

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE - *CAMPUS* ARAQUARI
BEATRIZ CRISTINA DE OLIVEIRA VIEIRA, BRUNO BONASSOLI,
HENRIQUE GONÇALVES MARQUES, JEFFERSON SCHMOELLER
MARCOLINO, NAUHANA JULIA BOEBEL ZEMBRANI.**

**INCORPORAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE (E.C.
3.2.1.23) EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ÁGAR**

ARAQUARI/SC

2016

**BEATRIZ CRISTINA DE OLIVEIRA VIEIRA, BRUNO BONASSOLI,
HENRIQUE GONÇALVES MARQUES, JEFFERSON SCHMOELLER
MARCOLINO, NAUHANA JULIA BOEBEL ZEMBRANI**

**INCORPORAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE (E.C.
3.2.1.23) EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ÁGAR**

Trabalho de Qualificação do Projeto de Iniciação Científica Integrada (PIC-QUIMI) apresentado ao Instituto Federal Catarinense – *Campus* Araquari como parte complementar à matriz curricular do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio. Orientador: André Luis Fachini de Souza.

ARAQUARI/SC

2016

RESUMO EM LÍNGUA VERNÁCULA

A enzima β -galactosidase, popular lactase, é produzida no intestino delgado e sua ação permite a absorção do principal açúcar do leite (lactose), porém quando os níveis de β -galactosidase são insuficientes, a lactose não é digerida no intestino delgado e chega em grande quantidade ao cólon, lá é fermentada por bactérias e causam diversos sintomas gastrointestinais. Para contornar esses problemas, comprimidos com a enzima são indicados para os intolerantes, contudo a maioria dos produtos disponíveis no mercado são importados, os quais representam elevados custos, e, um meio de beneficiar o consumidor seria imobilizar a enzima para utilização reaproveitada. A imobilização de enzimas é um processo de confinamento da enzima em questão em um suporte sólido com a retenção de sua atividade catalítica, resultando na reutilização desta numerosas vezes até sua inativação. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi imobilizar a enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) comercial (Lactaid[®]) em suporte sólido polimérico de ágar. A enzima imobilizada nos suportes testados foi avaliada quanto à sua atividade catalítica, assim como o tempo de estabilidade, em uma perspectiva de utilização contínua da enzima imobilizada. A enzima foi imobilizada sendo incorporada em matriz sólida de ágar e os experimentos foram feitos com 1 e 2 comprimidos de lactase comercial. Ao final do trabalho foi confirmado o fato de que a enzima alcança sua atividade máxima em cerca de 7 minutos e mantém sua estabilidade por 6 dias se guardada e refrigerada a 6 °C.

Palavras-chave: Enzima, β -galactosidase, lactose, imobilização.

SUMÁRIO

1	TEMA	04
1.1	DELIMITAÇÃO DO TEMA	04
1.2	PROBLEMA	04
1.3	HIPÓTESES	04
2	OBJETIVO GERAL	05
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	05
3	INTRODUÇÃO	06
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	07
4.1	LEITE	07
4.1.1	Lactose	08
4.1.1.2	Intolerância à Lactose	10
4.2.	ENZIMAS	10
4.2.1	Classes de Enzimas	11
4.2.2	Enzima Lactase	12
4.2.2.1	Atuação da lactase no corpo humano	13
4.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	14
4.3.1	Imobilização de β-galactosidase	15
5	METODOLOGIA DA PESQUISA	17
5.1	PREPARAÇÃO DOS SUPORTES SÓLIDOS	17
5.2	ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	18
5.3	MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	19
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
7	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 TEMA

Imobilização da enzima β -galactosidase em suporte sólido.

1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Imobilização da enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23) em suporte sólido de ágar alvejando melhor aproveitamento de sua atividade biocatalítica.

1.2 PROBLEMA

Uma grande parcela da população mundial possui intolerância à lactose e faz uso de suplemento da enzima lactase que supre a deficiência desta enzima no organismo e possibilita a digestão da lactose, anulando os sintomas causados pela intolerância e até mesmo amenizando os sintomas da alergia ao leite de vaca. Entretanto, essas enzimas são na sua maioria importadas, de custo relativamente elevado e pouco acessível à uma parcela da população. Poderiam então as enzimas serem melhor aproveitadas, com menor custo e maior acessibilidade através do método de imobilização das próprias?

1.3 HIPÓTESES

- A imobilização da enzima responsável pela hidrólise da lactose em suportes sólidos aumenta a estabilidade da mesma;

2 OBJETIVO GERAL

Imobilizar a enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) comercial (Lactaid[®]) em suporte sólido e averiguar a retenção de sua atividade catalítica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar a enzima β -galactosidase fisicamente no suporte sólido de ágar;
- Estudar a cinética da reação de hidrólise de lactose realizada pela enzima imobilizada no suporte através da medição da porcentagem de glicose formada após a hidrólise com o auxílio de um kit laboratorial;
- Avaliar o tempo de estabilidade da enzima imobilizada frente à sua atividade catalítica por meio do resultado de sua reação com uma solução de lactose definida.

3 INTRODUÇÃO

O leite é um componente da alimentação dos mamíferos, essencial durante as primeiras semanas de vida, fornecendo as proteínas, lipídios e carboidratos necessários para o desenvolvimento do neonato (FALCÃO, 2001).

A enzima da classe hidrolase β -galactosidase, comumente conhecida como lactase, é produzida com a função de catalisar a reação de hidrólise da lactose (INSUMOS, 2016) - um carboidrato, mais especificamente um dissacarídeo, formado pelos monossacarídeos galactose e glicose que são, facilmente, digeridos no intestino delgado por serem carboidratos muito simples (TIBBETS, 2008).

Quando os níveis de β -galactosidase são muito baixos, ou nulos no corpo humano, as pessoas não podem consumir leite ou derivados, já que a lactose não é devidamente digerida no intestino delgado e chega ao cólon, parte do intestino que possui, em grande número, bactérias capazes de fermentar a lactose, o que causa diversos sintomas gastrointestinais no organismo humano, devido ao fato de liberarem gases, como o hidrogênio, e ácido láctico. (LIMA, 2012)

Uma grande parcela da população possui intolerância à lactose, pois em um intervalo de tempo após a fase de aleitamento, seu organismo diminui, ou cessa a produção da enzima lactase.(PEREIRA, 1981) Para trespassar esse problema as pessoas com essa intolerância usam enzimas encapsuladas, que devem ser depositadas sobre o alimento que possui lactose, fazendo com que o mesmo possa ser consumido. Essas enzimas encapsuladas geralmente não são totalmente aproveitadas, pois para ingerir quaisquer quantidades de lactose é necessário usar uma cápsula mesmo que não seja necessária toda aquela quantidade de lactase para fazer a digestão daquela quantidade de lactose. Elas também são demasiadamente caras devido ao fato de serem, em sua grande maioria, importadas.

Portanto, em prol destes problemas, deixando em destaque a intolerância à lactose presente na vida de inúmeras pessoas, surgiu o presente trabalho, que visou avaliar as enzimas imobilizadas quanto à sua atividade catalítica e tempo de estabilidade, numa expectativa de maior aproveitamento da enzima e maior viabilidade de custo.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 LEITE

O leite é descrito como o produto final de uma ordenha completa e ininterrupta de uma fêmea leiteira sadia em condições de higiene (VEISSEYRE, 1988), contudo também pode ser definida como o produto das glândulas mamárias, sendo um líquido viscoso de uma fase e contendo partículas em suspensão nas condições normais de temperatura ou refrigeração (SGARBIERI, 1996). Sua composição varia de acordo com a raça, alimentação e tempo de gestação, período de lactação, saúde, período de cio, idade, clima e estação do ano, porém independente das características individuais, os sólidos totais do leite são divididos em lipídios (gorduras) e sólidos não gordurosos (SNG - proteínas, lactoses e cinzas) (VENTURINI, 2007). (Tabela 1).

O leite é caracterizado pela cor branca, resultante da dispersão de luz refletida pelas moléculas de gordura, das partículas coloidais e de fosfato de cálcio. A cor amarelada provém do pigmento caroteno, e torna-se mais branco devido a homogeneização. Cores anormais, tais como vermelho e azul, são causadas por bactérias, *Serratia marcescens* e do gênero *Pseudomonas*, respectivamente. Seu pH varia entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 à 20 °C e 6,5 à 25 °C (MOURA, 2012).

Tabela 1: Composição Média do leite bovino

Constituinte	Teor (g/kg)	Varição
Água	873	855-887
Lactose	46	38-53
Gordura	39	24-55
Proteínas	32,5	23-44
Substâncias minerais	6,5	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3-2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptação de Walstra e Jenness, 1984.

Dentre os diferentes tipos de leite estão o integral - que não sofre processo químico para retirada da gordura natural da bebida -, o semi desnatado - que possui certa redução de gordura, com as mesmas quantidades de cálcio e proteínas que a versão integral - e o desnatado - redução de gordura é muito maior comparado ao leite semi desnatado. Ademais da gordura, não há grande variação na quantidade de proteínas, portanto a porcentagem de lactose é praticamente a mesma.

O leite em si é essencial para a saúde dos ossos e dos dentes, pois é rico em cálcio, magnésio e vitaminas A e D, que auxilia na absorção de cálcio pelo intestino, impedindo a perda de massa óssea. Além de beneficiar os ossos, ele proporciona bem-estar por conter o aminoácido triptofano, que relaxa os músculos e induz o sono (STUPPIELLO, 2016).

O principal açúcar, característico do leite é a lactose, um dissacarídeo constituído pelos monossacarídeos glicose e galactose, unidos por uma ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (GALLO).

4.1.1 Lactose

A lactose, nome popular do 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicopiranosose α/β -isômeros, é o principal açúcar presente no leite e seus derivados. Os açúcares são formados por

unidades chamadas monossacarídeos, e a lactose é formada por duas dessas unidades, a α -D-glicose e a β -D-galactose, sendo, portanto, um dissacarídeo. (Figura 1).

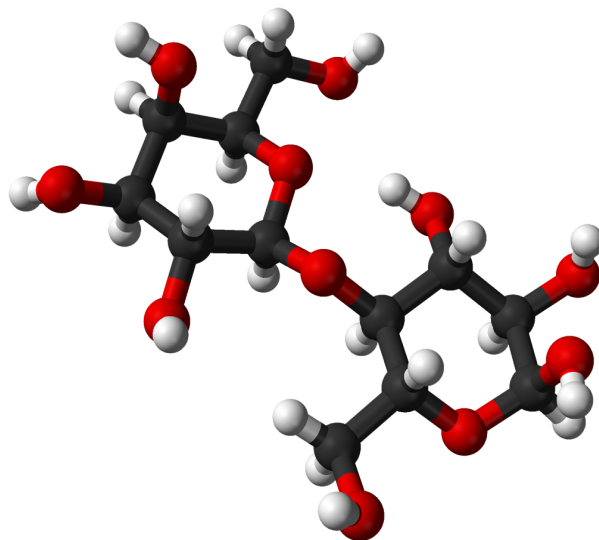


Figura 1 - Estrutura da lactose

O leite humano contém de 6-8% de lactose e o de vaca, de 4-6%. A lactose presente no leite é hidrolisada (Figura 1) pela ação da lactase, uma β -galactosidase sendo considerada portanto como um β -galactosídeo (WANKENNE, 2009). É levemente adocicada e não fermentada por leveduras, apesar de serem adaptadas para fazê-lo. Lactobacilos são capazes de fermentar lactose, tendo como produto final o ácido láctico (ALBUQUERQUE, 1997). A lactose é o hidrato de carbono mais importante no leite da maioria das espécies, sendo biossintetizado na glândula mamária. Industrialmente, a lactose é produzida do leite de bovinos principalmente, ou a partir dos derivados do leite, tais como o soro do queijo ou do filtrado da ultrafiltração (MOURA, 2012).

Ele é fundamental para que o cálcio, mineral de suma importância na prevenção de doenças como a osteoporose e a obesidade, que ajuda na formação dos ossos e na queima de gorduras, seja absorvido pelo organismo de maneira adequada e na quantidade ideal.

Logo após a ordenha, o leite apresenta uma reação ácida com a fenolftaleína, mesmo que nenhuma acidez, como o ácido láctico, tenha sido produzido por fermentação, já que sua acidez deve-se a caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. Sua acidez varia-se entre 0,13 e 0,17%, expressa como ácido láctico, e é elevada por ações de enzimas, que caracteriza a acidez láctea (UFBA, 2009).

4.1.1.2 Intolerância à Lactose

A intolerância à lactose, também conhecida como deficiência de lactase, é a incapacidade que o corpo tem de digerir lactose. O dissacarídeo lactose não é quebrado, por causa da ausência da enzima, em monossacarídeos β -galactose e β -glicose, dificultando a absorção dos mesmos pelo intestino delgado, então a lactose se dirige para o cólon, que é uma parte do intestino que possui uma alta taxa bacteriana, que fermentam a lactose acarretando problemas gastrointestinais, com a liberação de gases como ácido láctico, metano, entre outros.

Segundo estudos, mais de 70% da população brasileira está sujeita a adquirirem a intolerância, devido a insuficiente produção da enzima lactase, logo, produtos com baixo teor de lactose são oportunos para as empresas lácteas (IFT, 2012).

É importante ressaltar que intolerância é diferente da alergia ao glicídio do leite. A alergia é uma reação agressiva do organismo do indivíduo a algumas proteínas do leite (BROSTOFF, et al., 2000)(SOUZA, 2006) que devem ser quebradas com alguma proteinase. Já a intolerância é voltada apenas para a insuficiência de enzima para quebrar a lactase (VALSECHI, 2001).

4.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas presentes nos seres vivos que são responsáveis por catalisar reações bioquímicas em organismos vivos, isto é, gerar uma nova reação com uma energia de ativação menor. As enzimas são sintetizadas por células vivas e catalisam quase todas as reações do metabolismo dos seres vivos sem serem consumidas na reação, além não alterarem o ponto de equilíbrio de reação (INSUMOS, 2016).

4.2.1 Classes de Enzima

As enzimas podem ser classificadas segundo vários critérios e são distribuídas em seis classes: oxidorreductores, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Suas classes são identificadas no nome de cada enzima pelo primeiro número da série de algarismos que os caracteriza, como por exemplo a β -galactosidase, cujo número é E.C.3.2.1.23, o primeiro número 3 caracteriza-a como uma hidrolase. O segundo número indica sua subclasse (glicosilases), o terceiro indica os grupos químicos específicos que participam de cada reação. Já o última par de números caracteriza a enzima propriamente dita (LEHNINGER, et al, 2002).

Nº	Classificação da Enzima	Função
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos às ligações duplas ou formação de ligações duplas por meio de remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formam ligações C-C, C-O, C-S e C-N nas reações acopladas à quebra de ATP

(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - NC-IUBMB, 1997)

4.2.2 Enzima Lactase

Esta enzima pertence ao grupo das hidrolases, ela pode ser encontrada na natureza, em diversos vegetais como amêndoas, maçã, damasco, pêssego, podendo ser encontrada também em órgãos de animais, como o intestino, cérebro, testículos, placenta além de ser produzida por inúmeros microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo assim estes últimos como fontes mais utilizadas para aplicações comerciais (SANTIAGO et al, 2004).

Elas são sintetizadas a partir de células vivas e aceleram diversas reações químicas, como a lactase, que catalisa a reação de hidrólise da lactose, que é a separação do dissacarídeo lactose em β -D-galactose e α -D-glicose, o que faz com que a lactose possa ser digerida no intestino delgado (WAKANNE, 2006).

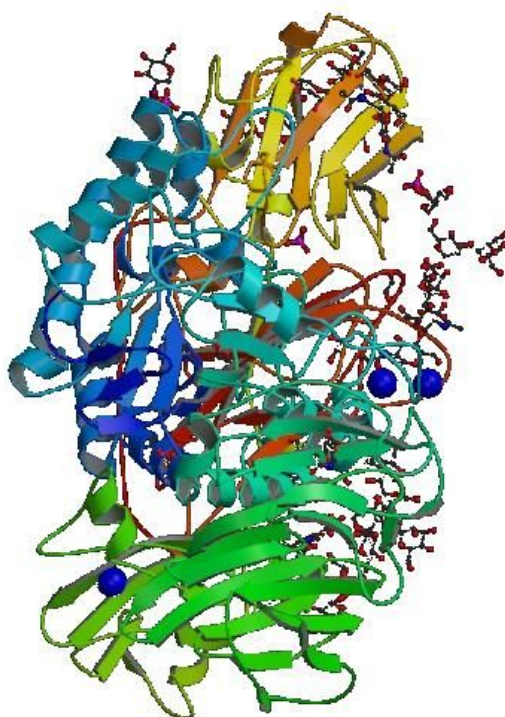


Figura 2. - Estrutura da Enzima β -galactosidase do *Penicillium sp.*

A lactase produzidas por fungos e leveduras têm grande importância na indústria alimentícia de laticínios, sendo utilizadas na transformação de soro de queijo em xarope

doce, na fabricação de iogurtes, coalhadas e manteiga de leite com o papel de melhorar seu sabor sem aumentar o conteúdo calórico e na redução da cristalização da lactose em produtos lácteos. Seu aproveitamento industrial através do tratamento enzimático promove maior firmeza e maior elasticidade no requeijão e reduz o tempo de maturação dos queijos (WANKANNE, 2009).

4.2.2.1 Atuação da lactase no corpo humano

A lactase no corpo humano exerce a função de degradação da lactose, um açúcar dissacarídeo presente no leite e na maioria dos seus derivados. Quando a lactose é ingerida ela deve chegar até o intestino delgado, aonde a enzima iria catalisar sua reação de hidrólise, fragmentando a mesma em β -D-galactose e α -D-glicose possibilitando sua ingestão (WANKANNE, 2006). (Figura 3).

Figura 3 - Hidrólise da lactose pela β -galactosidase

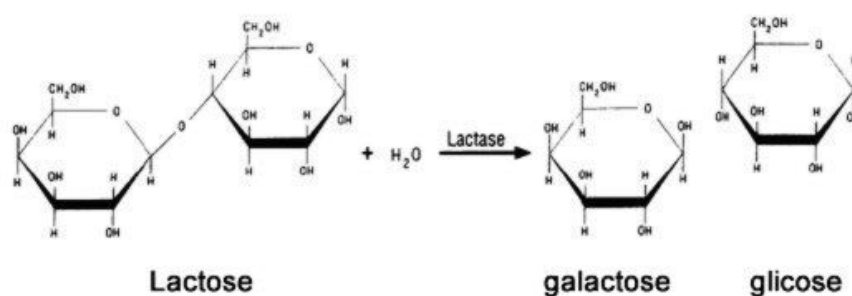


Figura 3. - Hidrólise da Lactase. Fonte: BARRETT KE, Ch. 15 - "CARBOHYDRATE, PROTEIN AND WATER SOLUBLE VITAMIN ASSMILATION".New York, 2006.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Uma das definições de imobilização de enzimas é compreendida como uma enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetida e continuamente (CHIBATA, 1978). O principal objetivo em imobilizar uma enzima é obtê-la com sua atividade e estabilidade não afetadas em comparação a enzima em sua forma livre. Apesar desse processo possuir um custo elevado, ele é totalmente viável pela possibilidade de uso contínuo do biocatalisador (HARJU et al., 2012), além de estar sendo cada vez mais utilizada a fim de melhorar a aplicação industrial das mesmas, com mais apreço na produção e redução dos recursos (KLEIN, 2010). Como não há um método universal para a imobilização enzimática, diversos meios estão disponibilizados para diferentes enzimas (Figura 4).

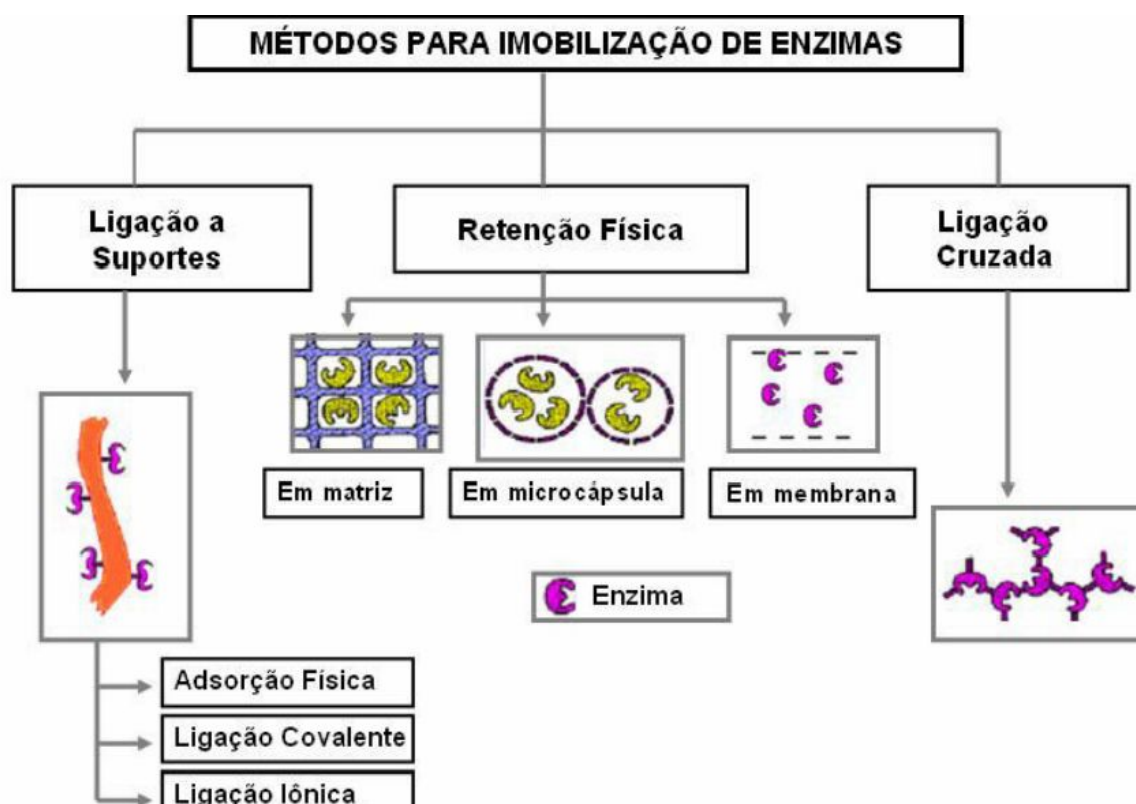


Figura 4 - Métodos para imobilização de enzimas (adaptado DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004)

4.3.1 Imobilização da β -galactosidase

Considerando a viabilidade da imobilização das enzimas quanto à sua atividade catalítica, a pesquisa visando as condições apropriadas para o desempenho da enzima é fundamental. Por este meio, as condições necessárias para uma considerável atividade enzimática são:

I. Faixa de pH: Algumas pesquisas publicam resultados de pH variando, onde a faixa de pH em que a enzima se mostra mais eficaz são nas faixas de pH 2, 5 e 7 (FALLEIROS, 2012). Geralmente, lactases fúngicas possuem ótimo pH em uma faixa ácida, entre 2,5 e 2,5, já lactases provindas de bactérias e leveduras estão numa faixa mais neutra (6,0 - 7,0). Tais características são de grave importância para a escolha do suporte sólido adequado para a enzima escolhida (KLEIN, 2010).

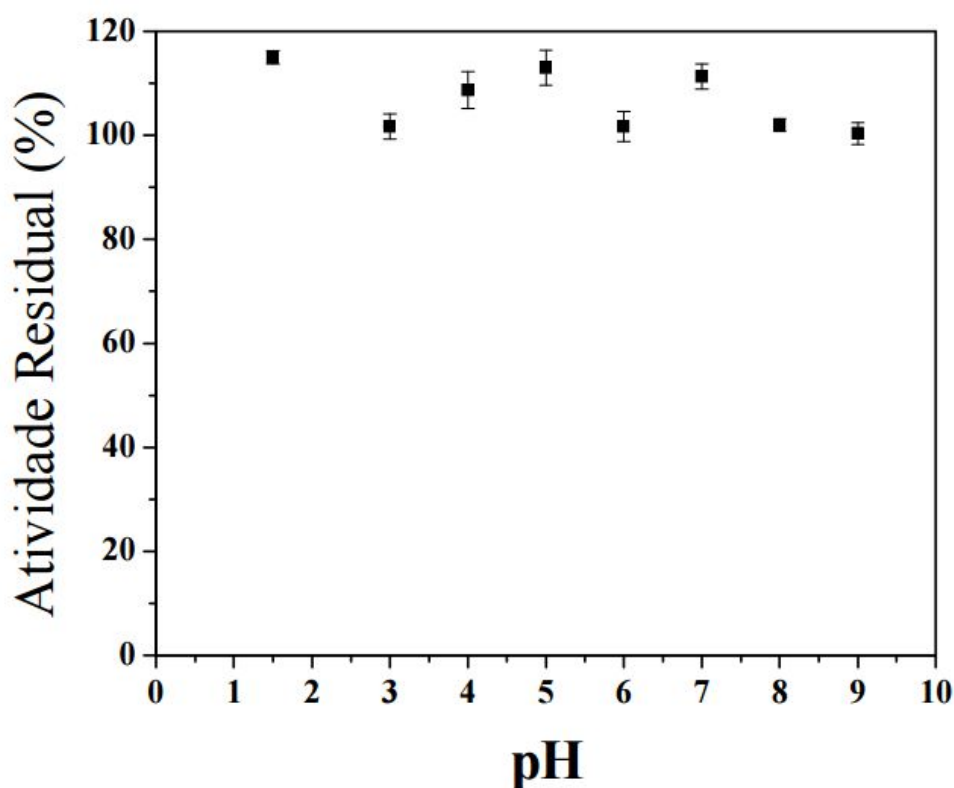


Figura 5. Gráfico da porcentagem de atividade residual da enzima lactase em função do pH (FALLEIROS, 2012).

II. Temperatura: As temperaturas ideais para o funcionamento da lactase quando esta está imobilizada em Duolite A568 são 60 °C e 57,5 °C (FALLEIROS, 2012),

porém levando em conta a temperatura corporal ideal para a atividade enzimática, a variação encontra-se entre 36 °C e 37 °C.

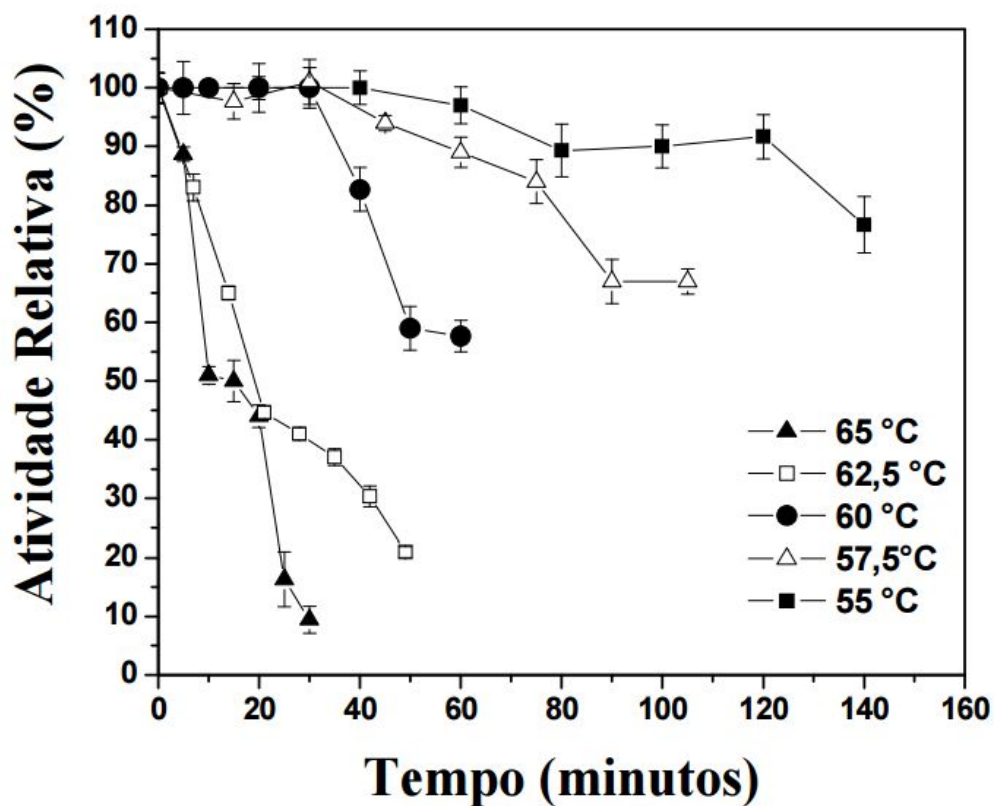


Figura 6. Gráfico da porcentagem da atividade relativa da enzima lactase em diferentes temperaturas em função do tempo.
(FALLEIROS, 2012)

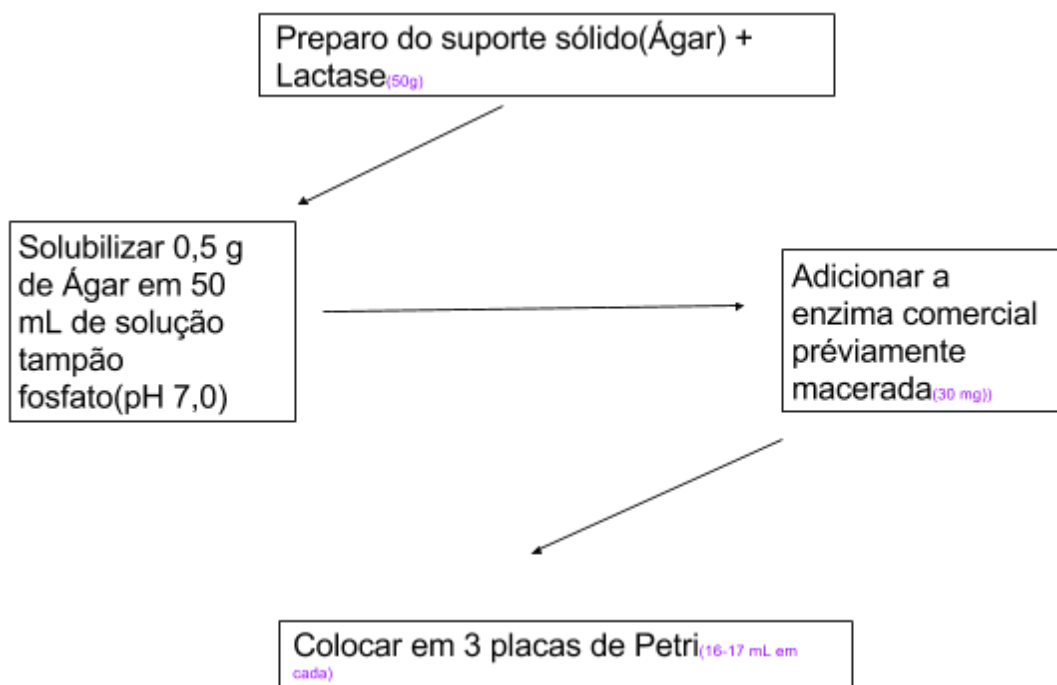
5 METODOLOGIA DA PESQUISA

5.1 PREPARAÇÃO DOS SUPORTES SÓLIDOS

Para a incorporação da enzima e a realização dos testes foi utilizada a enzima β -galactosidase comercial LACTAID® em comprimidos e como suporte sólidos foi utilizada uma matriz polimérica de ágar bacteriológico.

Inicialmente foi preparada uma solução de ágar 1,0 % (m/v) em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0, misturando 0,5 g de ágar à 50 mL de solução tampão. A solução foi aquecida para a completa dissolução do ágar e na sequência, após resfriamento da solução a uma temperatura aproximadamente de 37 °C, ao volume de 50,0 mL foi adicionado o(s) comprimido(s) da enzima comercial macerado(s). Após a homogeneização completa da enzima na solução tampão/ágar, esta foi distribuída em três placas de Petri com volumes similares até a total solidificação do ágar.

Os mesmos procedimentos foram realizados para todos os testes, diferenciados apenas pelo número de comprimidos para cada solução do suporte (um [30 mg] ou dois [60 mg] comprimidos).



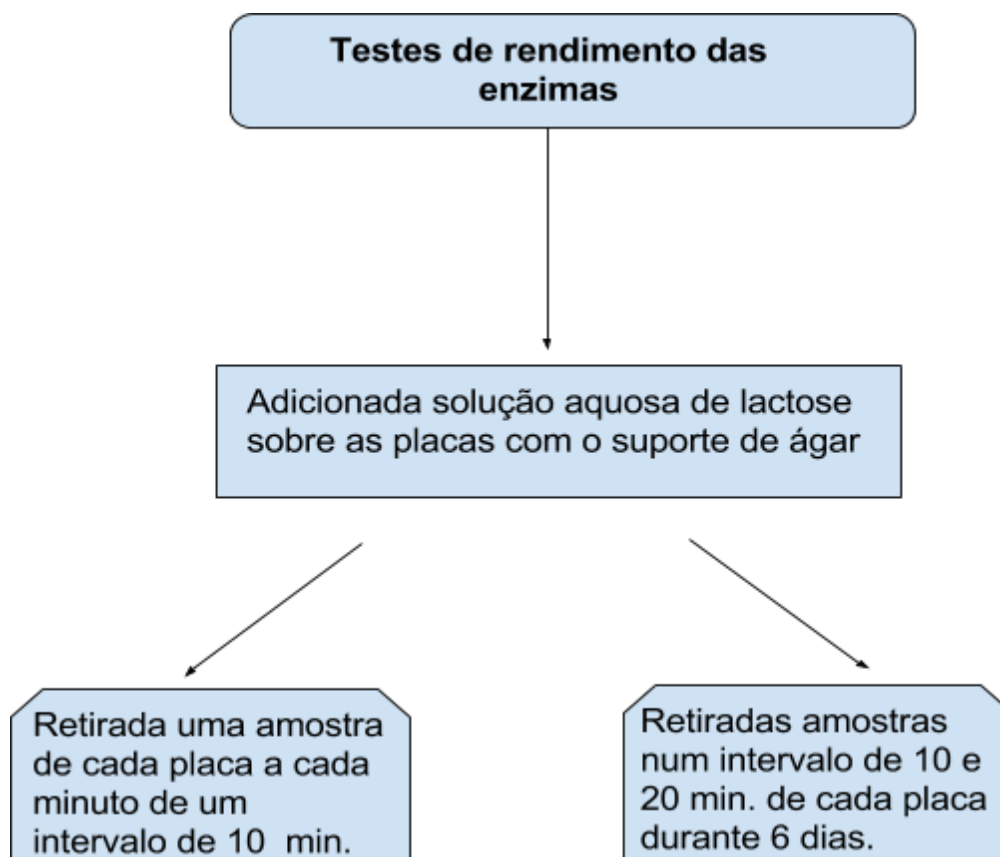
5.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o começo dos testes da atividade enzimática, um volume de 5,0 mL de uma solução de lactose 6,0 mmol/L foi adicionado sobre o meio solidificado nas placas sob temperatura ambiente, e amostras desta solução foram coletadas de cada placa em diferentes intervalos de tempo após a adição da solução de lactose, para análise da atividade e estabilidade da enzima incorporada na matriz.

Ao fim de cada teste e dos experimentos as placas foram lavadas superficialmente com água destilada e armazenadas a 6 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Também foram testados experimentos nas mesmas condições descritas, utilizando-se uma solução de ágar com um comprimido e outra com dois comprimidos. Os testes foram realizados durante uma semana com a retirada de amostras em intervalos de tempo de 10 e 20 minutos de cada placas - 6 placas no total.

Da mesma forma, foi testada a atividade enzimática. Um ou dois comprimidos foram imobilizados numa solução de ágar da mesma forma que os demais experimentos e amostras foram retiradas a cada minuto de um intervalo de 10 minutos.



5.3 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A avaliação da atividade enzimática foi efetuada por meio da dosagem da concentração do produto formado a partir da hidrólise da enzima. Para a dosagem do produto de reação foi utilizado um kit comercial de dosagem de glicose (GLICOSE Liquiform Labtest®). Este kit consiste em um sistema enzimático para a determinação de glicose baseado na oxidação desta pela glicose oxidase. Um dos produtos dessa reação, peróxido de hidrogênio, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da peroxidase formando um composto de coloração vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra.

O produto formado foi determinado por espectrofotometria em comprimento de onda 505 nm, utilizando uma solução de glicose 100 mg/dL como padrão.

Cada amostra avaliada seguiu o padrão de 1 mL de reagente do kit e 100 μ L da amostra analisada. Todos os resultados quanto ao comprimento de onda equivalente à cor da amostra foi anotado e ponderado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima β -galactosidase catalisa a reação de hidrólise da ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ do dissacarídeo lactose, originando D-glicose e β -D-galactose. A atividade e estabilidade da enzima incorporada em matriz sólida de ágar foram determinadas a partir da dosagem da concentração de produto ao longo do tempo (Figura 1).

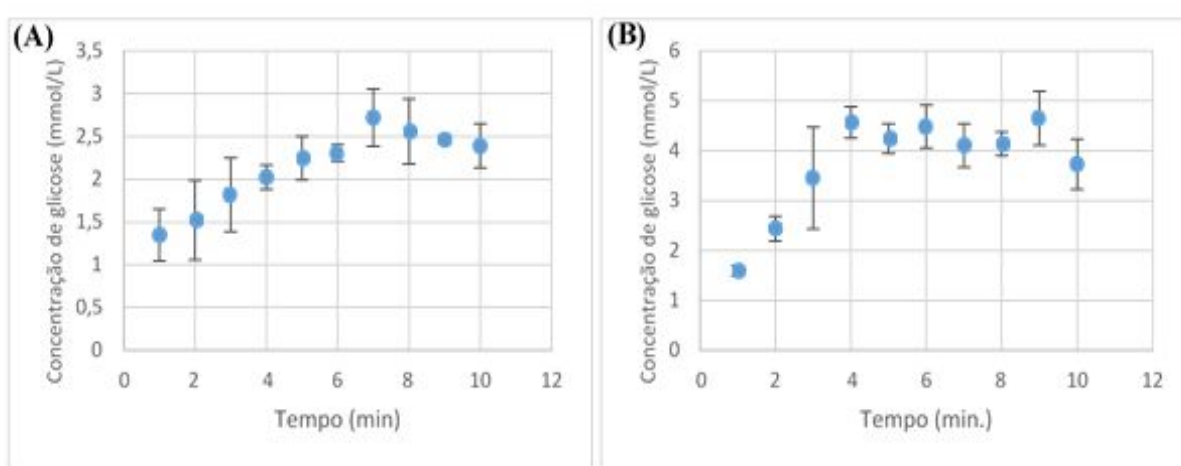


Fig. 1 Atividade da β -galactosidase incorporada em matriz polimérica de ágar em função do tempo. Amostras foram coletadas a cada minuto e um tempo total de 10 minutos. (A) um comprimido (30 mg) e (B) dois comprimidos (60 mg). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados revelaram que os experimentos conduzidos com um ou dois comprimidos atingiram a atividade máxima em tempos curtos (aproximadamente 3 minutos), mantendo-se estável ao longo do experimento, porém a margem de erro foi ampla quanto aos resultados do experimento com 2 comprimidos.

Na sequência, em um ensaio preliminar foi testada a estabilidade da β -galactosidase em longos tempos (Figura 2). Os resultados mostraram que a atividade máxima da enzima foi atingida dentro dos primeiros 10 minutos de experimentação, como visto previamente (Figura 1), mantendo-se estável por 24 horas após a incorporação.

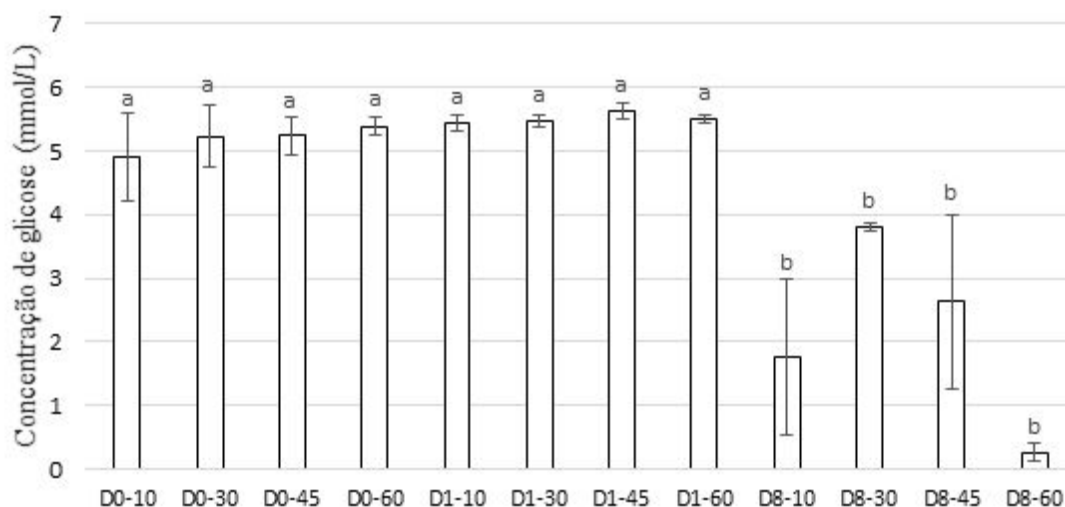


Fig. 2 Atividade da β -galactosidase incorporada em matriz polimérica de ágar em função do tempo. D0, D1 e D8, dia zero, dia 1 e dia 8; 10, 30, 45 e 60, tempos em minutos de coleta de amostra após adição do substrato (lactose). Barras com as mesmas letras (a, b) não apresentam diferença significativa. Foi utilizado o teste de análise de variância com nível de significância de 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quando a atividade enzimática foi avaliada após oito dias foi observada uma diminuição significativa na atividade da β -galactosidase, porém retendo ainda aproximadamente 50% da atividade original. Esses resultados sugerem que a enzima após imobilizada manteve sua atividade, hidrolisando consideravelmente o substrato em um curto período de tempo e mantendo esta mesma taxa de atividade por tempos superiores.

Foi testada então a estabilidade da β -galactosidase, em experimentos com um ou dois comprimidos ao longo de seis dias, tomando-se amostras após 10 e 20 minutos em cada dia de experimentação (Figura 3).

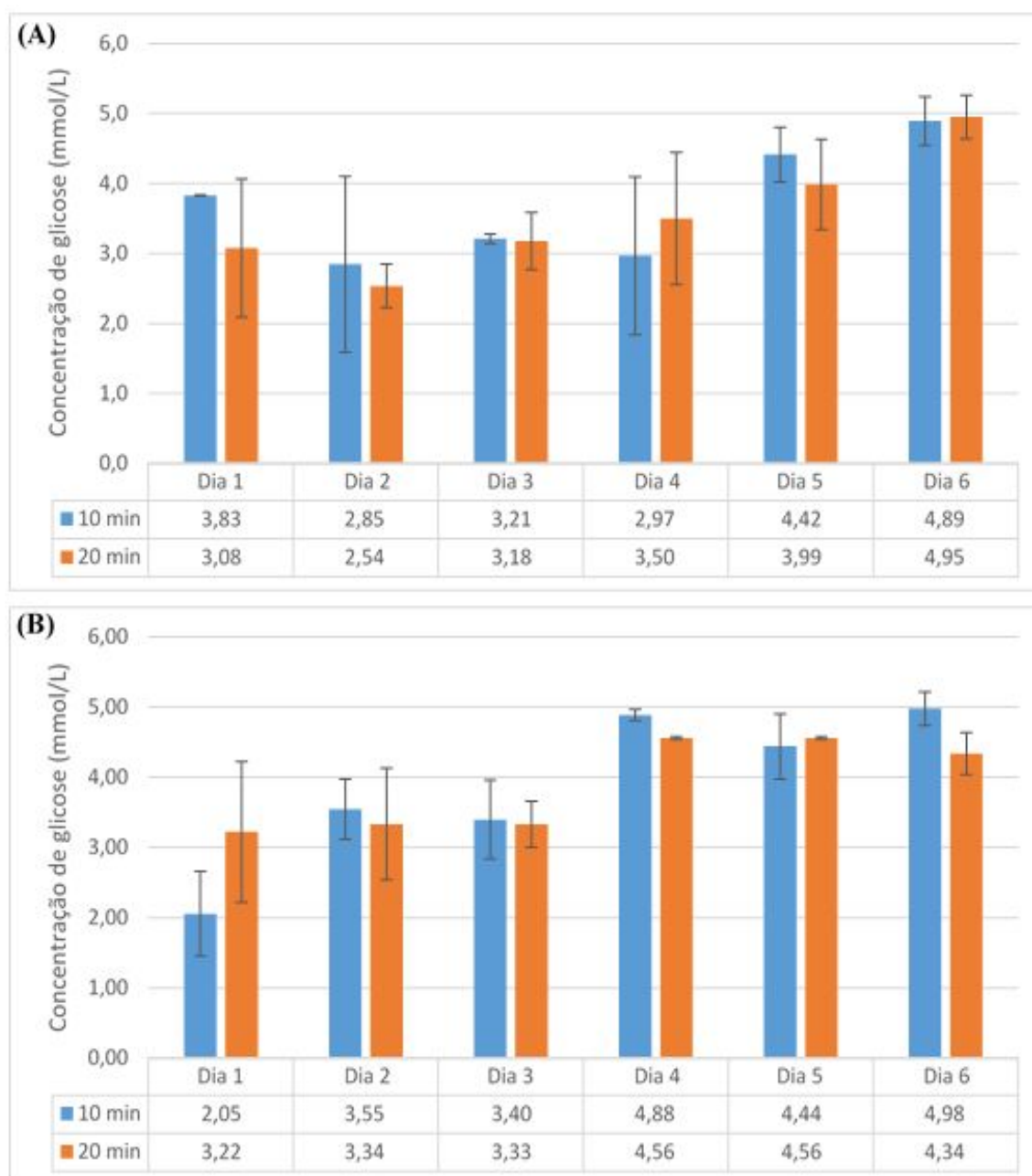


Fig. 3 Atividade da β -galactosidase incorporada em matriz polimérica de ágar em função do tempo. Amostras para dosagem de glicose foram tomadas em 10 e 20 minutos após a adição de substrato (lactose 3,0 mmol/L) ao longo de seis dias. (A) experimentos com um comprimido e (B) experimentos com dois comprimidos. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

Os resultados confirmaram que a estabilidade da β -galactosidase se mantém constante ao longo do tempo de experimentação. É um resultado espetacular porém suspeito pois a atividade enzimática intensificava-se ao invés de decair seu resultado.

A β -galactosidase comercial é uma enzima que apresenta alta atividade, uma vez que é utilizada para dietas livres de lactose, portanto é necessário que hidrólise a lactose em curtos intervalos de tempo. Neste trabalho, a incorporação da enzima comercial em matriz

polimérica de ágar bacteriológico mostrou que a β -galactosidase reteve sua atividade próxima da máxima por até cerca de sete dias, além de atingir a atividade máxima em poucos minutos, exibindo as características desejáveis para essa enzima.

7 CONCLUSÃO

Visto o crescente número de intolerantes à lactose, o papel de um método financeiro e ativamente viável leva a pesquisa ao favor da melhor qualidade de vida mais longe. Este trabalho incorporou a enzima comercial β -galactosidase em matriz polimérica de ágar e avaliou sua atividade enzimática e estabilidade. Seus resultados revelaram uma grande taxa de hidrólise em um curto período de tempo, exibindo atividade máxima em aproximadamente três minutos, retendo consideravelmente a atividade por períodos de aproximadamente sete dias, quando armazenadas a 6 °C.

REFERÊNCIAS

- ABLV. **O papel da lactose no organismo.** Saúde e Bem-estar. Disponível em: <http://www.ablv.org.br/listcontentint.aspx?id=631> (Acessado: 23 de maio de 2016).
- ALBUQUERQUE, L. C. **O leite em suas mãos.** Juiz de Fora: Concorde. 1997. 3 v. 150p. Sociedade Brasileira de Farmacognosia. **Química do Leite.** Apostila experimental UFBA. Bahia, 2009. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/quimica_do_leite.html (Acessado em: 01 de julho de 2016).
- BROTOFF, J.; GAMLIN, L. **Food allergies and food intolerance.** Bloomsbury: Vermont, 2000. 414p.
- CHIBATA I. **Immobilized Enzymes-Research and Development.** Tokyo. Kandansha Ltd. 1978.
- SANTIAGO, P. A. et al. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyvoromyces marxinus*.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004. DOMÍNIO PÚBLICO. Disponível em: <http://www.emforma.net/imagens/imagem-da-lactose.jpg> (Acessado em 01 de julho de 2016).
- EDITORA. **ENZIMAS CATALIZADORAS DE REAÇÕES BIOLÓGICAS.** Revista INSUMOS - Funcionais e Neutraceuticos, ed. 86. pg. 20-29. São Paulo, 2016.
- FALCÃO, Mauro Cícero. **TEMAS DE PEDIATRIA: Nutrição e desenvolvimento cerebral da criança.** Nº86. Nestle Nutrition Institute. São Paulo. 2001.
- FALLEIROS, Larissa Nayhara S. Santana. **Imobilização e Estabilização de β -Galactosidase por Ligações Multipontuais em Duolite A568.** Dissertação (Conclusão de Mestrado em Engenharia Química do Universidade Federal de Uberlândia-MG.) 2012.
- GALLO, PROF. Dr. Luiz Antonio. **LCB 208 - BIOQUÍMICA CARBOIDRATOS.** Depto. Ciências Biolóficas Esalq USP. São Paulo. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html> (Acessado em 29 de junho de 2016).
- HARJU, M.; et al. **International Dairy Journal,** Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects (Review). V. 22, p. 104-109, 2012.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.
- KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91 p., 2010.
- LABTEST Diagnóstica S.A. **GLICOSE Liquiform.** Lagoa Santa, Minas Gerais, 2008.
- LIMA, Thiago Gomes. **INTOLERÂNCIA À LACTOSE: ASPECTOS CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS.** 2012. 47 folhas. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, 2012.
- MOURA, Dr. Daniel Sherrer de; CARRER, Dra. Helaine; GALLO, Dr. Luiz Antonio; BASSO, Dr. Luiz Carlos; MELO, Dr. Murilo. **ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS - BIOQUÍMICA.** Piracicaba, São Paulo, 2012. Pag. 10-19. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/2088326/apostila-pratica-de-quimica/4> (Acessado: 23 de maio de 2016).
- PEREIRA, A. S. **Malabsorção de lactose do adulto em uma população brasileira.** 1981. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, Campinas, 1981.
- SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY.** Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. V.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.
- SOUTO, Debora. **Metabolismo dos Carboidratos.** Blogspot. 2008. Disponível em: <http://debby2008metabolismo.blogspot.com.br/2008/05/carboidratos.html>. (Acessado em: 01 de julho de 2016).
- SOUZA, Viviane de. **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, CELULARES E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE COMUNITÁRIO.** São Paulo. Dissertação (Conclusão de Mestrado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"). 2006.
- STUPPIELLO, Bruna. **Leite: benefícios, nutrientes e importância de consumir.** Disponível em: <http://www.minhavidacom.br/alimentacao/tudo-sobre/18018-leite-beneficios-nutrientes-e-importancia-de-consumir> (Acessado: 23 de maio de 2016).
- TIBBETS, Theresa. **Metabolismo dos Carboidratos.** Maio de 2008. Modelo Ethereal. Disponível em: <http://debby2008metabolismo.blogspot.com.br/2008/05/carboidratos.html> (Acessado em: 29 de junho de 2016).

UFBA. Disponível em : http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/quimica_do_leite.html (Acessado: 23 de maio de 2016).

VALSECHI, Octávio Antônio. **O LEITE E SEUS DERIVADOS**. Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal. Araras, São Paulo, 2001. Gastro Med. VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2º ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.

VENTURINI, Katiani Silva et al. **Características do Leite**. Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Editado: 26.08.2007.

Sociedade Brasileira de Farmacognosia. **Química do Leite**. Apostila de Aula Prática de Farmacognosia

WANKENNE, Michell A. **INSUMOS - ADITIVOS E INGREDIENTES**. INTOLERÂNCIA À LACTOSE e produtos lácteos com baixo teor de lactose. São Paulo, 2009.

WANKENNE, Michell A. **INSUMOS - Funcionais e Nutracêuticos**. ENZIMAS CATALIZADORAS DE REAÇÕES BIOLÓGICAS. Pg. 20-29, São Paulo, 2006.