



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES A PARTIR DE
CASEÍNA E GELATINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE
COM TRIPSINA E TRANSGLUTAMINASE**

Hulda Noemi Chambi Mamani
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos R. F. Grosso

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de
alimentos da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição

Campinas, Julho de 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C355d Chambi Mamani, Hulda Noemi
Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina
modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase /
Hulda Noemi Chambi Mamani. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Enzimas proteolíticas. 2.Transglutaminase. 3.Filmes
comestíveis. 4.Gelatina 5.Caseína. I.Grosso, Carlos Raimundo
Ferreira. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

CARS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientador)

Prof. Dra. Helia Harumi Sato
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Prof. Dra. Florência Menegalli
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho
Faculdade de Zootécnica e Engenharia de Alimentos - USP
(membro)

*“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças; porque no além,
para onde tu vais, não há obra, nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma”*
Eclesiastes 9:10

*Dedico este trabalho aos meus pais Nicanor e Irma,
meus maiores tesouros aqui na terra
e às minhas irmãs Esther e Dámariz,
minhas melhores amigas.*

A vitória foi de vocês!

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu querido Deus por preparar “tudo” o necessário para a realização desta pesquisa.

É difícil encontrar as palavras certas para expressar meus agradecimentos às pessoas e instituições que participaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa. A todos gostaria de exprimir os maiores agradecimentos e aqui reconhecer o seu importante contributo.

Ao Prof^o. Dr. Carlos R. F. Grosso, orientador desta tese, agradeço pela sua confiança, disponibilidade e, principalmente, o respeito com o qual tratou as minhas dificuldades profissionais e pessoais durante todo o processo de mestrado.

A Prof^a. Dra. Flávia Maria Netto por disponibilizar o Laboratório de Bioquímica Nutricional – DEPAN para a realização de uma grande parte do meu trabalho experimental.

Aos membros da banca pelas correções e valiosas sugestões apresentadas à redação final da tese.

A AJINOMOTO e NOVOZYMES pela doação das enzimas, transglutaminase e tripsina.

Aos colegas e amigos, a seguir citados, pelos ensinamentos dos princípios e técnicas seguidos na parte experimental desta pesquisa. Eliane (Eletroforese); Elizabete (TNBS e pH-stat); Larissa, Juliana, Delia, Chico e Adriane (Elaboração e Caracterização dos Filmes). Muito obrigada!

A Karina e Lilian pela assistência, apoio e, principalmente, por dar o melhor de vocês na fase final da parte experimental deste trabalho.

Aos amigos que dedicaram tempo às discussões dos problemas que surgiram ao longo do trabalho, especialmente a Isabela e Ana Silvia.

Ao Prof^o. Dr. José Aloísio Antunez pela sua orientação inicial, animo e apoio brindados muito antes de eu começar o mestrado.

A Dudinha, Janai, Suzy, Lucia, Soninha e Carol por desempenharem durante todo este mestrado o papel de colegas, amigas e irmãs mostrando sempre amor, respeito, integridade, abnegação, e atenção. Aprendi muito de vocês e as guardo no coração!

A Keila e Leila, por serem, mães e amigas, principalmente na fase final do mestrado, quando a saudade aumenta!

A Claudinha, Márcia e Vivian pelas “caronas” (Hortolândia - Unicamp) e principalmente pela sua disposição e carinho.

Aos funcionários da UNICAMP, especialmente ao Cosme, Creuza, Geraldo, Claudia, José, Cidinha, Graça, Fátima e André pela atenção.

A Carol, Maria Inês, Ro, Liz, Luciano, Fábio, Tassiana, Andréa, Julio, Sócrates, Elmer Silvia, Danuta, Natalia, Bruna, Fábio e Poliana pelas palavras de ânimo. E aos tantos outros amigos da UNICAMP meus agradecimentos sinceros.

Ao “Chorus Dei” e orquestra pela música, ambiente e momentos, sempre agradáveis, onde o “stres” sumia por completo.

A todos os amigos da igreja adventista de Hortolândia que no decorrer desta pesquisa me brindaram carinho e amizade.

Finalmente, a maior gratidão é para a Família Bianchi Ferreyra, por me acolher na família, especialmente a Silvana quem me levou para sua casa ainda sem me conhecer e sem pedir nada em troca. Eu amo e admiro muito vocês!

É muito bom saber que tem pessoas que se interessam em ajudar-nos a alcançar nossos objetivos.

A todos vocês: MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

Índice	viii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xii
Resumo	xiii
Summary	xiv
1. Introdução	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Geral	3
1.1.2. Específicos	4
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Gelatina	5
2.2. Caseína	7
2.3. Modificação enzimática de proteínas.....	9
2.3.1. Proteases	9
2.3.2. Transglutaminase	13
2.4. Filmes e coberturas comestíveis	17
2.4.1. Avaliação das propriedades de filmes e coberturas.....	20
3. Materiais e métodos	24
3.1. Materiais	24
3.2. Métodos	24
3.2.1. Fluxograma geral do experimento.....	24
3.2.2. Hidrólise das proteínas com tripsina	25
3.2.3. Caracterização dos hidrolisados	29
3.2.4. Polimerização dos hidrolisados	30
3.2.5. Elaboração de filmes	33
3.2.6. Caracterização dos filmes	37
3.2.7. Análise estatística	38

4. Resultados e discussões.....	39
4.1. Hidrólise com tripsina.....	39
4.1.1. Produção dos hidrolisados.....	39
4.1.2. Caracterização dos hidrolisados.....	40
4.2. Polimerização dos hidrolisados	45
4.2.1. Efeito dos parâmetros de polimerização.....	45
4.2.2. Influência das enzimas proteolíticas	49
4.3. Elaboração de filmes	54
4.3.1. Formação de filmes a partir das proteínas nativas.....	54
4.3.2. Formação de filmes a partir dos hidrolisados	68
5. Conclusões.....	71
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	72
7. Referências bibliográficas.....	73
ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posição de ataque das enzimas proteolíticas nas proteínas.....	10
Figura 2. Locais de clivagem β -caseína pela ação da tripsina.....	12
Figura 3. Reações catalisadas pela transglutaminase.	14
Figura 4. Processo de ativação por difusão	22
Figura 5. Fluxograma geral dos experimentos	25
Figura 6. Fluxograma para a obtenção dos hidrolisados de gelatina e caseína.	26
Figura 7. Fluxograma da polimerização dos hidrolisados.....	31
Figura 8. Fluxograma geral da produção de filmes com e sem transglutaminase	34
Figura 9. Curva de hidrólise da caseína (40°C) e gelatina (45°C) utilizando a enzima tripsina, em pH constante de 8.0.	39
Figura 10. Perfil de solubilidade da caseína nativa e hidrolisada em função do pH a 23° C	42
Figura 11. Perfil de solubilidade da gelatina nativa e hidrolisada em função do pH a 23°C	42
Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína.....	44
Figura 13. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína submetidos à reação com diferentes concentrações de transglutaminase	46
Figura 14. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína tratados com transglutaminase sob diferentes concentrações de proteína, temperatura e tempo de incubação..	49
Figura 15. Eletroforese SDS-PAGE dos peptídeos de caseína, produzidos com diferentes enzimas proteolíticas, tratados com transglutaminase.	51
Figura 16. Eletroforese SDS-PAGE da caseína polimerizada com transglutaminase na presença de excesso de resíduo mineral.....	52
Figura 17. Imagens da seção transversal dos filmes de caseína [a] e gelatina [b], nativas [-1] e modificadas com transglutaminase [-2], obtidas por microscopia eletrônica de varredura (x4000).	62

Figura 18. Imagens da seção transversal dos filmes de caseína:gelatina, nativos e modificados com transglutaminase, obtidos por microscopia eletrônica de varredura (x4000).	63
Figura 19. Formação das fibras do colágeno	64
Figura 20. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de filmes de caseína e gelatina sem tratamento enzimático.....	67
Figura 21. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de filmes de caseína e gelatina tratados com transglutaminase.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição de aminoácidos da gelatina.....	6
Tabela 2. Composição de aminoácidos dos principais componentes das caseínas.....	8
Tabela 3. Classificação das endopeptidases	10
Tabela 4. Especificidade de algumas proteases	11
Tabela 5. Condições do processo de polimerização dos hidrolisados.....	32
Tabela 6. Proporções de gelatina e caseína utilizadas na produção dos filmes	35
Tabela 7. Proporções de CaH e GeH utilizadas na elaboração de filmes	37
Tabela 8. Proteína bruta, cinzas e umidade das amostras de gelatina, caseína e seus hidrolisados.....	40
Tabela 9. Porcentagem de grupos amino livres dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com diferentes concentrações de transglutaminase	45
Tabela 10. Porcentagem de grupos amino livres dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com transglutaminase sob diferentes concentrações de proteína, temperatura e tempo de incubação.	48
Tabela 11. Porcentagem de grupos amino livres dos peptídeos de caseína, produzidos com diferentes enzimas proteolíticas, tratados com transglutaminase.	50
Tabela 12. Resistência à tração dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase (23°C, 50% UR)	55
Tabela 13. Porcentagem de alongação dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase (23°C, 50% UR)	57
Tabela 14. Modulo de elasticidade dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase.....	59
Tabela 15. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase	60
Tabela 16. Formação de filmes a partir dos hidrolisados.....	68
Tabela 17. Formação de filmes a partir dos hidrolisados.....	69

RESUMO

A associação de duas proteínas de estruturas diferentes, através de ligações cruzadas pela ação da transglutaminase, é uma alternativa promissora para obter filmes com propriedades desejáveis. Por outro lado, a formação de ligações cruzadas nas proteínas poderia ser otimizada se disponibilizarmos locais reconhecíveis para a ação da transglutaminase. Isto seria conseguido hidrolisando as proteínas com tripsina. Desta forma, caseína e gelatina foram hidrolisadas com tripsina até um grau de hidrólise de 5%. Depois, os hidrolisados foram polimerizados com transglutaminase. Nesta etapa, foram avaliadas diferentes condições de polimerização (concentração de enzima e proteína, temperatura e tempo de incubação) com a finalidade de conseguir a formação de polímeros de alta massa molecular, os quais, seriam capazes de formar filmes coesos. A polimerização foi avaliada através de eletroforese SDS-PAGE e determinação dos grupos amino livres pelo método TNBS. Os resultados mostraram que o tratamento dos hidrolisados com transglutaminase conduziu à formação de peptídeos de baixa massa molecular. Porém, foram elaborados filmes a partir dos polímeros obtidos da ligação cruzada (mediada pela transglutaminase) dos hidrolisados de caseína e gelatina. Também, foram elaborados filmes a partir dos hidrolisados sem polimerizar, com fins de comparação. Os filmes obtidos apresentaram-se quebradiços e pouco manuseáveis e por isso não foram caracterizados. Assim, as proteínas hidrolisadas com tripsina e polimerizadas com transglutaminase não foram capazes de formar filmes coesos. Posteriormente, foram produzidos filmes a partir dos heteropolímeros obtidos da ligação cruzada da caseína e gelatina nativa. Também foram elaborados filmes a partir das proteínas sem polimerizar, com fins de comparação. Os filmes resultantes foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira e morfológicas. Os valores de permeabilidade ao vapor de água, porcentagem de alongação e módulo de elasticidade diferiram significativamente dos encontrados para as proteínas nativas. Entretanto, a resistência à tração dos filmes não variou. A microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes revelou que o tratamento com transglutaminase provocou algumas alterações na estrutura dos filmes. Finalmente, filmes produzidos a partir dos heteropolímeros obtidos da ligação cruzada de caseína e gelatina nativa apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água e alta alongação quando comparado aos filmes das proteínas simples.

Palavras chave: Enzimas proteolíticas, Transglutaminase, Filmes, Gelatina, Caseína.

SUMMARY

The association of two different structures proteins, through crosslinkings by action of the transglutaminase, is a promising alternative to get films with desirable properties. On the other hand, the formation of crosslinkings in proteins could be optimized making up recognizable places to transglutaminase action. This would be obtained by protein trypsin hydrolysis. In this way, casein and gelatin were broken into peptides with trypsin up to 5% hydrolysis degree. Later, the hydrolysates were polymerized with transglutaminase. In this stage it was evaluated different conditions of polymerization (enzyme and protein concentration, incubation temperature and time) with the purpose to obtain high molecular mass polymer formation, which, would be able to form cohesed films. The extent of crosslinking was evaluated by SDS-PAGE and free amino groups determination (TNBS). The results showed that the treatment of the hydrolysates with transglutaminase lead to the formation of peptides of low molecular mass. Anyway, films based on resulting polymers by crosslinking of the hydrolyzed casein and gelatin were elaborated. Also, films starting from hydrolysates without crosslinking were elaborated for comparison. The resulting films were difficult for handling and fragile, for this reason, they were not characterized. Thus, trypsin hydrolyzated proteins and polymerized with transglutaminase were not able to form cohesed films. Later, films based on resulting heteropolymers from native casein and gelatin crosslinking were produced. Also, films starting from proteins without crosslinking were elaborated for comparison. The films were characterized for mechanical, barrier and morphologic properties. The values of water vapor permeability, percentage of elongation and elasticity modulus were significantly different as compared with native protein films without treatment with transglutaminase. However, the tensile strength of the films did not vary. The scanning electric microscopy of the transversal section of the films disclosed that the treatment with transglutaminase caused some alterations in the structure of films. Finally, films based on resulting heteropolymers from native casein and gelatin crosslinking showed smaller water vapor permeability and high elongation when compared with simple protein films.

Words key: Proteolíticas Enzymes, Transglutaminase, Films, Gelatin, Casein

1. INTRODUÇÃO

O interesse em filmes comestíveis origina-se da tentativa de desenvolver embalagens facilmente degradáveis, não-agressivas ao meio ambiente, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos alimentícios e proporcionar novos mercados para matérias primas utilizadas na fabricação desses filmes (KOELSCH, 1994; CHEN, 1995).

Um filme comestível é uma camada fina, contínua de material comestível, que pode controlar a transferência de massa (umidade, oxigênio, dióxido de carbono, etc.) ou prover proteção mecânica e também aumentar a atração sensorial de produtos alimentícios (CHEN, 1995). Além disso, uma alternativa bastante interessante é a possibilidade de ser usado como suporte de diferentes aditivos tais como agentes antimicrobianos, agentes antioxidantes, nutrientes, vitaminas, corantes e outros agentes funcionais (KESTER e FENNEMA, 1986).

Os filmes são produzidos basicamente a partir de proteínas, polissacarídeos ou lipídios, capazes de produzir matrizes contínuas e coesas (GUILBERT et al., 1997). Em geral, os filmes de proteína são excelentes barreiras aos aromas e ao oxigênio. Contudo, devido a sua inerente natureza hidrofílica, tais filmes tendem a absorver grandes quantidades de água em condições de alta umidade relativa, resultando em matrizes filmogênicas plastificadas (LIM et al., 1999). Assim, parte das pesquisas desenvolvidas em filmes a base de proteína, orientam-se em reduzir a sensibilidade dos filmes à umidade e melhorar suas características mecânicas. Isto poderia ser conseguido modificando a proteína através de métodos físicos, químicos ou enzimáticos.

O uso de enzimas para modificar as propriedades funcionais das proteínas é uma área que tem atraído interesse considerável para os pesquisadores; pois elas são naturais, requerem condições mais moderadas, possuem alta especificidade e têm menos probabilidade de produzir produtos tóxicos quando comparadas com os catalisadores químicos (SINGH, 1991).

As enzimas mais freqüentemente usadas para modificar as proteínas são as proteases e as transglutaminases (NIELSEN e OLSEN, 2002). As proteases catalisam a

quebra de ligações peptídicas em proteínas (BEYNOM e BOND, 1989) e, as transglutaminases catalisam principalmente a transferência do grupo acil entre o grupo λ -carboxiamida de resíduos peptídicos glutamina (doadores acil) e o grupo ε -amino da lisina (receptores acil) livre ou ligado a peptídeos, resultando na formação de ligações isopeptídicas ε -(λ -glutamil) lisina (MOTOKI e SEGURO, 1998).

SOTHORNVIT e KROCHTA (2002 a,b) observaram que os filmes elaborados a partir de hidrolisados de soro de leite foram mais flexíveis e fracos e tiveram menores valores de alongação que os filmes de soro de leite sem hidrolisar. Contudo, as propriedades de barreira foram similares às das proteínas nativas.

A transglutaminase foi utilizada na elaboração de filmes à base de isolado protéico de soro de leite (YILDIRIM e HETTIRACHCHY, 1998; YOSHIDA, 2002), gelatina (CARVALHO e GROSSO, 2004), α s1-caseína (MOTOKI et al., 1987b) e proteína da clara de ovo (LIM et al., 1998). A introdução de ligações cruzadas, em alguns casos, melhorou as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

Nenhuma informação está atualmente disponível na contribuição combinada das proteases com as transglutaminases na elaboração de filmes. Contudo, recentes pesquisas reportaram melhorias nas propriedades de solubilidade, emulsificantes e espumantes de hidrolisados de soja (BABIKER et al., 1996 a; BABIKER, 2000) e glúten (BABIKER et al., 1996b) incubados com transglutaminase.

Dentre as proteínas disponíveis, a caseína e a gelatina são consideradas bons substratos para as enzimas, devido à sua estrutura aberta e flexível (SINGH, 1991; DE JONG e KOPPELMAN, 2002).

As caseínas são as principais proteínas no leite, representando 80% das proteínas totais e têm encontrado muitas aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos (SOUTHWARD, 1989; KINSELLA, 1984). Elas são um grupo não-usual de proteínas, que não são globulares e nem fibrosas na natureza (BARRETO et al., 2003). Em geral, as caseínas são relativamente hidrofóbicas, anfífilicas, estruturadas ao acaso ou flexíveis, com relativamente baixos níveis de estrutura secundária e terciária (FOX e MCSWEENEY, 1998; MODLER, 2000). Apesar do índice elevado de aminoácidos hidrofóbicos, a caseína mostra uma estrutura aberta e hidratada (BARRETO et al., 2003). As caseínas são aptas à formação de filmes por causa de sua natureza *random-*

coil e habilidade para formar ligações intermoleculares hidrofóbicas, eletrostáticas e de hidrogênio. A sua natureza anfifílica faz com que elas sejam materiais muito promissores na formação de filmes emulsionados (MCHUGH e KROCHTA, 1994; GENNADIOS et al., 1994).

A gelatina, proteína resultante da hidrólise parcial do colágeno, é considerada única entre os hidrocolóides formadores de géis termorreversíveis com um ponto de fusão próximo ao da temperatura do corpo (ACHET e HE, 1995; JOHNSTON-BANKS, 1990). A gelatina é diferenciada das outras proteínas pela ausência de apreciável ordem interna e a configuração ao acaso (aleatória) das cadeias peptídicas em soluções aquosas. A gelatina apresenta muitas aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e na indústria têxtil (ARVANITOYANNIS et al. 1998).

Além de serem bons substratos para as enzimas, ambas as proteínas são também boas candidatas para a formação de conjugados protéicos heterólogos catalisados pela transglutaminase. Segundo DE JONG e KOPPELMAN (2002) funcionalidades totalmente novas poderiam ser criadas por associação de duas proteínas com diferentes estruturas. NONAKA et al. (1997) utilizaram a transglutaminase para ligar covalentemente caseinato de sódio e gelatina. O conjugado protéico resultante mostrou melhora em relação à solubilidade.

Desta forma, o presente trabalho foi direcionado à formação de filmes a base de polímeros heterólogos obtidos da ligação cruzada de caseína e gelatina nativa ou hidrolisada com tripsina. A tripsina quebra ligações peptídicas formadas pela porção carboxílica de lisina ou arginina (STRYER, 1996), resultando na formação de peptídeos relativamente grandes e conseqüentemente a ligação covalente destes peptídeos por uma transglutaminase, poderia resultar na formação de polímeros de alto peso molecular. Por outro lado, os peptídeos trípticos formados, exceto o carboxiterminal da proteína terminarão com arginina ou lisina. Desta forma, poderiam ser disponibilizados sítios reconhecíveis para a reação com a transglutaminase.

1.1. Objetivos

1.1.1. Geral

- Produzir filmes a partir dos polímeros heterólogos, obtidos da ligação cruzada de caseína e gelatina nativas ou hidrolisadas com tripsina.

1.1.2. Específicos

- ❑ Caracterizar os hidrolisados quanto à composição, solubilidade e massa molecular.
- ❑ Polimerizar os hidrolisados com transglutaminase
 - Avaliar a influência dos parâmetros de polimerização
 - Avaliar a influência do uso de diferentes enzimas proteolíticas.
- ❑ Elaborar filmes a partir de:
 - Caseína e/ou gelatina com e sem transglutaminase
 - Hidrolisados de caseína e/ou gelatina com e sem transglutaminase
- ❑ Caracterizar os filmes quanto à permeabilidade ao vapor de água, resistência mecânica e morfologia de superfície.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gelatina

A gelatina, proteína de alto peso molecular, obtido da hidrólise parcial do colágeno (componente fibroso de pele, osso, tendão, cartilagem e dentes) (POPPE, 1997; STRYER, 1996; WONG, 1995) é um polímero vítreo parcialmente cristalino (SLADE e LEVINE, 1987), altamente hidrofílico e insolúvel em água fria. A transformação das fibras de colágeno (moléculas altamente organizadas e insolúveis em água) em um sistema mais despolimerizado denominado gelatina, a qual, é solúvel em água a temperaturas acima de 30°C tem sido descrita em detalhe na literatura (POPPE, 1997; CARVALHO, 1997).

Comercialmente, a gelatina é avaliada e caracterizada pelo seu ponto isoelétrico, viscosidade, granulometria e poder de geleificação ou *Bloom*; podendo ser encontrada no mercado entre 50 a 300 *Bloom* (PB LEINER, 2004). Elas são divididas em dois grupos: gelatina tipo A (pI = 7-9), obtido por pré-tratamento ácido e gelatina tipo B (pI = 4,8 – 5,2) obtida por pré-tratamento básico (POPPE, 1997).

O pré-tratamento tem como finalidade eliminar gorduras, mucopolissacarídeos e outros compostos orgânicos (POPPE, 1997). Além desta purificação, o pré-tratamento quebra as ligações cruzadas inter e intramoleculares presentes no colágeno (WONG, 1995). O grau de ligações cruzadas depende do tipo de colágeno, tecido, espécie animal, idade, etc. (GOMÉZ-GUILLÉN et al., 2002). A clivagem destas ligações dá lugar à formação das cadeias α (MM de 80.000 a 125.000), β (MM de 160.000 a 250.000) e γ (MM de 240.000-375.000). A forma beta e gama correspondem à união de duas ou três cadeias alfa respectivamente (POPPE, 1997). A gelatina pode conter cadeias polipeptídicas de massas moleculares da ordem de 30.000 a 300.000 Da (WONG, 1995) dependendo do tipo de colágeno utilizado e do processo de manufatura.

O conteúdo e a seqüência de aminoácidos da gelatina variam em função da fonte, mas sempre consistem em alto conteúdo dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina bem como uma ausência dos aminoácidos triptofano e cisteína. Na Tabela 1, pode-se verificar um exemplo do conteúdo de aminoácidos para gelatinas do tipo A e B.

Tabela 1. Composição de aminoácidos da gelatina

Aminoácido	Gelatina Tipo A^a	Gelatina Tipo B^a
Lisina	2.7	2.8
Histidina	0.4	0.4
Arginina	4.9	4.8
Acido aspártico	4.5	4.6
Treonina	1.8	1.8
Serina	3.5	3.3
Acido glutâmico	7.3	7.2
Prolina	13.2	12.4
Glicina	33.0	33.5
Alanina	11.2	11.7
Cisteína	0.0	0.0
Valina	2.6	2.2
Metionina	0.4	0.4
Isoleucina	1.0	1.1
Leucina	2.4	2.4
Tirosina	0.3	0.1
Fenilalanina	1.4	1.4
Triptofano	-	-
Hidroxiprolina	9.1	9.3
Hidroxilisina	0.6	0.4

^a Número de resíduos de aminoácidos em base a 100 resíduos totais.

Fonte: GENNADIOS et al. (1994)

A habilidade para formar um gel é sem dúvida uma das mais importantes propriedades da gelatina. A gelatina entumece quando colocada em água fria, absorvendo 5 a 10 vezes seu peso em água. Quando aquecida a temperaturas acima do ponto de fusão, a gelatina inchada dissolve e forma gel quando esfriada. Esta conversão sol-gel é reversível e pode ser repetida.

A nível molecular a gelificação da gelatina em solução envolve a renaturação de estruturas, no estado desordenado, da gelatina para estruturas tripla hélice, característica do colágeno no estado nativo; sendo que a estrutura e as propriedades físicas dos géis são resultado do nível de renaturação (ACHET e HE, 1995; ZIEGLER e FOEGEDING, 1990). Assim, a gelificação da gelatina é considerada como uma renaturação parcial do colágeno; a qual, depende da composição e estrutura da gelatina, que por sua vez é influenciada pelas condições do processo e pela origem da matéria prima.

A gelificação da gelatina envolve vários mecanismos, os quais não têm sido bem elucidados (DJAGNY et al., 2001). Um número de sugestões, contudo, permitem uma vista geral das interações que conduzem à formação de um gel (DJAGNY et al., 2001; POPPE, 1997; WONG, 1995). Acredita-se que pequenas seções -ricas em iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) - de um número de moléculas de gelatina se unem para formar zonas de junção microcristalinas, oferecendo uma estrutura de uma rede tridimensional altamente ramificada capaz de imobilizar o líquido (DJAGNY et al., 2001). A rede formada estaria reforçada por regiões em que a estrutura helicoidal do colágeno é reconstituída (WONG, 1995).

A velocidade de esfriamento das soluções de gelatina e a concentração de gelatina são os parâmetros mais importantes no controle do processo de gelificação. Resfriamentos lentos permitiriam uma melhor orientação das moléculas de gelatina na formação de gel (DJAGNY et al., 2001), entanto que baixas concentrações de gelatina conduziriam a uma menor conformação helicoidal (GOMEZ-GUILLEN et al., 2002).

2.2. Caseína

As caseínas formam aproximadamente 80% do conteúdo total da proteína no leite, onde estão presentes na forma de partículas essencialmente esféricas conhecidas como micelas de caseína. As micelas compreendem 93% (p/p) de caseínas e 7% (p/p) de cálcio inorgânico, fosfato, citrato bem como pequenas quantidades de magnésio, sódio e potássio. Os principais componentes das caseínas são designados como α s1-, α s2-, β -, e k -caseínas, os quais, representam aproximadamente 44, 13, 33 e 10% da caseína inteira, respectivamente (WONG et al., 1996; MODLER, 2000; CREAMER, 2002). A Tabela 2 mostra a composição de aminoácidos destas quatro caseínas.

Em geral, as caseínas são moléculas relativamente pequenas com peso molecular aproximado de 19- 26 kDa. No entanto, a k -caseína pode também ocorrer em forma polimérica via ligações dissulfídicas com massa molecular da ordem de 60 a 600kDa (WONG et al., 1996). As caseínas são relativamente hidrofóbicas, devido a seu alto conteúdo de aminoácidos apolares (35-45%) e anfifílicas, devido a que os seus resíduos polares e apolares estão distribuídos em blocos, apresentando assim, regiões hidrofóbicas e hidrofílicas ao longo da cadeia (FOX e MCSWEENEY, 1998). Elas têm relativamente pouca estrutura secundária e terciária, provavelmente devido à presença dos altos níveis de resíduos prolina, especialmente na β -caseína, a qual interrompe a

formação das estruturas α -hélice e β -sheet (FOX e MCSWEENEY, 1998; CREAMER, 2002). Devido aos baixos níveis destas estruturas as caseínas são absorvidas facilmente nas interfaces ar-água e óleo-água, são susceptíveis à proteólise, apresentam alta estabilidade térmica e alta viscosidade em solução.

Tabela 2. Composição de aminoácidos dos principais componentes das caseínas

Aminoácido	α1-caseína (B-8P)^a	α2-caseína (A-11P)^a	β-caseína (A2-5P)^a	k-caseína (B-1P)^a
Aspartato	7	4	4	3
Asparagina	8	14	5	8
Treonina	5	15	9	14
Serina	8	6	11	12
Serina-P	8	11	5	1
Glutamato	25	24	19	12
Glutamina	14	16	20	14
Prolina	17	10	35	20
Glicina	9	2	5	2
Alanina	9	8	5	15
Cisteína 1/2	0	2	0	2
Valina	11	14	19	11
Metionina	5	4	6	2
Isoleucina	11	11	10	13
Leucina	17	13	22	8
Tirosina	10	12	4	9
Fenilalanina	8	6	9	4
Lisina	14	24	11	9
Histidina	5	3	5	3
Triptofano	2	2	1	1
Arginina	6	6	4	5
TOTAL (resíduos)	199	207	209	169
Peso Molecular (Da)	23614	25230	23983	19007

^a (X-Y): (variante genética - grau de fosforilação)

FONTE: CREAMER (2002)

As caseínas podem ser obtidas por precipitação ácida, precipitação com etanol, centrifugação, ultrafiltração, crioprecipitação, ou coagulação enzimática (FOX e MCSWEENEY, 1998). Mas, existem dois métodos estabelecidos para a produção de caseína em escala industrial: (1) precipitação ácida (ou isoelétrica), onde o leite é acidificado em pH 4,6 (para solubilizar o fosfato de cálcio coloidal) e aquecido a 46°C para obter um coalho e (2) coagulação enzimática, onde o leite é hidrolisado com certas enzimas proteolíticas (reninas). Os coágulos obtidos pelos dois métodos são escoados, lavados, prensados, moídos, e secados (KINSELLA, 1984; WONG et al, 1996; FOX e MCSWEENEY, 1998; SOUTHWARD, 2002).

A caseína ácida é insolúvel em água. Entretanto, se dissolvida, sob determinadas condições alcalinas, resulta em caseinatos solúveis em água. Os caseinatos são produzidos por neutralização da caseína em pH de aproximadamente 6,7 usando hidróxido de cálcio, sódio, potássio ou magnésio (WONG et al., 1996). O tratamento alcalino solubiliza a caseína alterando a carga líquida, a qual, supera as interações hidrofóbicas. Os caseinatos são solúveis acima de pH 5,5. Os caseinatos de sódio e potássio são mais solúveis e em alguns casos possuem melhores propriedades do que os derivados de cálcio e magnésio (MCHUGH e KROCHTA, 1994).

As caseínas obtidas pela ação da renina são insolúveis em água ou álcali. Contudo podem ser solubilizadas em valores de pHs superiores a 9,0 ou em pH de aproximadamente 7,5 usando agentes seqüestrantes de cálcio (usualmente citratos ou polifosfatos) (FOX e MCSWEENEY, 1998).

2.3. Modificação enzimática de proteínas

A proteína pode ser modificada através de métodos físicos (tratamento térmico, uso de pressões altas, etc.), químicos (tratamentos alcalinos ou ácidos, fosforização, succinilação, etc), enzimáticos (uso de proteases, processos de fermentação, etc.) ou genéticos. Estas modificações alteram a conformação e estrutura das proteínas mudando conseqüentemente suas propriedades físicoquímicas, funcionais e biológicas (CHOBERT et al, 1988b; GIESE, 1994; KILARA, 1985; KORHONEN et al., 1998). A modificação enzimática, quando comparado à modificação química, é o processo mais aceitável por ser natural, ter menos probabilidade de produzir produtos tóxicos e possuir alta especificidade (PHILLIPS e BEUCHAT, 1981).

As enzimas mais freqüentemente usadas para modificar as proteínas são as proteases e transglutaminases (NIELSEN e OLSEN, 2002).

2.3.1. Proteases

As proteases são encontradas em uma ampla diversidade de fontes como plantas (papaína, bromelina, ficina), animais (tripsina, quimiotripsina, pepsina, renina) e microorganismos (proteases bacterianas neutras e alcalinas) (RAO et al., 1998). Estas enzimas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (Figura 1).

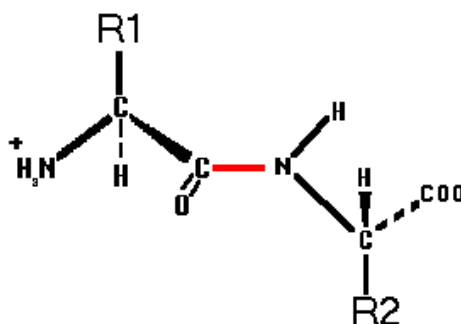


Figura 1. Posição de ataque das enzimas proteolíticas nas proteínas

São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), divididas em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4. 11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise (Tabela 3). As enzimas cujos mecanismos de ação não estão completamente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99. (RAO et al., 1998; BEYNOM e BOND, 1989).

Tabela 3. Classificação das endopeptidases

GRUPOS	CLASSIFICAÇÃO^a	ENZIMAS^b
Serina proteases	EC 3.4.21	Quimiotripsina, tripsina, elastase, protrombina, subtilisina, proteases α -lítica de <i>Sorangium sp.</i>
Cisteína proteases	EC 3.4.22	Papaína, bromelina, ficina, cathepsina
Aspártico proteases	EC 3.4.23	Renina, pepsina.
Metaloproteases	EC 3.4.24	Carboxipeptidases A e B, dipeptidases, aminopeptidases, prolidase e iminopeptidase.

^a De acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB) (LEHNINGER, 1995)

^b WHITAKER (1994) e PÓLGAR (1989).

A Tabela 4 apresenta a especificidade de algumas enzimas proteolíticas. Dentre elas, a tripsina (enzima proveniente do suco pancreático) apresenta mais especificidade em função ao restrito número de ligações peptídicas que hidrolisa. A enzima somente hidrolisa ligações peptídicas formadas pela porção carboxílica de lisina ou arginina. Uma proteína que contenha 9 lisinas e 7 argininas produzirá geralmente 17 peptídeos com tripsina. Cada um desses peptídeos tripticos, exceto o carboxi-terminal da proteína terminará com arginina ou lisina (STRYER, 1996). Conseqüentemente, a hidrólise das proteínas pela tripsina resulta na formação de fragmentos peptídicos relativamente grandes. Na Figura 2 pode ser observada a localização das ligações hidrolisadas pela tripsina na seqüência de uma β -caseína.

Tabela 4. Especificidade de algumas proteases

Enzima	Ligações peptídicas quebradas^a
Tripsina	...— Lys (ou Arg) — ...
Quimiotripsina, subtilisina	...— Trp (ou Tyr, Phe, Leu) —...
Protease V8 do <i>Staphylococcus sp.</i>	...— Asp (ou Glu) —...
Papaína	...— Phe (ou Val, Leu) —Xaa —...
Termolisina	...— Leu (ou Phe) —...
Pepsina	...— Phe (ou Tyr, Leu) — Trp (ou Phe, Tyr) —

Fonte: RAO et al. (1998)

^a A seta indica o local de ação da protease. Xaa, é qualquer resíduo de aminoácido.

Com a hidrólise das ligações peptídicas, três mudanças principais acontecem: (1) incremento no número de grupos ionizáveis (NH_4^+ , COO^-) com aumento concomitante na hidrofilicidade e na carga líquida (2) diminuição do tamanho da cadeia polipeptídica com redução aguda da antigenicidade e (3) alteração da estrutura molecular que pode conduzir à exposição da porção hidrofóbica da proteína (MAHMOUD, 1994). Assim, pode ser esperado aumento da solubilidade, diminuição da viscosidade e mudanças significativas nas propriedades emulsificantes, espumantes e gelificantes quando comparadas àquelas das proteínas originais (CHOBERT et al., 1988b; CARLOS, 1997; CANDIDO, 1998). A melhora destas propriedades dependerá da especificidade da enzima proteolítica, da natureza física e química da proteína de origem, das condições de hidrólise e do tamanho molecular atingido como resultado da ação hidrolítica (MAHMOUD, 1994).



Figura 2. Locais de clivagem da β -caseína pela ação da tripsina (VOROB'EV et al., 2000)

O processo de hidrólise pode ser controlado através dos parâmetros: temperatura, tempo de hidrólise, pH e relação enzima:substrato. A temperatura de hidrólise é normalmente escolhida para otimizar a cinética da enzima selecionada. O pH é determinado de acordo com a faixa ótima para atividade enzimática máxima. O tempo de hidrólise é relacionado diretamente ao grau de hidrólise desejado, quanto mais longo o tempo de hidrólise, mais alto o grau de hidrólise (LAHL e BRAUN, 1994).

O critério quantitativo de uma reação proteolítica é o grau de hidrólise calculado através da determinação do número de ligações peptídicas quebradas em relação ao número total de ligações peptídicas na proteína intacta (NIELSEN e OLSEN, 2002). O grau de hidrólise das proteínas pode ser quantificado através de diversos métodos: (1) quantificação do nitrogênio liberado durante a hidrólise o qual fica solúvel na presença de um agente de precipitação (p.e. ácido tricloroacético); (2) determinação dos grupos amino livres liberados durante a hidrólise através de titulação com formol ou usando compostos que especificamente reagem com os grupos amino, tais como: TNBS, OPA, ninidrina ou fluorescamina; (3) titulação dos prótons liberados durante a hidrólise ou (4) através da osmometria, onde a depressão no ponto de congelamento pode ser usada para calcular mudanças na osmolalidade durante a hidrólise (SILVESTRE, 1997;

SPELLMAN et al., 2003). Porém, os métodos pH-stat e TNBS são os comumente empregados para a quantificação do grau de hidrólise.

No método pH-stat a hidrólise é feita em condições alcalinas ou neutras para favorecer a dissociação de prótons dos grupos amino livres liberados. A liberação dos prótons no meio conduz a uma redução no pH da solução. Assim, o número de ligações peptídicas quebradas pode ser estimado a partir da quantidade de base requerida para manter o pH constante durante a reação (NIELSEN e OLSEN, 2002). No método de TNBS, os grupos amino primários reagem com o TNBS para formar um cromóforo com uma absorbância máxima a 340nm (ALDER-NISSEN, 1979).

Uma proteólise não controlada e/ou prolongada resulta na formação de peptídeos menores comprometendo as propriedades funcionais das proteínas nativas, como capacidade de retenção de água, emulsificação e formação de espuma. Com um controle cuidadoso da hidrólise, podem-se modificar as propriedades funcionais, que são úteis na formulação de alimentos.

2.3.2. Transglutaminase

A transglutaminase pode ser obtida de diferentes fontes como fígado de porco (BROOKHART et al., 1983), tecido de plantas (FALCONE et al., 1993), tecido de peixe (YASUEDA et al., 1994) e microorganismos (ANDO et al., 1989; GERBER et al., 1994). A enzima transglutaminase derivada de microorganismos apresenta uma cadeia polipeptídica simples, com peso molecular aproximado de 38000Da. Seu ponto isoelétrico está em torno de 8,9. O pH ótimo está na faixa de 5,0 e 8,0; contudo em pH 4,0 e 9,0 a enzima ainda apresenta alguma atividade enzimática. A temperatura ótima de reação é de 50°C, mas ainda apresenta atividade enzimática a 10°C e temperaturas próximas às do ponto de congelamento (MOTOKI e SEGURO, 1998). A enzima não precisa da presença de Ca^{2+} para reagir e seu custo de produção é baixo quando comparado aos outros processos de obtenção de transglutaminase (ANDO et al., 1989; ZHU et al., 1995). Segundo MATSUMURA et al. (2000), o fato da atividade da transglutaminase microbiana ser independente da presença dos íons cálcio proporciona uma vantagem na aplicação em alimentos que alteram seu estado físico na presença destes cátions, ou em casos de proteínas que tendem a precipitar na presença de baixas concentrações deste íon, por exemplo, a caseína (DICKINSON,

1997). A atividade da transglutaminase pode ser avaliada por análise fluorométricas, radioativas, colorimétricas, imunoquímicas ou fotométricas (WILHELM et al. 1996).

A Tgase (E.C. 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina γ -glutamil transferase) catalisa reações de acil transferência nas quais o grupo λ -carboxiamida de resíduos peptídicos glutamina são os doadores acil. Dependendo da molécula receptora três reações diferentes podem ser distinguidas (Figura 3). Primeiro, os grupos ϵ -amino de resíduos lisina podem servir como substratos para formar ligações isopeptídicas ϵ -(λ -glutamil)lisina inter- ou intra-moleculares. Este é o tipo mais comum de reação catalisada pela transglutaminase. Depois, outras aminas primárias podem servir como receptores acil. Esta segunda reação é denominada a reação de acessório e é utilizada para incorporar aminas contendo açúcar, aminoácidos, etc. à cadeia protéica. A terceira reação catalisada pela Tgase é a deamidação da glutamina, onde as moléculas de água são usadas como receptores, resultando na conversão de glutamina em ácido glutâmico (GERRARD, 2002; DE JONG e KOPPELMAN, 2002).

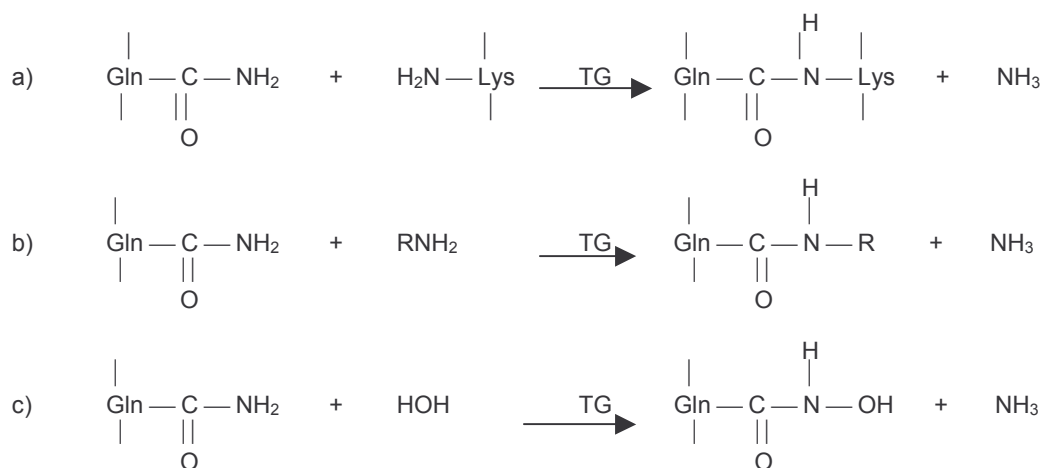


Figura 3. Reações catalisadas pela transglutaminase. (a) Formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas e peptídeos (b) Incorporação de aminas (c) Deamidação

A formação de ligações cruzadas em uma proteína pode ser acompanhada utilizando diferentes ferramentas, tais como: (1) desaparecimento de grupos amino

(que pode ser controlado pela reação com TNBS) (2) aumento da massa molecular (monitorado com SDS-PAGE ou cromatografia de exclusão molecular) (3) produção de NH_3 ou (4) medida das propriedades funcionais (NIELSEN, 1995).

São diversas as aplicações da transglutaminase em proteínas alimentícias (DE JONG e KOPPELMAN, 2002; KURAISHI, et al., 2001; MOTOKI e SEGURO, 1998; NIELSEN, 1995; ZHU, et al., 1995). Dentre elas podem-se destacar sua aplicação na formação de géis (SCHORSCH, et al., 2000; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002), emulsões (FAERGEMAND et al., 1998; LIU e DAMODARAN, 1999), filmes (CARVALHO & GROSSO, 2004; YOSHIDA, 2002) e polímeros homólogos e heterólogos entre diferentes proteínas (MOTOKI e NORIKI, 1983; NONAKA et al. 1997). A enzima, também, tem sido utilizada na polimerização de peptídeos (BABIKER et al., 1996ab).

A ligação cruzada de dois substratos protéicos de estruturas diferentes (formação de polímeros heterólogos) é utilizada no intuito de criar funcionalidades totalmente novas. Contudo, isto dependerá de vários fatores tais como: a compatibilidade termodinâmica da mistura do substrato protéico ao local ativo da enzima, o estado estrutural e disposição de resíduos lisil e glutamina em proteínas e as diferenças nas taxas de reação com transglutaminase (HAN e DAMODARAN, 1996).

A compatibilidade termodinâmica é relacionada à natureza e a intensidade da interação entre duas macromoléculas quando se aproximam. Segundo FLORY (1986), dois polímeros são mutuamente compatíveis se sua energia livre de interação é favorável, isto é, negativa. Na maioria dos casos, a energia de interação é usualmente positiva, e assim incompatibilidade de polímeros dissimilares é a regra e compatibilidade é a exceção. Proteínas que pertencem a classes diferentes exibem compatibilidade termodinâmica limitada. Esta incompatibilidade origina-se como resultado da interação entre superfícies polares e apolares. Devido a esta repulsão mútua entre superfícies polares e apolares, duas proteínas dissimilares aproximar-se-ão somente até uma distância em que a energia livre da interação é zero (HAN e DAMODARAN, 1996).

Proteínas dissimilares como caseína e albuminas não podem formar dímeros heterólogos. Isto é principalmente devido à inabilidade destas proteínas para sobrepor-se uma a outra ao local ativo da enzima. A incompatibilidade termodinâmica da mistura origina-se por causa das interações repulsivas entre as proteínas hidrofílicas e

hidrofóbicas. Por outro lado, proteínas similares, isto é, proteínas globulares tais como albuminas e globulinas, podem formar dímeros e polímeros na reação com transglutaminase devido à compatibilidade termodinâmica da mistura. Duas proteínas incompatíveis podem ser feitas compatíveis convertendo a proteína hidrofóbica em uma proteína hidrofílica ou vice-versa através da modificação química.

Uma condição prévia para a reação com transglutaminase é uma exposição suficiente dos resíduos lisina e glutamina na proteína. Algumas proteínas, tais como a caseína e gelatina, são facilmente ligadas pela transglutaminase, pois as lisinas e glutaminas estão facilmente disponíveis. Em contraste, muitas outras proteínas têm estruturas mais rígidas que previnem a formação de ligações cruzadas (DE JONG e KOPPELMAN, 2002). Estas estruturas podem ser desestabilizadas desnaturando ou modificando quimicamente a proteína (DICKINSON, 1997). Assim, embora a ovoalbumina e alfa-lactalbumina sejam proteínas compatíveis, elas não formam polímeros heterólogos, pois os resíduos lisil e glutamina da ovalbumina estão indisponíveis para a reação com transglutaminase (HAN e DAMODARAN, 1996).

Outro fator a ser considerado é a diferença nas taxas de reação das duas proteínas. Por exemplo, a taxa de formação de ligações isopeptídicas da β -lactoglobulina em um sistema único é muito mais lenta do que para a β -caseína. Devido a esta diferença, o local ativo da enzima poderia estar continuamente ocupado pela β -caseína, resultando em uma falta de polimerização da β -lactoglobulina (HAN e DAMODARAN, 1996). Contudo, esta última proteína poderia ser ligada em um estágio posterior, seja para si mesma ou para o polímero de massa molecular alta da primeira proteína (DE JONG e KOPPELMAN, 2002).

Assim, é muito difícil assegurar que sejam ligados duas proteínas diferentes ou que sejam formados polímeros grandes das proteínas separadas. O modo mais direto para assegurar a formação do heteropolímero seria usando uma proteína que não tenha lisinas acessíveis à enzima e uma proteína que não tenha glutaminas expostas (BECHTOLD et al., 2000). Por outro lado, o bloqueio do grupo ϵ -amino da lisina seria outra alternativa na formação de heteropolímeros (MOTOKI et al., 1987a; MOTOKI e NIO, 1983).

Em geral, uma prova indireta de sucesso pode ser obtida estabelecendo as mudanças resultantes na funcionalidade da proteína. A ligação cruzada de uma mistura

de caseína e gelatina resultou em melhoria do perfil de solubilidade da caseína (NONAKA et al., 1997). Quando a caseína e a gelatina eram ligadas separadamente e misturadas depois, o perfil de solubilidade era totalmente diferente, indicando que heteropolímeros são formados quando ambas proteínas são ligadas juntas.

2.4. Filmes e coberturas comestíveis

Filmes e coberturas comestíveis podem ser definidos como camadas finas, de material comestível, aplicados sobre ou até mesmo dentro de alimentos, para oferecer uma barreira seletiva contra a transmissão de gases, vapores, e solutos enquanto oferecem também proteção mecânica. Normalmente as coberturas são formadas diretamente na superfície dos produtos, enquanto que os filmes são formados separadamente e depois aplicados nos produtos como envoltórios ou bolsas (GENNADIOS e WELLER, 1990). Eles podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e da quantidade das substâncias empregadas (SHIH, 1996).

Os filmes e/ou as coberturas comestíveis apresentam algumas vantagens quando comparadas a outras embalagens sintéticas tradicionais não comestíveis (GENNADIOS e WELLER, 1990): (1) contribuem com a redução da poluição ambiental; (2) podem aumentar as propriedades organolépticas dos alimentos desde que vários componentes (condimentos, corantes, adoçantes) sejam incorporados a eles; (3) podem completar o valor nutricional dos alimentos, particularmente os filmes feitos de proteínas; (4) podem ser aplicados dentro de produtos heterogêneos; (5) podem ser usados como transportadores de agentes antimicrobianos ou antioxidantes.

Por atuarem tanto como embalagens quanto como componentes do alimento, as coberturas e os filmes devem cumprir alguns requisitos específicos para seu uso, tais como: boa qualidade sensorial, propriedades de barreira e mecânicas eficientes, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica, ser inócua, não poluente e de processamento simples e de baixo custo (DEBEAUFORT et al., 1998).

Os filmes comestíveis e/ou biodegradáveis são produzidos basicamente a partir de polissacarídeos, proteínas ou lipídios capazes de produzir matrizes contínuas e coesas (GUILBERT et al., 1997). Filmes a base de polissacarídeos apresentam eficiente barreira a óleos e lipídios e baixa barreira ao vapor de água, enquanto, filmes a base

de lipídios geralmente apresentam excelentes propriedades de barreira ao vapor de água, porém, aplicação limitada em função de suas características mecânicas e organolépticas (GUILBERT et al., 1997; MCHUGH e KROCHTA, 1994). Filmes protéicos apresentam características mecânicas e propriedades de barreira limitada, mas, superiores aos formados a partir de polissacarídeos. As proteínas têm uma estrutura específica (derivada de 20 diferentes monômeros) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais e potenciais por formar ligações intra e intermoleculares diferindo nas posições, tipos e energia (CUQ et al., 1995). Entretanto, os polissacarídeos possuem seqüências repetidas de somente um tipo de monômero.

Os filmes também podem ser produzidos a partir da combinação de polissacarídeos, proteínas e lipídeos (DONHOWE e FENNEMA, 1994). Assim, por exemplo, se obtêm filmes protéicos com propriedades de barreira e mecânicas melhoradas graças à introdução de lipídios na matriz filmogênica (MCHUGH, 2000).

Alguns exemplos de proteínas, derivadas de origem vegetal ou animal, utilizadas na elaboração de filmes são gelatina (CARVALHO & GROSSO, 2004), soja (PARK et al., 2000), glúten do trigo (PALMU, 2003), proteínas do leite (MCHUGH e KROCHTA, 1994), proteínas miofibrilares de origem bovina (SOUZA, 2001) e outros. Em geral, os filmes de proteína são barreiras excelentes ao oxigênio e *flavors*. Entretanto, devido a sua natureza hidrofílica inerente; tais películas tendem a absorver grandes quantidades da água, em condições de umidade relativa alta, resultando em matrizes plastificadas com propriedades mecânicas e de barreira reduzidas. Portanto, o conhecimento do efeito da umidade relativa é essencial para predizer as características e aplicabilidade dos filmes (LIM et al., 1999).

Os parâmetros de produção (concentração de proteína, temperatura, tipo de solvente, pH entre outros) também influenciam as características finais dos filmes. A temperatura facilita a formação de ligações dissulfídicas intermoleculares. Altas concentrações de proteína resultam na formação de soluções altamente viscosas, as quais, não poderiam ser espalhadas para formar filmes. Entretanto, baixas concentrações de proteína não permitem a formação de filmes intactos; devido possivelmente à falta de interações moleculares após a desidratação do filme. O pH afeta a formação de ligações modificando, conseqüentemente, as propriedades dos filmes (YOSHIDA, 2002). De uma forma geral, as propriedades finais dos filmes

comestíveis e/ou biodegradáveis serão resultantes das características das macromoléculas utilizadas, das interações entre os constituintes envolvidos na formulação (macromolécula, solvente, plastificante e outros aditivos), dos parâmetros de fabricação (temperatura, tipo de solvente, pH, entre outras), do processo de dispersão da solução filmogênica (pulverização, espalhamento, etc.) e das condições de secagem (GUILBERT et al., 1996).

O processo de produção de filmes de proteína compreende basicamente as seguintes etapas: dispersão da macromolécula em um solvente como água ou etanol; aquecimento da solução e espalhamento da solução sobre um suporte plano para a evaporação do solvente (CUQ et al. 1995). A nível macromolecular este processo consiste principalmente na ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia que estabilizam os polímeros no seu estado nativo; seguido de um arranjo e orientação das cadeias poliméricas para formar uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e ligações (CUQ et al., 1998). Desta forma, a formação de um filme protéico é resultado das interações eletrostáticas, forças de Vander Walls, ligações disulfídicas e ligações de hidrogênio produzidas na matriz do filme.

À medida que a água é eliminada da matriz filmogênica o número de interações entre as cadeias de proteína, aumenta resultando em filmes com alta rigidez e pouca flexibilidade (AMARANTE e BANKS, 2001). Para contornar a alta rigidez é necessário adicionar à solução filmogênica um plastificante, o qual irá melhorar a flexibilidade do filme. Os plastificantes (substâncias não voláteis de baixa massa molecular) diminuem as forças de atração intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias do biopolímero melhorando a flexibilidade bem como a extensibilidade dos filmes (GENNADIOS e WELLER, 1990). Por outro lado, com o aumento da mobilidade das cadeias os coeficientes de difusão também aumentam, resultando em maior permeabilidade aos gases e ao vapor de água (FAIRLEY et al., 1996).

Com exceção das moléculas de água (que poderiam ser consideradas os plastificantes “naturais” da maioria de filmes baseados em hidrocolóides) os plastificantes mais usuais são os polióis (glicerol, sorbitol, derivados de glicerina e glicerois), os mono-, di-, e oligossacarídeos (glicose, sacarose) (CUQ et al., 1997). A habilidade destes plastificantes em mudar as propriedades físicas e de permeabilidade à água do filme dependerá da sua estrutura química (tamanho molecular, configuração

e número total de grupos hidroxil funcional) e compatibilidade com o polímero. GUEGUEN et al (1998) estudaram a influência de diferentes plastificantes nas propriedades dos filmes. Usando diferentes polietilenos de glicol (etileno glicol, dietileno glicol, trietileno glicol e tetraetileno glicol), os autores observaram que a elongação e a força na ruptura dos filmes diminuía conforme o comprimento da cadeia do plastificante aumentava. Além disso, o uso de glicerol também diminuiu as propriedades mecânicas dos filmes embora sua fórmula química é bastante próxima àquelas do etileno e dietileno glicol. Os autores concluíram que para cadeias alifáticas pequenas, as ligações de hidrogênio formadas entre os polipeptídeos são mais fortes. Mas, se o comprimento da molécula de plastificante fosse aumentado, estas interações tornar-se-iam mais fracas. Entretanto, o efeito da estrutura do glicerol nas propriedades mecânicas dos filmes não foi claramente compreendido. Acredita-se que a assimetria e a presença de três grupos OH na molécula de glicerol conduziram à formação de uma rede menos organizada.

As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes protéicos podem ser modificadas pela introdução de ligações cruzadas através de tratamentos físicos (MILLER et al., 1997), químicos (GHORPADE et al., 1995; SAKANAKA, 2002) ou enzimáticos (YOSHIDA, 2002; CARVALHO e GROSSO, 2004). CARVALHO e GROSSO (2004) mostraram que o tratamento enzimático com transglutaminase foi eficiente em diminuir a permeabilidade ao vapor de água do filme de gelatina, contudo as suas propriedades mecânicas não foram modificadas. Por outro lado, os valores de força na ruptura e elongação dos filmes de α s1-caseína, tratados com transglutaminase, foram aproximadamente duas vezes mais altos, quando comparados aos filmes sem tratamento enzimático (MOTOKI et al., 1987b).

2.4.1. Avaliação das propriedades de filmes e coberturas

As propriedades de filmes e coberturas são avaliadas principalmente através dos seguintes parâmetros: propriedades de barreira, propriedades mecânicas e solubilidade em água. São estudadas frequentemente várias outras características do filme, principalmente para a compreensão das propriedades mecânicas e de barreira, como isoterma de sorção, solubilidade em diferentes solventes, difusividade de solutos dentro dos filmes, cor e opacidade, etc. (DEBEAUFORT et al., 1998).

2.4.1.1. Propriedades de Barreira

As propriedades de barreira requeridas para os filmes e coberturas comestíveis dependem principalmente do tipo de produto alimentício que será coberto ou embalado (DEBEAFORT et al., 1998). Por exemplo, para proteger alimentos gordurosos de processos oxidativos seria indicado um filme resistente ao transporte de oxigênio; se o objetivo for retardar a perda de umidade de frutas e vegetais é desejado um filme não só com baixa permeabilidade ao vapor de água como também alguma permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono para evitar condições anaeróbicas. SMITH et al. (1987) resumem algumas desordens fisiológicas em frutas, associadas com a modificação atmosférica interna produzida pelo uso de recobrimentos.

Assim, as propriedades de barreira de interesse no estudo de filmes são a permeabilidade aos gases (gás carbônico e oxigênio) e ao vapor de água. A permeabilidade é definida como a transferência de um gás permeante através de um material. Em um meio contínuo homogêneo e isotrópico; ou seja, desprezando-se os defeitos, os microporos ou fraturas existentes no filme ou cobertura; o mecanismo primário de transferência de gás e vapor de água, através de um filme ou cobertura, é por difusão ativada. Nesse processo, o permeante dissolve na matriz do filme no lado de concentração alta, difunde pelo filme conduzido por um gradiente de concentração, e evapora da superfície exterior. Os passos de dissolução e evaporação são influenciados pela solubilidade do permeante no filme (AMARANTE e BANKS, 2001).

A difusividade depende dos seguintes fatores: características das moléculas permeantes (solubilidade, forma e tamanho molecular), estrutura da rede protéica e mobilidade das cadeias poliméricas dentro do filme. Na Figura 4 pode-se verificar a importância da estrutura do polímero para o transporte do permeante. A habilidade de um segmento da cadeia do polímero relaxar e alterar sua estrutura para permitir que o permeante passe pelos espaços vazios formados é essencial para a difusão ativada. Assim, os fatores que afetem a estrutura do polímero influenciarão as propriedades de transporte de massa nos filmes (MILLER e KROCHTA, 1997).

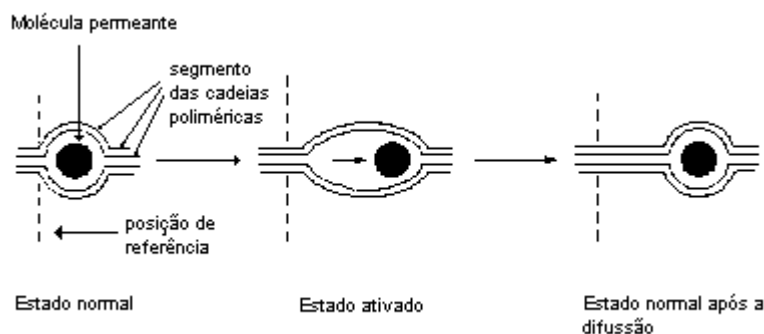


Figura 4. Processo de ativação por difusão

2.4.1.2. Propriedades Mecânicas

Um filme ou cobertura comestível, com boas propriedades de barreira, poderia ser ineficiente se suas propriedades mecânicas não permitem manter a integridade do filme durante os processos de manipulação (manuseio), empacotamento e transporte. Assim, a resistência mecânica e deformabilidade do filme ou cobertura comestível devem ser determinadas. Estas propriedades podem ser avaliadas através de testes de tração (FLANAGAN, 1997) onde a força aplicada a um corpo de prova (filme) é registrada à medida que este é deformado a uma velocidade constante. Com os dados experimentais obtidos pode-se construir a curva tensão-deformação definindo, previamente, as seguintes relações:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Equação 1}$$

$$\varepsilon = \frac{(L - L_o)}{L_o} = \frac{\Delta L}{L} \quad \text{Equação 2}$$

Onde σ é a tensão exercida no corpo de prova, **F** a força exercida no corpo de prova, **A** a área da seção transversal inicial do corpo de prova, ε a deformação, **L** o comprimento da peça esticada e **L_o** o comprimento inicial do corpo de prova.

As propriedades mecânicas dos filmes ou coberturas dependem da natureza do material filmogênico utilizado, bem como da coesão estrutural deste. Se o material filmogênico é uma proteína, o grau de coesão dependerá da aptidão da proteína para formar fortes e/ou numerosas ligações a nível molecular, dificultando assim sua separação quando submetida a forças mecânicas; das interações entre as proteínas e os demais componentes (solvente, plastificantes, lipídeos e outros aditivos dispersos no meio da matriz); do processo de obtenção e do processo de eliminação do solvente (secagem).

2.4.1.3. Solubilidade

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes comestíveis no que se refere ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto, como nos casos de utilização como proteção de alimentos onde a atividade de água é alta ou onde o filme é submetido ao contato com água durante o processamento do alimento embalado. Porém, em alguns casos, a solubilidade em água é requerida, como nos casos em que os desidratados devam sofrer uma hidratação prévia ao consumo (sopas instantâneas, arroz semipronto, entre outros), dispensando o uso de embalagens (BERTAN, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a realização deste trabalho utilizou-se como matéria-prima: (a) Gelatina alimentícia de pele bovina (Tipo B), gentilmente cedida pela indústria Gelita South America e (b) Caseína comercial, fornecida pela indústria Naarden Agro Products BV. As especificações de ambas proteínas encontram-se nos Anexos 1 e 2.

As enzimas utilizadas para modificar as proteínas foram: (a) Tripsina derivada do pâncreas suíno "Pancreatic Trypsin Novo 6.0S Type Saltfree", com atividade declarada de 1250tryp-USP/mg, gentilmente doado pela Novozymes A/S e (b) Transglutaminase produzida por *Streptovorticilium* independente de Ca^{2+} "Activa TG-S[®]", com atividade declarada de 100U/g aproximadamente, fornecida pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. As fichas técnicas de ambas enzimas são mostradas nos Anexos 3 e 4. Ainda foram utilizadas, com fins de comparação, as enzimas α -quimiotripsina de pâncreas bovino tipo II (Sigma, cód.: C4129) e pancreatina de pâncreas suíno (Sigma, cód.: P1500).

Para a formação dos filmes utilizou-se: (a) Glicerol (Synth), como agente plastificante e (b) Hidróxido de sódio (Merck) e ácido clorídrico (Merck), como ajustadores de pH. Os reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Fluxograma geral do experimento

A Figura 5 ilustra o fluxograma geral do experimento. As proteínas (caseína e gelatina) foram hidrolisadas com tripsina até 5% de grau de hidrólise, monitorado pelo método pH-stat. Em seguida, os hidrolisados foram liofilizados e caracterizados quanto à composição química, massa molecular e solubilidade. Depois, avaliou-se a influência de diferentes fatores na polimerização dos hidrolisados com transglutaminase, a saber: concentração de transglutaminase, concentração de proteína, temperatura e tempo de incubação. A extensão da polimerização foi avaliada através do aumento da massa molecular dos hidrolisados, monitorado com SDS-PAGE e do desaparecimento de grupos aminos, controlado pela reação com TNBS. Posteriormente, foram preparados

filmes a partir das proteínas nativas e hidrolisadas na presença e ausência de transglutaminase. Os filmes foram caracterizados quanto às propriedades de permeabilidade ao vapor de água, mecânicas e morfológicas.

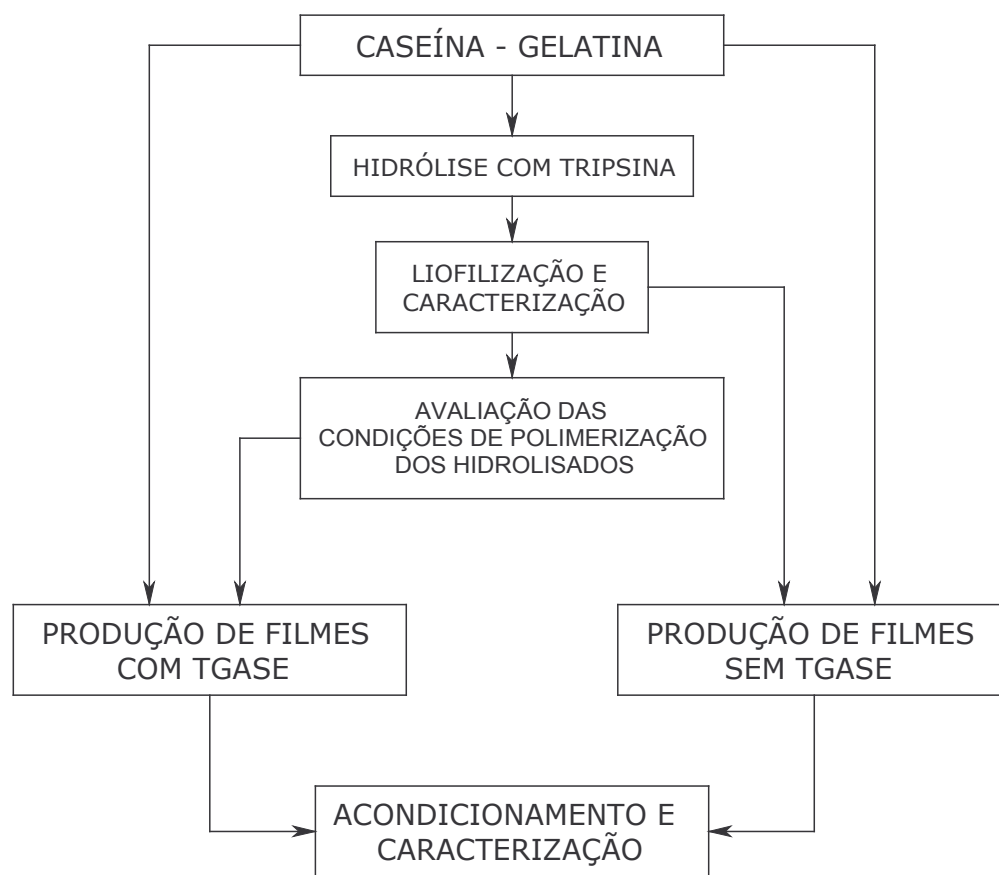


Figura 5. Fluxograma geral dos experimentos

3.2.2. Hidrólise das proteínas com tripsina

A Figura 6 ilustra o fluxograma empregado para se obter os hidrolisados de caseína e gelatina.

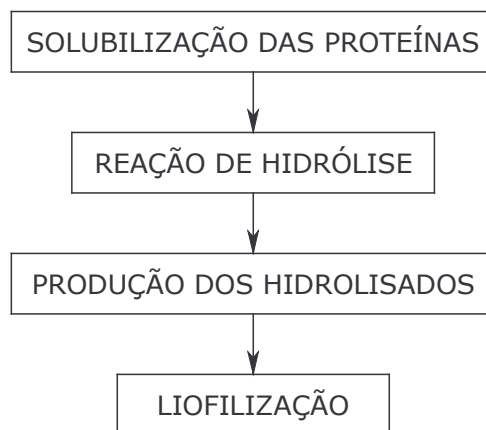


Figura 6. Fluxograma para a obtenção dos hidrolisados de gelatina e caseína.

3.2.2.1. Solubilização das proteínas

a) Gelatina:

A gelatina foi hidratada em água destilada à temperatura ambiente por 15 minutos e solubilizada a 55°C em banho termostático durante 30 minutos.

b) Caseína:

Ensaio preliminares foram conduzidos para conseguir completa solubilização da caseína. A proteína foi dispersa em água destilada à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$); e sob agitação constante, foi adicionado NaOH (0,5N) até atingir pH 7.0. A solução foi agitada por 0, 10, 20 e 30 minutos e aquecida a 85°C, em banho termostático, durante 15 minutos. Os parâmetros de pH e temperatura utilizados foram obtidos de TAKASE et al. (1979) e SPREER (1998). Conseguiu-se completa solubilização depois de 30 minutos de agitação.

3.2.2.2. Reações de hidrólise

Com a finalidade de determinar as melhores condições de hidrólise, para obter os hidrolisados, de caseína e gelatina, foram conduzidos ensaios preliminares

variando-se a relação enzima/substrato ($E/S = 1/100, 1/200$ ou $1/300$) e a temperatura ($T = 40, 45$ ou 45°C). As variáveis foram avaliadas em função do grau de hidrólise atingido por unidade de tempo. O grau de hidrólise (GH) foi estimado pelo método pH-stat (NIELSEN e OLSEN, 2002). A concentração de substrato (8,0 %) e o pH (8,0) foram mantidos constantes durante todos os ensaios. O ponto final da reação foi obtido mediante inativação térmica da enzima a 85°C por 15 minutos após duas horas de reação.

Os parâmetros foram escolhidos considerando: (a) temperatura ótima da enzima tripsina, 37°C ; (b) viscosidade que permita uma boa reação enzimática e (c) tempos de hidrólise que sejam fatíveis de serem controlados. Assim, a relação enzima/substrato e a temperatura de hidrólise, escolhidas para a produção dos hidrolisados foram: $E/S = 1/200$ e $T = 40$ e 45°C para a caseína e gelatina respectivamente.

3.2.2.3. Produção dos hidrolisados

Os hidrolisados de caseína e gelatina foram obtidos utilizando os parâmetros escolhidos na etapa anterior. Durante a reação de hidrólise, o pH foi mantido constante pela titulação automática de NaOH (1N), utilizando-se um titulador automático (Mettler-Toledo, modelo DL50), até a obtenção de 5% de grau de hidrólise. O grau de hidrólise foi estimado pelo método pH-stat através da Equação 3.

$$GH = \frac{V_b \cdot N_b}{M_p \cdot \alpha \cdot h_{tot}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde V_b é o volume de base consumido para manter o pH constante (mL); N_b é a normalidade da base; M_p é a massa de proteína (g); h_{tot} é o número equivalente de ligações peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 8,2 e 11,1 mM/g de proteína para a caseína e gelatina respectivamente; α é o grau de dissociação dos grupamentos aminos ($\alpha\text{-NH}_2$), que varia em função da temperatura e pH (NIELSEN e OLSEN, 2002).

A reação foi interrompida por inativação térmica da enzima a 85°C por 15 minutos, e em seguida os hidrolisados foram resfriados e congelados. Os hidrolisados de caseína e gelatina foram identificados como CaH e GeH respectivamente.

3.2.2.4. Liofilização

Soluções contendo os hidrolisados foram liofilizadas omitindo-se a etapa de diálise, após uma avaliação da influência do excesso de resíduo mineral na polimerização com transglutaminase.

3.2.2.5. Influência do excesso de resíduo mineral na polimerização com transglutaminase

A determinação do grau de hidrólise pelo método pH-stat tem um elevado valor prático por sua precisão e possibilidade de acompanhamento do processo de hidrólise sem necessidade de retirada de alíquotas durante a reação. A desvantagem desse método é que a titulação de NaOH, para controle de pH, promove um aumento no teor do resíduo mineral da amostra pela adição de sódio. Devido à dificuldade em retirar o sódio do hidrolisado por diálise, avaliou-se a influência do excesso de resíduo mineral na polimerização com transglutaminase em amostras de caseína nativa. Para isto, a soda utilizada na etapa de hidrólise foi quantificada e adicionada a uma solução de caseína ao 10% (preparada de acordo ao item 3.2.2.3.). Posteriormente, a solução foi submetida à polimerização utilizando uma concentração de transglutaminase de 10 U/g. A reação foi conduzida a 50 °C e pH 7,0, em reator encamisado, e interrompida após uma hora, por inativação térmica da enzima a 85 °C durante 10 minutos.

A polimerização foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Miniprotean II (Bio-Rad laboratories Ltda., Cód.: 165-2940) com gel de 1,50 mm de espessura. Utilizou-se gel de empilhamento de 4% e gel de gradiente de 8-13%. As amostras, dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8; SDS 10%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Aplicaram-se, nas canaletas do gel, 50 μ g de amostra. A corrida foi realizada a 120 V, à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 2 horas. As bandas de proteína foram coradas segundo manual de instruções do fabricante (Mini-Protean II: Dual slab cell, Instructors Manual, Biorad Laboratories, Richmond, USA). Preparou-se uma solução de Coomassie R-250 (0,1%) em 40 % de metanol e 10% de ácido acético, para corar os géis e uma solução contendo metanol (40%) e ácido acético (10%), para descorar os géis.

3.2.3. Caracterização dos hidrolisados

3.2.3.1. Determinação de proteínas, umidade e cinzas

O nitrogênio protéico total, o teor de umidade e o resíduo mineral foram determinados de acordo com os métodos descritos pela A.O.A.C. (1997). Para o cálculo da proteína bruta foram utilizados os fatores 6,38 e 5,55 para caseína e gelatina respectivamente.

3.2.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese dos hidrolisados foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por SCHÄGGER e JAGOW (1987). O método permite a separação de proteínas na faixa de 1 a 100 KDa. A eletroforese foi realizada em sistema Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Ltda., Cód.: 165-2940) com gel de 0,75 mm de espessura.

Utilizou-se gel de corrida com T= 16.5% e C= 3%; gel espaçador com T= 10% e C= 3% bem como gel de empilhamento com T= 4% e C= 3%. T representa a concentração total dos monômeros acrilamida e bisacrilamida e C é a concentração de bisacrilamida em relação à concentração total T. As amostras foram dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. A quantidade de amostra aplicada nas canaletas do gel foi 25 μ g de caseína nativa, 75 μ g de gelatina nativa, 56 μ g de caseína hidrolisada e 180 μ g de gelatina hidrolisada. A eletroforese foi conduzida a voltagem constante de 120V. As bandas de proteína foram coradas segundo manual de instruções do fabricante (Mini-Protean II: Dual slab cell, Instructors Manual, Biorad Laboratories, Richmond, USA). Preparou-se uma solução de Coomassie R-250 (0,1%) em 40 % de metanol e 10% de ácido acético, para corar os géis, e uma solução de metanol (40%) e ácido acético (10%) para descorar os géis.

A massa molecular das bandas foi determinada por comparação com padrão de massa molecular contendo globina III (2,5 kDa), globina II (6,2 kDa), globina I (8,1 kDa), globina I + III (10,7 kDa), globina I + II (14,4 kDa) e mioglobina (16,9 kDa) (Amershan Pharmacia Biotech Ltda, cód. 80-1129-83).

3.2.3.3. Solubilidade

Os hidrolisados foram caracterizados quanto à solubilidade na faixa de pH de 3 a 8, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C) segundo a metodologia descrita por MORR et al. (1985).

3.2.4. Polimerização dos hidrolisados

Na Figura 7 pode-se observar o esquema da metodologia empregada no intuito de obter polímeros de alta massa molecular, capazes de formar filmes. Na primeira etapa, foram avaliados os efeitos de diferentes parâmetros na polimerização dos hidrolisados trípticos de caseína e gelatina. Na segunda etapa, a caseína nativa foi hidrolisada com outras enzimas proteolíticas, com a finalidade de verificar em parte, se o tipo de enzima utilizada na hidrólise exercia influência na polimerização. A caseína foi utilizada como matéria prima, por se dispor de material bibliográfico referente a esta etapa em particular.

3.2.4.1. Efeito dos parâmetros de polimerização

(a) Influência da concentração de transglutaminase

Os hidrolisados de caseína e gelatina foram dispersos em água destilada, à temperatura ambiente e depois submetidas à polimerização utilizando diferentes concentrações de transglutaminase (10 e 100 U/g). A reação foi conduzida nas condições ótimas de atividade fornecidas pela Ajinomoto Interamericana Ind. E Com. Ltda., ou seja, em uma temperatura de 50°C e pH de 7,0. A concentração de proteína foi fixada em 10% (p/p) e o tempo de reação em 1 hora. A enzima foi inativada por tratamento térmico a 85°C durante 10 minutos, garantindo-se que a solução atingisse a temperatura interna de 80°C durante 5 minutos.

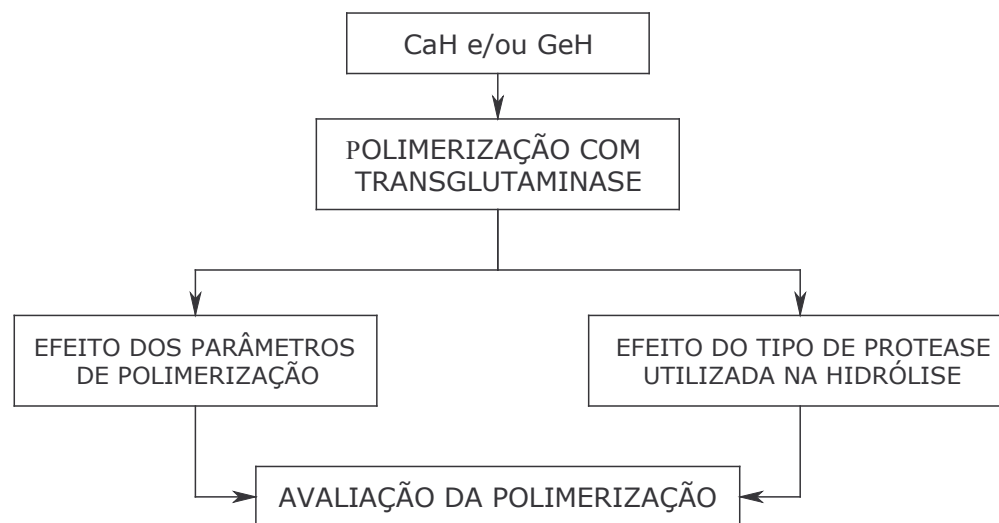


Figura 7. Fluxograma da polimerização dos hidrolisados

(b) Influência da concentração de proteína, temperatura e tempo de hidrólise

Verificado o efeito da concentração de transglutaminase, nas condições ótimas da enzima, foi conduzido um segundo estudo para avaliar a influência da variação de concentração de proteína, temperatura e tempo de hidrólise na polimerização dos hidrolisados (Tabela 5). Assim, foram preparadas soluções contendo concentrações de proteína superiores à utilizada na etapa anterior, contudo a concentração máxima de proteína utilizada, foi aquela que permitiu uma boa homogeneização das soluções. Depois as soluções foram incubadas com transglutaminase em temperaturas onde a enzima ainda apresenta atividade. Os tempos de reação enzimática foram fixados em função da temperatura utilizada, ou seja, para baixas temperaturas tempos de reação maiores. O pH de todas as soluções foi mantido constante em 7,0. A enzima foi inativada por aquecimento a 85°C por 10 minutos.

Tabela 5. Condições do processo de polimerização dos hidrolisados

<i>Hidrolisados</i>	<i>Concentração de proteína (% -p/p)</i>	<i>Temperatura e tempo de incubação (°C; horas)</i>
CaH	25	25; 5
GeH	15	40; 3
CaH/GeH (50/50)	20	25; 5
CaH/GeH (50/50)	20	40; 3
CaH/GeH (50/50)	30	40; 3

3.2.4.2. Efeito do tipo de protease utilizada na hidrólise

Para verificar a influência da enzima proteolítica na polimerização dos hidrolisados foram testadas as seguintes enzimas proteolíticas: tripsina, α -quimiotripsina e pancreatina.

Os hidrolisados com 5% de grau de hidrólise foram obtidos de acordo com item 3.2.2.3., com as seguintes modificações: as relações enzima/substrato utilizadas na etapa de hidrólise foram 1/200, 1/100, e 1/20 quando os hidrolisados foram produzidos com tripsina, α -quimiotripsina e pancreatina respectivamente; omitiu-se a etapa de liofilização dos hidrolisados.

O processo de polimerização foi conduzido à temperatura de 50 °C e pH 7,0 durante 1 hora. A concentração de enzima utilizada foi de 50 U/g de proteína. A reação foi interrompida por inativação térmica da enzima a 85°C durante 10 minutos.

3.2.4.3. Avaliação da Polimerização

a) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi seguida a metodologia descrita no item 3.2.3.2, com as seguintes modificações: (a) o gel espaçador foi omitido na preparação do gel; (b) a quantidade de amostra, por canaleta, aplicada no gel foi de 100 μ g e (c) a massa molecular das proteínas foi determinada por comparação com padrão de massa molecular contendo α -lactalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (24,1 kDa), anidrase carbonica

(30 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina (66 kDa), fosforilase b (97 kDa) (Amersham Pharmacia Biotech Ltda., cód. 17-0446-01).

b) Determinação de grupos amino livres (TNBS)

O número de grupos ϵ -amino livres foi determinado através do método de TNBS proposto por ADLER-NISSEN (1979). O método consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido trinitrobenzenosulfônico e aminas primárias, sob condições alcalinas. As amostras são dispersas em dodecil sulfato de sódio (SDS). A reação ocorre em presença de tampão fostato 0.2125M (pH 8,2) e é interrompida pela adição de HCl 0,1N. A absorbância da solução é determinada a 340nm. A concentração de grupos de grupos amino foi determinada através de curva padrão construída com L-leucina (0 a 2,0mM). O número de grupos ϵ -amino livres foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$GH = \frac{mMolLeu}{h_{tot}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde, **mMolLeu** são os grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina (mM/g de proteína); **h_{tot}** é o número de equivalente de ligações peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 8,2 e 11,1 mM/g de proteína para a caseína e gelatina respectivamente. Os resultados foram reportados como porcentagem de grupos amino livres (mg/100mg de proteína).

3.2.5. Elaboração de filmes

Os filmes foram preparados segundo a técnica *casting*, a qual consiste na desidratação da solução filmogênica convenientemente aplicada sobre um suporte (placas de acrílico). O controle da espessura, para todos os filmes elaborados, foi efetuado através do volume (ml) de solução filmogênica aplicado no suporte. O fluxograma geral para a produção de filmes é mostrado na Figura 8.

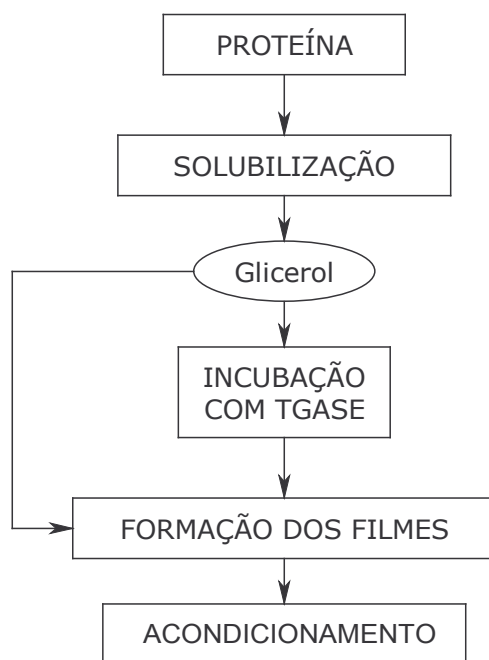


Figura 8. Fluxograma geral da produção de filmes com e sem transglutaminase

3.2.5.1. Filmes a partir das proteínas nativas

a) Ensaio preliminares

Foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de determinar os seguintes parâmetros: nível de plastificante, concentração de proteína e tempo de polimerização com transglutaminase.

Utilizando concentrações de proteína de 10% (para caseína e gelatina) e omitindo-se a etapa de polimerização foram elaborados filmes com diferentes concentrações de plastificante (15, 20, 25, 30, e 40 % em função ao conteúdo de proteína). Para cada tipo de filme foram realizadas análises visuais e táteis, com o objetivo de identificar o nível mínimo de plastificante necessário para a formação de filmes manuseáveis.

Fixada a concentração de plastificante, foram elaborados filmes com diferentes concentrações de proteína: 7,0; 7,5; 8,0 e 10,0% (p/p). A polimerização foi conduzida a temperatura de 50°C e pH 7,0 durante 15, 20, 30 e 60 minutos. A concentração de

proteína e o tempo de polimerização foram escolhidos em função das características da solução filmogênica; isto é, viscosidade visual e espalhabilidade da solução na placa.

b) Produção dos filmes

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior foram preparados os filmes de caseína e/ou gelatina. Para isto, foram preparadas soluções de caseína e gelatina contendo 7% de proteína (p/p) (as proteínas foram solubilizadas conforme descrito no item 3.2.2.1.). Em seguida, diferentes volumes das duas soluções foram gentilmente misturados para se obter filmes com a proporção desejada de cada componente (Tabela 7). O pH da mistura foi ajustado a 7,0 e a temperatura a 50°C e, em seguida, foram incorporados o plastificante ($C_{\text{glicerol}} = 25\%$) e a enzima. A concentração de enzima utilizada foi àquela utilizada por CARVALHO e GROSSO (2004) na elaboração de filmes de gelatina, isto é, 10U/g de proteína. A polimerização foi conduzida em reator encamisado durante 15 minutos, sob agitação lenta, e interrompida por inativação térmica da enzima a 85°C durante 10 minutos. Imediatamente, a solução foi aplicada sobre placas de acrílico e submetida à secagem à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Após a secagem, os filmes foram acondicionados à temperatura ambiente, em dessecadores contendo uma solução saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($50 \pm 2\%$ de umidade relativa) durante 48 horas antes das análises. Também, foram elaborados filmes omitindo-se a etapa de polimerização, onde, o plastificante foi adicionado após a etapa de aquecimento.

Tabela 6. Proporções de gelatina e caseína utilizadas na produção dos filmes

<i>Proteínas</i>	<i>Filmes</i>				
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>
Caseína (%)	100	75	50	25	0
Gelatina (%)	0	25	50	75	100

c) Avaliação da polimerização

A polimerização foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme à metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Ltda., Cód.: 165-2940) com

gel de 0,75 mm de espessura. Utilizou-se gel de empilhamento de 4% e gel de separação de 10%. As amostras foram dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8; SDS 10%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Aplicaram-se, nas canaletas do gel, 50 μ g de amostra. A corrida foi realizada a 120 V, à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 2 horas. As bandas de proteína foram coradas segundo manual de instruções do fabricante (Mini-Protean II: Dual slab cell, Instructors Manual, Biorad Laboratories, Richmond, USA). Preparou-se uma solução de Coomassie R-250 (0,1%) em 40 % de metanol e 10% de ácido acético, para corar os géis e uma solução contendo metanol (40%) e ácido acético (10%), para descorar os géis.

Para as amostras sem transglutaminase a massa molecular das proteínas foi determinada usando o kit padrão de baixa massa molecular contendo α -lactalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (24,1 kDa), anidrase carbonica (30 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina (66 kDa) e fosforilase b (97 kDa) (Amershan Pharmacia Biotech Ltda., cód. 17-0446-01). Para as amostras com transglutaminase foi utilizado o kit padrão de alta massa molecular contendo glutamato desidrogenase (53 kDa), transferrina (76 kDa), β -galactosidase (116 kDa), α 2-macroglobulina (170 kDa) e miosina (212 kDa), (Amershan Pharmacia Biotech Ltda., cód. 17-0615-01).

3.2.5.2. Filmes a partir dos hidrolisados

A partir dos resultados obtidos no item 3.2.4., foram preparados os filmes de caseína e gelatina hidrolisada. Para isto, foram preparadas soluções aquosas de 10% (p/p) de proteína hidrolisada. Depois, foram misturados diferentes volumes das duas soluções para obter filmes com a proporção desejada de cada componente (Tabela 7). A seguir o pH foi ajustado a 7,0 e as soluções foram submetidas a temperaturas de 25 e 85°C, durante 15 minutos. Após esse período, a temperatura das soluções foi ajustada a 50°C e em seguida foram incorporados o plastificante e a enzima ($C_{\text{ACTIVA-TGS}} = 50 \text{ U/g de proteína}$). A concentração de plastificante foi àquela utilizada na elaboração de filmes a partir das proteínas nativas, ou seja, 25 % (em relação ao conteúdo de proteína). A polimerização foi conduzida em reator encamisado e interrompida após 1 hora por inativação térmica da enzima a 85°C durante 10 minutos. Imediatamente, a solução foi aplicada sobre placas de acrílico e submetida à secagem à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Após a secagem, os filmes foram acondicionados durante 48 horas em dessecadores mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e

50 % de umidade relativa. Também foram elaborados filmes omitindo-se a etapa de polimerização (o plastificante foi adicionado após a etapa de aquecimento).

Tabela 7. Proporções de CaH e GeH utilizadas na elaboração de filmes

<i>Hidrolisados</i>	<i>Filmes</i>				
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>
CaH (%)	100	75	50	25	0
GeH (%)	0	25	50	75	100

3.2.6. Caracterização dos filmes

3.2.6.1. Espessura do filme

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital com resolução de 0,001mm (Modelo MDC-25M, Mitutoyo, MFG, Japão). As medições foram feitas após o período de acondicionamento dos filmes. Para a permeabilidade ao vapor de água, a espessura foi a média aritmética de dez medidas feitas aleatoriamente através de cada peça de filme a ser analisado. Para os testes de tração, a espessura foi a média aritmética de cinco medidas feitas através de cada corpo de prova a ser analisado.

3.2.6.2. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas foram determinadas através do teste de tração e de acordo com a norma D882-02 da ASTM (ASTM, 2002b), utilizando-se o texturômetro TAXT2 (SMS, Surrey, UK) e o programa *Texture Expert*, Versão 1.22. Os corpos de prova, filmes com 100mm de comprimento e 25mm de largura, foram submetidos à tração com velocidade de 1mm/s, partindo-se de uma separação inicial de 50mm, até a ruptura do filme. A resistência à tração (MPa) e a elongação (%) foram obtidas diretamente da curva de tensão em função da deformação, conhecidas as dimensões iniciais dos corpos de prova. O módulo de elasticidade, ou módulo de Young, foi obtido da tangente da curva na região elástica, isto é, na porção linear da curva.

3.2.6.3. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente, de acordo com o método E 96-00e1 da ASTM (ASTM, 2002a). Os

filmes foram fixados, com parafina microcristalina, em células de alumínio contendo cloreto de cálcio (UR = 0%). O sistema foi então introduzido em dessecador contendo uma solução saturada de NaCl (UR = $75,0 \pm 2$ %). As células foram pesadas em intervalos de 24 horas durante 7 dias para determinar a razão de fluxo de vapor de água através do filme. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada através da equação:

$$PVA = \frac{W \times e}{t \times A \times \Delta p} \quad \text{Equação 5}$$

Onde, **PVA** é a permeabilidade ao vapor de água determinada em triplicata (g.mm/m².d.kPa); **W/t** corresponde à massa de umidade absorvida pelo sistema em função do tempo (g/d) calculada por regressão linear ($r^2 \geq 0,98$); **A** é a área exposta do filme (m²); **Δp** é a diferença de pressão parcial através do filme (kPa) e **e** corresponde à espessura média de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme (mm).

3.2.6.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo sílica gel, por um período de sete dias (CARVALHO e GROSSO, 2004) para eliminar a umidade dos filmes. Em seguida, os filmes foram fraturados, fixados em suportes ("stubs") de alumínio (com fita condutiva de cobre) e recobertos com ouro (SPUTTER COATER BALZERS – SCD 050) a 25°C e pressão de 2×10^5 Torr por 180 segundos. A microestrutura da seção transversal dos filmes foi observada em microscópio eletrônico de varredura JEOL SCANNING MICROSCOPE-JMS-5800LV a 10kV.

3.2.7. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%, foi aplicada aos resultados experimentais para identificar possíveis diferenças significativas. Posteriormente, nas médias em que a ANOVA foi significativa; aplicou-se o teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para verificar quais médias foram significativamente diferentes (COCKRAN e COX, 1957). Para isto utilizou-se o programa computacional Statistica® 5.5 (Stasoft, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Hidrólise com tripsina

4.1.1. Produção dos hidrolisados

Os hidrolisados de caseína e gelatina, preparados com tripsina suína, foram obtidos como descrito no item 3.2.2.3. A Figuras 9 ilustra as curvas de hidrólise da gelatina e caseína. Verificou-se que o grau de hidrólise da caseína (9,39%) foi superior ao obtido com gelatina (5,40%) após duas horas de reação. Como as duas proteínas possuem uma estrutura aberta, favorável à ação da tripsina; a diferença encontrada nas taxas de hidrólise da gelatina e caseína pode estar relacionada com o conteúdo dos aminoácidos lisina e arginina que estão presentes em maiores proporções na caseína. Embora não foram determinados os aminogramas das proteínas, os valores da literatura apresentados nas Tabelas 1 e 2 podem ser utilizados com fins de comparação. Assim, o número de ligações peptídicas hidrolisadas na caseína foi superior em função do seu alto número de locais disponíveis para a ação da tripsina.

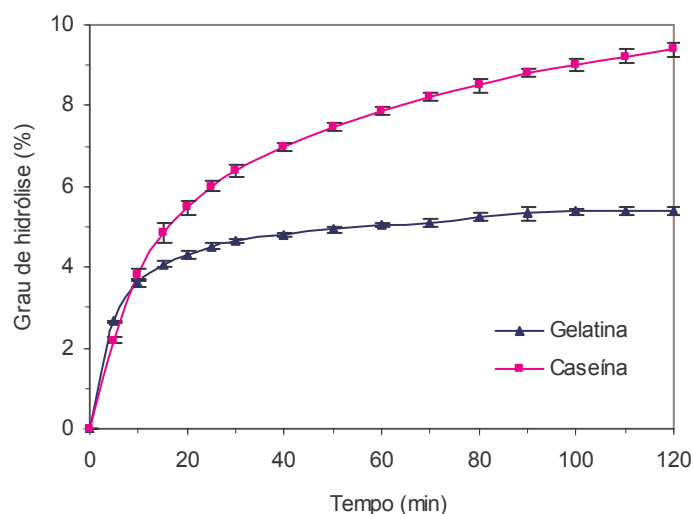


Figura 9. Curva de hidrólise da caseína (40°C) e gelatina (45°C), utilizando a enzima tripsina, em pH constante de 8,0.

Por outro lado, na Figura 9, verifica-se que o máximo grau de hidrólise atingido pela gelatina foi em torno de 5,40 % após duas horas de hidrólise, indicando que locais ativos não mais estariam disponíveis para a ação da tripsina.

Verificadas as taxas de hidrólise das proteínas, foram fixados tempos de hidrólise de 20 e 60 minutos para a caseína e gelatina respectivamente, a fim de se atingir 5% de grau de hidrólise. O grau de hidrólise foi fixado em função do tempo empregado para se obter os hidrolisados e o máximo grau de hidrólise atingido pela gelatina.

4.1.2. Caracterização dos hidrolisados

4.1.2.1. Composição dos hidrolisados

Na Tabela 8 pode-se observar a composição de proteínas, umidade e cinzas dos hidrolisados de gelatina e caseína, com 5% de grau de hidrólise, comparados às proteínas nativas.

Tabela 8. Proteína bruta, cinzas e umidade das amostras de gelatina, caseína e seus hidrolisados.

	Caseína		Gelatina	
	Nativa	Hidrolisada	Nativa	Hidrolisada
Proteína (%) [*]	88,57 ± 2,04 ^a	85,38 ± 0,83 ^a	97,48 ± 2,50 ^a	91,28 ± 1,95 ^b
Cinzas (%) [*]	2,51 ± 0,30 ^a	7,12 ± 0,03 ^b	0,82 ± 0,02 ^a	3,67 ± 0,06 ^b
Umidade (%)	11,01 ± 0,03 ^a	2,08 ± 0,12 ^b	12,11 ± 0,08 ^a	4,20 ± 0,12 ^b

^{*} Resultados apresentados em base seca, como média de três repetições ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha e para cada proteína representam diferenças significativas entre as médias ($p < 0.05$).

Observa-se que os teores de cinzas dos hidrolisados são significativamente superiores aos das proteínas nativas. Esta diferença decorre da adição do hidróxido de sódio para ajustar o pH (8,0) das soluções protéicas e mantê-lo constante durante a reação de hidrólise. Além disso, o elevado teor de cinzas observado para a caseína hidrolisada foi devido, também, à utilização prévia de hidróxido de sódio para a solubilização da proteína. Teores de cinzas altos (9,01%) foram observados por JACOBUECCI (1999) para caseinato de sódio produzido a partir da caseína ácida obtida do leite desnatado.

Os teores de proteína de ambos os hidrolisados foram inferiores aos das proteínas nativas. Resultados similares foram observados por ROMAN (2002) e CÂNDIDO (1998). Os teores de umidade foram variáveis e diferiram entre as amostras estudadas.

4.1.2.2. Solubilidade

Nas Figuras 10 e 11 observam-se às curvas de solubilidade da caseína e gelatina (nativa e hidrolisada) em função do pH. Devido a sua natureza anfótera (capacidade de dissociação como ácido ou como base), a solubilidade da caseína (Figura 10) foi altamente influenciada pelo pH da solução; apresentando solubilidade mínima de 1,60% no pH 4,5 (perto do pI =4,6) e solubilidade máxima de 89,12% no pH 8,0, na faixa de pH estudado. A baixa solubilidade próxima da região do pI isoeletrico foi devida, principalmente, à falta de repulsão eletrostática; a qual, promoveu agregação e precipitação através de interações hidrofóbicas. Por outro lado, o aumento da densidade de cargas da proteína, em valores de pH afastados da região do ponto isoeletrico, favoreceu as interações proteína-água; resultando num aumento das propriedades de hidratação e conseqüente aumento na solubilidade (DAMODARAM, 1996). Segundo BORDERIAS e MONTERO (1988) as variações de pH modificam a ionização e a carga líquida da proteína, alterando as forças de atração e repulsão entre as proteínas e a associação com a água.

A hidrólise triptica da caseína aumentou sua solubilidade em todos os valores de pH estudados (Figura 10), exceto em pH 8,0, onde o incremento não foi muito acentuado. Na faixa de pH correspondente ao ponto isoeletrico da caseína, o efeito da hidrólise triptica foi ainda mais acentuado, incrementado de 1,60 a 75,89% para a caseína nativa e hidrolisada respectivamente.

O efeito do pH na solubilidade da caseína, em diferentes formas, ou de suas frações, foi estudado por diversos autores e, em alguns casos (CHOBERT et al., 1988ab; FLANAGAN e FITZGERALD, 2002a), os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Por outro lado, observou-se valores baixos de solubilidade (18-42%) para a gelatina nativa (Figura 11) em função da temperatura do ensaio. Depois de hidrolisar a gelatina com tripsina, a solução peptídica, teve 100% de solubilidade em todos os valores de pH estudados.

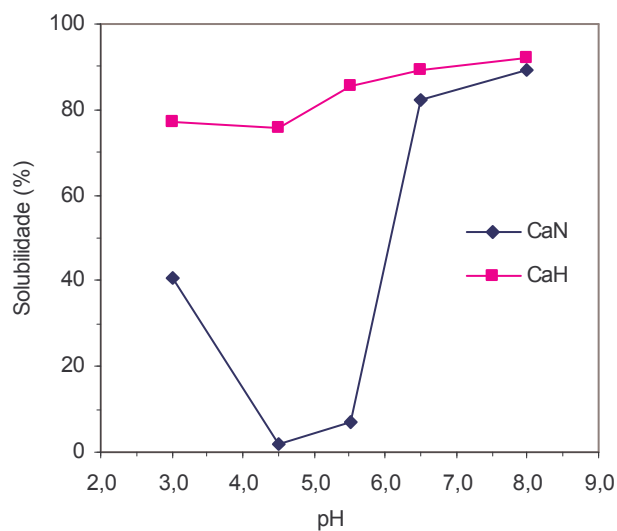


Figura 10. Curvas de solubilidade da caseína nativa e hidrolisada em função do pH a 23°C (CaN = caseína nativa, CaH = caseína hidrolisada).

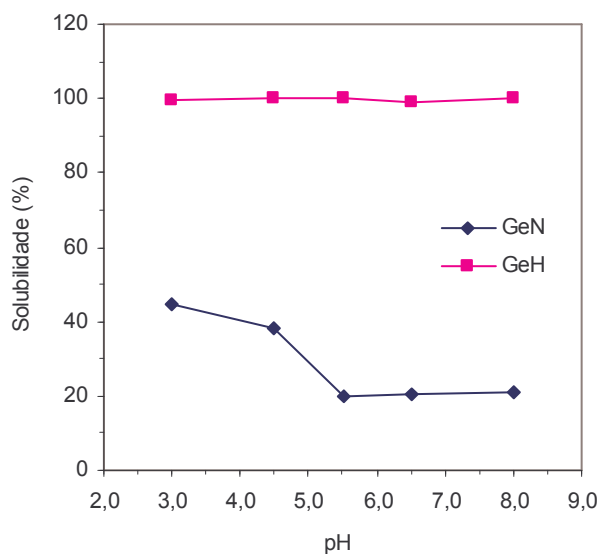


Figura 11. Curvas de solubilidade da gelatina nativa e hidrolisada em função do pH a 23 °C (GeN = gelatina nativa, GeH = gelatina hidrolisada).

Assim, nas Figuras 10 e 11 verifica-se aumento da solubilidade da caseína e gelatina, devido ao tratamento enzimático com tripsina. O aumento da solubilidade dos hidrolisados é provavelmente devido à diminuição do tamanho da cadeia polipeptídica e correspondente aumento da exposição de grupos ionizáveis (NH_4^+ , COO^-) com incremento concomitante na hidrofiliabilidade bem como da carga líquida da molécula (MAHMOUD, 1994; DAS e KINSELLA, 1990). Por outro lado, dependendo da enzima proteolítica utilizada na hidrólise, o produto resultante apresentará maior ou menor solubilidade. Desde que, a tripsina hidrolisa locais hidrofílicos (resíduos de lisina ou arginina) da proteína, os peptídeos formados serão mais hidrofílicos e, conseqüentemente, mais solúveis. Enzimas como a α -quimiotripsina, que hidrolisam sítios hidrofóbicos, produzem fragmentos mais hidrofóbicos e menos solúveis.

4.1.2.3. Determinação da massa molecular dos hidrolisados

O perfil eletroforético das proteínas hidrolisadas e não hidrolisadas de gelatina e caseína está ilustrada na Figura 12. A caseína foi separada em uma banda principal de massa molecular maior que 16,9 kDa; a banda corresponderia às frações: α_{S1} - , α_{S2} , β - e k-caseína, cujas massas moleculares encontram-se entre 19,0 e 26,0kDa. Também foram observadas algumas bandas secundárias de baixa massa molecular, entre 10,7 a 14,4 kDa, e outras bandas de massa molecular superior à banda principal. As primeiras corresponderiam às outras frações menores da caseína, a saber, as γ -caseínas produzidas a partir da β -caseína através da ação proteolítica da plasmina (proteinase do leite) e a segunda corresponderia à forma polimérica da k-caseína, a qual, pode variar em tamanho de 60 a 600 kDa (FOX e MCSWEENEY, 1998; CREAMER, 2002; WONG et al., 1996). O mesmo perfil eletroforético foi observado por BANERJEE e CHEN (1995) para caseinato de sódio.

Depois de vinte minutos de tratamento enzimático com tripsina, observou-se o desaparecimento das principais bandas da caseína e foram visíveis ao menos três bandas com massas moleculares variando de 6,2 a 10,7kDa.

A gelatina nativa apresentou bandas de alta massa molecular, as quais, ficaram retidas no gel de empilhamento e no limite superior do gel de separação. Assim, não foi possível determinar a massa molecular aproximada da gelatina. Contudo, ensaios preliminares, utilizando o sistema típico de eletroforese, mostraram que a gelatina tipo B utilizada, possui uma banda principal de massa molecular entre 116 a 170 kDa

(Anexo 6) que, segundo POPPE (1997), corresponde à subunidade β (resultado da união de duas cadeias α). Por outro lado, observa-se também uma banda de massa molecular aproximada de 17 kDa. A gelatina é uma proteína obtida da hidrólise do colágeno, por conseguinte, frações menores também poderiam estar presentes.

Depois de 60 minutos de hidrólise, correspondente a 5% de GH, observou-se desaparecimento total das bandas de alto peso molecular, e somente duas bandas de massa molecular de 14,4 e 16,9 kDa foram visualizadas (coluna 2).

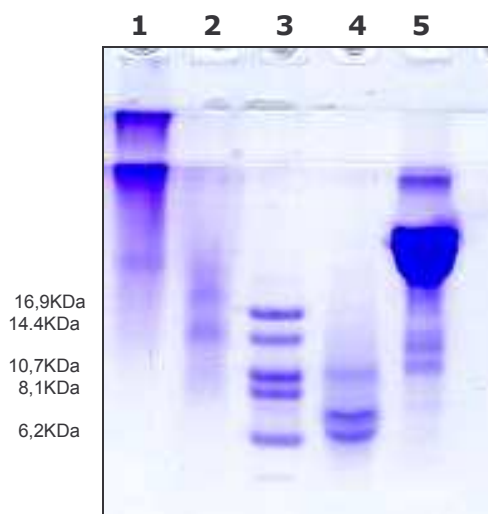


Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína. Coluna 1 – gelatina nativa; coluna 2 – gelatina hidrolisada; coluna 3 – padrão de massa molecular; 4 – caseína hidrolisada; coluna 5 – caseína nativa.

A hidrólise das proteínas com tripsina resultou em peptídeos de massas moleculares próximas (entre 6,2 a 16,9 kDa) embora a massa molecular da gelatina (116 a 170 kDa) fosse superior à da caseína (>16,9 kDa). Isto indica que o decréscimo da massa molecular para a gelatina foi superior do que para a caseína.

4.2. Polimerização dos hidrolisados

4.2.1. Efeito dos parâmetros de polimerização

4.2.1.1. Influência da concentração de transglutaminase

A Tabela 9 mostra as porcentagens de grupos amino livres obtidos pelo método de TNBS em função da concentração de transglutaminase. Os resultados mostram que concentrações de 10 U/g de transglutaminase conduzem a uma diminuição significativa dos grupos amino livres dos hidrolisados de gelatina e caseína, indicando que houve formação de ligações ϵ -(λ -glutamyl)lisina entre as cadeias dos peptídeos. Entretanto, a variação da concentração de enzima de 10 a 100 U/g, não teve efeito significativo no número de grupo amino livres (expressado em porcentagem). Isto sugere que um máximo de ligações cruzadas seria formado em concentrações de 10 U/g de proteína para ambos hidrolisados.

Tabela 9. Porcentagem de grupos amino livres dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com diferentes concentrações de transglutaminase

Concentração de Transglutaminase (U/g)	Grupo ϵ -amino livres (%, mg/100mg de proteína)*	
	Caseína	Gelatina
	Hidrolisada	Hidrolisada
0	12,22 $\pm$ 0,14 ^a	10,64 $\pm$ 0,20 ^a
10	10,73 $\pm$ 0,19 ^b	8,47 $\pm$ 0,03 ^b
100	9,76 $\pm$ 0,37 ^b	7,99 $\pm$ 0,16 ^b

* Média $\pm$ desvio padrão de duplicatas.

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes (p<0.05)

Embora a diminuição dos grupos amino livres devido à ação da transglutaminase tenha sido significativa, a redução foi somente em torno de 12%. CARVALHO e GROSSO (2004) obtiveram, para o filme de gelatina tratado com transglutaminase, uma redução em torno de 50% quando comparado ao filme nativo. LORENZE et al. (1998) observaram, para o caseinato de sódio modificado com transglutaminase, que o conteúdo de N-amino solúvel, determinado pelo método OPA modificado, diminuiu somente em torno de 5%. Contudo, os padrões de filtração de gel mostraram uma formação de polímeros de alta massa molecular (700-2000 kDa).

Assim, obviamente só um pequeno número de ligações cruzadas foi necessário para conectar as moléculas de caseína.

Desta forma, para verificar se foram formados polímeros de alta massa molecular, mesmo com a formação de poucas ligações cruzadas, foi avaliado o perfil eletroforético dos hidrolisados de gelatina e caseína (Figura 13).

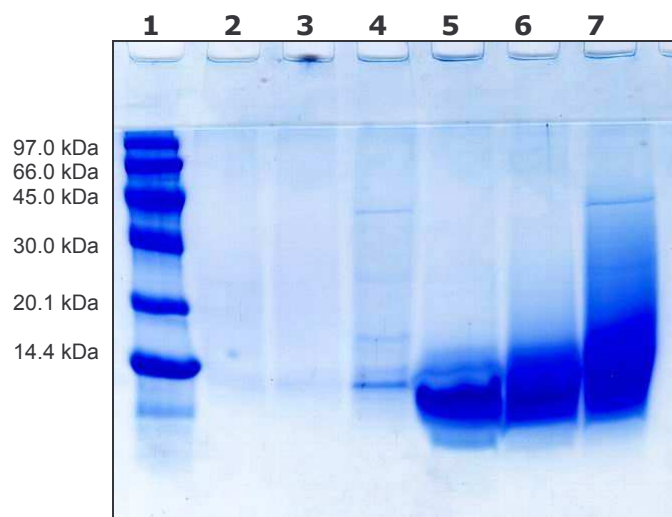


Figura 13. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína submetidos à reação com diferentes concentrações de transglutaminase.

Coluna 1 – padrão de massa molecular; coluna 2 – GeH; coluna 3 – GeH e polimerizada com 10 U/g de Tgase; coluna 4 – GeH e polimerizada com 100 U/g de Tgase; coluna 5 – CaH; coluna 6 – CaH e polimerizada com 10 U/g de Tgase; coluna 7 – CaH e polimerizada com 100 U/g de Tgase.

A polimerização das proteínas pode ser verificada pelo aumento da massa molecular da gelatina e caseína hidrolisada (colunas 4 e 7 respectivamente). Contudo, a massa molecular atingida foi ao redor de 30 a 45 kDa. Embora não fosse observada grande redução na intensidade das bandas pertencentes aos hidrolisados, uma alta concentração de frações protéicas de diferente massa molecular (entre 14,4 a 30 kDa) foi observada para a caseína hidrolisada e polimerizada com uma concentração de transglutaminase de 100 U/g. Esta grande distribuição de massa molecular pode ser atribuída ao fato de que a transglutaminase reage com peptídeos de diferentes tamanhos resultando em várias extensões de ligações cruzadas entre as moléculas da proteína.

LORENZE et al. (1998) verificaram também um leve aumento da massa molecular dos hidrolisados trípticos de caseinato de sódio, ligados covalentemente com transglutaminase, quando comparados aos hidrolisados não ligados. Resultados similares foram encontrados por WALSH et al. (2003) para hidrolisados de isolado protéico de soja (IPS) e por FLANAGAN e FITZGERALD (2002b) para hidrolisados de caseinato de sódio.

Os resultados encontrados no presente trabalho, nas condições testadas, sugerem que o tratamento enzimático, com transglutaminase, de peptídeos de baixa massa molecular resulta na produção de polímeros de baixa massa molecular. Segundo YOKOYAMA et al. (2003) é possível que a reatividade da transglutaminase seja diferente para moléculas de baixa e alta massa molecular. Os autores compararam a habilidade de duas transglutaminase microbianas (recombinante e não recombinante) em formas ligações cruzadas, através da atividade enzimática das enzimas e das propriedades gelificantes da gelatina tratada com transglutaminase. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os géis de gelatina (molécula de alta massa molecular) tratados com transglutaminase recombinante e não recombinante. Contudo, a atividade enzimática das duas enzimas, avaliada através do método de hidroxamato, foi similar. O método utiliza como substratos Z-Gln-Gly e NH_2OH (moléculas de baixa massa molecular).

Resultados contrários foram encontrados por BABIKER et al. (1996a,b) para hidrolisados de proteína de soja e de glúten respectivamente. Embora a massa molecular dos hidrolisados foi baixa, os padrões de SDS-PAGE mostraram que os hidrolisados tratados com transglutaminase estavam compostos de frações proteicas de massa molecular alta quando comparadas aos digeridos pelas enzimas proteolíticas.

A partir dos resultados encontrados nesta etapa, a concentração de transglutaminase foi fixada em 100 U/g de proteína; contudo, utilizou-se para os seguintes ensaios uma concentração de 50 U/g de proteína, porque o perfil eletroforético dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com esta concentração de enzima foi similar àquele obtido quando os hidrolisados foram tratados com concentrações de 100 U/g (resultados não mostrados).

4.2.1.2. Influência da concentração de proteína, temperatura e tempo de polimerização

Não se conseguindo uma polimerização extensiva, com altas concentrações de transglutaminase, conduziu-se ensaios para verificar se a concentração de proteína, temperatura ou tempo de hidrólise estavam influenciando na polimerização dos hidrolisados. Os valores de grau de hidrólise e o perfil eletroforético das amostras tratadas com transglutaminase foram similares aos obtidos na etapa anterior (Tabela 10; Figura 14), indicando que a variação das condições da reação enzimática não conduziu a uma polimerização extensiva dos hidrolisados. No entanto, pequenas diferenças podem não ter sido detectadas, pelos métodos empregados.

Tabela 10. Porcentagem de grupos amino livres dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com transglutaminase sob diferentes concentrações de proteína, temperatura e tempo de incubação.

<i>Hidrolisado</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Grupo ε-amino livres (%, mg/100mg de proteína)*</i>
CaH	SemTg	12,22 ± 0,14 ^a
	ComTg (Cp=25%, T=25°C, t=5hrs)	10,06 ± 0,25 ^b
GeH	SemTg	10,64 ± 0,20 ^a
	ComTg (Cp=15%, T=40°C, t=3hrs)	8,68 ± 0,24 ^b
CaH/GeH (50/50)	SemTg	11,20 ± 0,21 ^a
	ComTg (Cp=20%, T=25°C, t=5hrs)	9,39 ± 0,20 ^b
	ComTg (Cp=20%, T=40°C, t=3hrs)	9,03 ± 0,15 ^b
	ComTg (Cp=30%, T=40°C, t=3hrs)	9,21 ± 0,20 ^b

* Média ± desvio padrão de duplicatas.

^{a,b} Letras diferentes no mesmo hidrolisado correspondem a médias significativamente diferentes (p<0.05)

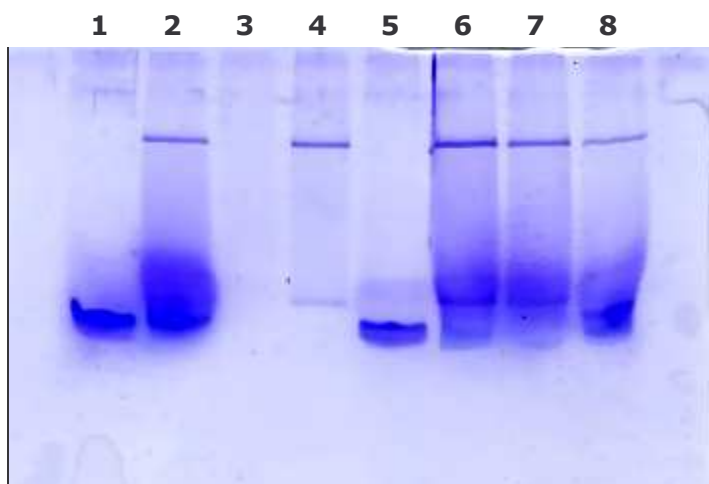


Figura 14. Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de gelatina e caseína tratados com transglutaminase sob diferentes concentrações de proteína, temperatura e tempo de incubação.

Coluna 1 – CaH; Coluna 2 – CaH e Polimerizada (Cp= 25%, T = 25 C, t = 5hrs); Coluna 3 – GeH; Coluna 4 – GeH e Polimerizada (Cp = 15%, T = 40 C, t = 3hrs); Coluna 5 – CaH/GeH; Coluna 6 – CaH/GeH e Polimerizada (Cp = 20%, T = 25 C, t = 5 hrs); Coluna 7 – CaH/GeH e Polimerizada (Cp = 20%, T = 40 C, t = 3 hrs); Coluna 8 – CaH/GeH e Polimerizada (Cp = 30%, T = 40 C, t = 3 hrs).

4.2.2. Influência das enzimas proteolíticas

Na Tabela 11 podem-se verificar os valores de grau de hidrólise dos hidrolisados de caseína obtidos com tripsina, quimiotripsina e pancreatina. Segundo a metodologia descrita na seção 3.2.4.2 todos os hidrolisados atingiram 5% de GH pelo método pH-stat. Os valores de grau de hidrólise (% de grupos amino livres) determinado pelo método TNBS são superiores àqueles determinados pelo método pH-stat. Isto é devido a que o método TNBS não só determina os grupos α -amino liberados, mas também os grupos amino da cadeia lateral (p.e., grupo ϵ -amino da lisina). Assim, esse método tende a superestimar o verdadeiro valor do GH.

Por outro lado, também pode verificar-se que o GH do hidrolisado pancreático é significativamente superior aos dos hidrolisados quimiotrípticos e trípticos. É importante mencionar que a determinação do GH para todos os hidrolisados foi realizado nas mesmas condições. Isto supõe, que o GH estimado pelo método pH-stat teria que ser superior a 5% para este hidrolisado em particular. O grau de hidrólise

determinado pelo método de pH-stat é influenciado pelo pK dos componentes da solução, que por sua vez é influenciado pela temperatura e o tamanho dos peptídeos (ALDER-NISSEN, 1986; NIELSEN e OLSEN, 2002) . A pancreatina, obtida por desidratação cuidadosa do pâncreas, é uma mistura de tripsina e quimiotripsina, com atividade endo- e exo-peptidase (WOLFANG, 1990; LAHL e BRAUN, 1994). Possivelmente devido à atividade exo- da pancreatina, estariam-se formando peptídeos de baixa massa molecular, cuja concentração seria superior aos dos hidrolisados trípticos e quimiotrípticos. Segundo SPELLMAN et al. (2003), o valor de pK dos grupos α -amino é consideravelmente mais alto para tripeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos livres, do que para polipeptídeos. Isto conduziria a uma subestimação do valor para $1/\alpha$ usado no cálculo do GH pelo método pH-stat (ver Equação 3), e uma conseqüente subestimação do GH, o que indica que o hidrolisado pancreático na realidade teria um GH superior a 5%. Isto é confirmado pelo método de TNBS.

Tabela 11. Porcentagem de grupos amino livres dos peptídeos de caseína, produzidos com diferentes enzimas proteolíticas, tratados com transglutaminase.

Enzimas proteolíticas	Grupos ε -amino livres (%, mg/100mg de proteína)**	
	Sem Tgase	Com Tgase
Tripsina	12,22 $\pm$ 0,14 ^{bA}	10,17 $\pm$ 0,33 ^{bB}
Quimiotripsina	11,34 $\pm$ 0,06 ^{cA}	9,54 $\pm$ 0,14 ^{bB}
Pancreatina	14,54 $\pm$ 0,14 ^{aA}	13,82 $\pm$ 0,18 ^{aB}

* Média $\pm$ desvio padrão de duplicatas. Médias para o mesmo parâmetros na mesma coluna (^{a-c}) ou na mesma linha (^{A,B}) com diferentes letras superescritas são significativamente diferentes (p<0.05).

Observando os resultados da reação com transglutaminase na Tabela 11 e Figura 15 verifica-se que a polimerização não foi extensa mesmo utilizando diferentes enzimas proteolíticas. Nas colunas 3, 5 e 7 (Figura 15) pode-se observar o aparecimento de uma banda com massa molecular entre 30 – 45kDa; relacionado à formação de ligações isopeptídicas ε -(λ -glutamil)lisina, obtidas através da ação da transglutaminase; para todos os hidrolisados de caseína. Embora não fosse observada redução na intensidade das bandas pertencentes aos hidrolisados, uma alta concentração de frações protéicas de diferente massa molecular (entre 14,4 a 30 kDa) foi observada para a caseína hidrolisada com quimiotripsina e polimerizada com transglutaminase (coluna 5).

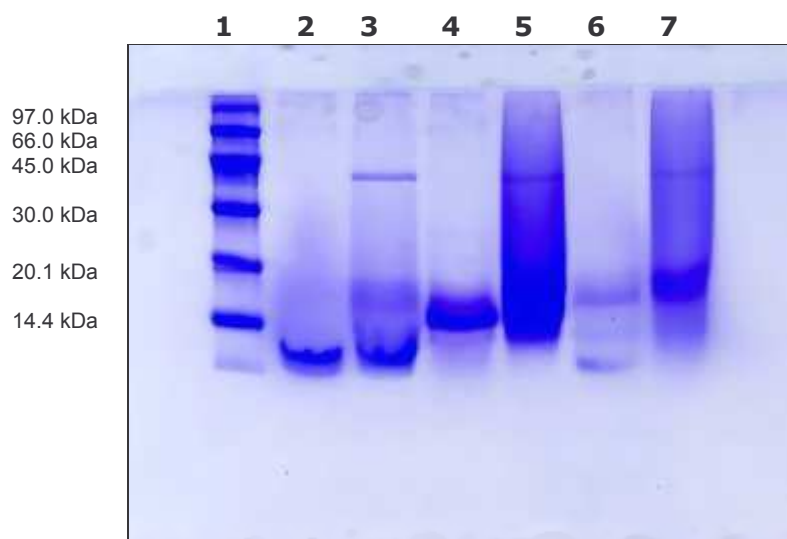


Figura 15. Eletroforese SDS-PAGE dos peptídeos de caseína, produzidos com diferentes enzimas proteolíticas, tratados com transglutaminase.

Coluna 1 – padrão de massa molecular; coluna 2 – CaH/tripsina; coluna 3 – CaH/tripsina e polimerizada; Coluna 4 – CaH/quimiotripsina; Coluna 5 – CaH/quimiotripsina e polimerizada; Coluna 6 – CaH/pancreatina; Coluna 7 – CaH/pancreatina e polimerizada.

BABIKER et al. (1996a) polimerizaram com transglutaminase proteínas de soja hidrolisadas com as proteases quimiotripsina, papaína e pepsina. A polimerização foi mais efetiva quando os hidrolisados foram obtidos com quimiotripsina e papaína, apresentando bandas de moléculas muito grandes no topo do gel de empilhamento. A massa molecular média, determinada por filtração de gel em HPLC, de ambos polímeros foi de 99.4 e 98.6 kDa respectivamente. Posteriormente os mesmos autores (BABIKER et al., 1996b) observaram, através de SDS-PAGE, um aumento significativo da massa molecular dos peptídeos de glúten – obtidos com pepsina, papaína e quimiotripsina - tratados com transglutaminase. Contudo, os padrões de SDS-PAGE também mostraram que não houve incremento na massa molecular dos peptídeos de glúten produzidos pela enzima pronase, em função do tratamento com transglutaminase. Segundo BABIKER (2000) a quimiotripsina, em particular, alteraria favoravelmente a configuração molecular das proteínas facilitando assim, a formação de ligações cruzadas mediadas pela transglutaminase.

Através dos resultados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que a transglutaminase não produziu uma polimerização extensiva dos hidrolisados de gelatina e caseína. Contudo, outros fatores como: a presença de sódio, o grau de hidrólise, e a disposição dos resíduos lisil e glutamyl; poderiam estar influenciando a reação com transglutaminase.

O método pH-stat, utilizado na obtenção dos hidrolisados de caseína e gelatina, promove um aumento no teor de resíduo mineral da amostra pela adição contínua de sódio para manter o pH constante. Assim, prévio à liofilização das soluções contendo os hidrolisados, foram conduzidos ensaios para avaliar a influência do excesso de resíduo mineral na polimerização com transglutaminase em amostras de caseína nativa (item 3.2.2.5.). Na Figura 16 pode-se verificar que a polimerização da caseína nativa mostrou ser efetiva ainda na presença de resíduo mineral em excesso.

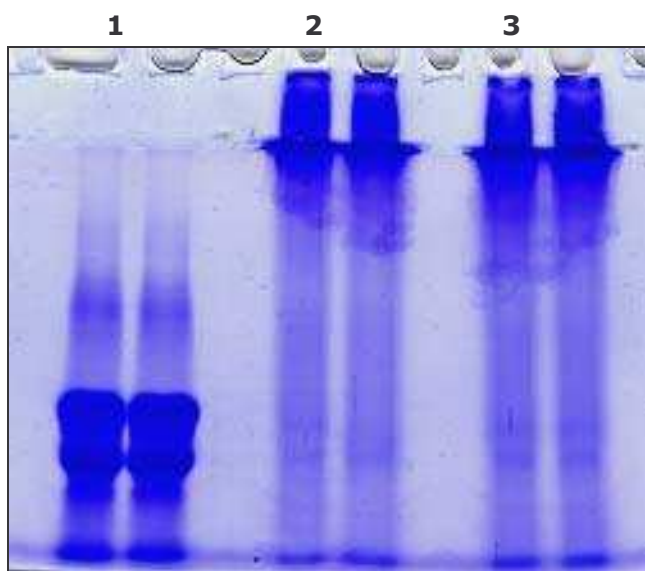


Figura 16: Eletroforese SDS-PAGE da caseína polimerizada com transglutaminase na presença de excesso de resíduo mineral.

Coluna 1 – Caseína Nativa (CaN); coluna 2 – CaN polimerizada na presença de excesso de sal; coluna 3 – CaN polimerizada sem a presença de sal.

WALSH et al (2003) e FLANAGAN e FITZGERALD (2002b) observaram pouco aumento na massa molecular dos hidrolisados de isolado protéico de soja (IPS) e

caseinato de sódio tratados com transglutaminase; mas, foi evidenciada uma concentração de frações protéicas de diferente massa molecular no gel. Os hidrolisados foram obtidos pelo método pH-stat utilizando hidróxido de sódio para manter valores de pH constantes de 7,0 (IPS) e 8,0 (caseinato de sódio). Entretanto BABIKER (2000) observou um incremento significativo na massa molecular dos hidrolisados de proteína de soja também tratados com transglutaminase. Estes últimos hidrolisados foram obtidos utilizando tampão Tris-HCl 0,05M, para manter um pH constante de 8,0; logo, as soluções foram centrifugadas, para tirar as pequenas quantidades de proteína não digerida, e dialisadas contra água destilada. Além disso, a reação com transglutaminase foi realizada no mesmo tampão utilizado na hidrólise.

Outro fator a ser considerado é o grau de hidrólise dos hidrolisados. É esperado que valores baixos de hidrólise conduzam a produtos com ligações isopeptídicas de massa molecular mais alta.

Tanto a presença de sódio quanto o elevado grau de hidrólise estariam contribuindo para um aumento excessivo das forças eletrostáticas nos hidrolisados. Isto, não permitiria aos hidrolisados assumir uma conformação favorável para agir como bons substratos para a transglutaminase. No trabalho de MARINIELLO et al. (2003) demonstrou-se que a pectina facilita a formação, catalisada por transglutaminase, de espécies de alta massa molecular derivadas das subunidades da proteína de soja. Isto seria devido principalmente às interações eletrostáticas, favoráveis à ação da transglutaminase, que ocorrem entre as proteínas de soja e a pectina.

Segundo MATSUMURA et al. (2000) a presença de cálcio, na reação com transglutaminase, conduz à agregação das proteínas, através de interações eletrostáticas. Este efeito pode mascarar os resíduos reativos de glutamina. Conseqüentemente, a transglutaminase não teria atividade catalítica máxima por causa do acesso difícil das enzimas aos locais ativos nos agregados.

Assim, as forças eletrostáticas geradas pelas ligações peptídicas hidrolisadas e pela presença de sal influenciariam a conformação do substrato e conseqüentemente, sua reatividade pela transglutaminase.

Finalmente, a reatividade das proteínas pela enzima também será dependente da estrutura secundária e terciária da proteína bem como da disposição e disponibilidade dos resíduos lisil e glutamyl na cadeia protéica (MATSUMURA et al., 1996).

4.3. Elaboração de filmes

4.3.1. Formação de filmes a partir das proteínas nativas

4.3.1.1. Ensaios preliminares

a) Concentração de plastificante

Segundo os resultados das análises visuais e táteis o nível mais adequado de plastificante para a formação de filmes manuseáveis foi de 25%, para ambas proteínas. Contudo, os filmes de caseína podem ser elaborados utilizando uma concentração de 20% de glicerol.

b) Concentração de proteína e tempo de reação

Para se formar filmes, através da técnica *casting*, é necessário que a solução filmogênica possua uma viscosidade tal que permita ser convenientemente aplicada nas placas de acrílico.

Para verificar se as soluções filmogênicas, modificadas enzimaticamente, permitem a produção de filmes; foram avaliadas diferentes concentrações de proteína e tempos de reação. Foi observado que em concentrações altas de caseína, as soluções filmogênicas gelificavam impossibilitando a produção de filmes. Por outro lado, independente da concentração de proteína, as soluções filmogênicas de gelatina gelificavam, quando eram utilizados períodos longos de incubação (Anexo 6). Assim, a concentração de proteína foi fixada em 7,0%, em função da caseína, e o tempo de reação fixado em 15 minutos, em função da gelatina.

4.3.1.2. Aspecto geral

Os filmes elaborados apresentaram-se com um bom aspecto visual, textura homogênea e não pegajosos, sendo facilmente manuseáveis. Dependendo da proteína utilizada eles foram transparentes, quando os filmes foram produzidos a partir

somente de gelatina, e ligeiramente amarelos, conforme a caseína foi sendo introduzida na mistura.

4.3.1.3. Propriedades mecânicas

a) Resistência à tração

Na Tabela 12 pode-se verificar o efeito do tratamento enzimático, com transglutaminase, sobre a resistência à tração dos filmes de gelatina e caseína e suas misturas. Independente da modificação enzimática, a gelatina produziu filmes com tensão na ruptura significativamente superiores aos filmes produzidos a partir de caseína e a partir das misturas caseína-gelatina. Para filmes de gelatina tipo A e B, foram encontrados valores de resistência à tração de 115,08 MPa e 15,12 MPa respectivamente (CARVALHO e GROSSO, 2004; BERTAN et al., 2004). Já os valores de resistência à tração de filmes de caseína reportados na literatura foram de 0,0004 a 0,001 MPa para filmes de α s1-caseína (MOTOKI et al, 1987b), 2,97-4,25 MPa para filmes de caseinato (BANERJEE e CHEN, 1995), 6-9 MPa para filmes de β -caseína (MAUER et al., 2000), 2,43 a 11,65 MPa para filmes de caseína ácida láctica (CHICK e USTUNOL, 1998) e 0,83 a 15,12 MPa para filmes de caseína obtida pela ação da renina (CHICK e USTUNOL, 1998). Em geral, os filmes produzidos a partir de gelatina apresentam maior resistência à tração que os produzidos a partir de caseína. Estes resultados estariam relacionados com o nível de organização da rede protéica.

Tabela 12. Resistência à tração dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase (23°C, 50% UR)

FILMES	RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (Mpa)*	
	Sem Tgase	Com Tgase
CASEÍNA	12,14 $\pm$ 0,75 ^{dA}	11,38 $\pm$ 0,45 ^{dA}
C:G (75:25)	16,39 $\pm$ 0,31 ^{CA}	16,32 $\pm$ 0,58 ^{CA}
C:G (50:50)	22,89 $\pm$ 0,13 ^{BA}	20,41 $\pm$ 0,39 ^{BB}
C:G (25:75)	23,74 $\pm$ 1,15 ^{BA}	22,09 $\pm$ 1,03 ^{BA}
GELATINA	35,49 $\pm$ 1,78 ^{AA}	36,55 $\pm$ 1,84 ^{AA}

* Média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Médias para o mesmo parâmetro na mesma coluna (^{a-d}) ou na mesma linha (^{A,B}) com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0.05).

As caseínas e os caseinatos são geralmente classificados como proteínas não ordenadas, isto é, proteínas que contém pouca estrutura “ α -helicoidal” e “ β -sheet”. Por exemplo, uma solução aquosa de caseinato de sódio contém aproximadamente 63% de estruturas não ordenadas (conformações aleatórias ou de giro) (SIEW et al., 1999). Conseqüentemente, os filmes obtidos a partir desta proteína terão uma rede pouco organizada. A gelatina, também possui uma estrutura pouco ordenada; mas, ao contrário da caseína, ela renatura no processo de gelificação (ACHET e HE, 1995; ZIEGLER e FOEGEDING, 1990). Isto é, ela volta a adquirir parte da estrutura tripla hélice do colágeno (proteína altamente organizada). Conseqüentemente, os filmes de gelatina terão uma rede mais organizada quando comparado aos filmes de caseína. Segundo SIEW et al (1999) o aumento na organização da cadeia provavelmente otimiza o empacotamento molecular resultando em filmes com propriedades mecânicas e de barreira desejáveis. Na mistura caseína-gelatina, a primeira proteína estaria atrapalhando a renaturação da gelatina, conduzindo a valores baixos de resistência à tração.

Por outro lado, verifica-se que a resistência à tração dos filmes mistos foi dependente da concentração de gelatina e caseína presente na mistura (Tabela 12). Assim, a resistência à tração aumentou à medida que se diminuiu a concentração de caseína e se aumentou a concentração de gelatina. Os resultados apresentaram uma tendência linear com um R^2 de 0,92 (Anexo 7).

Em relação ao tratamento enzimático, pode-se verificar que a introdução de ligações cruzadas não provocou diferenças significativas nos valores de resistência à tração dos filmes em relação aos filmes sem transglutaminase. Resultados similares foram encontrados por CARVALHO e GROSSO (2004) para filmes de gelatina tipo B, elaborados no pH natural da solução (5,6). Já MOTOKI et al. (1987b) e YOSHIDA (2002) observaram, para filmes a base de α s1-caseína e proteínas do soro de leite, aumento da resistência à tração nos filmes modificados enzimaticamente em relação a filmes sem tratamento. Segundo os autores, este aumento estaria relacionado com a formação de redes mais estáveis, produto da introdução de ligações cruzadas pela transglutaminase.

b) Elongação

Na Tabela 13 verifica-se que a adição de transglutaminase promoveu maior elasticidade nos filmes protéicos, com valores duas vezes maiores em relação aos filmes sem adição da enzima. Resultados similares foram encontrados por YOSHIDA (2002) para filmes a base das proteínas do soro de leite e por LIM et al. (1999) para filmes de gelatina tipo A. Entretanto, CARVALHO e GROSSO (2004) não verificaram aumento da elasticidade dos filmes de gelatina Tipo B tratados com transglutaminase em relação aos filmes sem tratamento. O aumento da elasticidade indica a necessidade de uma maior energia para romper os filmes, confirmando a formação de uma matriz com ligações de maior energia (ligações covalentes).

Tabela 13. Porcentagem de elongação dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase (23°C, 50% UR)

FILMES	ELONGAÇÃO (%) [*]	
	Sem Tgase	Com Tgase
CASEÍNA	9,03 ± 1,76 ^{bA}	17,97 ± 2,82 ^{cB}
C:G (75:25)	27,23 ± 1,74 ^{aA}	56,79 ± 3,28 ^{aB}
C:G (50:50)	27,08 ± 0,63 ^{aA}	32,57 ± 1,34 ^{bB}
C:G (25:75)	23,17 ± 0,87 ^{aA}	32,94 ± 1,94 ^{bB}
GELATINA	9,72 ± 2,28 ^{bA}	15,33 ± 1,46 ^{cA}

* Média ± desvio padrão de triplicatas. Médias para o mesmo parâmetro na mesma coluna (^{a-d}) ou na mesma linha (^{A,B}) com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0.05).

Independente da modificação enzimática pode-se observar que filmes a base das misturas de caseína e gelatina apresentaram elongações superiores às das proteínas homólogas, as quais, tiveram elasticidade semelhante. Segundo HOWELL (1995) as interações de proteínas com outras proteínas conduzem a três principais fenômenos: (a) interações sinérgicas, (b) precipitação e (c) separação de fases. As interações sinérgicas podem ser definidas como aquelas interações que resultam em um efeito que seja maior do que aquele produzido por cada proteína isolada. No presente trabalho, o efeito manifestou-se em uma elongação maior para as misturas caseína-gelatina.

Por outro lado, a formação de conjugados heterólogos pela transglutaminase pode ser confirmada indiretamente através de mudanças resultantes na funcionalidade

(HAN e DAMODARAN, 1996). A introdução de ligações cruzadas nas misturas de caseína e gelatina resultou em um aumento significativo da elongação, o qual foi ainda maior quando a mistura foi composta de 75% de caseína e 25% de gelatina. Isto indicaria que conjugados, dímeros heterólogos, foram formados na presença de transglutaminase. A formação de conjugados de caseína e gelatina foi também verificada, através da solubilidade, por NONAKA et al (1997). Os autores verificaram um aumento na solubilidade, ao redor do ponto isoelétrico, para as misturas de gelatina e caseína. O incremento foi ainda mais acentuado quando as misturas foram tratadas com transglutaminase.

O aumento acentuado na elongação para a mistura composta de 75% de caseína e 25% de gelatina indicaria que, a disposição das cadeias polipeptídicas nesta mistura seria a mais favorável para a ação da transglutaminase, quando comparado às outras misturas, nas condições testadas. Resultados similares foram encontrados por OH et al. (2004) para filmes de caseína e zeína hidrolisada tratados com transglutaminase. Os autores reportaram um aumento de aproximadamente 41% na elongação do filme tratado com transglutaminase, em relação ao filme sem tratamento. Quando o filme foi preparado a partir somente de caseína, não foi observado um aumento significativo da elongação em função da introdução de ligações cruzadas, indicando que a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de caseína foi melhorada pela presença de zeína hidrolisada. Assim, a mistura de duas proteínas poderia ser favorável à ação da transglutaminase em função da nova conformação estrutural protéica adquirida.

Os resultados indicam que a gelatina e a caseína são proteínas compatíveis que podem formar dímeros heterólogos e que possuem habilidade para sobrepor-se uma a outra ao centro ativo da enzima.

c) Módulo de elasticidade

A ação da transglutaminase é confirmada através dos resultados da Tabela 14, onde se pode verificar que a introdução de ligações cruzadas resultou em uma diminuição significativa do módulo de elasticidade dos filmes tratados com transglutaminase em relação aos filmes sem tratamento. O módulo de elasticidade, conhecido também como módulo de Young, é a razão da tensão com a deformação na parte linear inicial da curva de tensão-deformação, sendo comumente considerada

uma medida da rigidez do filme. Em geral, observa-se que quando a elongação aumenta, o módulo de elasticidade diminui.

Tabela 14. Módulo de elasticidade dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase

FILMES	MÓDULO DE ELASTICIDADE (Mpa)*	
	Sem Tgase	Com Tgase
CASEÍNA	6,58 ± 0,43 ^{bA}	5,43 ± 0,33 ^{bB}
C:G (75:25)	6,38 ± 0,15 ^{bA}	4,32 ± 0,05 ^{cB}
C:G (50:50)	7,51 ± 0,23 ^{bA}	5,63 ± 0,38 ^{bB}
C:G (25:75)	7,11 ± 0,50 ^{bA}	5,46 ± 0,56 ^{bcB}
GELATINA	11,95 ± 1,05 ^{aA}	11,56 ± 0,66 ^{aA}

* Média ± desvio padrão de triplicatas. Médias para o mesmo parâmetro na mesma coluna (^{a-d}) ou na mesma linha (^{A,B}) com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0.05).

Dependendo da aplicação, altos valores de elongação seriam desejáveis, se, os filmes fossem utilizados como embalagens. Por exemplo, filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de alta densidade apresentam valores de elongação de 500 e 300% respectivamente (SALAME, 1986), os quais são superiores aos dos filmes protéicos (SIEW et al., 1999). Assim, o tratamento com transglutaminase, em alguns casos, dependendo da proteína, pode ser utilizado para aumentar a elongação dos filmes.

4.3.1.4. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água podem ser analisados na Tabela 15. Independente do tratamento enzimático verifica-se que a gelatina possui o menor valor de PVA. Para os filmes desta proteína, foram observados altos valores de resistência à tração e rigidez (Tabela 13 e 14). Como mencionado anteriormente, isto estaria relacionado com o nível de ordem na rede protéica. Filmes de caseína apresentam menor ordem na matriz polimérica, entanto que, filmes a base de gelatina apresentam maior ordem e conseqüentemente maior empacotamento. Segundo CHEN (1995) cadeias poliméricas lineares simples (p.e. polímeros sintéticos) podem ser empacotadas firmemente, mas moléculas com cadeias volumosas (p.e. proteínas) são empacotadas frouxamente e tem permeabilidades superiores (CHEN, 1995). Segundo

MCHUGH e KROCHTA (1994) a estrutura do polímero afeta significativamente a propriedade de transferência ao vapor de água.

Tabela 15. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de caseína e gelatina tratados com e sem transglutaminase

FILMES	PVA (g.mm/m ² .d.kPa)	
	Sem Tgase	Com Tgase
CASEÍNA	6,17 ± 0,28 ^{bA}	7,52 ± 0,49 ^{aB}
C:G (75:25)	7,17 ± 0,46 ^{aA}	5,06 ± 0,31 ^{bB}
C:G (50:50)	6,09 ± 0,48 ^{bA}	7,16 ± 0,40 ^{aB}
C:G (25:75)	6,18 ± 0,19 ^{bA}	6,51 ± 0,40 ^{aA}
GELATINA	4,79 ± 0,20 ^{cA}	6,06 ± 0,69 ^{Bb}

* Média ± desvio padrão de triplicatas. Médias para o mesmo parâmetro na mesma coluna (^{a-d}) ou na mesma linha (^{A,B}) com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0.05).

A introdução de ligações cruzadas provocou diferenças significativas nos valores de PVA dos filmes de gelatina, caseína e suas misturas, exceto para a mistura contendo 25% de caseína e 75% de gelatina. Em geral, a PVA dos filmes aumentou em função do tratamento enzimático. Este aumento seria explicado pela formação de um maior número ou tamanho de poros durante a reação cruzada, ou seja, a orientação das moléculas de proteína formou poros adicionais ou aumentou o tamanho dos poros já existentes. No caso da gelatina, o aumento do grau de ligações cruzadas, estaria dificultando a formação de zonas de junção, características da formação da matriz polimérica (BABIN e DICKINSON, 2001). Segundo KAMPER e FENNEMA (1984) a permeabilidade ao vapor de água varia bastante com a composição e orientação das moléculas.

Resultados similares foram encontrados por YILDIRIM e HETTIRACHCHY (1998) para filmes a base de isolado protéico de soro de leite, tratados com transglutaminase. LI e CHEN (1999), CARVALHO e GROSSO (2004) e YOSHIDA (2002) observaram uma tendência contrária, para filmes a base de proteína de soro de leite e gelatina respectivamente. Para CARVALHO e GROSSO (2004) a introdução de ligações cruzadas pode ter levado a uma configuração intermediária, onde a cadeia polimérica apresentou-se na forma ordenada, com estrutura poli (L-prolina) ao longo da cadeia e com uma pequena proporção de estruturas características do colágeno. Segundo CARVALHO e GROSSO (2004), esta conformação parece favorecer a propriedade de

barreira. Por outro lado, para YOSHIDA (2002) as ligações cruzadas reduziram o volume livre e a difusividade do permeante através da matriz e conseqüentemente a permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

Embora a PVA da maioria dos filmes tenha aumentado, efeito contrário foi observado para o filme que apresentou a mais alta porcentagem de alongação (Figura 17). Para esta mistura, em particular, verificou-se uma diminuição significativa da PVA. Como mencionado anteriormente, esta mistura estaria favorecendo a ação da transglutaminase. O processo de formação da rede protéica, nesta mistura, seria diferente aos das outras formulações.

Se diferentes conjugados foram formados, como verificado através do aumento significativo da alongação dos filmes a partir das misturas de caseína e gelatina, então, poder-se-ia esperar diferentes comportamentos na permeabilidade ao vapor de água das misturas.

A formação de ligações cruzadas pode reduzir ou aumentar a mobilidade segmental do polímero de proteína. Assim, a permeabilidade pode ser aumentada ou diminuída. Isto dependerá de fatores tais como: o tipo de estrutura protéica e da seqüência de aminoácidos, a disponibilidade e a disposição estrutural dos aminoácidos lisina e glutamina, e a compatibilidade termodinâmica do substrato protéico ao local ativo da enzima.

4.3.1.5. Morfologia dos filmes

As micrografias eletrônicas de varredura, da seção transversal dos filmes, são mostradas nas Figuras 17 e 18. Os filmes de caseína e gelatina apresentaram estruturas diferentes que poderiam explicar a diferença observada nos valores de tensão na ruptura, módulo de elasticidade e PVA encontrados para estes filmes. A caseína, proteína pouco organizada, produziu filmes com estrutura lisa (Figura 17a), enquanto que o filme de gelatina (Figura 17b) apresentou uma estrutura na forma de fibras (estrutura característica dos colágenos fibrilares), a qual, parece ser responsável pela alta resistência à tração, alta elasticidade e baixa permeabilidade ao vapor de água destes filmes.

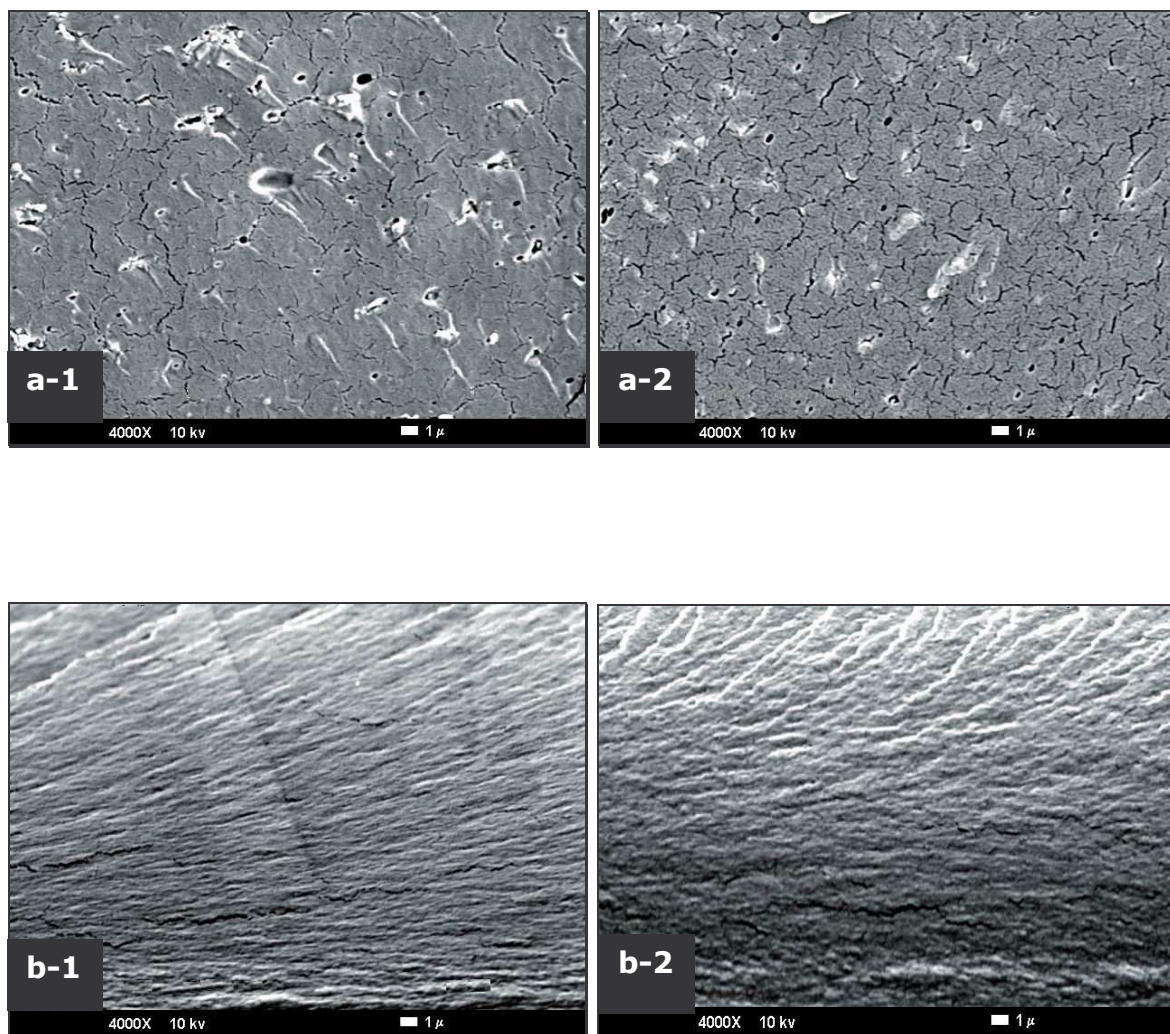


Figura 17. Imagens da seção transversal dos filmes de caseína [a] e gelatina [b], nativas [-1] e modificadas com transglutaminase [-2], obtidas por microscopia eletrônica de varredura (X4000).

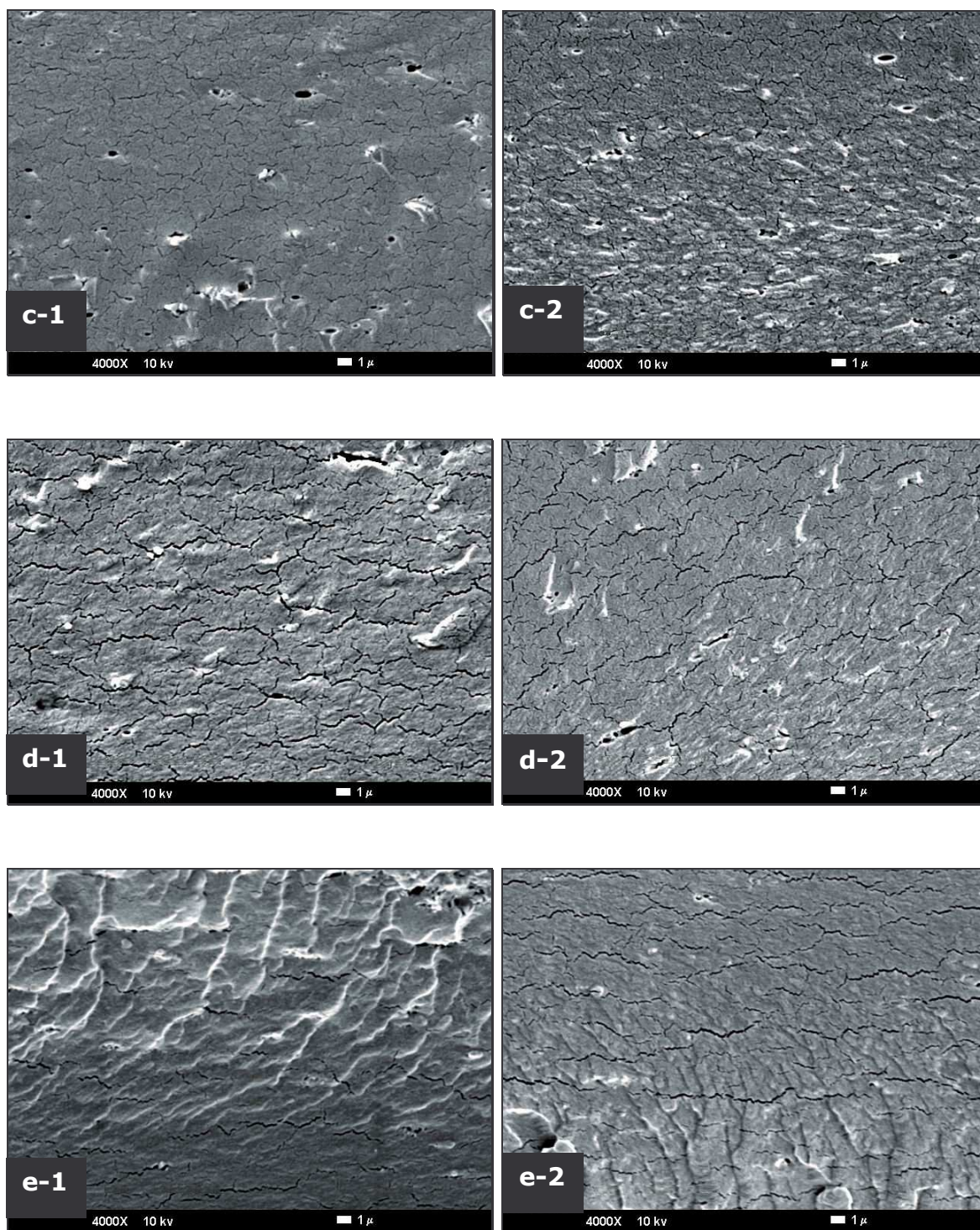


Figura 18. Imagens da seção transversal dos filmes de caseína:gelatina(*), nativos [-1] e modificados com transglutaminase [-2], obtidos por microscopia eletrônica de varredura (X4000). (*) 75:25 [c]; 50:50 [d]; 25:75 [e].

Na formação das fibras do colágeno, as moléculas de tropocolágeno se organizam em arranjos lineares formando filamentos longos (microfibrilas de colágeno) que por sua vez se arranjam em fibras e as fibras em grandes feixes (Figura 19). O tropocolágeno está composto por 3 cadeias polipeptídicas alfa entrelaçadas uma em torno da outra, formando super-hélice estabilizada por ligações hidrogênio. Só as regiões N- e C-terminais muito curtas, denominadas telopeptídeos, não formam a super hélice. Na molécula de tropocolágeno e nas microfibrilas de colágeno também estão presentes ligações cruzadas intra- e inter-moleculares que envolvem principalmente resíduos de lisina e hidroxilisina e aldeídos derivados deles, e estão principalmente localizadas nas regiões telopeptídeas (XIONG, 1997; STRYER, 1996; POPPE, 1997).

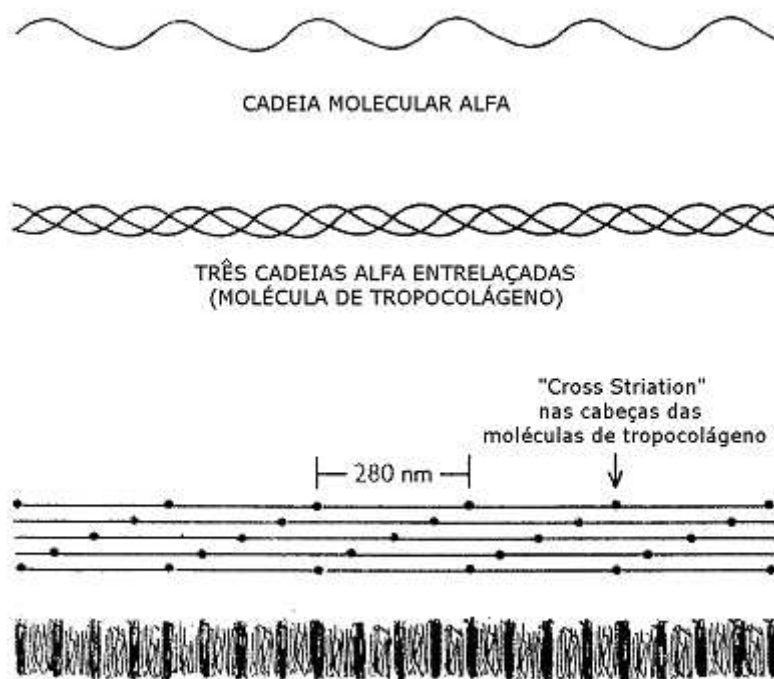


Figura 19. Formação das fibras do colágeno

Quando a gelatina é misturada com a caseína ela perde sua estrutura característica (Figura 18). Isto também explica a redução da tensão na ruptura dos filmes mistos. Contudo, ainda pode ser observada uma leve orientação na estrutura do filme contendo maior proporção de gelatina (Figura 18c).

A compatibilidade do glicerol, utilizado como plastificante, com as proteínas também pode ser observada nas imagens dos filmes. O filme de caseína apresentou fissuras e espaços vazios visíveis, que parecem ser regiões em que haveria glicerol livre. Isto está relacionado com a separação de fase do plastificante na matriz polimérica que geralmente ocorre durante o decorrer do processo de secagem do filme quando o plastificante não é compatível com o polímero utilizado. A quase ausência de fissuras no filme de gelatina, por sua vez, indicaria uma boa compatibilidade do plastificante com a gelatina. Nos filmes elaborados a partir das misturas a presença de fissuras e espaços vazios diminui conforme a proporção de gelatina aumenta na mistura (Figura 18).

Os filmes tratados com transglutaminases exibiram poucas diferenças morfológicas quando comparadas com os filmes elaborados a partir das proteínas nativas. Comparando-se a estrutura do filme de gelatina modificado enzimaticamente com a estrutura interna do filme de gelatina nativo, verificou-se uma leve perda da orientação fibrilar em função da formação de um emaranhado. A perda, pouca extensiva, desta estrutura parece ser responsável pelo aumento da PVA destes filmes. Contudo, a tensão na ruptura deste filme não foi modificada e continua sendo maior que aquela obtida para o filme de caseína e as misturas modificadas enzimaticamente com transglutaminase. Se a alta tensão na ruptura é resultado de uma estrutura fibrilar, então a perda desta estrutura deveria conduzir a filmes com baixos valores de tensão. Embora parte da estrutura fibrilar tenha sido perdida, os resultados mostram que a introdução de ligações cruzadas estaria compensando a possível diminuição da tensão. Segundo AMAYA-FARFAN (1990) o grau de ligações cruzadas é um dos fatores que determina a rigidez do colágeno.

Assim, não só uma orientação organizada das moléculas protéicas é necessária para obter altos valores de tensão na ruptura como também a presença de ligações fortes que estabilizem a rede protéica.

Nas misturas, o tratamento enzimático não provocou mudanças visíveis na estrutura do filme. Contudo, comparando o filme da mistura caseína:gelatina (75:25) (Figura 18c-1) modificada enzimaticamente com transglutaminase com a estrutura do filme sem modificação, verificou-se a presença pontos brancos homoganeamente distribuídos no filme, os quais estão presentes somente em algumas regiões do filme

sem modificação. Estes pontos são observados em todos os filmes elaborados com e sem transglutaminase, menos no filme de gelatina. Assim, pode ser que os pontos brancos sejam moléculas de hidróxido de sódio utilizado na etapa de solubilização da caseína.

Para o filme da mistura caseína:gelatina (75:25) foi observada uma diminuição da PVA em função do tratamento com transglutaminase. A PVA atingida foi próxima àquela obtida para o filme de gelatina. Assim, não se pode afirmar conclusivamente que baixos valores de PVA são resultado de matrizes com orientação definida. Outros fatores como hidrofobicidade da proteína também devem ser considerados.

4.3.1.6. Perfil eletroforético dos filmes

Os produtos da reação da caseína e gelatina foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS para detectar a presença de polímeros formados pelas ligações cruzadas intermoleculares catalisadas pela transglutaminase. Uma vez que a mistura da reação incluía 2-mercaptoetanol, os polímeros detectados não poderiam ter sido formados por ligações dissulfídicas.

Verificou-se que as amostras tratadas com transglutaminase resultaram na formação de agregados poliméricos de alta massa molecular que não conseguiram entrar no gel de empacotamento (Figura 21). Isto foi acompanhado por uma diminuição na intensidade das bandas para as frações protéicas não polimerizadas. Por outro lado, produtos não polimerizados foram observados nas amostras de proteína sem tratamento com transglutaminase (Figura 20).

Através dos perfis eletroforéticos obtidos no estudo, podem-se confirmar os resultados da caracterização dos filmes protéicos, onde a presença da enzima provocou a formação de um maior número de ligações intermoleculares entre as proteínas e a produção de filmes com propriedades mecânicas e de barreira diferentes aos das proteínas originais.

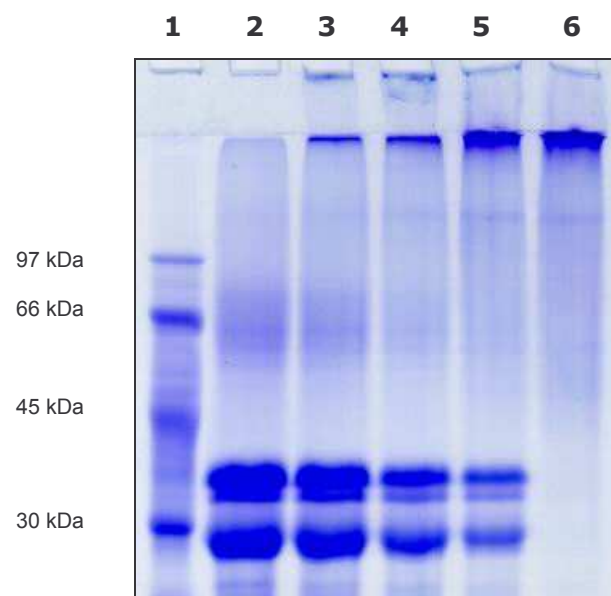


Figura 20. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de filmes de caseína e gelatina sem tratamento enzimático.

Coluna 1 – padrão de massa molecular; Coluna 2 – Caseína; Coluna 3 – Caseína:Gelatina (75:25); Coluna 4 – Caseína:Gelatina (50:50); Coluna 5 – Caseína:Gelatina (25:75); Coluna 6 – Gelatina.

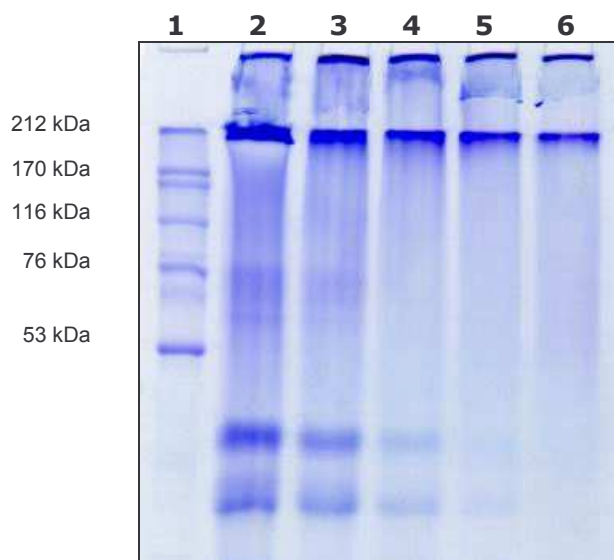


Figura 21. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de filmes de caseína e gelatina tratados com transglutaminase.

Coluna 1 – padrão de massa molecular; Coluna 2 – Caseína; Coluna 3 – Caseína:Gelatina (75:25); Coluna 4 – Caseína:Gelatina (50:50); Coluna 5 – Caseína:Gelatina (25:75); Coluna 6 – Gelatina.

4.3.2. Formação de filmes a partir dos hidrolisados

Os resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17 correspondem aos ensaios preliminares de formação de filmes com e sem transglutaminase. As análises realizadas foram “visuais” e “táteis”.

Tabela 16. Formação de filmes a partir dos hidrolisados

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>CaH</i>	<i>GeH</i>
25	-	-
85	+	-

⁺ O filme foi formado

Como pode observar-se na Tabela 16 os hidrolisados de gelatina não formaram filmes, em qualquer das temperaturas testadas, mesmo na presença de transglutaminase. Ao contrário, observou-se a formação de uma estrutura muito pegajosa e aderente ao suporte de acrílico. Já a caseína hidrolisada formou filmes, à temperatura de 85°C, com pouca flexibilidade (geralmente ocorria fraturas durante o desprendimento do suporte) e com presença de partículas brancas visíveis. Depois do período de acondicionamento, estes filmes começaram a se tornar pegajosos dificultando seu manuseio.

Numa segunda etapa utilizando uma temperatura de 85°C, foram preparadas soluções filmogênicas a partir dos hidrolisados de caseína e gelatina tratados com transglutaminase. A Tabela 17 apresenta os tratamentos que formaram filmes. Novamente os filmes apresentaram as mesmas características visuais e táteis mencionadas anteriormente. No intuito de melhorar a coesão dos filmes de caseína e da mistura caseína:gelatina (75:25) foram testadas concentrações maiores de proteína (12,5 - 15%) obtendo-se os mesmos resultados. Os filmes controle, isto é, os filmes produzidos a partir dos hidrolisados sem tratamento com transglutaminase apresentaram resultados similares aos filmes tratados com transglutaminase.

Os resultados obtidos nesta etapa indicam que os hidrolisados trípticos de gelatina e caseína não foram capazes de formar superfícies contínuas fortemente ligadas, mesmo na presença de transglutaminase. De fato, as interações na rede protéica entre as cadeias mais curtas dos hidrolisados seriam mais fracas quando comparadas àquelas formadas pelas cadeias mais longas das proteínas sem hidrolisar.

Segundo GUILBERT (1986) somente polímeros de alto peso molecular possuem força de coesão e capacidade de aglutinação suficientes para a formação de estruturas filmogênicas. Por outro lado, o aumento da carga efetiva nos hidrolisados, devido à quebra de ligações peptídicas, pode resultar em um aumento da repulsão entre os peptídeos, diminuindo sua habilidade em formar filmes.

Tabela 17. Formação de filmes a partir dos hidrolisados tratados com transglutaminase.

<i>Caseína (%)</i>	<i>Gelatina (%)</i>	<i>Formação de filme</i>
100	0	+
75	25	+
50	50	-
25	75	-
0	100	-

⁺ O filme foi formado

SOTHORNVIT e KROCHTA (2000a,b) observaram que os filmes elaborados a partir de hidrolisados de soro de leite foram mais flexíveis e fracos e tiveram menores valores de alongação do que os filmes de soro de leite sem hidrolisar. Por outro lado, as propriedades de barreira, permeabilidade à água e ao oxigênio, dos filmes dos hidrolisados foram similares aos filmes da proteína nativa.

CARLOS (1997) estudou a influência da hidrólise com tripsina e pepsina (GH = 7,78 e 2,72 %) na formação de géis de soro de leite. O autor observou que a formação de gel pelos hidrolisados trípticos não ocorreu em nenhuma das concentrações testadas. Já a pepsina produziu um hidrolisado que formou gel desde a concentração mais baixa. TAKEITI (2002) observou que a hidrólise com α -quimiotripsina do isolado protéico de soja (IPS) promoveu a formação de géis frágeis e com menor dureza em relação aos obtidos a partir do IPS. Segundo PANYAM e KILARA (1996), a hidrólise é presumivelmente prejudicial às propriedades gelificantes das proteínas; mas, dependendo da protease utilizada, a hidrólise pode causar uma melhora nesta propriedade. Por exemplo, as características do gel de albumina de ovo têm sido melhoradas por uma proteólise limitada usando pepsina em pH 4,0 (KITABATAKE e DOI, 1993). Por outro lado, a hidrólise tríptica das proteínas do soro de leite (GH de 2,3 e 6,7%) impediu a gelificação em pH 3,0 e 7,0; enquanto que, a

hidrólise com a protease de *Bacillus Subtilis* incrementou dramaticamente a habilidade gelificante e a força do gel em pH neutro (JU et al., 1995).

Segundo MAHMOUD (1994) a hidrólise é considerada prejudicial para as propriedades gelificantes, em função da reduzida hidrofobicidade do hidrolisado. Este efeito dependerá do tipo de enzima proteolítica e do grau de hidrólise. Por exemplo, a hidrólise das proteínas com tripsina resulta na formação de fragmentos peptídicos hidrofílicos; enquanto que, a pepsina, produz peptídeos hidrofóbicos (Tabela 4). Segundo MORR (1993) as reações de gelatinização requerem um balanço próprio entre forças de repulsão e atração entre as moléculas de proteína e a água e entre as moléculas de proteínas.

Na produção de filmes, uma matriz contínua e de alta coesão não só dependerá do tamanho da cadeia protéica como também do número de interações entre as cadeias de proteína. Desta forma, a formação de filmes a partir de hidrolisados protéicos seria possível levando-se em conta fatores como: tipo de enzima proteolítica, grau de hidrólise e presença de substâncias que podem afetar o balanço de cargas.

Por outro lado, conseguindo-se uma polimerização extensiva dos hidrolisados de gelatina e caseína através da reação com transglutaminase, seria possível elaborar filmes com propriedades desejáveis. Adicionalmente, os hidrolisados com e sem transglutaminase poderiam exibir características desejáveis em outras propriedades funcionais.

5. CONCLUSÕES

Os hidrolisados trípticos de caseína e gelatina, quando comparados às proteínas nativas, apresentaram as seguintes características: teores de cinza elevados, concentração de proteína diminuída e solubilidade incrementada na faixa de pH 3,0 a 8,0.

O tratamento dos hidrolisados trípticos de caseína e gelatina, com transglutaminase, não conduziu à formação de polímeros de alta massa molecular nas condições testadas.

Os filmes elaborados a partir das proteínas hidrolisadas com tripsina e polimerizadas com transglutaminase não foram capazes de formar filmes coesos.

Os filmes elaborados a partir de gelatina e caseína, na ausência e presença de transglutaminase, apresentaram-se manuseáveis e visivelmente homogêneos. A introdução de ligações cruzadas promoveu a formação de filmes com propriedades mecânicas e de barreira diferentes das proteínas originais.

O tratamento da amostra composta de 75% de caseína e 25% de gelatina, com transglutaminase, resultou em um aumento significativo na elongação e uma diminuição significativa na permeabilidade dos filmes ao vapor de água em relação aos filmes sem tratamento.

As micrografias eletrônicas de varredura da seção transversal dos filmes indicaram que: (1) a estrutura do filme de gelatina foi diferente da estrutura do filme de caseína, o primeiro apresentou uma estrutura na forma de fibras e o segundo uma estrutura lisa; (2) a estrutura fibrilar da gelatina não foi modificada extensivamente em função da introdução de ligações cruzadas, contudo, ela foi perdida na sua totalidade em função da introdução da caseína e (3) houve pouca compatibilidade entre o plastificante e a caseína.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação da influência de diferentes métodos de obtenção de hidrolisados, na polimerização com transglutaminase, e posterior obtenção de conjugados heterólogos com diferentes níveis de modificação enzimática e possível estudo das propriedades funcionais dos conjugados.

Desenvolvimento de filmes de caseína, com diferentes graus de desnaturação, tratados com transglutaminase; caracterização dos filmes quanto às suas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água.

Estudo da introdução de ligações cruzadas, da incorporação de lipídios e do tipo de plastificante na elaboração de filmes protéicos.

Avaliação do comportamento reológico e das mudanças conformacionais dos componentes das soluções filmogênicas modificadas enzimaticamente com transglutaminase e o estabelecimento de sua relação com as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHET, D.; HE, X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. **Polymer**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 787-791, 1995.

ALDER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, 1979.

ALDER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publisher, 1986. 427p.

AMARANTE, C.; BANKS, N.H. Postharvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. In: JANICK, J. (Ed.) **Horticultural Reviews**, New York: John Wiley e Sons, Inc., 2001. Vol. 26, p. 161-238.

AMAYA-FARFAN, J. **Química de proteínas: aplicado a ciencia e tecnologia dos alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. 134p.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

AOAC **Association of Official Analytical Chemists Official methods of analysis**. Washington, 16th ed., 1997.

ARVANITOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2-3, p. 105-119, 1998.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designation: E96-00e1. In: **Annual Book of American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2002a.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation: D882-02. In: **Annual Book of American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2002b.

BABIKER, E. E.; KHAN, M. A.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties. **Food Research International**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 627-634, 1996a.

BABIKER, E. E.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 12, p. 3746-3750, 1996b.

BABIKER, E. E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin -digested soy protein. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 70, p. 139-145, 2000.

BABIN, H. ; DICKINSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 15, n. 3-4, p. 271-276, 2001.

BANERJEE, R.; CHEN, H. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 8, p. 1673-1683, 1995.

BARRETO, P.L.; ROEDER, J.; CRESPO, J.S.; MACIEL, G.R.; TERENCE, H.L.; PIRES, A.T. ; SOLDI, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 82, p. 425-431, 2003.

BECHTOLD, U.; OTTERBACH, J.T.; PASTERNAK, R. ; FUCHSBAUER, H.L. Enzymic preparation of protein γ -peroxidase conjugates catalysed by transglutaminase. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 127, n. 2, p. 239-245, 2000.

BERTAN, L.C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. **Tese de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003. 157p.

BERTAN, L.C.; TANADA-PALMU, P.S.; SIANI, A.C.; GROSSO, C.R.F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, available online 2 June 2004 (in press).

BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (Ed.) **Proteolytic enzymes**: A practical approach. Oxford: Oxford University, 1989. 259p.

BORDERIAS, A.J.; MONTERO, P. Principles of the functionality of proteins in foods. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 28, n. 2, p. 159-169, 1988.

BROOKHART, P.P.; MCMAHON, P.L.; TAKASHI, M. Purification of guinea pig liver transglutaminase using a phenylalanine-sepharose 4B affinity column. **Analytical Biochemistry**, v. 128, n. 1, p. 202-205, 1983.

CANDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*): Composição, propriedades nutritivas e funcionais. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1998, 207p.

CARLOS, M.R.E. Avaliação das propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas de soro de leite. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1997. 81p.

CARVALHO, R.A.P. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1997. 128p.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CHICK, J.; USTUNOL, Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 6, 1998.

CHOBERT, J.-M.; SITOHY, M.Z.; WHITAKER, J.R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 1, p. 220-224, 1988a.

CHOBERT, J.-M.; BERTRAND-HARB, C.; NICOLAS, M.-G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 883-892, 1988b.

COCKRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental Designs**. 2ed. New York: John Wiley, 1957. 611p.

CREAMER, L.K. Casein Nomenclature, structure and association properties. In: ROGINSKI, H; FULQUAY, J.W.; FOX, P.F. (Ed.) **Encyclopedia of Dairy Sciences: Milk Proteins**. New York: Academic Press, 2002. Vol. 3, p. 1895-1902.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 75, n. 1, p. 1-9, 1998.

DAMODARAM, S. Aminoacids, peptides and proteins. In: FENEMA, O. (Ed.) **Food Chemistry**. 3ra. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap. 6, p. 321-429.

DAS, K.P.; KINSELLA, J.E. Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. **Advances in Food and Nutrition Research.**, Lincoln, v. 34, p. 81-129, 1990.

DE JONG, G.A.H.; KOPPELMAN, S.J. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, 2002.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.-A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 10, p. 334-339, 1997.

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; SHIYING, X. Gelatin: A valuable protein for food and Pharmaceutical Industries: Review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.

DONHOWE, I.G.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J.M., BALDWIN, E.A., NISPEROS-CARRIERO, M. (Ed.) **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1994. Cap. 1, p 1-24.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F.J.; GERMAN, J.B; KROCHTA, J.M. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n.2, p. 438-443, 1996.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, n. 8, p. 715-723, 1998.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.42, p. 263–273, 1993.

FLANAGAN, M. Mechanical and rheological testing. In: HUNT, B. J. ; JAMES, M. I. (Ed.) **Polymer characterization**. UK: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 261-296.

FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R.J. Functionality of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, n. 9, p. 737-748, 2002a.

FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R.J. Physicochemical and nitrogen solubility properties of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 19, p. 5429-5436, 2002b.

FLORY, P.J. **Principles of Polymer Chemistry**, 13th ed. New York: Cornell University Press, 1986. 555p.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie academic and professional, 1998. 478p.

FROKJAER, S. Use of hydrolysate for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coating and films based on proteins. In: KROCHTA J.M., BALDWIN E. A.; NISPEROS-CARRIEDO M. O (Ed.) **Edible Coatings and to Improve Food Quality**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1994. Cap. 9, p. 210-278.

GENNADIOS, A.; WELLER, L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 10, p. 63-69, 1990.

GERBER, U.; JUCKNISCHKE, U.; PUTZIEN, S.; FUCHSBAUER, H.L. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Biochemical Journal**, London, v. 299, n. 3, p. 825-829, 1994.

GERRARD, J.A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 12, p. 391-399, 2002.

GIESE, J. Proteins as ingredients: Types, functions and applications (Special Report). **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 50-60, 1994.

GHORPADE, V.M.; LI, H.; GENNADIOS, A.; HANNA, M.A. Chemically modified soy protein films. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Michigan, v. 38, n. 6, p. 1805-1808, 1995.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M.D.; ULMO, N.; LIZARBE, M.A.; MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 25-34, 2002.

GUEGUEN, J.; VIROBEN, G.; NOIREAUX, P.; SUBIRADE, M. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 7, n. 2-3, p. 149-157, 1998.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective film. In: MATHLOUTHI, M. (Ed.) **Food Packaging and Preservation**. Essex: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. Cap. 19, p.371-394.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, n. 1-2, p. 10-17, 1996.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 6-7, p. 741-751, 1997.

HAN, X.Q.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1211-1217, 1996.

HOWELL, N.K. Synergism and interactions in mixed protein systems. In: HARDING, S.E.; HILL, S.E.; MITCHELL, J.R. (Ed.) **Biopolymer Mixtures**. Nottingham: Nottingham University Press, 1995. Cap. 16, p. 329-347.

JACOBUCCI, H.B. Características nutricionais e efeito sobre lipídios sanguíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados a caseína e proteína de soja, comerciais. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1999. 82p.

JOHNSTON-BANKS, F.A. Gelatin. In: HARRIS, P. (Ed.) **Food Gels**. London, Elsevier Applied Science, 1990. Cap. 7, p. 233-289.

JU, Z.Y.; OTTE, J.; MADSEN, J.S.; QUIST, K.B. Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 10, p. 2119-2128, 1995.

KAMPER, S.L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 1478-1481, 1984.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KILARA, A. Enzyme modified protein food ingredients. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 149-157, 1985.

KINSELLA, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 197-262, 1984.

KITABATAKE, N.; DOI, E. Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. **Food Review International**, n. 9, v. 4, 445-471, 1993.

KOELSCH, C. Edible water vapor barriers: properties and promise. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 76-81, 1994.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science**, Amsterdam, v.9, p. 307-319, 1998.

KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. **Nature**, vol., 227, p. 680, 1970

LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LEHNINGER, A.L. **Principios de Bioquímica**. 2da. Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LI, J.; CHEN, H. Transglutaminase catalyzed crosslinking on functional properties of whey protein-based edible films. In: **1999 IFT Annual Meeting**. 1999, Chicago (USA). IFT Annual Meeting Abstracts. Trabalho n. 79A-6.

LIM, L.T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4022-4029, 1998.

LIM, L.-T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase crosslinked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 4, p. 616-622, 1999.

LIU, M.; DAMODARAN, S. Effect of transglutaminase-catalysed polymerization of β -casein on its emulsifying properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1514-1519, 1999.

LORENZE, P.C.; SCHLIMME, E.; ROOS, N. Cross-linking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. **Nahrung/Food**, Weinheim, v. 42, n. 3-4, p. 151-154, 1998.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.

MAUER, L.J.; SMITH, D.E.; LABUZA, T.P. Water permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 10, n. 5-6, p. 353-358, 2000.

MARINIELLO, L.; DI PIERRO, P.; ESPOSITO, C.; SORRENTINO, A.; MASI, P.; PORTA, R. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 191-198, 2003.

MATSUMURA, Y.; CHANYONGVORAKUL, Y.; KUMAZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; MORI, T. Enhance susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. **Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1292, n. 1, p. 69-76, 1996.

MATSUMURA, Y.; LEE, D-S.; MORI, T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 49-59, 2000.

MCHUGH, T.H. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung**, Weinheim, v. 44, n. 3, p. 148-151, 2000.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Milk protein-based edible films and coatings. **Food Technology**, Chicago, vol 48, n. 1, p. 97-103, 1994.

MILLER, K.S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 8, p. 228-237, 1997.

MILLER, K.S.; CHIANG, M.T.; KROCHTA, J.M. Heat curing of whey protein films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, p. 1189-1193, 1997.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S. e MODLER, H. (Ed.) **Food Proteins**. New York: Wiley-VHC, 2000.

MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

MOTOKI, M.; NORIKI, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 561-566, 1983.

MOTOKI, M.; NIO, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 561-566, 1983.

MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Functional properties of heterologous polymer prepared by transglutaminase between milk casein and soybean globulin. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, p. 237-239, 1987a.

MOTOKI, M.; ASO, H.; SEGURO, K.; NIO, N. α s1-casein film prepared using transglutaminase. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 993-996, 1987b.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

NIELSEN, P.; OLSEN, H. Enzymic modification of food protein. In: WHITEHURST, R.; LAW, B. (Ed.) **Enzymes in Food Technology**. Boca Ratón: CRC Press, 2002. Cap. 6, p. 109-143.

NIELSEN, P.M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnology**, New York, v. 9, n. 3, p. 119-156, 1995.

NONAKA, M.; MATSUURA, Y.; NAKANO, K.; MOTOKI, M. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase with gelatin. **Food hydrocolloids**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p.347-349, 1997.

OH, J.-H.; WANG, B.; FIELD, P.D.; AGLAN, H.A. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysates cross-linked with transglutaminase. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 3, p. 287-294, 2004.

PALMU, P.S.T. Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis a base de glúten de trigo. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003. 244p.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science e Technology**, Amsterdam, vol. 7, n. 4, p. 120-125, 1996.

PARK, S.K.; RHEE, C.O.; BAE, D.H.; HETTIARACHCHY, N.S. Mechanical properties and water-vapor permeability of soy-protein films affected by calcium salts and glucono- δ -lactone. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2308-2312, 2000.

PB LEINER. **Aplicaciones de gelatina**. Disponível em: <http://www.gelatin.com/>. Acesso em 06/04/2004.

PHILLIPS, R.D.; BEUCHAT, L.R. **Protein functionality in foods**. ACS Symposium Series, Washington, 1981. 275.

POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 223p.

POPPE, J. Gelatin. In: IMESON, A. (Ed.) **Thickening and Gelling agents for Food**, 2da. Ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. Cap. 7, p. 144 –179.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

ROMAN, J.A. Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002. 163p.

SALAME, M. Barrier polymers. In: Bakker M. (Ed.) **The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology**, New York: John Wiley and Sons Inc., 1986.

SAKANAKA, L.S. Estudo das condições de armazenamento sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina reticulada. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002, 175p.

SCHÄGGER, H. e JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHORSCH, C.; CARRIE, H.; CLARK, A.; NORTON, I. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 10, n. 8, p. 519-528, 2000.

SIEW, D.C.; HEILMANN, C.; EASTEAL, A. J. e COONEY, R. P. Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3432-3440, 1999.

SILVESTRE, M.P.C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 263-271, 1997.

SINGH, H. Modification of food proteins by covalent crosslinking. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 2, p. 196-200, 1991.

SHIH, F.F. Edible Films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.73, n.3, p.406-409, 1996.

SLADE, L.; LEVINE, H. Polymer-chemical properties of gelatin in foods. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R.; BAILEY, A.J. (Ed.) **Advances in meat research**: Collagen as a food. New York: AVI Pub., 1987. Vol. 4, p. 251-266.

SMITH, S.; GEESON, J.; STOW, J. Production of modified atmospheres in deciduous fruits by the use of films and coatings. **Horticultural Science**, West Bengal, v. 22, p. 772-776, 1987.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M. Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3913-3916, 2000a.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 4, 2000b.

SOUTHWARD, C.R. Uses of casein and caseinates. In: FOX, P.F. (Ed.) **Developments in Dairy Chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1989. Vol. 4., Cap. 5, p. 173-244.

SOUTHWARD, C.R. Caseins, industrial production and compositional standards. In: ROGINSKI, H.; FULQAY, J.W.; FOX, P.F. (Ed.) **Encyclopedia of Dairy Sciences: Milk Proteins**. New York: Academic Press, 2002. Vol. 3, p. 1915-1924.

SOUZA, S.M.A. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001. 207p.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, G.; O'CUINN, G. e FITZGERALD, R.J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 447-453, 2003.

SPREER, E. **Milk and Dairy Product Technology**. New York: M. Dekker, 1998. 481p.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ta. Edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996. 1000p.

TAKASE, M.; FUKUWATARI, Y.; KAWASE, K.; KIYOSAWA, I.; OGASA, K.; SUZUKI, S.; KUROUME, T. Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 62, n. 10, p. 1570-1576, 1979.

TAKEITI, C.Y. Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002. 102p.

VOROB'EV, M.M.; DALGARRONDO, M.; CHOBERT, J-M.; HAERTLÉ, T. Kinetics of β -casein hydrolysis by wild-type and engineered trypsin. **Biopolymers**, Roboken, v. 54, p. 355-364, 2000.

WALSH, D.J.; CLEARY, E.; MACCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITZGERALD, R.J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 7, p. 677-683, 2003.

WHITAKER, J.R. The proteolytic enzymes. In: **Principles of enzymology for the food sciences**. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. Cap. 19, p. 469-498.

WILHELM, B.; MEINHARDT, A.; SEITZ, J. Transglutaminase: purification and activity assays. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 684, p. 163-177, 1996.

WOLFANG, G. **Enzymes in Industry**. New York: VHC Publisher, 1990. 321p.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: Mecanismo y teoría**. España: Editorial Acribia S.A., 1995. 476p.

WONG, D.W.S.; CAMIRAND, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and Functionalities of milk proteins. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

XIONG, Y.L. Structure-Function Relationships of muscle proteins. In: DAMODARAM, S.; PARAF, A. (Ed.) **Food Proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. Cap. 12, p. 341-392.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from Red Sea bream (*Pagrus major*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 11, p. 2041-2045, 1994.

YILDIRIM, M.; HETTIARACHCHY, N.S. Properties of films produced by crosslinking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, p. 248-252, 1998.

YOKOYAMA, K.; OHTSUKA, T.; KURAISHI, C.; ONO, K.; KITA, Y.; ARAKAWA, T.; EJIMA, D. Gelation of food protein induced by recombinant microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 48-51, 2003.

YOSHIDA, C.M.P. Aplicação de concentrado protéico de soro de leite bovino na elaboração de filmes comestíveis. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002. 227p.

ZIEGLER, C.R.; FOEGEDING, E.A. The gelation of Proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v. 34, p. 203-298, 1990.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase - a review of its productions and application in food processing. **Applied Microbiological Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 3-4, p. 277-282, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1. Especificações da gelatina**SOUTH AMERICA****240/30****PRODUTO** : Gelatina Alimentícia – Origem: Pele Bovina**DESCRIÇÃO** : É um produto proteico de coloração amarelo claro, obtido pela extração do colágeno parcialmente hidrolizado, derivado de tecido animal, com sabor e odor característicos.**ESPECIFICAÇÕES**

FÍSICO QUÍMICO	LIMITES	MÉTODOS	MICROBIOLÓGICO	LIMITES	MÉTODOS
Bloom 6,66%	230 – 250	GME/GMIA	Contagem Total	≤ 1000/gr	USP
Viscosidade 6,66%	33 – 42 mPs	BSI	Coliformes Fecais	Negative/10gr	AFNOR/APHA
Umidade	8,0 – 13,0 %	GME/GMIA	Salmonella sp	Negative/25gr	USP
Cinzas	≤ 2,0 %	FQ09/02/01	Sulfito Redutor	≤ 10/gr	AFNOR
pH (6,67%)	5,0 – 6,0	BSI/GMIA			
Peróxido de Hidrogênio	≤ 10 ppm	FQ28/01/04			
Arsênico	≤ 1,0 ppm	BS/FCC/AFNOR			
Metais Pesados	≤ 20 ppm	USP			
SO2 AFNOR	≤ 40 ppm	AFNOR			
Nitrogênio	≥ 15%	KJELDHAL			
Chumbo	≤ 1,5 ppm	Atomic Ab.			
Cromo	≤ 2 ppm	BSI			
Granulometria	30 Mesh	FQ13/01/03			

EMBALAGEM : As embalagens são individualmente identificadas por etiquetas, contendo de 20 a 25 Kg Liq, dependendo da granulometria. A mercadoria pode ser também embalada em big-bags, contendo de 0,5 a 1,0 t, sob consulta prévia.**ARMAZENAGEM** : Sob armazenamento em local fresco e seco, a gelatina mantém suas propriedades por um período de cinco anos.**APLICAÇÃO** : A gelatina pode ser usada em confeitos, sobremesas e produtos cárneos ou lácteos. Também, é adequada para indústria farmacêutica para encapsulação e drageamento. Outros usos podem ser aplicados sob consulta.**Data de Emissão:** 26/03/03 **Versão:** 02

ANEXO 2. Especificações da caseína**Naarden Agro Products BV****CERTIFICATE OF ANALYSIS**

DESTINAR AO IPA MARIMEX,
858 CASEINA MALHA 60

Chemical parameters:

Moisture.	11,50 %
Milkfat in dry substance	2,20 %
Ash in dry substance	2,52 %
Free Acidity	0,58 %
Insolubility	0,032
Disc	B

Colour : Creamy white

Productiondate : March - 1999

Validitydate : March - 2001

Packing : 320 moreply paperbags with p.e. innerbag
of 25 kgs nett.

Batchnumber : PI:40025, malha 60

Contract : 00985261

Our ref. : P-4043

Your ref. : MC-184/99-A

Invoices : 99100/1,2,3 and 4, dated 13-04-1999

B/L nrs. : GDYL04947/4982/4983 and 4984

Containernr. : CLHU-207660-3

ANEXO 3. Ficha técnica da tripsina

Special Food / 2001-07050-03.pdf

Product Sheet

Pancreatic Trypsin Novo

Description

Pancreatic Trypsin Novo (PTN) is the designation for enzyme preparations derived from porcine pancreas.

The major enzymatic component of PTN is trypsin (E.C. 3.4.21.4).

Chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1) may be present as a minor constituent.

Trypsin is a serine protease with a narrow specificity. In a peptide chain it hydrolyzes preferentially peptide bonds at the carboxyl side of arginine and lysine residues.

Product Properties**Product Type**

The PTN product for the food industry is available in powder form as the following type:

PTN 6.0 S, Type Saltfree

PTN 6.0 S is manufactured from porcine trypsin concentrates.

Activity

Pancreatic Trypsin Novo 6.0 S, Type Saltfree is standardized with lactose in

Trypsin Units per g (tryp-USP/mg). The product is off-white.

PTN 6.0 S, Type Saltfree..... Declared activity: 1250 tryp-USP/mg

The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength. Detailed descriptions of the Analytical Methods, SM-0542 & SM-0543 are available on request.

Solubility

PTN 6.0 S, Type Saltfree is fully soluble in water. The presence of calcium ions enhances the stability.

At ambient temperature (20-25°C (68-77°F)) a solution with pH 7 of either of the two preparations should be used within a few hours.

Food-grade status

The product complies with the recommended purity specifications for food grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC)

Packaging

See the standard Packaging List for more packaging information.

Application

PTN 6.0 S, Type Saltfree can be used for the hydrolysis of all kinds of proteins except those which contain an active trypsin inhibitor. The high purity of PTN 6.0 S, Type Saltfree makes it of special value in such applications where the presence of salt is undesirable.

Reaction Parameters

The actual activity and stability of PTN products will depend on the conditions imposed on the enzyme during application. Notably, it is well known that the presence of a substrate will stabilize the enzyme under otherwise identical conditions while the presence of e.g. a soy-bean trypsin inhibitor may have a detrimental effect on the enzyme. In Figures 1 and 2 the influence of pH and temperature on the activity and thermostability of PTN are shown. The activities shown are measured according to a modified Anson method in aqueous solutions without the stabilizing effect of proteinaceous matter.

Under industrial conditions of use, reaction times of several hours are frequently applied; furthermore, the presence of high substrate concentrations (8-12%) enhances the stability of the enzymes.

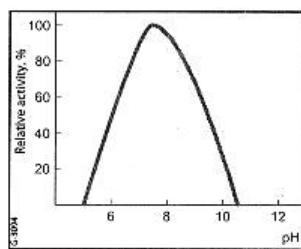


Fig. 1. Activity of PTN at different pH values.

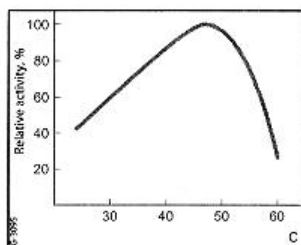


Fig. 2. Activity of PTN at different temperatures.

Inactivation

PTN can be inactivated in 10 minutes at 85°C (185°F) or higher when pH is 4-8. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of PTN must be based on actual analysis for detection of residual activity.

Safety

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

Powdered enzymes are readily inhaled and should be handled only with specific precautions to prevent inhalation of dust. All equipment and handling procedures must be designed to control airborne dust. Personal respiratory protection is recommended in all cases where full dust control is not secured. All spills, even small spills, should be gently shoveled into plastic lined containers. Use respiratory protection. Small spills and remains of large spills should be removed by vacuuming or flushing with water (no splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature and humidity. Cool and dry conditions are recommended.

When stored at 5°C (41°F) the product will maintain its declared activity for at least two years.

When stored in closed containers at 25°C (77°F) the product will maintain its declared activity for at least 6 months.

Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperature or high humidity may lead to higher dosage requirement.

ANEXO 4. Ficha Técnica da transglutaminase**AJINOMOTO**FOOD INGREDIENTS DEPARTMENT
AJINOMOTO CO., INC.15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU, TOKYO 104-8315 JAPAN
TEL : +81-3-5250-8146 FAX : +81-3-5250-8287**PRODUCT INFORMATION****ACTIVA®TG-S****Specifications**

Item	Specification	Method*
Description	White powder	AJI TEST [Sensory analysis]
Loss on drying	Not more than 2.0 %	Japanese Standards for Food Additive (Loss on drying test [3 g, 80 °C for 2 hours])
Transglutaminase activity	78 – 126 U/g	AJI TEST [Hydroxamate method]
Arsenic (as As ₂ O ₃)	Not more than 2 µg/g	AJI TEST [Atomic absorption spectrophotometry]
Heavy metals (as Pb)	Not more than 20 µg/g	AJI TEST [Sodium Sulfide colorimetry]
Aerobic plate count	Not more than 3,000 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Thermotolerant bacteria (mesophilic)	Not more than 300 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Coliform bacteria	Negative/g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [BGLB medium]

* All the methods are available on request to AJINOMOTO

IngredientsTransglutaminase, Sodium Polyphosphate, Sodium Pyrophosphate (anhydride),
Sodium L-Ascorbate, Lactose and others**Shelf-life**

Eighteen months from manufacturing date in the original unopened package in cool dry place.

7th April, 2003



FOOD INGREDIENTS DEPARTMENT
AJINOMOTO CO., INC.

15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU, TOKYO 104-8315 JAPAN
TEL : +81-3-5250-8146 FAX : +81-3-5250-8287

PRODUCT INFORMATION

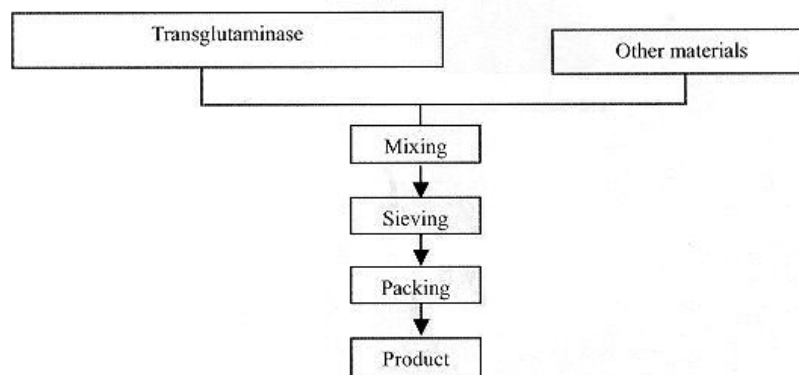
ACTIVA®TG-S

Packaging Specifications

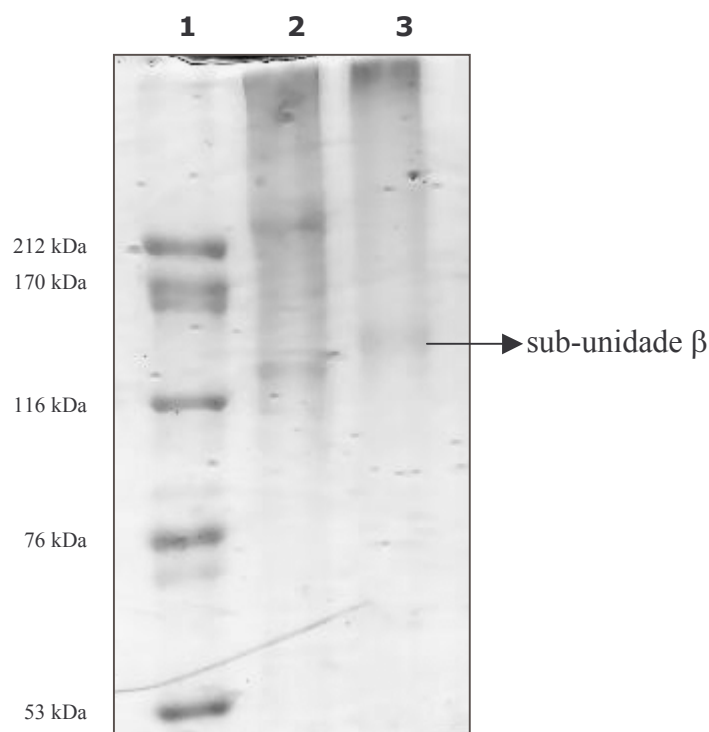
Packaging items		Outer dimensions	Packaging material compositions
<Individual packaging>	Pouches*	350 mm x 225 mm	PET/PE/AL/PE/L-LDPE
			Center partition: L-LDPE
<Outer packaging>	Carton box	440 mm x 310 mm x 225 mm	Corrugated fiberboard
	Partition	300 mm x 210 mm	Card board
	Pad (top)	425 mm x 295 mm	Card board
	Pad (bottom)	425 mm x 295 mm	Card board
<Weight>	Gross weight	11.1 kg	
	Net weight	10 kg (1 kg x 10 bags)	

*Pouches contain oxygen absorbers to maintain product functionality

Production Process



7th April, 2003

ANEXO 5. Perfil eletroforético da gelatina tipo B.

Coluna 1 – padrão contendo: miosina (212 kDa), α 2-macroglobulina (170 kDa), β -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa), glutamato desidrogenase (53 kDa); Coluna 2 – Gelatina tipo A; Coluna 3 – Gelatina tipo B.

A eletroforese da gelatina foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Ltda., Cód.: 165-2940) com gel de 0,75 mm de espessura. Utilizou-se gel de empilhamento de 4% e gel de separação de 6%. As amostras, dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8; SDS 10%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Aplicaram-se, nas canaletas do gel, 25 μ g de amostra. A corrida foi realizada a 120 V, à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 2 horas. As bandas de proteína foram coradas segundo manual de instruções do fabricante (Mini-Protean II: Dual slab cell, Instructors Manual, Biorad Laboratories, Richmond, USA). Preparou-se uma solução de Coomassie R-250 (0,1%) em 40 % de metanol e 10% de ácido acético, para corar os géis e uma solução contendo metanol (40%) e ácido acético (10%), para descorar os géis. A massa molecular das proteínas foi determinada usando o kit padrão de alto peso molecular (Amershan Pharmacia Biotech Ltda., cód. 17-0615-01).

ANEXO 6. Influência da concentração de proteína e tempo de reação com transglutaminase na formação de filmes pela técnica *casting*

Proteínas	Concentração de proteína (%)	Tempo de polimerização com Tgase (minutos)			
		15	20	30	60
Caseína	7,0	+	+	+	+
	7,5	+/-	+/-	+/-	-
	8,0	-	-	-	-
	10,0	np	np	np	np
Gelatina	7,0	+	-		
	7,5	+	-		
	8,0	+	-	np	np
	10,0	+/-	-		

+, solução filmogênica adequada para a formação de filmes

-, solução filmogênica difícil de manipular na formação de filmes

np, gelatinização rápida impossibilitando a formação do filme.

ANEXO 7. Regressão linear da resistência à tração dos filmes de gelatina e caseína.