

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATALIA PASSONI MÜLLER

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA, TEMPERATURA E TEMPO
NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE**

PALOTINA

2018

NATALIA PASSONI MÜLLER

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA, TEMPERATURA E TEMPO
NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Tecnologia em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do grau
de Tecnóloga em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Ströher

PALOTINA

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATALIA PASSONI MÜLLER

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA, TEMPERATURA E
TEMPO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE


Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para aprovação na disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso Superior de Tecnologia Em Biotecnologia para a seguinte banca examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Raquel Ströher
Orientadora – Departamento de Engenharias e Exatas da
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina



Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes
Departamento de Engenharias e Exatas da Universidade
Federal do Paraná – Setor Palotina.



Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele
Departamento de Engenharias e Exatas da Universidade
Federal do Paraná – Setor Palotina

Palotina, 29 de Junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus pelo dom da vida, a oportunidade de ter chegado até aqui, por ter me dado forças nos momentos em que mais precisei.

À meus pais pelo apoio nos momentos difíceis, a minha avó Maria pelas orações, meus irmãos, à minha família de modo geral que me apoiaram ao longo desses anos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Raquel Ströher pela dedicação, confiança e paciência.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e a Poline que me ajudou nas estatísticas.

Enfim, à todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O leite é um alimento consumido no mundo todo, e apresenta grande importância na alimentação devido às proteínas que possui. A lactose como principal carboidrato do leite, é um dissacarídeo constituído de galactose e glicose, os quais são absorvidos facilmente pelo organismo. Porém, é comum alguns indivíduos apresentarem após a fase de amamentação, a diminuição da atividade da enzima lactase presente no intestino, assim provocando uma intolerância a lactose. O mercado está buscando e desenvolvendo novos produtos com baixo teor de lactose, permitindo que pessoas com intolerância possam fazer uso de produtos lácteos e seus derivados. Para romper as moléculas de lactose pode-se utilizar a hidrólise enzimática ou a hidrólise química, no entanto, esta última não é muito indicada para fins alimentícios, pois exige condições extremas de pH e temperatura, sendo a hidrólise enzimática a mais indicada. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo avaliar a hidrólise enzimática da lactose, levando-se em consideração os parâmetros concentração da enzima lactase, temperatura e tempo de reação. Foram avaliadas três concentrações de enzima 0,2, 0,4 e 0,8 g.L⁻¹, as temperaturas 25, 30 e 40 °C e os tempos de reação 1, 2 e 3 horas. A condição que apresentou o melhor resultado foi a que utilizou 0,8 g.L⁻¹ de enzima de lactase a 30 °C, após 3 horas de reação alcançando 64,13% de rendimento de hidrólise. A concentração da enzima lactase e o tempo de reação influenciaram positivamente no rendimento da reação de hidrólise, possibilitando a formação de um ingrediente com potencial elevado para atender a demanda das pessoas que possuem intolerância a lactose.

Palavras-chave: Hidrólise da lactose, lactase, intolerância a lactose.

ABSTRACT

Milk is a food consumed worldwide, and has great importance in food because of the proteins it has. Lactose as the main carbohydrate in milk, is a disaccharide consisting of galactose and glucose, which are absorbed easily by the body. However, it is common for some individuals to exhibit after lactation a decrease in the activity of the enzyme lactase present in the intestine, thus causing lactose intolerance. The market is seeking and developing new products with low lactose content, allowing people with intolerance to make use of dairy products and their derivatives. In order to break down the lactose molecules enzymatic hydrolysis or chemical hydrolysis can be used, however, the latter is not very suitable for food purposes, since it requires extreme conditions of pH and temperature, with enzymatic hydrolysis being the most indicated. Thus, the objective of this work was to evaluate the enzymatic hydrolysis of lactose, taking into account the parameters concentration of the enzyme lactase, temperature and reaction time. Three enzyme concentrations 0.2, 0.4 and 0.8 g.L⁻¹, temperatures 25, 30 and 40 ° C and reaction times 1, 2 and 3 hours were evaluated. The condition that presented the best result was the one that used 0.8 g.L⁻¹ of lactase enzyme at 30 °C, after 3 hours of reaction reaching 64.13% of hydrolysis yield. The concentration of the enzyme lactase and the time of reaction positively influenced the yield of the hydrolysis reaction, allowing the formation of an ingredient with high potential to meet the demand of people who have lactose intolerance.

Key-words: Hydrolysis of lactose, lactase, lactose intolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE LACTOSE.....	13
FIGURA 2- HIDRÓLISE DA LACTOSE CATALISADA POR β - GALACTOSIDASE.....	16
FIGURA 3- RENDIMENTOS ALCANÇADOS NOS ENSAIOS A CADA HORA.....	23
FIGURA 4- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 1 HORA DE REAÇÃO.....	25
FIGURA 5- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 2 HORAS DE REAÇÃO.....	26
FIGURA 6- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 3 HORAS DE REAÇÃO.....	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PRINCIPAIS COMPONENTES DO LEITE BOVINO.....	12
TABELA 2- CONDIÇÕES DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS DURANTE OS EXPERIMENTOS.....	20
TABELA 3 – CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE – SOLUÇÃO 1 g.L ⁻¹	22
TABELA 4 – RENDIMENTO DE HIDRÓLISE, APÓS 3 HORAS DE REAÇÃO.....	24
TABELA 5 - ANOVA	24
TABELA 6 –TESTE F ANOVA.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 LEITE	12
3.2 LACTOSE.....	13
3.2.1 Intolerância à Lactose	14
3.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE	15
3.3.1 Hidrólise Ácida	16
3.3.2 Hidrólise Enzimática	16
3.3.2.1 Enzima Lactase	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 MATERIAL	19
4.1.1 Substrato.....	19
4.1.2 Enzima Lactase.....	19
4.2 MÉTODOS	19
4.2.1 Tratamentos	19
4.2.2 Análise de Glicídios Redutores em Glicose.....	20
4.2.2.1 Preparação do Reagente DNS:.....	20
4.2.2.2 Preparação da Curva Padrão de Glicose:.....	21
4.2.2.3 Determinação da Glicose na Amostra	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
5.1 ANÁLISE DE GLÍCIDIOS REDUTORES.....	23
5.1.1 Análise Estatística	24
5.2 DISCUSSÃO	26

6 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
APÊNDICES.....	32

1 INTRODUÇÃO

O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, sendo que o Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares. Respondemos por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul (IBGE, 2016).

Pelo segundo ano consecutivo, o Paraná se destaca como o segundo maior produtor de leite do País. Essa produção no estado vem num ritmo ascendente nos últimos 10 anos. No Paraná, a produção de leite em 2016 alcançou 4,7 bilhões de litros, volume 1,5% maior que no ano anterior, quando o volume alcançado foi de 4,6 bilhões de litros (IBGE, 2016).

O leite é um alimento de reconhecido valor nutricional por apresentar em sua composição elevada concentração de cálcio e proteínas de valor biológico, além de peptídeos bioativos com ação protetora na saúde humana, tais como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, anti-hipertensiva e antitrombótica (SOUZA, 2014). A composição do leite de vaca pode variar dependendo da alimentação do animal, das condições a que é submetido, presença de mastite (inflamação das glândulas mamárias), raça, entre outros fatores (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

O principal carboidrato presente no leite é a lactose, compreendendo de 40 a 50 gramas por litro, ou de 8 a 10 gramas por copo (200 mL). Fisiologicamente, esse açúcar contribui para o aumento da absorção intestinal de cálcio, magnésio e fósforo presentes no leite, assim como na utilização de vitamina D pelo organismo. Esses micronutrientes são importantes no que diz respeito ao metabolismo ósseo (AMANCIO et al., 2015).

Apesar da importância desse açúcar no metabolismo, estima-se que cerca de 65% da população mundial apresenta algum grau de intolerância à lactose (PEREIRA et al., 2012). A intolerância à lactose é o nome que se dá à incapacidade parcial ou completa de digerir o açúcar existente no leite e seus derivados. Ela ocorre quando o organismo não produz, ou produz em quantidade insuficiente, uma enzima digestiva chamada lactase, que quebra e decompõe a lactose, ou seja, o açúcar do leite. Como consequência, essa

substância chega ao intestino grosso inalterada. Ali, ela se acumula e é fermentada por bactérias que fabricam ácido lático e gases, promovem maior retenção de água e o aparecimento de diarreias e cólicas (BRUNA, 2014).

Diante dessa problemática, surgem os processos de hidrólise, realizados por ácidos ou enzimas, que são capazes de realizar a quebra da molécula de lactose, sendo que; a hidrólise ácida pode provocar a desnaturação de proteínas e uma coloração marrom na solução, ao passo que o processo enzimático é menos severo, realizado em condições mais amenas de temperatura e pH, e considerado mais indicado para as indústrias alimentícias (SENER; APAR; ÖZBEK, 2006).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência das variáveis concentração de enzima, temperatura e tempo da reação no processo de hidrólise enzimática de uma solução de lactose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a hidrólise enzimática da lactose avaliando os parâmetros: concentração de enzima lactase, temperatura e tempo de reação;
- Determinar o teor final de glicídios redutores dos hidrolisados obtidos a cada tratamento e calcular o rendimento de hidrólise;
- Determinar as condições ótimas da hidrólise enzimática por meio da análise estatística dos resultados de rendimento da reação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

O leite pode ser denominado como “o produto fresco e integral, segregado pelas glândulas mamárias de fêmeas sadias mediante ordenha ininterrupta realizada em condições higiênico-sanitárias que não prejudiquem sua qualidade”, de acordo com o Decreto nº 30.691 de 1952 (BRASIL, 1952).

Ele é uma emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas em solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas, e outras proteínas (TABELA 1). As partículas de gorduras e de proteínas do leite são responsáveis pela cor, consistência e opalescência. A cor é também resultado da dispersão da luz pelas proteínas, gordura, fosfatos e citrato de cálcio. A homogeneização do leite aumenta a coloração branca, pois as partículas fragmentadas refletem mais luz (JUNIOR, 2002).

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPONENTES DO LEITE BOVINO

Componente	Percentual no leite
Água	86,0 a 88,0
Sólidos Totais	12,0 a 14,0
Gordura	3,5 a 4,5
Proteína	3,2 a 3,5
Lactose	4,6 a 5,2
Minerais	0,7 a 0,8

FONTE: SOARES (2013).

Conforme dispõe a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002, o leite pode ser dividido em leite pasteurizado tipo A, leite pasteurizado tipo B, leite pasteurizado tipo C, leite pasteurizado e leite cru refrigerado e apresentam a mesma composição nutricional, mas se diferem quanto ao tipo de rebanho, número de bactérias após o processo de pasteurização, processo de obtenção e tipo de ordenha utilizada (BRASIL, 2006).

O leite é considerado um alimento praticamente completo e essencial na dieta de crianças, adolescentes e adultos, e conseqüentemente tem uma natureza complexa. Seus mais importantes componentes são os orgânicos solubilizados (sais e lactose), incluindo vitaminas hidrossolúveis e substâncias

nitrogenadas não protéicas; proteína no estado coloidal (micelas de caseína) e proteínas do soro (lactoalbumina e lactoglobulina) em estado molecular disperso; glóbulos de gordura em estado emulsificado, associados com colesterol, fosfolípidos, e vitaminas A, D, E e K e pigmentos carotenóides; ácidos láctico e enzimas (JUNIOR, 2002).

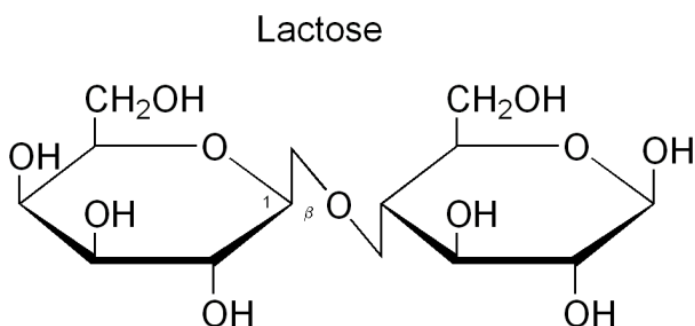
3.2 LACTOSE

A lactose (C₁₂H₂₂O₁₁) é encontrada apenas em mamíferos e é constituída de lactose (4,90%), água (87,30%), gordura (3,80%) e minerais (0,72%) (SILVA; LOPES, 2015).

A lactose, assim como a glicose, frutose e galactose são açúcares redutores por possuírem grupos capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalina sendo uma propriedade muito útil na análise dos açúcares (CAMPOS et al., 2014).

É um dissacarídeo constituído por um radical β-D-galactose e um radical α-D-glicose unidos por ligação glicídica β-1,4. Por apresentar ambas as moléculas em forma de anel piranosídico, a lactose deve ser denominada propriamente de 4-0- β-galactopiranosil-D-glucopiranosose. É considerado um açúcar redutor, por que o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agente oxidante (FISCHER, 2010). A estrutura da molécula de lactose é apresentada na FIGURA 1:

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE LACTOSE



FONTE: REZENDE, 2010.

No processamento do leite, a lactose é a base para a obtenção de produtos fermentados, como, por exemplo, o iogurte. Dos carboidratos, a lactose é o mais encontrado no leite, representando aproximadamente a metade dos sólidos não gordurosos e contribuindo para o valor energético do leite, pois cerca de 30% das calorias fornecidas pelo leite são devido à lactose (JUNIOR, 2002).

Para os bebês e crianças, a lactose é a fonte de energia mais importante, já para os adultos ela não apresenta a mesma importância nutricional. A lactose apresenta diferentes concentrações nos mamíferos, representando, em média, 7,2% no leite humano e no leite de vaca 4,7% (REZENDE, 2010).

A lactose é hidrolisada em glicose e galactose, pela enzima β – D galactosidase conhecida como lactase, que se encontram presentes em expressiva quantidade no jejuno, facilitando a absorção pela mucosa intestinal. Após a quebra e absorção intestinal da glicose, a galactose é metabolizada no fígado para ser também ser metabolicamente convertida em glicose. Quando a lactose não é devidamente hidrolisada, o intestino delgado não consegue absorvê-la apropriadamente e a mesma chega ao cólon. Neste local, a lactose é convertida em ácidos graxos de cadeia curta, gás carbônico e gás hidrogênio pela flora intestinal, que produz acetato, butirato e propionato. Estes ácidos graxos são absorvidos pela mucosa, e recuperam a lactose que não foi absorvida corretamente (REZENDE, 2010).

3.2.1 Intolerância à Lactose

A intolerância à lactose pode ser descrita como uma infecção da mucosa intestinal que a incapacita a digerir a lactose devido à deficiência de uma enzima denominada lactase, que é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose (ROCHA, 2012).

O fato de a intolerância a lactose gerar uma série de desconfortos, é resultado da não absorção pelo intestino, produzindo uma série de gases, gerando um grande desconforto intestinal. Esses desconfortos são devidos à

distensão intestinal, sendo mais intensa conforme a quantidade de lactose ingerida, e a quantidade que o seu corpo tolera (SILVA; LOPES, 2015).

Hoje em dia, existem vários métodos para diagnosticar um paciente com intolerância a lactose baseado em exames laboratoriais como teste oral de tolerância a lactose, do hidrogênio expirado, a medida do pH fecal, pesquisa de substâncias redutoras nas fezes. Já alguns testes são realizados com o paciente ingerindo de 25 a 50 g de lactose e avaliam-se os sintomas de 2 a 3 horas. A técnica mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas é por curva glicêmica, em que se coleta a glicemia em jejum e depois é feita a curva se o paciente absorver a lactose, a glicemia deve-se elevar 1,4 mmol/L ou mais (MATTAR; MAZO, 2010).

Em indústrias são criados produtos com lactose hidrolisada, para que pessoas que com intolerância a lactose, possam consumir leite e seus derivados.

3.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise da lactose é a quebra desta molécula em glicose e galactose. Após o rompimento da molécula, estes componentes monossacarídicos são liberados para absorção na corrente sanguínea; em seguida são transportados até o fígado, onde a galactose é convertida em glicose, principal combustível metabólico de muitas células (SANTOS et al., 2014).

É um processo promissor a nível industrial, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato, além de oferecer certas vantagens tecnológicas, como a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos (leite condensado, doce de leite, iogurte, sorvete, concentrados de leite ou soro) e o aumento do poder adoçante (FISCHER, 2010).

Nos mamíferos, a enzima β -galactosidase é responsável por este processo, mas ele também pode ocorrer por meio de métodos ácidos (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011).

3.3.1 Hidrólise Ácida

O método ácido, também chamado de método químico convencional, depende de condições muito severas de reação. Neste tipo de hidrólise a temperatura pode variar de 90 a 150 °C e o pH deve ser próximo a 1,5, o que é controlado pela adição de ácidos fortes em grandes concentrações (LONGO, 2006).

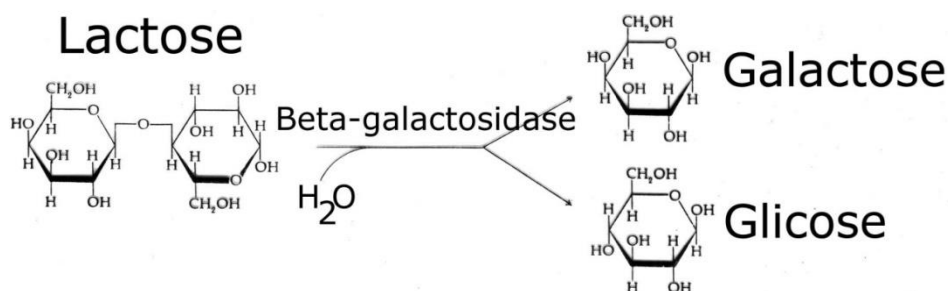
Por este motivo é muito pouco explorada para a redução do teor de lactose em leites e derivados devido às condições severas de operação do processo (PEREIRA et al., 2012).

3.3.2 Hidrólise Enzimática

Pode ser aplicado no leite ou soro sem um tratamento prévio. A hidrólise é catalisada pela β -galactosidase e se processa em condições amenas de pH e temperatura (30 a 40 °C), reduz não só a possibilidade de alteração dos compostos sensíveis ao calor, como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (FISCHER, 2010).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Nele, a enzima β -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a β -(1,4) da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose (FIGURA 2), de grande interesse para a indústria de laticínios (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985).

FIGURA 2 - HIDRÓLISE DA LACTOSE CATALISADA POR β -GALACTOSIDASE



FONTE: SANTOS, 2011.

De acordo com Andrade apud LOURSEMA (1978), a hidrólise enzimática afeta várias propriedades como:

- Solubilidade: a lactose pura apresenta 18% (m/m) de solubilidade em água, a 25 °C, sendo que a essa temperatura as solubilidades de D-glicose e D-galactose são respectivamente 50 e 32%;

- Poder adoçante: a lactose é um açúcar de baixo poder adoçante. Já a mistura de glicose e galactose é 3 vezes mais doce que a lactose;

- Viscosidade: o produto da hidrólise de lactose apresenta alta viscosidade permitindo alta concentração de sólidos sem problemas com a cristalização;

- Digestibilidade: a digestão da lactose é ruim para boa parte dos indivíduos, com a hidrólise da lactose esses produtos ficam mais digeríveis;

- Corpo, textura e paladar: são modificadas pela liberação da galactose, o sabor do produto fica mais acentuado.

3.3.2.1 Enzima Lactase

A enzima β -galactosidase é uma enzima proteica usualmente chamada de lactase, ou ainda pelo nome sistemático de β -D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -D-glicose.

A lactase age no leite, quebrando a ligação da lactose utilizando uma molécula de água e produzindo glicose e galactose, açúcares mais solúveis e de absorção mais rápida (LONGO, 2006).

Segundo Tremarin (2007), nem todas as fontes de lactase são consideradas seguras e, quando as aplicações envolvem a indústria alimentícia é recomendado trabalhar com enzimas reconhecidas pelo GRAS (*Generally Recognize as Safe*, uma designação da FDA – *Food and Drug Administration* – para substâncias ou aditivos adicionados aos alimentos). Atualmente, este “status” é válido apenas para *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*. Apesar de a bactéria *Echerichia coli* ser muito estudada, não é recomendado o uso da lactase proveniente

desta espécie em alimentos devido aos problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes.

Diante disso, os processos biotecnológicos, como a hidrólise enzimática, vêm se destacando principalmente na indústria alimentícia, como alternativa para produção de ingredientes alimentares para indivíduos com restrições alimentares, tendo em vista a especificidades desses biocatalisadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Substrato

Para a realização dos experimentos, foi utilizado uma solução de lactose com concentração 4,84% (m/v), preparada com reagente de grau analítico. Essa concentração foi escolhida com o intuito de comparar com dados encontrados por Wilke (2016), em que foi utilizado o leite semidesnatado para hidrólise enzimática.

4.1.2 Enzima Lactase

Foi utilizada a enzima lactase produzida pela empresa Prozyn[®] sob a forma de um líquido de cor amarelada. Esta enzima é obtida através da fermentação de uma cepa selecionada e específica de *Kluyveromyces lactis*. Esta enzima pode atuar em ampla faixa de temperatura, de 5 a 40 °C. Durante o período de experimentos a enzima foi mantida sob refrigeração.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Tratamentos

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se 100 mL de solução de lactose em frascos do tipo Erlenmeyer mantidos sob controle de temperatura em banho metabólico do tipo Dubnoff com agitação de 100 rpm.

Foram testadas as variáveis: temperatura (25, 30 e 40 °C), concentração de enzima (0,2; 0,4; e 0,8 g.L⁻¹) e tempo de reação (1, 2 e 3 horas), de acordo com os 9 tratamentos apresentados na TABELA 2:

TABELA 2 - CONDIÇÕES DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS DURANTE OS EXPERIMENTOS

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração da enzima (g.L ⁻¹)
1	25	0,2
2	25	0,4
3	25	0,8
4	30	0,2
5	30	0,4
6	30	0,8
7	40	0,2
8	40	0,4
9	40	0,8

4.2.2 Análise de Glicídios Redutores em Glicose

As análises de glicídios redutores foram realizadas no laboratório de Cinética e Biorreatores na Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina e foram realizadas pelo método colorimétrico mais empregado para a determinação de açúcares redutores que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Este método se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente em 600 nm (ZANIN, 2006).

4.2.2.1 Preparação do Reagente DNS:

Solução 1 – Foram dissolvidos 24,0 g da NaOH em aproximadamente 200 mL de água destilada e deixado resfriar à temperatura ambiente. A dissolução pode ser feita com auxílio de um agitador magnético, e o resfriamento pode ser acelerado colocando-se o béquer em um banho-maria contendo água à temperatura ambiente.

Solução 2 - Em aproximadamente 500 mL de água destilada foram dissolvidos por completo 8,0 g de DNS (ácido monohidrato ou sal monossódico).

Solução 3 – Foram pesados 5,0 g de fenol onde foram dissolvidos em aproximadamente 80 mL de água. Para ajudar na dissolução do fenol utilizou-se banho-maria (45 - 50°C).

Solução 4 – Adicionou-se 15 mL da solução 1 (NaOH) junto a solução de fenol, no agitador magnético.

Solução 5 – Foram adicionado lentamente até completa dissolução, o restante da solução 1 (NaOH) na solução 2 (DNS).

Solução 6 – Pesou-se 200,0 g de tartarato de sódio e potássio que foram misturado na solução 5 até dissolução completa ate que não observar-se liberação de bolhas de gás.

Solução 7 - Foram adicionados 5,0 g de sulfitoácido de sódio (NaHSO_3) na solução de fenol (solução 4) até dissolução completa.

Solução 8 – Adicionou-se a solução 7 na solução 6. Completou-se o volume para 1 L de solução.

A solução 8 foi filtrada em funil de vidro de fundo sinterizado de 100 mL. Foram adicionados ao filtrado 5,0 g de NaHSO_3 realizam a mistura até dissolver. A solução de DNS foi guardada em frasco inerte, escuro, em condições mínimas de luz até o uso.

4.2.2.2 Preparação da Curva Padrão de Glicose:

A solução padrão de glicose foi preparada contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose. Pesou-se 1,0 g de glicose, diluídos em água até o volume de 1 L, e deixado em repouso na geladeira por no mínimo 3 horas. A curva padrão de glicose disponível no APÊNDICE 1 foi preparada de acordo com a metodologia indicada na TABELA 3 para as soluções de 1 g.L^{-1} .

TABELA 3 - CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE

Tubo nº	Vol. Sol. Glicose(mL)	Vol. Água (mL)	Conc. de Glicose (mg/mL)	Abs. média
1	0	4,0	0	0,000
2	0,2	3,8	0,05	0,015
3	0,4	3,6	0,10	0,032
4	0,6	3,4	0,15	0,053
5	0,8	3,2	0,20	0,069
6	1,0	3,0	0,25	0,101
7	1,2	2,8	0,30	0,130
8	1,4	2,6	0,35	0,157
9	1,6	2,4	0,40	0,190
10	1,8	2,2	0,45	0,207
11	2,0	2,0	0,50	0,234
12	2,2	1,8	0,55	0,281
13	2,4	1,6	0,60	0,277
14	2,6	1,4	0,65	0,310
15	2,8	1,2	0,70	0,319
16	3,0	1,0	0,75	0,356
17	3,2	0,8	0,80	0,370
18	3,4	0,6	0,85	0,397
19	3,6	0,4	0,90	0,439
20	3,8	0,2	0,95	0,454
21	4,0	0,0	1,00	0,473

De cada tubo (1 a 21) foram pipetados 0,5 mL de amostra. Foram adicionados 2,5 mL de solução de DNS. Os tubos fechados foram levados a banho de água fervente por 10 min. Após passar esses 10 min as estantes com os tubos foram colocados em um banho com água de temperatura ambiente por aproximadamente 5 min e foram adicionados 3 mL de água destilada. A cor é estável durante 30 min. Cada amostra foram feitas em triplicata.

No agitador "vortex" foram agitados os tubos e iniciou-se a leitura da absorvância a 600 nm, zerando o aparelho com o branco da amostra (tubo nº 1).

4.2.2.3 Determinação da Glicose na Amostra

Foram medidos 0,5 mL da amostra que contém glicose e se adicionou 2,5 mL do reagente de DNS, o tubo foi agitado no vortex e se fez a leitura da absorvância a 600 nm, zerando o aparelho com o branco da amostra.

Com auxílio da curva padrão de glicose, determinou-se a quantidade de açúcares redutores, expressos como glicose presentes na amostra, não esquecendo de levar em consideração a diluição da amostra.

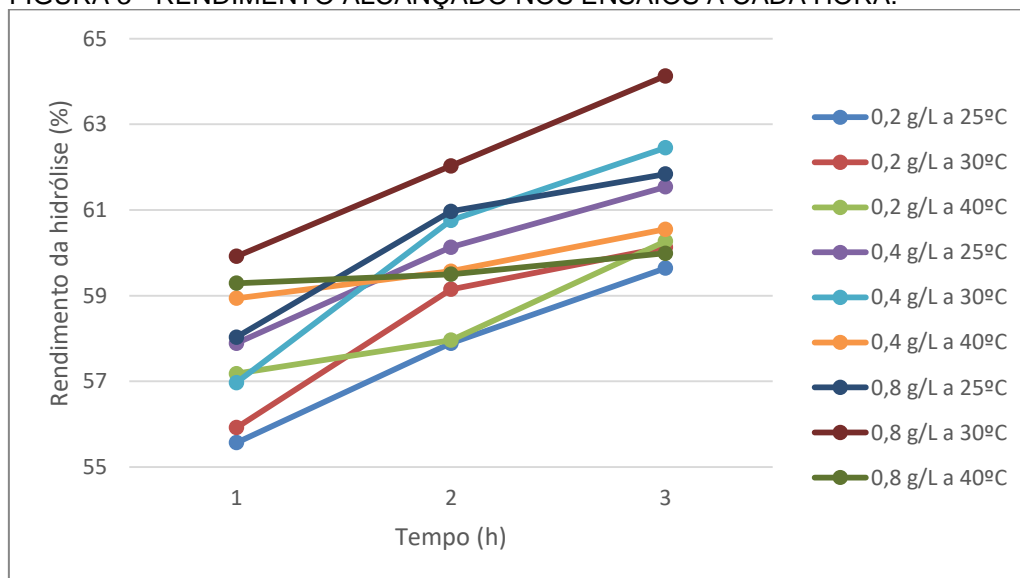
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE DE GLÍCIDIOS REDUTORES

Realizou-se a quantificação dos glicídios redutores em lactose por meio do método colorimétrico de DNS, com o objetivo de analisar as variáveis concentrações de enzima, temperatura e tempo da reação em relação ao rendimento obtido pela hidrólise de cada amostra.

Como a lactose pode ser considerada o único açúcar presente na solução, por meio da análise de glicídios redutores em glicose é possível chegar a uma porcentagem de rendimento da hidrólise para cada amostra, esses dados encontram-se no APÊNDICE 2. A FIGURA 3 mostra o rendimento de hidrólise de cada ensaio ao longo das 3 horas de reação:

FIGURA 3 - RENDIMENTO ALCANÇADO NOS ENSAIOS A CADA HORA.



Exceto pelos ensaios 1 e 9, todos os demais apresentaram maior porcentagem de rendimento de hidrólise no tempo final de reação (3 horas). Conforme mostra a TABELA 4 o ensaio que obteve maior rendimento de hidrólise correspondeu ao ensaio 6 (0,8 g.L⁻¹ a 30 °C) depois de 3 horas de reação.

TABELA 4 – RENDIMENTO DE HIDRÓLISE, APÓS 3 HORAS DE REAÇÃO

ENSAIO	RENDIMENTO (%)
1	59,64
2	61,64
3	61,84
4	60,13
5	62,45
6	64,13
7	60,27
8	60,55
9	59,99

Estudos realizados por Holsinger e Kligerman (1991) mostraram que com uma redução de 70% no teor de lactose do leite é possível reduzir significativamente os sintomas provocados pela intolerância à lactose.

Nota-se que para valores elevados de concentração da enzima e maiores tempos de reação são obtidos maiores valores de rendimento da hidrólise. Em relação à temperatura não é observado esse comportamento, pois o maior rendimento da hidrólise foi alcançado na temperatura de 30 °C.

5.1.1 Análise Estatística

Realizou-se uma análise estatística dos dados obtidos por meio do Programa Excel com o objetivo de averiguar as variáveis concentração de enzima, temperatura e tempo de reação em relação ao efeito rendimento da hidrólise.

A análise de variância por meio do teste F é apresentada nas TABELAS 5 e 6, em que F é maior que $F^{\text{crítico}}$, logo existe significância entre os dados. Desta forma, o modelo proposto é válido sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas. O P-valor menor que 0,05 confirma essa significância.

TABELA 5 - ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	8985,398563	9	998,3776	301,8907	2,32E-19	2,392814
Dentro dos grupos	66,14166667	20	3,307083			
Total	9051,54023	29				

TABELA 6 - TESTE F ANOVA

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
	3	6	2	1
0,2 g.L ⁻¹ a 25°C	3	173,1	57,7	4,1683
0,2 g.L ⁻¹ a 30°C	3	175,2	58,4	4,8529
0,2 g.L ⁻¹ a 40°C	3	175,41	58,47	2,5821
0,4 g.L ⁻¹ a 25°C	3	179,56	59,85333	3,388033
0,4 g.L ⁻¹ a 30°C	3	180,18	60,06	7,8751
0,4 g.L ⁻¹ a 40°C	3	179,06	59,68667	0,658233
0,8 g.L ⁻¹ a 25°C	3	180,84	60,28	3,9861
0,8 g.L ⁻¹ a 30°C	3	186,08	62,02667	4,431033
0,8 g.L ⁻¹ a 40°C	3	178,78	59,59333	0,129033

As FIGURAS 4, 5 e 6 apresentam as superfícies de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 1, 2, e 3 horas de reação, respectivamente.

Nota-se que para valores elevados de concentração da enzima e maiores tempos de reação são obtidos maiores valores de rendimento da hidrólise. A temperatura segue o mesmo comportamento até 40 °C, o que já era esperado, pois a faixa de temperatura adequada para esta enzima é entre 5 e 40 °C.

FIGURA 4 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 1 HORA DE REAÇÃO.

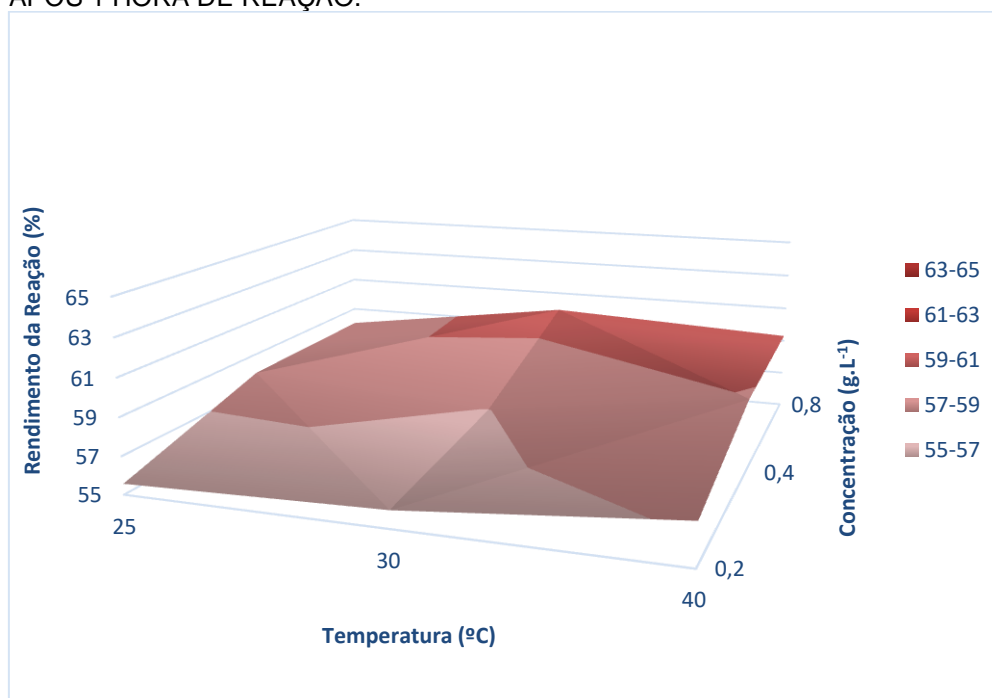


FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 2 HORAS DE REAÇÃO.

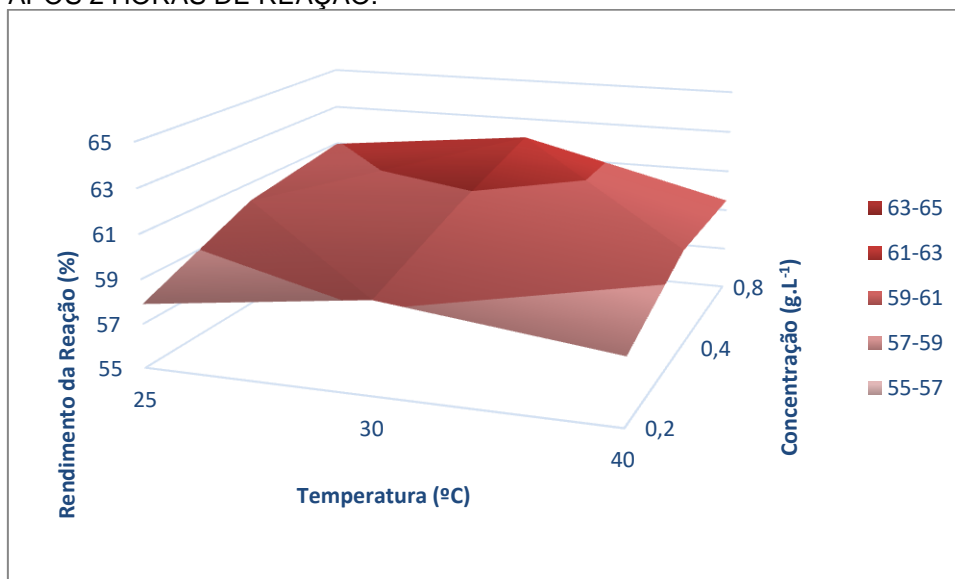
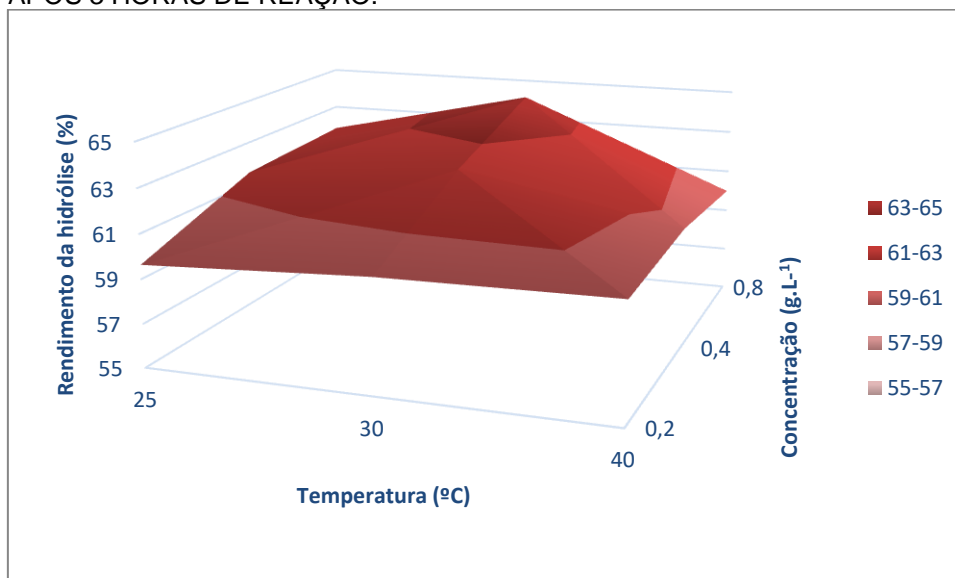


FIGURA 6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO RENDIMENTO DA REAÇÃO AVALIADA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA UTILIZADA NA REAÇÃO E DA TEMPERATURA APÓS 3 HORAS DE REAÇÃO.



5.2 DISCUSSÃO

Faedo e colaboradores (2013) utilizaram processos de separação de membranas associados à hidrólise enzimática da lactose. Os autores utilizaram 0,8 g.L⁻¹ de lactase a 6 °C por 15 horas alcançando uma redução de 93,34% do teor de lactose.

Em um estudo que buscava avaliar a produção de queijo Minas Frescal com baixo teor de lactose, Back e colaboradores (2013) alcançaram uma redução de 87,72% da lactose do leite utilizando 0,9 g.L⁻¹ de lactase a 5 °C em 24 horas de reação.

Longo (2006) atingiu cerca de 88% de hidrólise da lactose do leite para posterior produção de iogurte com 0,8 g.L⁻¹ de enzima a 40 °C após 4 horas de reação.

Foram realizados no mesmo laboratório que o presente trabalho, outras pesquisa pelo método de Lane-Eynon que apresentaram rendimentos de hidrólise maiores. Segundo Wilke (2016), após 4 horas de reação, uma redução de 99,6% no teor da lactose. Para Guariente (2017) com a concentração de enzima 0,15 g/L a uma temperatura de 30 °C após 3 horas de reação, alcançou um rendimento de 100% na reação de hidrólise.

Temperaturas mais baixas do que aquelas indicadas pela literatura podem ser utilizadas para alcançar uma alta conversão da lactose em glicose e galactose. Porém, necessitam de um tempo muito maior de reação podendo tornar-se um processo de difícil execução em escala industrial.

6 CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado foi possível concluir que a concentração de enzima e o tempo de reação influenciaram positivamente o rendimento da hidrólise, resultando, assim, em um produto que tenha um teor reduzido de lactose. **A variável temperatura também influenciou positivamente a reação até a faixa de 40 °C – valor este que está próximo ao ideal para a enzima lactase utilizada.**

Por meio dos dados obtidos pode-se afirmar que o processo de hidrólise da lactose foi eficiente. Pode-se notar que a melhor condição para esse experimento, foi o ensaio 6 - 0,8 g.L⁻¹ de enzima a 30 °C - que apresentou, após 3 horas, uma redução de 64,13% no teor da lactose.

Portanto, a hidrólise enzimática pode ser considerada uma alternativa para reduzir teor de lactose de ingredientes alimentares a serem utilizados por pessoas intolerantes à esse dissacarídeo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE NOTICIA DO PARANÁ. Leite: Paraná se mantém como segundo maior produtor do País, 2017. Disponível em:

<<http://www.apcbrh.com.br/noticias/item/337-leite-parana-se-mantem-como-segundo-maior-produtor-do-pais>>. Acesso em: 23/05/2018

AMANCIO, O. M. S et al. A Importância do consumo de leite no atual cenário brasileiro: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2015. Disponível em: <http://sban.cloudpainel.com.br/source/SBAN_Importancia-do-consumo-de-leite.pdf>. Acesso em: 10 maio 2018.

ANDRADE, A.C. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

BARBOSA, C.R.; ANDREAZZI, M.A. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. 2010. 5 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2010.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Proteínas. In: Química do processamento de alimentos. 3 ed. São Paulo: Varela, 1992. p. 79-92.

BACK, D.; et al. Viabilidade probiótica de queijos minas frescal com teor reduzido de lactose. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 68, n. 390, p. 27-35, jan./fev. 2013.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Mapa Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico - químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório de Produtos de Origem Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/Metodos%20IQA/POA/Leite%20e%20Produtos%20Lacteos/MET%20POA%2019%2001%20Acucares%20em%20leite.pdf>. Acesso em: 29/04/2018

BRITO, Maria Aparecida et al. Composição : Agência de informações EMBRAPA. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 10 maio 2018.

BRUNA, M.H.V. Intolerância à lactose, 2018 . Disponível em:
<<https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/intolerancia-a-lactose/>>.
Acesso em: 25 abr. 2018.

CAETANO, M. Produção de leite deve crescer 2,5% em 2018. Disponível em:
<<https://www.dci.com.br/agronegocios/producao-de-leite-deve-crescer-2-5-em-2018-1.678497>>. Acesso em: 23 maio 2018.

CAMPOS, N. et al. Lactose Quantification in Dairy Products by AccuChek®Glucometer. Revista Virtual de Química, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1677-1686, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
<http://dx.doi.org/10.5935/19846835.20140108>.

FAEDO, R.; BRIÃO, V. B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. Revista CIATEC, Passo Fundo, v. 3, n. 1, p. 4454, 2013.

FISCHER, J. Hidrólise de lactose por B-galactosidase de *Aspergillus Oryzae* imobilizada em reator de leito fixo. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FOPPA, T.; FERRAREZE, C. K.; CASAGRANDE, J.; KOCH, P.A. Análises físicoquímicas do leite em pó comparado ao leite UHT integral. Ágora: Revista de Divulgação Científica, v. 16, n. 1, p. 38-43. 2009.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Hydrolysis of Lactose – a Literature Review. Process Biochemistry, v.20, n.1, p.2–12. 1985.

GUARIENTE, Cassiano. Influência da temperatura, concentração de enzima β – galactosidase e tempo de reação na hidrólise enzimática da lactose do soro do leite. Graduação em Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, K. H. Application of lactose in dairy foods and other foods containing lactose. Food Technology, v. 45, n. 1, p. 94-95, 1991

JUNIOR , F.P. Porcentagem de gordura, proteína e lactose em amostras de leite de tanque. 2002. 76 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Paraná, 2002.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudanças de paradigmas com a biologia molecular. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. O. 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, Juiz de Fora, n. 389, p. 57-65, nov./dez. 2012.

REZENDE, R.C. Lactose, 2010. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/bioquimica/lactose/>>. Acesso em: 13 maio 2018.

ROCHA, L.C.S.C. Intolerância à lactose: conduta nutricional no cuidado de crianças na primeira infância. 2012. 12 p. Dissertação (Pós-Graduação em Nutrição Clínica) - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, [S.l.], 2012.

SANTOS, F. F. P.; OLIVEIRA, G. L.; PIMENTEL, H. G. P.; PINHO, K. D.; VERAS, H. N. H. intolerância à lactose e as consequências no metabolismo do cálcio. Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia, v. 2, n. 4, jun. 2014.

SENER, N.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and b-galactosidase stability under sonication. Process Biochemistry, Istanbul, v. 41, p. 1493-1500, 2006.

SILVA, G.G.; LOPES, L.A. Intolerância à lactose e galactosemia: Importância dos processos metabólicos. Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research. Ipatinga, p. 57-62. jul. 2015.

SOARES, F.A.C. COMPOSIÇÃO DO LEITE: FATORES QUE ALTERAM A QUALIDADE QUÍMICA*. 2013. 7 p. Seminário (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2013/10/leiteFred.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2018.

SOUZA, C. F. V. Utilização da enzima β -Galactosidase na hidrólise da lactose do leite. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/claucia-fernanda-souza/utilizacao-da-enzima-946galactosidase-na-hidrolise-da-lactose-do-leite-100180n.aspx>>. Acesso em: 13 maio 2018.

TREMARIN, A. Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

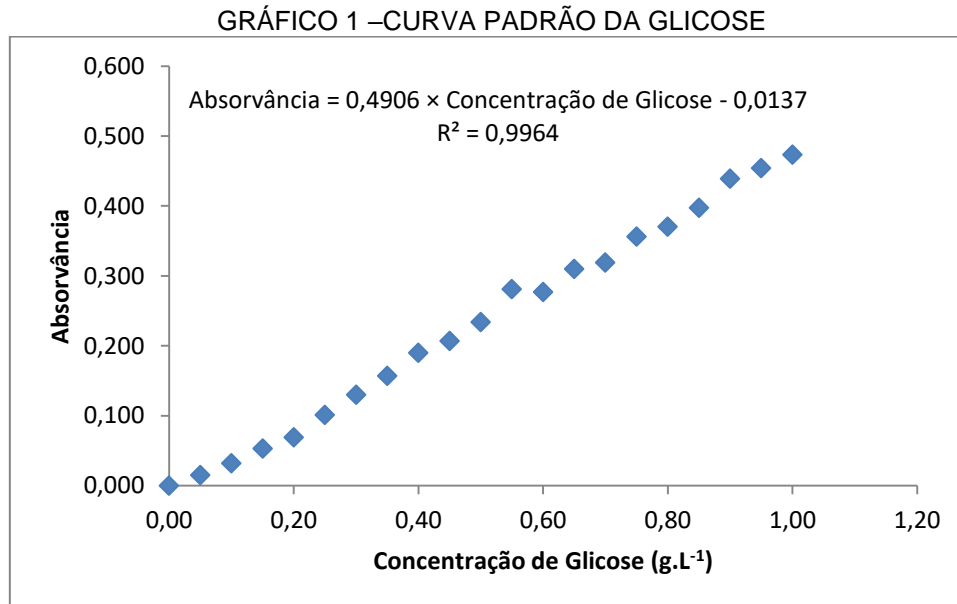
WILKE, Poline. Avaliação da influencia da temperatura, concentração de enzima e tempo de reação na hidrólise da lactose. Graduação em Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.

ZANIN, Gisella Maria. Notas de aula. 2006. Disponível em: <[http://file:///C:/Users/user/Downloads/APOSTILA2006-%20LAB3%20\(2\).pdf](http://file:///C:/Users/user/Downloads/APOSTILA2006-%20LAB3%20(2).pdf)>. Acesso em: 14 maio 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE.....	32
APÊNDICE 2 - PORCENTAGENS DE RENDIMENTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE ENCONTRADAS EM CADA ENSAIO A CADA HORA DE REAÇÃO.....	33

APÊNDICE 1 - GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE



APÊNDICE 2 - PORCENTAGENS DE RENDIMENTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE ENCONTRADAS EM CADA ENSAIO A CADA HORA DE REAÇÃO.

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE RENDIMENTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE PARA CADA ENSAIO.

HORA	ENSAIO	RENDIMENTO (%)
1	1	55,57
2	1	57,89
3	1	59,64
1	2	57,89
2	2	60,13
3	2	61,54
1	3	58,03
2	3	60,97
3	3	61,84
1	4	55,92
2	4	59,15
3	4	60,13
1	5	56,97
2	5	60,76
3	5	62,45
1	6	59,92
2	6	62,03
3	6	64,13
1	7	57,18
2	7	57,96
3	7	60,27
1	8	58,94
2	8	59,57
3	8	60,55
1	9	59,29
2	9	59,5
3	9	59,99

FONTE: O autor (2018)