

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

Crisleine Zottis dos Reis

**LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS EM
TECIDOS DE ALGODÃO POR AÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo,
Prof^ª. Dr^ª. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza

Florianópolis
2012

Reis, Crisleine Zottis dos

Liberação controlada de substâncias ativas em tecidos de algodão por ação enzimática [dissertação] / Crisleine Zottis dos Reis ; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza ; co-orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo. - Florianópolis, SC, 2012.

132 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Microencapsulação. 3. Enzima papaina. 4. Liberação controlada. I. Souza, Antônio Augusto Ulson de. II. Araújo, Pedro Henrique Hermes de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Crisleine Zottis dos Reis

LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS EM TECIDOS DE ALGODÃO POR AÇÃO ENZIMÁTICA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Química e de Alimentos.

Florianópolis, 19 de junho de 2012.

Prof. Leonel Teixeira Pinto, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Selene M. A. G. Ulson
de Souza,
Coorientadora
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof., Dr. Pedro Henrique Hermes
de Araújo,
Coorientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof.^a, Dr.^a Cláudia Sayer,
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof.^a, Dr.^a Débora Oliveira ,
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof.^a, Dr.^a Heloísa de Lima Brandão
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico com todo o amor à minha mãe,
à minha irmã e ao meu querido
marido.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, pelo suporte técnico e infraestrutura e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao orientador Professor Antônio Augusto Ulson de Souza pela orientação, compreensão, apoio e incentivo;

À Professora Selene M. A. Guelli Ulson de Souza, ao Professor Pedro Henrique Hermes de Araújo e à Professora Cláudia Sayer pela orientação, pelo apoio e pela atenção dada em todos os momentos que os procurei.

Às Professoras Maria da Graça e Débora Oliveira pelas sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa;

Às empresas Duas Rodas e Gelita do Brasil, pela gentil doação do óleo de hortelã e da gelatina, respectivamente, utilizados na realização do projeto;

Aos amigos e colegas do LABMASSA/LABSIM por todo o apoio, companheirismo e amizade. Em especial às amigas Rafaela Bohaczuk Venturelli e Priscilla Barreto Cardoso por todo o apoio, sugestões e ajuda ao longo da realização deste trabalho.

À Talita Guimarães e à Nathalia Buss da Silva pelo auxílio na parte experimental durante a pesquisa.

À Marilete Zottis e à Tatiane Zottis dos Reis por todo o carinho e ajuda durante este período.

Ao Odinei Fogolari por todo o amor, compreensão, incentivo, pelo apoio em todas as horas e por fazer parte da minha vida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido sermos crianças por toda a vida.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Buscando atingir novos consumidores no setor têxtil, diversos processos vêm sendo estudados visando dar novas funcionalidades aos tecidos, como por exemplo, o encapsulamento de substâncias ativas. Este trabalho tem por objetivo avaliar a utilização da enzima papaína imobilizada em microcápsulas, de gelatina e goma arábica, aplicadas em tecido de algodão, para liberação controlada do óleo de hortelã ou óleo de jojoba. A imobilização da papaína nas microcápsulas possibilita a liberação do óleo, uma vez que, sob determinadas condições, a enzima é ativada e hidrolisa as microcápsulas liberando o encapsulado. As microcápsulas foram obtidas por coacervação complexa, sendo que na etapa de reticulação ocorreu a imobilização da enzima papaína. Foram avaliadas as aplicações das microcápsulas em tecido 100% algodão por impregnação utilizando o equipamento Foulard. Foi avaliada também a influência da temperatura de secagem do tecido tratado através da secagem em forno termofixador-rama e pela secagem natural. A liberação do óleo encapsulado foi avaliada por cromatografia gasosa por dez dias consecutivos. A ativação da enzima ocorre pelo contato com o suor humano a 37 °C e pH 5,5 ou 8,0, resultando na hidrólise da microcápsula e na liberação da substância ativa. As microcápsulas contendo óleo de hortelã mostraram-se resistentes a ambos os tipos de secagem, enquanto que não ocorreu o mesmo para as microcápsulas contendo óleo de jojoba, as quais não resistiram ao processo de aplicação e secagem do tecido. A liberação do óleo de hortelã ocorreu com uma taxa maior no período inicial tornando-se praticamente constante nos demais dias monitorados. O tempo de liberação do óleo de hortelã, microencapsulado, foi superior quando comparado a aplicação do mesmo na forma livre no tecido de algodão. Foi testada a ativação da enzima por onze vezes consecutivas, até que houvesse a perda da fragrância de 95 a 98%, durante o período avaliado. O princípio de liberação utilizando a enzima papaína mostrou-se efetivo para a liberação do óleo de hortelã encapsulado no sistema estudado.

Palavras-chave: Microencapsulação, enzima papaína, liberação controlada.

ABSTRACT

Seeking to reach new customers in the textile sector, several processes have been studied aiming to give new features to the fabrics, such as the encapsulation of active substances. This study aims to evaluate the use of the enzyme papain supported in microcapsules of gelatin and gum Arabic, applied to cotton fabric, to the controlled release of spearmint or jojoba oil. The immobilized papain in the microcapsules provides the release of oil, since under certain conditions, the enzyme is active and hydrolyzes the microcapsules and releasing the encapsulated. Microcapsules were obtained by complex coacervation, and in step of crosslinking occurred the immobilization of the enzyme papain. Different application methods have been tested, impregnation versus bath exhaustion. Was also evaluated the influence of drying temperature of the fabrics treated by drying in an oven term linker and natural drying. The release of the encapsulated oil was evaluated by gas chromatography for ten consecutive days. The activation of the enzyme occurs by contact with human sweat, ie at 37 °C and pH 5,5 or 8,0 resulting in the microcapsule hydrolysis and the release of active substance. Microcapsules containing spearmint oil were resistant to both types of drying, while the same did not occur for the microcapsules containing jojoba oil, which did not resist the drying process of the fabric. The release of peppermint oil occurred at a higher rate in the initial period became almost constant in the remaining days monitored. The release time of the microencapsulated peppermint oil was higher when compared to the application of free oil in the cotton fabric. The activation of the enzyme for eleven consecutive times, until there was loss of fragrance 95-98% was tested in the period of study.

Keywords: Microencapsulation. Papain. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da celulose.	32
Figura 2 - Corte transversal da fibra de algodão	33
Figura 3 - Esquema representativo de uma fibra de Algodão	33
Figura 4 - Representação esquemática da clivagem de uma ligação peptídica catalisada por uma enzima proteolítica.	37
Figura 5 - Configuração tridimensional da papaína, na qual está representada a Cisteína 25 (Cys-25), do sítio ativo da papaína e dois domínios da cadeia principal.	40
Figura 6 - Principais tipos de imobilização de enzimas	42
Figura 7 - Representação esquemática das etapas do processo de encapsulação por coacervação	47
Figura 8 - Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla	48
Figura 9 - Esquema de aminoácidos em diferentes pH. (a): pH > pI, forma aniônica; (b): pH < pI, forma catiônica	49
Figura 10 - Principal unidade repetitiva da Goma Arábica	50
Figura 11 - (a) <i>Mentha spicata</i> L. (b) <i>Mentha x piperita</i> L.	51
Figura 12 - Estrutura química (a) do mentol e, (b) da Carvona	51
Figura 13 - Estrutura química do óleo de jojoba.	52
Figura 14 - Jojoba (a) Flor feminina; (b) Sementes e óleo.	52
Figura 15 - Produtos da ligação cruzada de GDA baseada em íons piridínio quaternário	54
Figura 16 - Reações do glutaraldeído com proteínas, base de schiff (1) e Adição de Michael (2).	55
Figura 17 - Possibilidade de ligação cruzada entre a celulose, enzima e glutaraldeído	55
Figura 18 - Micrografia das microcápsulas de gelatina e goma arábica contendo óleo de cânfora.	57
Figura 19 - Microfotografias ópticas das microcápsulas contendo óleo essencial de citronela x100.	58
Figura 20 - Micrografias do tecido não tratado (a) e do tecido tratado com as microcápsulas (b).	58
Figura 21 - Micrografias dos tecidos tratados (a)500x; (b)1500x	59
Figura 22 - Fluxograma do processo de obtenção das microcápsulas contendo a enzima imobilizada na parede polimérica da cápsula.	68
Figura 23 - Etapa de lavagem das microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada na parede polimérica.	69
Figura 24 - Influência do amaciante e dos óleos de jojoba e hortelã sobre a ação da enzima livre na hidrólise da caseína.	73
Figura 25 - Microcápsulas (a) contendo óleo de hortelã sem a enzima imobilizada; (b) contendo óleo de hortelã com a enzima papaína imobilizada (0,25mg/mL); e (c) contendo óleo de jojoba com a enzima papaína imobilizada (0,05mg/mL). Lente com aumento de 100x.	75

Figura 26 - Hidrólise das microcápsulas contendo óleo de jojoba ao fim do tempo de 60 min a 37°C em tampão fosfato 50 mM pH 7,5, (a) microcápsulas contendo a enzima imobilizada (0,05 mg/mL) (b) microcápsulas sem a enzima.	76
Figura 27 - Microcápsulas contendo óleo de jojoba com a enzima imobilizada (a) liofilizadas; (b) imagens por MEV (c) solubilizadas após liofilização.	77
Figura 28 - Microcápsulas de óleo de hortelã com a enzima imobilizada (a) liofilizadas, (b) imagens por MEV (c) solubilizadas após liofilização.	77
Figura 29 - Imagens de MEV das microcápsulas sem a enzima imobilizada.	78
Figura 30 - Curva de frequência para a distribuição de tamanho das microcápsulas.	79
Figura 31 - Variação da atividade enzimática para a enzima livre em diferentes pH e temperaturas.	81
Figura 32 - Variação da atividade enzimática para a enzima imobilizada (1 mg/mL) em microcápsulas contendo óleo de jojoba em diferentes pH e temperaturas.	82
Figura 33 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para 1 mg/mL de enzima.	83
Figura 34 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína (1 mg/mL) imobilizada em microcápsulas contendo óleo de jojoba, a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para a enzima imobilizada.	84
Figura 35 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína (1 mg/mL) imobilizada em microcápsulas de óleo de hortelã a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para a enzima imobilizada.	84
Figura 36 - Avaliação do $t_{1/2}$ para a temperatura de 37°C. (a) Imobilização em microcápsulas contendo óleo de jojoba. (b) Imobilização em microcápsulas contendo óleo de hortelã.	86
Figura 37 - Imagem do equipamento Foulard, (a) vista frontal e (b) aplicação ao tecido de algodão.	90
Figura 38 - Forno termofixador utilizado para a secagem das amostras tratadas.	90
Figura 39 - Espaço de cor CIELAB.	92
Figura 40 - Imagem de MEV do tecido de algodão contendo microcápsulas de óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL), aplicadas no Foulard e a secagem realizada (a) na Rama e (b) naturalmente (a sombra).	94
Figura 41 - MEV realizado do tecido de algodão contendo microcápsulas de óleo de jojoba com a enzima imobilizada (0,05 mg/mL), aplicadas no Foulard e com secagem (a) na Rama e (b) natural (a sombra).	94
Figura 42 - Imagem de MEV do tecido com as microcápsulas com a enzima (0,25 mg/mL) imobilizada contendo óleo de hortelã, impregnado pelo Foulard.	95

Figura 43 - Imagem de MEV do tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,25mg/mL), impregnado em banho termostático.	96
Figura 44 - (a) Tecido de algodão tratado com as microcápsulas impregnadas pelo Foulard. (b) Tecido contendo microcápsulas aplicadas juntamente com glutaraldeído pelo Foulard. (c) Tecido previamente tratado com glutaraldeído, contendo as microcápsulas aplicadas em banho termostático. Em todos os casos as microcápsulas contêm óleo de hortelã e a enzima imobilizada (0,25mg/mL).	98
Figura 45 - Tecido previamente tratado com glutaraldeído, contendo as microcápsulas (óleo de hortelã) com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL) em aplicadas em banho termostático por 1h a 10°C.	99
Figura 46 - MEV do tecido contendo as microcápsulas com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL) aplicadas juntamente com o amaciante (150 mg/mL) pelo Foulard.	99
Figura 47 - (a) Amostra 1-Tecido sem tratamento, (b) Amostra 2, (c) Amostra 3, (d) Amostra 4, (e) Amostra 5,(f) Amostra 6	101
Figura 48 - Esquema representativo do processo de liberação da fragrância pela ação da enzima em condições específicas.....	107
Figura 49 – Micrografia da microcápsula contendo óleo de hortelã, sendo hidrolisada pela ação da enzima papaína (0,25mg/mL). Aplicação pelo Foulard (microcápsulas em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5), secagem na rama (100°C/5min). Imagem após 24h da aplicação, em condições ambientes.	107
Figura 50 - Imagens das microcápsulas a 37°C no tampão suor ácido pH 5,5 (a) no início do processo de liberação e (b) ao final do tempo de 10 min. Lente com aumento de 100x.....	108
Figura 51 - Imagens das microcápsulas a 37°C no tampão suor básico pH 8,0 (a) no início do processo de liberação e (b) ao final do tempo de 10 min. Lente com aumento de 100x.....	108
Figura 52 - Cromatograma do óleo de hortelã puro.	110
Figura 53 - Cromatograma obtido após a aplicação das microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,05 mg/mL) no tecido de algodão, a secagem na rama (100°C/5min).....	110
Figura 54 - Comportamento da perda dos três componentes avaliados para o tecido tratado com as microcápsulas em pH 7,0.	111
Figura 55 - Comportamento da perda dos três componentes avaliados para o tecido tratado com o óleo de hortelã livre em pH 7,0.	112
Figura 56 - Comparativo do comportamento da perda do componente referente ao pico 2 avaliado para ambos os tecidos (com e sem fragrância encapsulada).	112
Figura 57 - Avaliação da perda dos três componentes monitorados, quando há a ativação da enzima e liberação do encapsulado.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição seca do algodão bruto.....	32
Tabela 2 - Divisão das seis classes enzimáticas.....	35
Tabela 3 - Família de inibidores de proteases de plantas	38
Tabela 4 - Principais reagentes químicos e equipamentos utilizados.....	62
Tabela 5 - Distribuição granulométrica para as microcápsulas contendo óleo de hortelã.	79
Tabela 6 - Diferenças de cor obtidas para as amostras tratadas com microcápsulas contendo óleo de hortelã.	100
Tabela 7 - Parâmetros estabelecidos para a quantificação de óleo de hortelã por cromatografia gasosa	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDI	- Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
BAEE	- N-benzil-L-arginina éster etílico
BSA	- Albumina Serica Bovina
CG	- Cromatografia Gasosa
CPs	- Cisteíno Proteases
Cys-25	- Cisteína-25
E.C.	- Comissão de Enzimas
GDA	- Glutaraldeído
Gly	- Glicina
Hypro	- Hidroxiprolina
ISO	- Organização Internacional para Padronização
LABMASSA	- Laboratório de Transferência de Massa
LCME	- Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LCP	- Laboratório de Controle de Processos
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
NBR	- Norma Brasileira
P(3HB)	- Poli(3-hidroxiбутirato)
P(3HV)	- Poli(3- hidroxivalerato)
PCL	- Poli(ϵ -caprolactona)
PDLA	- Poli(D, L-ácido láctico)
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pI	- Ponto Isoelétrico
Pro	- Prolina
PROFI	- Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

- A - Representa a atividade da enzima inicial.
- B - Atividade da enzima residual da imobilização e da água de lavagem após o procedimento de imobilização.
- $D_{4,3}$ - Diâmetro médio das partículas (μm).
- $d_{0,1}$ - Diâmetro em que 10% da distribuição de tamanho das microcápsulas é inferior a este diâmetro (μm).
- $d_{0,5}$ - Diâmetro o qual 50% das microcápsulas estão a cima e 50% estão abaixo deste diâmetro (μm).
- $d_{0,9}$ - Diâmetro em que 90% da distribuição de tamanho das microcápsulas é inferior a este diâmetro (μm).
- SPAN - Medida da dispersão granulométrica.
- L^* - Luminância.
- a^* - Correspondem a crominância de uma cor.
- b^* - Correspondem a crominância de uma cor.
- ΔE_{ab}^* - Representa a diferença total de cor entre a amostra padrão e o tratado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	27
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	28
1.1.1 Objetivo Geral	28
1.1.2 Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO II	31
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	31
2.1 FIBRAS DE ALGODÃO	31
2.2 ENZIMAS	34
2.2.1 Classificação das enzimas	34
2.2.2 Enzimas Proteolíticas	36
2.2.3 Imobilização de enzimas	41
2.3 MICROENCAPSULAÇÃO	44
2.3.1 Coacervação complexa	45
2.3.2 Material de Parede	47
2.3.3 Substâncias ativas encapsuladas	50
2.3.4 Glutaraldeído	53
2.3.5 Aplicações de Microcápsulas e avaliação da liberação controlada.	56
CAPÍTULO III	61
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1.1 REAGENTES E MATERIAIS	61
3.1.2 PROCEDIMENTOS	63
3.1.2.1 Preparo das Soluções	63
3.1.2.2 Determinação de Proteína	64
3.1.2.3 Quantificação da atividade enzimática	65
3.1.2.4 Cinética de Hidrólise da caseína pela ação da enzima livre e pela enzima imobilizada	66
3.1.2.5 Avaliação do óleo de hortelã, óleo de jojoba e amaciante sobre a ação da enzima livre	66
3.1.2.6 Formação das microcápsulas e Imobilização da enzima	67
3.1.2.7 Avaliação da ação da enzima na hidrólise das microcápsulas	69
3.1.2.8 Rendimento da imobilização	69
3.1.2.9 Liofilização das microcápsulas	70
3.1.2.10 Determinação da distribuição de tamanho das microcápsulas	70
3.1.2.11 Determinação do pH e da temperatura ótimos para a enzima livre e para a enzima imobilizada	71
3.1.2.12 Avaliação do tempo de meia vida da enzima imobilizada	71
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	72
3.2.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	72

3.2.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE JOJOBA, ÓLEO DE HORTELÃ E DO AMACIANTE SOBRE A AÇÃO DA ENZIMA LIVRE	73
3.2.3 OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS CONTENDO A ENZIMA IMOBILIZADA	74
3.2.4 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO	78
3.2.5 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS	78
3.2.6 DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS PARA A ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	80
3.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA LIVRE E DA ENZIMA IMOBILIZADA	83
3.2.8 VERIFICAÇÃO DO TEMPO DE MEIA-VIDA PARA A ENZIMA IMOBILIZADA	85
3.3 CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO IV	89
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	89
4.1.1 PROCEDIMENTOS	89
4.1.1.1 Preparo das soluções	89
4.1.1.2 Tratamento do tecido de algodão com Glutaraldeído	89
4.1.1.3 Aplicação das microcápsulas em tecido de algodão	90
4.1.1.4 Determinação da gramatura do tecido 100% algodão	91
4.1.1.5 Avaliação da variação da cor do tecido após aplicação das microcápsulas	92
4.1.1.6 Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas no tecido de algodão	92
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	93
4.2.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SECAGEM DO TECIDO CONTENDO AS MICROCÁPSULAS	93
4.2.2 APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS NO TECIDO DE ALGODÃO	95
4.2.2.1 Aplicação das microcápsulas no tecido de algodão com a presença do glutaraldeído e do amaciante	97
4.2.3 VARIAÇÃO DA COR DO TECIDO APÓS APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS	99
4.3 CONCLUSÕES	102
CAPÍTULO V	103
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	103
5.1.1 PROCEDIMENTOS	103
5.1.1.1 Preparo das soluções	103
5.1.1.2 Avaliação da ação da enzima nos tampões suor ácido pH 5,5 e suor básico pH 8,0	104
5.1.1.3 Avaliação da liberação controlada por cromatografia gasosa	104

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	106
5.2.1 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO CONTROLADA	106
5.2.1.1 Verificação da ação da enzima nos tampões suor ácido e suor básico	108
5.2.1.2 Acompanhamento da liberação controlada por Cromatografia Gasosa (CG) das microcápsulas contendo óleo de hortelã	109
5.3 CONCLUSÕES	113
CAPÍTULO VI	115
6.1 CONCLUSÕES	115
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
REFERÊNCIAS	117

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, ABDI (2008), o Brasil possui em torno de 53 mil empresas têxtil e de confecção (T&C), sendo que 80% delas estão localizadas nas regiões Sul e Sudeste. O predomínio é da confecção de artigos de vestuário (75%).

Em Santa Catarina, a atividade têxtil é um dos principais ramos da economia. O principal pólo têxtil do Estado está situado nas regiões de Blumenau, Brusque, Joinville e Jaraguá do Sul, onde empresas como, Coteminas, Hering, Büettner, Teka, Marisol, Malwee, entre outras, respondem por grande parte do percentual da produção nacional, segundo Lange (2004).

O setor T&C brasileiro passa por um momento de transição que enfatiza a cada dia sua necessidade de buscar novos modelos para adequar-se aos desafios da economia global e da globalização da sociedade de consumo (ABDI, 2008). Atualmente, os avanços científicos vêm sendo usados para inovações nos produtos têxteis.

Têxteis funcionais são têxteis modificados pela presença de uma substância química ou produto. Estes produtos, quando estimulados, geram um efeito específico. As aplicações mais frequentes incluem repelentes de insetos, corantes, atividade antimicrobiana, materiais de mudança de fase, os retardadores de fogo, policromia e efeitos termocrômico e substâncias que produzem efeitos sensoriais agradáveis ao consumidor (SPECOS et al., 2010).

Vários processos com aromas vêm sendo utilizados para o acabamento do produto têxtil, dentre eles, o uso de aplicação direta no tecido e processos utilizando microcápsulas e nanocápsulas, que merecem atenção especial, pois atuam como um pequeno compartimento contendo um líquido a ser liberado do interior, sob condições controladas (RODRIGUES et al., 2009).

Segundo Rodrigues et al. (2009) as microcápsulas podem ser aplicadas durante o acabamento do processo de fabricação do tecido usando um foulard no qual o tecido pode ser tratado sendo impregnado por meio de um banho contendo microcápsulas, um amaciante e um agente reticulante.

A microcápsula é constituída por um núcleo e por uma casca, que pode ter características variadas em função dos materiais utilizados e do processo empregado para sua formação. Biopolímeros em geral como

gomas, amidos, proteínas e lipídios, podem ser usados como material de parede. (ALVIM, 2005)

Os óleos essenciais, como por exemplo óleo de hortelã, podem volatilizar-se ou simplesmente oxidar-se com o tempo. Neste caso, a microencapsulação proporciona uma maior estabilidade destes compostos e permite sua liberação controlada, uma vez que a proteção proporcionada pela parede polimérica evita que durante o armazenamento prolongado, ocorram alterações químicas e organolépticas.

A microencapsulação de óleos essenciais tem sido muito utilizada, porém nas aplicações em têxteis a liberação do encapsulado ocorre geralmente por difusão pela parede ou fricção (quebra). Por este motivo, no presente trabalho foi estudado um processo capaz de tornar possível a liberação do composto encapsulado através da hidrólise da microcápsula pela ação de uma enzima.

O processo compreendeu a elaboração das microcápsulas contendo a enzima papaína imobilizada, através da reticulação por glutaraldeído, na parede da mesma. Com isso, ao entrar em contato com a umidade ou suor humano, em 37°C a enzima agirá sobre a microcápsula, hidrolisando-a e liberando o óleo encapsulado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Utilizar a enzima papaína imobilizada na superfície de microcápsulas de gelatina e goma arábica para promover a liberação controlada do óleo de hortelã e do óleo de jojoba encapsulado, aplicados em tecido de algodão.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a influência inibitória de compostos, presentes no processo de síntese, encapsulamento, e ancoragem das microcápsulas no tecido, na atividade enzimática;
- b) Determinar as condições ótimas de pH e temperatura, bem como a atividade enzimática para a enzima livre e para a enzima imobilizada;
- c) Avaliar diferentes métodos de aplicação das microcápsulas, contendo a enzima imobilizada, ao tecido de algodão;

- d) Analisar a influência do glutaraldeído e do amaciante na aplicação das microcápsulas ao tecido de algodão;
- e) Avaliar a temperatura de secagem do tecido após aplicação das microcápsulas na estabilidade da mesma;
- f) Avaliar a liberação controlada das microcápsulas de óleo de hortelã impregnadas ao tecido de algodão através de cromatografia gasosa.

CAPÍTULO II

Neste capítulo será apresentada a fundamentação teórica, a qual visa abordar os principais conceitos adotados para o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente serão apresentados alguns aspectos sobre a composição e características estruturais do tecido de algodão. Em seguida, será tratado sobre as enzimas e suas classificações, bem como sobre as enzimas proteolíticas e a enzima papaína. Sendo explorados também os diferentes métodos de imobilização de enzimas.

A microencapsulação será abordada inicialmente de forma geral e, de forma mais específica posteriormente, em relação ao método de coacervação complexa, os materiais poliméricos utilizados, o reticulante adotado e as substâncias ativas encapsuladas. Por fim, uma exploração referente à liberação controlada do encapsulado e algumas aplicações das microcápsulas na indústria.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FIBRAS DE ALGODÃO

Segundo estatística da Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI-2008), em 2006 a fiação com fibras químicas representava uma parcela de 15% da produção de fios com destaque para os fios de poliéster (9%). Os fios de juta, sisal e outras fibras naturais contribuem com 3% da produção. Considerando-se a produção de fios, utilizando apenas o algodão puro, o percentual de uso dessa fibra na fiação é cerca de 75%.

O algodão é a fibra natural mais utilizada em tecidos, sua composição é basicamente celulose, cerca de 3 a 15% é material não celulósico.

Segundo Trotman (1984), o algodão bruto tem na sua composição, além de celulose, os componentes comuns das células vegetais, estes componentes são gorduras, ceras, óleos, pectoses, pectinas, proteínas e compostos relativos azotados, ácidos orgânicos e material corante natural. Os fios e tecidos de algodão podem ter, adicionalmente, sujidade, encolantes e óleos de máquinas, resultantes dos processos de fábrica. A composição seca do algodão bruto está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição seca do algodão bruto

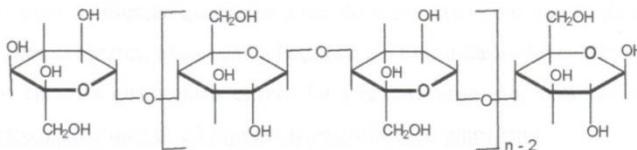
Componente	Quantidade (%)
Celulose	85,5
Óleos e ceras	0,5
Proteínas, pectoses e gorduras	5,0
Minerais	1,0
Umidade	8,0

Fonte: Trotman (1984).

A celulose é um polímero de β -D-glucose insolúvel em água. As propriedades físicas deste material resultam do peso molecular muito alto e do fato de não ter ramificações. O aspecto estrutural mais importante da celulose é a ligação 1,4- β das unidades de glucose. O arranjo linear das unidades de glucose com a ligação β na celulose faz com que haja uma distribuição uniforme de grupos OH nas extremidades de cada cadeia. Quando duas ou mais cadeias de celulose entram em contato, os grupos hidroxilas estão em posição ideal para unir integralmente as cadeias, formando pontes de hidrogênio (Figura 1). A ligação de muitas cadeias de celulose, por esta razão, constitui um polímero rígido, fibroso e insolúvel (SOLOMONS 1996; SILVA 2006).

Assim, a estrutura química da celulose deve ser descrita como 1,4- β -D-glucano, sendo um polímero de condensação de β -D-glucopiranosose com ligações 1,4-glucosídicas.

Figura 1 - Estrutura da celulose.

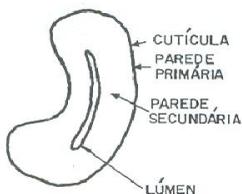


Fonte: Revello (2002).

A estrutura molecular do algodão é do tipo fibrilar. Este possui um alto grau de polimerização, n (Figura 1). Segundo Revello (2002), este valor geralmente oscila entre 2.000 e 3.000.

As fibras de algodão são constituídas por uma cutícula externa, chamada *skin* (pele), por uma parede primária, uma parede secundária e um canal central chamado lúmen, como pode ser visto na Figura 2.

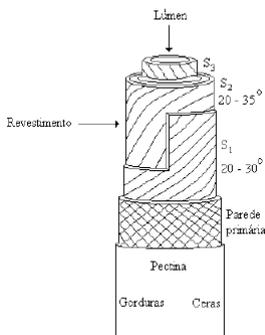
Figura 2 - Corte transversal da fibra de algodão



Fonte: Lange (2004).

As fibras sofrem torção pela tensão superficial de forma helicoidal, sendo distribuídas de maneira irregular sobre o seu comprimento e assumindo as formas de “S” e “Z”, como é mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema representativo de uma fibra de Algodão



Fonte: Adaptado de Trotman (1984).

A parede secundária, essencialmente celulósica, é a mais espessa e cristalina de todas e é composta pela camada S1, exterior e pela S2, interior. Em S1 os feixes de fibrilas estão dispostos helicoidalmente em redor de fibra, formando com o seu eixo um ângulo de 20-30°. A camada S2 constitui cerca de 95% do peso da fibra. A secção transversal de uma fibra de algodão inchada com soda cáustica mostra uma série de anéis concêntricos, devido ao aumento de volume de S2. O número destes anéis pode ser correlacionado com o número de dias de crescimento da fibra de algodão. Tal como em S1, em S2 os feixes de fibrilas estão dispostos helicoidalmente ao redor do eixo da fibra, mas formando com este um ângulo de 20-35°. Em S2 observa-se ainda que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento. A parede

terciária, S3, ou parede do lúmen, praticamente só se observa em fibras de algodão muito maduras. Nesta camada a disposição do feixe de fibrilas é similar a S1, sendo assim distinto da camada S2. O lúmen, que constitui a parte mais interior das fibras de algodão, é composto por ceras, pectina e restos de protoplasma (CAVACO-PAULO, 1995).

2.2 ENZIMAS

Atualmente mais de 3.000 enzimas diferentes têm sido isoladas e caracterizadas, principalmente a partir de organismos mesófilos. Apenas um número limitado de todas as enzimas conhecidas são comercialmente disponíveis e uma quantidade menor ainda é usada em grandes quantidades. Pelo menos 75% de todas as enzimas industriais são hidrolíticas em ação. Enzimas que degradam proteínas dominam o mercado, respondendo por aproximadamente 40% de todas as vendas de enzimas (SILVA, 2005).

As peptidases são uma classe única de enzimas que ocupam uma posição central, devido as suas aplicações em ambos os campos fisiológico e comercial.

O uso de proteases como aditivos em detergentes na década de 1960 estimulou o seu desenvolvimento comercial e levou a uma considerável expansão na investigação sobre estas enzimas (GERMANO et al., 2003).

2.2.1 Classificação das enzimas

Classificação é a organização de enzimas em grupos com atividades e características catalíticas semelhantes, enquanto que Nomenclatura é a nomeação de enzimas de acordo com um código internacional de princípios, regras e recomendações (GARCIA-CARREÑO; DEL TORO, 1997).

De acordo com a Comissão de Enzimas (E.C.), foi estabelecido que a classificação possuísse um código numérico, formado por um conjunto de 4 números separados por pontos. Neste sistema, a classificação das enzimas foi estabelecida em seis classes principais, de acordo com a reação catalisada. O primeiro dos quatro dígitos mostra qual a classe principal que a enzima pertence (CABRAL, 2005). A Tabela 2 apresenta as seis classes.

Tabela 2 - Divisão das seis classes enzimáticas

Número	Classe	Descrição Funcional
1	Oxidoredutases	Enzimas que catalisam reações envolvendo transferência de elétrons.
2	Transferases	Enzimas que transferem um grupo de um composto para outro.
3	Hidrolases	Enzimas que clivam ligações químicas por adição de água.
4	Liases	Enzimas que adicionam grupos a duplas ligações ou produzem duplas ligações por remoção de grupos.
5	Isomerases	Enzimas que transferem grupos dentro de uma molécula produzindo isômeros.
6	Ligases	Enzimas que ligam duas moléculas através de uma reação, usando eventualmente ATP como fonte energia.

Fonte: Cabral (2005).

Para hidrolases, ao qual pertencem as proteases, o segundo dígito indica o tipo de ligação afetada pela hidrólise: 1- para hidrólise de ligação éster, 2- para ligação glicosídica, 3- para ligação éter, 4- para ligação peptídica, e 5- para hidrólise de ligação C-N que não constitui ligação peptídica. O terceiro dígito de proteases pode se encontrar em uma de três faixas: 11 ao 19, 21 ao 24, e 99. O primeiro grupo, 11 ao 19, são aquelas enzimas que hidrolisam ligações peptídicas nas extremidades amina e carboxila de proteínas; essas enzimas são chamadas de exopeptidases. O segundo conjunto, 21 ao 24, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas internas nas proteínas, essas enzimas são chamadas de endopeptidases. O último grupo é reservado às enzimas cujo mecanismo de ação é desconhecido (GARCIA-CARREÑO; DEL TORO, 1997). Assim, as proteases possuem E.C. 3.4.x.x, com o terceiro número obedecendo a classificação anterior. O quarto número é seqüencial, na ordem da catalogação da enzima.

Proteases também são classificadas de acordo com seu sítio catalítico em quatro classes principais: serino proteases, cisteína proteases, aspártico proteases e metalo proteases (GRZONKA et al., 2001).

Como é conhecido, a atividade das cisteíno-peptidases depende da presença, no sítio catalítico, de um resíduo de cisteína e outro de

histidina. A ordem desses resíduos (Cys/His ou His/Cys) na sequência linear difere entre as famílias. As Cisteíno proteases (CPs) são proteínas com massa molecular de 21-30 kDa e mostram a maior atividade hidrolítica em pH 4 - 6,5 (GRZONKA et al., 2001).

Baseando-se no mecanismo químico da catálise, as peptidases pertencem a dois grupos (GARCÍA-CARREÑO; DEL TORO, 1997):

a) Aquelas que formam complexo covalente durante o estado de transição, que são as serino e cisteíno-peptidases;

b) Aquelas que não formam o complexo covalente, que são as metalo peptidases e peptidases-aspárticas.

Estas propriedades são da maior importância, pois o mecanismo de controle da atividade pelos inibidores é muito diferente. A formação do complexo covalente nas peptidases é devido à presença de aminoácidos que agem como agentes nucleofílicos, no seu sítio catalítico (VOET; VOET, 1995).

O sítio catalítico de uma enzima realiza duas funções: primeiro, ligar o substrato e segundo, catalisar a reação. A eficiência destas ações determina a atividade da enzima para um substrato particular, ou seja, a especificidade da enzima. Portanto, os estudos cinéticos das enzimas fornecem informações importantes sobre o centro catalítico através de reações com diferentes substratos. Uma importante característica do sítio ativo é seu tamanho, sendo possível medi-lo considerando a utilização de substratos ou inibidores (SCHECHTER; BERGER, 1967).

2.2.2 Enzimas Proteolíticas

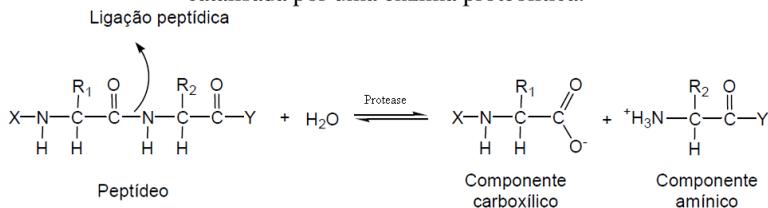
Algumas enzimas são extraídas de tecidos animais ou vegetais. Enzimas comerciais derivadas de plantas incluem as enzimas proteolíticas papaína, bromelina e ficina e algumas outras enzimas especiais como lipoxigenase extraída da soja. Enzimas derivadas de animais incluem proteinases como pepsina e renina. A maioria das enzimas são, no entanto, produzidas por microorganismos em culturas submersas em fermentadores (SILVA, 2005).

Proteases são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos, elas são onipresentes, sendo encontradas em uma ampla diversidade de fontes, tais como plantas, animais e micro-organismos (RAO et al., 2006).

Segundo Tauber (1950) todas as enzimas proteolíticas hidrolisam ligações peptídicas (Figura 4). Apesar de todas terem essa característica

funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade.

Figura 4 - Representação esquemática da clivagem de uma ligação peptídica catalisada por uma enzima proteolítica.



Fonte: Adaptado de Vieira (2007).

As enzimas em geral são afetadas pela variação de pH e temperatura. Cada enzima é cataliticamente ativa em um intervalo de pH restrito, possuindo um pH ótimo característico. A medida que o pH se afasta desse valor ótimo a velocidade da reação diminui (BELITZ; GROSCH, 1997).

Tal como para o pH, existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual a atividade enzimática é máxima. Esta variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a velocidade de reação; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Ao contrário, para as temperaturas baixas, que geralmente não tem efeito desnaturante, a repetição de transição sólido-líquido, congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas da atividade enzimática (SCRIBAN, 1985).

Crerios utilizados na seleção de uma enzima industrial incluem especificidade, taxa de reação, pH e temperatura ótima, estabilidade, efeito de inibidores e afinidade a substratos. Enzimas usadas em aplicações industriais normalmente devem ser tolerante contra vários metais pesados e não têm necessidade de cofatores (SILVA, 2005).

De modo geral, a regulação da atividade das enzimas proteolíticas ocorre por meio de proteínas inibidoras de proteases. Os inibidores de protease são proteínas ou peptídeos que compreendem um grupo específico de moléculas que têm a propriedade de formar um complexo estável com proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (VALUEVA; MOSOLV, 1999; MACEDO et al., 2007). Eles estão presentes na maior parte dos organismos vivos e

desempenham diversas funções, como a regulação da proteólise de enzimas endógenas e exógenas (GAMBÔA, 2010).

Os inibidores de proteases são particularmente abundantes (1-10% das proteínas totais) e podem atuar, por exemplo, reduzindo os danos causados por insetos, no armazenamento proteico em sementes e tubérculos, na regulação da atividade proteolítica endógena e nos mecanismos de apoptose. Além disso, inibidores de proteases estão envolvidos na resposta ao estresse causado por fatores abióticos e nos processos de defesa de plantas e ataque de insetos (GAMBÔA, 2010).

Segundo Lopes (2006), basicamente os inibidores de proteases são categorizados de acordo com a protease que eles inibem: serino, cisteíno, aspártico ou metalo protease, Tabela 3.

Tabela 3 - Família de inibidores de proteases de plantas

Proteases	Classe	Família de inibidores
Serínicas	Inibidores de proteases serínicas	Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteases cisteínicas	Cistatinas (Fitocistatinas em plantas)
Aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas
Metaloproteinases	Inibidores de Metaloproteinases	Inibidores de carboxipeptidases A eB

Fonte: Gâmbôa (2010).

Cistatina é o nome dado às proteínas inibidoras de proteases cisteínicas. O nome cistatina foi originalmente dado por Barrett (1987) a um inibidor de proteases cisteínicas do tipo papaína, isolado da clara do ovo de galinha. Desde então, esta tem sido a nomenclatura usada para as proteínas relacionadas a tal inibidor. Os inibidores de protease cisteínicas foram agrupados numa superfamília denominada cistatina, uma vez que a determinação da sequência de aminoácidos e das propriedades bioquímicas desses inibidores tem mostrado relações, a níveis de estrutura e função, com o inibidor isolado da clara de ovo de galinha. A maioria das proteases que é inibida pelas cistatinas pertence à

família da papaína. Essas proteases apresentam um peso molecular de aproximadamente 25 kDa e grande homologia com a papaína (VIDAL, 2003).

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno proteases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica. A manutenção do equilíbrio entre cisteíno proteases livres e em complexo com seus inibidores é crítico para o perfeito funcionamento de um sistema biológico (GAMBÔA, 2010).

As enzimas em geral são inibidas por três grupos de inibidores: (a) substratos que reduzem a concentração necessária de coenzimas, grupos proteicos ou metais ativadores; (b) substâncias que competem com o substrato pela enzima; (c) substâncias que destroem o grupo ativo das enzimas (TAUBER, 1950). Entre as substâncias que desativam ou inibem as enzimas estão solventes orgânicos miscíveis em água (etanol e acetona, por exemplo), solutos como uréia e detergentes.

2.2.2.1 Enzima Papaína (E.C 3.4.22.2)

Entre as principais enzimas proteolíticas estão a papaína, a bromelina e a tripsina. A mais conhecida das cisteíno-peptidases de plantas é a papaína.

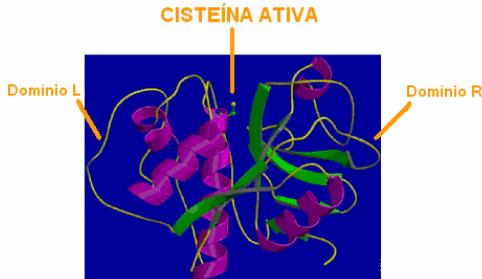
A papaína é originária do látex das folhas e dos frutos do mamão verde adulto (*Carica papaya* Linn.). Após seu preparo, é um pó de cor leitosa, com odor forte e característico, lembrando enxofre. É solúvel em água e glicerol, mas praticamente insolúvel em álcool, éter e clorofórmio. Além disso, pode ser inativada ao reagir com agentes oxidantes como ferro, oxigênio, derivados de iodo, água oxigenada, nitrato de prata, e também pela ação da luz e calor. Por ser uma enzima de fácil deterioração deve ser mantida em ambiente fresco e seco e protegida da luz (FERREIRA et al., 2005).

A papaína é constituída de uma cadeia simples, com 212 resíduos de aminoácidos, e uma massa molecular de 23406 Da, dobrada formando dois domínios (um no lado direito e outro no esquerdo) delimitando uma fenda dentro da qual o substrato pode se ligar. A molécula da papaína (Figura 5) contém ao todo 7 resíduos de cisteína, sendo que 6 destes realizam 3 ligações dissulfeto, enquanto a cisteína-25 (Cys-25) está envolvida no sítio catalítico, de acordo com Lowe (1976).

A papaína cliva, preferencialmente, ligações peptídicas envolvendo aminoácidos básicos e, também, possui atividade esterásica (CAPUCHO, 2006). Segundo Smith (1959), a papaína é classificada

como endopeptidase, cliva ligações peptídicas centrais bem como ligações terminais. Pode catalisar hidrólises, sínteses e transferir ligações peptídicas ou aminas, também pode atacar ésteres, hidrazidas, anilidas, tiol ésteres, etc.

Figura 5 - Configuração tridimensional da papaína, na qual está representada a Cisteína 25 (Cys-25), do sítio ativo da papaína e dois domínios da cadeia principal.



Fonte: Capucho (2006).

As enzimas do grupo Cisteína possuem a zona de atividade muito ampla e se encontram, dependendo do substrato, na faixa de pH 4,5 - 10 com o máximo em pH 6 - 7,5 (BELITZ; GROSCHE, 1997). Um estudo realizado por Rao e colaboradores (2006) determinou o pH ótimo da papaína como sendo entre 8 e 8,5 e a temperatura ótima entre 50 e 60°C.

Devido à sua atividade, a papaína, tem aplicação em diversas indústrias, na medicina, na odontologia e como ferramenta em pesquisas. Na indústria de alimentos é utilizada na fabricação de queijos e biscoitos, como amaciante de carne e clareador de cervejas. Na produção de detergentes a papaína é adicionada para aumentar o poder de limpeza pela degradação hidrolítica de proteínas presentes em manchas de sangue, ovo, chocolate, entre outras (CAPUCHO, 2006). Na industrialização do couro, a papaína é empregada no processo de remoção dos pêlos e amaciamento do couro, agindo na degradação do colágeno (DAMRONGSAKKUL et al., 2008).

O estudo realizado por Li, Xing e Ding (2007) avaliou a viabilidade de imobilização papaína pelo método sol-gel em tecido de algodão. Os autores concluíram que a papaína imobilizada é menos sensível ao pH, em comparação a papaína livre, já em relação a termoestabilidade a papaína imobilizada não mostra uma melhora significativa em comparação a papaína livre.

Estudo realizado por Lopes e colaboradores (2008) avaliou a segurança da utilização da papaína na pele humana. A pele humana foi exposta a papaína *in vitro* em diferentes tempos: 4, 24 e 48 horas. Após 24 horas, ocorreu mudanças na corneosomes. No entanto, as amostras de 48 horas não mostrou grandes alterações de acordo com o controle. Estes resultados indicaram que a papaína poderia ser usado com segurança sobre a pele.

Reque (2006) estudou o uso da papaína como potencializadora da penetração cutânea de diclofenaco dietilamonio em pomada. Não foi observada nos voluntários humanos, nenhuma reação adversa como eritema, pápulas ou vesículas durante o período de avaliação da alergenicidade cutânea da papaína, sendo a enzima aprovada para uso tópico. O teste de permeabilidade *in vivo* mostrou que a papaína aumentou a penetração de diclofenaco na pele quando a mesma foi tratada anteriormente com pomada contendo papaína e não quando a enzima foi administrada juntamente com o diclofenaco.

2.2.3 Imobilização de enzimas

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Como por exemplo, elevadas temperaturas, pH alcalino ou ácido, ou por ação de agentes desnaturantes, entre outros. As enzimas são de um modo geral estáveis à temperatura ambiente dos organismos de que são obtidas, e perdem a sua atividade quando a temperatura aumenta significativamente. Na indústria têxtil, a desativação deve-se ao fato da indústria operar a temperaturas muito elevadas e valores de pH não neutros, de acordo com Carneiro (2003).

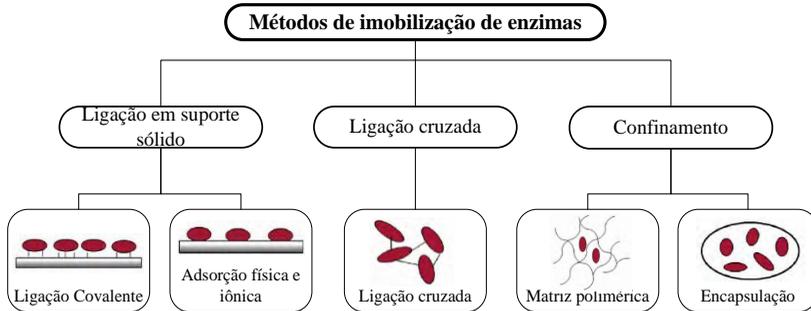
A imobilização de enzimas trouxe como vantagens imediatas, de acordo com Silva et al. (2008), a possibilidade de reaproveitamento do catalisador, o uso em processos contínuos, o aumento da estabilidade da enzima, a regeneração e o reuso do catalisador, e a redução dos custos. Porém, as desvantagens significativas seriam a aleatoriedade da interação suporte-enzima, a desorção das enzimas com o uso, a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estereo conformacionais.

As técnicas de imobilização de enzimas ficaram mais conhecidas a partir dos anos 60, e desde então vêm sendo estudadas. Alguns exemplos incluem a imobilização de celulase por glutaraldeído (TODOROVA et al., 2007), Lipase imobilizada em gel de pectina (SANTOS, 2003) e Amilase imobilizada utilizando alginato de sódio (SILVA et al., 2008). Além das enzimas, imobilizam-se, também,

células, como, por exemplo, para a produção de cerveja (CARVALHO et al., 2006).

Segundo Santos (2003), os principais métodos de imobilização (Figura 6) são: método de adesão ao suporte; método de ligação covalente cruzada e o método de imobilização por aprisionamento ou oclusão.

Figura 6 - Principais tipos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Gulrajani; Gupta (2011) e Santos (2003).

- A) *Método de adesão ao suporte*: Consiste na fixação do biocatalisador a um suporte insolúvel em água, por adsorção física, por ligação iônica ou covalente. Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos sendo que os mais comuns são a sílica, alumina, carvão ativado, e vários polissacarídeos, além de polímeros que podem ser naturais, como ágar, ou sintéticos, como o poli-óxido de etileno (SANTOS, 2003).
- B) *Método de ligação covalente cruzada*: Neste método, os suportes são especialmente funcionalizados para conter um grupamento químico, que será responsável pela imobilização da célula ao suporte (PRADELLA, 2001). Segundo Santos (2003), uma das técnicas mais utilizadas é a reação com glutaraldeído. Onde os dois grupos aldeídicos do glutaraldeído formam bases de Schiff com resíduos de aminoácidos livres da enzima formando uma rede de ligação cruzada. Este processo é também conhecido como reticulação.
- C) *Método de imobilização por aprisionamento ou oclusão*: Baseia-se fundamentalmente na retenção de enzimas no interior de uma matriz polimérica de modo a impedir a sua liberação para o meio,

permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Neste método, nenhuma reação ocorre sendo um processo de retenção física da enzima. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural, e é protegido por substâncias de alto peso molecular (SANTOS, 2003).

Geralmente a imobilização covalente é mais eficaz do que os outros métodos de imobilização de enzimas, em melhorar a resistência ao calor, perturbação química e variações de pH. Este método também é útil para evitar uma das causas principais de inativação de proteases, que é a auto-degradação proteolítica (autólise). Ligando-se covalentemente ao suporte, as proteases são impedidas de atacarem umas as outras, embora alguma perda de atividade enzimática possa ocorrer (SILVA, 2005).

Para a imobilização da papaína em microcápsulas de gelatina e goma arábica não foram encontrados resultados na literatura. Contudo, tem sido relatada na literatura a imobilização da enzima papaína, em: Membrana de copolímero de álcool vinílico/butiral vinílico (ZHUANG; BUTTERFIELDAS, 1992), esferas porosas de quitosana (ITOYAMA et al., 1994), microesferas magnéticas (LEI et al., 2004), tecido de algodão pelo método sol-gel (LI; XING; DING, 2007), esferas de sílica (WANG et al., 2008), esferas de alginato (BHATTACHARYYA et al., 2010), carboxil-modificado SBA-15 (BIAN et al., 2011), micropartículas de quitosana (VASCONCELLOS; GOULART; BEPPU, 2011), entre outros, sendo que nestes casos o objetivo da imobilização foi a reutilização da enzima.

Alguns trabalhos relatam a imobilização de outras enzimas utilizando como suporte gelatina, como por exemplo: imobilização da urease em gelatina por ligação cruzada (SUNGUR; ELCIN, 1992), β -galactosidade imobilizada em suporte de celulose-gelatina (NUMANOGLU; SUNGUR, 2004), imobilização de uma invertase em gel de gelatina (VUJCIC et al., 2011), imobilização da α -amilase em nanopartículas de prata dopadas com gelatina - goma arábica - sílica nanohíbrida (SINGH; AHMED, 2012), imobilização de uma invertase em hidrogéis de gelatina e em goma guar (BAGAL-KESTWAL et al., 2011), entre outros. Observa-se que nestes trabalhos não houve a imobilização de uma protease.

2.3 MICROENCAPSULAÇÃO

Microencapsulação é um processo de envelopamento de quantidades microscópicas de matéria em uma fina película de polímero, que forma uma parede sólida. Esta estrutura núcleo/casca permite o isolamento da substância encapsulada do entorno e, assim, protegê-lo de quaisquer fatores degradantes como a água. A substância encapsulada pode ser liberada por fusão ou dissolução da casca impermeável ou por difusão através de uma casca porosa (GIRAUD et al., 2002).

Além da função de proteção, outras vantagens podem ser associadas à encapsulação de substâncias (ALVIM, 2005):

- Conversão de substâncias líquidas ou gasosas em pós, permitindo sua melhor utilização em sistemas desidratados;
- Mascaram propriedades indesejáveis do material encapsulado como sabor, odor, pH, propriedades catalíticas, dentre outras;
- Permitir mecanismos de liberação controlada das substâncias encapsuladas para fins específicos nos produtos onde está veiculada.

Segundo Suave et al. (2006) o material encapsulante (ou de parede) é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. Os materiais mais utilizados como encapsulantes, ainda conforme Suave e colaboradores (2006), incluem:

- Carboidratos: amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celulosos;
- Gomas: goma arábica, alginato de sódio, carragena;
- Lipídeos: cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hydrogenadas;
- Poliésteres naturais: poli(hidroxicanoatos), tais como poli(3-hidroxitirato) P(3HB), poli(3-hidroxi valerato) P(3HV) e seus copolímeros;
- Polímeros sintéticos: poli(D, L-ácido láctico) (PDLA), poliacrilatos, copolímeros de polietileno-co-propileno, poli(ϵ -caprolactona) (PCL);
- Proteínas: glúten, caseína, gelatina, albumina;
- Quitosana: fonte alternativa extraída da casca de crustáceos.

O uso de polímeros biodegradáveis naturais continua a ser uma área de pesquisa ativa, apesar do advento de polímeros sintéticos biodegradáveis. Polímeros naturais permanecem atraentes porque são encontrados facilmente, relativamente barato e capazes de modificações químicas (BOGDANSKY, 1990).

A maioria das pesquisas de polímeros naturais tem se concentrado em proteínas, como colágeno, gelatina e albumina, e polissacarídeos, como amido, dextrana, inulina, goma arábica, celulose e ácido hialurônico. A maioria dos sistemas à base de proteínas produz microesferas sólidas reticuladas em que a substância ativa está dispersa por toda a matriz do polímero. A formulação de proteínas em microesferas foi ditada em grande parte por considerações relacionadas com a sua resistência mecânica, estabilidade dimensional e conformacional e as condições em que a transformação é possível (BOGDANSKY, 1990).

O encapsulamento pode ser realizado por uma variedade de métodos. Os dois principais processos industriais são a secagem por pulverização (*spray drying*) e extrusão. Liofilização, coacervação e técnicas de adsorção são também utilizadas industrialmente (MADENE et al., 2006).

2.3.1 Coacervação complexa

A escolha do método de encapsulação mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SUAVE et al., 2006).

Coacervação é a separação entre duas fases líquidas em um sistema coloidal. A fase mais concentrada em componentes coloidais é a fase coacervada e a outra fase é a solução de equilíbrio. A separação de fase associativa de dois polímeros em água ocorre se existir uma atração eletrostática. Coacervação complexa é a coacervação causada por interação de duas cargas coloidais opostas (KRUIF, 2004).

Coacervação complexa é a separação de uma mistura aquosa de poli-íons binários em duas fases distintas de líquidos; uma fase coacervada densa, rica em poli-íon e uma fase diluída de equilíbrio. A coacervação ocorre entre os íons de carga oposta sob condições específicas de pH, força iônica, peso molecular e proporção de íons, e os

resultados da competição entre as forças de atração elétrica, que tendem a acumular-se opostamente íons carregados e os efeitos da entropia, que tendem a dispersá-los (STOTT et al., 1996).

A coacervação pode ser realizada em meio aquoso ou orgânico, dependendo das propriedades físico-químicas do polímero que será empregado e do material a ser encapsulado (SUAVE et al., 2006).

Ainda segundo Suave et al. (2008), de forma geral, o processo de microencapsulação segue as seguintes etapas:

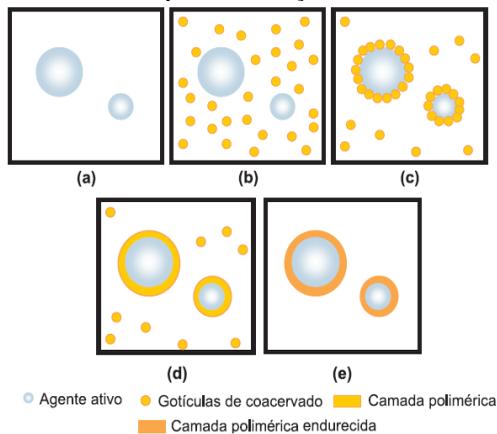
- Dispersão do agente ativo a ser encapsulado em uma solução do polímero;
- Indução da coacervação por algum método descrito anteriormente, formando gotículas de coacervado;
- Deposição das gotículas de coacervado em torno dos núcleos contendo o princípio ativo;
- Coalescência das gotículas de coacervado para formar uma camada polimérica;
- Endurecimento da camada polimérica por meio da difusão do solvente, adição de um agente reticulante, mudança de temperatura etc.

Finalmente, as microcápsulas ou microesferas obtidas são separadas do sistema por centrifugação ou filtração. A Figura 7 representa as etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

A coacervação complexa baseia-se na formação de um complexo (coacervato) entre polímeros com cargas opostas, normalmente proteínas e polissacáridos. Para esse fim, a gelatina é usada em combinação com a goma arábica em numerosos estudos (CHANG et al., 2006; FUGUET; PLATERINK; JANSSEN, 2007; ALVIM; GROSSO, 2010; DONG et al., 2011).

Entre os reticulantes utilizados para o enrijecimento da parede polimérica estão o glutaraldeído e o formaldeído, como citado por Fuguet, Platerink e Janssen (2007) e a transglutaminase, citado por Alvim e Grosso (2010).

Figura 7 - Representação esquemática das etapas do processo de encapsulação por coacervação



Fonte: Suave et al. (2006).

No presente trabalho, foram utilizados como materiais poliméricos gelatina associada à goma arábica; como reticulante o glutaraldeído; e como agentes ativos encapsulados o óleo de jojoba e o óleo de hortelã.

2.3.2 Material de Parede

2.3.2.1 Gelatina

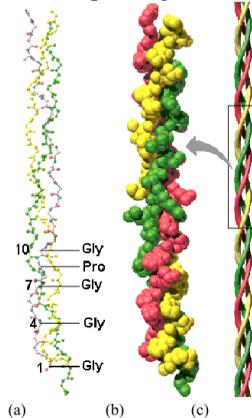
A gelatina é uma proteína derivada de colágeno, a principal proteína estrutural no tecido conjuntivo da pele de animais e óssea. A gelatina é um componente importante em um número de produtos de diferentes indústrias, como a alimentícia, farmacêutica, indústrias fotográfica e cosméticos, e ganhou uso generalizado, principalmente devido a suas propriedades multifuncionais. A propriedade mais valiosa da gelatina é provavelmente a sua capacidade de formar géis termo-reversíveis. A temperatura de fusão de géis de gelatina normalmente fica a cerca de 35-37 °C (SEGTMAN et al., 2003).

Segundo Segtmann et al. (2003) o processo de obtenção da gelatina é dado por procedimentos que têm o objetivo de separar as ligações do colágeno, as quais influenciam diretamente as propriedades físicas e químicas da gelatina. Com isso, as gelatinas comerciais podem ser agrupadas de acordo com a sua origem, e principalmente pelo processo

de fabricação, sendo as mais comuns entre elas, a do tipo A e a do tipo B. A gelatina do tipo A é obtida, principalmente, a partir de peles suínas as quais passam por um tratamento em meio ácido (com pH 5,5); de acordo com Mascarenhas (2010) possuem ponto isoelétrico entre 7,0 e 9,5. Já a gelatina do tipo B é obtida a partir de ossos ou pele bovina, que passa por um tratamento em meio alcalino com pH próximo de 9 e de acordo com Mascarenhas (2010) possuem ponto isoelétrico em torno de 4,5 a 5,3. Em seguida, os dois tipos de gelatinas passam por vários processos até a obtenção de pós. Estas quando secas, para fins de comercialização, usualmente contém em torno de 88% de proteína, 10% de água e 2% de sais. Para Meneses (2007) outros tipos de fontes de colágenos, tais como os peixes, também são adequados para obtenção de gelatina, mas raramente são usados na produção de gelatina, sendo a pele bovina e pedaços de ossos as principais matérias primas utilizadas.

Como a gelatina é produzida diretamente a partir de matérias primas ricas em colágeno, suas estruturas são semelhantes. Por isso, a gelatina é formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , duas iguais ($\alpha 1$) e uma diferenciada ($\alpha 2$), contendo cada uma 1055 e 1029 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete Glicina (Gly), com conteúdo de 33%, Prolina (Pro), 12% e Hidroxiprolina (Hypro) 11%. No conjunto, sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Figura 8) (VULCANI, 2004).

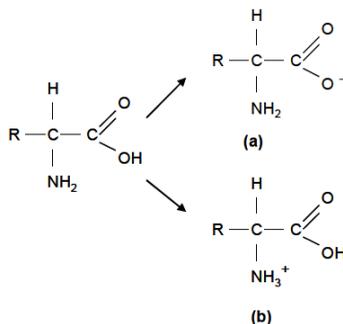
Figura 8 - Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla



Fonte: Vulcani (2004).

Para Mascarenhas (2010) as proteínas dissociadas em água possuem cargas elétricas dependentes do pH da solução e do seu ponto isoelétrico (pI). No caso da gelatina ela pode estar na forma aniônica ou catiônica, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema de aminoácidos em diferentes pH. (a): pH > pI, forma aniônica; (b): pH < pI, forma catiônica



Fonte: Mascarenhas (2010).

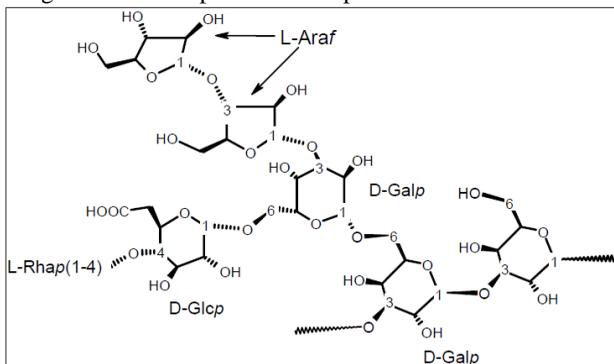
2.3.2.2 Goma Arábica

Goma arábica ou goma acácia é um produto obtido pela dessecação espontânea do exsudato dos troncos e dos ramos da *Acácia Senegal (Linne)* (GABAS; CAVALCANTI, 2003). É um polissacarídeo complexo, ramificado, neutro ou ligeiramente ácido obtido como uma mistura de cálcio, magnésio e sal de potássio (VERBEKEN et al., 2003).

A Goma Arábica não apresenta unidade repetitiva de maneira regular, porém, o hexassacarídeo ramificado, conforme esquematizado na Figura 10, pode representar a principal subunidade para esta macromolécula altamente ramificada (FÁVARO et al., 2006).

Este polissacarídeo tem larga utilização industrial, como um agente espessante, estabilizante e emulsificante, principalmente na indústria de alimentos, mas também na indústria têxtil, cerâmica, litografia, cosméticos e indústrias farmacêuticas (VERBEKEN et al., 2003).

Figura 10 - Principal unidade repetitiva da Goma Arábica



Fonte: Fávoro et al. (2006).

2.3.3 Substâncias ativas encapsuladas

Segundo Sacchetti et al. (2005) vem crescendo o interesse pelos óleos essenciais e seus componentes nas suas várias aplicações como produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, entre outros. Isto em virtude da sua relativa segurança por serem produtos naturais, pela grande aceitação pelos consumidores e por possuírem propriedades importantes como atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica.

Para Ferreira (1991) os óleos essenciais conferem características de sabores e aromas e apresentam os seguintes atributos: não influenciam na cor do produto final, são livres de enzimas e taninos, oxidam rapidamente devido as frações de terpenos e sesquiterpenos.

Como os óleos essenciais são voláteis e também podem ser oxidados, a microencapsulação torna-se uma importante alternativa de estabilização destes óleos e também permite agregar valor aos produtos onde são inseridos, aumentando sua eficácia e prolongando sua ação (LEIMANN, 2008).

No presente trabalho foram escolhidos os óleos de hortelã e de jojoba para serem encapsulados, devido as suas propriedades.

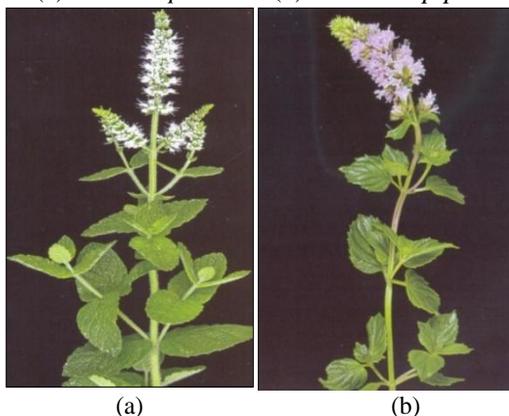
2.3.3.1 Óleo essencial de Hortelã

As plantas do gênero *Mentha*, conhecidas popularmente como hortelãs ou mentas, compreendem cerca de 30 espécies diferentes, pertencentes à ordem Tubiflorae (Lamiales) e família Lamiaceae. As hortelãs de uso popular mais freqüente são a hortelã-verde (*Mentha*

spicata L., Figura 11 (a)); o mentrasto (*Mentha rotundifolia* Huds); menta-do-levante (*Mentha citrata* Ehrhart); *Mentha crispa* L., *Mentha arvensis* L. e a hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L., Figura 11 (b)) a mais famosa das hortelãs, sendo as duas últimas as mais ricas em mentol (Figura 12a) (PEGORARO, 2007). Já o óleo da *Mentha spicata* L. é rico em carvona (Figura 12b) responsável pelo odor característico de hortelã (JIROVETZ et al., 2002).

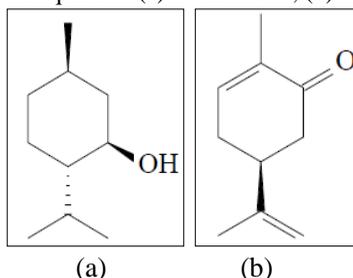
A composição química das espécies e sub-espécies da *Mentha* não varia muito em termos de grupos químicos, ocorrendo variação maior nos compostos específicos (MENTZ; BORGIGNON, 2001).

Figura 11 - (a) *Mentha spicata* L. (b) *Mentha x piperita* L.



Fonte: Lorenzi; Matos (2008).

Figura 12 - Estrutura química (a) do mentol e, (b) da Carvona



Fonte: Freire (2006).

O gênero *Mentha* vem sendo muito utilizado na indústria de fármacos, perfumes, bebidas, alimentícias, higiênicas e tabaco. Também é usado como antifúngico (MATOS et al., 2009) e antibacteriano

(SARTORATTO et al., 2004), antiviral (SCHUMACHER et al., 2003), repelente de insetos (ANSARI et al., 2000), entre outros.

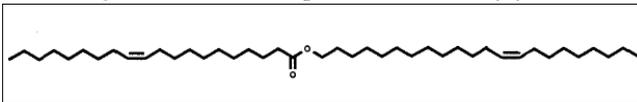
As ações terapêuticas atribuídas ao óleo essencial de *Mentha arvensis* são: antiespasmódica, expectorante, anti-histamínica, colagoga, carminativa, antiséptica, tônica e estimulante sobre o aparelho digestório, antivomitiva e antitérmica (BRITO, 2007).

3.2.3.2 Óleo de Jojoba

O óleo proveniente da semente da *Simmondsia chinensis* é um éster de cera líquida pura e não um típico triglicéride da maioria dos lipídios presentes nas sementes. Esta cera líquida é composta por ésteres derivados do C₁₈, C₂₀, C₂₂ e C₂₄ de ácidos e alcoóis monoinsaturados. A estrutura química do óleo de jojoba (Figura 13) atribui ao mesmo uma alta estabilidade e resistência à oxidação e degradação, possibilitando sua estocagem por anos em recipientes devidamente fechados, em contraste aos óleos que se tornam rançosos com o tempo (WISNIAK, 1994).

O óleo de jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) (Figura 14) e seus derivados têm encontrado uma ampla e crescente aplicação em produtos destinados aos cuidados da pele e dos cabelos (ZAGUE et al., 2005).

Figura 13 - Estrutura química do óleo de jojoba.



Fonte: Gunstone, 1990.

Figura 14 - Jojoba (a) Flor feminina; (b) Sementes e óleo.



Fonte: Gunstone, 1990.

Segundo Gunstone (1990), o óleo de jojoba tem sido utilizado principalmente pela indústria cosmética, em xampus, condicionadores e hidratantes para a pele, devido a sua característica emoliente e restauradora. É uma boa base cosmética e mesmo depois da utilização durante cerca de dez anos, não há evidência de toxicidade. O óleo tem uma estabilidade oxidativa elevada por isso é cada vez mais utilizado como um produto farmacêutico para o tratamento de acne, psoríase, e eczema e também para queimaduras solares e mãos rachadas. Ele controla a oleosidade natural da pele e não permite o crescimento microbiano na pele.

Em 2005, Habashy e colaboradores realizaram um estudo em ratos do efeito anti-inflamatório do óleo de jojoba líquido e concluíram que é eficaz no combate à inflamação em diversos modelos experimentais.

Outras utilizações incluem produtos lubrificantes (BISHT et al., 1993), alimentos (LIMA; NASSU, 1996), entre outros.

2.3.4 Glutaraldeído

Entre os muitos agentes de reticulação de proteína disponíveis, o glutaraldeído possui características únicas que o tornam um dos reagentes mais eficazes para formar ligações covalentes (reticulações ou “crosslinking”) com vários grupos funcionais de proteínas, como a amino, tiol, fenol e imidazol, de acordo com Migneault et al. (2004).

O glutaraldeído (GDA) foi introduzido inicialmente na área biológica, como agente de fixação de tecidos, para a sua observação através de microscopia eletrônica de transmissão. Sua função é reagir com grupos ϵ -amino de resíduos de lisina, presentes nas proteínas, para formar ligações cruzadas por meio de bases de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$) (Figura 16 (1)). Sua aplicação estendeu-se posteriormente a outras áreas, que incluem técnicas de imobilização de enzimas e a estabilização de matrizes colagênicas para vários tipos de aplicações, tais como a confecção de válvulas cardíacas ou géis de colágeno injetáveis (YOSHIOKA et al., 1995).

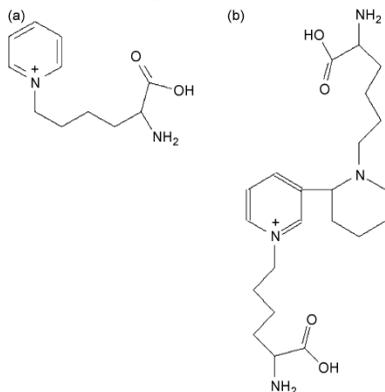
Este agente reticulante é um dialdeído de 5 carbonos, claro, incolor a amarelo-pálido, líquido oleoso penetrante, é solúvel em todas as proporções em água e álcool, bem como em solventes orgânicos. Em solução pode apresentar-se em pelo menos 13 formas diferentes dependendo das condições, tais como pH, concentração, temperatura, etc (MIGNEAULT et al., 2004).

Na microencapsulação por coacervação complexa, as propriedades dos coacervatos, inicialmente determinada pela natureza dos polímeros utilizados para elaborar o material de parede da cápsula, podem ser modificadas por reações químicas com reagentes específicos. A adição de glutaraldeído para microcápsulas de gelatina baseada em coacervação complexa, por exemplo, resulta em uma reticulação parcial tornando as microcápsulas mais resistentes ao calor e à umidade (FUGUET; PLATERINK; JANSSEN, 2007).

O glutaraldeído pode polimerizar facilmente para formar estruturas complexas que, por sua vez podem reagir com os biopolímeros do coacervato complexo (FUGUET; PLATERINK; JANSSEN, 2007).

Hardy et al. (1979) estudaram a reação de GDA com a proteína ovoalbumina e concluíram que existem dois principais produtos de reação. Ambos os compostos são com base numa estrutura de piridínio quaternário (Figura 15), além de outras estruturas não identificadas.

Figura 15 - Produtos da ligação cruzada de GDA baseada em íons piridínio quaternário

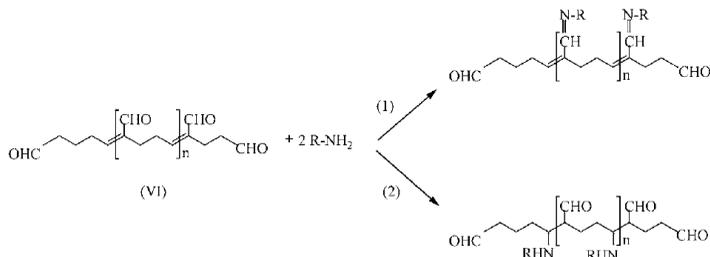


Fonte: Hardy et al. (1979).

Além do uso na reticulação da parede polimérica de microcápsulas de gelatina e goma arábica, o glutaraldeído também é utilizado para imobilização de enzimas, sendo muito citado na literatura existente, mas ainda não há acordo sobre as principais espécies reativas que participam no processo de reticulação, porque as formas monoméricas e poliméricas estão em equilíbrio (MIGNEAULT et al.,

2004). Ele pode reagir com proteínas por vários meios, tais como base de Schiff ou adição de Michael, como mostra a Figura 16.

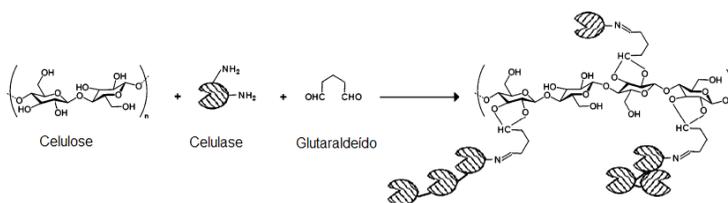
Figura 16 - Reações do glutaraldeído com proteínas, base de schiff (1) e Adição de Michael (2)



Fonte: Migneault et al. (2004).

Um estudo realizado por Todorova et al. (2007), avaliou a possibilidade da utilização de algodão como matriz para a liberação controlada de corante reativo como composto modelo. O tecido tingido com corante reativo foi revestido com uma enzima celulase imobilizada com glutaraldeído. A liberação do composto modelo foi realizada através da hidrólise das fibras de algodão pela ativação da enzima em tampão suor, onde o aumento da concentração de corante foi observado. Os resultados confirmaram a viabilidade do algodão como matriz natural para sistemas controlados mostrando este método como uma técnica promissora para liberar substâncias em roupas de algodão, como fragrâncias. A Figura 17 mostra uma possível ligação cruzada entre a celulose, a enzima e o glutaraldeído citados no trabalho.

Figura 17 - Possibilidade de ligação cruzada entre a celulose, enzima e glutaraldeído



Fonte: Todorova et al. (2007).

Para o processo de imobilização podem ser utilizados vários tipos de agentes reticulantes para ligar a molécula desejada ao suporte. Estes

reticulantes são moléculas de massa molecular muito menor que a massa molecular da cadeia principal entre duas ligações cruzadas consecutivas e normalmente apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (OREFICE, 2006).

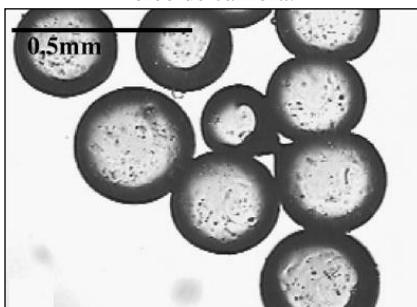
2.3.5 Aplicações de Microcápsulas e avaliação da liberação controlada.

Na microencapsulação, em geral, o número de aplicações comerciais na indústria têxtil continua a crescer particularmente nas indústrias têxteis da Europa Ocidental, Japão e América do Norte. O movimento pelos países mais desenvolvidos em tecidos com propriedades novas e valor agregado, em têxteis técnicos e para a área médica, por exemplo, tem incentivado a indústria a utilizar processos de microencapsulação como um meio de transmitir acabamentos e propriedades em produtos têxteis que não eram possíveis ou custo-benefício favorecia outra tecnologia. Vêm crescendo o interesse dos fabricantes de têxteis em aplicativo de fragrâncias duráveis, bem como hidratantes de pele (NELSON, 2002).

Outras aplicações potenciais incluem repelentes de insetos (SPECOS et al., 2010), corantes (CHANG et al., 2003), vitaminas (SHI; TAN, 2002), enzimas (NARITA et al., 2009), em aplicações médicas específicas (VERGARO et al., 2011), antibióticos (PETITTI; BARRESI; VANNI, 2009), hormônios (TAKADA et al., 2003), entre outros.

Chang et al. (2006) encapsularam óleo de cânfora com adição de poliestireno, em microcápsulas de gelatina e goma arábica obtidas pelo método de coacervação, utilizando glutaraldeído como reticulante. Foi avaliada a liberação do óleo e o comportamento das cápsulas preparadas em diferentes condições. Obtiveram uma eficiência de encapsulação em torno de 99,6% e a liberação do óleo ocorre de forma exponencial, normalmente a uma taxa mais elevada no início. A Figura 18 apresenta as microcápsulas produzidas pelos autores.

Figura 18 - Micrografia das microcápsulas de gelatina e goma arábica contendo óleo de cânfora.



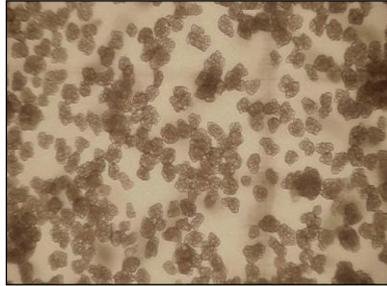
Fonte: Chang et al. (2006)

Dong et al., (2011) analisaram a morfologia e o perfil de liberação para microcápsulas obtidas por coacervação complexa contendo óleo de hortelã-pimenta, utilizando como reticulante transglutaminase. Os autores observaram que as microcápsulas em solução possuíam formato esférico, transparentes e multinucleadas. Verificaram que quanto menor a espessura da microcápsula maior era a taxa de liberação em água quente. Já em água fria a liberação foi mais lenta. Sendo assim, as microcápsulas possuíam uma excelente estabilidade de armazenamento em água fria.

Alvim e Grosso (2010) analisaram o tipo de reticulação e o processo de secagem na liberação do encapsulado para microcapsulas obtidas por coacervação complexa. Partículas úmidas reticuladas com glutaraldeído na concentração de $1,0 \text{ mM.g}^{-1}$ de proteína foram mais eficientes na retenção do recheio comparadas a $0,1 \text{ mM.g}^{-1}$ de proteína ou reticuladas com transglutaminase (10 U.g^{-1} de proteína). A secagem influenciou fortemente no perfil de liberação do recheio, reduzindo a quantidade liberada para todas as amostras secas.

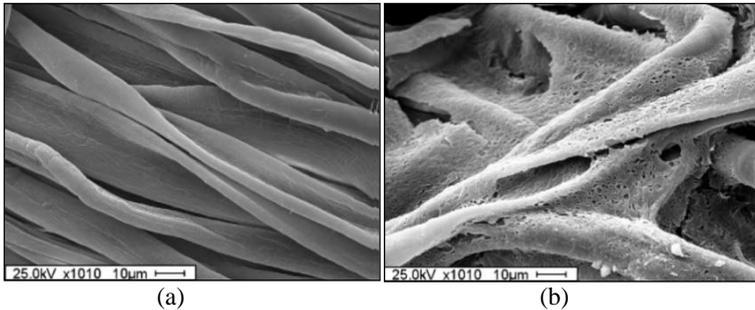
No estudo realizado por Specos e colaboradores (2010) foram elaboradas microcápsulas pelo método de coacervação complexa contendo óleo essencial de citronela. Estas foram posteriormente aplicadas em tecidos de algodão, por meio de banho de revestimento aquoso, a fim de avaliar a eficiência da repelência do tecido. A Figura 19 apresenta as microcápsulas elaboradas pelos autores e a Figura 20 apresenta o tecido sem e com o tratamento.

Figura 19 - Microfotografias ópticas das microcápsulas contendo óleo essencial de citronela x100.



Fonte: Specos et al. (2010).

Figura 20 - Micrografias do tecido não tratado (a) e do tecido tratado com as microcápsulas (b).



(a)

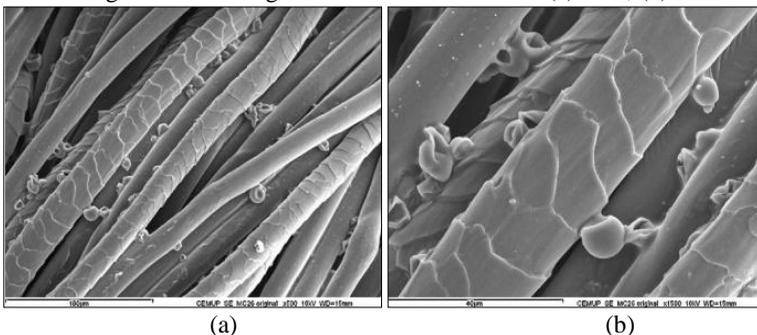
(b)

Fonte: Specos et al. (2010).

O tecido tratado com as microcápsulas de citronela apresentou uma proteção maior quando comparados com outros métodos, o efeito repelente foi superior a 90% por três semanas.

Rodrigues et al. (2009) verificaram a aplicação de microcápsulas de poliuretano/uréia contendo fragrância em substrato têxtil. A aplicação foi realizada pelo Foulard, sendo que a solução de aplicação continha as microcápsulas, um amaciante e poliéter poliuretano como agente de auto-reticulação. Após a aplicação o tecido foi seco por 3 min a 100°C e termofixado a 140°C durante 3 min. A Figura 21 apresenta as microcápsulas impregnadas no tecido.

Figura 21 - Micrografias dos tecidos tratados (a)500x; (b)1500x



(a)

(b)

Fonte: Rodrigues et al. (2009).

As microcápsulas utilizadas neste trabalho são formadas por materiais biopoliméricos e os óleos encapsulados são naturais. As microcápsulas podem ser aplicadas ao tecido de algodão no processo de acabamento do mesmo, não necessitando de maiores dispêndios de energia. Visto o exposto, este trabalho vem a contribuir para a introdução de tecnologias emergentes no setor têxtil, especificamente na microencapsulação de fragrâncias e sua aplicação em tecidos de algodão, visando agregar maior valor ao produto final.

CAPÍTULO III

Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos, resultados e discussões e as conclusões, relacionados à avaliação da enzima livre e imobilizada e à formação das microcápsulas e imobilização da enzima na parede polimérica.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA em parceria com o Laboratório de Controle de Processos – LCP, ambos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. A pesquisa foi realizada com apoio do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-LCME-UFSC.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção apresenta os materiais, bem como a descrição dos procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental desta etapa do trabalho.

No item “Reagentes e materiais” estão descritos os principais reagentes e materiais utilizados durante toda a fase experimental, incluindo os procedimentos descritos nos próximos capítulos.

No item “Preparo de soluções” estão apresentadas as soluções utilizadas durante toda a fase experimental, incluindo os procedimentos descritos nos próximos capítulos.

3.1.1 REAGENTES E MATERIAIS

O tecido 100% algodão, pré-alvejado e sem branqueamento óptico e o amaciante foram gentilmente doados pela empresa Coteminas®.

A gelatina farmacêutica tipo A e o óleo essencial de hortelã foram doados gentilmente pelas empresas Gelita do Brasil e Duas Rodas, respectivamente.

O óleo de jojoba utilizado é da marca Ferquímica.

A enzima utilizada neste estudo foi a enzima papaína originária da *Carica papaya* em pó com atividade enzimática, fornecida pelo fabricante, de 3,1 U/mg da marca Sigma. Esta enzima foi escolhida devido sua característica de hidrolisar proteínas como a gelatina, clivando ligações peptídicas e devido sua faixa de ação em relação ao pH e temperatura serem as desejadas neste estudo.

Os reagentes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho, bem como os equipamentos, estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais reagentes químicos e equipamentos utilizados.

Reagente	Marca
Acetato de sódio Anidro P.A.	Nuclear
Ácido acético glacial P.A.	Biotec
Ácido o-fosfórico 85% P.A.	Lafan
Ácido Tricloroacético P.A. ACS	Vetec
Álcool etílico absoluto	Nuclear
Amaciante	-
Azul de Coomassie Brilhante G 250	Vetec
Caseína pura	Synth
Cloreto de amônia	Lafan
Cloreto de sódio	Synth/Vetec
EDTA Sal Dissódico P.A	Vetec
Enzima papaína	Sigma
Fosfato de potássio monobásico P.A.	Lafan
Fosfato de sódio dibásico dihidratato	Sigma-Aldrich
Gelatina farmacêutica tipo A	Gelita
Glutaraldeído (sol. 25% em água)	Vetec
Goma arábica	Vetec
Hidróxido de amônio	Neon
Hidróxido de sódio	Nuclear
L-Cisteína Cloridrato P.A	Vetec
L-Cisteína Cloridrato P.A.	Vetec
L-Tirosina P.A.	Synth
Óleo de jojoba	Ferquímica
Óleo essencial de hortelã	Duas Rodas
Uréia	Vetec
Equipamento	Marca_{modelo}
Agitador magnético	Dist
Balança analítica	Mettler Toledo
Banho termostático	Dist
Cromatógrafo Gasoso	Shimadzu GC-2010AF
Espectrofotômetro UV-VIS mini 1240	Shimadzu
Foulard	Mathis FVH
Liofilizador	Liotop L101
Mastersizer	Malvern Instruments 2000
Microscópio eletrônico de varredura	Jeol JSM-6390LV

Continuação

Microscópio ótico trinocular MiniScan EZ Peneira 400Mesh, 38Mic pHmetro Rama Ultra-Turrax IKA® T25 digital	Bioval _{L-2000A} HunterLab _{4500L} Endecotts Quimis Mathis _{LTE-S} IKA
---	--

3.1.2 PROCEDIMENTOS

3.1.2.1 Preparo das Soluções

3.1.2.1.1 Solução tampão fosfato e Solução tampão acetato

A solução de tampão fosfato foi inicialmente preparada duas soluções, uma de fosfato de sódio dibásico dihidratado 50 mM e a outra de fosfato de potássio monobásico 50 mM. Sob agitação magnética, foi dosando-se um pouco de cada fosfato até que se alcançasse o pH desejado.

A solução de tampão acetato, inicialmente foi preparado uma solução de acetato de sódio 50 mM e a esta foi adicionado aos poucos a solução de ácido acético glacial 50 mM, até que se alcançasse o pH desejado.

Estas soluções foram utilizadas na avaliação do pH e da temperatura de operação ótima. A solução tampão fosfato também foi utilizada ao longo dos experimentos.

3.1.2.1.2 Solução de enzima papaína

A solução de enzima foi preparada diluindo a quantidade necessária de enzima, para a concentração final de 1 mg/mL, na solução de tampão fosfato ou acetato no pH desejado.

Esta solução foi utilizada na avaliação do pH e da temperatura de operação ótima da enzima.

3.1.2.1.3 Solução de caseína

A solução de caseína foi preparada diluindo a quantidade de caseína necessária para concentração de 2,5% (m/v), em 20 mL da solução de fosfato de sódio dibásico dihidratado 50mM contendo 3 mL de NaOH 1 M, sob agitação magnética constante. Após completa

dissolução da caseína, foi ajustado o pH desejado com as soluções de fosfato de sódio dibásico dihidratado 50mM e a de fosfato de potássio monobásico 50 mM, para um volume final de 100 mL.

Esta solução foi utilizada na avaliação do pH e da temperatura de operação ótima, na determinação de atividade enzimática e em todos os experimentos que avaliaram a ação da enzima.

3.1.2.1.4 Solução ativadora

Preparou-se a solução de L-cisteína 50 mM diluindo a quantidade necessária em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Para a solução de EDTA seguiu-se o mesmo procedimento, para uma concentração final de 20 mM. A solução ativadora foi preparada colocando 50% de cada solução.

Esta solução foi utilizada em todos os experimentos que avaliaram a ação da enzima.

3.1.2.1.5 Solução de L-Tirosina e de Albumina Serica Bovina (BSA)

As soluções de L-Tirosina e de BSA foram preparadas para construir as curvas de calibração, para leituras em espectrofotômetro. A curva padrão de L-Tirosina foi utilizada para determinação de atividade enzimática e a curva de BSA utilizada para a determinação de proteína. A solução de L-Tirosina foi preparada em tampão fosfato 50 mM pH 7,5, variando as concentrações de 0 a 1 mg/mL (0 a 5,52 $\mu\text{mol/mL}$). Já a solução de BSA foi preparada em água destilada, variando a concentração de 0 a 1 mg/mL.

3.1.2.2 Determinação de Proteína

Para a determinação de proteína foi utilizado o Método de Bradford (1976), o qual se baseia na ligação do corante Azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isso ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular. A ligação ocorre muito rapidamente cerca de dois minutos e permanece por até uma hora (BRADFORD, 1976). Segundo Zaia, D.; Zaia, C. e Lichtig (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio deste para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

O Reagente de Bradford foi preparado com 100 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvido em 50 mL de etanol e 100

mL de ácido *o*-fosfórico (85%). Após homogeneização da mistura foi adicionado água destilada até completar o volume de 1000 mL. A solução foi filtrada, em sistema a vácuo e armazenada em frasco âmbar.

A concentração de proteína total foi determinada pela adição de 100 µL da amostra em 5 mL do Reagente de Bradford. Agitou-se e após 5 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando Albumina Sérica de Bovino (BSA) como padrão na faixa de 0 a 1 mg/mL.

3.1.2.3 Quantificação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Arnon (1970), também utilizada por Nitsawang (2006), com algumas modificações. Este método utiliza caseína como substrato.

A hidrólise da caseína pela enzima papaína fornece como produto L-Tirosina, o qual é medido por espectrofotômetro e quantificado por meio da curva de calibração pré estabelecida entre as concentrações de 0 e 1 mg/mL.

A mistura de reação contendo 2 mL de solução da enzima papaína 1 mg/mL, 0,5 mL da solução ativadora e 2 mL da solução de caseína 2,5% (m/v), foi incubada a 37°C por 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v), permanecendo em repouso até entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugada a 6484,4 xg, durante 5 min e a leitura de absorbância do sobrenadante foi realizada, com o branco sendo a enzima acrescentada após a adição do TCA 10% (m/v), em espectrofotômetro a 275 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de L-Tirosina por minuto, nas condições experimentais. A atividade específica foi calculada dividindo-se a atividade total (U/mL) pela concentração de proteína contida na enzima e expressa como U/mg de proteína. A atividade para a enzima imobilizada foi calculada dividindo-se a atividade total (U/mL) pela concentração de microcápsulas inseridas no meio, expressa como U/mg de suporte.

3.1.2.4 Cinética de Hidrólise da caseína pela ação da enzima livre e pela enzima imobilizada

Os ensaios da cinética de hidrólise da caseína pela enzima livre foram realizados em reator, contendo 50 mL da solução de caseína 2,5% (m/v), 10 mL da solução ativadora e 40 mL da solução da enzima papaína 1 mg/mL. A reação aconteceu em banho termostático à temperatura de 37°C, sob agitação de 100 rpm/min. Periodicamente foram retiradas alíquotas de 1,5 mL, as quais foram acrescentadas 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para interromper a reação. A amostra foi centrifugada a 6484,4 xg, durante 5 min e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275 nm.

Para a enzima imobilizada, a cinética de hidrólise da caseína para determinação da atividade enzimática foi determinada seguindo o mesmo procedimento anterior, porém acrescentando 5 g de microcápsulas em 50 mL da solução de caseína 2,5% (m/v), 10 mL da solução ativadora e 40 mL da solução tampão 50 mM pH 7,5. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas periodicamente e acrescentado 1 mL de TCA 10% (m/v). Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 6484,4 xg, durante 5 min e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275 nm.

3.1.2.5 Avaliação do óleo de hortelã, óleo de jojoba e amaciante sobre a ação da enzima livre

A inibição causada pelo óleo de hortelã, óleo de jojoba e pelo amaciante sobre a ação da enzima foi avaliada. A concentração de amaciante adotada para o ensaio foi a mesma praticada na indústria para aplicação no tecido, já as concentrações dos óleos, desejou-se que fosse superior a aplicada para a encapsulação (8,33 mg/mL) e com isso garantir o excesso e a máxima interferência.

Em 15 mL da solução do composto desejado (amaciante (150 mg/mL) ou óleo de hortelã (50 mg/mL) ou óleo de jojoba (50mg/mL)), foi adicionado 10 mL da solução de enzima 1 mg/mL e 5 mL da solução ativadora. Esta solução permaneceu em temperatura ambiente por 5min e em seguida foi adicionado 15 mL da solução de caseína 2,5% (m/v). Todas as soluções possuem o pH 7,5. A reação aconteceu em banho termostático com agitação de 100 rpm/min, a 37°C por 1 h. Periodicamente foram retiradas alíquotas de 1 mL nas quais foram adicionados 1 mL de TCA 10% (m/v) para interromper a reação, permanecendo em repouso até entrar em equilíbrio com a temperatura

ambiente. Após, centrifugou-se a 6484,4 xg, durante 5 min e o sobrenadante analisado em 275nm. O ensaio para o controle foi realizado adicionando 15 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,5 no lugar dos compostos estudados. O branco foi preparado acrescentando a enzima após a adição do TCA 10% (m/v).

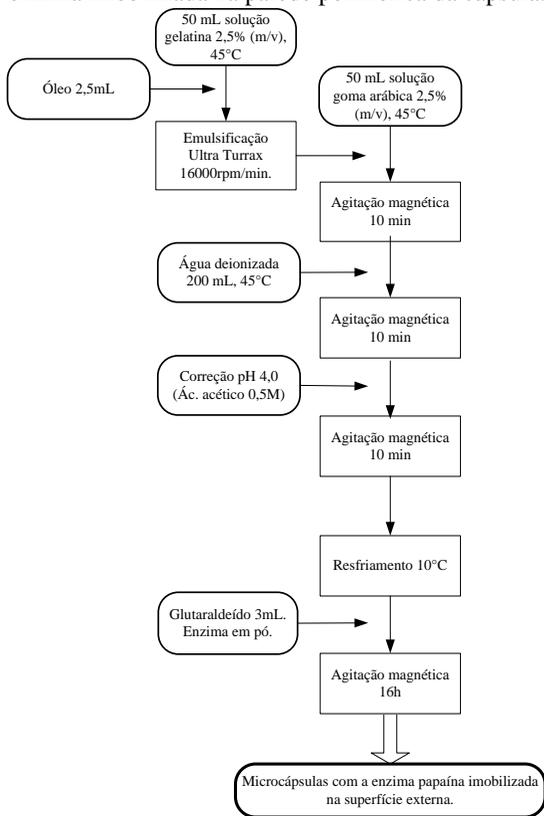
3.1.2.6 Formação das microcápsulas e Imobilização da enzima

As microcápsulas foram formadas seguindo a metodologia proposta por Alvim (2005) e adaptada por Venturelli (2012), porém com algumas modificações, como por exemplo, o acréscimo da enzima na etapa de reticulação.

O Fluxograma apresentado na Figura 22 ilustra o procedimento seguido. Preparou-se 50 mL de solução de gelatina 2,5% (m/v), a qual permaneceu sob agitação em agitador magnético com chapa de aquecimento até atingir a temperatura de 45°C. A esta solução acrescentou-se 2,5 mL de óleo (jojoba ou hortelã) e agitou-se em ultraturrax a 16000 rpm por 1 min, formando uma emulsão. Paralelamente foram preparados 50 mL de solução de goma arábica 2,5% (m/v) sob agitação em agitador magnético com chapa de aquecimento até atingir 45°C.

A emulsão formada anteriormente foi acrescentada na solução de goma arábica, a qual permaneceu sob agitação magnética por 10 min. Em seguida, acrescentou-se 200 mL de água deionizada a 45°C, agitou-se por mais 10 min e foi realizada a correção do pH para 4, com adição da solução de ácido acético 0,5 M, permanecendo sob agitação por 10 min. Posteriormente, submeteu-se a solução ao resfriamento até 10°C ainda sob agitação. Após, acrescentou-se 3 mL de Glutaraldeído e a quantidade desejada de enzima. Nessa etapa de reticulação foi acrescentada a enzima para que fosse imobilizada na parede polimérica das microcápsulas. A solução permaneceu sob agitação magnética a 10°C por 16 h.

Figura 22 - Fluxograma do processo de obtenção das microcápsulas contendo a enzima imobilizada na parede polimérica da cápsula.



Após o preparo das microcápsulas, as mesmas foram peneiradas em peneira de 400 Mesh e lavadas com 200 mL de água destilada gelada, como mostra a Figura 23. As amostras foram armazenadas em refrigeração a 4°C. A água residual e de lavagem foram submetidas à determinação de atividade (segundo o método descrito no item 3.3.3).

Avaliou-se qual a melhor concentração de enzima para a imobilização. As concentrações analisadas foram de 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/mL, para ambos os óleos. A melhor concentração foi aquela que possibilitou a peneiração, a liofilização e a solubilização novamente da microcápsula, para então ocorrer à hidrólise pela ativação da enzima a 37°C e a liberação do óleo encapsulado.

Para visualização das microcápsulas foi utilizado o microscópio óptico que se encontra no Laboratório de Controle de Processos – LCP,

do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC.

Figura 23 - Etapa de lavagem das microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada na parede polimérica.



3.1.2.7 Avaliação da ação da enzima na hidrólise das microcápsulas

Com o intuito de verificar se a enzima realmente hidrolisava as microcápsulas na temperatura desejada, adicionou-se em 2 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,5, 0,5 g de microcápsulas contendo a enzima imobilizada, a solução foi mantida sob agitação (100 rpm/min) por 60 min a 37°C. O controle foi realizado nas mesmas condições, porém foram utilizadas as microcápsulas sem a enzima imobilizada. Ao fim, foi analisada em microscópio ótico a presença de microcápsulas no meio, para ambos os casos.

3.1.2.8 Rendimento da imobilização

Calculou-se o rendimento de imobilização ao final da reação de encapsulação, considerando-se assim a presença do óleo de jojoba e os interferentes inerentes do processo.

O rendimento de imobilização foi determinado seguindo o proposto por Arnon (1970) e Lei (2004), pela Equação a seguir.

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \cdot 100 \quad (01)$$

Onde:

A = Representa a atividade da enzima inicial.

B = Atividade da água residual e da água de lavagem após o procedimento de imobilização.

As atividades foram determinadas conforme descrito no item 3.1.2.3.

3.1.2.9 Liofilização das microcápsulas

A liofilização foi realizada no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos – PROFI, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - UFSC, utilizando o Liofilizador L101. As amostras foram congeladas em contato com o condensador a $-60 \pm 2^\circ\text{C}$ (em média 12h) e em seguida submetidas à liofilização (em média 24h).

3.1.2.10 Determinação da distribuição de tamanho das microcápsulas

A distribuição de tamanho das microcápsulas foi avaliada apenas para as microcápsulas contendo óleo de hortelã. A técnica de análise foi a de difratometria a laser utilizando o equipamento Mastersizer 2000 no Laboratório de Farmacotécnica, do Departamento de Farmácia – UFSC. Este equipamento tem como princípio a difração a laser para determinar a distribuição do tamanho das partículas na faixa de diâmetro entre 20 nm a 2000 μm .

As microcápsulas após a reação de obtenção foram peneiradas em peneiras de 400Mesh, lavadas com água destilada e armazenadas para posterior análise. A água foi utilizada como meio não-solvente.

A análise fornece o diâmetro médio ($D_{4,3}$) das partículas e medidas do diâmetro da microcápsula denotadas $d_{0,1}$, $d_{0,5}$ e $d_{0,9}$, bem como o SPAN. $d_{0,1}$ indica que 10% da distribuição de tamanho da microcápsula é inferior valor de $d_{0,1}$ e o parâmetro $d_{0,9}$ indica que 90% da distribuição de tamanho da microcápsula é inferior ao valor de $d_{0,9}$. Já $d_{0,5}$ é o parâmetro que divide a distribuição percentual de volume obtida exatamente na metade, ou seja, 50% do volume total das microcápsulas da fase dispersa encontram-se abaixo do valor de $d_{0,5}$ e 50% encontram-se acima dele. O SPAN é indicativo de polidispersão ou monodispersão das partículas. Pode ser calculado pela equação a seguir.

$$SPAN = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (02)$$

3.1.2.11 Determinação do pH e da temperatura ótimos para a enzima livre e para a enzima imobilizada

A determinação do pH e da temperatura ótimos foram obtidos realizando-se ensaios de hidrólise da caseína para diferentes pH e diferentes temperaturas. Os pH avaliados foram de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8, já as temperaturas foram de 25, 37, 45, 50, 55 e 60°C. Para a enzima livre, em 2 mL da solução de caseína (2,5% (m/v)) preparada no pH desejado, adicionou-se 2 mL da solução de enzima (1 mg/mL) (preparada no pH desejado) e 0,5 mL da solução ativadora. Esta mistura permaneceu em banho termostático, sob agitação, na temperatura desejada e após 5 min foi acrescentado 2 mL de TCA 10% (m/v) para interromper a reação. Em seguida centrifugou-se a 6484,4 xg, durante 5 min e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275nm.

Para a enzima imobilizada seguiu-se o mesmo procedimento, acrescentou-se 0,5 g de enzima imobilizada em 2 mL da solução de caseína (2,5% (m/v)) preparada no pH desejado) e 0,5 mL da solução ativadora, permanecendo na temperatura desejada por 10 min. Em seguida acrescentou-se 2 mL de TCA 10% (m/v). Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo e analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275 nm.

3.1.2.12 Avaliação do tempo de meia vida da enzima imobilizada

A avaliação do tempo de meia vida da enzima imobilizada foi realizada para a temperatura de 37°C. Para tanto, foi submetido 0,150 g de microcápsulas liofilizadas em 2 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,5, as quais permaneceram incubadas na temperatura desejada e sob agitação por diferentes tempos: 5, 10, 20, 25, 30, 60, 120 min. Ao fim de cada tempo foi adicionado 2 mL da solução de caseína 2,5% (m/v), a mistura reagiu por 10 min na temperatura desejada, sob agitação e então acrescentou-se 2 mL TCA 10% (m/v) para interromper a reação. Após entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente foi submetida à centrifugação a 6484,4 xg, durante 5 min e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro e analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 275 nm.

O tempo de meia vida é o tempo necessário para que a enzima diminua em 50% sua atividade.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Serão apresentados neste item os resultados obtidos para a microencapsulação do óleo essencial de hortelã e para o óleo de jojoba, e a avaliação da enzima livre e imobilizada. Sendo que o objetivo principal foi obter microcápsulas com a enzima imobilizada. Desta forma, serão apresentadas as seguintes seções:

- a- Determinação de proteína;
- b- Avaliação da influência do óleo de jojoba, óleo de hortelã e do amaciante sobre a ação da enzima livre;
- c- Obtenção das microcápsulas contendo a enzima imobilizada;
- d- Rendimento da imobilização;
- e- Distribuição de tamanho das microcápsulas;
- f- Determinação do pH e temperatura ótimos para a enzima livre e imobilizada;
- g- Determinação da atividade enzimática da enzima livre e da enzima imobilizada;
- h- Verificação do tempo de meia-vida para a enzima imobilizada.

3.2.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação de proteína permite avaliar o grau de pureza da enzima, uma vez que pode conter impurezas oriundas do processo de obtenção e purificação da mesma. Esta análise foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (1976). A concentração encontrada em 1 mg/mL da solução de enzima foi de 0,402 mg/mL \pm 0,03 de proteína. Isto é, há 0,402 mg de proteína/mg do pó enzimático. Indicando que a enzima contém aproximadamente 60% de outros componentes e apenas 40% de proteína. Esta concentração pode variar de acordo com o tipo de enzima e sua origem.

Capucho (2006) em seu estudo avaliou a enzima papaína de origem *Carica papaya* fornecida por dois fabricantes e a concentração de proteína encontra foi de 0,119 mg de proteína/mg de matéria prima para o fabricante A, e 0,847 mg de proteína/mg de matéria prima para o fabricante B.

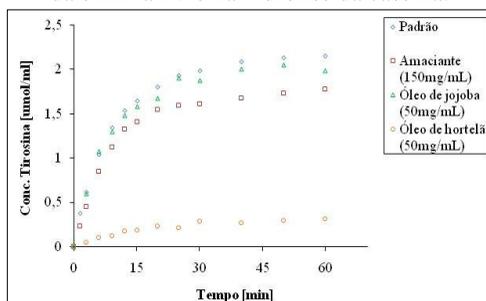
3.2.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE JOJOBA, ÓLEO DE HORTELÃ E DO AMACIANTE SOBRE A AÇÃO DA ENZIMA LIVRE

A atividade da enzima pode ser influenciada por vários fatores, como temperatura, pH, inibidores presentes no meio reacional, entre outros. Em virtude disso, avaliou-se a ação da enzima sob a influência dos óleos a serem encapsulados, jojoba e hortelã, uma vez que a enzima permanece em contato com estes óleos durante o processo de formação das microcápsulas; e do amaciante, pois as microcápsulas podem ser aplicadas direto com o amaciante ao tecido de algodão.

A Figura 24 apresenta o perfil de hidrólise da caseína 2,5% (m/v) pela ação da enzima livre 1 mg/mL sob diferentes possíveis inibidores. Pode-se observar que no tempo de 60 min todos os componentes analisados influenciaram na ação da enzima quando comparados com a hidrólise controle. O óleo de jojoba foi o que interferiu em menor escala, cerca de 8%, o amaciante em torno de 17,5%, sendo o óleo de hortelã o maior inibidor da papaína, cerca de 85%, o desvio médio para todos os ensaios foi de $\pm 0,03$.

A inibição sofrida pela enzima, neste caso, torna-se interessante, pois pode ajudar na sua estabilidade, porém uma inibição muito alta aumenta o custo de produção, já que seria preciso utilizar uma quantidade maior de enzima.

Figura 24 - Influência do amaciante e dos óleos de jojoba e hortelã sobre a ação da enzima livre na hidrólise da caseína.



O óleo de jojoba é constituído principalmente de ésteres derivados do C₁₈, C₂₀, C₂₂ e C₂₄ de ácidos e alcoóis monoinsaturados, como descrito anteriormente, e estes constituintes provavelmente não interferem significativamente na ação enzimática.

O amaciante possui surfactante na sua composição, alguns surfactantes podem inibir a ação enzimática. Porém, enzimas apropriadas (principalmente proteases, amilases, celulases ou lípases) têm sido testadas e utilizadas como componentes em detergentes. Proteases são frequentemente utilizadas para este propósito (SAFARÍK; SAFARÍCOVÁ, 1994).

Já o óleo de hortelã afeta consideravelmente a ação catalítica da papaína, provavelmente em virtude do mentol presente na sua composição. O óleo essencial de *Mentha* possui ação contra várias cepas bacterianas, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenos*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras, bem como no combate à levedura *Candida albicans* (BRITO, 2007).

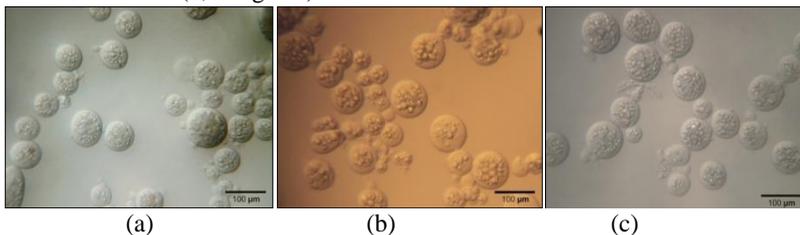
3.2.3 FORMAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS CONTENDO A ENZIMA IMOBILIZADA

Seguindo a metodologia proposta por Alvim (2005) e adaptada por Venturelli (2012), foram obtidas as microcápsulas contendo o encapsulado (óleo de hortelã ou de jojoba) e a enzima imobilizada na superfície externa das mesmas.

A imobilização da enzima aconteceu na etapa de reticulação das microcápsulas com glutaraldeído. Nesta etapa, os dois sítios reativos do glutaraldeído podem reagir com os grupos amino livres das proteínas, gelatina e papaína, e deste modo criar intra e inter-ligações cruzadas.

Uma vez imobilizada na microcápsula a enzima deve agir, sob condições desejadas, hidrolisando as microcápsulas e liberando o óleo ou fragrância encapsulado. Pode-se observar na Figura 25 que as microcápsulas obtidas possuem formato próximo ao esférico, na maior parte multinucleada e com parede transparente. A morfologia das mesmas não é alterada com a presença da enzima, conforme comparativo entre as figuras (a) e (b) na Figura 25, para as microcápsulas contendo óleo de hortelã. As características apresentadas são as mesmas para as microcápsulas contendo óleo de jojoba, como se observa entre as figuras (b) e (c) na Figura 25.

Figura 25 - Microcápsulas (a) contendo óleo de hortelã sem a enzima imobilizada; (b) contendo óleo de hortelã com a enzima papaína imobilizada (0,25mg/mL); e (c) contendo óleo de jojoba com a enzima papaína imobilizada (0,05mg/mL). Lente com aumento de 100x.



Yeo e colaboradores (2005) encapsularam em microcápsulas de gelatina e goma arábica pelo método de coacervação complexa, óleo natural para alimentos cozidos, com o objetivo de manter o sabor do alimento após o congelamento. As microcápsulas obtidas por estes autores são multinucleadas, esféricas e com parede transparente, características semelhantes às microcápsulas do presente trabalho. Porém, não houve a reticulação com algum tipo de enzima nas microcápsulas, sendo este processo um diferencial do presente trabalho.

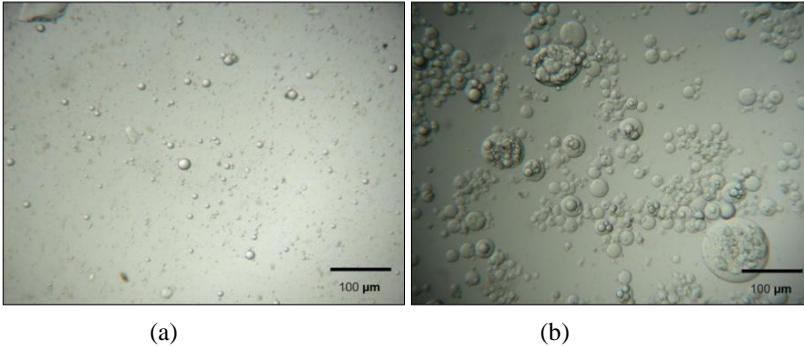
Após verificar que a metodologia de formação das microcápsulas foi satisfatória, seguiu-se com a otimização da imobilização, sendo então determinada qual a melhor concentração de enzima para essa etapa.

A concentração de imobilização da enzima foi considerada ótima quando possibilitou a peneiração, a liofilização e a solubilização novamente da microcápsula, para então ser hidrolisada na temperatura de 37°C pela ação da enzima. Caso a concentração fosse maior que a desejada, as microcápsulas seriam hidrolisadas durante alguma dessas etapas. Já para uma concentração muito baixa, não ocorreria a hidrólise quando desejado, pois a quantidade de enzima imobilizada seria insuficiente. Sendo essas duas condições desfavoráveis ao processo.

A concentração ótima de enzima imobilizada nas microcápsulas contendo como encapsulado óleo de jojoba foi de 0,05 mg/mL. Já para as microcápsulas contendo óleo hortelã a melhor concentração foi de 0,25 mg/mL. No entanto, para as análises de rendimento de imobilização, atividade enzimática, pH e temperatura ótimos para a enzima imobilizada, a concentração de enzima reticulada na microcápsula foi de 1 mg/mL para ambos os óleos, já que, com uma concentração maior a diferença entre os tratamentos torna-se mais evidente.

Uma vez obtidas as microcápsulas com a enzima imobilizada, foi avaliada a influencia da enzima na hidrólise das mesmas. Para tanto, foram submetidas à hidrólise duas amostras: uma contendo as microcápsulas com a enzima imobilizada e na outra, microcápsulas sem a enzima. O ensaio ocorreu à 37°C por 1 h em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Ao fim do tempo pode-se perceber que na amostra que continha as microcápsulas com a enzima imobilizada havia ocorrido a hidrólise total das mesmas ao contrário do segundo ensaio, o qual ainda havia muitas microcápsulas no meio, conforme apresentado na Figura 26. Com isso, pôde-se concluir que a enzima é de fundamental importância para que ocorra a hidrólise das microcápsulas nas condições desejadas, uma vez que sem a enzima as mesmas permanecem inteiras.

Figura 26 - Hidrólise das microcápsulas contendo óleo de jojoba ao fim do tempo de 60 min a 37°C em tampão fosfato 50 mM pH 7,5, (a) microcápsulas contendo a enzima imobilizada (0,05 mg/mL) (b) microcápsulas sem a enzima.



Após ter estabelecido as concentrações de imobilização da enzima (0,05 mg/mL para as microcápsulas contendo óleo de jojoba e 0,25 mg/mL para as microcápsulas contendo óleo de hortelã), as microcápsulas foram submetidas à liofilização. Na Figura 27 estão apresentadas as microcápsulas contendo óleo de jojoba e na Figura 28 estão apresentadas as microcápsulas contendo óleo de hortelã. Apresenta-se em ambas as figuras as microcápsulas liofilizadas, as imagens por microscopia eletrônica de varredura e as microcápsulas em solução novamente após a liofilização.

Pela Figura 27 e Figura 28, observa-se que as microcápsulas secas apresentam característica em forma de “pó” e ocorre a formação de pequenos grumos. Observa-se ainda que as microcápsulas quando

solubilizadas novamente após a liofilização apresentam as mesmas características iniciais (apresentadas na Figura 25).

Figura 27 - Microcápsulas contendo óleo de jojoba com a enzima imobilizada (a) liofilizadas; (b) imagens por MEV (c) solubilizadas após liofilização.

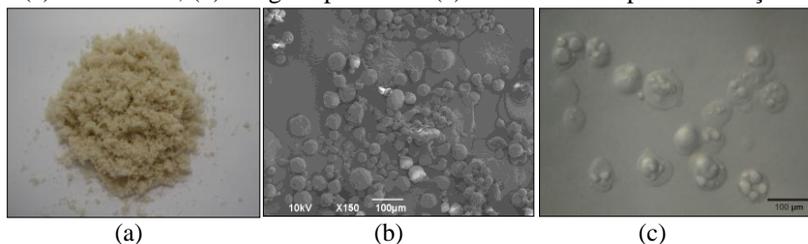
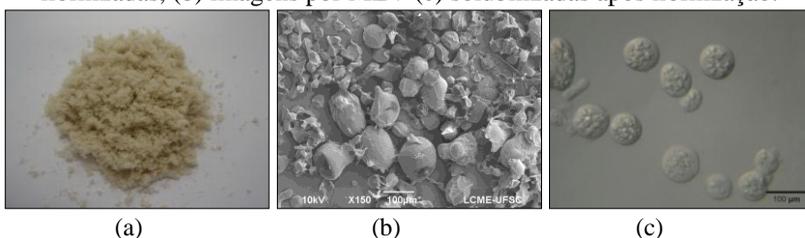
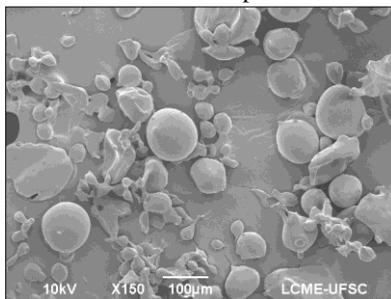


Figura 28 - Microcápsulas de óleo de hortelã com a enzima imobilizada (a) liofilizadas, (b) imagens por MEV (c) solubilizadas após liofilização.



Com a liofilização algumas cápsulas se deformam, porém não se pode atribuir este fato unicamente a presença da enzima, uma vez que pela Figura 29, onde está apresentada uma imagem de MEV das microcápsulas sem a enzima imobilizada, também se observa a presença de algumas cápsulas deformadas ou quebradas. Esta deformação pode ser resultado de uma má reticulação, de interferentes no processo como mau ajuste de pH, além da ação da enzima durante a liofilização ou mesmo pela fricção na hora de formar o “pó” após a liofilização. No entanto, a liofilização mostrou-se satisfatória para a secagem das microcápsulas, uma vez que a quantidade de microcápsulas deformadas é praticamente insignificante se compara com as restantes.

Figura 29 - Imagens de MEV das microcápsulas sem a enzima imobilizada.



3.2.4 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO

Determinou-se o rendimento de imobilização seguindo o proposto por Arnon (1970) e Lei et al., (2004) por meio da Equação (01). A determinação do rendimento foi realizada apenas para as microcápsulas de jojoba, uma vez que o óleo de hortelã inibe significativamente a ação da enzima e com isso o rendimento encontrado não seria o real. O rendimento de imobilização foi de $79,6\% \pm 0,04$.

Zhuang e Butterfieldas (1992) imobilizaram papaína em membrana polimérica de álcool vinílico/butiral vinílico e o rendimento de imobilização obtido foi entre 4,2 e 13,2%. Já no estudo realizado por Afaq e Ipbal (2001) o rendimento obtido foi entre 95 e 98% na imobilização de papaína em suporte de íon metálico. Wang et al. (2008) imobilizaram a papaína em esferas de sílica e o rendimento da imobilização foi em torno de 90%. Bayramoglu et al. (2011) obtiveram rendimento de 83% na imobilização da papaína em esferas de poli(hidroxietil metacrilato-etilenoglicol dimetacrilato). Vujcic et al. (2011) imobilizaram uma invertase em gel de gelatina e obtiveram rendimento de 30% na imobilização. O rendimento encontrado neste estudo está coerente com os encontrados pelos autores citados.

3.2.5 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS

Com o intuito de estabelecer a faixa de tamanho das microcápsulas obtidas, foi realizada a análise granulométrica, em duplicata e apenas para as microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada, uma vez que estas se mostraram favoráveis à aplicação no tecido de algodão, sendo que o mesmo não aconteceu com

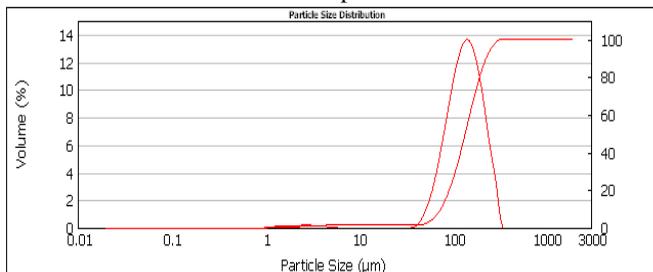
as microcápsulas contendo óleo de jojoba que não resistiram a aplicação, como será visto no próximo capítulo.

O resultado desta análise está apresentado na Tabela 5 e graficamente apresentado na Figura 30. Como pode ser observado, o diâmetro médio das microcápsulas (baseado no volume de distribuição) foi de $145,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$. O número de SPAN está muito próximo a um, indicando uma monodispersão.

Tabela 5 - Distribuição granulométrica para as microcápsulas contendo óleo de hortelã.

$D_{4,3} (\mu\text{m})$	SPAN	$d_{0,1} (\mu\text{m})$	$d_{0,5} (\mu\text{m})$	$d_{0,9} (\mu\text{m})$
$145,6 \pm 1,3$	$1,13 \pm 0,002$	$75,5 \pm 0,6$	$137,7 \pm 1,4$	$230,8 \pm 1,9$

Figura 30 – Curva de frequência para a distribuição de tamanho das microcápsulas.



A distribuição de tamanho das microcápsulas é um fator importante no desempenho e no controle na liberação e também na proteção do ativo encapsulado. Quanto maior a área superficial das microcápsulas, ou seja quanto menores forem seus diâmetros, mais rapidamente o ativo será liberado (LEIMANN, 2008). O diâmetro das microcápsulas é influenciado significativamente pela quantidade de óleo presente na fase dispersa e pela taxa de agitação.

Leimann (2008) verificou que um acréscimo na fração volumétrica do óleo da fase dispersa e menores taxas de agitação, provocam um amortecimento do fluxo turbulento que promove a formação de partículas de óleo grandes e um quebraamento erosivo que forma partículas de óleo menores e com isso, há um espalhamento da curva de distribuição. Avaliou ainda que com o aumento da taxa de agitação, aumenta a energia cinética turbulenta, ocorrendo maior quebra das gotas de óleo e com isso obtém-se microcápsulas com diâmetros menores.

No trabalho realizado por Chang et al. (2006) foi encapsulado óleo de canfora (20, 30, 40 e 50 mL) em microcápsulas de gelatina (3%) e goma arábica (3%) reticuladas com glutaraldeído e obtiveram diâmetros de partícula de $294,7 \pm 14,2 \mu\text{m}$, $167,2 \pm 11,2 \mu\text{m}$ e $85,7 \pm 8,7 \mu\text{m}$, para 10 min de agitação nas velocidades de 500, 1000 e 2000 rpm, respectivamente. Percebe-se que com o aumento da agitação diminui o diâmetro das partículas.

Alvim e Grosso (2010) determinaram diâmetros de $43,7 \pm 3,4$ a $96,4 \pm 10,3 \mu\text{m}$, para microcápsulas de gelatina (2,5%) e goma arábica (2,5%) contendo 50g de óleo resina de páprica e óleo de soja (1:1), com agitação de 14000 rpm por 3 min.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS PARA A ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A curva de atividade em função do pH representa a influência da concentração de íon hidrogênio sobre a atividade enzimática relativa. O pH ótimo, entretanto, pode mudar de acordo com a condição do experimento, com o substrato utilizado, com a fonte do material enzimático e com o tampão empregado (TAUBER, 1950).

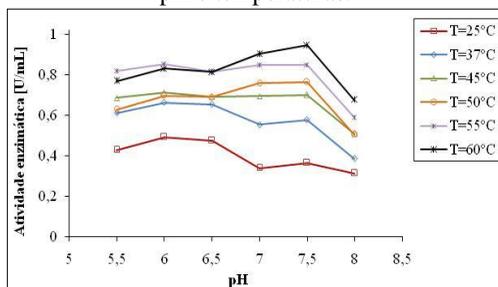
A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, em temperaturas mais altas ocorre à desnaturação da enzima, ou seja, à perda da sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante termolábeis, desencadeia-se uma série de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida, a enzima é dita, então, desnaturada (BORZANI et al., 2001).

A influência do pH e da temperatura no desempenho catalítico da papaína na reação de hidrólise do substrato caseína 2,5% foi avaliada variando-se o pH de incubação na faixa de 5,5 a 8, para cada temperatura estudada. As temperaturas avaliadas foram 25, 37, 45, 50, 55, 60°C. Os pH de 5,5 e 8,0 foram escolhidos pois são os pH de liberação, isto é os pH do suor humano. A temperatura de 25°C foi escolhida por se tratar da temperatura ambiente onde permanecerão as amostras após a finalização. Já a temperatura de 37°C foi escolhida por ser a temperatura de controle para a liberação, uma vez que será controlado pela formação de suor pelo corpo humano e é nesta temperatura que se inicia o processo de transpiração.

A Figura 31 apresenta o resultado obtido para a enzima livre 1 mg/mL. Percebe-se que o pH ótimo é 7,5 na temperatura de 60°C. Nos

pH de liberação 5,5 e 8 na temperatura de 37°C, a atividade é menor se comparada com a condição ótima. No entanto, o objetivo da liberação é que ela ocorra de forma lenta, e essa menor ação da enzima se torna um fator favorável.

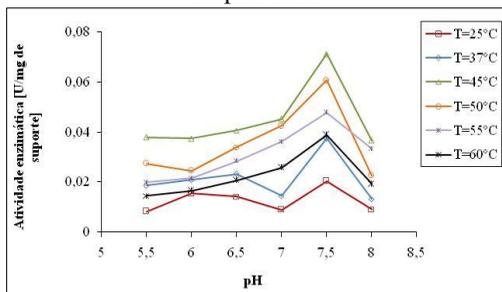
Figura 31 - Variação da atividade enzimática para a enzima livre em diferentes pH e temperaturas.



Com o intuito de avaliar se há alteração no comportamento da enzima quando esta está imobilizada nas microcápsulas, foi realizado o mesmo procedimento aplicado para a análise da enzima livre, em microcápsulas contendo óleo de jojoba. Observa-se pela Figura 32 que não há alteração no valor de pH ótimo para a papaína imobilizada. No entanto, a temperatura ótima diminui para 45°C, a partir desta temperatura a enzima perde atividade. Uma hipótese atribuída a esta questão, pode ser o fato de que a enzima, quando imobilizada, pode perder parte de sua atividade, devido a interferentes do meio, como por exemplo, a reticulação ou autólise, segundo Wang et al. (2008). Em temperaturas elevadas as microcápsulas são hidrolisadas rapidamente e com isso, não haverá mais enzima imobilizada no meio.

Análogo à enzima livre, a ação da enzima imobilizada em condições de pH de 5,5 e 8 na temperatura de 37°C é mais baixa se comparada aos outros pH nesta temperatura, sendo um fator positivo para a liberação controlada uma vez que a enzima não agirá rapidamente.

Figura 32 - Variação da atividade enzimática para a enzima imobilizada (1 mg/mL) em microcápsulas contendo óleo de jojoba em diferentes pH e temperaturas.



Outros autores também avaliaram o pH e a temperatura de enzimas livres e imobilizadas. Lei e colaboradores (2004) estudaram a preparação e a caracterização da ação catalítica da papaína imobilizada em microesferas magnéticas. Observaram que o pH ótimo da enzima livre de 8,0 passou para 6,5 quando imobilizada.

Itoyama e colaboradores, em 1994, avaliaram a estabilidade da papaína imobilizada em esferas porosas de quitosana e concluíram que a faixa de pH, entre 7,0 e 8,0, foi a mesma para a enzima livre e para a imobilizada, já a estabilidade térmica em 60°C foi maior para a enzima imobilizada.

Dutta et al. (2009) estudaram a remoção de mercúrio em solução utilizando carvão ativado com enzima a papaína imobilizada. A temperatura ótima encontrada para o imobilizado foi de 35°C e o pH de 7,0, não foi avaliada a enzima livre.

Vujcic et al. (2011) imobilizaram uma enzima invertase em hidrogel de gelatina utilizando glutaraldeído como reticulante e observaram que o efeito do pH sob a enzima livre e imobilizada foram semelhantes, ambas apresentaram um atividade máxima no intervalo de pH entre 4,0 a 5,0. A temperatura ótima encontrada de 60°C também se manteve a mesma para ambos os casos, porém a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica.

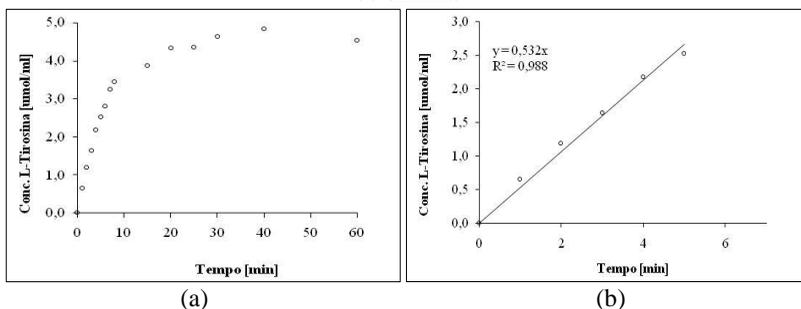
Ressalta-se que no presente trabalho a imobilização da enzima nas microcápsulas não foi com o intuito de reutilizá-las posteriormente e sim, que hidrolisassem as microcápsulas em condições específicas. Em virtude disso, não foi avaliada a estabilidade térmica da papaína imobilizada.

3.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA LIVRE E DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade enzimática fornecida pelo fabricante foi determinada por metodologia própria, portanto, fez-se necessário a determinação da atividade enzimática pela metodologia empregada na literatura para que se torne universal e de fácil comparação com outros trabalhos já realizados.

Inicialmente foi determinada a atividade da enzima livre conforme descrito por Arnon (1970). Para tanto, foi determinado a concentração de L-Tirosina formada da hidrólise do substrato caseína 2,5% (m/v) pela enzima papaína 1 mg/mL no decorrer do tempo. A Figura 33 (a) apresenta o comportamento da hidrólise. A partir deste gráfico, pode-se determinar o intervalo de velocidade inicial, isto é, a faixa linear de formação de produto, e com isso a atividade enzimática nas condições de trabalho. O intervalo de linearidade do gráfico ficou entre 0 e 7 minutos, sendo o tempo 5 minutos o escolhido para os demais ensaios de atividade. A atividade enzimática foi encontrada traçando uma reta tangente na fase linear (Figura 33 (b)). Para a enzima livre a atividade enzimática foi de 0,532 U/mL, sendo a atividade específica de 1,32 U/mg de proteína.

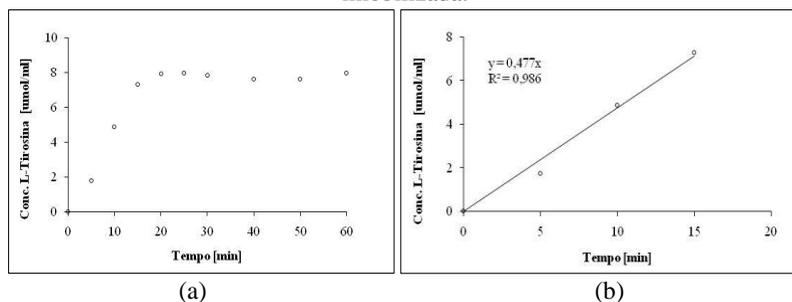
Figura 33 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para 1 mg/mL de enzima



A atividade enzima também foi determinada para a enzima imobilizada seguindo a mesma metodologia adotada para a enzima livre, porém utilizando microcápsulas contendo óleo de jojoba com a enzima imobilizada (1 mg/mL). A concentração de produto, L-Tirosina, foi medida ao longo do tempo. Pode-se observar pela Figura 34 que o comportamento foi análogo ao observado para a enzima livre, e a

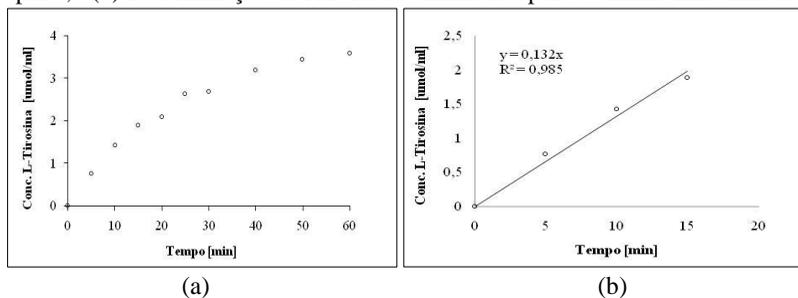
atividade encontrada para a enzima imobilizada, nas condições de trabalho, foi de 0,477 U/mL, especificando em relação à massa (mg) de microcápsulas adicionadas no meio reacional, 0,049 U/mg de suporte. O intervalo de linearidade do gráfico ficou entre 0 e 15 minutos, sendo o tempo 10 minutos o escolhido para os demais ensaios de atividade.

Figura 34 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína (1 mg/mL) imobilizada em microcápsulas contendo óleo de jojoba, a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para a enzima imobilizada.



Avaliou-se também a atividade da enzima imobilizada nas microcápsulas contendo óleo de hortelã, que como visto anteriormente afeta a atividade da enzima. Pode-se observar novamente um comportamento análogo às hidrólises anteriores, porém a atividade diminuiu consideravelmente. A atividade encontrada foi de 0,132 U/mL, ou 0,020 U/mg de suporte, como apresentado na Figura 35.

Figura 35 - (a) Hidrólise da caseína pela papaína (1 mg/mL) imobilizada em microcápsulas de óleo de hortelã a 37°C por 60 min em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 (b) Determinação da Atividade enzimática para a enzima imobilizada.



Itoyama et al. (1994) imobilizaram a papaína covalentemente em esferas porosas de quitosana e observaram que para BAEE (N-benzil-L-arginina éster etílico), substrato de peso molecular baixo, a atividade da enzima aumentou com a imobilização, mas com a caseína, substrato com massa molar elevada, a atividade diminuiu. Isto devido à dificuldade de um substrato de alto peso molecular encontrar o sítio ativo da enzima por causa do impedimento causado pela imobilização e do grande tamanho do substrato.

Zhao; Shi e Ma (2005) obtiveram aumento da atividade enzimática da papaína com a imobilização covalente em mesoporos moleculares MCM-48. Este aumento se deu devido à determinação da exata concentração de enzima para a imobilização, pois conforme aumentava a concentração de enzima a atividade diminuía, devido à saturação dos poros.

Wang e colaboradores (2008) observaram que a atividade da enzima papaína imobilizada foi menor que a atividade da enzima livre. Segundo estes autores, quando ocorre a imobilização por ligação covalente da papaína, a atividade relativa da enzima é frequentemente menor quando comparada à enzima livre, resultante da ligação covalente e da autólise.

Neste estudo, observou-se uma leve diminuição da atividade para as microcápsulas contendo óleo de jojoba, porém um decréscimo acentuado da atividade para microcápsulas de óleo de hortelã. Além dos interferentes causados pela imobilização covalente, há a interferência do óleo a ser encapsulado, uma vez que a enzima permanece em contato com este por 16 h. Como já explorado na seção 4.1, o óleo de hortelã possui em sua composição inibidor da ação enzimática.

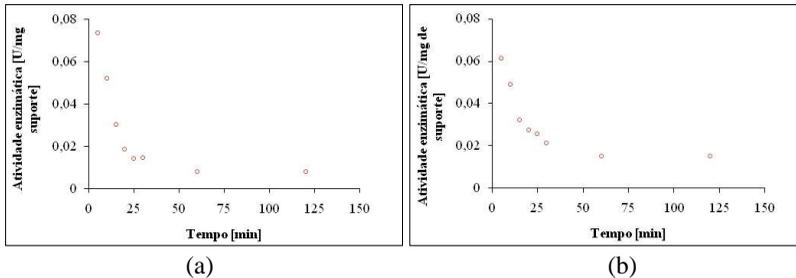
3.2.8 VERIFICAÇÃO DO TEMPO DE MEIA-VIDA PARA A ENZIMA IMOBILIZADA

A análise do tempo de meia-vida foi realizada com as microcápsulas liofilizadas e a concentração da enzima imobilizada foi a estabelecida na otimização da reticulação, sendo de 0,05 mg/mL para o óleo de jojoba e 0,25 mg/mL para o óleo de hortelã. Foi avaliada a temperatura de 37°C, a qual é a temperatura de liberação. Os tempos avaliados foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120 min.

Para as microcápsulas de óleo de jojoba, observa-se pela Figura 36 (a) que a enzima começa a agir desde o início dos 5 min e segue a tendência esperada durante a hidrólise da caseína. O tempo de meia vida foi de 13,5 min. Para as microcápsulas contendo óleo de hortelã

observa-se um comportamento análogo. O tempo de meia vida para a temperatura de 37°C foi de 16,5 min, como pode ser observado na Figura 36 (b). Sendo maior que o tempo encontrado para as microcápsulas de óleo de jojoba, uma vez que o óleo de hortelã inibe a ação da enzima e com isso ela agirá mais lentamente.

Figura 36 – Avaliação do $t_{1/2}$ para a temperatura de 37°C. (a) Imobilização em microcápsulas contendo óleo de jojoba. (b) Imobilização em microcápsulas contendo óleo de hortelã.



Li et al. (2001) investigaram a termoestabilidade da papaína imobilizada em fibras nitrilona e encontraram o tempo de meia vida de 6 h a 60°C. Zhao; Shi e Ma (2005) estimaram o tempo de meia vida para a papaína, imobilizada em mesoporos moleculares MCM-48, de 2500 min a 50°C. Nestes estudos as enzimas foram imobilizadas para posterior reutilização em suportes não proteicos, isto é, a enzima não hidrolisava o próprio suporte. No presente trabalho, o objetivo da imobilização é a hidrólise do suporte com a ativação da enzima, para assim liberar o encapsulado desejado. Em virtude disso, o tempo de meia vida neste caso é baixo, uma vez que a microcápsula é hidrolisada em poucos minutos nas condições desejadas.

3.3 CONCLUSÕES

Com a metodologia proposta foi possível obter as microcápsulas contendo a enzima imobilizada na parede polimérica.

Verificou-se que a presença da enzima na microcápsula é fundamental para que ocorra a hidrólise da mesma em 37°C.

Observou-se que o óleo de hortelã inibe em aproximadamente 85% a atividade da enzima papaína, enquanto que o óleo de jojoba e o amaciante não foram significativos na inibição.

Determinou-se a condição ótima de operação para a papaína imobilizada como sendo, pH 7,5 em 45°C. Nas condições de liberação,

pH 5,5 e 8,0 em 37°C, a ação da enzima foi mais lenta, favorecendo assim, a liberação controlada.

A atividade enzimática específica para a enzima livre foi de 1,32 U/mg de proteína, após a imobilização nas microcápsulas contendo óleo de jojoba a atividade enzimática encontrada foi de 0,049 U/mg de suporte e para as microcápsulas contendo óleo de hortelã a atividade enzimática foi de 0,020 U/mg de suporte.

Verificou-se que o $t_{1/2}$ para a enzima imobilizada em microcápsulas contendo óleo de jojoba foi de 13,5 min, já para a imobilização nas microcápsulas contendo óleo de hortelã foi de 16,5 min.

CAPÍTULO IV

No presente capítulo estão descritos os materiais e métodos, resultados e discussões bem como as conclusões, relacionados à aplicação das microcápsulas no tecido de algodão.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item estão apresentados os procedimentos experimentais utilizados durante o desenvolvimento desta segunda etapa do trabalho. Os materiais, reagentes, equipamentos e as soluções utilizadas, além das citadas no item “Preparo das soluções”, foram descritos no capítulo anterior.

4.1.1 PROCEDIMENTOS

4.1.1.1 Preparo das soluções

4.1.1.1.1 Solução reticulante de glutaraldeído

A solução de glutaraldeído foi preparada mediante diluição em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 para uma concentração de 1 mg/mL. Sendo utilizada no tratamento prévio do tecido de algodão e na aplicação das microcápsulas.

4.1.1.1.2 Solução de amaciante

Preparou-se a solução de amaciante mediante diluição em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 para uma concentração de 150 mg/mL. Sendo utilizada na aplicação das microcápsulas no tecido de algodão.

4.1.1.2 Tratamento do tecido de algodão com Glutaraldeído

Para o pré tratamento do tecido de algodão com glutaraldeído (GDA), introduziu-se em 200 mL da solução de GDA, 9 g do tecido de algodão, o qual permaneceu reagindo por 1 h na temperatura de 25°C em banho termostático, sob agitação de 100 rpm/min.

Em seguida foi retirado o excesso de glutaraldeído do tecido com 100 mL de água destilada. O tecido encharcado foi introduzido no Foulard, para retirar o excesso de água, o *pick up* estabelecido foi de

100%. Posteriormente utilizou-se o tecido para aplicação das microcápsulas em banho termostático (item 4.1.1.3.2).

4.1.1.3 Aplicação das microcápsulas em tecido de algodão

Realizou-se a aplicação das microcápsulas em tecido de algodão por meio de duas técnicas diferentes, por impregnação em Foulard (Figura 37) e por banho de exaustão em banho termostático. A secagem do tecido tratado foi avaliada submetendo-o à secagem em forno termofixador (rama) (Figura 38) e em condições ambientes.

Figura 37 - Imagem do equipamento Foulard, (a) vista frontal e (b) aplicação ao tecido de algodão



Figura 38 - Forno termofixador utilizado para a secagem das amostras tratadas



4.1.1.3.1 Aplicação utilizando o equipamento Foulard

Para este método, o Foulard foi ajustado para uma pressão de 2 bar entre os rolos, o qual proporciona um *pick up* de 100%. As amostras de tecido de algodão foram tratadas por três vias diferentes:

1. Para a primeira via, preparou-se 250 mL de solução contendo 10 g/L de microcápsulas em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Esta solução foi introduzida no equipamento e em seguida foi aplicada em 9g de tecido 100% algodão. Após a aplicação, um dos tecidos foi imediatamente seco em forno de termofixação - rama, a 100°C por 5 min, enquanto que a segunda amostra foi seca em condições ambientes.

2. Para a segunda metodologia, preparou-se 250 mL de solução contendo 10 g/L de microcápsulas e 1 mg/mL de GDA em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Esta solução foi introduzida no equipamento e em seguida foi aplicada em 9 g de tecido 100% algodão. Após, o tecido foi envolvido em plástico PVC e deixou-se reagir por 12 h sob refrigeração a 4°C. A secagem realizou-se na rama a 100°C por 5 min.

3. Para a terceira aplicação, preparou-se 250 mL de solução contendo 10 g/L de microcápsulas e 150 mg/mL de amaciante em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Esta solução foi introduzida no equipamento e em seguida foi aplicada em 9 g de tecido 100% algodão. O tecido foi seco na Rama nas mesmas condições citadas.

4.1.1.3.2 Aplicação em banho termostático

O tecido previamente tratado com GDA foi inserido em 200 mL de solução contendo 10 g/L de microcápsulas em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 por 1h, sob agitação, na temperatura de 10°C. Após, foi retirado o excesso com 50 mL de água destilada e realizou-se a secagem na Rama por 5 min a 100°C.

4.1.1.4 Determinação da gramatura do tecido 100% algodão

Para avaliação da gramatura do tecido 100% algodão, seguiu-se a Norma ABNT NBR 10591:2008. Para tanto, foram pesados cinco corpos de prova, com tamanho de (10x10) cm, após pré-condicionamento por 2h na temperatura de 23°C. A pesagem foi realizada após estabilização da massa em balança analítica.

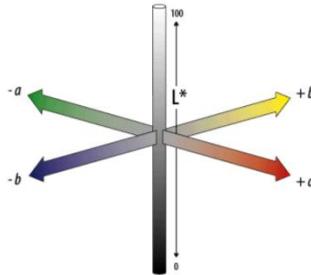
A gramatura foi encontrada dividindo a massa (g) pela área do tecido (m²). A tolerância admitida pela norma entre os resultados e a gramatura nominal é de $\pm 5\%$.

4.1.1.5 Avaliação da variação da cor do tecido após aplicação das microcápsulas

A avaliação da variação de cor no tecido após a aplicação das microcápsulas foi realizada com auxílio do Equipamento MiniScan EZ, localizado no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos – PROFI do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - UFSC.

O equipamento utilizado segue o sistema $L^*a^*b^*$, denominado CIELAB, o qual é expresso por um sistema tridimensional L, a, b, conforme apresentado na Figura 39. Sendo que o L^* , Luminância, pode variar de 0 (preto) a 100 (branco); o eixo a^* assume valores negativos (verde) e positivos (vermelho) e o eixo b^* varia entre valores negativos (azul) e positivos (amarelo).

Figura 39 - Espaço de cor CIELAB



Fonte: http://dba.med.sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/cielab.html

Cada amostra de tecido foi analisada nos quatro quadrantes e a partir destes valores, realizada a média para a obtenção do ΔE seguindo a Equação (03).

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (03)$$

4.1.1.6 Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas no tecido de algodão

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada pelo equipamento JEOL JSM-6390LV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME – UFSC.

As amostras foram preparadas e dispostas sobre uma fita de carbono, as quais estavam fixadas em *stubs*. Em seguida foram recobertas com uma fina camada de ouro e enviadas para análise no equipamento, conforme procedimento padrão.

Esta análise foi realizada para visualizar as microcápsulas no tecido de algodão após os diferentes tratamentos dados as amostras.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

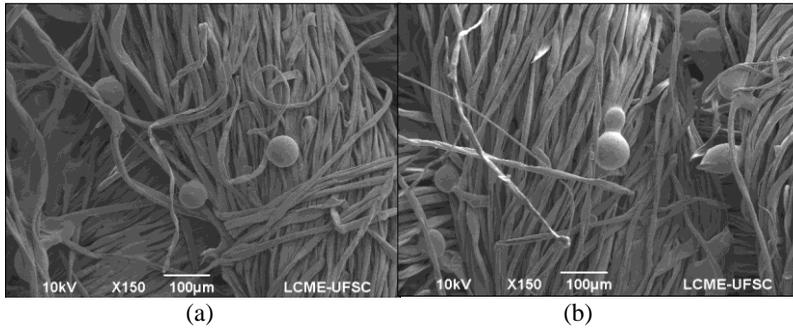
Estão apresentados aqui os resultados obtidos para a aplicação das microcápsulas no tecido de algodão. O principal objetivo foi verificar a resistência das microcápsulas ao processo de impregnação e secagem do tecido. As seções apresentadas serão:

- a- Influência da temperatura de secagem do tecido contando as microcápsulas;
- b- Aplicação das microcápsulas no tecido de algodão;
- c- Variação da cor do tecido após aplicação das microcápsulas.

4.2.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SECAGEM DO TECIDO CONTENDO AS MICROCÁPSULAS

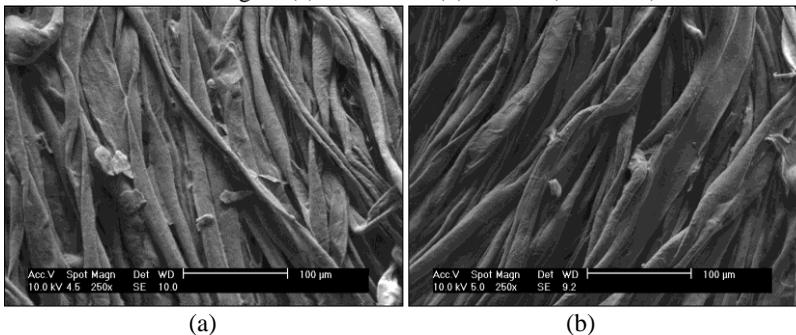
Com o intuito de verificar se as microcápsulas resistiriam à secagem, foi analisada a secagem na rama (condições: 100°C por 5min) e a secagem na sombra em temperatura ambiente. A Figura 40 apresenta as micrografias para as duas formas de secagem para as microcápsulas contendo óleo de hortelã, observa-se que para ambas as formas de secagem não houve interferência significativa nas microcápsulas. Para a secagem na Rama, verifica-se pela Figura 40 (a) que algumas microcápsulas se desfazem devido à ação da enzima, porém de forma pouco significativa. Já para a secagem natural a presença de microcápsulas hidrolisadas foi menor, porém, verificou-se por análise sensorial apenas, que a intensidade da fragrância foi ligeiramente menor quando comparada à amostra seca na rama.

Figura 40 - Imagem de MEV do tecido de algodão contendo microcápsulas de óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL), aplicadas no Foulard e a secagem realizada (a) na Rama e (b) naturalmente (a sombra).



Para as microcápsulas de óleo de jojoba a secagem foi realizada nas mesmas condições, na Rama e naturalmente. Pode-se perceber pelas imagens contidas na Figura 41 que para ambos os tipos de secagem houve a hidrólise das microcápsulas. Isso porque a concentração de enzima encontrada para imobilização possibilita apenas a liofilização das microcápsulas, não resistindo ao processo de aplicação no tecido e secagem. Torna-se necessário definir uma nova concentração de enzima que possibilite a aplicação e secagem das mesmas no tecido. Outra possibilidade é analisar o preparo de microcápsulas de óleo de jojoba contendo uma fração do óleo de hortelã, uma vez que este óleo inibe a ação da enzima (como mostrado na Figura 24), possibilitando assim a aplicação.

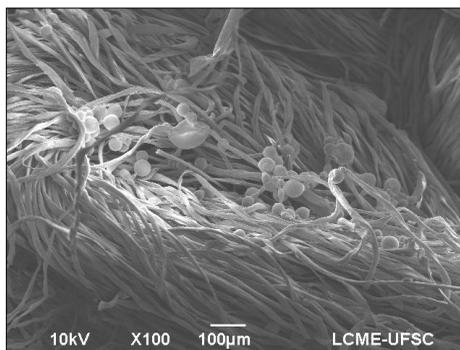
Figura 41 - MEV realizado do tecido de algodão contendo microcápsulas de óleo de jojoba com a enzima imobilizada (0,05 mg/mL), aplicadas no Foulard e com secagem (a) na Rama e (b) natural (a sombra).



4.2.2 APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS NO TECIDO DE ALGODÃO

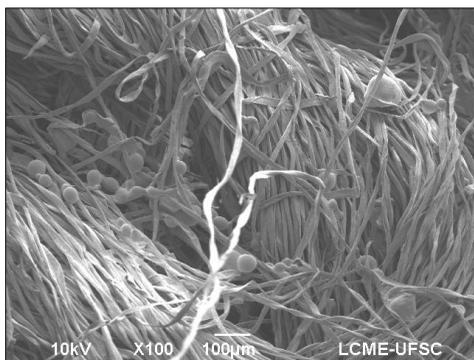
As microcápsulas foram aplicadas ao tecido 100% algodão de gramatura $276 \pm 4 \text{ g/m}^2$ por duas técnicas diferentes. Na primeira, as microcápsulas contendo óleo de hortelã são impregnadas ao tecido por meio do equipamento Foulard. Neste procedimento o tecido seco é introduzido entre os rolos do equipamento programado para um *pick up* de 100% e em seguida ocorre a secagem na Rama. A Figura 42 apresenta o MEV da amostra tratada.

Figura 42 - Imagem de MEV do tecido com as microcápsulas com a enzima (0,25 mg/mL) imobilizada contendo óleo de hortelã, impregnado pelo Foulard.



Pela segunda via o tecido foi introduzido em uma solução contendo as microcápsulas, ao qual permaneceu por 1h, a 10°C sob agitação. Em seguida o tecido foi seco na Rama. A Figura 43 apresenta o tecido tratado.

Figura 43- Imagem de MEV do tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,25mg/mL), impregnado em banho termostático.



Por meio das figuras anteriores percebe-se que a forma de aplicação foi satisfatória para ambos os casos, porém a impregnação pelo Foulard apresentou-se superior quando comparado com a aplicação em banho termostático. Isso porque, na aplicação por banho, quando o tecido foi retirado do meio foi também removido o excesso de microcápsulas com água destilada, sendo assim as microcápsulas que permaneceram no tecido são as que reagiram com os fios, caso contrário, seriam levadas pela água de enxágüe. Como a reticulação da parede polimérica é parcial, pode haver grupos reativos livres e com isso as microcápsulas continuam reagindo com o tecido posteriormente. Enquanto que na aplicação pelo Foulard as microcápsulas são impregnadas no tecido.

Monllor, Bonet e Cases (2007) avaliaram a aplicação de microcápsulas de melamina formalina contendo óleo de hortelã em tecidos de algodão. A aplicação foi realizada por impregnação, utilizando o Foulard e por banho de exaustão, utilizando banho termostático. Os autores concluíram que a aplicação pelo Foulard apresentou melhor resultado. Neste caso, a aplicação foi melhor pelo Foulard, pois as microcápsulas não possuíam afinidade com o tecido de algodão.

Outros métodos de aplicação de microcápsulas em tecidos também têm sido estudados. Ma et al. (2009) aplicaram microcápsulas de tamoxifeno em tecidos de algodão por *coating* (revestimento) e obtiveram bons resultados quando comparado com a aplicação por *padding* (preenchimento). No estudo realizado por Specos e colaboradores (2010) as microcápsulas de gelatina e goma arábica

contendo óleo essencial de citronela foram aplicadas em tecidos de algodão por meio de banho de revestimento aquoso, obtendo bons resultados.

4.2.2.1 Aplicação das microcápsulas no tecido de algodão com a presença do glutaraldeído e do amaciante

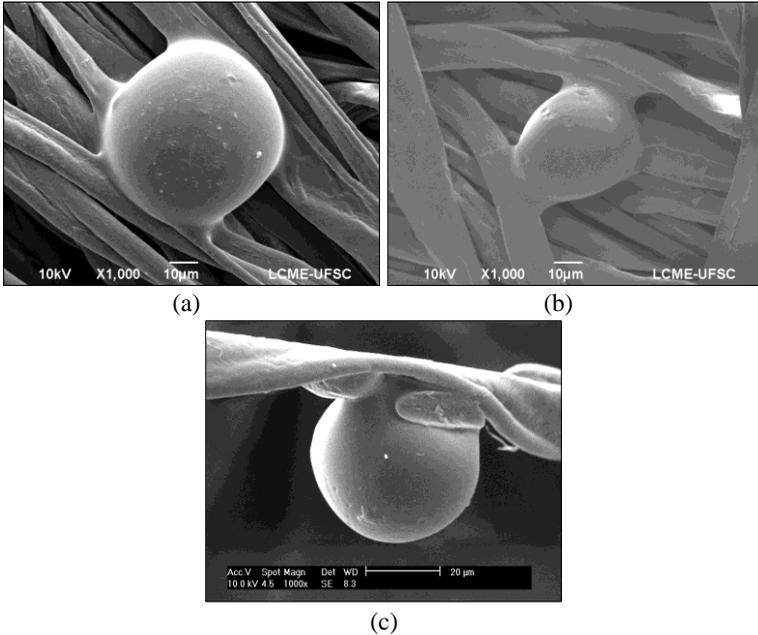
A impregnação das microcápsulas na presença de glutaraldeído realizou-se por duas vias distintas. Na primeira delas, uma solução de microcápsulas e glutaraldeído foi aplicado ao tecido por meio do Foulard, após a aplicação o tecido foi envolvido em plástico PVC e deixado reagir por 12h a 4°C, posteriormente foi realizada a secagem na rama a 100°C por 5 min. Na segunda via, o tecido foi previamente tratado com glutaraldeído e em seguida introduzido na solução de microcápsulas, o qual permaneceu por 1h a 10°C, sob agitação, em banho termostático. Posteriormente foi realizada a secagem na rama nas mesmas condições.

A Figura 44 apresenta as micrografias (a) para o tecido sem tratamento com glutaraldeído, contendo as microcápsulas por impregnação em Foulard, em seguida o tecido tratado (b) pela primeira via e (c) pela segunda. Pode-se perceber que não há diferença visual na forma que a microcápsula reage com o tecido.

Era esperado que com a presença do glutaraldeído ocorresse a ligação dos grupos amino das microcápsulas com os grupos hidroxilas da fibra celulósica, formando assim a ligação covalente entre os mesmos. Para a amostra não tratada com glutaraldeído, esperava-se que a microcápsula estivesse apenas sobreposta ao tecido, sem nenhum tipo de ligação aparente. Porém, como a reticulação das microcápsulas (no processo de obtenção das mesmas) pelo glutaraldeído, é uma reticulação parcial, pode haver grupos livres que reagem com a fibra posteriormente, devido ao contato prolongado ou mesmo pela temperatura de secagem.

Para resultados mais concretos a respeito do grau de reticulação das microcápsulas ao tecido de algodão, torna-se necessário um maior estudo sob várias condições, como por exemplo, com variações de concentrações de glutaraldeído, testes de lavagens entre outros.

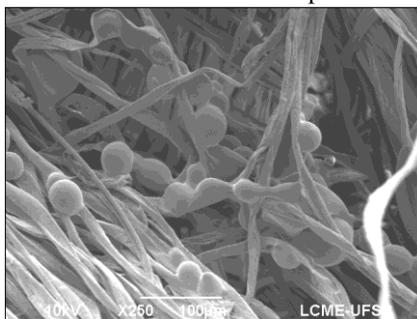
Figura 44 - (a) Tecido de algodão tratado com as microcápsulas impregnadas pelo Foulard. (b) Tecido contendo microcápsulas aplicadas juntamente com glutaraldeído pelo Foulard. (c) Tecido previamente tratado com glutaraldeído, contendo as microcápsulas aplicadas em banho termostático. Em todos os casos as microcápsulas contêm óleo de hortelã e a enzima imobilizada (0,25mg/mL).



Para a amostra tratada em banho termostático (segunda via), pode-se verificar também pela Figura 45, que as microcápsulas estão ligadas umas nas outras. Isto porque o glutaraldeído presente no meio possibilitou, devido o contato prolongado (1 h), a reticulação das microcápsulas entre si.

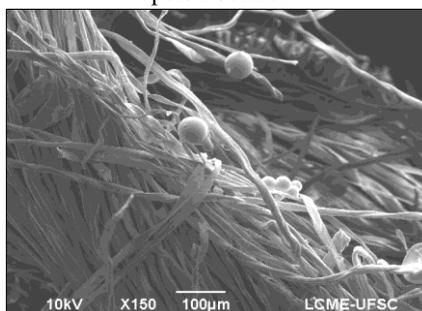
Venturelli (2012) observou em seu estudo que quando a concentração de glutaraldeído na etapa de reticulação das microcápsulas era elevada, elas tendiam a formar “cachos”, isto é, reticulavam entre si e formavam aglomerados. Neste caso, na aplicação das microcápsulas ao tecido, há glutaraldeído no meio e como a parede das microcápsulas já foi reticulada há a tendência, então, de acontecer a reticulação entre elas.

Figura 45 - Tecido previamente tratado com glutaraldeído, contendo as microcápsulas (óleo de hortelã) com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL) em aplicadas em banho termostático por 1h a 10°C.



Avaliou-se também a aplicação das microcápsulas juntamente com a solução de amaciante, no tecido de algodão, por impregnação no Foulard e posteriormente secagem na rama. A Figura 46 apresenta a micrografia do tecido tratado. Percebe-se que o amaciante não interferiu na impregnação, nem na morfologia das microcápsulas. Este teste comprova a possibilidade da aplicação das microcápsulas juntamente com o amaciante.

Figura 46 - MEV do tecido contendo as microcápsulas com a enzima imobilizada (0,25 mg/mL) aplicadas juntamente com o amaciante (150 mg/mL) pelo Foulard.



4.2.3 VARIAÇÃO DA COR DO TECIDO APÓS APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

Para a análise de diferença de cor, as amostras avaliadas foram as mesmas submetidas à análise de MEV. A Tabela 6 apresenta a diferença

de cor obtida para as amostras tratadas com microcápsulas contendo óleo de hortelã. As amostras tratadas foram:

Amostra 1: Tecido sem aplicação das microcápsulas.

Amostra 2: Tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã, preparadas na solução de glutaraldeído e aplicadas pelo Foulard. Logo após a aplicação o tecido foi envolvido com plástico PVC e permaneceu reagindo por 12h a 4°C. A secagem ocorreu na rama a 100°C por 5min.

Amostra 3: Tecido previamente tratado com glutaraldeído e a aplicação das microcápsulas aconteceu em banho termostático. A secagem ocorreu na rama.

Amostra 4: Tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã, aplicadas pelo Foulard e a secagem ocorreu na rama.

Amostra 5: Tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã, aplicadas pelo Foulard e a secagem ocorreu em condições ambientes.

Amostra 6: Tecido com as microcápsulas contendo óleo de hortelã, aplicadas juntamente com a solução de amaciante pelo Foulard, a secagem ocorreu na rama.

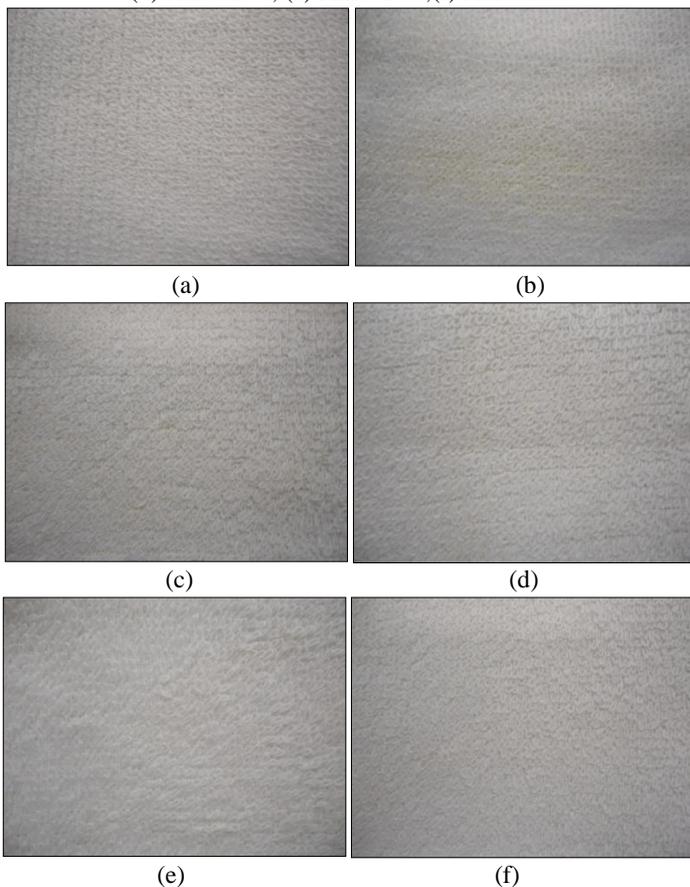
Tabela 6 - Diferenças de cor obtidas para as amostras tratadas com microcápsulas contendo óleo de hortelã.

Amostras	Dados			
	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*
1	97,14	1,39	-10,40	-
2	96,13	1,74	-6,21	4,32
3	96,72	2,38	-9,00	1,77
4	96,75	2,10	-8,96	1,65
5	95,59	2,69	-9,12	2,39
6	96,85	2,83	-10,18	1,48

O valor de ΔE representa a diferença total de cor entre a amostra padrão e o tratado. Os valores de ΔE inferiores a 1, indicam que as diferenças de cores dos tecidos não são perceptíveis. Entretanto, todas as amostras tratadas obtiveram um ΔE superior a 1, indicando que as diferenças de cores entre as amostras são perceptíveis. Dentre as 4 amostras tratadas a que apresentou menor variação da cor em relação ao tecido sem tratamento foi a amostra 6. Esta diferença foi menor, pois as microcápsulas foram aplicadas juntamente com o amaciante, o qual possui a cor branca e com isso dá um tom “esbranquiçado” à solução de aplicação, diminuindo assim, a variação da cor no tecido. Estas

observações podem ser verificadas nas amostras apresentadas na Figura 47.

Figura 47 - (a) Amostra 1-Tecido sem tratamento, (b) Amostra 2, (c) Amostra 3, (d) Amostra 4, (e) Amostra 5, (f) Amostra 6



Observa-se também pela figura anterior, que a aplicação não se dá de forma homogênea, ocorrendo uma variação maior da cor onde há uma concentração maior de microcápsulas.

4.3 CONCLUSÕES

Observou-se que a aplicação das microcápsulas no tecido pelo equipamento Foulard foi superior quando comparado à aplicação por banho de exaustão.

Verificou-se que as microcápsulas contendo óleo de hortelã resistem ao processo de secagem do tecido, sendo que o mesmo não ocorreu para as microcápsulas contendo óleo de jojoba, as quais não resistiram.

As microcápsulas contendo óleo de hortelã podem ser aplicadas juntamente com o amaciante, sem interferir na sua morfologia ou mesmo na ação da enzima.

Torna-se necessário um estudo detalhado da reticulação das microcápsulas no tecido de algodão por glutaraldeído.

Verificou-se que a aplicação junto com o amaciante ameniza a variação da cor causada pela aplicação das microcápsulas no tecido de algodão.

CAPÍTULO V

Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos, resultados e discussões bem como as conclusões, relacionados à avaliação da liberação controlada das microcápsulas aplicadas no tecido de algodão.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção tratará dos materiais e métodos utilizados na fase experimental para o desenvolvimento desta terceira e última etapa do trabalho. Os materiais, reagentes, equipamentos e as soluções utilizadas, além das citadas no item “Preparo das soluções”, foram descritos no Capítulo III.

5.1.1 PROCEDIMENTOS

5.1.1.1 Preparo das soluções

5.1.1.1.1 Solução tampão de suor ácido e solução tampão de suor básico

Para ambas as soluções, seguiu-se a Norma ABNT NBR ISO 105 – E04: 2009, onde consta a composição do tampão suor ácido pH 5,5 e do tampão suor básico pH 8,0. As concentrações foram ajustadas para o que se pratica na indústria.

Para 1 L da solução de suor ácido, foi diluído em água destilada 2,7 g de cloreto de sódio com 0,75 g de uréia. O pH foi ajustado para 5,5 com uma solução de ácido acético 0,1 M.

Para 1 L da solução de suor básico, foi diluído em água destilada 0,84 g de cloreto de amônio, 1,73 g de cloreto de sódio e 0,42 mL de hidróxido de amônio. O ajuste do pH para 8,0 foi realizado com adição de hidróxido de sódio 0,1 M.

Estas soluções foram utilizadas na avaliação da liberação do encapsulado.

5.1.1.1.2 Avaliação da liberação controlada do óleo encapsulado

A liberação foi avaliada por duas técnicas diferentes: a primeira avaliou a ação da enzima nos tampões suor ácido e básico, e na segunda foi analisada a liberação controlada por cromatografia gasosa. Ambas as

análises foram realizadas para as microcápsulas contendo óleo de hortelã.

5.1.1.2 Avaliação da ação da enzima nos tampões suor ácido pH 5,5 e suor básico pH 8,0

Inseriu-se em 2 mL de solução tampão suor (ácido ou básico) 0,100 g de microcápsulas liofilizadas, as quais permaneceram sob agitação por 10 min a temperatura de 37°C. Ao fim desse tempo as amostras foram resfriadas e analisadas em microscópio ótico e comparadas com as imagens realizadas no início da reação.

5.1.1.3 Avaliação da liberação controlada por cromatografia gasosa

Para a avaliação da liberação controlada da fragrância de hortelã, foram preparadas três amostras de tecido: dois contendo a fragrância encapsulada e um contendo a fragrância livre.

Os dois tecidos contendo as microcápsulas foram impregnados pelo Foulard. A solução de 10 g/L de microcápsulas, preparada em tampão fosfato 50 mM e pH 7,0, foi introduzida no equipamento e aplicada em 41 g de tecido de algodão com *pick up* de 100%. Em seguida ocorreu a secagem na rama a 100°C por 5 min. A variação do pH da solução tampão fosfato de 7,5 para 7,0, foi necessária para igualar com o que se pratica na indústria, uma vez que se deseja avaliar a liberação controlada nas condições reais de operação.

Para o tecido contendo a fragrância livre, preparou-se uma solução em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 contendo apenas óleo de hortelã 8,33 mg/mL, sendo que, essa concentração foi a mesma adicionada para a microencapsulação. As condições de aplicação e secagem do tecido foram exatamente as mesmas utilizadas na aplicação das microcápsulas.

Após o preparo dos corpos de prova, estes foram acondicionados em embalagens plásticas fechadas e mantidos em condições ambientes. Sendo que, um dos tecidos contendo as microcápsulas e o tecido com a fragrância livre foram avaliados em condições ambientes.

O segundo tecido com microcápsulas foi avaliado sob as condições de liberação: 37°C e pH 8,0. Para tanto, o corpo de prova foi borrifado com a solução tampão suor 50 mM pH 8,0, permanecendo por 5 min em estufa a 37°C. Este procedimento foi realizado antes de cada avaliação.

Para os três casos avaliados, amostras de 0,200 g de tecido com a fragrância (encapsulado ou não) foram analisadas no cromatógrafo gasoso. A análise foi realizada em triplicata e as amostras retiradas sempre do mesmo tecido.

A quantificação dos componentes voláteis presentes nos tecidos impregnados com o óleo de hortelã, foram realizadas análises com evaporação total das amostras em um cromatógrafo gasoso (GC-2010AF) acoplado a um *headspace* (AOC-5000 Shimadzu), equipado com um detector por ionização de chama e um sistema de injeção *split/splitless*.

Uma vez que a análise foi realizada pela evaporação total dos componentes voláteis contidos na amostra, foi necessário determinar os parâmetros de operação do forno *headspace* que garantam a total transferência do aroma para a fase vapor. Sendo assim, foram analisadas no cromatógrafo amostras de tecidos contendo o mesmo teor de fragrância variando-se o tempo e a temperatura de incubação das amostras no forno *headspace*. Com isso, podem-se obter os parâmetros a serem adotados para as análises, apresentados na Tabela 7. A quantificação dos componentes foi baseada na área dos picos correspondentes.

Tabela 7 - Parâmetros estabelecidos para a quantificação de óleo de hortelã por cromatografia gasosa

Parâmetros	Descrição
Coluna capilar	Modelo RTX-5
Condições de operação da coluna	75°C (5 min.) até 220°C (5 min.) taxa de 20°/min.
Gás de arraste	Nitrogênio
Fluxo do gás de arraste	1,39 mL.min ⁻¹
Temperatura do detector	220°C
Temperatura de injeção	200°C
Condições do forno <i>headspace</i>	130°C, 4 minutos
Razão de <i>split</i>	10
<i>Software</i> utilizado	GC Solution v.2.3, Shimadzu Corporation

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estão apresentados aqui os resultados obtidos para a avaliação da liberação controlada das microcápsulas no tecido de algodão. O principal objetivo foi verificar se as microcápsulas contribuiriam na permanência prolongada e constante da fragrância no tecido, bem como se a enzima atuaria na liberação mais acentuada em condições desejadas. A seção e as subseções apresentadas serão:

a- Avaliação da liberação controlada

- Verificação da ação da enzima nos tampões, suor ácido e suor básico.
- Acompanhamento da liberação controlada por Cromatografia Gasosa (CG) das microcápsulas contendo óleo de hortelã.

5.2.1 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO CONTROLADA

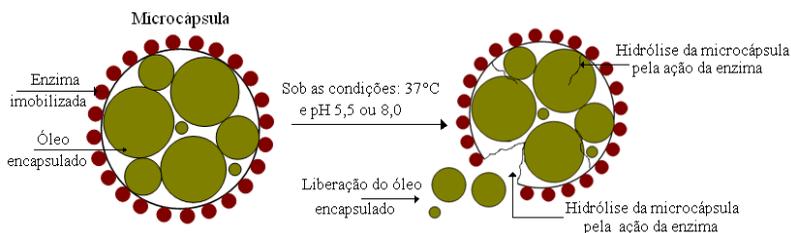
Sabendo-se que as microcápsulas de óleo de hortelã podem ser aplicadas ao tecido resistindo à secagem na rama, foi analisada a liberação controlada destas microcápsulas por cromatografia gasosa.

Havendo a intenção das microcápsulas serem hidrolisadas pela enzima, quando esta for ativada pela temperatura do corpo (37°C) e pelo suor humano, foram preparadas soluções que imitam o suor humano seguindo a Norma ABNT NBR ISO 105 – E04: 2009, a qual é utilizada na indústria têxtil para testes de solidez.

As microcápsulas foram submetidas às condições de liberação em tampão suor ácido pH 5,5 e em tampão suor básico pH 8,0, para verificação da hidrólise das mesmas, uma vez que até o momento esta verificação foi realizada apenas em tampão fosfato pH 7,5.

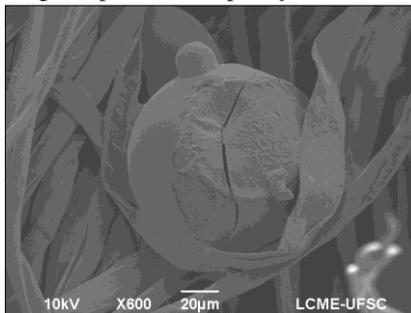
O processo de liberação da fragrância pode acontecer de forma difusiva através da parede da microcápsula, pela fricção das mesmas ou pode acontecer pela ação da enzima em condições desejadas, a qual hidrolisará a microcápsula, liberando o encapsulado, conforme o esquema representativo na Figura 48.

Figura 48 - Esquema representativo do processo de liberação da fragrância pela ação da enzima em condições específicas.



Na Figura 49 está apresentada a imagem, após 24h da aplicação pelo Foulard e secagem na rama (100°C por 5 min), do tecido com uma microcápsula contendo óleo de hortelã e a enzima imobilizada. O tecido permaneceu em condições ambientes até a análise. A solução de aplicação continha as microcápsulas em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Observa-se pela figura o início da hidrólise da microcápsula pela a ação da enzima imobilizada (0,25 mg/mL).

Figura 49 – Micrografia da microcápsula contendo óleo de hortelã, sendo hidrolisada pela ação da enzima papaína (0,25mg/mL). Aplicação pelo Foulard (microcápsulas em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5), secagem na rama (100°C/5min). Imagem após 24h da aplicação, em condições ambientes.



Inicialmente foi avaliado se a enzima ativaria nas condições desejadas e a partir deste resultado, foi escolhido um dos tampões suor para ser utilizado na etapa de avaliação da liberação por cromatografia gasosa.

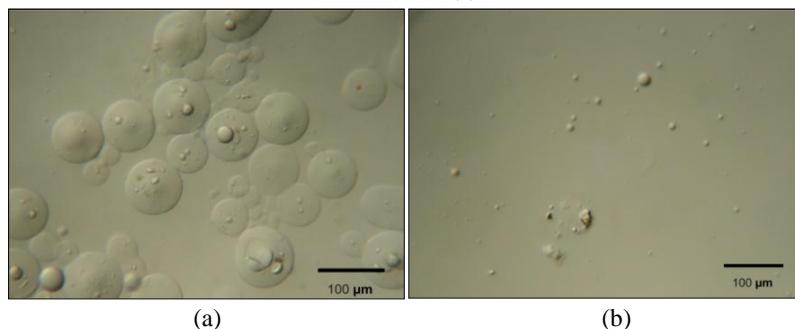
5.2.1.1 Verificação da ação da enzima nos tampões suor ácido e suor básico

Com o intuito de avaliar a ação da enzima na hidrólise das microcápsulas nos tampões suor ácido e básico nos pH de 5,5 e 8,0 respectivamente, as microcápsulas contendo óleo de hortelã com a papaína imobilizada (0,25 mg/mL) foram submetidas a estes tampões por 10 min a 37°C. Foram fotografadas imagens no tempo inicial e final, conforme mostra a Figura 50 e a Figura 51. Observa-se que o tempo de 10 min foi suficiente para ativar a enzima na temperatura de 37°C. Destaca-se também, que a composição de ambos os tampões suor não inibiu a ação da enzima a ponto de não hidrolisar a microcápsula.

Figura 50 - Imagens das microcápsulas a 37°C no tampão suor ácido pH 5,5 (a) no início do processo de liberação e (b) ao final do tempo de 10 min. Lente com aumento de 100x.



Figura 51 - Imagens das microcápsulas a 37°C no tampão suor básico pH 8,0 (a) no início do processo de liberação e (b) ao final do tempo de 10 min. Lente com aumento de 100x.



5.2.1.2 Acompanhamento da liberação controlada por Cromatografia Gasosa (CG) das microcápsulas contendo óleo de hortelã

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua única função é transportar o analito através da coluna (SKOOG, 2006).

Com o objetivo de avaliar o efeito de liberação controlada da fragrância proporcionado pelas microcápsulas, três tecidos foram impregnados, dois contendo a fragrância encapsulada, outro contendo a fragrância livre. Após o preparo dos corpos de prova, estes foram embalados em embalagem plástica fechada e mantidos em condições ambientes.

A evolução por CG da liberação da fragrância em função do tempo foi determinada quantificando alguns dos componentes presentes nas amostras. Não foi possível determinar a composição do óleo de hortelã, pois o equipamento não estava acoplado a um espectrômetro de massa. A Figura 52 apresenta o cromatograma obtido para o óleo puro e a Figura 53 mostra o cromatograma do tecido tratado (Aplicação e secagem) com as microcápsulas contendo óleo de hortelã. Percebe-se pela Figura 52 e pela Figura 53 uma diferença significativa entre os picos cromatográficos, principalmente para os picos iniciais. Isso porque, são compostos mais voláteis e não resistiram à secagem na rama (100°C por 5 min). Em virtude disso, os picos escolhidos para monitoramento foram em relação à Figura 53. Sendo assim, três picos foram monitorados, chamados de pico 1, 2 e 3, com tempo de retenção de 6,925, 8,839 e 9,987 min, respectivamente, conforme mostrado na Figura 53. Acredita-se que o pico 2 seja o pico relacionado ao mentol.

Figura 52 - Cromatograma do óleo de hortelã puro.

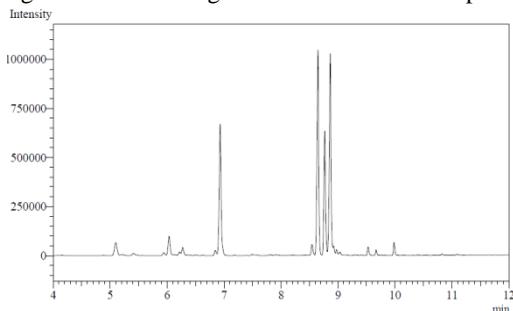
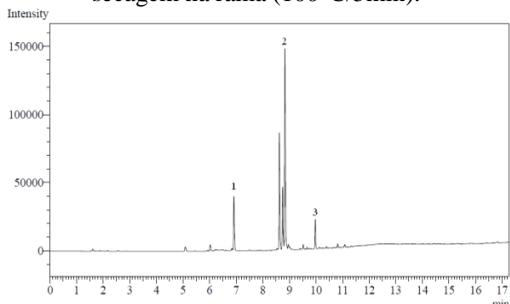


Figura 53 - Cromatograma obtido após a aplicação das microcápsulas contendo óleo de hortelã com a enzima imobilizada (0,05 mg/mL) no tecido de algodão, a secagem na rama (100°C/5min).



A análise por CG ocorreu logo após a impregnação e secagem dos tecidos, a quantidade de fragrância presente no tecido logo após a secagem foi considerada como 100% para o cálculo da fração de perda dos componentes ao longo do tempo.

A Figura 54 apresenta o comportamento obtido para os três componentes presentes na amostra tratada com microcápsulas, já a Figura 55 mostra o comportamento para a amostra tratada com o óleo de hortelã livre. Em ambos os casos as amostras permaneceram na temperatura ambiente.

Pode-se observar pela Figura 54 e pela Figura 55 que o óleo de hortelã não encapsulado perdeu uma quantidade maior dos componentes avaliados quando comparado ao microencapsulado. Este comportamento é evidenciado na Figura 56, onde é apresentado um comparativo entre as duas amostras, para o pico 2. Com base nestes resultados, é possível afirmar que a microencapsulação contribuiu para a proteção do óleo

encapsulado, favorecendo a permanência da fragrância ao tecido por maior tempo quando comparado ao tecido com o óleo livre.

Com base na Figura 55 percebe-se um decréscimo acentuado, dos componentes referentes aos picos 2 e 3, nos três primeiros dias avaliados, já o componente referente ao pico 1 perde consideravelmente sua intensidade após o primeiro dia, em virtude de ser mais volátil que os demais. Ao fim do período monitorado houve uma perda da fragrância para esta amostra entre 96 e 99%, aproximadamente.

Para o tecido tratado com as microcápsulas, Figura 54, o decréscimo em relação aos componentes referentes aos picos 2 e 3 foi menos acentuado nos três primeiros dias, quando comparado ao tecido com a fragrância livre (Figura 54). Este decréscimo inicial, visto na Figura 54, pode ser atribuído à liberação do óleo de hortelã que pode não ter sido efetivamente encapsulado na reação de formação das microcápsulas. Pois, como se trata de um óleo, após a formação das microcápsulas as mesmas são lavadas apenas com água e não com algum tipo de solvente, que pudesse eventualmente remover o excesso de óleo presente ao redor da microcápsula.

Em relação ao componente referente ao pico 1, percebe-se uma maior concentração ao longo dos dez dias acompanhados, quando comparado ao tecido com o óleo livre, confirmando assim, a eficiência da microencapsulação em preservar componentes mais voláteis.

Pelo decréscimo na concentração dos compostos, pode-se dizer que a liberação controlada começa a partir do terceiro dia para o pico 1 e a partir do quarto dia para os demais componentes, onde observa-se um comportamento praticamente constante de liberação. A perda de fragrância para esta amostra, ao fim dos dez dias avaliados foi entre 74 e 85%, aproximadamente. Sendo que, para o componente referente ao pico 2 (provavelmente mentol) a microencapsulação favoreceu em 24% na sua permanência ao tecido.

Figura 54 - Comportamento da perda dos três componentes avaliados para o tecido tratado com as microcápsulas em pH 7,0.

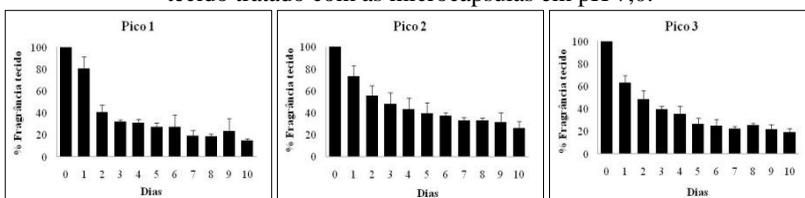


Figura 55 - Comportamento da perda dos três componentes avaliados para o tecido tratado com o óleo de hortelã livre em pH 7,0.

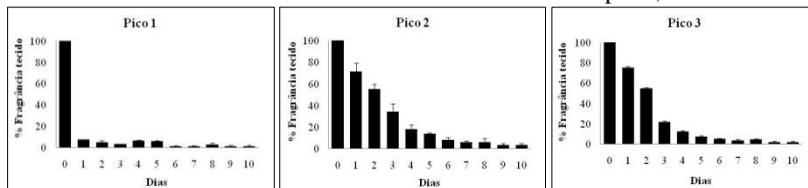
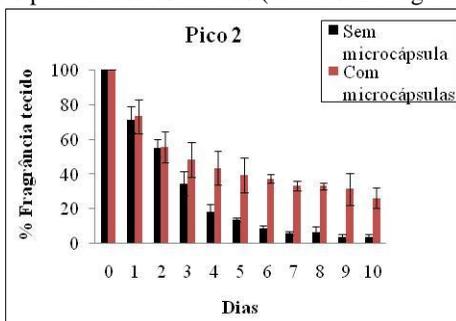


Figura 56 - Comparativo do comportamento da perda do componente referente ao pico 2 avaliado para ambos os tecidos (com e sem fragrância encapsulada).



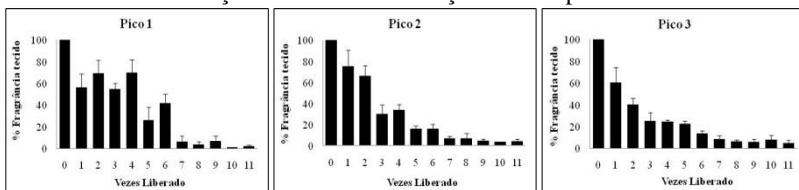
Realizou-se uma nova avaliação do tecido contendo as microcápsulas (referente à Figura 54) após 52 dias da aplicação e verificou-se que para os três componentes avaliados não houve perda da fragrância, isto é, a liberação ainda estava acontecendo de forma constante. Para o componente referente ao pico 2, após os 52 dias a perda ainda estava em 74%, indicando a estabilidade da liberação.

Chang et al. (2006) encapsularam óleo de cânfora com adição de poliestireno, em microcápsulas de gelatina e goma arábica obtidas pelo método de coacervação e avaliaram a liberação por 120 min, observando que a liberação do óleo ocorre normalmente a uma taxa mais elevada nos primeiros 20 min. A adição de poliestireno teve o objetivo de tornar a liberação do óleo mais constante durante esse tempo. Concluíram que quanto maior a concentração de poliestireno adicionada no meio mais constante se tornava a liberação, isso possivelmente devido a inter-reação entre as moléculas do óleo de cânfora e as moléculas do poliestireno.

Avaliou-se também a liberação do óleo encapsulado nas condições de ativação da enzima (pH 8,0 e temperatura de 37°C), o comportamento obtido para os três componentes monitorados

(referentes aos picos 1, 2 e 3) está apresentado na Figura 57. Esta amostra pôde ser ativada onze vezes até que houvesse a perda da fragrância de 95 a 98%, aproximadamente. O componente referente ao pico 1 teve um comportamento um tanto diferente dos demais, provavelmente por ser o mais volátil e com isso torna-se mais difícil seu monitoramento.

Figura 57 - Avaliação da perda dos três componentes monitorados, quando há a ativação da enzima e liberação do encapsulado.



Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a microencapsulação favoreceu na permanência da fragrância no tecido, indicando que essa metodologia é válida para aplicação em tecidos de algodão. Porém, é necessária uma melhor investigação da reticulação das microcápsulas do tecido, para que se tenha resistência à lavagem e uma maior durabilidade.

Em relação às microcápsulas com a enzima imobilizada, foi possível comprovar que a liberação acontece de forma mais intensa quando o tecido é submetido às condições de pH 8,0 ou 7,5 e temperatura de 37°C, observou-se ainda que o mesmo tecido pode ser submetido à estas condições por mais de uma vez até que a fragrância seja totalmente liberada.

5.3 CONCLUSÕES

Verificou-se que a microencapsulação favoreceu na permanência da fragrância no tecido quando comparado a aplicação com o óleo livre. Em relação às microcápsulas com a enzima imobilizada, houve a ativação da enzima e com isso, a liberação mais acentuada do óleo encapsulado.

A perda de intensidade para os três componentes avaliados foi de 74 a 85% quando microencapsulado, enquanto que para a aplicação com o óleo livre a perda foi de 96 a 99% ao fim dos 10 dias monitorados.

A microencapsulação favoreceu em aproximadamente 24% a permanência da fragrância (em relação ao componente referente ao pico 2) no tecido.

A ativação da enzima foi realizada por onze vezes consecutivas, até que houvesse a perda da fragrância de 95 a 98%, durante o período avaliado.

CAPÍTULO VI

Neste capítulo estão apresentadas as principais conclusões e as sugestões para trabalhos futuros.

6.1 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo da imobilização da enzima papaína em microcápsulas de gelatina e goma arábica para auxiliar na liberação controlada do óleo de hortelã e do óleo de jojoba encapsulado, aplicados em tecido de algodão.

Com base nos resultados obtidos, a metodologia empregada mostrou-se satisfatória para a obtenção das microcápsulas contendo a enzima papaína imobilizada. Contudo, foi possível a avaliação da liberação controlada apenas para as microcápsulas contendo óleo de hortelã.

Comprovou-se que o óleo de hortelã afeta em aproximadamente 85% a atividade da enzima papaína, enquanto que o óleo de jojoba e o amaciante não interferiram significativamente na ação da mesma.

Verificou-se através da determinação das condições ótimas de operação da enzima, que em pH 5,5 e 8,0 na temperatura de 37°C, há uma ação mais lenta da enzima favorecendo assim, a liberação controlada do encapsulado.

A atividade enzimática específica para a enzima livre foi de 1,32 U/mg de proteína, após a imobilização nas microcápsulas contendo óleo de jojoba a atividade enzimática encontrada foi de 0,049 U/mg de suporte. Já para as microcápsulas contendo óleo de hortelã a atividade enzimática encontrada foi de 0,020 U/mg de suporte.

Avaliou-se a aplicação das microcápsulas ao tecido de algodão, sendo que a aplicação pelo equipamento Foulard mostrou-se superior quando comparado a aplicação por banho de exaustão.

Verificou-se que as microcápsulas contendo óleo de hortelã resistem ao processo de secagem do tecido. O mesmo não ocorreu para as microcápsulas contendo óleo de jojoba, uma vez que a concentração de enzima imobilizada foi maior que a necessária.

A aplicação das microcápsulas contendo óleo de hortelã juntamente com a solução de amaciante mostrou-se favorável, não interferindo na sua morfologia.

Torna-se necessário um maior estudo da reticulação das microcápsulas ao tecido de algodão por glutaraldeído, já que neste

trabalho não foi possível a realização de testes para avaliar a reticulação existente.

A microencapsulação mostrou-se favorável na proteção do óleo de hortelã encapsulado, uma vez que ao fim dos dez dias monitorados a perda de intensidade para os três componentes avaliados foi de 74 a 85%, enquanto que para a aplicação com o óleo livre a perda foi de 96 a 99%. Sendo assim, a microencapsulação favoreceu em aproximadamente 24% a permanência da fragrância (em relação ao componente relacionado ao pico 2) no tecido.

A ativação da enzima foi realizada por onze vezes consecutivas, até que houvesse a perda da fragrância de 95 a 98%, durante o período avaliado.

Conclui-se que a metodologia desenvolvida possibilita a aplicação das microcápsulas contendo óleo de hortelã em tecidos de algodão e favorecendo assim, a permanência da fragrância ao tecido, bem como a liberação mais acentuada do óleo nas condições estabelecidas de ativação da enzima.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influência do tempo de imobilização das enzimas e consequentemente o tempo de reticulação das microcápsulas;
- Realizar estudo da reticulação das microcápsulas no tecido de algodão pela ação do glutaraldeído, bem como de outros reticulantes citados na literatura;
- Determinar as novas condições de processo, como concentração da enzima imobilizada, para microcápsulas contendo frações do óleo de jojoba e do óleo de hortelã;
- Verificar a estabilidade de armazenamento das microcápsulas;
- Avaliar a aplicação das microcápsulas liofilizadas no tecido de algodão;
- Avaliar a microencapsulação e liberação de outros óleos, como por exemplo, o óleo de cravo;
- Analisar a viabilidade de aplicação em diferentes tipos de tecidos.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR 10591. **Materiais têxteis - Determinação da gramatura de superfícies têxteis**. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2008.

ABNT NBR ISO 105 – E04. **Têxteis – Ensaio de solidez da cor. Parte 04: Solidez da cor ao suor**. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009.

AFAQ, S.; IQBAL, J. Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable Carrier. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n.3, Issue 15, 2001.

Disponível:

<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/viewFile/v4n3-1/916>.

Acesso em: maio. 2012.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). **Panorama Setorial Têxtil e Confecção**. Série Cadernos da Indústria ABDI, Vol. IV, Brasília: ABDI, 2008.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2005.

ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, 2010.

ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R. K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 3, p. 267-271, 2000.

ARNON, R. Papain. **Methods Enzymol**, v. 19, p. 226-246, 1970.

BAGAL-KESTWAL, D.; KESTWAL, R. M.; CHIANG, B. H.; KARVE, M. S. Development of dip-strip sucrose sensors: Application of plant invertase immobilized in chitosan–guar gum, gelatin and poly-

acrylamide films. **Sensors and Actuators B**, v. 160, p. 1026– 1033, 2011.

BAYRAMOGLU, G.; SENKAL, B. F.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization and stabilization of papain on poly(hydroxyethyl methacrylate–ethylenglycol dimethacrylate) beads grafted with epoxy functional polymer chains via surface-initiated-atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9833–9837, 2011.

BELITZ, H. D; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. Ed. Zaragoza (Espanha): Acribia, S. A, 1997.

BHATTACHARYYA, A.; DUTTA, S.; DE, P.; RAY, P.; BASU, S. Removal of mercury (II) from aqueous solution using papain immobilized on alginate bead: Optimization of immobilization condition and modeling of removal study. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9421–9428, 2010.

BIAN, W. et al. Immobilization of papain by carboxyl-modified SBA-15: Rechecking the carboxyl after excluding the contribution of H₂SO₄ treatment. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 143, p. 341–347, 2011.

BISHT, R. P. S.; SIVASANKARAN, G. A.; BHATIA, V. K. Additive properties of jojoba oil for lubricating oil formulations. **Wear**, v. 161, p. 193-197, 1993.

BOGDANSKY, S. Nova Pharmaceutical Corporation. Baltimore. Maryland. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, vol. 45. **Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems**. Edited by CHASIN, M., LANGER, R. 1990.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. v 1. São Paulo: Blucher, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, A. M. G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.** Dissertação (Mestrado em saúde e ambiente). Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes. Aracaju, 2007.

CABRAL, H. **Análise Funcional e Estrutural Comparativa da Fastuosaina com Papaína e Bromelinas.** Tese (doutorado em Biofísica Molecular). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. São José do Rio Preto, 2005.

CAPUCHO, H. C. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fabricação). Departamento de Engenharia Têxtil, Escola de Engenharia, 2003.

CARVALHO, C. C. C. R; FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, p. 413–422, 2006.

CAVACO-PAULO, A. M. **Influência da agitação mecânica e da composição enzimática o tratamento do algodão com celulasas.** Tese (doutorado em Eng. Têxtil). Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga, 1995.

CHANG, C. P.; LEUNG, T. K.; LIN, S. M.; HSU, C. C. Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 50, p. 136–140, 2006.

CHANG, C. P.; YAMAMOTO, T. A; KIMURA, M.; SATO, T.; ICHIKAWA, K.; DOBASHI, T. Release characteristics of an azo dye from poly(ureaurethane) Microcapsules. **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 207–211, 2003.

DAMRONGSAKKUL, S.; RATANATHAMMAPAN, K.; KOMOLPIS, K.; TANTHAPANICHAKOON, W. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, p. 202–206, 2008.

DONG, Z.; MA, Y.; HAYAT, K.; JIA, C.; XIA, S.; ZHANG, X. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 455–460, 2011.

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, A.; DE, P.; RAY, P.; BASU, S. Removal of mercury from its aqueous solution using charcoal-immobilized papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 888–896, 2009.

FÁVARO, S. L.; GUILHERME M. R.; OLIVEIRA F.; RADOVANOVIC, E.; MUNIZ, E. C. Modificação Química da Goma Arábica para Obtenção de Hidrogéis Superabsorventes. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Foz do Iguaçu, Brasil, 2006.

FERREIRA, S. R. S. **Extração em Dióxido de Carbono Líquido Subcrítico de Óleo Essencial de Pimenta-do-reino**. Tese (Doutorado em Eng de alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1991.

FERREIRA, A. M; OLIVEIRA, K. A.; VIEIRA, L. C.; ROL, J. L. Revisão de Estudos Clínicos de Enfermagem: Utilização de Papaína para o Tratamento de Feridas. **R Enferm UERJ**, v. 13, p. 382-390, 2005.

FREIRE, M. M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)**. Tese (Doutorado em Agroquímica). Programa de Pós-graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

FUGUET, E; PLATERINK, C. V.; JANSSEN, H. G. Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in gelatine–gum arabic complex coacervates. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, p. 45–53, 2007.

GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico: Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 39, n. 4, 2003.

GAMBÔA, A. G. **Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas**. Dissertação (Mestrado em Biologia). Programa de Pós-graduação em Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

GARCIA-CARREÑO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of proteases without tears. **Biochem. Educ.**, v. 25, n. 3, p. 161-167, 1997.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p 246–251, 2003.

GIRAUD, S.; BOURBIGOT, S.; ROCHERY, M.; VROMAN, I.; TIGHZERT, L.; DELOBEL, R. Microencapsulation of phosphate: application to flame retarded coated cotton. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 77, p. 285–297, 2002.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.

GULRAJANI, M. L.; GUPTA, D. Emerging Techniques for Functional Finishing of Textiles. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 36, p. 388 – 397, 2011.

GUNSTONE, F. D. Jojoba oil. **Endeavour**, v. 14, n. 1, p. 40-43, 1990.

HABASHY, R. R.; ABDEL-NAIM, A. B.; KHALIFA, A. E.; AL-AZIZI, M.M. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 95–105, 2005.

HARDY, P. M.; HUGHES, G. J.; RYDON, H. N. The nature of the cross-linking of proteins by glutaraldehyde. Part 2. The formation of quaternary pyridinium compounds by the action of glutaraldehyde on

proteins and the identification of a 3-(2-piperidil)-pyridinium derivative, anabily sine, as a cross-linking entity. **J. C. S. Perkin, I**, p. 2282-2288, 1979.

ITOYAMA, K.; TANIBE, H.; HAYASHIJ, T.; IKADAL, Y. Spacer effects on enzymatic activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. **Biomaterials**, v. 15, n. 2, 1994.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SHABI, M.; NGASSOUM, M. B. Comparative investigation of essential oil and volatiles of spearmint. **Perfum. Flav.**, v. 27, p. 16–22, 2002.

KRUIF, C. G. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 340-349, 2004.

LANGE, C. R. **Estudo das Condições Operacionais do Processo de Tingimento de Fibra Mista Acrílico/Algodão em Bobina Cruzada**. Dissertação (Mestrado em Eng. Química). Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

LEI, H. et al. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 15–21, 2004.

LEIMANN, F. V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo coacervação simples**. Dissertação (Mestrado em Eng. Química). Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

LI, F. Y.; XING, Y. J.; DING, X. Immobilization of papain on cotton fabric by sol–gel method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1692–1697, 2007.

LI, F. Y.; JIA, F. Y.; LI, J. R.; LIU G.; LI, Y. Z. Papain immobilization on a nitrilon fibre carrier containing primary amine groups. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 33, p. 29-34, 2001.

LIMA, J. R.; NASSU, R. T. Substitutos de Gorduras em Alimentos: Características e Aplicações. **Química Nova**, v. 19, n. 2, 1996.

LOPES, J. L. S. **Purificação e investigação das propriedades físicoquímicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2006.

LOPES, P. S. et al. *In vitro* safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, 2008.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** 2. Ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008.

LOWE, G. The Cysteine Proteinases. *Tetrahedron Report*, v. 32, p. 291-302, 1976.

MA, Z. H. et al. Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 85–90, 2009.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104-1111. 2007.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER & STÉPHANE DESOBRY J., Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Science and Technology*, v. 41, p. 1-21, 2006.

MASCARENHAS, M. C. C. N. **Utilização de Surfactantes na Produção de Microencapsulados de Óleo Rico em Ômega 3 por Coacervação Complexa com Aplicação em Emulsões.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

MATOS, B. M; KOMIYAMA, E. Y.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre

Candida albicans e *C. tropicalis*. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 38, n. 4, p. 244-48, 2009.

MENESES, C. T. **Estudo da cristalização de nanopartículas de NiO por difração e absorção de raios-X**. Tese (Doutorado em Física). Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L. **Nomenclatura Botânica, Classificação e Identificação de Plantas Medicinais**. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed.ver. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001.

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, p. 798–802, 2004.

MONLLOR, P.; BONET, M. A.; CASES, F. Characterization of the behaviour of flavour microcapsules in cotton fabrics. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2481–2490, 2007.

NARITA, T.; KISHIGAWA, T.; TAGAMI, Y.; OISHI, Y. Preparation of W/O/W microcapsule containing enzyme without alcohol. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 347, p. 187–191, 2009.

NELSON, G. Application of microencapsulation in textiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 55–62, 2002.

NITSAWANG, S; HATTI-KAULB, R E KANASAWUDA, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and Microbial Technology**, vol.39, pg. 1103–1107, 2006.

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

OREFICE, R. L. Em **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações**; ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PEGORARO, R. L. **Avaliação do crescimento e produção de óleos essenciais em plantas de Mentha x piperita L. Var. Piperita (Lamiaceae) Submetidas a Diferentes níveis de Luz e Nutrição**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

PETITTI, M.; BARRESI, A. A.; VANNI, M. Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 859–866, 2009.

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. vol. 2, São Paulo (SP) : Edgard Blucher, 2001.

RAO, R. S.; BORKAR, P. S.; KHOBRAGADE, C.N.; SAGAR, A.D. Enzymatic activities of proteases immobilized on tri(4-formyl phenoxy) cyanurate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 958–962, 2006.

REQUE, M. L. **Uso de Papaína como Potencializadora da Penetração Cutânea de Diclofenaco Dietilamônio em Pomada**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

REVELLO, J. H. P. **Tingimento de Fios Têxteis em Bobinas: Uma Abordagem Numérica e Experimental**. Tese (Doutorado em Eng. Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

RODRIGUES, S. N., MARTINS, I. M., FERNANDES, I. P., GOMES, P. B., MATA, V. G., BARREIRO, M. F., RODRIGUES, A. E., Scentfashion: microencapsulated perfumes for textile application. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, p. 463-472, 2009.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SAFARÍK, I.; SAFARÍKOVÁ, M. Spectrophotometric determination of effective proteolytic activity in biodetergents. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 28, p. 131-136, 1994.

SANTOS, R. **Imobilização de Lipases em Gel de Pectina**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Regional de Blumenau. Mestrado Interinstitucional em Química – UFSC/FURB. Florianópolis e Blumenau, 2003.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the Size of the Active Site in Proteases, I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 27, n. 2, 1967.

SCHUMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine**, v.10, p. 504–510, 2003.

SCRIBAN, R (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole LTDA, 1985.

SEGTMAN, V.H.; KVAAL, K.; RUKKE, E.O.; SCHULLER R.B.; ISAKSSON T. Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 585–592, 2003.

SHI, X. Y.; TAN, T. W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2. **Biomaterials**, v. 23, p. 4469–4473, 2002.

SILVA, C. J. S. M. **Enzymatic Treatment of Wool with Modified Proteases**. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil). Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2005.

SILVA, R. J. M. **Tratamento de Fibras Têxteis com Ultra-Sons e Enzimas**. Dissertação (Mestrado em Química Têxtil). Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2006.

SILVA, R. L. F. O. B.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 28, n. 3, p. 642-648, 2008.

SINGH, V.; AHMED, S. Silver nanoparticle (AgNPs) doped gum acacia–gelatin–silica nanohybrid: An effective support for diastase immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 353– 361, 2012.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo (SP): Cengage Learning, 2006.

SMITH, E. L. Peptide Bond Cleavage (Survey). In: Boyer, P. D.; Lardy, H.; Myrbäck, K. (Coord). **The Enzymes**. 2 ed.. New York: Academic Press, 1959.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Vol. 2, p. 388-393, 1996.

SPECOS, M. M. M.; ESCOBAR, G.; MARINO, P.; PUGGIA, C.; VICTORIA, M.; DEFAIN TESORIERO, M. V.; HERMIDA, L. G. Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques. **Journal of Industrial**, v. 40, n. 1, 2010.

SPECOS, M. M. M.; GARCÍA, J.J.; TORNESELLO, J.; MARINO, P.; DELLA VECCHIA, M.; DEFAIN TESORIERO, M.V.; HERMIDA, L. G. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 653–658, 2010.

STOTT, P. W., WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W. Characterization of complex coacervates of some tricyclic antidepressants and evaluation of

their potencial for enhancing transdermal flux. **Journal of Controlled Release**, v. 41, p. 215-227, 1996.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v.7, p. 12-20, 2006.

SUNGUR, S.; ELCH, M. Studies on immobilization of urease in gelatin by cross-linking. **Biomaterials**, v. 13, n. 11, 1992.

TAKADA, S.; YAMAGATA, Y.; MISAKI, M.; TAIRA, K.; KUROKAWA, T. Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. **Journal of Controlled Release**, v.88, p. 229–242, 2003.

TAUBER, H. **The Chemistry and Technology of enzymes**. New York: J. Wiley & Sons, 1950, 550 p.

TODOROVA, S. B.; SILVA, C. J. S. M.; SIMEONOV, N. P.; CAVACO-PAULO, A. Cotton fabric: A natural matrix suitable for controlled release systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1646–1650. 2007.

TROTMAN, E. R. **Dyeing and Chemical Technology of Textile Fibres**. 6. Ed. England: Charles Griffin & Company Limited, 1984.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Protein Inhibitors of Proteinases in Seeds: 1. Classification, Distribution, Structure, and Properties. **Journal of Plant Physiology**, v. 46, n. 3, p. 307-321, 1999.

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G. A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v. 205, p. 65–70, 2011.

VENTURELLI, R. B. **Microencapsulação por Coacervação Complexa de óleo de menta aplicados em tecidos de algodão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

VERBEKEN, D., DIERCKX, S., DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 10–21, 2003.

VERGARO, V. et al. Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 847–864, 2011.

VIDAL, S. M. **Potencial biotecnológico das cistatinas**. Embrapa Algodão: Campina Grande - PB. 1ª ed. 27p. 2003.

VIEIRA, C. R. **Extração, Hidrólise e Remoção de Fenilalanina das Proteínas de Farinha de Arroz**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*. 2. Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

VUJCIC, Z.; MILORADOVIC, Z.; MILOVANOVIC, A.; BOZIC, N. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. **Food Chemistry**, v. 126, p. 236–240, 2011.

VULCANI, V. A. S. **Matrizes de Colágeno para Liberação Controlada de Progesterona**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, 2004.

WANG, A. et al. Ag-induced Efficient Immobilization of Papain on Silica Spheres. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 4, p. 612 – 619, 2008.

WISNIAK, J. Potential uses of jojoba oil and meal - a review. **Industrial Crops and Products**, v. 3, p. 43-68, 1994.

YEO, Y. et al. Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavor Compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7518-7525, 2005.

YOSHIOKA, S. A.; BRAILE, D. M.; RAMIREZ, V.; GOISSIS, G. Reticulação de Matrizes Colagênicas com Diacetais de Glutaraldeído para a Preparação de novos Biomateriais. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1995.

ZAGUE, V. et al. Avaliação do Efeito do Óleo de Jojoba na Regeneração Cutânea. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 85-8, 2005.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, vol.21, n.6, p. 787-793, 1998.

ZHAO, B; SHI, B.; MA, R. Immobilization of Papain on the Mesoporous Molecular Sieve MCM-48. **Eng. Life Sci**, v. 5, n. 5, 2005.

ZHUANG, P.; BUTTERFIELDASB, D. A. Structural and enzymatic characterizations of papain immobilized onto vinyl alcohol/vinyl butyral copolymer membrane . **Journal of Membrane Science**, v. 66, p. 247-257, 1992.