

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMOBILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE EM HIDROGÉIS CONSTITUÍDOS DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE

MARIANE WOLF

PINHALZINHO, 2018

MARIANE WOLF

IMOBILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE EM HIDROGÉIS CONSTITUÍDOS DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador Dr. Prof. Alexandre Tadeu Paulino

PINHALZINHO, SC 2018

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

 Wolf, Mariane Imobilização de β-D-galactosidase em hidrogéis constituídos de polissacarídeos naturais para produção de alimentos com baixo teor de lactose / Mariane Wolf. - Chapecó, 2018. 122 p.

Orientador: Alexandre Tadeu Paulino Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2018.

 β-D-galactosidase. 2. Imobilização. 3. Hidrogel. 4. Hidrólise.
 Lactose. I. Paulino, Alexandre Tadeu. II. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título. Universidade do Estado de Santa Catarina Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

IMOBILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE EM HIDROGÉIS CONSTITUÍDOS DE POLISSACARÍDIOS NATURAIS PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE

Elaborada por Mariane Wolf

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora:

Dr. Prof. Alexandre Tadeu Paulino - Orientador (UDESC-SC)

11.10:

ZZ-

Dr. Prof. Elias Basile Tambourgi (UNICAMP-SP)

Dra. Prof. Elisandra Rigo (UDESC-SC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por me conceder toda a luz e força durante todo o tempo e nunca me deixar desistir.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais Darli Paul Wolf e Geraldo Wolf que lutaram muito para que eu pudesse realizar meu sonho e acreditaram em mim sempre me dando força para continuar.

As minhas irmãs Tayara Wolf e Sintia Wolf pelos inúmeros conselhos e amor de irmãs.

A pequena e doce Laura Gubert que tornou este período mais leve com alegrias e um amor incondicional.

Ao meu namorado Tiago Rezende pelo carinho, companheirismo, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Ao meu professor orientador Dr. Alexandre Tadeu Paulino a quem admiro muito, pela amizade, ensinamentos e paciência.

As minhas queridas amigas e colegas Angélica Patrícia Bertolo e Fabiane Paula Werlang Schuster que estiveram comigo me auxiliando e repassando seus conhecimentos, e principalmente pela amizade sincera e confortante que desejo para a vida inteira.

As minhas amigas Daiane Valmorbida e Ana Paula Rezende, pelos inúmeros conselhos que foram valiosos para me manter emocionalmente saudável durante as turbulências deste período e pela amizade e conversas que tivemos, muito obrigada.

Aos colegas e agora amigos de mestrado, mesmo aqueles com quem não tive muito contato, por tornarem o dia a dia mais agradável.

A Bruna Carla Gasparin que me ajudou a desenvolver meu trabalho, sempre comparecendo.

A Universidade Estadual de Santa Catarina e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo ensino de alta qualidade e por proporcionarem essa experiência.

Enfim, a todos que de alguma maneira colaboraram não apenas no meu curso, mas em toda a minha caminhada humana e profissional até aqui.

RESUMO

Hidrogéis a base de goma arábica e hidrogéis a base de quitosana foram sintetizados por reticulação química, caracterizados por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios de intumescimento para a imobilização de β-Dgalactosidase e aplicação na hidrólise de lactose, produção de leite com baixo teor lactose e produção de cápsulas de liberação controlada de enzima. A partir dos resultados de FT-IR e MEV foram confirmados o processo de reticulação dos monômeros e a formação dos hidrogéis. Os graus de intumescimento dos hidrogéis foram influenciados pelo pH e pela temperatura da solução aquosa. Assim, foram estudadas as principais variáveis que afetam a capacidade de imobilização e liberação de enzimas. As capacidades de imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foram $151,18 \pm 0,57$ e $189,23 \pm 1,09$ mg g⁻¹, respectivamente. As atividades enzimáticas da enzima imobilizada nos hidrogéis foram $0,246 \pm 0,002 \text{ e } 0,211 \pm 0,003 \text{ U mg}^{-1}$, respectivamente. As frações de enzima liberada a partir dos hidrogéis foram $0,407 \pm 0,007$ e $0,245 \pm 0,005$, respectivamente. A quantidade de β-D-galactosidase imobilizada no hidrogel a base de quitosana foi maior do que no hidrogel a base de goma arábica. Contudo, uma menor atividade enzimática em hidrogéis a base de quitosana foi obtida provavelmente pela menor liberação de enzima durante a hidrólise de lactose uma vez que a atividade enzimática quantificada foi parcialmente devido à enzima livre liberada a partir dos hidrogéis. A secagem dos hidrogéis por liofilização foi determinante para alcançar uma capacidade de imobilização máxima. Além do melhor desempenho catalítico da enzima imobilizada na hidrólise de lactose, foi observado que a liberação aumentou após o aumento do pH e da temperatura da solução durante a hidrólise. A enzima imobilizada em hidrogel a base de goma arábica foi mais estável do que a enzima livre e melhorou o desempenho na hidrólise em meio ácido. Este resultado é relevante e promissor no emprego da enzima imobilizada em hidrogéis para processos de liberação controlada no sistema do trato gastrointestinal após administração oral de uma cápsula. A β-D-galactosidase imobilizada nos hidrogéis foi aplicada em dez ciclos sucessivos de hidrólise da lactose padrão e de lactose contida em leite UHT sem alteração significativa da sua atividade enzimática. Após dez ciclos de reutilização de β-D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica, as atividades enzimáticas relativas remanescentes foram $43,82 \pm 3,26$ e $65,09 \pm 3,47$ % quando utilizado hidrólise em solução de lactose padrão e lactose contida em leite UHT, respectivamente. Nos hidrogéis a base de quitosana, as atividades enzimáticas relativas foram $56,05 \pm 0,78$ e $71,81 \pm 2,33$ %, respectivamente. Assim, a imobilização da enzima em hidrogéis constituídos de polissacarídios é bastante promissora na hidrólise de lactose contida em leite UHT, podendo ser aplicados na produção de leites com baixo teor de lactose e também como cápsulas de liberação controlada de enzima em indivíduos com intolerância a lactose.

Palavras-chave: β-D-galactosidase. Imobilização. Hidrogel. Hidrólise. Lactose.

ABSTRACT

Arabic gum-based and chitosan-based hydrogels were synthesized through chemical crosslinking, characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM) and swelling assays for the immobilization of β -D-galactosidase and application in the hydrolysis of lactose, production of low-dosage lactose milk and production of controlled enzyme release capsules. FT-IR and SEM results confirmed the gelling processes and the crosslinking of the hydrogels. The degrees of swelling were affected by the pH and temperature of the aqueous solutions. In this sense, it was studied the main variables affecting the immobilization capacity and controlled enzyme release from the hydrogels. The capacities of immobilization of β -Dgalactosidase in the Arabic gum-based hydrogel and chitosan-based hydrogel were 151.18 ± 0.57 and 189.23 ± 1.09 mg enzyme per g dried hydrogel, respectively. The enzymatic activities of the immobilized enzyme were 0.246 ± 0.002 and 0.211 ± 0.003 U mg⁻¹, respectively. The enzyme fractions released from the hydrogels were 0.407 \pm 0.007 and 0.245 \pm 0.005, respectively. The capacity of immobilization of β -D-galactosidase in the chitosan-based hydrogel was higher than Arabic gum-based hydrogel. However, lower enzymatic activity was observed for the immobilized enzyme in the chitosan-based hydrogel due probably to lower amount of enzyme released during the hydrolysis of lactose since the quantified enzymatic activity was partially determined by the free enzyme in solution released from the hydrogels. The drying processes of the hydrogels by lyophilization were determinant to achieve a maximum capacity of immobilization. Besides the better catalytic performance of the immobilized enzyme during the hydrolysis of lactose, it was observed that the controlled release rate increased with the increase of the pH and temperature of the aqueous solution. The β -D-galactosidase immobilized in the hydrogels was more stable than the free enzyme, improving the efficiency of the lactose hydrolysis in acid medium. Therefore, the natural polysaccharide-based hydrogels containing immobilized enzyme could be efficiently applied for the controlled enzyme release in the gastrointestinal tract systems. β-D-galactosidase immobilized in the hydrogels was applied for ten successive cycles of hydrolysis of standard lactose and lactose contained in UHT milk without significant changes of its enzymatic activity. The enzymatic activities of β -D-galactosidase immobilized in the Arabic gum-based hydrogel after ten reuse cycles were 43.82 ± 3.26 and $65.09 \pm 3.47\%$ for hydrolisys of standard lactose and lactose contained in UHT milk, respectively. The enzymatic activities for β -D-galactosidase immobilized in the chitosan-based hydrogel were 56.05 \pm 0.78 and 71.81 \pm 2.33%, respectively. The β -Dgalactosidase immobilization in the natural polysaccharide-based hydrogels is a promising strategy for the hydrolysis of lactose contained in standard lactose aqueous solutions and UHT milk. Finally, the β -D-galactosidase immobilized in hydrogels could be efficiently applied in the production of low-dosage lactose milk and controlled enzyme release for lactose intolerant individuals.

Key words: β-D-galactosidase. Immobilization. Hydrogel. Hydrolysis. Lactose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Espectros d (a), metac arábica (d	e infravern rilato de gl)	nelho com trans icidila (b), gom	formada de a arábica n	e Fourier para nodificada (c)	a goma aráb e hidrogel a	ica purificada base de goma 41
Figura 2	- Espectros d (a) (b)	le infraveri e	melho com trans hidrogel	sformada a a	le Fourier par base	a a molécula de	de quitosana quitosana 42
Figura 3 ·	- Imagens de imediata até ati (b)	microscop mente depo ngir o	bia de varredura ois de sintetizad equilíbrio e	eletrônica o e seco po subsequ	a para o hidrog or liofilização uentemente	el a base de (a) e hidroge seco por	goma arábica l intumescido liofilização 43
Figura 4	- Imagens d intumesc b)	e microsce vido até ec	opia de varredu quilíbrio e seco	ra eletrôn por liofi	ica para hidro lização em di	ogel a base ferentes am	de quitosana, pliações (a e 44
Figura 5 -	- Graus de in solução ta água pota	tumescime mpão aceta ável, à te	ento em função d ato de pH 4,0, s emperatura de	lo tempo p olução tan 25 ± 1,	para hidrogel a npão fosfato d 0 ° C (a)	base de gor e pH 7,0, ág e 37,0 ±	na arábica em ua destilada e 1,0 °C (b) 44
Figura 6	- Graus de i tampão a potável,	ntumescim acetato de à tempe	ento em função pH 4,0, solução eratura de 25	o do tempo tampão fo ± 1,0	o para hidroge osfato de pH ' ° C (a) e	el a base de 7,0, água de e 37,0 ±	quitosana em stilada e água 1,0 °C (b) 45
Figura 7 -	- Capacidade no hidroge solução ta 25 ± 1,0 °	es de imobi el a base de mpão aceta C	lização (a) e efi goma arábica v ato de pH 4,0 e s	ciências d ersus temp solução tar	e imobilização po de contato. npão fosfato d	o (b) de β-D- Condições e le pH 7,0 à te	galactosidase xperimentais: emperatura de 47
Figura 8 -	- Capacidade hidrogel a solução ta de 25 ± 1,	s de imobi 1 base de mpão acet 0 ° C	lização (a) e efi quitosana vers ato de pH 4,0 e	ciências ir us tempo solução ta	nobilização (b de contato. (ampão fosfato) de β-D-gal Condições e de pH 7,0,	actosidase no xperimentais: à temperatura 47
Figura 9	- Concentraç lactose u	ões de glic Isando β-	cose (a) e ativid D-galactosidas	ades enzin e livre	náticas (b) ver à temperatur	sus tempo d ra de 25	e hidrólise de ± 1,0 °C 49
Figura 10) - Concentra	cões de gli	icose versus ten	nno de cor	ntato (a) e ativ	idades enzin	náticas versus

Figura 10 - Concentrações de glicose versus tempo de contato (a) e atividades enzimáticas versus tempo de contato (b) durante a hidrólise de lactose padrão usando o hidrogel a base de goma arábica contendo β-D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e pH 7,0.

Condições experimentais para a hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de $37,0 \pm 1,0$ °C50
Figura 11 - Concentrações de glicose versus o tempo de contato (a) e atividades enzimáticas versus tempo de contato (b) durante a hidrólise de lactose padrão usando o hidrogel a base de quitosana contendo β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e pH 7,0. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 °C
Figura 12 - Frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) quando imobilizadas em pH 4,0 e pH 7,0. Condições experimentais para o processo de liberação: pH 7,0 e temperatura de 37,0 \pm 1,0 °C
Figura 13 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β-D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (b), versus tempo, durante três ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C
Figura 14 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β-D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de quitosana (b), versus tempo, durante cinco ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C
Figura 15 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β-D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (b), versus tempo, durante três ciclos de hidrólise de lactose contida em leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C
Figura 16 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β-D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de quitosana (b), versus tempo, durante cinco ciclos de hidrólise de lactose contida em leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C
Figura 17 - Atividades enzimáticas relativas de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) durante diferentes ciclos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C
Figura 18 - Diagramas de Pareto com os termos significativos para as capacidades de imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)
 Figura 19 – Valores previstos pelo modelo em função dos valores observados para a resposta da capacidade de imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)

Figura 20 -	Sup	perfície	s de re	sposta e cu	rvas d	e contorno para	i as capaci	dades	de imo	biliza	ção d	le β-
	D-g	galacto	sidase	$(mg g^{-1}) en$	n hidro	ogel a base de go	oma arábio	ca em f	função	da ten	npera	tura
	e da	a conce	entraçã	o de enzim	a (a e	b); em função d	da concen	tração	de enz	ima e	do pl	H (c
	e	d);	em	função	de	temperatura	e	do	pН	(e	e	f)
				-		-			-			.68

- Figura 37 Frações de β-D-galactosidase liberadas a partir de hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) em função da temperatura. Condições experimentais

para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperaturas de 4,0, 25,0, 37,0 ou 50,0 \pm 1,0 °C......101

Figura 38 – Atividad	es de β-D-	galactosi	dase im	obilizadas em hid	rogel a b	ase de goi	na aráb	ica (a)
e hidroge	el a base de	e quitosai	na (b), s	secos em estufa e	liofilizaç	ão, durant	e os cio	clos de
reutiliaçã	o da enzin	na imobil	lizada. (Condições experir	nentais p	oara hidról	ise de l	actose
padrão:	pН	7,0	e	temperatura	de	37,0	±	1,0
°C	•••••	•••••		••••••		•••••		102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 9 Análise de variância (ANOVA) para os fatores temperatura (X₁), concentração inicial de enzima (X₂) e pH (X₃) em função das frações de enzima liberada a partir dos

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	
Equação 2	
Equação 3	
Equação 4	
Equação 5	
Equação 6	65
Equação 7	65
Equação 8	72
Equação 9	72
Equação 10	
Equação 11	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAc	Ácido acrílico
AAm	Acrilamida
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EI	Eficiência de imobilização
F _{cal}	F calculado
FL	Fração liberada
F _{tab}	F tabelado
GA	Goma arábica
GI	Grau de intumescimento
GL	Grau de liberdade
MAG	Metacrilato de glicidila
MBA	N,N'- metileno-bisacrilamida
PA	Persulfato de amônio
PP	Persulfato de potássio
QA	Quitosana
Qe	Capacidade de imobilização
Qe	Capacidade de imobilização
QM	Quadrados médios
\mathbb{R}^2	Coeficiente de determinação
SQ	Soma dos quadrados
UHT	Temperatura Ultra Alta
X_1	Temperatura
X_2	Concentração de enzima
X ₃	рН

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	20
1.1	CONTEXTUALIAÇÃO	20
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	Objetivo geral	21
1.2.2	Objetivos específicos	21
1.3	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	22
1.3.1	Lactose	22
1.3.2	β-D-galactosidase	24
1.3.3	Aplicações de β-D-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polissacarí	dios
	na hidrólise de lactose	25
1.3.3.	1 Obtenção de leite com baixo/zero teor de lactose	25
1.3.3.2	2 Liberação controlada de β -D-galactosidase a partir de hidrogéis	26
1.3.4	Imobilização de enzimas por adsorção	26
1.3.5	Hidrogéis a base de polissacarídios na imobilização de enzimas	28
1.3.5.	l Mecanismo de difusão em hidrogéis a base de polissacarídios	29
1.3.5.2	2 Hidrogéis a base de goma arábica	30
1.3.5.	3 Hidrogéis a base de quitosana	31
2	CAPÍTULO 2	33
2.1	INTRODUÇÃO	33
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1	Reagentes	34
2.2.2	Síntese de hidrogel a base de goma arábica	35
2.2.3	Síntese de hidrogel a base de quitosana	35
2.2.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	36
2.2.5	Microscopia eletrônica de varredura	36
2.2.6	Grau de intumescimento	36
2.2.7	Imobilização de β-D-galactosidase	37
2.2.8	Hidrólise de lactose padrão usando β-D-galactosidase livre	38

de lactose padrão usando β -D-galactosidase imobilizada	8
e hidrogel contendo β-D-galactosidase imobilizada	8
de leite com baixo teor de lactose	9
o controlada de β-D-galactosidase	9
statística	9
ADOS E DISCUSSÃO 40	0
s de FT-IR do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de	
1	0
pia eletrônica de varredura 42	2
ntumescimento 44	4
ção da β-D-galactosidase 46	6
de lactose padrão usando β-D-galactosidase livre	8
de lactose padrão usando β-D-galactosidase imobilizada	9
o controlada de β-D-galactosidase a partir dos hidrogéis51	1
e hidrogel contendo β-D-galactosidase imobilizada52	2
de lactose contida em leite UHT usando β-D-galactosidase imobilizada 54	4
JSÃO	б
LO 3 58	8
UÇÃO	8
AL E MÉTODOS	9
ento experimental para imobilização de β-D-galactosidase	9
ADOS E DISCUSSÃO	1
ento experimental para imobilização de β-D-galactosidase nos hidrogéis. 61	1
ção otimizada de β -D-galactosidase para hidrólise de lactose contida em	
5	6
/SÃO	8
LO 4 90	0
UCÃO	0
	1
AL L'IVIL I UDUS	_
ıção de β-D-galactosidase	1
	de lactose padrão usando β -D-galactosidase imobilizada

4.2.3	Efeito da temperatura na estabilidade de β-D-galactosidase9	1
4.2.4	Efeito do pH na estabilidade de β-D-galactosidase9	2
4.2.5	Liberação controlada de β-D-galactosidase9	2
4.2.6	Análise estatística9	2
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO9)3
4.3.1	Efeito da secagem dos hidrogéis sobre a imobilização de β-D-galactosidase9	13
4.3.2	Efeito do pH na estabilidade de β-D-galactosidase9	4
4.3.2.1	Efeito do pH na atividade enzimática de β -D-galactosidase)4
4.3.2.2	Efeito do pH na liberação de β -D-galactosidase9)6
4.3.3	Efeito da temperatura na estabilidade de β-D-galactosidase9	8
4.3.3.1	Efeito da temperatura na atividade enzimática9)8
4.3.3.2	Efeito da temperatura na liberação de β -D-galactosidase10)0
4.3.4	Efeito da secagem dos hidrogéis contendo β-D-galactosidase nas reutilizações10)1
4.3.5	Hidrólise de lactose reutilizando β-D-galactosidase imobilizada em hidrogéis10	13
4.4	CONCLUSÃO)6
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS10	17
REFE	RÊNCIAS10	19
APÊN	DICE A - CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS12	20

1 CAPÍTULO 1

No Capítulo 1 foi descrito uma síntese bibliográfica apontando a importância da hidrólise de lactose em leite e produtos lácteos pela β -D-galactosidase e a necessidade de se imobilizar esta enzima. Ainda, como possíveis suportes foram apontados os hidrogéis a base de polissacarídeos e por fim, as possíveis aplicações de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel de quitosana.

1.1 CONTEXTUALIAÇÃO

As indústrias de laticínios têm como desafio e oportunidade o desenvolvimento de novos produtos com reduzido ou baixo teor de lactose para atender o índice ascendente de portadores de intolerância à lactose. Atualmente estima-se que cerca de 70% da população adulta no mundo manifesta alguma deficiência de lactase no organismo (RUEDA et al., 2016; LULE et al., 2016). No Brasil este cenário não é diferente, 88 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir lactose (PROZYN, 2010). Contudo, um avanço significativo no setor de produtos lácteos se intensificou nos últimos anos. Em 2015, 5,9% dos alimentos lançados apresentaram informações de baixo/teor reduzido/sem lactose na embalagem (MINTEL, 2016). Além de um aumento de 13% no consumo de leite UHT Zero Lactose (KANTAR WORDPANEL, 2016).

O predomínio e a gravidade da intolerância à lactose são eventualmente superestimados pela população em geral. Esta desorientação causa a redução indevida do consumo de produtos lácteos que são essenciais à saúde, principalmente pelos benefícios do teor de cálcio e os das bactérias probióticas (BAYLESS et al., 2017; CORGNEAU et al., 2017). Desta forma, o uso de preparações enzimáticas exógenas, bem como formulações de produtos lácteos adequados para pessoas intolerantes parecem indispensáveis como estratégias para a redução de sintomas da intolerância à lactose (FACIN et al., 2015; CORGNEAU et al., 2017).

A hidrólise da lactose pelo método enzimático usando β-D-galactosidase produzida a partir de *Kluyveromyces lactis* tem um papel importante nas indústrias de laticínios e no processamento de produtos lácteos contendo baixas concentrações de lactose (JURADO et al., 2004; HSU et al., 2007; FACIN et al., 2015). Além disso, os sintomas da intolerância podem ser reduzidos pela reposição de lactase exógena obtida de *Aspergillus oryzae* minutos antes do consumo de lácteos (HEYMAN, 2006). Portanto, o desenvolvimento de técnicas para a produção de leite livre ou com

baixo teor de lactose (TAMIME; THOMAS et al., 2017) e de preparados enzimáticos estáveis para a ingestão são essenciais (ZHANG et al., 2016; LIU et al., 2017). A imobilização da β -Dgalactosidase em suportes insolúveis como hidrogéis constituídos de polisacarídios é uma estratégia promissora para ambas as aplicações da enzima (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018). A imobilização de enzima por adsorção é relativamente simples e oferece benefícios consideráveis como a reutilização da preparação enzimática durante ciclos sucessíveis de hidrólise de lactose na produção de leites (SHELDON; VAN PELT, 2013). Ainda, a fraca interação da enzima com o suporte polimérico possibilita a liberação controlada de enzima no meio digestivo, prolongando a atividade enzimática (ZHANG et al., 2016; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

Os materiais poliméricos tem recebido atenção especial como possíveis suportes para a imobilização de enzimas. Os hidrogéis baseados em polissacarídios são capazes de absorver grande quantidade de água, permitindo a imobilização de β -D-galactosidase e posteriores aplicações na hidrólise de lactose pelo processo de difusão dos solutos envolvidos (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018). Tendo em vista as vantagens da utilização de β -D-galactosidase e do potencial de aplicação em reações de hidrólise de lactose, têm-se a consolidação da proposta deste estudo.

1.2 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados o objetivo geral e específico que norteiam a pesquisa.

1.2.1 Objetivo geral

Sintetizar hidrogéis constituídos de goma arábica e hidrogéis constituídos de quitosana para imobilização de β-D-galactosidase e aplicação na produção de leite com baixo/zero teor de lactose e em processos de liberação controlada.

1.2.2 Objetivos específicos

- a. Sintetizar e caracterizar o hidrogel de goma arábica e hidrogel de quitosana;
- b. Determinar o grau de intumescimento dos hidrogéis em função do pH e temperatura;
- c. Estudar o efeito da temperatura, concentração inicial de enzima e pH das soluções na capacidade de imobilização, atividade enzimática e fração de enzima liberada.

d. Identificar melhores condições experimentais para a produção de leite com baixo/zero teor de lactose;

e. Determinar a atividade enzimática e fração de β -D-galactosidase liberada em diferentes pHs e temperaturas.

f. Estudar ciclos de reuso dos hidrogéis contendo enzima imobilizada.

1.3 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A síntese bibliográfica aborda assuntos relevantes ao tema estudado apontando a importância da hidrólise de lactose em leite e produtos lácteos pela β -D-galactosidase e a imobilização desta enzima. Os hidrogéis a base de goma arábica e hidrogel de quitosana podem ser usados como suportes de imobilização e utilizados em aplicações alimentícias.

1.3.1 Lactose

O leite é um alimento composto por nutrientes fundamentais à manutenção da saúde humana e a lactose é o seu principal carboidrato. A lactose é um dissacarídeo composto de uma molécula de glicose ligada a uma de galactose que está presente no leite de todos os mamíferos em concentrações que variam de 2 a 10%, sendo que no leite bovino a concentração média é de 4,8% (GOUSAUD, 1985; CAMPOS et al., 2015). O termo intolerância à lactose é usualmente utilizado para descrever os sintomas relacionados com pessoas que apresentam má digestão da lactose após consumir leite e derivados, sendo uma questão de extrema relevância (PEREIRA et al., 2012). A deficiência de lactase ou hipolactasia existe em três condições diferentes: congênita, primária e secundária. A forma congênita é uma condição autossômica recessiva extremamente rara, onde a atividade da lactase é baixa ou mesmo ausente (LULE et al., 2016). A deficiência primária é observada frequentemente na idade adulta pela redução da atividade enzimática proveniente de alguns fatores como a quantidade de lactose ingerida, idade, genética e taxa de digestão. Além disso, os fatores biológicos, psicológicos e culturais também podem influenciar no nível de intolerância a alimentos contendo lactose. Por fim, a deficiência secundária ou deficiência temporária, ocorre quando danos na mucosa atrofiam as vilosidades do intestino delgado pelo uso de radiação ou medicação durante tratamento de doenças (TORRES et al., 2016; LULE et al., 2016).

A maioria dos intolerantes à lactose pode ingerir até 12 g de lactose por dia, o equivalente a 250 mL de leite sem apresentar sintomas adversos. Para o tratamento da intolerância à lactose é recomendada a injestão gradual de lactose na dieta, e se sintomas gastrointestinais típicos persistirem, pode ser adotada uma suplementação de lactase (HURDUC et al., 2017). Os sintomas de intolerância a lactose podem ser reduzidos com medidas farmacológicas como a reposição enzimática com lactase exógena. Esta enzima é comercializada nas formas líquida, cápsula e tablete, sendo que a eficácia das formulações líquidas é superada pelas preparações em cápsulas e tabletes, pela alta palatividade, diminuição de efeitos colaterais e praticidade para a ingestão (SUAREZ et al., 1995; FLOOD; KONDO, 2004).

Normalmente as pessoas intolerantes evitam o consumo de leite e derivados deixando de usufruir dos benefícios do alimento à saúde humana. Além disso, com objetivo de suplementação enzimática é necessário o consumo de lácteos por pessoas com restrições a lactose. Assim, a presença de lactose em alimentos deve ser declarada no rótulo dos produtos de forma clara e legível para o consumidor. Atendendo a esta necessidade, novas regras para rotulagem de produtos com lactose foram publicadas, incluindo os alimentos para dietas com restrição de lactose (BRASIL, 2017a), e definindo como as informações de lactose devem ser colocadas no rótulo, independentemente do tipo de alimento (BRASIL, 2017b). Os alimentos considerados "isentos de lactose" contêm quantidade de lactose igual ou menor a 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL do alimento pronto para o consumo, enquanto que os alimentos considerados de "baixo teor de lactose" contêm quantidade de lactose maior que 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL e igual ou menor do que 1g/100g ou 1g/100mL do alimento pronto para o consumo (BRASIL, 2017a). A quantidades de lactose acima de 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL de alimento, devem estar declaradas pela expressão "contém lactose" imediatamente após ou abaixo da lista de ingredientes (BRASIL, 2017b). Também é estabelecido que os alimentos para dietas com restrição de lactose, que atendam a classificação de "isentos de lactose", devem empregar a expressão: "isento de lactose", "zero lactose", "0% lactose", "sem lactose" ou "não contém lactose" próxima à denominação de venda do alimento. Assim como os alimentos que atendam a classificação de "baixo teor de lactose" devem trazer a declaração "baixo teor de lactose" ou "baixo em lactose" próxima à denominação de venda do alimento (BRASIL, 2017a). Diante disso, o desenvolvimento de técnicas para a produção de leite livre ou com baixo teor de lactose torna-se essencial (FAEDO et al., 2013). Esse processo pode ser realizado por meio de sua remoção física ou da hidrólise enzimática, pela liberação dos monossacarídios, glicose e galactose (CUNHA et al., 2007). A hidrólise da lactose pelo método enzimático é uma técnica promissora na indústria de alimentos, onde a catálise ocorre pela enzima lactase (β-D-galactosidase).

1.3.2 β-D-galactosidase

A β -D-galactosidase é uma enzima hidrolase responsável pela catálise da ligação glicosídica da lactose produzindo glicose e galactose (TORRES; BATISTA-VIEIRA, 2012). É também umas das mais importantes enzimas na indústria de laticínios (RAM, 2011), utilizada no processamento de produtos lácteos, tais como a produção de leite contendo baixas concentrações de lactose, na prevenção de cristalização de produtos lácteos (JURADO et al., 2004; HSU et al., 2007), e para sintetizar galacto-oligossacarídeos pela transgalactosilação da lactose (HASSAN et al., 2016).

O uso de enzimas como a β -D-galactosidase para hidrólise de lactose permite condições operacionais mais brandas de temperatura e pH e não ocasionam a desnaturação de proteínas, escurecimento do produto e a formação de subprodutos indesejados, aspectos normalmente observados nos processos de hidrólise ácida (FAEDO et al., 2013). A legislação brasileira estabelece que a enzima lactase utilizada na indústria alimentícia deve ser proveniente de micro-organismos (BRASIL, 2006). Deste modo, as fontes comerciais mais abundantes da enzima β -D-galactosidase são fungos e leveduras (ANSARI; SATAR, 2012). As enzimas obtidas de fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) possuem pH ótimo para hidrólise na faixa ácida de 2,5 a 4,5 e geralmente são utilizadas na hidrólise de lactose em meios ácidos. Entretando, as enzimas produzidas por leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*) possuem pH ótimo próximo à neutralidade (6,5 e 7,5), e podem ser aplicadas em indústrias de laticínios. Além dos micro-organismos, a enzima pode ser obtida a partir de animais e plantas, diferindo suas propriedades de acordo com sua origem (PANESAR et al., 2010; KLEIN, 2010). Características como peso molecular, temperatura e pH ótimo para hidrólise de lactose podem diferir de acordo com a fonte enzimática ou quando se utiliza a enzima imobilizada (RAM, 2011).

A β -D-galactosidase pode ser utilizada para hidrólise de lactose na forma livre em processos de batelada e na forma imobilizada, tanto em batelada quanto em operação contínua. Como o custo da enzima é relativamente elevado, o sistema de imobilização de β -D-galactosidase em suportes

sólidos como os hidrogéis é viável economicamente por oferecer a possibilidade de reutilização da enzima e aumentar a estabilidade ao processo (PANESAR et al., 2010). Com um processo bem sucedido, a β -D-galactosidase imobilizada pode ser utilizada para a produção de leite com baixo teor de lactose para consumo direto (FAEDO et al., 2013), e também na liberação controlada de enzima (GROSOVÁ et al., 2009).

1.3.3 Aplicações de β-D-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polissacarídios na hidrólise de lactose

A hidrólise de lactose pela reação enzimática de β -D-galactosidase possui grande relevância em relação aos problemas nutricionais ocasionados pela intolerância à lactose. Tanto a remoção da lactose do leite quanto à suplementação de enzima exógena são estratégias para que intolerantes à lactose não deixem de desfrutar dos benefícios nutricionais do leite e produtos lácteos. Neste sentido, a imobilização de β -galactosidase para a hidrólise da lactose é uma estratégia promissora, tendo grande potencial de aplicação na obtenção de produtos com baixo teor de lactose e na liberação controlada da enzima ingerida via oral.

1.3.3.1 Obtenção de leite com baixo/zero teor de lactose

A imobilização de enzimas industriais visa melhorias na produtividade em grande escala de forma econômica e sustentável. Assim, as limitações das enzimas solúveis em aplicações industriais são superadas (HUSAIN et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas para imobilização de β -D-galactosidase torna-se essencial para a produção de leite baixo/zero teor de lactose. Pelo custo da enzima pura ser relativamente elevado, o sistema de imobilização de β -D-galactosidase é viável economicamente porque oferece a possibilidade de reciclo do imobilizado e confere uma maior estabilidade frente às variáveis do processamento (PANESAR et al., 2010).

A hidrólise de lactose no leite para processamento de alimentos previne a cristalização de lactose em produtos de leite congelados e condensados. Além disso, a utilização de leite hidrolisado para a fabricação de iogurtes e queijos acelera o processo de acidificação uma vez que a hidrólise da lactose é normalmente o passo limitante do processo. Assim, o tempo definido de fermentação do iogurte é reduzido e o desenvolvimento da estrutura e do sabor no queijo acelerado. A hidrólise

da lactose do soro é outra aplicação importante da β -D-galactosidase na indústria de lacticínios (PANESAR et al., 2010). Além da ação hidrolítica, a β -D-galactosidase possui também atividade de transferase pela qual a enzima produz e hidrolisa uma série de oligossacarídeos, que têm um efeito benéfico no crescimento desejável da microflora intestinal (PANESAR et al., 2010). Resultados promissores foram obtidos utilizando hidrogel a base de goma arábica (WOLF et al., 2018) e hidrogel a base de quitosana (FACIN et al., 2015) para a imobilização de β -D-galactosidase e aplicação na produção de leites com baixo ou zero teor de lactose. Desta maneira, os hidrogéis a base de polissacarídios contendo β -D-galactosidase imobilizada podem ser utilizados em experimentos cíclicos de hidrólise de lactose, sendo úteis para a produção de alimento com baixo ou zero teor de lactose com alta eficiência (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018).

1.3.3.2 Liberação controlada de β -D-galactosidase a partir de hidrogéis

Os efeitos colaterais provocados pela lactose não digerida podem ser reduzidos com ingestão de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis, além da obtenção de leite com baixo teor de lactose. Do ponto de vista tecnológico, hidrogéis contendo β -D-galactosidase imobilizada podem liberar de forma controlada a enzima, suprindo a função da enzima líquida exógena com melhor eficiência na hidrólise de lactose e aumentando a vida útil no trato digestivo (GROSOVÁ et al., 2009; FACIN et al., 2015). Para compensar variações clínicas da enzima líquida, a β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polissacarídios pode ser ingerida e liberada controladamente, com melhor eficiência hidrolítica, no intestino delgado. A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel é vantajosa porque possui maior eficiência, palatabilidade e minimização dos efeitos secundários. Assim, as cápsulas contendo β -D-galactosidase imobilizada podem ser uma alternativa promissora para suplementar a ausência desta enzima em intolerantes à lactose (SUAREZ et al., 1995; FLOOD; KONDO, 2004). A taxa de liberação de enzima pode ser monitorada para aumentar a sua vida útil no trato digestivo. Além disso, as concentrações de enzimas podem ser mantidas no intervalo apropriado para hidrólise de lactose (SUAREZ et al., 1995; FLOOD; ONDO, 2004).

1.3.4 Imobilização de enzimas por adsorção

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização como biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (GUISAN, 2006). A imobilização de enzimas em suportes insolúveis é uma técnica eficiente para fornecer carga enzimática ao reator e ao mesmo tempo, conceder maior estabilidade frente ao pH, temperatura e tempo de armazenamento (ALBAYRAK; YANG, 2002). Um processo eficiente de imobilização é afetado pelas características da enzima, do suporte e do método de imobilização (CANTONE et al., 2013). Com isso, a avaliação destes três fatores é de suma importância.

Qualquer transportador pode ser aplicado para adsorção/imobilização enzimática. Porém, nem todas as enzimas podem ser imobilizadas em todos os veículos. A razão é que para a adsorção bem sucedida da enzima é necessária algumas condições tal como haver afinidade entre suporteenzima. Isso, por exemplo, é assegurado pela presença dos grupos ativos específicos no transportador, que permitem a geração das interações suporte-enzima (JESIONOWSKI et al., 2014).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação da enzima imobilizada é necessário selecionar o procedimento mais simples e menos oneroso que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES et al., 2011). Entre muitos métodos propostos para a imobilização de proteínas, o mais importante e útil é a imobilização por adsorção. As ligações químicas são fracas o bastante para não alterar a conformação estrutural nativa da enzima. Isso evita que os locais ativos da enzima se perturbem e permite que a enzima retenha sua atividade (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; HWANG; GU, 2013).

A adsorção física é considerada um método simples de imobilização de enzima em um suporte insolúvel, pois, ela é mantida na superfície do suporte por forças de van der waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As vantagens incluem a possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo e simplicidade do método. Em contrapartida, a desvantagem da técnica são as fracas forças de ligações de adsorção (PANESAR et al., 2010; RUEDA et al., 2016). Na adsorção iônica a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte quanto da enzima. Este método de imobilização é mais efetivo que a adsorção física, mas é inferior em

relação aos outros métodos de imobilização que envolvem interações mais fortes entre suporte e a enzima (CARDOSO et al., 2009).

As enzimas imobilizadas possuem atividade superior em relação às livres devido à maior disponibilidade de seus sítios ativos quando imobilizadas nos poros do sólido. Além de ser uma técnica ecológica e acessível, prolonga a vida útil do biocatalizador proporcionando uma recuperação fácil e reutilização das enzimas em sucessivos lotes da produção de interesse (CASTIGLIONI, 2009). Portanto, a imobilização pode ser uma alternativa viável e eficiente na otimização efetiva do desempenho operacional em processos industriais (SHELDON, 2007).

1.3.5 Hidrogéis a base de polissacarídios na imobilização de enzimas

Hidrogéis biodegradáveis têm sido amplamente estudados para aplicação em diversas áreas científicas, tanto médica quanto tecnológica, sendo suportes eficientes para a imobilização de enzimas (COVIELLO et al., 2007). Hidrogéis são constituídos de redes poliméricas tridimensionais com capacidade de absorver e reter quantidades significativas de água e/ou fluídos biológicos devido à presença de grupos hidrofílicos em sua estrutura porosa (PAULINO et al., 2010; BORTOLIN et al., 2012). Os hidrogéis são estruturas poliméricas constituídas por uma ou mais redes poliméricas tridimensionalmente estruturadas, formadas por cadeias de macromoléculas conectadas por ligações cruzadas ou interações físicas. A rede hidrofílicos, sulfônicos, dentre muitos outros utilizados na síntese desses tipos de materiais (GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2009).

Hidrogéis a base de polissacarídios naturais tem alta estabilidade pela presença de ligações de hidrogênio e ligações cruzadas entre monômeros nas redes poliméricas, sendo que o grau em que essas ligações ocorrem influencia diretamente a taxa de intumescimento e desentumescimento do material. Outros parâmetros que influenciam no grau de intumescimento dos hidrogéis incluem temperatura, pH, pressão e campo elétrico (AOUADA et al., 2011). À medida que os hidrogéis intumescem, moléculas de diferentes tamanhos podem se difundirem através de sua estrutura tridimensional (HOFFMAN, 2012), e essa difusão permite que hidrogéis sejam utilizados em sistemas de imobilização e liberação controlada. Os hidrogéis têm sido amplamente estudados para

aplicações em diversas áreas (PAULINO et al., 2009) tais como ambiental, biológica, farmacêutica, médica e biotecnológica (VAN VLIERBERGHE et al., 2011).

Existe uma variedade de polímeros que ocorrem naturalmente, principalmente polissacarídios insolúveis em água tais como celulose, amido, agarose, quitosana, entre outros, os quais têm sido amplamente utilizados como suportes para imobilização de enzimas (KRAJEWSKA, 2004). Ainda, hidrogéis superabsorventes têm sido eficientes para imobilização de enzimas (COVIELLO et al., 2007) e têm despertado grande interesse devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, abundância e baixo custo (KIM et al., 2012; SAMANTA et al., 2014). Entretanto, as propriedades e a microestrutura dos polímeros naturais são difíceis de controlar experimentalmente de forma reproduzível, apresentando propriedades mecânicas ruins e variação na composição química, dependendo do lote. Por esta razão, a modificação química e/ou a mistura com outros polímeros sintéticos às vezes se torna necessária para obtenção de melhores propriedades mecânicas, solubilidade, sensibilidade a estímulos específicos, dentre outros (AOUADA et al., 2011).

O suporte é o principal contribuinte para aumentar a eficiência de um sistema de imobilização (MENDES et al., 2011). Os materiais utilizados na elaboração de suportes devem possuir alta capacidade de retenção, ter resistência mecânica para estender a vida operacional, ser atóxico, ter baixo custo, serem abundantes na natureza e apresentar facilidade de operação em grande escala (PRADELLA, 2001; CANILHA et al., 2006). Os principais atributos necessários envolvem a área superficial, permeabilidade, insolubilidade, morfologia, composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo. A seleção do material de suporte analisa as propriedades físicas e químicas, bem como a capacidade de regeneração do material (VILLENEUVE et al., 2000; MENDES et al., 2011). Entre os polissacarídios disponíveis na natureza, a goma arábica e a quitosana são relatados como eficientes na síntese de hidrogéis para aplicação na imobilização de leites com baixo teor de lactose e em processos de liberação controlada (FACIN et al., 2015; LIU et al., 2017; WOLF et al., 2018).

1.3.5.1 Mecanismo de difusão em hidrogéis a base de polissacarídios

Existem diferentes mecanismos de imobilização e liberação de enzimas a partir de hidrogéis que podem ser estudados, tais como aqueles influenciados pelo intumescimento do hidrogel, pelos coeficientes de difusão dos solutos, pelo relaxamento macromolecular da rede polimérica tridimensional hidrofílica e pelas interações físico-químicas entre hidrogel e soluto (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018). O mecanismo de difusão em hidrogéis pode ser descrito pela lei de difusão de Fick com algumas modificações (PAULINO et al., 2006a). Nesse caso, a porosidade dos hidrogéis influencia o coeficiente de difusão dos solutos e os processos de liberação podem ser dificultados pelas redes poliméricas tridimensaionais contendo alto grau de reticulação. A liberação controlada pode também ocorrer pela absorção de moléculas de água com subsequente dessorção do soluto conforme descrito no mecanismo controlado pelo intumescimento (LIN; METTERS, 2006).

A resistência mecânica dos hidrogéis pode sofrer alteração com a modificação da estrutura polimérica tridimensional, aumentando ou diminuindo o volume durante o processo de hidratação. Com a variação do volume, podem ocorrer alterações nos processos de imobilização e liberação os quais são também influenciados pela composição e densidade de reticulação dos hidrogéis. Por fim, o solvente que se difunde através da estrutura do hidrogel gera uma tensão superficial responsável pelo aumento da distância entre as cadeias poliméricas, aumentando o relaxamento macromolecular e aumentando o intumescimento. Esse processo de intumescimento é acompanhado pela dessorção do soluto e sua liberação controlada conforme descrito na literatura (RANGA RAO et al., 1988; GUPTA et al., 2002). Se as moléculas imobilizadas nas redes dos hidrogéis forem pequenas como os peptídeos e proteínas, sua difusão será mais fácil e sua liberação poderá ocorrer por processos difusionais (BENCHERIF et al., 2009).

1.3.5.2 Hidrogéis a base de goma arábica

A goma arábica é um biopolímero atóxico e biodegradável obtido a partir de caules e ramos de acácia (MAQBOOL et al., 2011). É um polissacarídeo com propriedades ácidas contendo estrutura ramificada de cadeia principal formada por unidades de D-galactopiranose unidas por ligações glicosídicas β -D (1,3). As cadeias laterais são ligadas a cadeia principal por ligações β (1,6), formadas por estruturas químicas de D-galactopiranose, L-arabinofuranose e ácido glucurônico (GILS et al., 2010). É um polissacarídeo biocompatível, não tóxico, solúvel em água e relativamente barato, sendo uma goma natural amplamente utilizada em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (SHAIKH et al., 2014).

A goma arábica possui potencial utilidade na indústria alimentícia como filme ou revestimento de produtos devido as suas propriedades emulsificantes (AIT-OUAZZOU et al., 2010). Além disso, ela pode ser utilizada para processos de imobilização de solutos, e para produção de cosméticos e tintas litográficas (MOTLAGH et al., 2006). Muitas vezes, a goma arábica tem sido também utilizada na microencapsulação de aroma em alimentos líquidos voláteis para transformação em pó (YE et al., 2012). Nas formulações farmacêuticas, é comum o uso de goma arábica em sistemas de liberação controlada (RAMAKRISHNAN et al., 2007; WANG et al., 2015) e na preparação de hidrogéis superabsorventes (SHAIKH et al., 2014; GUILHERME et al., 2015).

As propriedades físico-químicas dos hidrogel a base de goma arábica são provenientes de diferentes monômeros que são utilizados durante a síntese. A acrilamida muitas vezes é utilizada como monômero para aumentar a resistência mecânica do hidrogel e ácido acrílico para aumentar a capacidade de intumescimento e imobilização (ZONATTO et al., 2017). Hidrogéis a base de goma arábica têm sido estudados e aplicados muitas vezes devido as suas respostas a variação de estímulos externos como variação no pH, temperatura, campo magnético, campo elétrico e força iônica (PAULINO et al., 2010; GEROLA et al., 2016).

1.3.5.3 Hidrogéis a base de quitosana

A quitosana é um polímero catiônico obtido por desacetilação parcial da quitina e é biocompatível, biodegradável e não tóxica. É formada por unidades repetitivas de *N*-acetilglucosamina e D - glucosamina ligadas por ligações 1,4-glicosídicas, sendo que a proporção da unidade depende do grau de desacetilação (PAULINO et al., 2006b; BOSTAN et al., 2013; ATTA et al., 2015). A quitina é encontrada no exoesqueleto de crustáceos, crisálidas do bicho da seda, dentre outros, sendo o segundo biopolímero natural mais abundante na natureza após celulose (PAULINO, et al., 2006b; KAMMOUN et al., 2013; ELGADIR et al., 2015). Leveduras e fungos são fontes de quitina e as paredes celulares de alguns fungos também são fontes diretas de quitosana (WU et al., 2005). A quitosana é um importante biopolímero para aplicações biomédicas,

cosméticas, têxteis, biotecnológicas e em sistemas de liberação modificada de fármacos (SIEDENBIEDEL e TILLER, 2012).

A quitosana é solúvel em solução aquosa de ácido acético diluído uma vez que o grupo amino é protonado e responsável por sua solubilidade (RINAUDO, 2006). A modificação química da quitosana é necessária para melhorar sua solubilidade e algumas outras propriedades como a hidrofilia, mecânicas e natureza iônica. Os locais reativos na estrutura da quitosana para as modificações químicas são: (i) grupo -NH₂ em C-2, (ii) grupo hidroxila em C-3 e (iii) grupo hidroxila em C-6. As posições C-2 e C-6 são mais suscetíveis a substituições e reações uma vez que estes são locais mais reativos, enquanto que no C-3 há impedimento estérico, sendo menos reativo (ALVES et al., 2008). Hidrogéis a base de quitosana são excelentes matrizes para a imobilização de enzimas em aplicações tecnológicas. Assim, podem-se utilizar diferentes tipos de monômeros para a síntese de hidrogéis com alta porosidade e capacidade de intumescimento em soluções aquosas (FACIN et al., 2015). Hidrogéis a base de quitosana podem ser aplicados na imobilização de diferentes solutos, no tratamento de águas e efluentes industriais, na liberação controlada de solutos orgânicos e inorgânicos, como membranas de filtração, capsulas de suplementação alimentar, dentre outros (WOLF, et al., 2018).

2 CAPÍTULO 2

IMOBILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE EM HIDROGÉIS A BASE DE POLISSACARÍDIOS PARA HIDRÓLISE DE LACTOSE E LIBERAÇÃO CONTROLADA

2.1 INTRODUÇÃO

A β -D-galactosidase produzida a partir de *Kluyveromyces lactis* tem sido amplamente empregada na hidrólise de lactose de alimentos lácteos industriais, produzindo glicose e galactose (TORRES; BATISTA-VIEIRA, 2012). A hidrólise da lactose minimiza os problemas de cristalização em alimentos contendo açúcar e aumenta a o tempo de prateleira. Além disso, diminui os problemas de saúde para indivíduos intolerantes à lactose, aumentando a solubilidade e a digestibilidade dos alimentos lácteos (JURADO et al., 2004; RICARDI et al., 2017). No entanto, a hidrólise usando enzimas livres aumenta o custo de produção de alimentos sem lactose ou com baixo teor de lactose (FACIN et al., 2015). Assim, a imobilização de β -D-galactosidase para a hidrólise de lactose é uma estratégia promissora para a indústria de alimentos quando o objetivo é produzir alimentos com teores reduzidos de lactose (LIU et al., 2012). Um processo de imobilização adequado evita a desnaturação enzimática em ambientes contendo catalisadores ativos estáveis ou soluções com diferentes temperaturas e valores de pH. Além disso, uma enzima imobilizada pode ser facilmente recuperada e reutilizada em vários ciclos de hidrólise, o que reduz a relação custo/benefício no processo industrial (LIU et al., 2012).

Muitas estratégias e suportes têm sido estudados para a imobilização de β -D-galactosidase a fim de melhorar a produção industrial de alimentos com baixo teor de lactose (RICARDI et al., 2017). Fatores que interferem na estabilidade e atividade da β -D-galactosidase tais como tipo de suporte, pH e temperatura, devem ser cuidadosamente controlados durante os processos de imobilização e liberação para melhorar a eficiencia de hidrólise (MENDES et al., 2011). Processos de imobilização de enzimas empregando estudos de adsorção são muito comuns e envolvem interações físico-químicas, iônicas e de hidrogênio fracas entre o suporte e a enzima (RUEDA et al., 2016). Estes fenômenos mantêm a estrutura molecular nativa da enzima específica e os sítios ativos são inalterados, permitindo uma atividade enzimática significativa dentro do material adsorvente (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Um material adsorvente utilizado para a imobilização enzimática deve contribuir para a manutenção da atividade enzimática e do desempenho durante a aplicação (MENDES et al., 2011). Portanto, os hidrogéis naturais a base de polissacarídios hidrofílicos ou hidrofóbicos são excelentes adsorventes para a imobilização enzimática devido à sua biodegradabilidade, biodisponibilidade, não toxicidade e alta capacidade de absorção de água e fluidos biológicos (COVIELLO et al., 2007; ZONATTO et al., 2017).

A goma arábica é um polissacarídeo natural extraído de diferentes acácias (SNOWDEN et al., 1987). Este polissacarídeo possui estrutura molecular contendo glicoproteínas e açúcares que atuam como sítios ativos nos processos de imobilização (SANCHEZ et al., 2017). Além disso, a goma arábica também tem propriedades emulsificantes, não toxicidade, alta solubilidade e baixa viscosidade em comparação a outros polissacarídios (DAOUB et al., 2016; SANCHEZ et al., 2017). Outro polissacarídeo interessante é a quitosana, forma desacetilada da quitina e solúvel em soluções de ácido acético diluído. A quitina é o biopolímero aminopolissacarídeo mais abundante na natureza responsável pela extrutura dos exoesqueletos de crustáceos, insetos, fungos, dentre outros (ELIEH-ALI-KOMI et al., 2016). Assim, ambos polissacarídios podem ser eficientemente aplicados nas sínteses de hidrogéis superabsorventes para aplicações na imobilização de diferentes solutos (FACIN et al., 2015; ZONATTO et al., 2017).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e métodos utilizados durante os procedimentos experimentais do Capítulo 2 são apontados a seguir.

2.2.1 Reagentes

A quitosana (QA) utilizada foi produzida a partir de crisálidas de bicho da seda com massa molar aproximadamente de 6.9×10^{6} Dalton e grau de desacetilação de aproximadamente 90% (PAULINO et al., 2006b). Goma arábica (GA), metacrilato de glicidila (MAG), acrilamida (AAm), persulfato de potássio (PP), Ácido acrílico (AAc), N,N'- metileno-bisacrilamida (MBA), persulfato de amônio (PA), reagente de Bradford e albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. β -D-galactosidase (Lactomax 200S, EC 3.2.1.23) foi fornecida pela Prozyn, Brasil. Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e cada solução preparada em água Milli-Q®.

2.2.2 Síntese de hidrogel a base de goma arábica

A goma arábica foi purificada antes da síntese do hidrogel dissolvendo quantidades conhecidas do polissacarídeo em água Milli-Qa 60,0 ± 1,0 °C sob agitação magnética constante por 20 min. Subsequentemente, o polissacarídeo foi precipitado em etanol, separado por centrifugação e seco por liofilização (TFD5503, Ilshin Lab. Co. Ltd., Coreia) a -60,0 \pm 1,0 °C durante 24 h. Este procedimento foi repetido três vezes para obter a goma arábica purificada. A goma arábica purificada foi modificada dissolvendo 12,0 g do polissacarídeo em 500,0 mL de água Milli-Q® a 60.0 ± 1.0 °C sob agitação magnética constante durante 20 min. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 3,5 gotejando lentamente ácido clorídrico concentrado. Após isso, 9,456 mmol de metacrilato de glicidila foram adicionados e o sistema foi mantido em agitação magnética constante por 24 h a 50,0 \pm 1,0 °C para modificação da goma arábica. O sistema foi vedado para evitar a evaporação da solução reacional. A goma arábica modificada foi precipitada em etanol, lavada várias vezes com água Milli-Q®, reprecipitada para purificação, congelada em ultrafreezer (IULT 335 D, Indrel, Brasil) e seca por liofilização a -60,0 \pm 1,0 °C por 24 h, para posterior síntese do hidrogel. Para a síntese do hidrogel foram utilizadas 7,0 g de goma arábica modificada que foi dissolvida em 50,0 mL de água Milli-Qa 50,0 ± 1,0 °C sob agitação magnética constante durante 20 min. Em seguida, 0,5215 mmol de persulfato de potássio e 0,0211 mmol de acrilamida foram adicionados, mantendo a solução aquosa a 65,0 ± 1,0 °C durante 90 min para a reticulação completa. A acrilamida foi adicionada durante esta síntese para melhorar a resistência mecânica do hidrogel final. Apesar de acrilamida ser tóxica, a baixa quantidade adicionada não gerou efeitos tóxicos para o hidrogel sintetizado. O hidrogel formado foi cortado em pequenos pedaços cilíndricos de aproximadamente 600,0 mg e secos em estufa com circulação de ar (Alpax FD) a 50,0 \pm 1,0 ° C por 24 horas para posterior aplicação nos processos de imobilização de β -Dgalactosidase.

2.2.3 Síntese de hidrogel a base de quitosana

A metodologia de síntese para o hidrogel a base de quitosana proposta por Paulino et al (2009) é realizada com quantidades conhecidas de quitosana (QA), ácido acrílico (AAc) e metileno bisacrilamida (MBA) copolimerizados na presença de PP ou PA como o iniciadores. Assim, uma solução de QA 1% foi preparada em ácido acético 2 %, em que 30,0 mL dessa solução foram adicionados em um balão de três hastes nas quais foi conectado um condensador de refluxo, um funil para adição de reagentes e um cilindro de nitrogênio gasoso. Após isso, a mistura foi deaerada por 30 min para remover interferências de oxigênio no processo de reticulação. Em seguida, foram adicionados ao balão 0,5215 mmol de PP, 3,40 mL de AAc e 0,150 g de MBA em 15,0 ml de água deionizada previamente deaerada. A solução final foi homogeneizada e mantida em agitação constante por 3 h a 70,0 ± 1,0 ° C até a completa polimerização. O hidrogel formado foi transferido para um recipiente contendo uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ por 15 min, para neutralização. O hidrogel formado foi seco por liofilização a -60,0 ± 1,0 ° C durante 12 h para posterior aplicação na imobilização de β -D-galactosidase.

2.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (espectrofotômetro Nickelson FT-IR_{max} MB-100) foram registrados usando pastilhas de KBr a 1%. A resolução espectral foi de 4,0 cm⁻¹ e a taxa de aquisição de dados foi de 21 interferogramas por minuto.

2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de hidrogel foram intumescidas até atingir o equilíbrio, congeladas em nitrogênio líquido a -180 °C e secas por liofilização a -60,0 \pm 1,0 °C por 24 h. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em microscópio JEOL, modelo JSM-6701F, operando a 20 KeV.

2.2.6 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento foi determinado pela imersão de 100,0 mg de hidrogel seco em 50,0 mL de água destilada, ii) água potável, iii) solução tampão fosfato de pH 7,0 para simular o
pH do leite UHT e iv) solução tampão acetato de pH 4.0 para simular um sistema gástrico e a região do ponto isoelétrico da β -D-galactosidase. O intervalo de valores de pH avaliado nesta seção abrange valores de pHs estudados no desenvolvimento do trabalho. Estes estudos foram realizados em temperatura de 25 e 37,0 ± 1,0 °C. As massas de hidrogéis intumescidos foram medidas em intervalos de tempo 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 2880, 4320 min e o grau de intumescimento calculado usando a Equação 1:

$$GI = \frac{m_I \cdot m_S}{m_S}$$
(1)

em que m_I e m_S são as massas de hidrogéis intumescidos e secos, respectivamente.

2.2.7 Imobilização de β-D-galactosidase

A β -D-galactosidase foi imobilizada imergindo peças de 100,0 mg de hidrogel seco em erlenmeyers de vidro contendo 8,5 mL de solução tampão fosfato a pH 7,0 ou solução tampão acetato a pH 4,0, e 1,5 mL de β -D-galactosidase, mantidos à temperatura de 25 ± 1,0 °C. A concentração de β -D-galactosidase nas soluções aquosas durante os estudos de imobilização foram realizadas por espectrofotometria UV-vis (Femto Cirrus 80SA), preparando as amostras coletadas entre 0 e 1440 min pelo método de Bradford (1976). A concentração foi calculada utilizando uma curva de calibração de absorbância versus concentração de ASB. A capacidade de imobilização (qe) da β -D-galactosidase no hidrogel foi calculada usando a Equação 2:

$$q_e = \left(\frac{C_0 - C_{eq}}{m_S}\right) . V$$
⁽²⁾

em que C_o e C_{eq} são as concentrações inicial e equilíbrio de β -D-galactosidase, respectivamente, m_s é a massa de hidrogel seco e V é o volume de solução tampão contendo β -D-galactosidase.

A eficiência de imobilização (EI) foi calculada usando a Equação 3:

$$EI(\%) = \frac{Cenzima_{(t=0)} - Cenzima_{(t)}}{Cenzima_{(t=0)}}$$
(3)

em que Cenzima_(t=0) é a concentração inicial de β -D-galactosidase na solução, Cenzima_(t) é a concentração remanescente de β -D-galactosidase após o processo de imobilização no hidrogel em um tempo t específico.

2.2.8 Hidrólise de lactose padrão usando β-D-galactosidase livre

A lactose padrão foi hidrolisada adicionando em erlenmeyers de vidro 2,0 mL de β -Dgalactosidase livre 9,0 % (v/v), 9,0 mL de solução tampão fosfato de pH 7,0 ou solução tampão de acetato de pH 4,0, e 1,0 mL de solução de lactose padrão 5,0% (m/v), à temperatura de 25 ± 1,0 °C. Alíquotas da solução de lactose foram coletadas para análise por espectrofotometria UV-vis em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min usando um kit Bioclin.

2.2.9 Hidrólise de lactose padrão usando β-D-galactosidase imobilizada

A lactose padrão foi hidrolisada por imersão do hidrogel a base de goma arábica ou hidrogel a base de quitosana, contendo β -D-galactosidase imobilizada, em erlenmeyers de vidro contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato de pH 7,0 e 1,0 mL de solução de lactose padrão 5,0 % (m/v) à temperatura de 25 ± 1,0 °C e à 37,0 ± 1,0 °C. Alíquotas de solução foram coletadas para análise por espectrofotometria UV-vis em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min usando um Kit Bioclin.

2.2.10 Reciclo de hidrogel contendo β-D-galactosidase imobilizada

Os hidrogéis contendo β -D-galactosidase imobilizada, previamente aplicados na hidrólise de lactose, foram secos em estufa com circulação de ar a 37,0 ± 1,0 ° C por 24 h e imersos numa solução contendo 9,0 mL de tampão fosfato de pH 7,0 e 1,0 mL de lactose padrão 5,0 % (m/v), à temperatura de 25 ± 1,0 °C. Neste novo ciclo de hidrólise, foram coletadas alíquotas de solução em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min e a hidrólise da lactose foi monitorada por espectrofotometria UV-vis utilizando um kit Bioclin. No final de cada ciclo, o hidrogel foi removido da solução de lactose, lavado com água Milli-Q e seco por liofilização durante 24 h para

subsequente reaplicação num novo ciclo de hidrólise. A atividade da β-D-galactosidase no hidrogel após cada ciclo foi calculada utilizando a Equação 4:

Atividade relativa =
$$\frac{\text{Atividade enzimática em n ciclo}}{\text{Atividade enzimática no 1° ciclo}}$$
(4)

2.2.11 Produção de leite com baixo teor de lactose

A lactose contida no leite UHT foi hidrolisada por imersão de hidrogéis contendo β -Dgalactosidase imobilizada em erlenmeyers contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato de pH 7,0 e 1,0 mL de leite UHT, à temperatura de 25 ± 1,0 °C. Alíquotas de amostras de leite foram coletadas para análise por espectrofotometria UV-vis em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min.

2.2.12 Liberação controlada de β-D-galactosidase

O processo de liberação controlada foi realizado introduzindo hidrogéis secos contendo β -D-galactosidase imobilizada em erlenmeyers com solução tampão fosfato ou solução tampão acetato em diferentes temperaturas. A concentração de β -D-galactosidase liberada em solução aquosa foi monitorada em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min e determinada por espectrofotometria Uv-vis utilizando o método de Bradford. A fração de β -D-galactosidase liberada a partir dos hidrogéis foi calculada utilizando a Equação 5:

$$Fração Liberada (FL) = \frac{Quantidade liberada}{Quantidade absorvida}$$
(5)

2.2.13 Análise estatística

Os resultados das análises estatísticas foram expressos como média \pm desvio padrão para a capacidade e eficiência de imobilização de β -D-galactosidase, atividade de β -D-galactosidase, concentração de glicose, fração liberada de β -D-galactosidase e atividade relativa de β -D-

galactosidase. Todos os dados foram calculados para amostras em triplicata usando ANOVA e considerando o teste t, com nível de significância de 95 % (p < 0.05).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e discussão referentes ao Capítulo 2.

2.3.1 Espectros de FT-IR do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana

Na Figura 1 são apresentados os espectros de FT-IR para a goma arábica purificada (a), metacrilato de glicidila (b), goma arábica modificada (c) e hidrogel a base de goma arábica (d). A banda de absorção em aproximadamente 1620 cm⁻¹ no espectro de goma arábica purificada está relacionada a grupos – C-O de polissacarídios purificados. A banda em aproximadamente 1700 cm⁻¹ no espectro do metacrilato de glicidila está associada à frequência de estiramento dos grupos carbonilas (-C=O) do éster conjugado. Este grupo químico foi adicionado à estrutura molecular do polissacarídeo purificado durante o processo de modificação para iniciar o processo de reticulação na síntese do hidrogel.

As bandas de absorção em aproximadamente 2930 cm⁻¹ para todos os espectros correspondem às frequências de alongamento dos grupos –C-H. Devido à pequena quantidade de acrilamida adicionada durante a síntese do hidrogel, foram encontradas frequências discretas de estiramento para grupos amina no espectro de hidrogel em aproximadamente 1500 cm⁻¹. No entanto, o aumento na faixa de absorção em aproximadamente 1700 cm⁻¹ indica a presença de maiores quantidades de grupos carbonila após a síntese do hidrogel. As bandas registadas a aproximadamente 3500 cm⁻¹ nos espectros da goma arábica purificada, da goma arábica modificada e do hidrogel a base de goma arábica sugerem a presença de grupos hidroxilas (OH). Pode-se inferir, portanto, que o hidrogel a base de goma arábica foi efetivamente sintetizado e o processo de gelificação foi satisfatório.

Figura 1 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier para a goma arábica purificada (a), metacrilato de glicidila (b), goma arábica modificada (c) e hidrogel a base de goma arábica (d)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os espectros de FT-IR para a molécula de quitosana e hidrogel a base de quitosana são apresentadas nas Figuras 2a e 2b, respectivamente. A molécula de quitosana exibe uma banda de absorção em 3425 cm⁻¹ devido ao estiramento de grupos hidroxilas. Uma vez que as ligações de hidrogênio entre grupos OH e C=O presentes nos hidrogel a base de quitosana são mais fracas do que a autoassociação de grupos OH em moléculas de quitosana, o estiramento relacionado aos grupos OH presentes nos hidrogéis a base de quitosana deslocou-se para números de onda mais elevados (i.e., 3455 cm⁻¹). A banda de absorção em 1645 cm⁻¹ na molécula de quitosana é atribuída ao estiramento de grupos NH₂. Em quitosana com alto grau de acetilação, a vibração e o estiramento de grupos CN devido à presença de grupos NH-COCH₃ apareceu em 1626 cm⁻¹, e a intensidade desta banda depende do grau de acetilação, bem como da extensão da ligação de hidrogênio entre amida e dos grupos hidroxilas (PAULINO et al., 2006b).

Figura 2 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier para a molécula de quitosana (a) e hidrogel a base de quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As interações de hidrogênio inter e intramolecular podem ocorrer entre grupos hidroxilas do carbono-3 e carbono-6 em moléculas de quitosana. Além disso, ocorre uma forte ligação de hidrogênio entre esses grupos hidroxilas e grupos carbonilas (ZHANG et al., 2000). As bandas de absorção entre 2850 e 2950 cm⁻¹ indicam a presença de grupos metilas. Os estiramentos dos grupos carbonilas entre 1715 e 1724 cm⁻¹ os quais são característicos de ácidos carboxílicos foram observados nos espectros do hidrogel a base de quitosana. Os estiramentos assimétricos devido aos grupos carboxilatos podem ser observados entre 1552 e 1574 cm⁻¹ enquanto que os estiramentos simétricos próximos a 1400 cm⁻¹ devido à presença de grupos do ácido poliacrílico reticulado. Os estiramentos dos grupos amidas da molécula de quitosana acetilada e molécula de N',N' - metileno-bisacrilamida são observados em 1650 cm⁻¹. A deformação planar dos grupos N-H provenientes de moléculas de amida podem ser visualizados em aproximadamente 1575 cm⁻¹. A banda de absorção em 1451 cm⁻¹ observado nos dois espectros é devido aos grupos metilas. Finalmente, a banda de absorção em 1110 cm⁻¹ pode ser atribuída aos estiramentos e vibrações dos grupos C-N dos anéis sacarídeos.

2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 3 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura parao hidrogel a base de goma arábica imediatamente após a síntese e seco por liofilização (a) e

hidrogel a base de goma arábica, intumescido até atingir o equilíbrio e subsequentemente seco por liofilização (b).

Figura 3 – Imagens de microscopia de varredura eletrônica para o hidrogel a base de goma arábica imediatamente depois de sintetizado e seco por liofilização (a) e hidrogel intumescido até atingir o equilíbrio e subsequentemente seco por liofilização (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Uma estrutura muito mais porosa pode ser observada no hidrogel intumescido até atingir o equilíbrio e seco por liofilização uma vez que os poros permanecem abertos durante a análise morfológica. O tamanho médio de poros para este hidrogel foi de aproximadamente 45 µm. Por outro lado, uma estrutura rígida e não porosa pode ser observada para o hidrogel analisado imediatamente após a síntese uma vez que os poros permaneceram fechados durante a análise morfológica.

Na Figura 4 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura para o hidrogel a base de quitosana. Uma estrutura menos porosa do que no hidrogel de goma arábica foi observada. Como conclusão, a superfície do hidrogel a base de quitosana foi mais densa e homogênea.

Figura 4 - Imagens de microscopia de varredura eletrônica para hidrogel a base de quitosana, intumescido até equilíbrio e seco por liofilização em diferentes ampliações (a e b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.3.3 Grau de intumescimento

Na Figura 5 são apresentados os graus de intumescimento dos hidrogéis a base de goma arábica em solução tampão acetato de pH 4,0, solução tampão fosfato de pH 7,0, água destilada e água potável, à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C (a) e $37,0 \pm 1,0$ °C (b).

Figura 5 - Graus de intumescimento em função do tempo para hidrogel a base de goma arábica em solução tampão acetato de pH 4,0, solução tampão fosfato de pH 7,0, água destilada e água potável, à temperatura de 25 ± 1,0 °C (a) e 37,0 ± 1,0 °C (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O equilíbrio máximo de intumescimento à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C foi atingido após 1440 min para todos os meios aquosos. Em contraste, o equilíbrio ocorreu somente após 4320 min a 37,0 ± 1,0 °C. Os graus de intumescimento máximos em solução tampão acetato à temperatura

de $25 \pm 1,0$ °C e $37,0 \pm 1,0$ °C foram 6,49 e 8,16 g de água por g de hidrogel seco, respectivamente. Em solução tampão fosfato foram 8,58 e 10,71, respectivamente. Os graus de intumescimento máximos em água destilada foram 12,56 e 17,72 g de água por g de hidrogel seco e em água potável foram 10,65 e 12,58 g de água por g de hidrogel seco à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C e $37,0 \pm 1,0$ °C, respectivamente.

Na Figura 6 são apresentados os graus de intumescimento dos hidrogéis a base de quitosana em solução tampão acetato de pH 4,0, solução tampão fosfato de pH 7,0, água destilada e água potável, à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C (a) e $37,0 \pm 1,0$ °C (b).

Figura 6 - Graus de intumescimento em função do tempo para hidrogel a base de quitosana em tampão acetato de pH 4,0, solução tampão fosfato de pH 7,0, água destilada e água potável, à temperatura de 25 ± 1,0 °C (a) e 37,0 ± 1,0 ° C (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O equilíbrio máximo de intumescimento à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C foi atingido após 1440 min para todos os meios aquosos. Porém, o equilíbrio foi observado após 4320 min a 37,0 ± 1,0 °C. Os graus de intumescimento máximos em solução tampão acetato à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C e $37,0 \pm 1,0$ °C foram 9,58 e 21,68 g de água por g de hidrogel seco, respectivamente. Em solução tampão fosfato foram 45,46 e 60,27 g de água por g de hidrogel seco, respectivamente. Os graus de intumescimento máximos em água destilada foram 113,89 e 167,09 g de água por g de hidrogel seco à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C e $37,0 \pm 1,0$ °C, respectivamente. Por fim, em água potável os graus de intumescimento máximos foram 101,01 e 146,47 g de água por g de hidrogel seco, respectivamente.

Os graus de intumescimento dos hidrogéis aumentaram com o tempo de contato, temperatura e pH. Com o aumento de temperatura ocorre a expansão do hidrogel devido à

desestabilização térmica dos retículos da rede polimérica, aumentando os graus de intumescimento (MOURA et al., 2008; FACIN et al., 2015). O maior grau de intumescimento foi observado em água destilada devido à ausência de sais minerais ou outros íons os quais diminuem as repulsões eletrostáticas entre os grupos glucurônicos presentes nas redes poliméricas dos hidrogéis. Além disso, o intumescimento em valores de pH menores foram influenciados pela protonação dos grupos aniônicos dos hidrogéis e diminuição das repulsões eletrostáticas as quais são responsávies pelo aumento do hidrogel e de seu grau de intumescimento.

A absorção de água em hidrogéis envolve basicamente interações físicas e de hidrogênio enquanto que a adsorção de íons catiônicos ou aniônicos envolve interações químicas com maior intensidade de interação (BRAZEL; PEPPAS, 1999; GUILHERME et al., 2015). Assim, o grau de intumescimento em solução tampão acetato de pH 4,0 foi afetado pela presença de prótons do meio ácido e íons de Na²⁺ proveniente dos compostos utilizados para o preparado da solução tampão. Maior grau de intumescimento foi observado em solução tampão fosfato de pH 7,0 devido à diminuição de prótons em solução. Desta forma, em meios com pH ácido, os grupos aniônicos hidrofílicos da estrutura tridimensional do hidrogel estarão protonados e haverá menor repulsão eletrostática entre eles, justificando os menores valores dos graus de intumescimento (PEPPAS e BURES, 2000; ZONATTO et al., 2017). A expansão da cadeia hidrofílica dos hidrogéis aumenta a taxa de transferência de massa de solutos orgânicos e inorgânicos através da matriz polimérica (CAETANO et al., 2011). Com isso, o estudo do grau de intumescimento é muito importante para a aplicação de β -D-galactosidase imobilizada na hidrólise de lactose e em processos de liberação controlada. O conhecimento da cinética de intumescimento é importante para avaliar a capacidade dos materiais para diferentes aplicações. Por fim, é evidente que o hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base quitosana são sensíveis a variação do pH e temperaturas, podendo ser utilizados na imobilização e liberação de β-D-galactosidase para hidrólise de lactose.

2.3.4 Imobilização da β-D-galactosidase

Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as capacidades de imobilização (a) e as eficiências de imobilização (b) de β -D-galactosidase, em função do tempo de contato, no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana, respectivamente, em pH 4,0 e 7,0 temperatura de 25 ± 1,0 °C.

Figura 7 - Capacidades de imobilização (a) e eficiências de imobilização (b) de β -D-galactosidase no hidrogel a base de goma arábica versus tempo de contato. Condições experimentais: solução tampão acetato de pH 4,0 e solução tampão fosfato de pH 7,0 à temperatura de 25 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 8 - Capacidades de imobilização (a) e eficiências imobilização (b) de β -D-galactosidase no hidrogel a base de quitosana versus tempo de contato. Condições experimentais: solução tampão acetato de pH 4,0 e solução tampão fosfato de pH 7,0, à temperatura de 25 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As capacidades de imobilização da β -D-galactosidase no hidrogel a base de goma arábica em soluções tampão acetato de pH 4,0 e tampão fosfato de pH 7,0 foram de 242,52 ± 0,13 e 118,42 ± 0,23 mg de enzima por g de hidrogel seco, respectivamente, após 1440 min de contato. As eficiências de imobilização em soluções tampão acetato e tampão fosfato foram de 7,78 ± 0,08 e 5,55 ± 0,05 % (m/m), respectivamente. As capacidades de imobilização no hidrogel a base de quitosana em soluções tampão acetato de pH 4,0 e tampão fosfato de pH 7,0 foram de 257,12 ± 3,18 e 157,87 ± 1,96 mg de enzima por g de hidrogel seco, respectivamente. As eficiências de imobilização em soluções tampão acetato e tampão fosfato foram de 27,91 \pm 0,08 e 20,54 \pm 0,55 % (m/m), respectivamente.

O grau de intumescimento de um hidrogel e o ponto isoelétrico de uma proteína ou enzima são parâmetros que podem afetar significativamente as capacidades de imobilização (CIBOROWSKI; SILBERRING, 2016). A tendência em ocorrer à difusão da enzima para o interior da rede polimérica tridimensional do hidrogel aumenta com o aumento do grau de intumescimento do hidrogel para muitos solutos. Entretanto, na imobilização de β-D-galactosidase foi verificado que o grau de intumescimento em pH 7,0 foi superior do que em pH 4,0 enquanto que a capacidade de imobilização foi menor devido a influência do ponto isoelétrico da β -D-galactosidase que é em pH 4,8 (MBUYI-KALALA et al, 1988; PANESAR et al., 2006) Como a β-D-galactosidase está positivamente carregada em pH 4,0, ocorre atração eletrostática com as cargas negativas dos grupos aniônicos da rede polimérica dos hidrogéis, resultando em capacidades de imobilização maiores. Por outro lado, a enzima está negativamente carregada em pH 7,0, resultando em menores capacidades de imobilização devido às repulsões eletrostáticas entre as cargas negativas da enzima e os grupos aniônicos nas redes poliméricas dos hidrogéis. Apesar de ambos os hidrogéis serem sensíveis ao pH durante a imobilização de β-D-galactosidase, as capacidades e eficiências de imobilização foram maiores em pH 4,0 do que em pH 7,0. Assim, o ponto isoelétrico da enzima influencia mais significativamente as capacidades de imobilização do que o pH.

2.3.5 Hidrólise de lactose padrão usando β-D-galactosidase livre

A hidrólise de lactose padrão em solução tampão acetato de pH 4,0 e solução tampão fosfato de 7,0 usando β -D-galactosidase livre foi confirmada pela produção de glicose e atividade enzimática. Na Figura 9a são apresentadas as concentrações de glicose e na Figura 9b as atividades enzimáticas em função do tempo à temperatura de 25 ± 1,0 °C.





Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A quantidade de lactose hidrolisada aumentou com o aumento do pH da solução uma vez que a estrutura molecular positivamente carregada de β -D-galactosidase em pH maior do que 4,8 hidrolisa mais facilmente as moléculas de lactose, sofrendo desnaturação completa (PANESAR et al., 2006). Assim, menor atividade enzimática foi determinada durante a hidrólise da lactose em condições mais ácidas. A atividade enzimática tende a zero para a hidrólise da lactose usando β -D-galactosidase livre após um determinado tempo (FACIN et al., 2015). Além disso, como não é possível reutilizar a enzima livre em outros procedimentos de hidrólise, o custo/benefício para a produção industrial de leite com baixo teor de lactose usando enzima livre é maior em comparação ao uso de enzimas imobilizadas (FACIN et al., 2015).

2.3.6 Hidrólise de lactose padrão usando β-D-galactosidase imobilizada

Nas Figuras 10 e 11 são apresentados resultados de hidrólise de lactose padrão usando β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e 7,0 em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana, respectivamente.

Os perfis de atividade enzimática durante a hidrólise da lactose foram semelhantes comparando os hidrogéis contendo β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e 7,0. A quantidade de lactose hidrolisada aumentou com o aumento do pH da solução. A introdução da enzima em uma solução com pH menor do que o pH do seu ponto isoelétrico possivelmente desnatura parcialmente sua estrutura, resultando em menor atividade enzimática durante a hidrólise de lactose (PANESAR et al., 2006; ZHANG et al., 2016).

Figura 10 - Concentrações de glicose versus tempo de contato (a) e atividades enzimáticas versus tempo de contato (b) durante a hidrólise de lactose padrão usando o hidrogel a base de goma arábica contendo β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e pH 7,0. Condições experimentais para a hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 ° C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 11 - Concentrações de glicose versus o tempo de contato (a) e atividades enzimáticas versus tempo de contato (b) durante a hidrólise de lactose padrão usando o hidrogel a base de quitosana contendo β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e pH 7,0. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de $37,0 \pm 1,0$ °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Considerando relevantes os resultados na imobilização de β -D-galactosidase em ambos os hidrogéis também em soluções com pH 7,0, preferencialmente, a imobilização deve ocorrer em condições alcalinas ou neutras. Assim, pode-se obter melhor aproveitamento na hidrólise de lactose durante a produção de leite com baixo teor lactose. O aumento da concentração de glicose na ausência de β -D-galactosidase imobilizada sugere que a enzima se difundiu através dos poros dos

hidrogéis durante os primeiros 240 min de hidrólise. Após 240 min de hidrólise foi quantificado o aumento nas concentrações de glicose sendo referente à liberação parcial de β -D-galactosidase a partir dos hidrogéis (FERNANDEZ-LOPES et al., 2017).

2.3.7 Liberação controlada de β-D-galactosidase a partir dos hidrogéis

Na Figura 12 são apresentados os perfis de liberação de β -D-galactosidase imobilizada em pH 4,0 e 7,0 a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana. Observase maior fração de β-D-galactosidase liberada a partir de ambos hidrogéis quando a enzima foi imobilizada em pH 7,0 quando comparado com a enzima imobilizada em pH 4,0. O processo de imobilização de β-D-galactosidase em pH 4,0 ocorre predominantemente por interações eletrostáticas devido as cargas positivas da enzima e as cargas negativas da rede do hidrogel. Já em pH 7,0 ocorre predominantemente por interações hidrofóbicas devido as cargas negativas de ambos, enzima e hidrogel. Como as interações hidrofóbicas são em geral mais fracas, é possível que a enzima seja removida da rede polimérica com mais facilidade. Por esse motivo, a fração de β -D-galactosidase liberada a partir do hidrogel quando a enzima foi imobilizada em pH 7,0 foi maior do que quando imobilizada em pH 4,0. Isso pode indicar também que o mecanismo de imobilização de enzimas nos hidrogéis em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico pode gerar um processo parcialmente irreversível. Em processos irreversíveis, pode ocorrer a formação de ligações covalentes de alta energia (ESSA et al., 2007). No entanto, é pouco provável que tenha ocorrido ligações covalentes durante o processo de imobilização porque a enzima não sofreu desnaturação e foi eficientemente utilizada para a hidrólise de lactose contida em solução aquosa de lactose padrão bem como em leite UHT.

A enzima é desnaturada tornando-se inativada quando perde sua estrutura secundária e/ou terciária e seu arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica é rompido. Assim o número de interações enzimáticas com o suporte aumenta e a desimobilização é mais difícil (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). As interações físico-químicas que ocorrem entre enzima e hidrogel durante os estudos de imobilização são usadas para definir processos de dessorção e liberação (PAULINO et al., 2010; PAULINO et al., 2011; ZONATTO et al., 2017). Os processos de dessorção e liberação a partir de hidrogéis podem ocorrer por desestabilização de interações físico-químicas entre os seguimentos poliméricos e seguimentos dos solutos, seguido de

difusão através dos poros (ZONATTO et al., 2017). Na imobilização, ocorre a difusão de água para o interior da rede do hidrogel, transportando a enzima a qual é mantida por interações intermoleculares. As eficiências dos processos de dessorção e liberação dependem dos tipos de interações intermoleculares (interações eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, de hidrogênio e covalentes) que ocorreram.

Figura 12 - Frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) quando imobilizadas em pH 4,0 e pH 7,0. Condições experimentais para o processo de liberação: pH 7,0 e temperatura de 37,0 \pm 1,0 ° C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.3.8 Reciclo de hidrogel contendo β-D-galactosidase imobilizada

Na Figura 13 são apresentadas as concentrações de glicose formada (a) e as atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (b), em função do tempo, durante os ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C. Na Figura 14 são apresentadas as concentrações de glicose formada (a) e as atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana (b), em função do tempo, durante os ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C.

A concentração de glicose formada aumentou e a atividade enzimática diminuiu com o aumento do tempo para os estudos em ambos hidrogéis. Contudo, a β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foram utilizadas, respectivamente, por três e cinco ciclos sucessivos de hidrólise da lactose padrão sem perder a sua atividade enzimática de forma que impedisse seu reciclo. A pressão osmótica devido à diferença

entre a concentração de lactose na solução aquosa externa e dentro da rede tridimensional hidrofílica do hidrogel influencia na difusão do soluto (ZHANG et al., 2017). Após difusão através da rede do hidrogel, a lactose é hidrolisada ao entrar em contato com a β -D-galactosidase imobilizada ou β -D-galactosidase dispersa na estrutura porosa da matriz polimérica, produzindo glicose e galactose. Consequentemente, um alimento com baixo teor de lactose pode ser eficientemente produzido.

Figura 13 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (b), versus tempo, durante três ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 14 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de quitosana (b), versus tempo, durante cinco ciclos de hidrólise de lactose padrão a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.3.9 Hidrólise de lactose contida em leite UHT usando β-D-galactosidase imobilizada

Na Figura 15 são apresentadas as concentrações de glicose formada (a) e as atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (b), em função do tempo, durante os ciclos de hidrólise da lactose contida no leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C. Na Figura 16 são apresentadas as concentrações de glicose formada (a) e as atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana (b), em função do tempo, durante os ciclos de hidrólise da lactose contida no leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C.

Figura 15 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (b), versus tempo, durante três ciclos de hidrólise de lactose contida em leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 16 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de quitosana (b), versus tempo, durante cinco ciclos de hidrólise de lactose contida em leite UHT a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Na Figura 17 está apresentada a atividade enzimática relativa de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) durante os ciclos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT, a pH 7,0 e 37,0 ± 1,0 ° C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As atividades enzimáticas relativas de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica durante a hidrólise da lactose padrão e lactose contida no leite UHT foram 52,79 ± 0,85 e 93,92 ± 1,05 % (m/m), respectivamente, após três ciclos de hidrólise. Em hidrogel a base de quitosana, as atividades enzimáticas relativas de β -D-galactosidase imobilizada foram 52,84 ± 0,27 e 84,73 ± 1,09 % (m/m), respectivamente, após cinco ciclos de hidrólise.

De acordo com as normas brasileiras, a composição do leite UHT deve ser 3,0 % em gordura, 2,9 % em proteína, 8,4 % em sólidos livres de gordura e 5,0 % em lactose a qual precisa ser hidrolisada quando o consumo é feito por indivíduos intolerantes à lactose (BRASIL, 2011). Assim, a β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel poderia ser empregada por vários ciclos sucessivos na hidrólise de lactose e produção de alimentos com baixo teor de lactose, sem comprometer sua atividade enzimática para futuros usos. A hidrólise da lactose contida no leite UHT foi mais eficiente em comparação a hidrólise da lactose padrão, provavelmente devido a cofatores enzimáticos comumente encontrados em alimentos lácteos que são catalizadores na hidrólise de lactose (AHMAD et al., 2013; BOVENHUIS et al., 2016). Cofatores enzimáticos tais como íons Na⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺ contidos no leite UHT auxiliam na hidrólise da lactose pela beta D-galactosidase (CAVAILLE et al., 1995; PLOU et al., 2016).

Como a liberação de β -D-galactosidase deve ser menor durante os ciclos de reutilização do hidrogel, a hidrólise da lactose contida no leite UHT ocorreu quase exclusivamente devido à presença da enzima imobilizada. A hidrólise de lactose usando β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polissacarídios é então uma excelente alternativa para a produção de alimentos com baixo teor de lactose devido à possibilidade de reciclo da enzima imobilizada por vários ciclos sem perda significativa da atividade enzimática. Como a β -D-galactosidase livre perde sua atividade após o primeiro ciclo de hidrólise da lactose, o custo/benefício para a produção de alimentos com baixo teor de lactose aumenta quando comparado à produção usando enzima imobilizada (ANSARI; SATAR, 2012; FACIN et al., 2015).

2.4 CONCLUSÃO

O hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são excelentes matrizes sólidas para imobilização de β -D-galactosidase e hidrólise de lactose padrão ou lactose contida em leite UHT. A aplicação de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis é atraente para a produção de leites com baixo teor de lactose, usados para o consumo de indivíduos intolerantes à lactose.

As capacidades de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica usando solução tampão acetato de pH 4,0 e solução tampão fosfato de pH 7,0 foram 242,52 ± 0,13 e 118,42 ± 0,23 mg enzima por g de hidrogel seco, respectivamente. As eficiências de imobilização foram 7,78 ± 0,08 e 5,55 ± 0,05 % (m/m), respectivamente, após 1440 min de contato. As capacidades de imobilização no hidrogel a base de quitosana nessas mesmas condições foram 257,12 ± 3,18 e 157,87 ± 1,96 mg de enzima por g de hidrogel seco, respectivamente. As eficiências de imobilização foram 27,91 ± 0,08 e 20,54 ± 0,55 % (m/m), respectivamente. As capacidades e eficiências de imobilização foram afetadas pelo pH da solução, temperatura, concentração inicial e ponto isoelétrico da enzima, concluindo que esses parâmetros devem ser otimizados para melhorar a atividade hidrolítica e também controlar a liberação de enzima durante a aplicação.

As atividades enzimáticas de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica, durante a hidrólise da lactose e lactose padrão contida no leite UHT, foram 52,79 ± 0,85 e 93,92 ± 1,05 % (m/m), respectivamente, após três ciclos sucessivos de hidrólise. Em hidrogel a base de quitosana, as atividades enzimáticas de β -D-galactosidase imobilizada após cinco ciclos sucessivos de hidrólise foram 52,84 ± 0,27 e 84,73 ± 1,09 % (m/m), respectivamente. Cofatores

enzimáticos em alimentos lácteos contribuem para melhorar a eficiência de hidrólise da lactose e o custo/benefício da produção de alimentos com baixo teor de lactose. Portanto, a β -D-galactosidase imobilizada em ambos os hidrogéis a base de polisacarídeos poderia ser empregada para a produção de alimentos com baixo teor de lactose sem perder a atividade enzimática que comprometa sua reutilização.

3 CAPÍTULO 3

PLANEJAMENTO DCCR 2³ PARA IMOBILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE NOS HIDROGÉIS E HIDRÓLISE DE LACTOSE

3.1 INTRODUÇÃO

A β -D-galactosidase tem grande importância no processamento de alimentos com baixo teor de lactose. A β -D-galactosidase hidrolisa as ligações β -(1-4) na lactose, produzindo glicose e galactose (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985). A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogéis constituídos de polissacarídios é uma estratégia vantajosa nos processos industriais como catalizadores potencialmente ativos e estáveis (PANESAR et al, 2010; LIU et al., 2012). A imobilização em suportes insolúveis e inertes como o hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana é uma técnica eficiente e promissora para a atividade enzimática. Além da possibilidade de separação do suporte contendo a enzima no final do processo, essa técnica possibilita a reutilização da enzima em ciclos sucessivos (FACIN et al., 2015).

As limitações das enzimas solúveis em aplicações industriais são superadas com a imobilização enzimática, sendo uma excelente alternativa para utilizar enzimas em larga escala (HUSAIN et al., 2011). Diante disso, torna-se essencial o desenvolvimento de técnicas para imobilização de β-D-galactosidase para a produção de leite com baixo teor de lactose. O hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana têm despertado grande interesse nos processos de imobilização de enzima devido às suas biodegradabilidades, biocompatibilidades e baixas toxicidades (KIM et al., 2012; FACIN et al., 2015; ELIEH-ALI-KOMI et al., 2016; ZONATTO et al., 2017; WOLF et al., 2018). Hidrogéis são redes poliméricas tridimensinoais hidrofílicas reticuladas que possuem alta capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos (PAULINO et al., 2010; BORTOLIN et al., 2012). Com isso, os hidrogéis a base de polissacarídios naturais como goma arábica e quitosana são excelentes suportes para a imobilização enzimática (COVIELLO et al., 2007; PAULINO et al., 2010; ZONATTO et al., 2017).

A adsorção física é considerada um método simples de imobilização de enzima em um suporte insolúvel. Os biocatalizadores são mantidos na superfície dos suportes por forças de van der waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas. Este método tem a

vantagem da baixa influência da conformação do biocatalisador. Em contrapartida, a desvantagem da técnica são as fracas forças de ligações de adsorção (RUEDA et al., 2016; PANESAR et al., 2010). Com isso, na imobilização e liberação de β-D-galactosidase a partir dos hidrogéis a base de polissacarídios é necessário entender os fatores que afetam o comportamento de interação tais como temperatura, concentração de enzima, pH, dentre outros.

A otimização do processo de imobilização e a investigação dos efeitos combinados de muitos fatores, bem como as interações entre eles, influenciam na resposta final desejada. Assim, um planejamento composto central rotacional (DCCR) usando metodologias de construção de superfícies de resposta (RSM) é importante para prever esses efeitos. A metodologia de superfície de resposta é baseada no uso de um grupo de técnicas estatísticas para o desenvolvimento e otimização de processos nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis. Nessa metodologia são definidos os efeitos de variáveis independentes individuais ou em combinação para cada processo de imobilização. Além disso, o uso desta metodologia possibilita a geração de modelos matemáticos fundamentais para a explicação dos dados experimentais (BAS; BOYACI, 2007; BEZERRA et al., 2008).

A técnica de DCCR é comumente utilizada para análise e modelagem de processos em geral. Esta técnica é considerada suficiente para descrever a maioria das respostas de um processo. O número de testes necessários para DCCR inclui o padrão fatorial 2^k com sua origem no centro e pontos 2k axiais fixados a uma distância chamada α a partir do centro, no qual k é o número de variáveis. Os pontos axiais são escolhidos para permitir a rotacionalidade (BOX e HUNTER, 1957) e garantir a variância constante da previsão do modelo em todos os pontos equidistantes do centro. Repetições do teste no centro são importantes para fornecer uma estimativa independente do erro experimental (ASLAN, 2008).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e métodos utilizados durante os procedimentos experimentais do Capítulo 3 são apontados a seguir.

3.2.1 Planejamento experimental para imobilização de β-D-galactosidase

Um planejamento experimental para a imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foi realizado considerando como variáveis respostas a capacidade de imobilização (mg g⁻¹), atividade enzimática (U mg⁻¹) e fração de enzima imobilizada. As variáveis independentes foram temperatura (°C) (X₁), concentração inicial de enzima (mg mL⁻¹) (X₂) e pH (X₃). Foi utilizado como ferramenta o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ completo com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios realizados em duplicatas. Os resultados das variáveis dependentes foram tratados aplicando a análise de variância (ANOVA) para testar a adequação dos modelos. A validação de cada modelo foi realizada através do teste F e pelo coeficiente de determinação (R²), sob o intervalo de confiança de 95 % (p < 0,05) (BARROS NETO et al., 2003). Todos os ensaios foram considerados em duplicatas e a reprodutibilidade foi verificada repetindo-se alguns ensaios para dias aleatórios. O planejamento foi desenvolvido e analisado utilizando o software STATISTICA 7.0.

Os valores definidos com base na literatura e utilizados no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 é ilustrada a matriz do planejamento DCCR 2³.

				Níveis					
Fatores	Código	-1,68	-1	0	1	1,68			
Temperatura (°C)	X1	16,59	20,00	25,00	30,00	33,41			
Concentração inicial de enzima (mg mL ⁻¹)	X2	13,65	24,46	39,88	55,30	66,60			
pH	X3	5,66	6,00	6,50	7,00	7,34			

 Tabela 1 - Variáveis independentes com os respectivos níveis utilizados no planejamento experimental para imobilização de β-D-galactosidase em hidrogéis a base de goma arábica e hidrogéis a base de quitosana

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

abela 2 - Valores codificados e reais do planejamento DCCR 2 ³ com três variáveis independentes
três repetições no ponto central e seis pontos axiais para imobilização e aplicação d
β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a bas
de quitosana. Variáveis independentes: Temperatura (X1), Concentração de enzim
$(X_2) e pH (X_3)$

	Condições experimentais						
Ensaio	X1	X2	X3				
1	-1 (20,0)	-1 (24,46)	-1 (6,0)				
2	+1 (20,0)	-1 (55,30)	-1 (6,0)				
3	-1 (30,0)	+1 (24,46)	-1 (6,0)				
4	+1 (30,0)	+1 (55,30)	-1 (6,0)				
5	-1 (20,0)	-1 (24,46)	+1 (7,0)				
6	+1 (20,0)	-1 (55,30)	+1 (7,0)				
7	-1 (30,0)	+1 (24,46)	+1 (7,0)				
8	+1 (30,0)	+1 (55,30)	+1 (7,0)				
9	-1,68 (16,6)	0 (39,88)	0 (6,5)				
10	+1,68 (33,41)	0 (39,88)	0 (6,5)				
11	0 (25,0)	-1,68 (13,65)	0 (6,5)				
12	0 (25,0)	+1,68 (66,60)	0 (6,5)				
13	0 (25,0)	0 (39,88)	-1,68 (5,66)				
14	0 (25,0)	0 (39,88)	+1,68 (7,34)				
15	0 (25,0)	0 (39,88)	0 (6,5)				
16	0 (25,0)	0 (39,88)	0 (6,5)				
17	0 (25,0)	0 (39,88)	0 (6,5)				

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e discussão referentes ao Capítulo 3.

3.3.1 Planejamento experimental para imobilização de β-D-galactosidase nos hidrogéis

Os resultados médios de capacidade de imobilização, atividade enzimática e fração de β -D-galactosidase liberada a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

	enzima ((X_2) e pl Condiçõe	$H(X_3)$		• / • 1				
	ex	periment	ais	Variaveis de resposta					
Ensaio	X1	X2	X3	Capacidade de imobilização (mg g ⁻¹)	Atividade enzimática (U mg ⁻¹)	Fração liberada			
1	-1	-1	-1	$99,\!18\pm0,\!31$	$0,\!156\pm0,\!001$	$0,348 \pm 0,002$			
2	-1	-1	1	$95{,}66\pm0{,}52$	$0,\!205\pm0,\!001$	$0,\!456\pm0,\!004$			
3	-1	1	-1	$104,\!81\pm0,\!48$	$0{,}204\pm0{,}000$	$0,463 \pm 0,001$			
4	-1	1	1	$101,\!21\pm0,\!71$	$0,\!299\pm0,\!001$	$0{,}598 \pm 0{,}000$			
5	1	-1	-1	$103,\!35\pm0,\!66$	$0,\!108\pm0,\!002$	$0,\!140\pm0,\!000$			
6	1	-1	1	$77,\!06\pm0,\!31$	$0,131 \pm 0,001$	$0,\!277\pm0,\!000$			
7	1	1	-1	$129,\!36\pm1,\!26$	$0,\!183\pm0,\!001$	$0,\!208\pm0,\!000$			
8	1	1	1	$91,\!76\pm0,\!00$	$0,231 \pm 0,000$	$0,311 \pm 0,001$			
9	-1,68	0	0	$80,\!19\pm0,\!42$	$0,\!258\pm0,\!001$	$0{,}519\pm0{,}000$			
10	1,68	0	0	$106,\!63 \pm 0,\!94$	$0,\!093\pm0,\!001$	$0,214 \pm 0,000$			
11	0	-1,68	0	$87,\!95\pm0,\!72$	$0,\!105\pm0,\!001$	$0,\!172\pm0,\!000$			
12	0	1,68	0	$138{,}50\pm0{,}83$	$0,321 \pm 0,000$	$0,534 \pm 0,001$			
13	0	0	-1,68	$95{,}67 \pm 0{,}68$	$0,\!125\pm0,\!000$	$0,205 \pm 0,000$			
14	0	0	1,68	$91,\!11\pm0,\!77$	$0,\!254\pm0,\!001$	$0{,}539 \pm 0{,}002$			
15	0	0	0	$151,\!81\pm0,\!48$	$0{,}249\pm0{,}001$	$0,399 \pm 0,000$			
16	0	0	0	$150{,}87\pm0{,}02$	$0,\!243\pm0,\!001$	$0{,}415\pm0{,}000$			
17	0	0	0	$150,\!86\pm0,\!71$	$0,\!246\pm0,\!000$	$0,\!408\pm0,\!000$			

Tabela 3 - Resultados do planejamento DCCR 2³ para capacidade de imobilização, atividade enzimática e fração de β-D-galactosidase liberada a partir do hidrogel a base de goma arábica. Variáveis independentes: Temperatura (X₁), concentração inicial de enzima (X₂) e pH (X₃)

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

	P (1-)	,							
	Condições experimentais			Condições experimentais Variáveis de resposta					
Ensaio	X1	X2	X3	Capacidade de imobilização (mg g ⁻¹)	Atividade enzimática (U mg ⁻¹)	Fração liberada			
1	-1	-1	-1	$125,39 \pm 1,62$	$0,136 \pm 0,001$	$0,223 \pm 0,007$			
2	-1	-1	1	$119,\!30\pm1,\!04$	$0,\!174\pm0,\!002$	$\textbf{0,268} \pm \textbf{0,007}$			
3	-1	1	-1	$129,\!19\pm1,\!41$	$0,\!174\pm0,\!001$	$0,\!294\pm0,\!007$			
4	-1	1	1	$124,\!37\pm2,\!15$	$0,\!256\pm0,\!002$	$0,\!376\pm0,\!003$			
5	1	-1	-1	$130,\!81 \pm 1,\!47$	$0,\!092\pm0,\!001$	$0,\!174\pm0,\!007$			
6	1	-1	1	$98,\!07 \pm 2,\!07$	$0,\!113\pm0,\!001$	$0,\!156\pm0,\!004$			
7	1	1	-1	$159,\!63 \pm 4,\!50$	$0,\!156\pm0,\!000$	$0,\!130\pm0,\!001$			
8	1	1	1	$115,\!11 \pm 0,\!57$	$0,\!197\pm0,\!000$	$0,\!197\pm0,\!004$			
9	-1,68	0	0	$102,\!03 \pm 2,\!01$	$0,\!223\pm0,\!001$	$0,\!329\pm0,\!007$			
10	1,68	0	0	$134,\!43 \pm 0,\!44$	$0,\!079\pm0,\!000$	$0,136 \pm 0,003$			
11	0	-1,68	0	$109,38 \pm 0,10$	$0,\!126\pm0,\!001$	$0,\!105\pm0,\!003$			
12	0	1,68	0	$170,\!49 \pm 4,\!77$	$0,\!277\pm0,\!002$	$0,\!288\pm0,\!007$			
13	0	0	-1,68	$118,\!93 \pm 0,\!08$	$0,\!093\pm0,\!004$	$0,136 \pm 0,004$			
14	0	0	1,68	113,01 ± 2,21	$0,\!216\pm0,\!002$	$0,\!336\pm0,\!002$			
15	0	0	0	$188,71\pm2,09$	$0,214 \pm 0,001$	$0,\!252\pm0,\!005$			
16	0	0	0	$189,58 \pm 1,38$	$0,\!207\pm0,\!000$	$0,245 \pm 0,000$			
17	0	0	0	$189,39 \pm 0,28$	$0,211 \pm 0,002$	$0,239 \pm 0,000$			

Tabela 4 - Resultados do planejamento DCCR 2³ para capacidade de imobilização, atividade enzimática e fração de β-D-galactosidase a partir do hidrogel a base de quitosana. Variáveis independentes: Temperatura (X₁), concentração inicial de enzima (X₂) e pH (X₃)

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Pelos resultados do planejamento experimental foi observada uma sinergia entre as variáveis independentes e dependentes. As capacidades de imobilização no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana variaram entre 77,06 \pm 0,31 a 151,81 \pm 0,48 mg g⁻¹ e de 98,07 \pm 2,07 a 189,58 \pm 1,38 mg g⁻¹, respectivamente. As atividades enzimáticas da enzima imobilizada nos respectivos hidrogéis variaram entre 0,093 \pm 0,001 a 0,321 \pm 0,000 U mg⁻¹ e de 0,092 \pm 0,001 a 0,277 \pm 0,002 U mg⁻¹, respectivamente. As frações enzima liberada variaram entre

 $0,140 \pm 0,000$ a $0,598 \pm 0,000$, e $0,105 \pm 0,003$ a $0,376 \pm 0,003$, a partir dos respectivos hidrogéis. Pequenas variações foram obtidas nas três variáveis respostas nos pontos centrais, indicando boa repetibilidade do processo.

3.3.2 Capacidade de imobilização de β-D-galactosidase nos hidrogéis

Na Tabela 5 são apresentados os dados referentes à análise de variância (ANOVA) obtida para a capacidade de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana.

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para os fatores temperatura (X₁), concentração de enzima (X₂) e pH (X₃) em função das capacidades de imobilização de β-D-galactosidase no hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA)

Fatores	\mathbf{SQ}^{a}		QM^b		FCALC	CULADO	PVALOR	
Tatores	GA	QA	GA	QA	GA	QA	GA	QA
\mathbf{X}_1	320,08	524,84	320,08	524,84	5,52	5,74	0,027	0,025
X_1^2	8909,91	13113,62	8909,91	13113,62	153,62	143,35	0,000	0,000
X_2	2735,60	3632,91	2735,60	3632,91	47,16	39,71	0,000	0,000
X_2^2	3622,38	6096,03	3622,38	6096,03	62,45	66,64	0,000	0,000
X_3	900,91	1409,75	900,91	1409,75	15,53	15,41	0,001	0,001
X_3^2	8665,09	13998,00	8665,09	13998,00	149,40	153,01	0,000	0,000
X_1X_2	217,15	341,88	217,15	341,88	3,74	3,74	0,065	0,065
$X_1 X_3$	818,45	1100,77	818,45	1100,77	14,11	12,03	0,001	0,002
$X_2 X_3$	30,35	27,62	30,35	27,62	0,52	0,30	0,476	0,588

^a Soma dos quadrados; ^b Quadrados médios

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os efeitos foram calculados realizando a divisão de cada coeficiente por seu erro padrão conforme o teste T de Student. A relevância de cada termo foi semelhante para as capacidades de imobilização em ambos os hidrogéis e estão apresentadas por diagramas de Pareto nas Figuras 18ab. As barras que ultrapassam a linha vertical foram significativas ao nível de significância de 95 % (p < 0,05) para as capacidades de imobilização de enzima em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana. Assim, todas as variáveis independentes exerceram efeitos significativos sobre a capacidade de imobilização para ambos hidrogéis. Os fatores temperatura $(+x_1)$ e concentração inicial de enzima $(+x_2)$ influenciaram positivamente, enquanto que o pH $(-x_3)$ e a interação temperatura-pH $(-x_1x_3)$ foram negativos para ambos hidrogéis. Com relação à contribuição dos termos quadráticos, são interpretados como a presença de curvatura e representam a natureza do sistema de superfície de resposta. Assim, os sinais negativos para estes termos revelam a forma convexa da curva, como foi observado para temperatura $(-x_1^2 - Q)$ e concentração de enzima $(-x_2^2 - Q)$. Por outro lado, o sinal positivo para termos quadráticos estão relacionados a forma côncava da curva.

Figura 18 - Diagramas de Pareto com os termos significativos para as capacidades de imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Após a abstração dos termos não significativos, são apresentados os modelos previstos pelos quais são estimadas as capacidades de imobilização de β -D-galactosidase para o hidrogel a base de goma arábica (G₁) (Equação 6) e hidrogel a base de quitosana (Q₁) (Equação 7) em função das variáveis codificadas e significativas:

$$G_{1} (mg g^{-1}) = 150,898 + 3,423x_{1} - 19,879x_{1}^{2} + 10,008x_{2} - 12,675x_{2}^{2} - 5,743x_{3} - 19,604x_{3}^{2} - 7,152x_{1}x_{3}$$
(6)

$$Q_{1} (mg g^{-1}) = 188,942 + 4,384x_{1} - 24,117x_{1}^{2} + 11,533x_{2} - 16,443x_{2}^{2} - 7,184x_{3} - 24,917x_{3}^{2} - 8,294x_{1}x_{3}$$
(7)

A validação dos modelos foi realizada pela análise do teste de Fischer (Teste F), considerando o quociente entre os Quadrados Médios (QM) da regressão e dos resíduos. Para que o modelo seja aceito, o valor de F calculado (F_{cal}) deve ser maior que o F tabelado (F_{tab}), ou seja, $F_{cal} > F_{tab}$, para os respectivos graus de liberdade em um nível de confiança de 95% (p < 0,05). Para que o modelo seja não apenas significativo estatisticamente, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão entre o valor de F obtido da regressão e o valor de F tabelado deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETO et al., 2003). A partir dos resultados de aplicação da análise de variância (ANOVA) apresentados na Tabela 6, concluiu-se que os modelos podem ser utilizados para explicar as capacidades de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana uma vez que os valores de F_{cal} foram maiores que F_{tab} . Após análise dos valores de F_{cal} em relação aos valores de F_{tab} pode-se também dizer que a regressão foi altamente significativa para ambos hidrogéis uma vez que F_{cal}/F_{tab} foi 17,72 para o hidrogel a base de goma arábica e 17,16 para o hidrogel a base de quitosana. Portanto, os dados experimentais são bem representados pelos modelos ajustados, podendo ser empregados para fins preditivos dentro do domínio dos fatores estudados.

Tab	ela 6 – Resulta	ados da anális	e de variând	cia (ANOV	A) para o	os mode	elos de reg	ressão ut	ilizados
	para explicar as capacidades de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base								
	de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA)								
	Uidrogal	Fonto	C Oa	CIP	OMC	Б	Б	р	

Hidrogel	Fonte	SQ ^a	GL^b	QM ^c	Fcalculado	Ftabelado	R Regressão
GA	Regressão	18693,91	7,00	2670,56	42,35	2,39	93,15
	Resíduos	1639,52	26,00	63,06			
	Total	20333,43	33,00	616,16			
QA	Regressão	28323,18	7,00	4046,17	41,01	2,39	92,89
	Resíduos	2565,09	26,00	98,66			
	Total	30888,27	33,00	936,01			

^a Soma dos quadrados; ^b Grau de liberdade; ^c Quadrados médios Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Os coeficientes de determinação obtidos para a capacidade de imobilização de β -Dgalactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foram 93,15 e 92,89, respectivamente. Pelo coeficiente determinação (R²) pode ser definido a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto, oferecendo uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Na Figura 19 está apresentada a comparação entre as capacidades de imobilização determinadas experimentalmente e aquelas previstas pelos modelos ajustados.

Figura 19 – Valores previstos pelo modelo em função dos valores observados para a resposta da capacidade de imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Observa-se um bom ajuste do modelo, justificado pelo considerável agrupamento dos pontos próximos da reta representativa. Após a validação dos modelos foram gerados os gráficos de superfície e de contorno para as capacidades de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (Figura 20) e hidrogel a base de quitosana (Figura 21).

Figura 20 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para as capacidades de imobilização de β-D-galactosidase (mg g⁻¹) em hidrogel a base de goma arábica em função da temperatura e da concentração de enzima (a e b); em função da concentração de enzima e do pH (c e d); em função de temperatura e do pH (e e f)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.





Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As respostas aparecem no eixo Y como capacidade de imobilização (Qe) (mg g⁻¹) em função das condições operacionais: temperatura (X_1) versus concentração de enzima (X_2) ; concentração de enzima (X₂) versus pH (X₃); e temperatura (X₁) versus pH (X₃), com a terceira variável sempre fixada em seu ponto central. Os tons saturados de coloração mais intensa são as regiões onde foram determinadas as maiores capacidades de imobilização e os valores críticos. Verificou-se que as condições experimentais ótimas da solução enzimática para os processos de imobilização foram em concentrações e temperaturas mais elevadas com pH ligeiramente ácido para ambos os modelos conforme observados nos gráficos de superfície. Ainda, o termo quadrático negativo é um indicativo de existência de um ponto máximo o qual está ilustrado pela parábola com concavidade voltada para baixo. Assim, pode-se afirmar que as condições experimentais centrais de temperatura e pH foram equivalentes com as condições obtidas pelo modelo e a concentração de enzima ótima para os processos de imobilização foi entre 39,88 a 55,30 mg mL⁻¹. Portanto, em concentrações maiores ou menores que esse intervalo foi observado uma diminuição considerável da capacidade de imobilização. Os coeficientes de regressão foram positivos para temperatura $(+x_1)$ e concentração de enzima (+x₂), sendo possível optar por condições de imobilização com menor gasto de energia e conomicamente viáveis. Portanto, a capacidade de imobilização máxima para ambos hidrogéis podem ser determinadas fixando a temperatura em 25,0 °C, o pH em 6,5 e a concentração inicial em 39,88 mg mL⁻¹.

A capacidade de imobilização de β -D-galactosidase no hidrogel a base de quitosana foi maior do que no hidrogel a base de goma arábica, indicando que o tamanho dos poros e o grau de reticulação dos hidrogéis não foram fatores predominantes no processo (KANG et al., 2007) bem como o tamanho da molécula de enzima (ESSA et al., 2007). No entanto, a variação de temperatura e pH afetaram mais significativamente o processo. Em temperaturas mais elevadas, o processo de difusão de β -D-galactosidase para o interior das redes poliméricas dos hidrogéis é mais fácil devido a diminuição da viscosidade da solução e maior flexibilidade das redes poliméricas (SANTOS et al., 2016). Além disso, a variação de pH afetou a capacidade de imobilização devido ao ponto isoelétrico das biomoléculas (ESSA et al., 2007). A variação do pH altera a conformação das moléculas de enzimas bem como as cargas das estruturas poliméricas tridimencionais dos hidrogéis (ALBUQUERQUE et al., 2016), alterando também a intensidade das interações intermoleculares (SANTOS et al., 2015). Assim, em uma imobilização por processos físicos, por exemplo, ocorre

interações eletrostáticas entre grupos NH₂ e C=O em diferentes pHs afetando a capacidade de imobilização (SANTOS et al., 2016; ZONATTO et al., 2017). No entanto, essas interações devem ser controladas e reversíveis para permitir a lixiviação e recuperação de enzima sob diferentes valores de pH e força iônica (SANTOS et al., 2016). O efeito da concentração inicial de enzima na solução pode estar relacionado a capacidade de saturação das redes poliméricas tridimensionais (MONIER et al., 2018). Em concentrações menores, a imobilização é mais lenta, permitindo maior estabilidade dos imobilizados e distribuição homogênea das moléculas de enzima na estrutura do hidrogel (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

3.3.3 Atividade enzimática de β-D-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polisacarídios

Na Tabela 7 são apresentados os resultados referentes à análise de variância (ANOVA) para as atividades de β -D-galactosidase no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana.

Fatores	S	SQ ^a		QM ^b		FCALCULADO		LOR
Tatores -	GA	QA	GA	QA	GA	QA	GA	QA
\mathbf{X}_1	0,035	0,026	0,035	0,03	98,47	122,65	0,000	0,000
X_1^2	0,014	0,011	0,014	0,01	39,04	51,60	0,000	0,000
X_2	0,067	0,040	0,067	0,04	188,51	187,58	0,000	0,000
X_2^2	0,003	0,000	0,003	0,00	8,34	1,89	0,008	0,182
X3	0,027	0,022	0,027	0,02	76,98	103,86	0,000	0,000
X_3^2	0,009	0,010	0,009	0,01	25,05	46,43	0,000	0,000
$X_1 X_2$	0,000	0,000	0,000	0,00	0,77	0,84	0,389	0,368
$X_1 X_3$	0,001	0,001	0,001	0,00	3,77	3,97	0,064	0,058
$X_2 X_3$	0,001	0,001	0,001	0,00	3,54	4,72	0,072	0,040

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os fatores temperatura (X₁), concentração de enzima (X₂) e pH (X₃) em função das atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel abase de quitosana (QA)

^a Soma dos quadrados; ^b Quadrados médios

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Pode ser observada pelas Figuras 22a-b uma semelhança da influência dos termos para as atividades da enzima imobilizada nos hidrogéis quando comparados àqueles que influenciaram a capacidade de imobilização. Todas as variáveis independentes foram significativas sobre a variável de resposta, sendo que a concentração inicial de enzima $(+x_2)$ e pH $(+x_3)$ afetaram positivamente, enquanto que a temperatura afetou negativamente $(-x_1)$ a atividade enzimática em ambos hidrogéis. Além disso, a interação entre concentração inicial de enzima $(x_2^2 - Q)$ não foi significantivo. Foi observado também efeito negativo datemperatura $(-x_1^2 - Q)$ e pH $(-x_3^2 - Q)$ para ambos, além de ter concentração inicial de enzima $(-x_2^2 - Q)$ com influência significativa na atividade da enzima imobilizada no hidrogel a base goma arábica.

 Figura 22 - Diagrama de Pareto com os termos significativos para as atividades enzimáticas de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os modelos estatísticos previstos para explicar as atividades enzimáticas de β -Dgalactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (G₂) e hidrogel a base de quitosana (Q₂) como função das variáveis codificadas e significativas estão apresentadas nas Equações 8 e 9, respectivamente:

$$G_{2} (U mg^{-1}) = 0,246 - 0,036x_{1} - 0,025x_{1}^{2} + 0,050x_{2} - 0,011x_{2}^{2} + 0,032x_{3} - 0,020x_{3}^{2}$$
(8)

$$Q_2 (U mg^{-1}) = 0.211 - 0.031x_1 - 0.022x_1^2 + 0.038x_2 + 0.028x_3 - 0.021x_3^2 + 0.008x_2x_3$$
(9)
Resultados da análise de variância considerando os modelos previstos para as atividades de β -D-galactosidase imobilizadas em hidrogéis estão apresentados na Tabela 8. Observa-se que as regressões foram significativas tanto para o hidrogel a base de goma arábica com F_{cal} de 58,08 quanto para o hidrogel a base de quitosana com F_{cal} de 72,76.

Tabela 8 – Resultados da análise de variância (ANOVA) para os modelos de regressão utilizados para explicar as atividades de β-D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA).

Hidrogel	Fonte	SQ ^a	GL^{b}	QM ^c	Fcalculado	Ftabelado	R Regressão
	Regressão	0,15	6,00	0,02	58,08	2,46	94,62
GA	Resíduos	0,01	27,00	0,00			
	Total	0,16	33,00	0,00			
	Regressão	0,11	6,00	0,02	72,76	2,46	95,45
QA	Resíduos	0,01	27,00	0,00			
	Total	0,11	33,00	0,00			

^a Soma dos quadrados; ^b Grau de liberdade; ^c Quadrados médios Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A significância da regressão pode também ser observada pelos valores de F_{cal}/F_{tab} igual a 23,61 para a atividade da enzima imobilizada no hidrogel a base de goma arábica e F_{cal}/F_{tab} igual a 29,58 para a atividade da enzima imobilizada no hidrogel a base de quitosana. Os coeficientes de determinação foram 94,62 e 95,45 % para o hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana, respectivamente. Portanto, os modelos podem ser utilizados para ajustar os dados experimentais de atividade da enzima imobilizada em ambos os hidrogéis e fazer a previsão dos efeitos e influências durante o processo de imobilização de enzima e hidrólise de lactose.

Na Figura 23 está ilustrada a comparação entre os valores de atividades enzimáticas determinadas experimentalmente e aqueles previstos pelos modelos estatísticos ajustados. Observa-se um bom ajuste do modelo, justificado pelo considerável agrupamento de pontos próximos da reta representativa.

Os gráficos de superfície e de contorno para as atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente. As respostas aparecem no eixo Y como atividade enzimática (U mg⁻¹) em função das condições operacionais de imobilização: temperatura (X₁) versus concentração inicial de enzima (X_2); concentração inicial de enzima (X_2) versus pH (X_3); e temperatura (X_1) versus pH (X_3), com a terceira variável sempre fixada em seu ponto central. Os tons saturados em cores mais intensas estão relacionadas as regiões nas quais foram encontradas as maiores atividades enzimáticas e os respectivos valores críticos.

Figura 23 - Valores previstos pelo modelo em função dos valores observados para as Atividades enzimáticas da β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As maiores atividades da enzima imobilizada em ambos hidrogéis foram determinadas em maiores concentrações iniciais, maiores temperatura e valores de pH ligeiramente ácidos. Mesmo que o hidrogel a base de quitosana seja capaz de imobilizar maior quantidade de β -D-galactosidase comparado ao hidrogel a base de goma arábica, é necessário que a enzima mantenha sua atividade enzimática. Assim, observou-se que a atividade da enzima imobilizada em hidrogel a base de quitosana foi ligeiramente menor devido à diferença de porosidade comparado ao hidrogel a base de goma arábica. As frações de β -D-galactosidase ativa liberada durante a hidrólise de lactose padrão também influenciam no processo de produção de produtos com baixo teor de lactose e na atividade da enzima imobilizada (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018). As atividades de β -D-galactosidase determinadas experimentalmente nesses estudos foram parcialmente promovidas pela enzima livre liberada a partir de ambos os hidrogéis como comprovado pelo aumento de glicose no meio hidrolítico após a aplicação dos hidrogéis.

A pressão osmótica devido à diferença de concentrações de solutos presentes dentro do hidrogel e na solução de lactose padrão origina um fluxo transferência de massa, forçando a solução saturada de soluto entrar para o interior e se difundir pelos poros da estrutura polimérica hidrofílica. Por essa difusão, por exemplo, uma molécula de lactose entra em contato com a enzima imobilizada, ocorrendo a reação de hidrólise (WOLF et al., 2018).

Figura 24 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de β -D-galactosidase (U mg⁻¹) imobilizada em hidrogel a base de goma arábica em função da temperatura e da concentração de enzima (a e b); em função da concentração de enzima e do pH (c e d); em função de temperatura e do pH (e e f)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 25 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de β-D-galactosidase (U mg⁻¹) imobilizada em hidrogel a base de quitosana em função da temperatura e da concentração de enzima (a e b); em função da concentração de enzima e do pH (c e d); em função de temperatura e do pH (e e f)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O aumento da temperatura aumenta a transferência de massa de lactose para o interior do hidrogel que pode desativar e desnaturar algumas moléculas de enzima, diminuindo sua atividade enzimática. Além disso, em baixas temperaturas, a interação entre substrato e enzima imobilizada pode ocorrer mais na superfície e aumentar a fração de β -D-galactosidase imobilizada.

O aumento da concentração inicial aumentou as cargas de enzima imobilizada nos hidrogéis, o que também aumentou a atividade enzimática. Enzimas livres em solução, dentro da qual está sendo realizados processos de hidrólise de lactose, podem produzir efeitos positivos na concentração inicial, exatamente como observado pelos modelos estatísticos. A enzima imobilizada na superfície de um suporte pode aumentar a fração liberada, e consequentemente, aumentar a atividade enzimática como observado experimentalmente. Contudo, foi observado um decréscimo de atividade a partir do ponto central, provavelmente devido à formação de várias camadas de enzimas depositadas na rede polimérica do hidrogel. Essa deposição em multi-camadas diminui a distância entre os sítios ativos da enzima e dos grupos hidrofílicos da rede polimérica dos hidrogéis, impedindo a reação de hidrólise. Além disso, há vários efeitos possíveis que podem interferir na atividade enzimática tais como a saturação dos sítios ativos dos hidrogéis, a flexibilidade da rede polimérica do hidrogel e os movimentos conformacionais da enzima (FACIN, et al., 2015; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017; WOLF et al., 2018).

A variação de pH durante a imobilização de β -D-galactosidase pode alterar significativamente as propriedades funcionais da enzima. Foi observado que a diminuição do pH durante o processo de imobilização influenciou negativamente a atividade enzimática e a eficiência de hidrólise das enzimas imobilizadas, indicando que pode ter ocorrido alterações morfológicas e químicas em seus sítios ativos (ZHANG et al., 2016). Assim, é de suma importância a otimização das variáveis independentes durante a imobilização para alcançar um melhor custo/benefício na aplicação da enzima imobilizada. As melhores condições determinadas pelo planejamento fatorial para a imobilização de β -D-galactosidase para manter sua atividade enzimática significativa foram: temperatura ambiente, concentração inicial de enzima moderada e valores de pH ligeiramente ácidos. As variáveis temperatura, concentração inicial de enzima e pH no ponto central do planejamento experimental foram as responsáveis pelas maiores capacidades de imobilização e atividades enzimáticas, e pelas menores frações de enzima liberada durante a hidrólise de lactose padrão. Desse modo, pode-se afirmar que as atividades enzimáticas quantificadas foram

promovidas basicamente por enzimas imobilizadas e em pequena quantidade por enzima liberada para a solução durante a hidrólise.

3.3.4 Liberação β-D-galactosidase imobilizada a partir dos hidrogéis

Na Tabela 9 são apresentados os dados referentes à análise de variância (ANOVA) para as frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana.

 Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para os fatores temperatura (X1), concentração inicial de enzima (X2) e pH (X3) em função das frações de enzima liberada a partir dos hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA)

Fatores	\mathbf{SQ}^{a}		QI	QM^b		FCALCULADO		PVALOR	
Tatores –	GA	QA	GA	QA	GA	QA	GA	QA	
X_1	0,304	0,101	0,304	0,101	173,01	135,32	0,000	0,000	
X_1^2	0,006	0,000	0,006	0,000	3,67	0,28	0,067	0,601	
X_2	0,137	0,034	0,137	0,034	78,13	45,68	0,000	0,000	
X_2^2	0,011	0,006	0,011	0,006	6,01	7,43	0,022	0,012	
X_3	0,160	0,038	0,160	0,038	91,08	51,33	0,000	0,000	
X_3^2	0,005	0,000	0,005	0,000	2,88	0,10	0,103	0,753	
$X_1 X_2$	0,006	0,008	0,006	0,008	3,40	11,21	0,078	0,003	
$X_1 X_3$	0,000	0,001	0,000	0,001	0,00	2,00	0,962	0,170	
$X_2 X_3$	0,000	0,004	0,000	0,004	0,00	4,98	0,945	0,035	

^a Soma dos quadrados; ^b Quadrados médios

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As frações de enzima liberada foram influenciadas similarmente às atividades enzimáticas como observado também na Figura 26. O efeito da temperatura (- x_1) foi negativo, enquanto que o efeito da concentração inicial de enzima (+ x_2) e do pH (+ x_3) foram positivos para ambos hidrogéis. O efeito negativo foi também observado para ambas as variáveis temperatura (- x_1^2 - Q) e pH (- x_3^2 – Q), sendo que a concentração de enzima (- x_2^2 - Q) foi significativa somente para o imobilizado em hidrogel a base goma arábica. Ainda, para as frações de enzima liberada a partir do hidrogel a base de quitosana foi observado influência negativa nas interações entre temperatura e

concentração inicial de enzima $(-x_1x_2)$ e positiva entre concentração inicial de enzima e pH (x_2x_3) . Por fim, o termo concentração inicial de enzima $(x_2^2 - Q)$ não foi significativo.





Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os modelos previstos para descreverem as frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (G₃) e hidrogel a base de quitosana (Q₃) em função das variáveis codificadas e significativas são apresentados nas Equações 10 e 11.

$$G_3 = 0,408 - 0,106x_1 + 0,071x_2 - 0,022x_2^2 + 0,077x_3$$
(10)

$$Q_3 = 0,245 - 0,061x_1 + 0,035x_2 - 0,016x_2^2 + 0,037x_3 - 0,023x_1x_2 + 0,015x_2x_3$$
(11)

Os resultados da análise de variância (ANOVA) referente aos modelos previstos para as frações de β-D-galactosidase liberadas a partir dos hidrogéis são apresentados na Tabela 10.

A partir dos resultados de regressão, observa-se que houve significância para a liberação de enzima a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana, com valores de F_{cal} de 77,09 e 43,77, respectivamente. Isso foi confirmado pela razão F_{cal}/F_{tab} que foi igual a 28,55 para hidrogel a base de goma arábica e 17,79 para o hidrogel a base de quitosana. Os coeficientes de determinação para as frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma

arábica e hidrogel a base de quitosan foram 93,65 e 91,50 %, respectivamente. A correlação entre os dados e os ajustes dos modelos pode ser claramente observada na Figura 27.

Tabela 10 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para os modelos de regressão na determinação das frações de β-D-galactosidase a partir de hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (OA)

Hidrogel	Fonte	SQ ^a	$\operatorname{GL}^{\operatorname{b}}$	QM ^c	Fcalculado	Ftabelado	R Regressão
	Regressão	0,61	4,00	0,15	77,09	2,70	93,65
GA	Resíduos	0,06	29,00	0,00			
	Total	0,66	33,00	0,02			
	Regressão	0,19	6,00	0,03	43,77	2,46	91,50
QA	Resíduos	0,02	27,00	0,00			
	Total	0,21	33,00	0,01			

^a Soma dos quadrados; ^b Grau de liberdade; ^c Quadrados médios

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 27 – Valores previstos pelo modelo de regressão em função dos valores das frações de β-D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e de hidrogel a base quitosana (b)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os gráficos de superfície e de contorno para as frações de enzima liberada a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são apresentados nas Figuras 28 e 29. As respostas aparecem no eixo Y como fração de enzima liberada em função das condições operacionais de imobilização: temperatura (X₁) versus concentração inicial de enzima (X₂); concentração inicial de enzima (X₂) versus pH (X₃); e temperatura (X₁) versus pH (X₃), com a terceira variável sempre fixada em seu ponto central. Os tons saturados com coloração mais intensa

são relacionados às regiões nas quais são observadas as frações de enzima liberadas e os respectivos valores críticos. Observa-se pelas superfícies de resposta que a redução de temperatura durante os processos de imobilização influenciam nas frações de enzima liberadas a partir dos hidrogéis.

Figura 28 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para as frações de β-D-galactosidase imobilizadas a partir do hidrogel a base de goma arábica em função da temperatura e da concentração de enzima (a e b); em função da concentração de enzima e do pH (c e d); em função de temperatura e do pH (e e f)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 29 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para as frações de β-D-galactosidase imobilizadas a partir do hidrogel a base de quitosana em função da temperatura e da concentração de enzima (a e b); em função da concentração de enzima e do pH (c e d); em função de temperatura e do pH (e e f)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O aumento da concentração inicial de enzima e do pH na solução aquosa aumentaram as frações de enzima liberadas. As condições ótimas para a imobilização nas quais ocorreu a fração máxima de β -D-galactosidase liberada foram determinadas em soluções aquecidas com alta concentração de enzima e de pH entre neutro e alcalino.

Os tipos de interações intermoleculares que ocorrem entre a enzima e o hidrogel durante a imobilização são importantes para descrever os processos de liberação (PAULINO et al., 2011; ZONATTO et al., 2017). A liberação da enzima imobilizada em suporte sólido por interação física é mais fácil de ocorrer uma vez que esse tipo de interação é fraca (SANTOS et al., 2016). Assim, o processo de liberação a partir de hidrogéis pode ser descrito com base na desestabilização das interações eletrostáticas entre enzima e suporte, relaxamento macromolecular da estrutura polimérica tridimensional e processos difusionais (ZONATTO et al., 2017). Então, a liberação de β -D-galactosidase a partir do hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana pode ter ocorrido pela combinação de processos de intumescimento dos hidrogéis, difusão através dos poros e relaxamento macromolecular da rede polimérica tridimensional hidrofílica (ZHANG et al., 2017; AHMED et al., 2016).

Observou-se pelas superfícies de resposta e curvas de contorno que a liberação de β -Dgalactosidase variou com a variação da temperatura. Então, a influência da temperatura nos processos de liberação pode estar associada ao grau de intumescimento do hidrogel que diminui para absorção de água em baixas temperaturas devido a compressão dos poros dos hidrogéis. Desta maneira, os porosos menos profundos da rede da matriz sólida aumentam a difusão das biomoléculas encapsuladas (ESSA et al., 2007). Ainda, a exposição prolongada da enzima em temperaturas elevadas pode resultar em sua degradação térmica e diminuir a intensidade das interações intermoleculares com a matriz sólida, aumentando a quantidade de enzima liberada.

O controle de temperatura é essencial no processo de imobilização para os estudos de liberação. Além disso, as interações intermoleculares são mais fortes quando a enzima está inativa, tornando o processo de liberação mais difícil (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016). Isso poderia explicar porque há menor fração de enzima liberada após a imobilização em pHs mais ácidos. A imobilização de enzimas em pH mais ácido também diminui a liberação em pH 7.0 devido a similaridade das cargas negativas do suporte e da enzima (WOLF et al., 2018). A saturação da superfície do hidrogel em processos de imobilização em altas concentrações iniciais de enzimas diminuem as interações intermoleculares entre suporte e

substrato (KONO et al., 2013), aumentando a fração de enzima liberada (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

3.3.5 Imobilização otimizada de β-D-galactosidase para hidrólise de lactose contida em leite UHT

Nesses estudos foram avaliadas as variáveis de respostas de maior relevância para aplicação de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana na hidrólise de lactose contida em leite UHT. As propriedades para utilização dos hidrogéis contendo enzima imobilizada incluem quantidade suficiente de enzima, atividade enzimática apropriada e fração mínima de β -D-galactosidase imobilizada. Assim, é necessário que a atividade enzimática quantificada seja proveniente preferencialmente da enzima imobilizada e não de frações de enzima liberada. Com base nisso, foram determinados os valores experimentais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam concomitantemente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes.

A partir das análises das superfícies de resposta foi possível determinar as condições adequadas de hidrólise utilizando enzima imobilizada. As condições de hidrólise de lactose contida em leite UHT estão apresentadas na Tabela 11 em que as variáveis independentes X_1 , X_2 , e X_3 são relacionadas às melhores condições de imobilização e hidrólise.

quitosan	a (QA)			-
Condições	Hidrogel	Capacidade de imobilização (mg g ⁻¹)	Atividade enzimática (U mg ⁻¹)	Fração liberada
X ₁ : 25 °C	GA	$151,\!18 \pm 0,\!57$	$0,246 \pm 0,002$	$0,407 \pm 0,007$
X ₂ : 59,88 mg mL ⁴ X ₃ : 6,5	QA	189,23 ± 1,09	0,211 ± 0,003	$0,245 \pm 0,005$

Tabela 11 - Valores das capacidades de imobilização, atividades enzimáticas e frações de enzima liberada após a imobilização em temperatura (X1), concentração inicial de enzima (X2) e pH (X3) no hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA)

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As melhores condições experimentais para imobilização de β -D-galactosidase e aplicação na hidrólise de lactose foram: temperatura de 25,0 °C, concentração inicial de enzima de 39,88 mg mL⁻¹ e pH 6,5. A aplicação das enzimas imobilizadas nessas condições foi altamente eficiente devido às altas atividades enzimáticas e baixas frações de β -D-galactosidase liberadas. Os resultados da aplicação de enzimas imobilizadas nas condições otimizadas pelo planejamento fatorial 2³ na hidrólise contida em leite UHT estão apresentadas na Figura 30. Nas Figuras 30a e 30.b são apresentadas as concentrações de glicose e as atividades enzimáticas em função do tempo de hidrólise de lactose contida no leite UHT, respectivamente.

Figura 30 - Concentrações de glicose formada (a) e atividades enzimáticas (b) versus o tempo de hidrólise de lactose contida em leite UHT, utilizando β -D-galactosidase imobilizada nos hidrogéis, nas condições otimizadas. Condições experimentais: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As concentrações de glicose formadas após 240 min de reação de hidrólise foram 169,02 ± 4,27 e 131,31 ± 10,64 mg dL utiilzando β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana, respectivamente. Contudo, após 315 min na ausência do imobilizado, as concentrações de glicose aumentaram para 197,57 ± 4,49 e 177,63 ± 3,49 mg dL, respectivamente. Isso é resultado da fração de enzima liberada durante a hidrólise da lactose contida em leite UHT.

Observou-se também que a formação de glicose e a atividade enzimática foram superiores após utilizar β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica em relação ao hidrogel a base de quitosana. Este resultado é atribuído à maior capacidade de difusão da enzima pela rede polimérica tridimensional hidrofílica do hidrogel a base de goma arábica que possui alta

porosidade. Assim, ocorreu maior contato entre β -D-galactosidase e lactose, com subsequente produção de glicose e galactose. Os perfis de hidrólise de lactose utilizando hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana contendo β -D-galactosidase imobilizada são apresentados na Figura 31. As frações de enzima imobilizada no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana utilizados para a hidrólise de lactose contida no leite UHT foram 0,193 ± 0,005 e 0,136 ± 0,001, respectivamente.

Figura 31 – Frações otimizadas de β -D-galactosidase liberadas após de imobilização no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana. Condições experimentais para hidrólise de lactose contida em leite UHT: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 ° C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A partir dos resultados foi possível observar que ambos hidrogéis contendo β -Dgalactosidase imobilizada foram eficientes e promissores na hidrólise de lactose contida em leite UHT. Maiores atividades enzimáticas e menores frações de β -D-galactosidase liberada foram determinadas durante a hidrólise de lactose contida em leite UHT em relação à hidrólise de lactose padrão considerando a otimização das variáveis independentes.

3.4 CONCLUSÃO

A β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são promissores na hidrólise de lactose contida em leite UHT para produção de leite com baixo teor de lactose. Pelo planejamento fatorial adotado foi possível identificar semelhanças e diferenças entre as variáveis de respostas para a aplicação dos hidrogéis contendo enzima

imobilizada. As maiores atividades enzimáticas e frações de β -D-galactosidase liberadas foram determinadas utilizando o hidrogel a base de goma arábica. Contudo, observou-se que as variáveis independentes influenciaram de forma similar as variáveis de respostas entre os hidrogéis. Com isso, as mesmas condições de otimização foram utilizadas para ambos hidrogéis.

A capacidade de imobilização máxima para ambos hidrogéis puderam ser determinadas fixando a temperatura em 25,0 °C, o pH em 6,5 e a concentração inicial em 39,88 mg mL⁻¹. Ainda, as atividades enzimáticas nestas condições de imobilização foram provenientes da enzima imobilizada pela uma baixa fração liberada de enzima obtida. O planejamento fatorial foi indispensável para determinar e confirmar que os parâmetros operacionais inicialmente indicados como centrais eram adequadas. A partir dos estudos para ambos hidrogéis foi possível propor modelos preditivos válidos para explicar a imobilização e liberação de enzima a partir dos hidrogéis bem como a hidrólise de lactose utilizando β -D-galactosidase imobilizada. Por fim, a capacidade de imobilização da enzima e aplicação dos hidrogéis contendo enzima imobilizada pode ser validada, e tais resultados foram importantes para confirmar a eficiência do planejamento fatorial para garantir as condições e critérios para um processo industrial com alto custo/benefício.

4 CAPÍTULO 4

ESTABILIDADE E REUTILIZAÇÃO DE β-D-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM HIDROGEL A BASE DE DE GOMA ARÁBICA E HIDROGEL A BASE DE QUITOSANA

4.1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de imobilização de β -D-galactosidase em matrizes sólidas pode ser de extrema importância para processos industriais de produção de produtos com baixo teor de lactose em comparação com a tecnologia de utilização da enzima livre (CHEN; DUAN, 2015). A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogéis a base de polissacarídios é uma técnica promissora para melhorar a atividade enzimática durante o processo de produção de leite com baixo teor de lactose (FACIN et al., 2015). Além de ser uma técnica de fácil aplicação, a enzima imobilizada pode ser reutilizada em processos sucessivos de produção de produtos com baixo teor de lactose. Além disso, a imobilização aumenta a estabilidade da enzima em diferentes valores de pH, temperatura e tempo de armazenamento (SHELDON, 2013).

Pelo uso de enzima imobilizada é possível melhorar o controle das condições de operação e flexibilidade de um reator, facilitando a recuperação do produto e aumentando a eficiência em operações prolongadas (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1998; ILLANES et al., 2006). De fato, a imobilização geralmente produz um aumento significativo na estabilidade da enzima, o que tem sido um aspecto importante em relação ao custo/benefício de um processo. A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são alternativas viávéis para aplicações na produção de leites com baixo teor de lactose e na liberação controlada de enzimas (FACIN et al., 2015; WOLF et al., 2018).

Os hidrogéis são amplamente utilizados em diversas aplicações (PAULINO et al., 2009) e são constituídos de redes poliméricas tridimensionais a base de diferentes polímeros reticulados química ou fisicamente, os quais possuem capacidade de absorver quantidades significativas de água e/ou fluídos biológicos (PAULINO et al., 2010). À medida que os hidrogéis intumescem, moléculas de diferentes tamanhos podem se difundir através de sua estrutura tridimensional (HOFFMAN, 2002). A difusão de fluídos no interior dessas matrizes poliméricas permite que hidrogéis sejam utilizados também em sistemas de encapsulamento e liberação controlada de diferentes solutos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e métodos utilizados durante os procedimentos experimentais do Capítulo 4 são apontados a seguir.

4.2.1 Imobilização de β-D-galactosidase

As condições otimizadas de imobilização e liberação controlada apresentadas no Capítulo 3 foram utilizadas para os estudos de estabilidade e reutilização da β -D-galactosidase imobilizada. O hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foram sintetizados conforme os tópicos 2.2.2 e 2.2.3, respectivamente, os quais foram secos em estufa com circulação de ar (Alpax FD) a 50,0 ± 1,0 ° C por 24 h ou por liofilização (TFD5503, Ilshin Lab. Co. Ltd., Coréia) a -60,0 ± 1,0 ° C por 12 h. Os efeitos dos processos de secagens foram avaliados determinando a capacidade de imobilização de β -D-galactosidase e a eficiência de hidrólise de lactose em diferentes ciclos sucessivos com o objetivo de avaliar os reciclos dos hidrogéis contendo enzima imobilizada. A capacidade de imobilização e a eficiência de imobilização foram determinadas utilizando as Equações 2 e 3.

4.2.2 Reutilização de β-D-galactosidase imobilizada nos hidrogéis

A eficiência dos hidrogéis contendo enzima imobilizada na hidrólise de lactose padrão e de lactose contida em leite integral UHT em pH 7,0 a $25,0 \pm 1,0$ °C (condições avaliadas preliminarmente) foram estudadas em diferentes ciclos sucessivos. A concentração de glicose, atividade relativa e fração de enzima liberada a partir dos hidrogéis foram quantificadas no início (tempo = 0 min) e no final (tempo = 240 min) de cada ciclo de reutilização. A concentração de glicose produzida após a hidrólise de lactose foi determinada utilizando spectrofotometria Uv-vis e um kit Bioclin. A atividade relativa, considerando que no primeiro ciclo a atividade era de 100 %, foi determinada proporcionalmente para os demais ciclos.

4.2.3 Efeito da temperatura na estabilidade de β-D-galactosidase

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado para a enzima livre e enzima imobilizada. A lactose foi hidrolisada adicionando 2,0 mL de β -D-galactosidase padrão livre 9,0 % (v/v) (ou hidrogel contendo enzima imobilizada) em um erlenmeyer de vidro contendo 8,5 mL de solução tampão fosfato de pH 7,0 e 1,5 mL de solução de lactose padrão 5,0% (m/v), nas temperaturas de 5,0, 25,0, 37,0, 50,0 ± 1,0 ° C. Alíquotas de cada solução aquosa foram coletadas para análise nos intervalos de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min para análises por espectrofotometria UV-vis.

4.2.4 Efeito do pH na estabilidade de β-D-galactosidase

O efeito do pH foi avaliado adicionando 2,0 mL de β -D-galactosidase padrão livre 9,0 % (v/v) (ou hidrogel contendo enzima imobilizada) em um erlenmeyer de vidro contendo 8,5 mL de solução tampão acetato nos pH 3,5 ou 4,8, ou solução tampão fosfato nos pH 5,5 ou 7,0, e 1,5 mL de solução de lactose padrão 5,0% (m/v), em temperatura de 37,0 ± 1,0 ° C. Alíquotas de solução aquosa coletadas em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min a fim de determinar a concentração de glicose e avaliar a hidrólise de lactose.

4.2.5 Liberação controlada de β-D-galactosidase

A fração de β -D-galactosidase liberada a partir de ambos hidrogéis foi determinada entre 0 e 240 min conforme tópico 2.2.12, considerando as diferentes situações de reciclo. Alíquotas de soluções aquosas remanescentes após contato com o hidrogel contendo enzima imobilizada foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min. A fração de β -D-galactosidase liberada em função do pH e temperatura foram determinadas por espectrofotometria Uv-vis utilizado o reagente de Bradford. A fração de enzima liberada foi calculada utilizando a Equação 5.

4.2.6 Análise estatística

Os resultados das análises estatísticas foram expressos como média \pm desvio padrão, considerando a capacidade e eficiência de imobilização de β -D-galactosidase, atividade de β -D-

galactosidase, concentração de glicose produzida, fração de enzima liberada e atividade relativa durante a hidrólise usando β -D-galactosidase imobilizada. Todos os dados foram calculados para amostras em triplicata usando análise de variância (ANOVA) e o teste t com nível de confiança de 95 % (p < 0,05).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e discussão referentes ao Capítulo 4.

4.3.1 Efeito da secagem dos hidrogéis sobre a imobilização de β-D-galactosidase

Na Tabela 12 são apresentados os dados de imobilização da enzima no hidrogel a base goma arábica e hidrogel a base de quitosana secos em diferentes condições. Observa-se que a capacidade e eficiência de imobilização aumentaram após secagem por liofilização para ambos hidrogéis quando comparado com a secagem em estufa.

Tabela 12 – Efeito dos processos de secagem na imobilização de β-D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica (GA) e hidrogel a base de quitosana (QA). (1) Secagem em estufa com circulação de ar a 37 °C por 24 h. (2) Secagem por liofilização a -60 °C por 24 h

Hidrogel	Processo de secagem	Capacidade de imobilização (mg g ⁻¹)	Eficiência de imobilização (%)
C A	1	$98,34 \pm 1,41$	$8,96 \pm 0,04$
GA	2	$150,\!62 \pm 0,\!71$	$13,85 \pm 0,01$
QA	1	$144,35 \pm 1,41$	$14,95 \pm 0,08$
	2	$189,04 \pm 1,15$	$19,33 \pm 0,14$

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A capacidade e eficiência de imobilização, a liberação controlada e o uso da enzima imobilizada na hidrólise de lactose são afetados pelas propriedades físico-químicas das redes tridimensionais hidrofílicas dos hidrogéis e por suas morfologias. Os métodos de secagem dos hidrogéis após a síntese, ou após a aplicação, alteram suas características morfológicas e estruturais, podendo causar modificações no arranjo tridimensional nas redes poliméricas (WANG et al., 2015).

A secagem em estufa com circulação de ar é de baixo custo comparado ao método por liofilização. Porém na liofilização, a secagem ocorre por desidratação do sólido em temperaturas abaixo de zero, mantendo os poros dos hidrogéis mais abertos e possibilitando o aumento da capacidade de imobilização como observado (GAVA, 1994). Como nesse método o solvente é removido por sublimação à vácuo, deixando espaços vazios nas regiões que anteriormente eram ocupadas (ANNABI et al., 2010), a área superficial do sólido aumenta consideravelmente quando comparado com os materiais secos em estufa. Assim, o rearranjo da rede polimérica do hidrogel durante o processo de congelamento contribui para a formação e preservação de uma estrutura porosa (ZHANG et al., 2017). Por outro lado, a secagem em estufa remove a água ou solventes da estrutura comprimindo os poros, e por vezes, degradando a matriz polimérica. A degradação da matriz polimérica diminui o número de sítios ativos, contribuindo também para a diminuição das capacidades de imobilização como observado (RISBUD et al., 2000). Como o processo de imobilização como observado (RISBUD et al., 2000).

4.3.2 Efeito do pH na estabilidade de β-D-galactosidase

4.3.2.1 Efeito do pH na atividade enzimática de β -D-galactosidase

O pH exerce grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. A quantidade de lactose hidrolisada foi confirmada pelo aumento da formação de glicose, a qual aumentou com a elevação do pH da solução. Na Figura 32 estão apresentadas as concentrações de glicose em função do tempo de hidrólise utilizando enzima livre (a), enzima imobilizada no hidrogel a base de goma arábica (b) e enzima imobilizada no hidrogel a base de quitosana (c) para diferentes valores de pH em temperaturas de $37,0 \pm 1,0$ °C.

Figura 32 – Concentrações de glicose versus tempo de hidrólise de lactose em diferentes valores de pH utilizando enzima livre (a), enzima imobilizada no hidrogel a base de goma arábica (b) e enzima imobilizada em hidrogel a base de quitosana (c). Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 3,5, 4,8, 5,5 e 7,0, em temperaturas de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A diminuição das concentrações de glicose produzida na hidrólise de lactose à medida que o pH diminui está relacionada a diminuição da atividade enzimática. Assim, concluiu-se que tanto a enzima livre como a enzima imobilizada reduzem suas atividades catalíticas em meios muito ácidos. Na Figura 33 estão apresentadas as atividades enzimáticas em função do pH das soluções aquosas para enzima livre e enzima imobilizada no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana.

Figura 33 - Efeito do pH nas atividades enzimáticas de β-D-galactosidade livre, β-D-galactosidade imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e β-D-galactosidade imobilizada em hidrogel a base de quitosana na hidrólise de lactose em diferentes valores de pH. Condições experimentais: pH 3,5, 4,8, 5,5 e 7,0; temperatura de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Mesmo em meios ácidos, as atividades enzimáticas da β -D-galactosidase imobilizada no hidrogel a base de goma arábica foram 0,113 ± 0,003 e 0,122 ± 0,006 U mg⁻¹ para pH 3,5 e 4,8, respectivamente. As atividades enzimáticas da β -D-galactosidase imobilizada no hidrogel a base de quitosana foram 0,102 ± 0,002 e 0,110 ± 0,002 U mg⁻¹, respectivamente. Por fim, as atividades da enzima livre foram aproximadamente zero nessas mesmas condições. Assim, a enzima imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana foram mais estáveis do que a enzima livre em meios ácidos (KLEIN et al., 2013; SARIKA et al., 2014). Concluindo, a β -D-galactosidade poderia ser imobilizada em cápsulas a base de hidrogéis para hidrólise de lactose em meios ácidos como no sistema gastrointestinal de indivíduos humanos. Além disso, a enzima imobilizada poderia ser reutilizada na hidrólise de lactose em diferentes ciclos durante a produção de leite UHT com baixo teor de lactose em pH 7.0, temperatura de 25 ± 1,0 °C ou a 37,0 ± 1,0 °C, uma vez que não perde sua atividade após o primeiro ciclo de hidrólise. Embora β -D-galactosidase produzida a partir de *kluyveromyces lactis* seja utilizada principalmente em valores de pH ácidos, sua estabilidade pode ser significantemnte afetada, comprometendo sua aplicação e eficiência na hidrólise de lactose.

4.3.2.2 Efeito do pH na liberação de β-D-galactosidase

Pela Figura 34 são observados os perfis de liberação de β-D-galactosidase a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) nas soluções tamponadas em pH 7,0.

Após 240 min, as frações de β -D-galactosidase liberadas a partir de hidrogel a base de goma arábica foram 0,122 ± 0,002, 0,162 ± 0,011, 0,284 ± 0,014 e 0,415 ± 0,006 em pH 3,5, 4,8, 5,5, e 7.5, respectivamente. As frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de quitosana foram 0,091 ± 0,012, 0,127 ± 0,006, 0,166 ± 0,006 e 0,243 ± 0,001 em pH 3,5, 4,8, 5,5, e 7.5, respectivamente.

Figura 34 - Frações de β -D-galactosidase liberadas a partir de hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b). Condições experimentais: pH 3,5, 4,8, 5,5 e 7,0; temperatura de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As frações de β -D-galactosidase liberadas aumentaram com o aumento do pH a partir de ambos hidrogéis devido as desestabilizações das interações eletrostática entre enzima encapsulada e grupos glucurônicos das redes dos hidrogéis (ZHANG et al., 2016). A liberação de β -D-galactosidase pode também ser influenciada pelo grau de intumescimento do hidrogel devido aos processos de através da rede polimérica. Ainda, a repulsão eletrostática entre moléculas de fosfato presentes nas soluções tampão e os grupos glucurônicos nos hidrogéis contribui para aumentar a velocidade de liberação (GUO; GAO, 2007). Contudo, tanto o hidrogel a base de goma arábica quanto o hidrogel a base de quitosana são eficientes para imobiliação e liberação de enzimas e proteínas pela variação do pH ou temperatura, podendo ser aplicados na produção de produtos com baixo teor de lactose ou liberação de enzima em sistemas gastrointestinais após ingestão de uma

cápsula contendo enzima imobilizada (GUO; GAO, 2007; SANGEETHA e ABRAHAM, 2008). Por fim, a estabilidade da enzima e das redes poliméricas em pH ácido é preponderante para aplicações na área médica, alimentícia, farmacêutica, dentre outras possuem a sensibilidade ao pH em soluções aquosas devido à presença abundante de grupamentos -COOH e -NH₂ (PAULINO et al., 2006b; PAULINO et al., 2009; ZONATTO et al., 2017).

4.3.3 Efeito da temperatura na estabilidade de β-D-galactosidase

4.3.3.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Nas Figuras 35a-c são apresentadas as concentrações de glicose em função do tempo de hidrólise de lactose utilizando β -D-galactosidase livre (a), β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (b) e β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana (c) para diferentes temperaturas em pH 7,0.

É importante avaliar a estabilidade térmica de β-D-galactosidase durante a hidrólise de lactose com o objetivo de estabeler informações importantes sobre as aplicações em situações reais na indústria alimentícia (SANTOS et al., 2016). As reações enzimáticas e as velocidades dessas reações são dependentes da temperatura. No entanto, pode ocorrer inibição da atividade enzimática devido ao processo de desnaturação em determinadas temperaturas que precisam ser determinadas muitas vezes experimentalmente. A maior quantidade de glicose produzida foi com a utilização da enzima livre emtempos menores. Ainda, a quantidade de lactose hidrolisada aumentou com o aumento da temperatura da solução, com exceção da hidrólise em temperatura de 50,0 ± 1,0 °C, na qual ambas asenzimas, livre e imobilizada, produziram menor glicose e galactose. A temperatura ótima de operação de um reator para enzima livre e imobilizada foi de 37,0 ± 1,0 °C. Entretanto, as enzimas imobilizadas também são eficientemente aplicadas e com potencial ótimo de operação a 25,0 ± 1,0 °C.

Figura 35 – Concentrações de glicose versus tempo de hidrólise de lactose utilizando β-D-galactosidase livre (a), β-D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (b) e β-D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana (c). Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperaturas de 4,0, 25,0, 37,0 e 50,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Na Figura 36 são apresentadas as atividades enzimáticas em função da temperatura para hidrólise de lactose utilizando β -D-galactosidase livre (a), β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (b) e β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana (c) para diferentes temperaturas e pH 7,0. Observa-se que os perfis para as atividades enzimáticas em função da temperatura foram semelhantes para β -D-galactosidase imobilizada nos hidrogéis entre 25,0 e 37,0 ± 1,0 °C. Porém, o aumento da temperatura da solução de hidrólise para 50,0 ± 1,0 °C aumentou a degradação térmica. Estatisticamente, as atividades enzimáticas a 50,0 ± 1,0 °C não foram significativamente diferentes. No entanto, a imobilização da enzima em suportes como os hidrogéis diminui a sua flexibilidade e aumenta a sua resistência à desnaturação em altas temperaturas.

Figura 36 - Efeito da temperatura nas atividades enzimáticas de β -D-galactosidase livre, β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica e β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperaturas de 4,0, 25,0, 37,0 e 50,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O número de interações intermoleculares que são formadas entre enzima e suporte pode ser correlacionado ao aumento na estabilidade térmica (MARTINEK et al., 1977; CHEN; DUAN, 2015). Contudo, no método de imobilização em que ocorre preferencialmente adsorção física tem uma estabilidade térmica enzimática menor.

4.3.3.2 Efeito da temperatura na liberação de β -D-galactosidase

Na Figura 37 são apresentadas as frações de β -D-galactosidase liberada a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) em diferentes temperaturas em pH 7,0. As frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica em 4,0, 25,0, 37,0 e 50,0 ± 1,0 °C foram de 0,104 ± 0,016, 0,135 ± 0,006, 0,399 ± 0,017 e 0,647 ± 0,015, respectivamente, após 240 min. As frações liberadas a partir do hidrogel a base de quitosana foram 0,084 ± 0,011, 0,119 ± 0,006, 0,244 ± 0,006 e 0,454 ± 0,010, respectivamente, após 240 min. Observa-se que a fração de enzima liberada aumentou com o aumento de temperatura entre 4,0 e 50,0 ± 1,0 °C. As quantidades de enzima liberadas em 4,0 e 25,0 ± 1,0 °C foram semelhantes. Figura 37 - Frações de β -D-galactosidase liberadas a partir de hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) em função da temperatura. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperaturas de 4,0, 25,0, 37,0 ou 50,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A liberação de β -D-galactosidase em temperaturas maiores que a temperatura de 25 ± 1,0 °C pode diminuir as forças intermoleculares e aumentar a velocidade de difusão (GUO e GAO, 2007; CHEN e DUAN, 2015). Além disso, a maior fração liberada pode também ser resultado do maior grau de intumescimento dos hidrogéis que aumenta a expansão térmica e a desestabilização da rede polimérica tridimensional, aumentando a velocidade de difusão e o tamanho dos poros (MOURA et al., 2008; FACIN et al., 2015). Com base nos perfis de liberação, pode-se concluir que a melhor condição para aplicação de β -D-galactosidase imobilizada na produção de leites com baixo teor de lactose é em 25,0 ± 1,0 °C, o que possibilitou a maior capacidade de imobilização durante os estudos de reutilização e a menor fração de enzima liberada.

4.3.4 Efeito da secagem dos hidrogéis contendo β-D-galactosidase nas reutilizações

O hidrogel a base de goma arábica e o hidrogel a base de quitosana descritos no tópico 4.3.1 foram utilizados na hidrólise de lactose padrão de pH 7,0 a 37,0 \pm 1,0 °C em cinco ciclos sucessivos. Conforme observado na Figura 38, a atividade de β -D-galactosidase diminuiu a partir de cada ciclo. As atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica, seco em estufa e liofilização, foram 49,07 \pm 0,07 e 40,36 \pm 0,71 %, respectivamente. As atividades

nos hidrogéis a base de quitosana, secos em estufa e liofilização, foram $52,84 \pm 0,27$ e $36,13 \pm 0,65$ %, respectivamente.

Figura 38 – Atividades de β-D-galactosidase imobilizadas em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b), secos em estufa e liofilização, durante os ciclos de reutiliação da enzima imobilizada. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A fração de β -D-galactosidase liberada foi maior quando a secagem dos hidrogéis foi realizada por liofilização em ambos os hidrogéis, conforme pode ser visualizado na Figura 39. As frações liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica, seco em estufa e liofilização, foram 0,519 ± 0,014 e 0,946 ± 0,007, respectivamente, após cinco ciclos de reutilização. As frações liberadas a partir do hidrogel a base de quitosana, secos em estufa e liofilização, foram 0,261 ± 0,005 e 0,481 ± 0,008, respectivamente, após cinco ciclos de reutilização.

A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel liofilizado tem sido mais eficiente devido a maior quantidade de poros e sítios ativos disponíveis para interações intermoleculares. Além disso, o aumento da área superficial aumenta a concentração de enzima imobilizada que estará disponível para hidrólise de lactose e processos de liberação controlada. Assim, pode-se concluir que a secagem do hidrogel é uma etapa muito importante nos estudos de imobilização e liberação controlada de enzimas. Figura 39 - Efeitos dos métodos de secagem dos hidrogéis nas frações de β-D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b), durante cinco ciclos de reutilização. Condições experimentais para hidrólise de lactose padrão: pH 7,0 e temperatura de 37,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

4.3.5 Hidrólise de lactose reutilizando β-D-galactosidase imobilizada em hidrogéis

Na Figura 40 são apresentadas as concentrações de glicose produzidas durante os ciclos de reutilização de β -D-galactosidase imobilizada no hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana em pH 7,0 a 25,0 ± 1,0 ° C.

Figura 40 – Concentrações de glicose em diferentes ciclos de reutilização de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b). Condições experimentais na hidrólise de diferentes soluções de lactose de pH 7,0 em $25,0 \pm 1,0$ °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A β -D-galactosidase imobilizada foi aplicada em dez ciclos sucessivos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT. A taxa de hidrólise de lactose diminuiu à medida que aumentou o número de ciclos de reutilização devido a menor atividade enzimática. Na Figura 41 pode ser observada a diminuição da atividade enzimática após ciclos sucessivos de hidrólise.

Figura 41 - Atividades β-D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) após ciclos sucessivos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT de pH 7,0 em 25,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

As atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica após hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT foram 43,82 ± 3,26 e 65,09 ± 3,47 %, respectivamente, após dez ciclos sucessivos. As atividades de β -D-galactosidase imobilizada em hidrogel a base de quitosana foram 56,05 ± 0,78 e 71,81 ± 2,33 %, respectivamente, após dez ciclos sucessivos. Durante o processo de imobilização pode ocorrer diferentes interações intermoleculares entre proteína e suporte sob a superfície ou intraporos. Nesse caso, a natureza da interação irá influenciar a eficiência de reutilização da enzima bem como as propriedades catalíticas e termodinâmicas (RAMAZANI et al., 2016). Quanto maior a força das interações intermoleculares, maior a quantidade de enzima imobilizada, menor a quantidade de enzima liberada durante as reutilizações, maior a eficiência de hidrólise e menor custo/benefício do processo industrial.

Na Figura 42 são apresentados os resultados de atividade de β -D-galactosidase em diferentes ciclos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT.

Figura 42 - Frações de β-D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de goma arábica (a) e hidrogel a base de quitosana (b) during diferentes ciclos de hidrólise de lactose padrão e lactose contida em leite UHT de pH 7,0 em 25,0 ± 1,0 °C



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Quantidades maiores de β -D-galactosidase liberadas foram determinadas em solução de lactose padrão com subsequente diminuição da atividade durante o processo de reutiilzação dos hidrogéis contendo enzima imobilizada. As frações de β-D-galactosidase liberada a partir do hidrogel a base de goma arábica em solução de lactose padrão e solução de lactose contida em leite UHT foram $0.919 \pm 0.065 \text{ e } 0.651 \pm 0.071$, respectivamente, após dez ciclos de reutilização. As frações de β -D-galactosidase liberadas a partir do hidrogel a base de quitosana foram 0,892 \pm 0,933 e 0,567 \pm 0,068, respectivamente. A reutilização do hidrogel contendo β -D-galactosidase imobilizada em temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C liberou menor quantidade da enzima a partir de ambos hidrogéis. Nessas condições pode-se concluir que a hidrólise de lactose e a atividade enzimática foram provenientes principalmente da enzima imobilizada, com pequena contribuição da enzima livre a qual pode ter sido liberada durante os ciclos de hidrólise. A hidrólise de lactose contida no leite UHT foi mais eficiente devido à presença de cofatores enzimáticos tais como íons Na⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺ os quais estão comumente presentes em alimentos derivados de lácteos (BOVENHUIS et al., 2016; PLOU et al., 2016). Por fim, a pressão osmótica gerada pela diferença entre concentração de lactose na solução aquosa externa e solução aquosa dentro da rede tridimensional hidrofílica do hidrogel aumenta o coeficiente de difusão de lactose pelos poros (ZHANG et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

4.4 CONCLUSÃO

A imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana é uma estratégia alternativa para aumentar o rendimento e a produtividade de leite com baixo teor de lactose e produção de cápsulas de liberação controlada de enzima para indivíduos intolerantes a lactose. O processo de imobilização, liberação, atividade enzimática e hidrólise de lactose são influenciados pelos métodos de secagem dos hidrogéis. Assim, é importante monitorar a estabilidade da enzima imobilizada em diferentes valores de pH e temperatura para aplicação na produção de produtos com baixo teor de lactose. Durante a hidrólise de lactose contida em leite UHT foi observado que cofatores enzimáticos são importantes para melhorar a eficiência do processo. Assim, a hidrólise de lactose usando β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis é uma estratégia viável, pois é possível reutizar a enzima em ciclos sucessivos de hidrólise sem perda total da sua atividade. Por fim, a imobilização de β -D-galactosidase em hidrogéis a base de goma arábica e hidrogéis a base de quitosana pode ser uma alternativa economicamente viável para a indústria alimentícia.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se inferir que o hidrogel a base de goma arábica e hidrogel a base de quitosana são suportes viáveis para imobilização de β -D-galactosidase e produção de leite com baixo teor de lactose. Ainda, é possível utilizar esses hidrogéis como cápsulas de liberação controlada de enzima em indivíduos intolerantes a lactose. A imobilização de β -D-galactosidase nos hidrogéis foi eficiente devido às propriedades físico-químicas da enzima e da rede polimérica tridimensaional hidrofílica do hidrogel. Na aplicação dos hidrogéis para imobilização de enzimas é importante o controle de certas propriedades tais como grau de intumescimento, mecanismo de absorção de água, pH, temperatura e força iônica. Ambos hidrogéis sintetizados aqui foram eficientes para imobilização, liberação controlada e aplicação de β -D-galactosidase imobilização, na hidrólise de lactose em diferentes meios.

Os métodos de secagem dos hidrogéis são fatores preponderantes para sua aplicação em sistemas de imobilização de enzimas, uma vez que mudam a porosidade e a posição de sítios ativos para adsorção. Usando liofilização como método de secagem é possível obter maior quantidade de sítios de imobilização e maior quantidade de reutilização da enzima imobilizada. O aumento da área superficial pelo uso desse método é também um fator preponderante na imobilização, na reação de hidrólise e também na liberação controlada de enzima. Assim, o método de secagem é uma etapa importante que pode ser usada para melhorar as características da enzima imobilizada contendo enzima imobilizada é muitas vezes uma combinação da concentração de enzima imobilizada e enzima livre a qual foi liberada a partir dos hidrogéis.

Temperatura, concentração inicial de enzima e pH de soluções influenciam a capacidade de imobilização, a capacidade catalítica e os processos de liberação. Desta forma, é necessário ser empregadas condições de imobilização adequadas dependendo do objetivo da aplicação. Então, é de suma importância os estudos de variáveis independentes na imobilização e aplicação para melhorar o custo/benefício de um reator industrial usado para hidrólise de lactose. Apesar da capacidade de imobilização de β -D-galactosidase em hidrogel a base de quitosana ter sido maior que aquela observada para o hidrogel a base de goma arábica, a enzima imobilizada possuiu menor atividade devido a maior quantidade de enzima liberada durante as reações de hidrólise. Assim, a

profundidade dos canais porosos do hidrogel a base de quitosana pode ter influenciado na atividade enzimática neste suporte como ocorreu com a fração de enzima liberada.

As frações de β -D-galactosidase liberadas a partir de hidrogéis são influênciadas pelas condições de imobilização, assim, é necessário controlar temperatura, pH, atividade enzimática dentre outros, para melhorar a eficiência de imobilização. Como a fração de enzima liberada aumenta com aumento de temperatura e pH, ocorre um aumento na taxa de hidrólise. Assim, os hidrogéis são adequados para imobilização e liberação de enzimas e/ou proteínas pela variação de temperatura e pH. Assim, esses hidrogéis podem ser considerados sensíveis a pH e temperatura para os processos de imobilização de β -D-galactosidade. As enzimas imobilizadas em hidrogéis sensíveis a pH e temperatura possuem maior estabilidade e eficiência na hidrólise de lactose.

Hidrogéis a base de polissacarídios contendo β -D-galactosidase imobilizada podem ser eficientemente utilizados na hidrólise de lactose e produção de leite com baixo teor de lactose. Além disso, β -D-galactosidase imobilizada em hidrogéis pode ser utilizada em vários ciclos sucessivos de hidrólise de lactose sem perda total de atividade enzimática. Assim, a imobilização de enzimas em hidrogéis constituídos de polissacarídios é bastante promissora para reatores industriais de produção de produtos com baixo teor de lactose.
REFERÊNCIAS

AHMAD, S. et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. Journal of Animal and Plant Sciences, v. 23, p. 62–74, 2013.

AHMED, P. et al. A Promising Approach To Support Appropriate Colon Target Drug Delivery System : a Review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 556–568, 2016.

AIT-OUAZZOU, A. et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of Mentha pulegium, Juniperus phoenicea, and Cyperus longus essential oils from Morocco. **Food Research Internacional**, v. 45, p.42-47, 2010.

ALBAYRAK, N.; YANG, S.T. Immobilization of Aspergillus oryzae beta-galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 371-383, 2002.

ALBUQUERQUE, T. L. et al. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 875–880, 2016.

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 401–414, 2008.

ANNABI, N. et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, p. 371-383, 2010.

ANSARI, S. A.; SATAR, R. Recombinant b-galactosidases - Past, present and future: A mini review. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 81, p. 1–6, 2012.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R. de; MATTOSO, L. H. C. Biodegradable hydrogel as delivery vehicle for the controlled release of pesticide. In: STOYTCHEVA, M. (Ed.). **Pesticides - Formulations, Effects, Fate.** 1. ed. Londres: Intech, 2011. p. 81–102.

ASLAN, N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. **Powder Technology**, v. 185, n. 1, p. 80-86, 2008.

ATTA, S. et al. Injectable biopolymer based hydrogels for drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 240–245, 2015.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª ed. Campinas: Bookman, 2003.

BAŞ, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of food engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BAYLESS, T. M.; BROWN, E.; PAIGE, D. M. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. **Current Gastroenterology Reports**, v. 19, p. 23, 2017.

BENCHERIF, S. A. et al. End-group effects on the properties of PEG-co-PGA hydrogels. Acta Biomaterialia, v. 5, n. 6, p. 1872–1883, 2009.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BORTOLIN, A. et al. C. Investigação do processo de absorção de água de hidrogéis de polissacarídeo: efeito da carga iônica, presença de sais, concentrações de monômero e polissacarídeo. **Polímeros**, v. 22, p. 311–317, 2012.

BOSTAN, M. S. et al. Controlled release of 5-aminosalicylicacid from chitosan based pH and temperature sensitive hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 177–183, 2013.

BOVENHUIS, H. et al. Effects of the diacylglycerol o-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism on fatty acid, protein, and mineral composition of dairy cattle milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3113–3123, 2016.

BOX, G. EP; HUNTER, J. S. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. **The Annals of Mathematical Statistics**, p. 195-241, 1957.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 136. Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, v. p. 9 fev. 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 135. Aprova o regulamento técnico** referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose e altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 fev. 2017b.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 62. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez. 2011. BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC n° 205. Enzimas e Preparações enzimáticas para uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 nov. 2006.

BRAZEL, C. S.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable , hydrophilic glassy polymers. **Polymer**, v. 40, p. 3383–3398, 1999.

CAETANO, M. N. P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. A New Transdermal Drug Delivery System Containing Hydroquinone. Latin American Journal of Pharmacy, v. 30, p. 1833–1842, 2011.

CAMPOS, T.C.A.S.; ALMEIDA, W. K.; ALEGRO, L. C. A. Utilização da β -galactosidase na Hidrólise da Lactose do Leite em Baixa Temperatura. **Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 4, 2015.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de enzimas e células imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 48-57, 2006.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262-6276, 2013.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quimica Nova**, v. 32, p. 175–187, 2009.

CASTIGLIONI, G.L. **Estudo da produção e utilização de lipase de Brukholderia cepacia na síntese enzimática de biodiesel**. 2009. f? Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Unicamp, Campinas, 2009.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from Kluyveromyces lactis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1995.

CHEN, S. C.; DUAN, K. J. Production of galactooligosaccharides using b-galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris(hydroxymethyl)phosphine as an optional coupling agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 12499–12512, 2015.

CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. **Proteomic profiling and analytical chemistry:** the crossroads. 2. ed. Amsterdam: Edition Elsevier, 2016. Disponível em: http://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/22459>. Acesso em: 18 abril 2018.

CORGNEAU, M. et al. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 3344-3356, 2017.

COVIELLO, T. et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5–24, 2007.

CUNHA, L.R. et al. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 23-26, 2007.

DAOUB, R. M. A. et al. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2016.

ELGADIR, M. A. et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 619–629, 2015.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. HHS Public Access. International journal of advanced research, v. 137, p. 10160–10163, 2016.

ESSA, H. et al. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 61–68, 2007.

FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosangrafted hydrogels. Food Chemistry, v. 179, p. 44–51, 2015.

FAEDO, R. et al. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. **Revista CIATEC-UPF**, v. 5, n. 1, p. 44-54, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185–197, 1998.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Physical crosslinking of lipase from Rhizomucor miehei immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 81–88, 2017.

FLOOD, M. T.; KONDO, M. Toxicity evaluation of a b-galactosidase preparation produced by penicillium multicolor. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 281–292, 2004.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems. **Iranian Polymer Journal**, v. 18, p. 63–88, 2009.

GAVA, A. J. Princípios de Tecnologia de Alimentos. São Paulo, Nobel, 1994.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 1985.

GEROLA, A. P. et al. The effect of methacrylation on the behavior of Gum Arabic as pHresponsive matrix for colon-specific drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 326– 339, 2016.

GILS, P. S.; RAY, D.; SAHOO, P. K. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 237–244, 2010.

GOUSAUD J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: Luquet F M. O leite: do úbere à fábrica de laticínios. **Publicações Europa-America Lda**, v. 1, p. 31-56, 1985.

GROSOVÁ, Z. et al. Production of D-galactose using b-galactosidase and Saccharomyces cerevisiae entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel. **Food Chemistry**, v. 116, p. 96–100, 2009.

GUILHERME, M. R. et al. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 365–385, 2015.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes and cells. Springer Science and Business Media, 2006.

GUO, B. L.; GAO, Q. Y. Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly (N-isopropylacrylamide)semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 16, p. 2416–2422, 2007.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, p. 569–579, 2002.

HASSAN, N. et al. Engineering a thermostable Halothermothrix orenii β-glucosidase for improved galacto-oligosaccharide synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 3533–3543, 2016.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 107–122, 2011.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. American Academy of Pediatrics, v. 118, p. 1279-1286, 2006.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 43, p. 3–12, 2002.

HSU, C.A. et al. Cultural condition affecting the growth and production of β -galactosidase by Bifidobacterium longum CCRC 15708 in a jar fermenter. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.186–9, 2007.

HURDUC, V. et al. OC-30 Lactose intolerance: new aspects of an old problem. Archives of Disease in Childhood, v. 102, p. 11-12, 2017.

HUSAIN, Q. et al. Immobilization of Aspergillus oryzae β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 37-43, 2011.

HWANG, E.T.; GU, M.B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 49-61, 2013.

ILLANES, A. et al. Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of β -lactam antibiotics in organic medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 189–202, 2006.

JESIONOWSKI, T.; JAKUB, Z.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v.20, n.5-6, p. 801-821, 2014.

JURADO, E. et al. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33–40, 2004.

KAMMOUN, M. et al. Biological properties and biodegradation studies of chitosan biofilms plasticized with PEG and glycerol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 433–438, 2013.

KANG, S. et al. Protein antifouling mechanisms of PAN UF membranes incorporating PAN-g-PEO additive. **Journal of Membrane Science**, v. 296, p. 42-50, 2007. KANTAR WORDPANEL. Uma onda que veio para ficar, 2016. Disponível em: https://www.kantarworldpanel.com/br>. Acesso em: 8 mai. 2018.

KIM, M.H. et al. Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 68-72, 2012.

KLEIN, M. P. Imobilização de β – galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KONO, H.; OEDA, I.; NAKAMURA, T. The preparation, swelling characteristics, and albumin adsorption and release behaviors of a novel chitosan-based polyampholyte hydrogel. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 97-107, 2013.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. Enzyme and microbial technology, v. 35, p. 126-139, 2004.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1379–1408, 2006.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. α-Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 308–316, 2017.

LIU, H. et al. Covalent immobilization of Kluyveromyces fragilis b-galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1287–1295, 2012.

LULE, V. K. et al. Food intolerance: lactose intolerance. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 43-48, 2016.

MAQBOOL, M. et al. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest biology and technology**, v. 62, n. 1, p. 71-76, 2011.

MARTINEK, K. et al. The principles of enzyme stabilization I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. **BBA - Enzymology**, v. 485, p. 1–12, 1977.

MBUYI-KALALA, A.; SCHNEK, A. G.; LÉONIS, J. Separation and characterization of four enzyme forms of beta-galactosidase from Saccharomyces lactis. **European journal of biochemistry**, v. 178, p. 437–443, 1988.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quimica Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

MINTEL. Cresce o lançamento de produtos sem lactose no Brasil, 2016. Disponível em: http://brasil.mintel.com/blog/noticias-mercadoalimentos-bebidas/cresce-lancamento-deprodutos-sem-lactose-no-brasil. Acesso em: 8 mai. 2018.

MONIER, M. et al. Synthesis of photo-responsive chitosan-cinnamate for efficient entrapment of β -galactosidase enzyme. **Reactive and Functional Polymers**, v. 124, p. 272–279, 2018.

MOTLAGH, S. et al. The analysis of Acacia gums using electrophoresis. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p.848-854, 2006.

MOURA, M. R. de; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Hidrogéis semi-IPN baseados em rede de alginato-Ca2+ com PNIPAAm entrelaçado: propriedades hidrofílicas, morfológicas e mecânicas. **Polímeros**, v. 18, p. 132–137, 2008.

PANESAR, P.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β-Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v.2010, 2010.

PANESAR, P. S. et al. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 81, p. 530–543, 2006.

PAULINO, A. T. et al. One-pot synthesis of a chitosan-based hydrogel as a potential device for magnetic biomaterial. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, p. 2636–2642, 2009.

PAULINO, A. T. et al. Smart hydrogels based on modified gum arabic as a potential device for magnetic biomaterial. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, p. 1196–1205, 2010.

PAULINO, A. T. et al. Effect of magnetite on the adsorption behavior of Pb(II), Cd(II), and Cu(II) in chitosan-based hydrogels. **Desalination**, v. 275, p. 187–196, 2011.

PAULINO, A.T. et al. Removal of methylene blue dye from an aqueous media using superabsorbent hydrogel supported on modified polysaccharide **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 301, p. 55–62, 2006a.

PAULINO, A.T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides **Carbohydrate Polymers**, V. 64, P. 98–103, 2006b.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27–46, 2000.

PEREIRA, M. C. S. et al. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 57-65, 2012.

PLOU, F. J. et al. Microbial enzyme technology in food applications. In: ROSELL, C. M.; RAY R. C. β -Galactosidases for lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis, CRC Press, 2016. p. 121–144.

PRADELLA, J.G.C. **Reatores com celulas imobilizadas: biotecnologia industrial**. E. Blücher, São Paulo: p.372, 2001.

PROZYN. Produtos com baixa lactose. Informação técnica. 2010.

RAM, E.C. β-galactosidase production by Kluyveromyces lactis in batch and continuous culture. **Durban University of Technology**. Durban, South Africa. 2011.

RAMAKRISHNAN, A. et al. Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 368-372, 2007.

RAMAZANI, A. et al. Perlite-SO 3 H nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for onepot three- component synthesis of 1, 2-dihydro-1-aryl-naphtho [1, 2-e][1, 3] oxazine-3-one derivatives under both microwave-assisted and thermal solvent-free conditions : **Nanochemistry Research**, v. 1, p. 87–107, 2016.

RANGA RAO, K. V.; DEVI, K. P.; BURI, P. Cellulose matrices for zero-order release of soluble drugs. **Drug development and industrial Pharmacy**, v. 14, p. 2299-2320, 1988.

RICARDI, N. C. et al. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, 2017.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RISBUD, M. V. et al. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 23–30, 2000.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.

RUEDA, N. et al. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads : A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.

SAMANTA, H. S.; RAY, S. K. Controlled release of tinidazole and theophylline from chitosan based composite hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 109–120, 2014.

SANCHEZ, C. et al. Acacia gum: History of the future. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 140–160, 2017.

SANGEETHA, K.; EMILIA ABRAHAM, T. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 3, p. 314–319, 2008.

SANTOS, J. C. S. D. et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, p. 2413–2432, 2015.

SANTOS, S. M. L. et al. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 53–64, 2016.

SARIKA, P. R. et al. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 61–68, 2016.

SHAIKH, M.M. et al. In-Vitro Release Kinetic Study of Paracetamol from Sustained Release Matrix Tablet Containing Gum acacia and acrylic acid hydrogels. **International Journal of Engineering and Technical Research**, v. 2, p. 298-303, 2014.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Advanced Synthesis and Catalysis, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **The Royal Society of Chemistry**, v. 42, p. 6223–6235, 2013.

SIEDENBIEDEL, F.; TILLER, J. C. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles. **Polymers**, v. 4, p. 46–71, 2012.

SNOWDEN, M. J.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Functional characteristics of gum arabic. **Topics in Catalysis**, v. 1, p. 291–300, 1987.

SUAREZ, F.L.; SAVAIANO, D.; LEVITT, M.D. Review article – The treatment of lactose intolerance. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, v. 9, p. 589–597, 1995.

TAMIME, A. Y.; THOMAS, L. Probiotic dairy products. John Wiley and Sons, 2017.

TORRES, J. K. F. et al. Hidrólise Da Lactose E Produção De Leite Em Pó: Aspectos Tecnológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, p. 94, 2016.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Improved biocatalysts based on Bacillus circulans β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 57–64, 2012.

VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1387–1408, 2011.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, Apr 21 2000.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules**, v. 22, p. 91, 2017.

WANG, Y. et al. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin-calcium carbonate composite films. **Food Chemistry**, v. 166, p. 414–422, 2015.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -d-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 157-164, 2018.

WU, T. et al. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 3888–3894, 2005.

YE, A.Q. et al. Temperature-dependet complexation between sodium caseinate and gum arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p.82-88, 2012.

ZHANG, M. et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (Bombyx mori) pupa exuvia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 99–105, 2000.

ZHANG, W. et al. Osmotic Pressure Triggered Rapid Release of Encapsulated Enzymes with Enhanced Activity. **Advanced Functinal Materials**, p. 1–7, 2017.

ZHANG, Z. et al. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308–315, 2016.

ZONATTO, F. et al. Adsorption and controlled release of potassium, phosphate and ammonia from modified Arabic gum-based hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

APÊNDICE A - CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS

Artigos publicados:

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 157-164, 2018.

WOLF, M. et al. Copper/zinc bioaccumulation and the effect of phytotoxicity on the growth of lettuce (Lactuca sativa L.) in non-contaminated, metal-contaminated and swine manure-enriched soils. **Water Air and Soil Pollution**, v. 228, p. 152, 2017.

Trabalhos completos apresentados em eventos científicos:

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Efeito do pH na imobilização de β -D-galactosidase em hidrogéis a base de quitosana. In: X SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 2018, Passo Fundo. **Anais eletrônicos...** Passo Fundo: Ed. UPF, 2018. Disponível em: < http://sial.upf.br/index.php/sial-2018/trabalhos>. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Liberação de β -D-galactosidase a partir de hidrogel à base de goma arábica modificada e hidrólise de lactose. In: X SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 2018, Passo Fundo. **Anais eletrônicos...** Passo Fundo: Ed. UPF, 2018. Disponível em: < http://sial.upf.br/index.php/sial-2018/trabalhos>. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Imobilização de β-galactosidase e produção de alimentos com baixo teor de lactose. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 2017, Lages. **Anais eletrônicos...** Lages: Ed. UNIPLAC, 2017. Disponível em: http://www.simposioppgas.com.br/. Acesso em: 8 jul. 2018.

GASPARIN, B. C.; WOLF, M.; PAULINO, A. T. Imobilização de enzimas em diferentes matrizes. In: IV Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território, 2017. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 2017, Lages. **Anais eletrônicos...** Lages: Ed. UNIPLAC, 2017. Disponível em: http://www.simposioppgas.com.br/. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; VIEIRA, T.; VARNIER, K.; GASPARIN, B. C.; SANTOS, A. P; PAULINO, A. T. Imobilização de β -galactosidase em hidrogel constituído de goma arábica modificada. In: 14° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2017, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Águas de Lindóia: CBPol. Disponível em: http://www.cbpol.com.br/anais/2017/. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; VIEIRA, T.; VARNIER, K.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Mecanismo de absorção de água em hidrogéis constituídos de goma arábica. In: 14° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2017, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Águas de Lindóia: CBPol. Disponível em: http://www.cbpol.com.br/anais/2017/. Acesso em: 8 jul. 2018.

Resumos expandidos apresentados:

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; CESCO, C. T.; ARTIFON, S. E. S.; PAULINO, A. T. Imobilização de β -galactosidase em hidrogel a base de quitosana e aplicações na hidrólise de lactose. 2° WORKSHOP DE COMPOSTOS BIOATIVOS E QUALIDADE DE ALIMENTOS, 2018, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria: UFSM. Disponível em: br/>>. Acesso em: 8 jul. 2018.">http://wcba.ufsm.br/anais/index.php/pt-br/>br/>>. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; CESCO, C. T.; ARTIFON, S. E. S.; PAULINO, A. T. Reutilização de β -galactosidase imobilizada em hidrogel a base de goma arábica modificada na hidrólise de lactose. 2° WORKSHOP DE COMPOSTOS BIOATIVOS E QUALIDADE DE ALIMENTOS, 2018, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria: UFSM. Disponível em: br/>. Acesso em: 8 jul. 2018">http://wcba.ufsm.br/anais/index.php/pt-br/>. Acesso em: 8 jul. 2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. Imobilização de β -galactosidase em hidrogéis constituídos de quitosana para a produção de leite com baixo teor de lactose. In: SEMINÁRIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2017, Chapecó. **Anais eletrônicos...** Chapecó: UDESC. Disponível em: < http://www.udesc.br/27seminariodeiniciacaocientifica>. Acesso em: 8 jul. 2018.

GASPARIN, B. C.; WOLF, M.; PAULINO, A. T. Cinética de Intumescimento de hidrogéis constituídos de goma arábica modificada. In: SEMINÁRIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2017, Chapecó. **Anais eletrônicos...** Chapecó: UDESC. Disponível em: < http://www.udesc.br/27seminariodeiniciacaocientifica>. Acesso em: 8 jul. 2018.

GASPARIN, B. C.; WOLF, M.; SANTOS, A. P dos; PAULINO, A. T. Efeito da temperatura na imobilização de β -galactosidase em hidrogéis constituídos de goma arábica. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO E XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIPAR, 2017, Umuarama. **Anais eletrônicos...** Umuarama: CICTI. Disponível em: < http://cicti.unipar.br/index.php>. Acesso em: 8 jul.2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; SANTOS, A. P dos; PAULINO, A. T. β-galactosidase imobilizada em hidrogéis a base de polissacarídios aplicada na obtenção de leite com baixo teor de lactose. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO E XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIPAR, 2017, Umuarama. **Anais eletrônicos...** Umuarama: CICTI. Disponível em: < http://cicti.unipar.br/index.php>. Acesso em: 8 jul.2018.

WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; SANTOS, A. P dos; PAULINO, A. T. Reciclagem de βgalactosidase imobilizada em hidrogéis a base de quitosana na hidrólise de lactose em leite integral UHT. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO E XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIPAR, 2017, Umuarama. **Anais eletrônicos...** Umuarama: CICTI. Disponível em: < http://cicti.unipar.br/index.php>. Acesso em: 8 jul.2018.

GASPARIN, B. C.; WOLF, M.; SANTOS, A. P dos; PAULINO, A. T. Ensaios de Intumescimento em hidrogéis constituídos de goma arábica modificada. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL

DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO E XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIPAR, 2017, Umuarama. **Anais eletrônicos...** Umuarama: CICTI. Disponível em: < http://cicti.unipar.br/index.php>. Acesso em: 8 jul.2018.