61, n.15, p.5010-5020, 2006.

KILARA, A. Enzyme modified lipid food ingredients. **Process Biochemistry**. v. 4, p. 35-45, 1985.

KHAN, I. M., DILL, C. W., CHANDAN, R. C., SHAHANI, K. M. Production and properties of extracellular lipase of *Achromobacter lipolyticum*. **Bioch. Bioph. Acta**. v.132, p. 68-77, 1967.

KHOR H.T, H.N TAN e T.L CHUA. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 63, p.538-540, 1986.

KNEZEVIC Z.D, SILER-MARINKOVIC S.S E MOJOVIC L.V Kinetics of Lipase-Catalysed Hydrolysis of Palm Oil in Lecithin/isooctane Reversed Micelles. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.49, p.267-271, 1998.

KRUIJF, N. VAN BEEST, M., RIJK, R., SIPILAINEN-MALM, T., LOSADAS, P. P., MEULENAER, B. Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. **Food Additives and Contaminants**. v.19, p.144-162, 2002.

LEAL M. C. M. R. *et al.* Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.19(2), p.175-180, 2000.

LABUZA, T. P. An introduction to active packaging for foods. **Food Technology**, v. 50, n.1, p. 68-71, 1996.

LABUZA, T. P., BREENE, W. M. Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, n. 1, p. 1-69, 1989.

LABUZA, T.P e TAOUKIS, P.S. Applicability of Time-Temperature Indicators as Food Quality Monitors Under Non-isothermal Conditions. **J. Food Sci.** v.54(4), p.783-788, 1989a.

LABUZA T.P e TAOUKIS P.S. Reliability of Time-Temperature Indicators as Food Quality Monitors Under Nonisothermal Conditions. **Journal of Food Science**. v.54, p.789-792, 1989b.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LEVENSPIEL, Octave. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo. E. Blucher, 1974, Vol. 2.

LIE E. e MOLIN G. **Bioconversion of waste materials to industrial products**. Elsevier Applied Science. New York, 1991, p. 401.

LINFIELD W.M, O'BRIEN D.J e SEROTA S. Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.61, p.1067-1071, 1984.

LINDBLOOM, B. J. CIE Color Calculator. Disponível em <<http://www.brucelindbloom.com>>. Consultado em 10/02/2007.

MONTICELLO D. J Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.11, p.540-546, 2000.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização - preparação - purificação**. 2.ed. 7ª reimpressão. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1990.

MUKATAKA S, TETSUO K e JOJI T. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. **J. Ferment Technol.** v.63(5), p.461-466, 1985.

NELSON, J. H., JENSEN, R. G., PITAS, R. Pregastric esterase and other oral lipases - a review. **J. Dairy Sci.** v. 60, n.3, p. 327-362, 1977.

OLIVEIRA A. L. A., GIOIELLI L. A. e OLIVEIRA M. N. Partial enzymatic hydrolysis of babassu fat. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.2, p. 19. 1999.

PANDEY, A., S. BENJAMIN, *et al.* The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology.** v.29, p.119-131, 1999.

PARK YONG K, PASTORE GLAUCIA M e ALMEIDA MARTA MITSUI. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** v. 65, p.252-254, 1988.

RAPP D., OLIVECRONA T. Kinetics of Milk Lipoprotein Lipase. Studies with Tributyrin. **Eur. J. Biochem.** v.91, p.379-385, 1978.

RICHARDSON, G. H., NELSON, J. H., FARNHAM, M. G. Gastric lipase characterization and utilization in cheese manufacture. **J. Dairy Sci.** v. 54, n. 5, p. 643-647, 1971.

ROONEY, M.L. **Active food packaging.** Glasgow: Chapman & Hall, 1995.

SARDA L., DESNUELLE D. Action de la lipase pancreatique sur les esters emulsion. **Biochimica et Biophysica.** v.30, p.513-521, 1958.

SEWALD M., DEVIRES J. Food Product Shelf Life. Medalions Lab. 2006. Disponível em: < <http://www.medallionlabs.com/file.aspx?FileID=91>>. Acesso em: 10 fev. 2007.

SUGIURA, M., OIKAWA. T., HIRANO, K., INUKAI, T. Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. **Bioch. Biophys. Act.** v.488, p.353-358, 1977.

SHAHANI, G., ESPOSITO, S. REED, E. Lipases and esterases. **Enzymes in food process.** Academic Press. NY. p.182-214, 1975.

SHARMA, D.K.; CHAUHAN, P.P.S.; AGRAWAL, R.D. Changes in the levels of serum enzymes and total protein during experimental haemonchosis in Barbari goats. **Small. Rum. Res.**, v.42, p.119-123, 2001.

SMOLANDER, M., HURME, E., LATVA-KALA, K., LOUMA, T., ALAKOMI, H. L., AHVENAINEN, R. Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness os unmarinated broiler cuts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v.3, p.279-288, 2002.

STRINGFELLOW W., T E ALVARAREZ-COHEN L Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. **Water Res.** v.33, p.2535-2544, 1999.

TAOUKIS P.S, FU B e T.P LABUZA Time-Temperature Indicators. **Food Technology.** p.70-82, 1991.

TAOUKIS, P.S., LABUZA, T.P., SAGY, S. Kinetics of food deterioration and shelf life prediction. **Food Engineering Handbook.** p.363 - 405, 1997.

TORRES, A. P., OLIVEIRA, F. A. R. Application of the acid hydrolysis of sucrose as a temperature indicator in continuous thermal processes. **Journal of Food Engineering**, v.40, p.181-188, 1999.

TRIANAFYLLOU, A.Ö., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON. How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media?. **B. Biotechnol. Bioeng.** v.54, pp. 67–76, 1997.

VAN LOEY, A., HENDRICKX, M., CORDT, S., HAENTJENS, T., TOBBACK, P. Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature Integrators. **Trends in Food Science and Technology**. v.7, p.16-26, 1996.

VITSAB International, CheckPoint® Basic Principles. Disponível em: <<http://www.vitsab.com/Basics.htm>>. Acesso em: 20 junho 2006.

WU HO-SHING E TSAI MING-JU Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. v.35, p.488-493, 2004.

XIA, J., CHEN, X., NNANNA, I.A., Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.73, p.115-120, 1996.

Y. J. WANG, et al. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. **Biotechnology and Bioengineering**. v.31, p.628-633, 1988.

YAN S., *et al.* Development and characterization of a new Amylase Type Time-temperature Indicator. **Food Control**. v.7, 2007.

ZANOTTO, S.P Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos opticamente ativos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 123p, 2003.