

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RENATA CRISTINA DA SILVA

**$\beta$ -GALACTOSIDASE ENCAPSULADA EM HIDROGÉIS DE  
CARRAGENANA, PECTINA E CARRAGENANA/PECTINA:  
ESTUDO COMPARATIVO E FATORES QUE INFLUENCIAM  
NA ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Alfenas/MG

2017

RENATA CRISTINA DA SILVA

**$\beta$ -GALACTOSIDASE ENCAPSULADA EM HIDROGÉIS DE  
CARRAGENANA, PECTINA E CARRAGENANA/PECTINA:  
ESTUDO COMPARATIVO E FATORES QUE INFLUENCIAM  
NA ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Analítica  
Orientadora: Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Renata Cristina da.

$\beta$ -Galactosidase encapsulada em hidrogéis de carragenana, pectina e carragenana/pectina: estudo comparativo e fatores que influenciam na estabilidade e liberação controlada / Renata Cristina da Silva.

-- Alfenas/MG, 2017.

79 f. -

Orientadora: Jerusa Simone Garcia.

Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

Bibliografia.

1. beta-Galactosidase. 2. Composição de Medicamentos. 3. Biopolímeros.  
4. Ativação Enzimática. I. Garcia, Jerusa Simone. II. Título.

CDD-543

**Renata Cristina da Silva**

**“ $\beta$ - galactosidade encapsulada em hidrogéis de carragenana, pectina e carragenana/pectina: Estudo comparativo e fatores que influenciam na estabilidade e liberação controlada”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 29/09/17

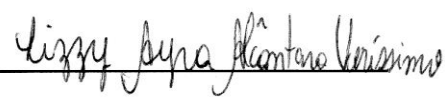
Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia Trevisan  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo  
Instituição: Universidade Federal de Lavras -  
UFLA

Assinatura: 

*Aos meus pais, Dalvimar e Juvêncio, que sempre estiveram presentes e apoiaram-me em toda minha vida acadêmica.*

## **AGRADECIMENTO**

A Deus pela vida, pela presença constante em todos os momentos e pela oportunidade de desenvolvimento intelectual, profissional e pessoal.

Aos meus pais e irmã, que acompanharam minha trajetória sempre me incentivaram e que nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso. Agradeço pelo amor incondicional, carinho, dedicação, paciência e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Lucio, pelos preciosos conselhos, por compreender minhas ausências, pelo carinho e apoio, por almejar esse objetivo tanto quanto eu.

A minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jerusa Simone Garcia, pela orientação, pela confiança depositada em mim e disposição em me auxiliar na execução deste trabalho.

A todos os amigos do grupo LACFar, em especial a Amanda pela amizade e a Fernanda por sempre se mostrar disposta a ajudar o próximo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Prof. Keyller Bastos Borges pela realização das análises de Microscopia eletrônica de varredura realizada nas dependências da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ).

## RESUMO

Alguns indivíduos que não produzem  $\beta$ -galactosidase, ou a produzem em baixa escala, sofrem com intolerância à lactose, que pode causar uma série de problemas de saúde. Desta forma, é necessária a suplementação da  $\beta$ -galactosidase no organismo, porém, a passagem da enzima pelo trato gastrointestinal pode comprometer sua estabilidade, tomando-a inativa. A  $\beta$ -galactosidase (E.C 3.2.1.23) é uma enzima que catalisa o processo de hidrólise da lactose, obtendo como produtos glicose e galactose. Neste estudo, foi investigado o potencial do hidrogel de carragenana, pectina e pectina/carragenana em encapsular a  $\beta$ -galactosidase. As pérolas de hidrogel foram fabricadas pela injeção de uma solução polimérica (carragenana e/ou pectina) contendo a enzima numa solução salina (cloreto de potássio e/ou cloreto de cálcio). A eficiência de encapsulação foi avaliada por meio da determinação da atividade enzimática específica utilizando orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo (ONPG). Os materiais obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG/DTG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e também pelo grau de intumescimento dos hidrogéis em diferentes meios. Os efeitos da variação de pH, da temperatura e do tempo de armazenamento também foram avaliados em termos da atividade catalítica da enzima livre e encapsulada nos hidrogéis formados. Foi realizado ainda um estudo do desempenho da atividade catalítica nos hidrogéis através do teste liberação controlada *in vitro*. Os hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido apresentaram uma eficiência de encapsulação de  $58,0 \pm 1$ ,  $72,0 \pm 1$  e  $77,0 \pm 2\%$ , respectivamente. O hidrogel de pectina foi que apresentou melhor desempenho nos testes de pH e temperatura em relação a atividade da  $\beta$ -galactosidase. No entanto, o hidrogel de carragenana foi o que apresentou maior estabilidade após três meses de armazenamento. Quanto ao teste de liberação controlada, verificou-se que os hidrogéis de carragenana e pectina foram 2,0 e 2,4 vezes, respectivamente, mais eficazes que o comprimido comercial na liberação *in vitro* da  $\beta$ -galactosidase. Mediante todos estes testes, foi possível realizar um estudo sistemático e comparativo entre os três biopolímeros preparados para encapsular a  $\beta$ -galactosidase. Tal abordagem é difícil de ser encontrada na literatura especializada.

**Palavras-chave:** Lactase. Encapsulação. Gelificação Ionotrópica. Biopolímero. Atividade enzimática

## ABSTRACT

A few individuals that do not produce  $\beta$ -galactosidase or produce at low scale suffer with intolerance to lactose, which may cause several health problems. In this sense, the supplementation of  $\beta$ -galactosidase is required, however its passage through the gastrointestinal tract may compromise its stability, making it inactive.  $\beta$ -galactosidase (E.C 3.2.1.23) is an enzyme responsible by catalyzing the process of lactose hydrolysis that provides products such as glucose and galactose. The current study investigated the potential of hydrogels of carrageenan, pectin and pectin/carrageenan to encapsulate the  $\beta$ -galactosidase. The hydrogel counts were made by injecting a polymeric solution (carrageenan and/or pectin) containing the enzyme in a salt solution (potassium chloride and/or calcium chloride). The efficiency of encapsulation was evaluated by the spectrophotometric test of specific enzymatic activity using ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG). The material obtained was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TG/DTG), scanning electron microscopy (SEM) and also by the degree of hydrogel swelling in different mediums. The effects of pH, temperature and storage time were also evaluated in terms of the catalytic activity of the free enzyme and those encapsulated in the hydrogels. Moreover, a study on the performance of catalytic activity through the test of controlled release *in vitro* was conducted. The carrageenan, pectin and hybrid hydrogels presented efficiency of encapsulation of  $58.0 \pm 1.0$ ,  $72.0 \pm 1.0$  and  $77.0 \pm 2.0\%$ , respectively. The pectin hydrogel presented the best performance in the pH and temperature tests in relation to the activity of  $\beta$ -galactosidase. However, the carrageenan presented the best stability after three months stored. Regarding the test of controlled release, the carrageenan and pectin hydrogels were 2.0 and 2.4 times, respectively, more efficient than the commercial tablet on releasing the  $\beta$ -galactosidase *in vitro*. All these tests provided a systematic and comparative study for the three biopolymers prepared to encapsulate the  $\beta$ -galactosidase. Such approach is not often found in the specialized literature.

**Keywords:** Lactase. Encapsulation. Ionotropic gelation. Biopolymer. Enzymatic activity



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação de Hidrólise da Lactose catalisada pela $\beta$ -galactosidase.....	15
Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas. ....	17
Figura 3 - Representação esquemática da gelificação ionotrópica.....	20
Figura 4 - Pectina com ácido D-galacturônico unidos por ligações $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4).....	24
Figura 5 - Representação esquemática do modelo "caixa de ovos".....	26
Figura 6 - Estrutura da carragenana tipo Kappa. ....	27
Figura 7 - Ilustração esquemática do possível mecanismo de gelificação da carragenana. ...	28
Figura 8 - Esquema geral do preparo dos hidrogéis. ....	31
Figura 9 - Reação de hidrólise do ONPG em galactose e O-NP. ....	36
Figura 10 - Fotografia dos hidrogéis. ....	45
Figura 11 - Curva analítica para avaliar a atividade da $\beta$ -galactosidase. ....	46
Figura 12 - Análises termogravimétrica dos hidrogéis de carragenana, pectina e pectina/carragenana. ....	52
Figura 13- Espectros de infravermelho, comparando os hidrogéis de carragenana, pectina e pectina/carragenana. ....	55
Figura 14- Imagens de MEV dos hidrogéis.....	57
Figura 15 - Influência do pH e da temperatura na estabilidade dos hidrogéis e também na $\beta$ -galactosidase sem ser submetida ao processo de reticulação. ....	60
Figura 16 - Comparação da quantidade de $\beta$ -galactosidase liberada (n=3) a diferentes pH em hidrogéis usando amostras recém preparadas e amostras armazenadas a 4°C por 3 meses.....	64
Figura 17 - Comparação da quantidade de $\beta$ -galactosidase liberada (n=3) em diferentes temperaturas em hidrogéis usando amostras recém preparadas e amostras armazenadas por 3 meses à 4°C. ....	65
Figura 18 - Perfil de liberação dos hidrogéis e do produto comercial colocado nas cápsulas gastroresistentes (n=3). ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações empregadas de biopolímero e sal para obtenção do hidrogel de carragenana .....	32
Tabela 2 - Concentrações usadas de biopolímero e sal para obtenção do hidrogel de pectina. ....	33
Tabela 3 - Concentrações empregadas de biopolímeros e sal para obtenção do hidrogel de pectina/carragenana. ....	35
Tabela 4 - Soluções de $\beta$ -galactosidase utilizadas para construção da curva analítica (n=3).37	
Tabela 5- Dados obtidos no preparo do hidrogel de carragenana (n=3).....	47
Tabela 7- Dados obtidos no preparo do hidrogel de pectina/carragenana (n=3). ....	50
Tabela 8- Grau de intumescimento dos hidrogéis imobilizados com $\beta$ -galactosidase em diferentes meios (n=3). ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAR	–	Hidrogel de carragenana
CAR/PEC	–	Hidrogel híbrido
EE	–	Eficiência de encapsulação
FDA	–	Food and Drug Administration
FTIR	–	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: Fourier Transform infrared)
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
O-NP	–	Ortonitrofenil
ONPG	–	Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo
PEC	–	Hidrogel de pectina
U	–	Unidade de atividade enzimática

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	INTOLERANCIA A LACTOSE.....	14
2.2	HIDRÓLISE DA LACTOSE E A $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	15
2.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	16
2.3.1	Imobilização por encapsulação .....	18
2.4	A IMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	20
2.5	BIOPOLÍMEROS.....	22
2.5.1	Pectina.....	23
2.5.2	Carragenana .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	EQUIPAMENTOS .....	30
4.2	REAGENTES .....	30
4.3	PREPARO DOS HIDROGÉIS .....	31
4.3.1	Hidrogel de carragenana .....	32
4.3.2	Hidrogel de pectina.....	33
4.3.3	Hidrogel de pectina/carragenana .....	34
4.4	ATIVIDADE CATALÍTICA DA $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	35
4.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	37
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS .....	38
4.6.1	Análises térmicas .....	38
4.6.2	Infravermelho .....	38
4.6.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
4.6.4	Intumescimento.....	39
4.7	EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA.....	39
4.8	ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE <i>IN VITRO</i> .....	40
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42

5.1.1	Hidrogel de carragenana .....	42
5.1.2	Hidrogel de pectina.....	43
5.1.3	Hidrogel de pectina/carragenana .....	44
5.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENCAPSULAÇÃO DOS HIDROGÉIS	45
5.2.1	Hidrogel de carragenana .....	46
5.2.2	Hidrogel de pectina.....	47
5.2.3	Hidrogel de pectina/carragenana .....	49
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS .....	50
5.3.1	Análises térmicas .....	51
5.3.2	Infravermelho .....	54
5.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
5.3.4	Intumescimento.....	58
5.4	INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	59
5.5	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	63
5.6	ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE <i>IN VITRO</i> .....	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -galactosidase (E.C 3.2.1.23), também conhecida como lactase, é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise da lactose do leite em seus monossacarídeos glicose e galactose que são absorvidos pela corrente sanguínea (BROWN-ESTERS et al., 2012). Quando há insuficiência ou ausência de  $\beta$ -galactosidase são gerados problemas gastrointestinais, incluindo a intolerância a lactose.

Dentre as alternativas para o tratamento e o alívio dos sintomas causados por essa intolerância, encontra-se o uso de  $\beta$ -galactosidase, a qual é administrada oralmente na forma de comprimido ou cápsulas (MONTALTO et al., 2006). No entanto, o uso clínico de enzimas apresenta limitações como: custo elevado, instabilidade e vida curta após a ingestão. Além disso, quando tomado por via oral, a  $\beta$ -galactosidase atravessa o pH ácido do estômago que pode comprometer a integridade estrutural da enzima e, conseqüentemente, a sua atividade na hidrólise de lactose (NICHELE et al., 2011). É importante também ressaltar que produtos contendo  $\beta$ -galactosidase como os comprimidos disponíveis nos EUA são classificados como suplemento alimentício de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) sendo, portanto, isentos de passar por testes de qualidade, eficácia e estabilidade (BLENDON et al., 2001). No Brasil a  $\beta$ -galactosidase não é registrada com a finalidade terapêutica pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A administração do suplemento alimentício contendo enzima/proteínas como princípio ativo não é adequada devido à alta susceptibilidade a enzimas digestivas no trato gastrointestinal. Uma alternativa para proteger as enzimas/proteínas da degradação e obter sua liberação em órgãos específicos é imobilizá-las (MUNARIN et al., 2012). A  $\beta$ -galactosidase tem sido imobilizada em uma grande variedade de suportes sólidos como alginato, carragenana, pectina, gelatina agar, poliacrilamida, colágeno, carvão ativado, cerâmica porosa (PANESAR et al., 2006, PANESAR et al., 2010), sephadex, quitosana, vidro poroso, agarose, álcool polivinílico, celulose, Eupergit C (esferas acrílicas ativadas com epóxi), nylon, espumas de poliuretano ou zeólita (ELNASHAR; YASSIN, 2009).

A  $\beta$ -galactosidase na forma imobilizada apresenta várias vantagens como: ser mais eficiente, ser agradável ao paladar e ser uma alternativa promissora para suplantiar a ausência desta enzima no organismo podendo ser usada no tratamento de pessoas com intolerância à lactose (FACIN et al., 2015). O método de imobilização escolhido para este estudo foi a gelificação ionotrópica. Neste método, uma solução polimérica contendo a enzima é injetada

em outra solução de "endurecimento", em condições que promovam a gelificação do polímero. Este procedimento resulta na formação do hidrogel. Os hidrogéis possuem propriedades importantes para aplicações biológicas, farmacêuticas e médicas, como serem biodegradáveis, biocompatíveis e não apresentarem toxicidade (VAN VLIERBERGHE et al., 2011).

Nesse sentido, o propósito do presente trabalho foi encapsular a  $\beta$ -galactosidase em hidrogéis de carragenana, pectina (primeira vez reportado na literatura para esta enzima) e um híbrido contendo os dois biopolímeros. Posteriormente, os materiais obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG/DTG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi investigado ainda o efeito da influência do pH e da temperatura para verificar a capacidade dos hidrogéis em proteger a  $\beta$ -galactosidase encapsulada sob condições específicas. Foi também avaliada a influência do tempo de armazenamento na estabilidade dos hidrogéis. Finalmente, os hidrogéis foram submetidos ao estudo de liberação da  $\beta$ -galactosidase *in vitro* para avaliar o comportamento nos fluidos gástricos e intestinais simulados. O resultado deste teste foi ainda comparado com o comprimido comercial contendo a  $\beta$ -galactosidase nas mesmas condições. Mediante todos estes testes, foi possível realizar um estudo sistemático e comparativo entre os três biopolímeros preparados para encapsular a  $\beta$ -galactosidase.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INTOLERANCIA A LACTOSE

Hipócrates (460-370 A.C.) foi o primeiro estudioso a relatar que algumas pessoas apresentavam problemas após a ingestão do leite, porém somente a partir dos anos 1990 tem-se investigado e diagnosticado como intolerância a lactose, que é definida como sendo uma desordem comum que induz à incapacidade para digerir a lactose (MATTHEWS et al., 2005).

A lactose é um açúcar encontrado no leite de todos os mamíferos, com exceção dos leões marinhos e das morsas. Em 240 mL de leite estão presentes aproximadamente 12 gramas de lactose, sendo essa quantidade suficiente para provocar sintomas de intolerância na maioria dos indivíduos com este problema (HARRINGTON; MAYBERRY, 2008). A intolerância à lactose afeta a maioria dos adultos em todo o mundo, sendo uma característica herdada geneticamente. Estima-se que mais de 70% da população do mundo não pode digerir o leite após a infância, isso porque a produção de  $\beta$ -galactosidase começa a diminuir após os 2 anos de idade e de modo mais significativo, quando o indivíduo se encontra em idade adulta (SQUILLANTE et al., 2003).

Esta intolerância é causada por uma deficiência de  $\beta$ -galactosidase no organismo causando sintomas como diarreia, flatulência, fortes dores e distensões abdominais e inchaços, estes sintomas tendem a ocorrer entre 30 min e 2 h após a ingestão de alimentos contendo lactose (BROWN-ESTERS et al., 2012). A fisiopatologia da intolerância à lactose está diretamente relacionada aos sintomas predominantes. Devido à insuficiência da atividade da  $\beta$ -galactosidase, a lactose não é quebrada no intestino delgado e atrai fluido osmoticamente para o lúmen intestinal passando rapidamente para o cólon, onde é transformada pela ação de bactérias em monossacarídeos que não podem ser absorvidos. Isso gera aumento de pressão osmótica e no volume de líquido no intestino. Esta fermentação produz hidrogênio, metano e dióxido de carbono (HARRINGTON, MAYBERRY, 2008; BROWN-ESTERS et al., 2012).

O teste de respiração de hidrogênio é a técnica mais utilizada para o diagnóstico da intolerância a lactose (BROWN-ESTERS et al., 2012). Uma vez diagnosticada um possível tratamento inclui quatro princípios gerais: 1) a redução ou a restrição dietética de lactose; 2) a substituição de nutrientes com fontes alternativas para evitar reduções na energia e ingestão



de proteínas; 3) a regulação de cálcio e vitamina; 4) a ingestão de  $\beta$ -galactosidase (NICHELE et al., 2011).

## 2.2 HIDRÓLISE DA LACTOSE E A $\beta$ -GALACTOSIDASE

A lactose ao passar pelo processo de hidrólise (FIGURA 1) libera como produtos a glicose e a galactose. Os dois monossacarídeos formados nos produtos são unidos por uma ligação entre o carbono-1 da galactose e o carbono-4 da glicose (MARTINS; BURKET, 2009).

Para a hidrólise da lactose dois métodos têm sido empregados: a hidrólise ácida (homogênea ou heterogênea) e a hidrólise enzimática (enzimas na forma livre, imobilizadas em suportes ou recuperadas) que utiliza a  $\beta$ -galactosidase.

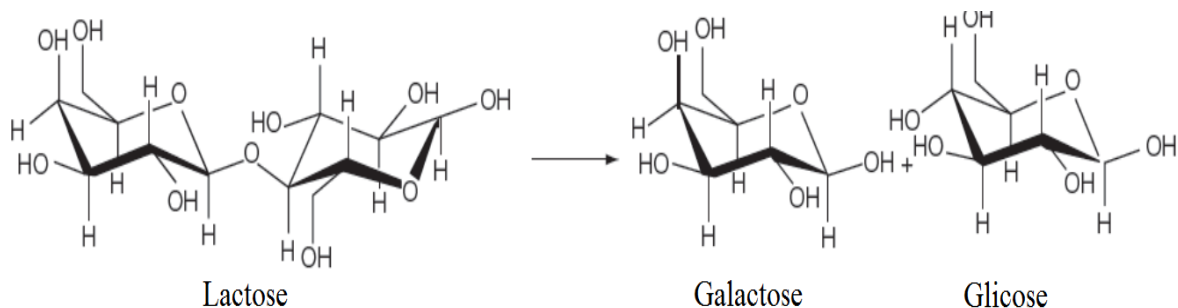


Figura 1- Reação de Hidrólise da Lactose catalisada pela  $\beta$ -galactosidase  
Fonte: MARTINS e BURKET (2009, p.232).

A hidrólise enzimática da lactose é mais vantajosa do que a ácida porque pode ser realizada em baixas temperatura e pH sem gerar subprodutos responsáveis por flavor ou cor desagradáveis, que geralmente são comuns de serem formados durante os métodos ácidos. Outra característica importante são que as propriedades nutricionais dos produtos lácteos não são modificadas (HEIDTMANN et al., 2012).

Apesar da  $\beta$ -galactosidase ser extraída de diversas fontes, as mais usadas para esta finalidade são extraídas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces (lactis ou fragilis)* devido ao histórico de aplicações e aos numerosos estudos realizados (HUSAIN, 2010).

A legislação brasileira específica a utilização da  $\beta$ -galactosidase pela indústria de alimentos por meio da Resolução nº 205, de 17/11/2006. A resolução relata que a  $\beta$ -galactosidase utilizada por esse tipo de indústria deve ser de origem microbiana, proveniente dos fungos: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus níger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp*, tais espécies são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) (BRASIL, 2006).

### 2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é que a retenção da enzima em um suporte sólido para posterior utilização do biocatalisador. A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização (MENDES et al., 2011). A imobilização pode também ser definida como um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico (MATEO et al., 2007). A imobilização de enzimas pode resultar em melhorias no seu desempenho catalítico e reduzir a sua inativação por distorção da estrutura originária pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, o que é interessante para a aplicação de enzimas no setor industrial (MENDES et al., 2011).

O mais importante é que a enzima imobilizada deve apresentar uma atividade catalítica preferencialmente superior à atividade de uma enzima nativa e não deverão ocorrer alterações em sua estrutura nem modificações no sítio ativo (DALLA-VECCHIA et al, 2004). A imobilização de enzimas pode ser feita de várias formas como: por meio da adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; pelo uso de um reagente multifuncional por meio de ligações cruzadas; confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em membranas poliméricas (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MATEO et al., 2007). A Figura 2 mostra algumas formas de imobilização de enzimas.

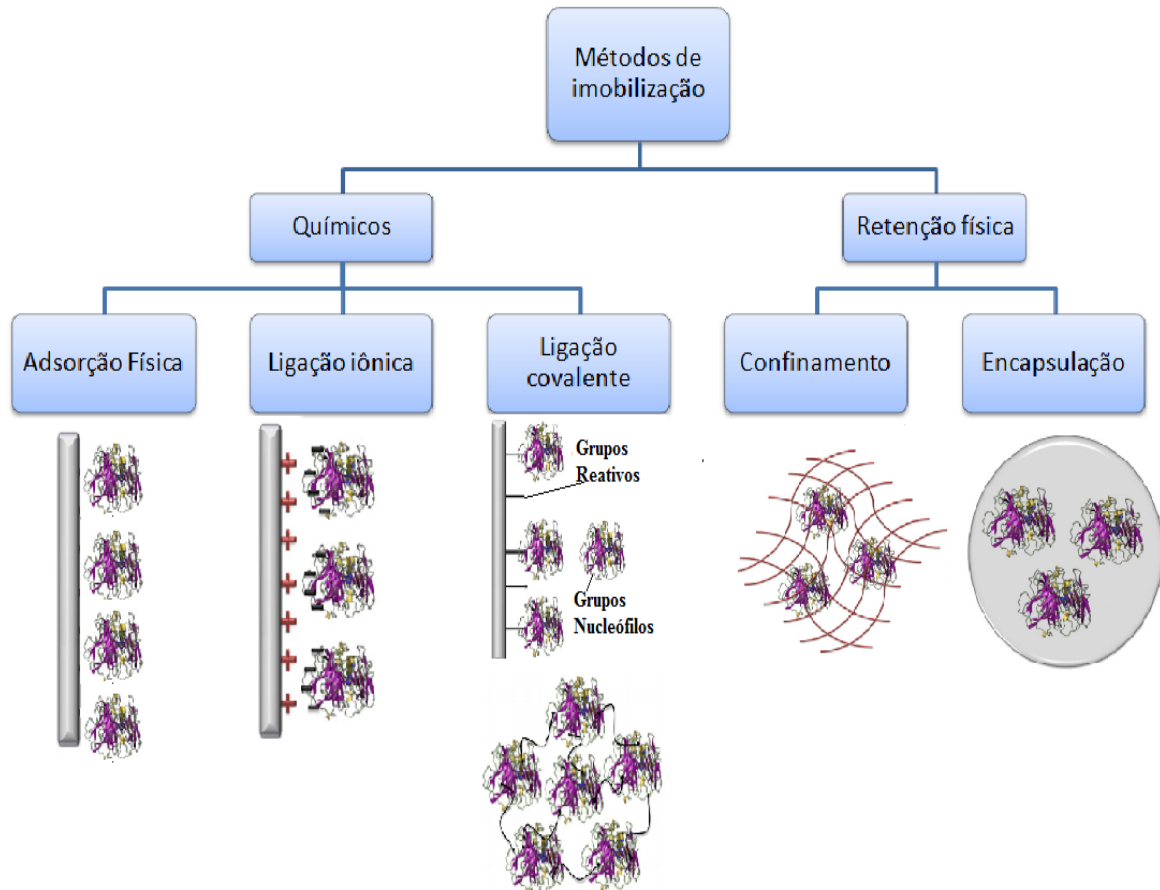


Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: Adaptado de FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al (2012)

Para uma escolha adequada do método de imobilização devem ser analisados alguns pontos como atividade da enzima, assim como suas características de inativação; custo do procedimento de imobilização; toxicidade dos reagentes de imobilização; estabilidade operacional e propriedades hidrodinâmicas desejadas para a enzima imobilizada (MENDES et al., 2011).

A imobilização de enzimas quando adequadamente empregada traz alguns benefícios como: o reaproveitamento do catalisador e aumento da estabilidade da enzima, ou seja, aumento da resistência química quando usadas em meios que apresentam extremos de pH, temperatura, força iônica, entre outros. (JOCHEMS et al., 2011).

É importante saber que os protocolos de imobilização de enzimas podem induzir modificações estruturais indesejáveis que causam perda total ou parcial da atividade enzimática. Se o método de imobilização não for bem planejado a enzima pode se tornar menos estável se comparada à enzima em sua forma livre (BEZERRA et al., 2015).

É necessário ser considerados os efeitos da imobilização, em geral, dentre os vários efeitos que a imobilização pode causar destaca-se:

- a) Efeitos estéricos e de conformação: pode ocorrer à perda de atividade da enzima imobilizada geralmente devido a mudanças conformacionais, o processo de interação enzima-suporte é quase sempre aleatório, poderá acontecer que a região do sítio ativo se torne menos acessível ao substrato (impedimento estérico), o que acarreta em uma diminuição na atividade (LIMA et al., 2001);
- b) Efeitos de microambiente: o microambiente ao redor de uma enzima imobilizada pode diferir daquele da forma livre, esse fato poderá se refletir sobre os valores dos parâmetros cinéticos. Os efeitos do microambiente, que dependem da natureza física e química do suporte, podem acarretar uma distribuição desigual do substrato, produto e cofatores entre a região vizinha do sistema imobilizado e o resto da solução (LIMA et al., 2001);
- c) Efeitos difusionais: quando a enzima é imobilizada sobre ou no interior de um suporte sólido, o substrato pode se difundir do seio da solução até o sítio ativo da enzima. Deste modo, quando a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de transformação pela enzima, a velocidade observada para a reação é mais baixa do que a esperada para uma dada concentração de enzima em solução, visto que nem todas as moléculas de enzima estarão em contato com o substrato, isto é, não se atinge a saturação (LIMA et al., 2001).

O método de imobilização por encapsulação, descrito a seguir, foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

### 2.3.1 Imobilização por encapsulação

O método de imobilização por encapsulação tem sido aplicado, principalmente, com polímeros naturais, como por exemplo, colagênio, quitosana, celulose e carragenana (BEZERRA et al., 2015). Este método consiste em retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa gerando o aprisionamento da mesma (MENDES et al., 2011). A imobilização de enzimas dentro de matrizes porosas é utilizada ainda para melhorar sua estabilidade e recuperação pelo fato das enzimas não estarem em contato direto com o meio que as envolvem (BETANCOR et al., 2008; ES; VIEIRA; AMARAL, 2015).

A encapsulação pode ser alcançada por vários métodos, como por exemplo, emulsificação-vaporação do solvente, coacervação, gelificação ionotrópica, polimerização, *spray-drying*, leito fluidizado (PREZOTTI, 2013).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de ampliar as potencialidades atribuídas aos hidrogéis. Dentre estes métodos a gelificação ionotrópica, escolhida para este estudo, consiste na complexação entre polieletrólitos e íons de carga contrária que ao entrarem em contato sofrem reticulação iônica. A formação de ligações cruzadas intra e intermolecular dão origem aos hidrogéis (PATIL et al., 2010).

Hidrogéis são redes poliméricas com configuração tridimensional capazes de reter grande quantidade de água, que é atribuída à presença de grupos hidrofílicos, tais como OH, -CONH-, -CONH<sub>2</sub>- e -SO<sub>3</sub>H presentes em polímeros que formam a estrutura do hidrogel (MEHRDAD et al., 2008; ULLAH et al., 2015). Estes grupos possibilitam a hidratação de 10-20% até milhares de vezes sua massa seco, quando em água, dependendo da natureza do meio aquoso e da composição do polímero (HOFFMAN, 2012; MEHRDAD et al., 2008). Se o tamanho dos poros do hidrogel for pequeno o suficiente, então a enzima será fisicamente presa dentro da rede polimérica formada (MCCLEMENTS, 2017).

Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais. Os hidrogéis obtidos a partir de polímeros naturais apresentam as propriedades características destes biomateriais como serem biocompatíveis e biodegradáveis (SMITH et al., 2002). Os hidrogéis podem ainda ser classificados em hidrogéis químicos ou físicos. Hidrogéis fisicamente reticulados não utiliza agentes de reticulação tóxicos, o que mantêm a integridade dos compostos a serem aprisionadas (ULLAH et al., 2015). Os hidrogéis físicos são reversíveis, a rede polimérica é formada através de atração eletrostática, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (HOFFMAN, 2012).

A gelificação ionotrópica, representada na Figura 3, permite a encapsulação dos mais diversos materiais como células, fármacos e enzimas. Este método permite a obtenção de micropartículas que são geradas pela extrusão da dispersão polimérica contendo a enzima, ou outro material a ser encapsulado, sobre a solução do agente reticulante. Deste modo, as esferas de hidrogel são produzidas no momento em que a solução contendo o polímero é gotejada sobre a solução reticulante, responsável pela formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, dando origem a uma rede tridimensional (PREZOTTI, 2013).

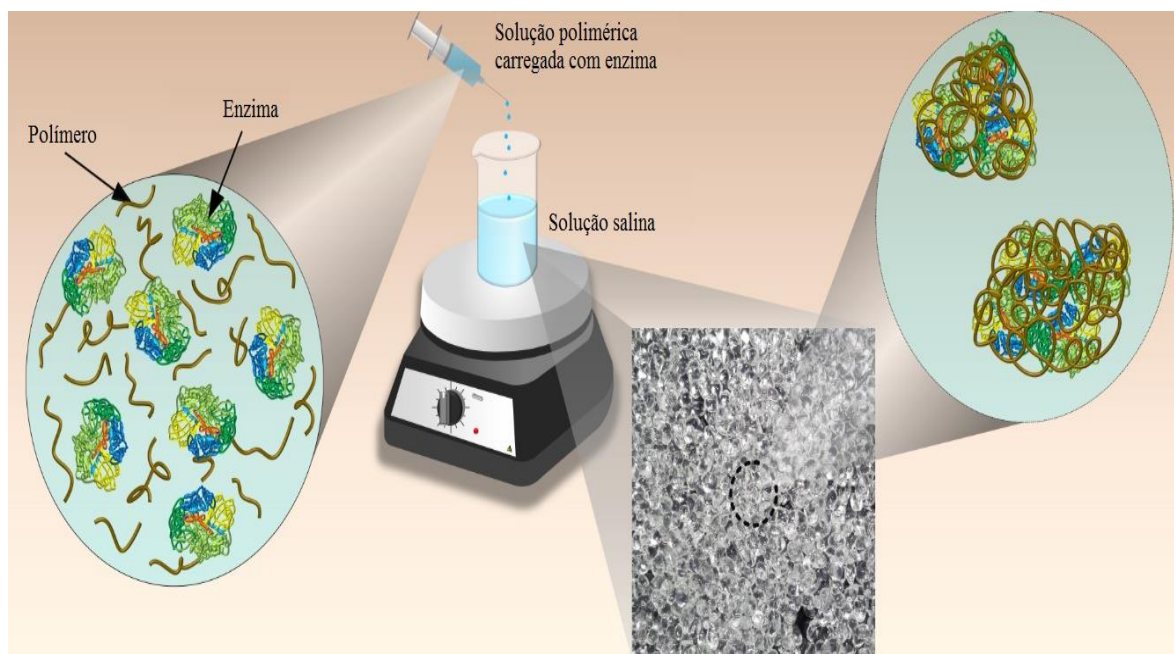


Figura 3 - Representação esquemática da gelificação iônica.

Fonte: Do autor

Uma das principais vantagens dos hidrogéis é não promover nenhuma modificação química da enzima (LIN; METTERS, 2006). Esta vantagem está relacionada ao fato de não ser necessário a utilização de solventes orgânicos ou altas temperaturas para a obtenção dos hidrogéis, mantendo assim a integridade do material encapsulado. Além disso, a gelificação iônica é uma técnica simples, rápida e econômica. Em contrapartida, hidrogéis formados por gelificação iônica apresentam dificuldade em controlar a taxa de liberação do material encapsulado por um longo período de tempo (YEO et al., 2001).

#### 2.4 A IMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

A imobilização da  $\beta$ -galactosidase pode impedir a sua degradação química e biológica tornando-a mais estável. Assim, comprimidos contendo a enzima encapsulada pode ser uma alternativa promissora para complementar a ausência desta enzima em humanos intolerantes à lactose (FACIN et al., 2015; MONTALTO et al., 2006). A imobilização pode ser obtida por

meio de vários métodos tais como: adsorção, ligação covalente, auto agregação, aprisionamento e encapsulação (ANSARI et al., 2010).

Zhang et al., (2016) investigaram o potencial de esferas de hidrogel de carragenana para encapsular  $\beta$ -galactosidase. As esferas de hidrogel foram fabricadas pela extrusão de uma solução aquosa contendo  $\beta$ -galactosidase e carragenana numa solução cloreto de potássio responsável pela gelificação do polímero. Os resultados indicaram que o hidrogel de carragenana pode ser útil em sistemas de encapsulamento (ZHANG et al., 2016).

Freitas et al., (2011), imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) em esferas de alginato-gelatina que foram reticuladas com glutaraldeído. Os autores compararam as propriedades da  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada. O rendimento alcançado, de 30%, foi considerado baixo e foi atribuído às interações entre enzima-alginato-gelatina-glutaraldeído, envolvendo o sítio ativo de enzima (FREITAS et al., 2011).

Estevinho et al., (2014), imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase usando diferentes biopolímeros (goma arábica, quitosana, quitosana modificada, alginato de cálcio e alginato de sódio) com objetivo de investigar a produção de micropartículas contendo a  $\beta$ -galactosidase. As micropartículas obtidas foram caracterizadas por potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura e a atividade da enzima foi avaliada por espectrofotometria empregando o substrato ONPG (O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo). Maiores atividades foram obtidas nas micropartículas produzidas com goma arábica, quitosana modificada (em pH 8) e alginato de cálcio (atividade relativa de 37, 20 e 20%, respectivamente, quando comparada com enzima livre) (ESTEVINHO et al., 2014).

Mammarella et al., (2005) estudaram a encapsulação da  $\beta$ -galactosidase com objetivo de desenvolver uma nova abordagem para determinar a estabilidade operacional da enzima aprisionada em gel de alginato-carragenana. Os resultados mostraram que a enzima aprisionada no gel foi parcialmente lixiviada pelo inchaço do mesmo (MAMMARELLA et al., 2005).

Elnashar et al., (2009), imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase por meio de ligação covalente em esferas de  $\kappa$ -carragenana utilizando o glutaraldeído. O processo de imobilização aumentou a estabilidade enzimática. A enzima imobilizada apresentou-se estável na faixa de temperatura de 45 a 55°C, enquanto a enzima não imobilizada foi estável na faixa de 45 a 50°C. Foi constatado um aumento do pH ótimo da atividade enzimática, sendo o valor de pH de 4,5 para a enzima livre e de 5,5 para a enzima (ELNASHAR et al., 2009).

Guidini et al., (2010), imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase por adsorção iônica empregando as resinas comerciais Duolite A-568, Duolite S-761, Marathon A e Marathon C. Neste

trabalho foi avaliada a atividade e estabilidade desta enzima em relação a variações de pH e temperatura. A resina que apresentou melhor resultado na imobilização foi a Duolite A-568, que é uma resina aniônica, fracamente básica e altamente porosa, com matriz de fenol-formaldeído policondensado. As condições ótimas de imobilização foram pH 4,5 e concentração de  $\beta$ -galactosidase de 16 g/L. A atividade da enzima imobilizada após ser utilizada 30 vezes foi de 51% em relação à inicial. O processo de reticulação da enzima usando o glutaraldeído como agente reticulante foi otimizado na seguinte condição: concentração de 3,5 g/L e tempo da reação de reticulação de 1,5h. A  $\beta$ -galactosidase imobilizada reteve 90% de sua atividade inicial (GUIDINI et al., 2010).

No trabalho de Souza et. al., (2014), a enzima  $\beta$ -galactosidase foi covalentemente imobilizada em polihidroxibutirato - PHB (material orgânico) magnetizado, utilizando glutaraldeído. Os resultados indicaram que nas condições avaliadas (pH 4,5 e 25°C), 52% da enzima foi imobilizada no PHB e que 50% da atividade catalítica foi mantida. Portanto, o suporte orgânico PHB demonstrou excelente para imobilização da  $\beta$ -galactosidase (SOUZA et al., 2014).

Facin et al., (2015) e colaboradores imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase em hidrogéis de quitosana para serem empregados na produção industrial de alimentos de liberação controlada de  $\beta$ -galactosidase para ser usado na dieta de indivíduos intolerantes à lactose. O resultado da imobilização mostrou um rendimento de apenas 19%. Mesmo assim, segundo os autores, esse resultado indica que os hidrogéis preparados com quitosana são uma alternativa para a produção de alimentos de baixo custo com baixa dosagem de lactose. Este estudo mostrou ainda que o grau de intumescimento diminuiu em meio ácido: 49,4 g e 8,4g de água absorvida por g de hidrogel a pH 7,0 e pH 3,5, respectivamente (FACIN et al., 2015).

## 2.5 BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros são polímeros naturais originários de: 1) plantas e algas (amido, celulose, pectina, alginato, carragenana, gomas, soja, glúten de trigo, caseína, sedas e elastina); 2) animais (ácido hialurônico e quitina) e soro de albumina, ou 3) bactérias (quitina, xantano, poligalactosamina, gelano e dextrano). Recentemente, os polímeros naturais têm sido usados como alternativas para a geração de biomateriais utilizados em aplicações biomédicas.



A maior vantagem destes materiais é seu baixo custo devido à elevada disponibilidade da matéria prima além de serem biodegradáveis (MITSUKA, 2007).

As vantagens no uso de biomateriais são conhecidas, porém há várias limitações. Um exemplo é que os biopolímeros não possuem, em alguns casos, propriedades mecânicas adequadas à estabilidade em solução aquosa e em ambientes fisiológicos, necessários para aplicações médicas. A reticulação, denominada como *crosslinking*, é o método muito usado para superar essas limitações. Várias técnicas de reticulação são usadas dependendo do tipo de biopolímero a ser reticulado como: encapsulação em filmes ou membranas, em esponjas, em fibras, em hidrogéis e em nanopartículas (REDDY et al., 2015).

Os biopolímeros têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de hidrogéis para aplicações na área da liberação controlada de fármacos. Hidrogéis com a capacidade de reter grandes quantidades de água são usados para a liberação de fármacos, peptídeos e proteína. Para tal fim, a reticulação deve ser realizada por meio de um hidrogel para evitar a dissolução (REDDY et al., 2015).

A utilização de biopolímeros para a produção de hidrogéis tem sido de grande importância por ser um método simples com capacidade de promover o confinamento de enzimas em baixas temperaturas, permitindo controle da porosidade da matriz e maior estabilidade mecânica (COLLINSON, 2002).

A seguir serão citados os dois biopolímeros naturais usados neste trabalho para a produção do hidrogel: a pectina e a carragenana.

### 2.5.1 Pectina

A pectina é um polissacarídeo natural composto por uma macromolécula ramificada com alta massa molecular que pode ser transformada em géis. As pectinas são muito empregadas na indústria alimentícia, como agente espessante, estabilizante e gelificante. Na indústria farmacêutica este biopolímero pode ser usado como excipiente na obtenção de sistemas de liberação de fármacos na região do cólon (região específica do trato gastrointestinal). A pectina existe em grande proporção na natureza, apesar disso, poucas são as plantas usadas como fonte deste polissacarídeo devido a problemas relacionados ao rendimento, custo e tempo de extração. As substâncias pécticas podem ser extraídas de

tecidos frescos ou secos de frutas ou vegetais através de diversos processos como a extração com água quente, com compostos quelantes e com enzimas. Maracujá, frutas cítricas, toranja e manga são algumas das fontes de pectina com maior rendimento de extração. No entanto, este polissacarídeo tem sido obtido basicamente de resíduos das indústrias que processam sucos e maçãs (MUNARIN et al., 2012).

Uma propriedade importante das pectinas é o fato de não serem degradadas no estômago ou pelas enzimas atuantes no trato gastrointestinal superior. Elas são degradadas apenas no cólon, podendo ser usadas em sistemas de liberação de fármacos designados a atuação específica na parte do sistema gastrointestinal (CHOURASIA; JAIN, 2004).

Apesar da descoberta da pectina ter ocorrido a mais de 200 anos, sua composição e estrutura ainda não estão completamente elucidadas devido à heterogeneidade desta família de polímeros. Quimicamente, a pectina é definida como um polissacarídeo aniônico constituído principalmente por unidades de ácido D-galacturônico unidos por ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), como representado na Figura 4. Os ácidos urônicos possuem grupos carboxila, alguns dos quais estão naturalmente presentes como ésteres metílicos e outros que são comercialmente tratados com amoníaco para produzir grupos carboxamida (CHAN et al., 2017; SRIAMORNSAK, 2003). A estrutura básica da pectina deve possuir pelo menos 17 monossacários diferentes, dos quais o ácido D-galacturônico é o mais abundante (CHAN et al., 2017).

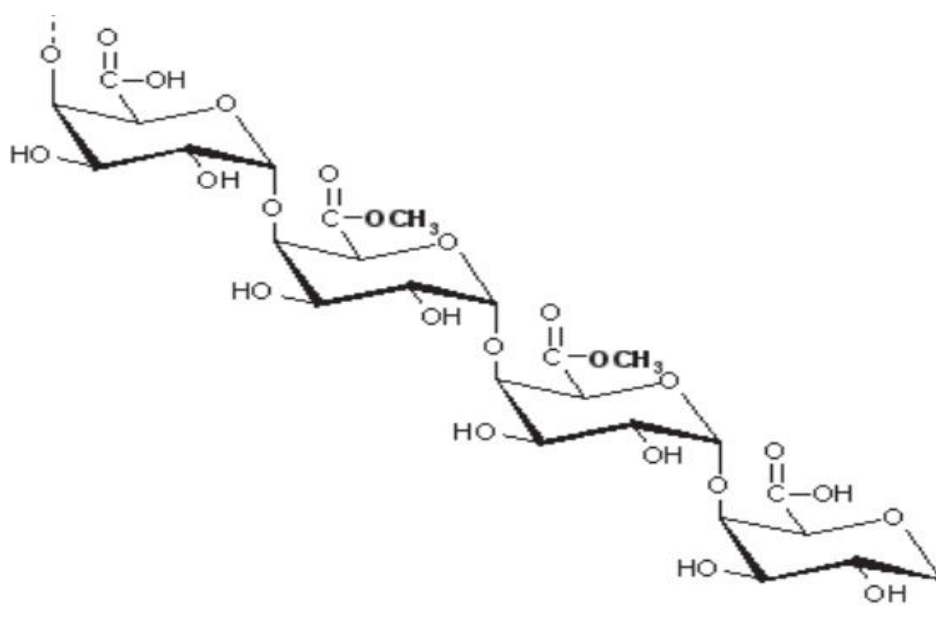


Figura 4 - Pectina com ácido D-galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4).

Fonte: CHAN et al (2017, p.120).

A capacidade de formação de géis de pectina está relacionada à quantidade de grupos polares livres (como as hidroxilas), à estrutura tridimensional, ao pH, aos eletrólitos presentes no meio, à solubilidade e concentração da pectina na dispersão, à massa molar e ao grau de metilação (CANTERI et al., 2012).

A formação de gel empregando pectina pode ocorrer por dois mecanismos diferentes, determinado pelo grau de esterificação da mesma. As pectinas de elevado grau de esterificação gelificam a um pH inferior a 3,5 e na presença de sólidos solúveis (tipicamente açúcares). Por outro lado, pectinas de baixo grau de esterificação (pectinas amidadas ou não) apresentam um mecanismo de gelificação completamente diferente onde o pH deve ser superior a 3,0 com a presença de uma quantidade suficiente de íons metálicos di- ou tri-valentes, sendo o  $\text{Ca}^{2+}$  o mais comumente usado (SRIAMORNSAK, 2003).

O mecanismo de gelificação das pectinas de baixo grau de esterificação (tipo de pectina usada neste trabalho) é explicado pelas interações dos grupos carboxila do esqueleto da pectina com íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , baseia-se principalmente no modelo conhecido como "caixa de ovos" representado na Figura 5 (originalmente definido para explicar o mecanismo de gelificação dos alginatos). Este modelo é caracterizado como zonas de junção formadas por associações ordenadas, lado a lado, por meio das quais sequências específicas de monômero de ácido D-galacturônico em cadeias paralelas ou adjacentes, são ligadas intermolecularmente através de ligação eletrostática e iônica dos grupos carboxila (CHAN et al., 2017; MUNARIN et al., 2012; SRIAMORNSAK, 2003).

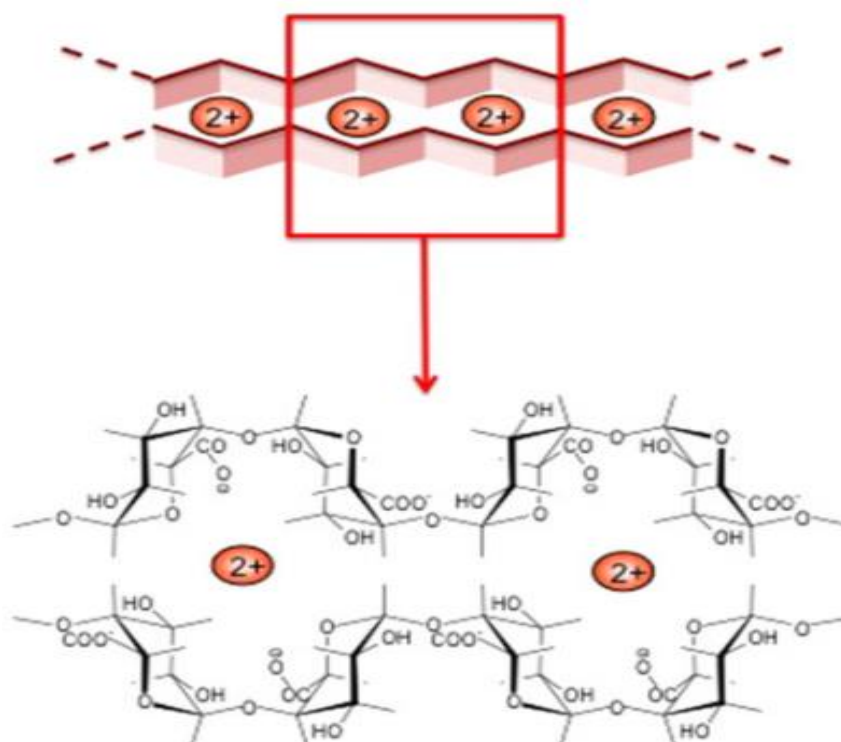


Figura 5 - Representação esquemática do modelo "caixa de ovos".

Fonte: MUNARIN et al (2012, p.684).

### 2.5.2 Carragenana

A carragenana é um nome genérico dado à família de polissacarídeos extraídos de algas vermelhas (*Rodophytas*). Juntamente com outros biopolímeros, as carragenanas são parte de um grupo de substâncias complexas denominadas fitocolóides. Estes polímeros naturais possuem habilidade de formar géis termo reversíveis ou soluções viscosas quando adicionados a soluções salinas e, por isso, são muito usados como agentes gelificantes, estabilizantes e emulsificantes em vários produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (HILLIOU et al., 2006).

A estrutura química da carragenana é baseada em unidades repetidas de D-galactose e resíduos de 3,6-anidro-D-galactose ligados em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) (FRANCIS et al., 2004). Existem vários tipos de carragenanas, sendo as mais comuns a  $\kappa$ -carragenana (kappa),  $\iota$ -carragenana (iota) e  $\lambda$ -carragenana (lambda), que são classificadas de acordo com a presença de ligações

3,6-anidro e com a posição e número de grupos sulfato presentes na estrutura da carragenana (HILLIOU et al., 2006; VAN DE VELDE, 2005). A carragenana do tipo kappa (Figura 6), utilizada neste trabalho, possui apenas um grupo sulfato por unidade de repetição de dissacarídeo, dissolvendo-se em água quente e ao resfriar forma o gel (LIU et al., 2015).

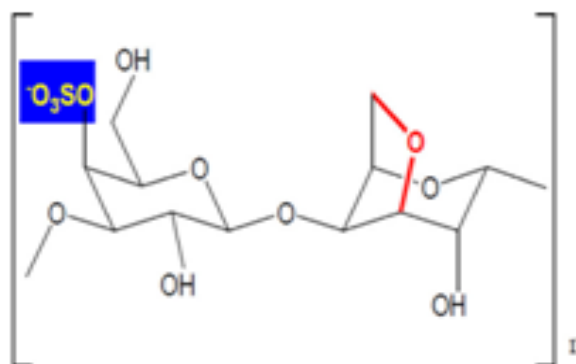


Figura 6 - Estrutura da carragenana tipo Kappa.

Fonte: LIU et al (2015, p.28).

As carragenanas do tipo kappa e iota possuem a importante propriedade de formar géis. Sugere-se que a presença de pontes anidro podem ser um fator chave na gelificação, o arranjo C<sub>4</sub> das unidades 3,6-anidro-D-galactose da carragenana k permite uma estrutura secundária helicoidal que é necessária para formar o gel. A teoria mais aceita é que estas moléculas de carragenana formam géis através de dois passos. Primeiro, ocorre uma transição de bobina a hélice, que é controlada pela temperatura e pela quantidade de cátions tais como K<sup>+</sup> ou Ca<sup>2+</sup>. Em seguida, estas hélices agregam-se em paralelo, como indicado na Figura 7. Os grupos sulfatos ficam localizados no exterior do hélice. As ligações de hidrogênio formadas entre as duas cadeias são responsáveis pela estabilização da hélice. Então, estas carragenanas formam uma rede de hélices duplas tridimensionais. Os géis formados utilizando carragenanas são termicamente reversíveis. Os géis começam a se formar após resfriamento até cerca de 50°C, e passam para o estado líquido quando aquecidos a 80-90°C (LIU et al., 2015).

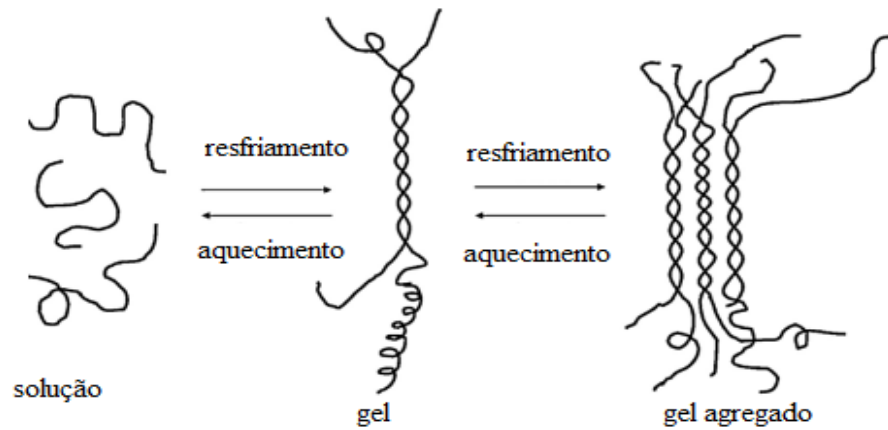


Figura 7 - Ilustração esquemática do possível mecanismo de gelificação da carragenana.

Fonte: LIU et al., (2015, p.28).

Hidrogéis de carragenana tem sido muito empregado na imobilização enzimática por melhorarem o tempo de estocagem e proporcionarem uma maior estabilidade térmica (TUMTURK et al., 2007).

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o preparar diferentes hidrogéis (carragenana, pectina e um híbrido formado pela combinação de pectina e carragenana) contendo a  $\beta$ -galactosidase para liberação controlada desta enzima.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparar diferentes hidrogéis (carragenana, pectina e um híbrido formado pela combinação de pectina e carragenana);
- b) Imobilizar a  $\beta$ -galactosidase nos hidrogéis;
- c) Caracterizar os hidrogéis obtidos por análises termogravimétricas, infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e teste de intumescimento;
- d) Analisar a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase nos hidrogéis imobilizados;
- e) Analisar a liberação da  $\beta$ -galactosidase nos diferentes hidrogéis em diferentes pHs e temperaturas;
- f) Avaliar a estabilidade dos hidrogéis gerados;
- g) Avaliar a liberação controlada da  $\beta$ -galactosidase *in vitro* nos diferentes hidrogéis nos fluidos gástricos e intestinais simulados;
- h) Comparar os resultados obtidos de liberação controlada *in vitro* dos hidrogéis com um produto comercial contendo  $\beta$ -galactosidase.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos marca Marconi®, modelo MA 162, banho de ultrassom marca Quimis®; banho maria marca Nova Técnica®; balança analítica marca Shimadzu®, modelo AY220; pipetadores automáticos marca SelectPette® de volumes injetáveis variados; espectrômetro de infravermelho marca Thermo Scientific®, modelo Nicoletis50 FTIR acoplado a Pike Gladi ATR Technologies; termobalança, microscópio eletrônico de varredura (MEV) TM3000 Hitachi Analytical Table Top (Tarrytown, NY, EUA), marca SII Nano Technology®, modelo TG/DTA7300; calorímetro, marca SII Nano Technology®, modelo DSC7020; pHmetro marca Gehaka®, modelo PG2000; espectrofotômetro UV-Vis marca Shimadzu®, modelo UV1800; shaker com aquecimento, marca Nova tecnica®, modelo NT 232; agitador magnético, marca Nova ética®, modelo 114; vortex, marca Labnet®, modelo S0200; cacinhos de alumínio, cubetas, vidrarias, computador.

### 4.2 REAGENTES

- a) Água deionizada, cloreto de cálcio (QM reagentes), cloreto de potássio (Synth), fosfato de sódio dibásico (Dinâmica Regentes Analíticos), fosfato de potássio monobásico (Dinâmica Regentes Analíticos), hidróxido de sódio (Vetec), ácido clorídrico (Anidrol), ácido acético glacial (Sigma Aldrich), carbonato de sódio anidro (Proquímios), tampão acetato pH com concentração de 3,7 mg/mL, O-nitrofenol-b-D-galactosídeo (ONPG) (Sigma Aldrich), fosfato de sódio monobásico (Dinâmica Regentes Analíticos), fosfato de sódio dibásico (Dinâmica Regentes Analíticos), ácido fosfórico (Vetec).
- b) Pectina de baixo grau de esterificação (grau de esterificação igual a 35%), doada pela PC Kelco, tipo LM -101 AS.
- c) Carragenana do tipo Kappa, produzida pela Gastronomy Lab Modernist Solutions.



- d)  $\beta$ -galactosidase *Aspergillus Oryzae* obtida pela Sigma Aldrich, 13,4 U/mg. A  $\beta$ -galactosidase usada neste trabalho foi proveniente do fungo *Aspergillus oryzae* apresenta 105 kDa sendo estável na faixa de pH entre 4,0 a 9,0 e apresenta atividade ótima em pH 4,5 e temperatura de 50°C (ANSARI; HUSAIN, 2012).
- e) Cápsulas gastroresistentes de hipromelose produzidas pela Fagron.
- f) Comprimido comercial: Lactaid® Fast Act 9000 U.

#### 4.3 PREPARO DOS HIDROGÉIS

A Figura 8 apresenta o esquema geral do preparo dos hidrogéis utilizado neste trabalho. As seções a seguir descrevem o procedimento detalhado para a obtenção dos hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido.



Figura 8 - Esquema geral do preparo dos hidrogéis.  
Fonte: Do autor.

### 4.3.1 Hidrogel de carragenana

O procedimento de obtenção do hidrogel de carragenana foi feito baseando-se no trabalho realizado por Zhang et al., (2016). Com a finalidade de formar um hidrogel que apresentasse como característica ser esférico, rígido, com superfície lisa e homogeneidade entre as esferas foram realizados testes variando as concentrações de carragenana (entre 1,00 e 2,00% m/v) e KCl (entre 1,5 e 6,0% m/v), conforme indicado na Tabela 1. Estas faixas foram escolhidas a fim expandir as variações das concentrações do polímero e do sal, baseando-se nas concentrações apresentadas no trabalho de Zhang.

Tabela 1 - Concentrações empregadas de biopolímero e sal para obtenção do hidrogel de carragenana.

<b>Carragenana, % (m/v)</b>	1,00	1,00	1,50	1,75	1,75	1,75*	2,00
<b>KCl, % (m/v)</b>	5,0	1,5	5,0	4,0	5,0	6,0*	5,0

Fonte: Do autor.

\* concentrações usadas para o preparo do hidrogel descrito

Para a obtenção do hidrogel de carragenana contendo a enzima  $\beta$ -galactosidase, inicialmente, preparou-se 75 mL de uma solução de  $\beta$ -galactosidase em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0.

Todo o processo descrito a seguir foi realizado em triplica a fim de verificar a reprodutibilidade do processo de produção do hidrogel.

Foram preparados 20 mL de uma solução de carragenana 3,50% (m/v) em água destilada. Para isso, esta solução foi incubada em banho de glicerina a 60°C sob agitação durante 30 minutos para a completa solubilização do polímero, sendo posteriormente resfriada a 37°C. Em seguida, retirou-se uma porção de 20 mL da solução de  $\beta$ -galactosidase descrita anteriormente que possuía 2.000 U. As soluções de carragenana e  $\beta$ -galactosidase (preparada anteriormente) foram misturadas na proporção 1:1 v/v e a solução resultante, contendo 1,75% de carragenana (m/v), foi mantida sob agitação magnética até completa homogeneização. A solução obtida (40 mL) foi vertida em uma seringa, sendo manualmente gotejada, em 40 mL de solução de KCl 6,0% (m/v), denominada reticulante, também sob agitação magnética. Este procedimento permitiu a formação de esferas que permaneceram sob agitação a 25°C na solução salina por 60 minutos adicionais a fim de completar a reação de reticulação. Posteriormente, estas esferas foram drenadas por meio de um funil de buchner sob vácuo e

lavadas primeiramente com tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0 e, em seguida, com água destilada para promover a eliminação do excesso de  $K^+$ . Por fim, as esferas foram secas a 4°C em geladeira onde permaneceram até a obtenção de massa constante.

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção do hidrogel controle (sem adição de enzima). Neste caso a solução enzimática foi substituída por 20 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0.

Durante o preparo do hidrogel com a enzima foram coletadas alíquotas de 2 mL da solução enzimática e 2 mL do sobrenadante obtido após as esferas serem drenadas. Também foram coletadas alíquotas do hidrogel controle de 2 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7 e 2 mL do sobrenadante obtido após a formação do hidrogel sem enzima. Estas alíquotas foram usadas para análise do teste de atividade com o objetivo de avaliar a eficiência de encapsulação do hidrogel produzido.

#### 4.3.2 Hidrogel de pectina

Para a obtenção do hidrogel de pectina também se baseou no procedimento descrito no trabalho de Zhang et al., (2016), porém para reticular a pectina necessita-se de íons divalentes, como por exemplo  $Ca^{2+}$ , por isso o  $CaCl_2$  foi utilizado no preparo da solução salina (SRIAMORNSAK, 2003). Como descrito da Tabela 2 diferentes concentrações de pectina (entre 1,0 e 4,0% m/v) e  $CaCl_2$  (entre 0,50 e 0,75% m/v), foram testadas para obtenção de um hidrogel mais rígido, esférico, homogêneo e que apresentasse superfície lisa, as diferentes proporções foram escolhidas a fim de expandir as variações das concentrações do polímero e do sal.

Tabela 2 - Concentrações usadas de biopolímero e sal para obtenção do hidrogel de pectina.

<b>Pectina, % (m/v)</b>	1,5	3,0*	3,0	4,0
<b>CaCl<sub>2</sub>, % (m/v)</b>	0,50	0,50*	0,75	0,75

Fonte: Do autor.

\* concentrações usadas para o preparo do hidrogel descrito

Primeiramente foi preparado, em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0, 75 mL de uma solução de  $\beta$ -galactosidase. Esta solução foi utilizada no preparo da triplicata de hidrogéis de pectina.

Para o hidrogel, uma solução de pectina 6,0% (m/v) foi preparada e incubada em banho de glicerina, a 60°C sob agitação magnética durante 30 minutos para a completa solubilização do polímero e, posteriormente, resfriada a 37°C. Retirou-se 20 mL da solução de  $\beta$ -galactosidase preparada anteriormente que equivale a 2.000 U. As soluções de pectina e  $\beta$ -galactosidase foram misturadas (1:1, v/v) para formar uma solução contendo 3,0% de pectina (m/v). Em seguida, esta solução foi transferida para uma seringa e gotejada em 40 mL de uma solução aquosa de  $\text{CaCl}_2$  0,50% (m/v) sob agitação magnética. O processo de drenagem e limpeza das esferas do hidrogel de pectina foi o mesmo descrito para o hidrogel de carragenana. A fim de verificar a reprodutibilidade do hidrogel este procedimento também foi feito em triplicata.

Igualmente ao hidrogel de carragenana, também foram preparados hidrogéis de pectina controle, sem adição de  $\beta$ -galactosidase.

Durante o preparo do hidrogel de pectina também foram coletadas alíquotas usadas para análise do teste de atividade com o objetivo de avaliar a eficiência de encapsulação do hidrogel produzido.

#### 4.3.3 Hidrogel de pectina/carragenana

Com a finalidade de agregar as propriedades dos dois biopolímeros simultaneamente, foi feito o preparo do hidrogel híbrido contendo pectina/carragenana. Para isso, o procedimento adotado foi baseado num trabalho que descreve o preparo de hidrogel híbrido composto por alginato e carragenana na proporção 8:1 (m/m) e mistura dos sais  $\text{CaCl}_2$  e KCl na proporção 1:2 (m/m) para encapsulação de  $\beta$ -galactosidase (MAMMARELLA et al., 2005). No entanto, neste trabalho o alginato foi substituído por pectina, uma vez que ambos apresentam características físico-químicas semelhantes e utilizam o mesmo agente reticulante ( $\text{CaCl}_2$ ). Foram testadas diferentes proporções de pectina/carragenana 10:1, 8:1, 4:1 e 2:1 (m/m) como indicado na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações empregadas de biopolímeros e sal para obtenção do hidrogel de pectina/carragenana.

<b>Pectina, % (m/v)</b>	3,0	3,0*	3,0	3,0
<b>Carragenana, % (m/v)</b>	0,38	0,75*	1,50	0,30
<b>CaCl<sub>2</sub>, % (m/v)</b>	1,0	1,0*	1,0	1,0
<b>KCl, % (m/v)</b>	2,0	2,0*	2,0	2,0

Fonte: Do autor.

\* concentrações usadas para o preparo do hidrogel descrito

Uma solução polimérica de 20 mL foi preparada a partir de 10 mL de uma solução de pectina 6,0% (m/v) e 10 mL de carragenana 1,50% (m/v) incubada em banho de glicerina, a 60°C sob agitação magnética durante 30 minutos para a completa homogeneização, sendo posteriormente resfriada a 37°C. A esta solução foi acrescentado 20 mL da solução com 2.000 U de  $\beta$ -galactosidase preparada anteriormente. Realizou-se nova homogeneização da solução resultante que foi transferida para uma seringa.

Paralelamente foram preparados 40 mL de uma solução salina contendo simultaneamente CaCl<sub>2</sub> 1,0% (m/v) e KCl 2,0% (m/v). A solução polimérica contendo a enzima foi gotejada na solução salina e as esferas obtidas permaneceram sob agitação na solução salina por 60 minutos adicionais, à temperatura ambiente a fim de completar a reação de reticulação. O procedimento de drenagem e limpeza das esferas do hidrogel híbrido foi o mesmo já descrito para o hidrogel de carragenana.

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção de esferas sem enzima, utilizadas como controle. Neste processo a solução enzimática descrita anteriormente foi substituída por 20 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0.

Durante o preparo do hidrogel também foram coletadas alíquotas usadas para determinação da atividade hidrolítica com o objetivo de avaliar a eficiência de encapsulação.

#### 4.4 ATIVIDADE CATALÍTICA DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

O teste de atividade é realizado a partir da reação de hidrólise da enzima  $\beta$ -galactosidase com o substrato orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo (ONPG). Esta reação (Figura 9) é um teste colorimétrico onde o ONPG (líquido incolor) depois de hidrolisado forma

galactose (incolor) e ortonitrofenol (O-NP) de coloração amarela, que absorve fortemente a luz no comprimento de onda de 420 nm (NICHELE et al., 2011).

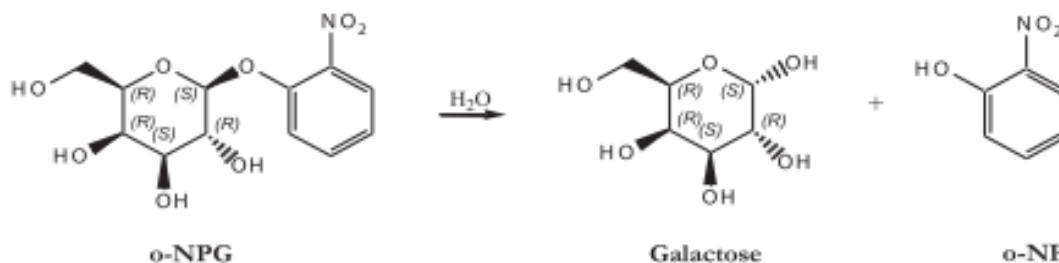


Figura 9 - Reação de hidrólise do ONPG em galactose e O-NP.

Fonte: NICHELE et al (2011, p.11).

Para a avaliação da atividade enzimática durante o preparo dos hidrogéis (eficiência de encapsulação), nos testes em diferentes pHs e temperatura (estudo da estabilidade dos hidrogéis) e no teste de dissolução (estudo de liberação controlada *in vitro*) foi empregado o método descrito na USP Pharmacopoeia. Baseado neste método, foi construída uma curva analítica com diferentes concentrações de  $\beta$ -galactosidase (faixa de 50 a 500 U/L) a partir de uma solução estoque de 500 U/L preparada em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0. Para a construção da curva analítica foi considerado a concentração da amostra (eixo x) e a resposta do sistema – absorvância (eixo y), onde x corresponde à concentração de  $\beta$ -galactosidase e y corresponde a absorvância, obtido nas seguintes concentrações: 50; 100; 200; 300; 400 e 500 U/L. Cada concentração foi analisada em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol de ONPG por minuto, nas condições experimentais do ensaio.

O método consiste em transferir para tubos de ensaio 2.000  $\mu$ L da solução de substrato (ONPG) 3,7 mg/mL preparada com tampão acetato pH 4,5 que foram incubados durante 10 minutos em um banho de água mantido a  $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Após este tempo, adicionou-se em cada tubo um total de 500  $\mu$ L da solução estoque de  $\beta$ -galactosidase e/ou tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0 conforme indicado na Tabela 4. Cada tubo foi agitado em vortex por 10 segundos e incubado por mais 15 minutos no banho de água a  $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Após este período, adicionou-se 2.500  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio a 10% (m/v) a cada tubo de ensaio para cessar a reação enzimática. O conteúdo de cada tubo foi transferido para um béquer onde foram

acrescentados 20,0 mL de água destilada. O conteúdo depois de diluído foi analisado em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm.

Para análise das alíquotas coletadas repetiu-se o tratamento descrito acima substituindo os 500 µL da solução estoque de β-galactosidase e/ou tampão Tris/HCl por 500 µL de cada amostra apropriadamente diluída. Tanto nas alíquotas coletadas, quanto a curva analítica foram realizadas análises em triplicata.

Tabela 4 - Soluções de β-galactosidase utilizadas para construção da curva analítica (n=3)

<b>Tubo</b>	<b>Volume da solução de β-galactosidase 500 U/L (µL)</b>	<b>Volume de tampão (µL)</b>	<b>Atividade de β-galactosidase (U/L)</b>
<b>0</b>	0	500	0
<b>1</b>	50	450	50
<b>2</b>	100	400	100
<b>3</b>	200	300	200
<b>4</b>	300	200	300
<b>5</b>	400	100	400
<b>6</b>	500	0	500

Fonte: Do autor

#### 4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Como já descrito anteriormente durante o preparo dos hidrogéis foram recolhidas alíquotas: na solução enzimática (considerada 100% de β-galactosidase utilizada no sistema) e no sobrenadante após o hidrogel ser recolhido por filtração para monitorar a eficiência de encapsulação. O fator de diluição para a amostra de solução enzimática foi de 500 vezes. Já para as amostras do sobrenadante do hidrogel com enzima o fator de diluição foi de 100 vezes. A atividade de β-galactosidase nas alíquotas foi determinada pelo método descrito na secção 4.4. A eficiência de encapsulação de β-galactosidase nos hidrogéis foi determinada de acordo com a diferença entre a atividade de β-galactosidase presente na solução enzimática e a atividade no sobrenadante. O rendimento de encapsulação foi calculado da seguinte forma:

$$EE (\%) = \left( \frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \times 100$$

EE = eficiência de encapsulação (%),  $A_i$ = atividade de β-galactosidase (U) disponível no sistema e  $A_f$ = atividade de β-galactosidase (U) recuperada no sobrenadante.

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido contendo a  $\beta$ -galactosidase encapsulada foram caracterizados de acordo com as técnicas a seguir.

### 4.6.1 Análises térmicas

A análise térmica utilizada para caracterizar os três hidrogéis foi à termogravimétrica e baseou-se nos estudos de Pascalão et al., (2012). As curvas termogravimétricas foram obtidas, em triplicata, utilizando-se o equipamento de termobalança TG/DTA, (DTA, do inglês *Differential Thermal Analysis*). Para isso, 3 a 5 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio e submetidas a um aquecimento controlado de 30°C até 500°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 60 mL/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de índio.

### 4.6.2 Infravermelho

Com base nos estudos também realizados por Pascalão et al., (2012), os espectros FTIR dos hidrogéis foram obtidos por meio de equipamento de espectroscopia no infravermelho de transformação de Fourier (FTIR) (Thermo Scientific, USA, modelo iS50 FTIR). As amostras de hidrogéis foram avaliadas na região de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com a resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 64 varreduras utilizando o acessório de ATR GladiATR diamante (Pike Technologies, USA).

### 4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)



As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em triplicata, foram obtidas usando um microscópio TM3000 Hitachi Analytical Table Top (Tarrytown, NY, EUA) com uma aceleração de tensão a 15 kV. As amostras foram colocadas em fita adesiva de carbono duplo sem qualquer pré-tratamento para obter as micrografias.

#### 4.6.4 Intumescimento

Os ensaios de intumescimento foram realizados de acordo com Pascalău et al., (2012), em triplicata. Primeiramente, 50 mg dos hidrogéis com enzima secos até massa constante foram pesados em uma balança analítica e posteriormente colocados em erlenmeyer para intumescer com 20 mL nos seguintes meios: 1) gástrico simulado: solução de HCl 1 M pH 1,2; 2) em meio intestinal simulado: tampão fosfato 100 mM pH 7,0 e 3) água destilada. Para este ensaio, os erlenmeyers foram submetidos a agitação de 100 rpm por meio de shaker rotativo a 37°C durante 2 horas. Após este período, os meios foram escoados e o excesso de solução retirado da superfície das esferas dos hidrogéis cuidadosamente, empregando papel de filtro. Em seguida, os hidrogéis intumescidos foram novamente pesados.

Os cálculos do grau de intumescimento ( $S_w$ , do inglês *Swelling degree*) foram feitos seguindo a equação abaixo, onde  $W_t$  é a massa (g) do hidrogel intumescido e  $W_0$  a massa do hidrogel (g) seco, conforme proposto por Gupta et al.,2006.

$$S_w = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

#### 4.7 EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA

Em aplicações comerciais contendo enzimas alterações no pH ou na temperatura durante o armazenamento ou durante a passagem pelo trato gastrointestinal pode alterar a estrutura ou o estado de agregação destas enzimas, alterando assim sua atividade catalítica

(ZHANG et al., 2016). Por esta razão, foi avaliada a influência do pH e da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase.

O efeito do pH na atividade enzimática foi estabelecido incubando 20 mg de cada hidrogel em 10 mL de solução de pH 1,0-7,0 durante 30 minutos a 37°C, em shaker rotativo; soluções de HCl (0,1 M) foram usadas para medições realizadas em pH 1,0 e 2,0 e soluções Tris/HCl (50 mM), corrigidas com NaOH (0,1 M), foram utilizadas para medições entre pH 3,0 a 7,0.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado pela incubação 20 mg de cada hidrogel em 10 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0 a 25-60°C durante 30 min, também em shaker rotativo. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi então avaliada usando os procedimentos descritos na seção 4.4. O mesmo procedimento foi feito utilizando 8,7 U de padrão de  $\beta$ -galactosidase (enzima livre) para fins comparativos. Este procedimento foi realizado com os hidrogéis secos recém preparados e também com os hidrogéis secos após três meses armazenados em geladeira a 4°C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.8 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE *IN VITRO*

Os hidrogéis controle e contendo  $\beta$ -galactosidase (60 mg) foram colocados em cápsulas gastroresistentes de hipromelose da marca Fagron. O efeito das condições simuladas do trato gastrointestinal dos hidrogéis foi feito utilizando 30 mL de fluido gástrico simulado (FGS), HCl 0,1 M pH 1,2 por duas horas. Após este período o meio foi trocado por fluido intestinal simulado (FIS), tampão de fosfato 100 mM pH 6,8 onde as cápsulas permaneceram por mais uma hora. O sistema permaneceu sob agitação a 100 rpm a 37°C por meio de um shaker rotativo. Em intervalos de tempo especificados (30, 60, 90, 120, 135, 150, 165 e 180 min), uma alíquota de 500  $\mu$ L foi recolhida e o meio correspondente foi repostado para manter o volume inalterado. A atividade de  $\beta$ -galactosidase nas alíquotas foi determinada pelo método descrito na seção 4.4. O mesmo procedimento foi feito utilizando 3,17 mg do comprimido comercial contendo a  $\beta$ -galactosidase para fins comparativos. Essa massa continha cerca de 26,1 U da enzima. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados (expressos como média  $\pm$  padrão desvio,  $n=3$ ) foi feita aplicando ANOVA e considerando *teste t de student* com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas seções a seguir são apresentados o preparo dos hidrogéis, os resultados das análises realizadas e a discussão dos mesmos.

### 5.1 PREPARO DOS HIDROGÉIS

A seguir será retratado como foi o processo de obtenção dos hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido.

#### 5.1.1 Hidrogel de carragenana

Primeiramente foram preparados dois hidrogéis com concentração final de carragenana de 1,0% (m/v) e solução salina de 1,5 e 5% (m/v) de KCl. Estes hidrogéis não possuíam aparência esférica, mas sim formato de discos e não possuíam resistência ao manuseio, desmanchando-se facilmente. Então foi aumentada a concentração da solução de carragenana para 1,5% (m/v), a fim de aumentar a reticulação, e mantida a solução de KCl de 5% (m/v). O hidrogel gerado com esta nova concentração tinha a aparência esférica, porém possuía a superfície rugosa. Utilizando uma solução de carragenana de 1,75% (m/v) foram preparados três hidrogéis com solução de KCl de 4,0, 5,0 e 6,0% (m/v), respectivamente. Neste caso, foi possível notar que à medida que a concentração do sal aumentava, formavam-se hidrogéis esféricos, mais rígidos, com superfície mais lisa e esferas homogêneas entre si. Testou-se ainda o preparo de um hidrogel com solução de carragenana 2% (m/v) e solução de KCl 4% (m/v), porém não foi possível a formação de hidrogel, uma vez que a solução de carragenana ficou muito viscosa, gelificando dentro da seringa. Deste modo, verificou-se que a concentração máxima de solução de carragenana deveria ser de 1,75% (m/v).

Os hidrogéis gerados a partir de solução de KCl de 4,0 e 6,0% (m/v) e solução de carragenana de 1,75% (m/v) foram avaliados preliminarmente por meio de testes

espectrofotométricos (realizados conforme indicado na secção 3.4). Foi constatado que o hidrogel formado com 6,0% (m/v) de KCl apresentou melhor rendimento quanto a quantidade de hidrogel produzido 0,66 U/mg valor este 1,5 vezes maior que o encontrado no hidrogel formado com 4,0% (m/v) de KCl. Por esses motivos, esta composição foi a selecionada para a produção do hidrogel de carragenana, sendo a usada para o preparo das triplicatas.

As esferas formadas a partir do hidrogel de carragenana foram medidas em microscópio óptico apresentam diâmetro de aproximadamente 3,5 mm, apresentam-se transparentes, possuem superfície lisa e homogeneidade entre si, porém são frágeis, clivando-se facilmente.

Nguyen et al., (2014) apresentaram um estudo do efeito de diferentes concentrações dos íons de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  na gelificação da k-carragenana e relataram que com o aumento da concentração de KCl, a rigidez do gel aumenta e este permanece transparente, enquanto que com o aumento da concentração do  $CaCl_2$ , a rigidez do gel diminui o que o torna cada vez mais turvo, essa diferença no processo de gelificação se deve ao fato que com maiores concentrações de  $Ca^{2+}$ , as hélices se acumulam em cadeias mais espessas formando géis mais heterogêneos (NGUYEN et al., 2014).

### 5.1.2 Hidrogel de pectina

Primeiramente, foi testado um hidrogel com concentração final de pectina 1,5% (m/v) e solução salina com 0,5% (m/v) de  $CaCl_2$ . Entretanto, quando esta solução polimérica foi gotejada à solução salina formava-se um gel que depositava no fundo da solução salina, não sendo possível a formação de esferas. Para tentar contornar este problema, aumentou-se a concentração de pectina para 3,0% (m/v) e foram preparados dois hidrogéis com soluções de  $CaCl_2$  de 0,50 e 0,75% (m/v), respectivamente. Este procedimento permitiu a formação de esferas mais rígidas, com superfícies lisas e mais homogêneas entre si. O aumento da concentração de biopolímero promoveu maior interação entre as biomoléculas o que proporcionou um aumento no grau de reticulação. Comparando os hidrogéis com 3,0% (m/v) de pectina e 0,50 e 0,75% (m/v) de solução salina, por meio de da determinação da atividade enzimática, foi possível observar que o hidrogel formado com 0,50% (m/v) de  $CaCl_2$  apresentou melhor resultado, obtendo eficiência de encapsulação de 74,5% , enquanto o hidrogel formado com 0,75% (m/v) de  $CaCl_2$  a eficiência de encapsulação foi de 69,3%. Esse

fato pode estar relacionado à diminuição da difusão do substrato com o aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$ , uma vez que o aumento da concentração deste sal gera uma rede polimérica com poros menores tornando mais difícil a passagem do substrato. Outra hipótese pode estar relacionada ao efeito “salting out”, que é a precipitação de proteína em solução por altas concentrações de sais. Os sais atraem as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas protéicas o que acarreta na diminuição da solubilidade e precipitação das mesmas, deste modo uma maior quantidade de  $\beta$ -galactosidase estaria disponível no sobrenadante do hidrogel formado com 0,75% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$ , diminuindo assim a eficiência de encapsulação.

O hidrogel com 0,50% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  apresentou ainda um rendimento 2 vezes maior que o hidrogel com 0,75% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$ , quanto quantidade de hidrogel produzido depois de seco em geladeira (cerca de 1,25 U/mg). Por essas razões esta composição foi escolhida para realizar o preparo das triplicatas.

O hidrogel de pectina descrito acima gerou esferas turvas e de superfície lisa. O diâmetro das esferas medido no microscópio óptico era de aproximadamente 2 mm, esferas 1,7 vezes menor que as esferas do hidrogel de carragenana, porém ela apresentavam maior resistência mecânica ao manuseio.

Também foi feita uma tentativa de formar o hidrogel com solução de pectina 4,0% (m/v) e solução de  $\text{CaCl}_2$  0,75% (m/v), porém a solução de pectina ficou muito viscosa, dificultando a formação de esferas quando gotejada na solução salina.

### 5.1.3 Hidrogel de pectina/carragenana

Baseado no trabalho de Mammarella et al., (2005) preparou-se um hidrogel híbrido de pectina/carragenana na proporção de 8:1 (m/m), em que as concentrações de pectina e carragenana foram de 3% (m/v) e 0,375% (m/v), respectivamente. Neste caso, foi usado como aglutinante uma solução salina que possuía 1% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  e 2% (m/v) de KCl. Por meio de testes espectrofotométricos preliminares este hidrogel apresentou uma porcentagem de encapsulação de  $\beta$ -galactosidase de aproximadamente 52%. Foram ainda testadas outras proporções de pectina/carragenana como: 4:1, 2:1, 10:1 (m/m). Empregando-se a proporção 2:1 (m/m) não foi possível a formação das esferas de hidrogel, uma vez que a solução contendo os polímeros se apresentou muito viscosa. Já as proporções 4:1 e 10:1 (m/m)

apresentaram capacidade de encapsulação de aproximadamente 76 e 75%; respectivamente. Por esse motivo o hidrogel híbrido formado por pectina/carragenana na proporção 4:1 foi escolhido como sendo o adequado para o preparado das triplicatas.

A Figura 10 retrata as esferas formadas pelos hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido. As esferas de hidrogel híbrido apresentaram homogeneidade entre si, resistência ao manuseio e superfície lisa. Ao analisar as esferas no microscópio óptico foi constatado que o diâmetro era de aproximadamente 5 mm, indicando que as esferas formadas no hidrogel híbrido foram 1,5 e 2,5 vezes maiores que as formadas no hidrogel de carragenana e pectina, respectivamente.

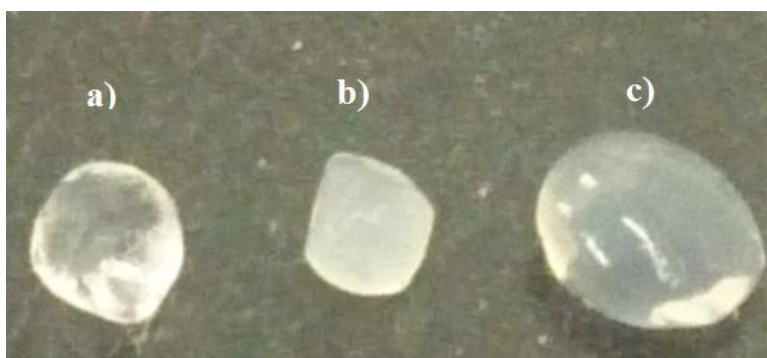


Figura 10 - Fotografia dos hidrogéis.

Lenda: a) Carragenana, b) Pectina e c) Híbrido.

Fonte: do autor

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENCAPSULAÇÃO DOS HIDROGÉIS

A Figura 11 apresenta a curva analítica obtida para calcular a atividade da  $\beta$ -galactosidase, a partir da hidrólise do nitrofenol- $\beta$ -D-galactosídeo (ONPG). A partir do coeficiente angular da curva (0,0015) e do desvio padrão (calculado baseado na média de absorvância do branco) (0,00015U/L), calculou-se os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ): 0,33 e 1,00 U/L, respectivamente.

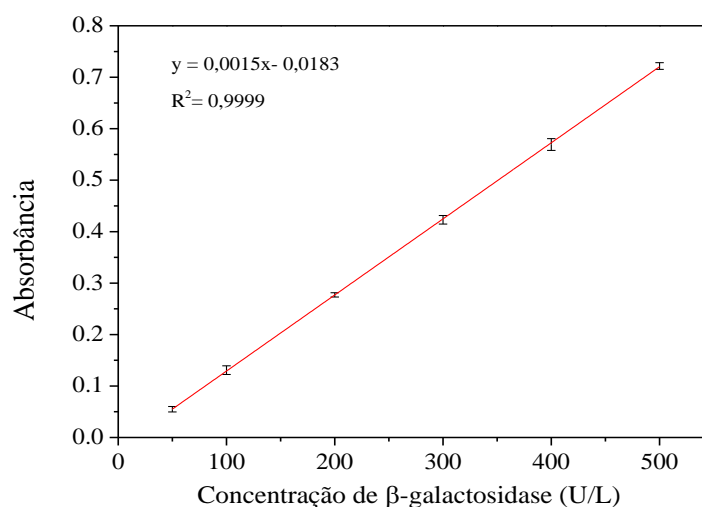


Figura 11 - Curva analítica para avaliar a atividade da β-galactosidase.

Fonte: Do autor

### 5.2.1 Hidrogel de carragenana

Considerando o volume da solução polimérica acrescida da solução enzimática utilizado no preparo do hidrogel, o volume da solução salina após a drenagem do hidrogel formado (41,0, 41,0 e 41,5 mL de sobrenadante das triplicatas dos hidrogéis de carragenana denominados CAR.1, CAR.2 e CAR.3) e a partir dos valores provenientes das absorbâncias das amostras, foi calculado as atividades iniciais e finais do processo de encapsulação. Estes valores estão indicados na Tabela 5, aonde também foi realizado o balanço de massa a fim de representar a quantidade de unidade enzimática (U) disponível no sistema e teoricamente encapsulado no hidrogel formado.

Foram disponibilizados para o processo de encapsulação  $2.272 \pm 14$  U de β-galactosidase, e ao final do processo foram encontrados  $975 \pm 16$ ,  $956 \pm 16$ ,  $930 \pm 19$  U referentes aos hidrogéis de CAR1, CAR 2 e CAR3, respectivamente. Este resultado indica que houve encapsulação de  $57,1 \pm 0,8\%$ ;  $58,0 \pm 0,8\%$  e  $59,0 \pm 0,8\%$  para CAR1; CAR2 e CAR3, respectivamente. Após o processo de secagem a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , os hidrogéis CAR1, CAR2 e CAR3 foram pesados e apresentaram massa igual a 1,24; 1,23 e 1,16 g, respectivamente. Considerando estas massas foi calculada a quantidade de unidade enzimática por miligrama de hidrogel seco e os resultados obtidos foram de 1,046; 1,074 e 1,152 U/mg.



Tabela 5- Dados obtidos no preparo do hidrogel de carragenana (n=3).

		Atividade de $\beta$ -galactosidase (U/L)	Atividade média de $\beta$ -galactosidase (U/L)	Balanco de massa (U)	EE (%)
<b>Sol. enzimática + sol. polimérica</b>		56.650			
		57.184	56.784 $\pm$ 353	2.272 $\pm$ 14	
		56.519			
<b>CAR1</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima (final)	23.767	23.767 $\pm$ 400	975 $\pm$ 16	57,1 $\pm$ 0,8
		24.167			
		23.367			
<b>CAR2</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima	23.240	23.316 $\pm$ 373	956 $\pm$ 16	58,0 $\pm$ 0,8
		22.987			
		23.720			
<b>CAR3</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima (final)	22.227	22.412 $\pm$ 459	930 $\pm$ 19	59,0 $\pm$ 0,8
		22.074			
		22.934			

Fonte: Do autor

Zhang et al., (2016) investigaram o potencial das esferas de hidrogel de carragenana na encapsulação de  $\beta$ -galactosidase, onde foi observado que cerca de 63% da enzima inicial foi imobilizada nas esferas do hidrogel, dado que é semelhante ao encontrado neste trabalho. Ressalta-se que no trabalho de Zhang et al., (2016) foram adotados composição de tampão e porcentagem de biopolímero e solução salina diferentes. Os autores relataram ainda que íons de  $K^+$  favorecem a atividade da enzima.

### 5.2.2 Hidrogel de pectina

Após a drenagem dos hidrogéis foram obtidos 43,0, 42,0 e 42,0 mL de sobrenadante, denominados PEC 1, PEC 2 e PEC 3 respectivamente. Estes volumes foram utilizados para definir a atividade da enzima que não foi encapsulada durante o processo de geração dos hidrogéis.

Os resultados de atividade obtidos a partir das alíquotas do hidrogel de pectina (Tabela 6) foram analisados e processados do mesmo modo que no hidrogel de carragenana.

Analisando a tabela 6, pode-se constatar que foram disponibilizados para o processo de encapsulação  $2.411 \pm 144$  U. Restaram no sobrenadante da produção do hidrogel PEC1  $632 \pm 6$  U, sendo imobilizados  $73,8 \pm 0,4\%$ . No hidrogel PEC2 foram imobilizados  $72,2 \pm 0,4\%$  e no hidrogel PEC3  $72,0 \pm 0,8\%$  de  $\beta$ -galactosidase. Após o processo de secagem os hidrogéis PEC1, 2 e 3 foram pesados e apresentaram massa de 1,04; 1,08 e 1,08g, respectivamente. A quantidade de unidade enzimática por miligrama de hidrogel seco encontrada foi de 1,72; 1,61 e 1,60 U/mg. Estes resultados mostram que o hidrogel de pectina apresenta uma maior capacidade de encapsulação de que os reportados nos hidrogéis de carragenana (cerca de 1,5 vezes superior).

Tabela 6- Dados obtidos no preparo do hidrogel de pectina (n=3).

		Atividade de $\beta$ -galactosidase (U/L)	Atividade média de $\beta$ -galactosidase (U/L)	Balanco de massa (U)	EE (%)
	<b>Sol. enzimática + sol. polimérica (inicial)</b>	58.467 62.050 60.267	$60.261 \pm 1.792$	$2.411 \pm 72$	
<b>PEC1</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima (final)	14.767 14.540 14.754	$14.687 \pm 128$	$632 \pm 6$	$73,8 \pm 0,4$
<b>PEC2</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima (final)	15.673 16.020 16.167	$15.953 \pm 254$	$670 \pm 11$	$72,2 \pm 0,4$
<b>PEC3</b>	Sol. Sal. do Hidrogel com enzima (final)	15.840 16.547 15.887	$16.092 \pm 396$	$676 \pm 17$	$72,0 \pm 0,8$

Fonte: Do autor

Wahba (2016), em seu trabalho realizou imobilização de  $\beta$ -galactosidase por ligação covalente usando pectina previamente tratada com glutaraldeído e polietilenoimina. Este estudo apresentou uma eficiência de encapsulação de 79,3% e um rendimento de  $6,29 \pm 0,22$  U/g de  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Vale ressaltar que o método de imobilização de Wahba é diferente do método utilizado neste trabalho, a imobilização covalente é obtida por ligações químicas, enquanto a encapsulação é um método obtido por retenção física.

Sriamomsak et al., (1998), imobilizou albumina de soro bovino em hidrogel de pectina. Para o preparo dos hidrogéis foram usados diferentes tipos de pectinas comerciais (PG36, PG28, combinações PG36+PS28, PG28+PS28 e PG28+PGA). A uma solução de

pectina 5% (m/v) adicionou-se, sob agitação, uma solução de albumina de soro bovino. A solução resultante foi então gotejada numa solução a 5% (m/v) de cloreto de cálcio com agitação suave à temperatura ambiente. As esferas formadas foram deixadas em repouso na solução durante 20 min, filtradas e lavadas com água destilada. Os hidrogéis formados com diferentes combinações de pectina apresentaram eficiência de encapsulação de 27,4 a 52,3% preparados com as combinações de pectinas PG36+PS28 e PG28+PS28, respectivamente. Esse resultado foi inferior ao observado neste trabalho.

Jung et al., (2013), estudaram a capacidade de diferentes pectinas comerciais (CP28, CP55 e MP38) com baixo grau de esterificação, para encapsular a indometacina em esferas de hidrogel. A solução indometacina 0,5 ou 1,0% (m/v) foi adicionada à solução de pectina. A solução resultante foi gotejada por meio de bomba peristáltica em solução de  $\text{CaCl}_2$  (100, 200 ou 300 mM). A eficiência de encapsulação variou entre 26% e 81%, sendo que as esferas de CP28 com 1,0% (m/v) de indometacina mostraram a menor eficiência de encapsulação como 26%, enquanto o hidrogel MP38 com indometacina 0,5% (m/v) apresentou a eficiência de encapsulação mais alta em 81%. Os autores relataram ainda que existe maior eficiência de encapsulação em esferas preparadas com concentração mais elevada de  $\text{CaCl}_2$  (300 mM) e a uma proporção mais baixa de indometacina 0,5% (m/v) para todas as pectinas.

### 5.2.3 Hidrogel de pectina/carragenana

Após a drenagem dos hidrogéis híbridos foram obtidos 43,0 46,0 e 43,0 mL de sobrenadante, denominados PEC/CAR 1, PEC/CAR 2 e PEC/CAR 3, respectivamente.

Conforme a Tabela 7, os hidrogéis híbridos PEC/CAR1, 2 e 3 apresentaram uma porcentagem de encapsulação de aproximadamente de  $78,1 \pm 0,2$ ,  $75,1 \pm 0,4$  e  $78,1 \pm 0,4\%$  de  $\beta$ -galactosidase, respectivamente. Entre os três hidrogéis preparados este foi o que apresentou melhor porcentagem de encapsulação. Foi realizada uma segunda triplicata do hidrogel híbrido que apresentou uma média de porcentagem de encapsulação de  $78 \pm 0,6\%$ ; confirmando a reprodutibilidade do processo. Por outro lado, resultados demonstram que após o processo de secagem os hidrogéis PEC/CAR1, 2 e 3 apresentaram massa igual a 1,87; 1,87 e 1,94 g, respectivamente, o que corresponde a 0,98; 0,94 e 0,95 U/mg. O rendimento de hidrogel seco foi inferior ao descrito no hidrogel de pectina.

Tabela 7- Dados obtidos no preparo do hidrogel de pectina/carragenana (n=3).

		Atividade de $\beta$ -galactosidase U/L	Atividade média de $\beta$ -galactosidase U/L	Balanco de massa (U)	EE (%)
<b>Sol. enzimática+ Sol. polimérica (inicial)</b>		59.084			
		58.450	58.506 $\pm$ 553	2.341 $\pm$ 23	
		57.984			
<b>PEC/CAR1</b>	Sol. Sal. do	11.754			
	Hidrogel com enzima (final)	12.034	11.883 $\pm$ 142	512 $\pm$ 7	78,1 $\pm$ 0,2
		11.860			
<b>PEC/CAR2</b>	Sol. Sal. do	12.507			
	Hidrogel com enzima (final)	12.767	12.665 $\pm$ 139	583 $\pm$ 6	75,1 $\pm$ 0,4
		12.720			
<b>PEC/CAR3</b>	Sol. Sal. do	12.107			
	Hidrogel com enzima (final)	11.860	11.927 $\pm$ 158	513 $\pm$ 7	78,1 $\pm$ 0,4
		11.813			

Fonte: Do autor

Abdulla et al., (2013), fizeram a imobilização da lipase por meio de hidrogéis híbridos de alginato/carragenana. O procedimento para a imobilização foi dividido em duas partes. Inicialmente, a lipase foi reticulada utilizando uma solução de glutaraldeído a 25% (m/v). Simultaneamente, foi preparada uma solução de carragenana tipo Kappa 1,5% (m/v) e adicionou-se uma solução de alginato de sódio 1,5% (m/v). Na segunda etapa a lipase reticulada foi misturada à solução alginato-carragenana. A mistura foi então gotejada em uma solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1M para formar as esferas de hidrogel contendo lipase imobilizada. Os estudos demonstraram uma eficiência de encapsulação de 89,26%.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

A seguir serão discutidos os resultados das análises realizadas na etapa de caracterização dos hidrogéis.

### 5.3.1 Análises térmicas

Nas análises termogravimétricas (TG) a amostra é submetida a um aquecimento controlado e sua massa é avaliada em função da temperatura ou tempo. Deste modo, um sólido ao ser aquecido pode sofrer mudanças físicas e químicas tais como: transição de fases, fusão, sublimação, decomposição e oxidação. Porém, nem todos os eventos térmicos são acompanhados de mudanças na massa da amostra. No caso dos processos de decomposição térmica, dessorção e oxidação, há variação de massa e assim as curvas TG/DTG podem ser usadas para avaliar as condições experimentais que degradariam um polímero (PREZOTTI, 2013)

As análises termogravimétricas foram realizadas para avaliar a estabilidade dos hidrogéis e para determinar a interação entre os dois polissacarídeos no hidrogel híbrido. Os termogramas (TG/DTG) apresentados na Figura 12 mostram a temperatura dos eventos. Observa-se que todos os hidrogéis apresentaram três eventos de perda de massa. No hidrogel de carragenana primeiro evento é registrado até 175°C que representa 6% em perda de massa que pode ser atribuído a desidratação, a literatura relata que a perda de água ocorre até 120°C, houve um aumento dessa temperatura em todos os hidrogéis analisados, esse aumento na temperatura pode ser atribuído ao fato de que para que ocorra da desidratação no hidrogel as moléculas de água devem transpor a barreira da rede formada pelo polímero. O segundo evento ocorreu de 175 a 240°C indicando de perda de massa de 14% atribuído a destruição da cadeia glicosídica e o terceiro evento entre 240 e 500°C mostra uma redução de massa de 13% que pode ser atribuído à decomposição de polissacarídeos (MARTINS et al., 2012).

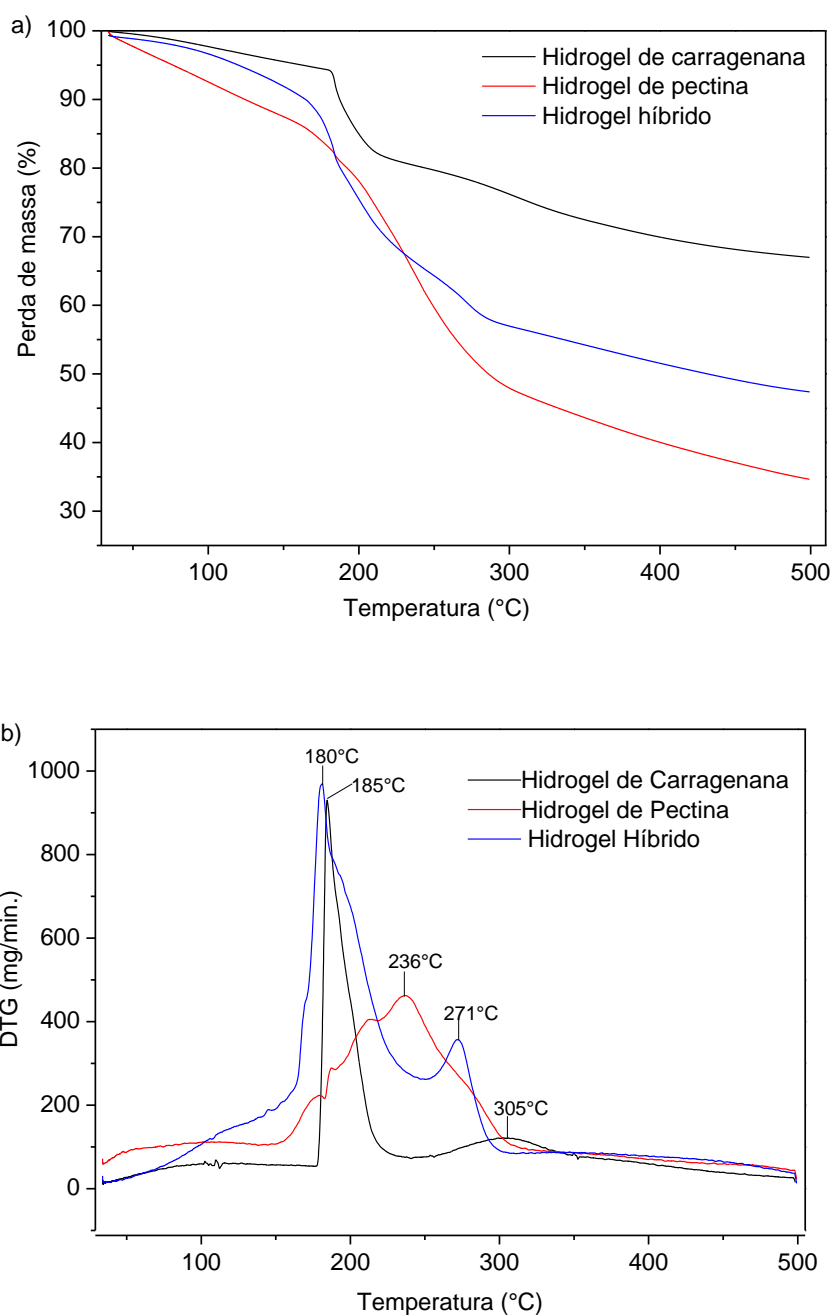


Figura 12 - Análises termogravimétrica dos hidrogéis de carragenana, pectina e pectina/carragenana.

Fonte: Do autor.

O hidrogel de pectina apresenta a primeira perda de massa de 13% até 150°C (perda de água), outro evento entre 150 e 320°C com perda de massa de 40% relacionado a decomposição da pectina e um último entre 320 e 500°C perda de massa de 10% (BIGUCCI et al., 2008; GHAFARI et al., 2007).

O hidrogel híbrido apresenta semelhanças tanto com o hidrogel de carragenana, quanto com o hidrogel de pectina mostrando haver interação entre os polímeros. O primeiro evento pode ser observado até 160°C (perda de água) com perda de massa de 9% o segundo evento ocorre entre 160 e 250°C que confere perda de massa de 34% com pico em 180°C, comportamento semelhante ao apresentado no segundo evento do hidrogel de carragenana onde o pico ocorre a 185°C e por fim outro evento que ocorre de 250 a 500°C com perda de massa de 12% com pico em 271°C temperatura intermediária entre o terceiro evento do hidrogel de carragenana com pico em 305°C e o segundo evento do hidrogel de pectina com pico de 236°C.

Prezotti e colaboradores (2014), produziram microesferas de gelatina:pectina (1:1 e 4:1, m/m) através da geleificação iônica usando  $Al^{3+}$  para a liberação controlada de fármacos. Ao analisar as curvas TG deste hidrogel foi possível observar que todas as amostras apresentaram dois eventos semelhantes: uma perda de massa de 2 a 7,5% entre 50 e 100°C atribuída à perda de umidade por evaporação durante o processo de aquecimento e outro de 125 a 200°C devido à degradação de ambos os polímeros. Este evento apareceu na forma de um único pico integrado devido à reação de reticulação.

De acordo com estudos realizados por Paşcalçau et al., (2012), as esferas de hidrogel de carragenana possuem três estágios de perda de massa. O primeiro está relacionado à desorção de água e ocorre à temperaturas abaixo de 100°C. Um segundo com temperaturas entre 100 e 200°C atribuído à destruição de ligações glicosídicas e o terceiro com temperaturas de 200 a 260°C.

Ma et al., (2011), desenvolveram um expansor de tecido para implante orbital formado por hidrogel de pectina e acrilato de sódio. As análises de TG mostrou uma perda de massa à 215°C atribuída à decomposição da pectina. Pôde-se observar ainda que com o aumento da concentração de pectina a temperatura de decomposição diminuiu devido a menor estabilidade da pectina, além de que a temperatura de decomposição dos hidrogéis de pectina/acrilato de sódio foi superior aos hidrogéis puros.

Bigucci et al., (2008), estudaram hidrogéis compostos de quitosana e pectina para liberação controlada da vancomicina. Os termogramas da quitosana, pectina e quitosana/pectina (1:1, m/m) mostram que a quitosana e a pectina degradaram-se em torno de 300 e 235°C, respectivamente. No TG do hidrogel híbrido havia dois picos a 235 e 300°C que foram relacionados com a perda de massa da pectina e quitosana, respectivamente. Ghaffari et al., (2007), estudaram as propriedades físico-químicas de filmes mistos entre pectina/quitosana/Eudragit, pectina/Eudragit e pectina/quitosana. Os resultados mostraram

que a degradação térmica da pectina pura ocorreu em dois estágios: o primeiro evento térmico foi uma perda de massa de 10% na faixa de 50-100°C e o segundo evento começou a 200°C com o máximo a 234°C e estava relacionado com a despolimerização de cadeias de pectina. Na mistura de pectina/quitosana também foi notado um evento térmico semelhante ao termograma da quitosana e da pectina puras e um outro evento com dois picos relacionada a perda de massa da pectina e quitosana nas temperaturas de 240 e 300°C, respectivamente.

### 5.3.2 Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é um método que permite estudar as interações intermoleculares entre diferentes compostos. A espectrometria com transformações de Fourier (FTIR) apresenta algumas vantagens como a utilização de pouca quantidade de amostra por análise, ganho de tempo e sensibilidade, além dos espectros serem de alta resolução (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Nos espectros dos hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido (Figura 13) podem ser observadas duas bandas comuns. Uma banda larga entre 3650 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  referente à vibração de estiramento de hidroxila (-OH) formadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e outra banda que ocorre na região entre 3000 e 2990  $\text{cm}^{-1}$  onde se encontra as bandas de estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H de grupos metila (PASCALĂU et al., 2012; PREZOTTI et al., 2014).



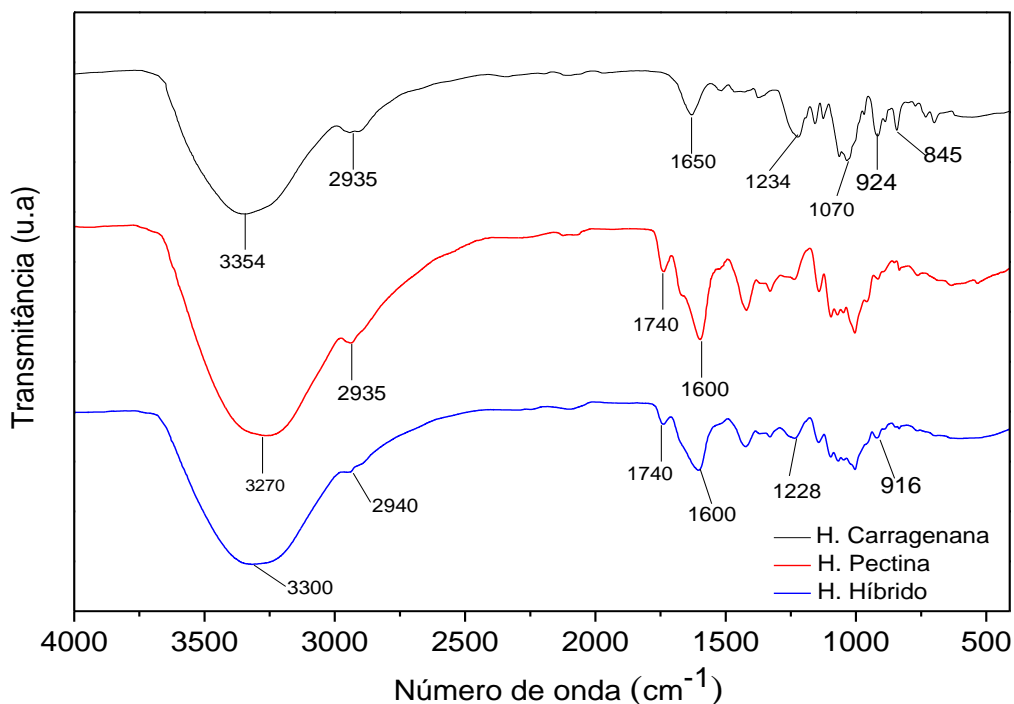


Figura 13- Espectros de infravermelho, comparando os hidrogéis de carragenana, pectina e pectina/carragenana.

Fonte: Do autor.

No hidrogel de carragenana a presença de grupos sulfato dá origem a bandas características dependendo da posição do sulfato no anel de galactose ou de 3,6-anidrogactose. Por exemplo, quando o grupo sulfato ocupa a posição C<sub>4</sub> no anel de 3,6-anidrogactose, o que corresponde a carragenana tipo kapa, a banda é esperada em aproximadamente 845-850 cm<sup>-1</sup>. Desse modo, a banda de 845 cm<sup>-1</sup> observada neste hidrogel é atribuída ao grupo sulfato ligado a posição C<sub>4</sub> (no anel de galactose) (WEBBER V., 2010). Outras bandas características da carragenana podem ser notadas como: banda de 1234 cm<sup>-1</sup> atribuída à ligação S=O de ésteres sulfato; banda de 924 cm<sup>-1</sup> referente à ligação C-O de 3,6-anidrogactose e banda de 1070 cm<sup>-1</sup> atribuída à ligação glicosídica (MAHMOOD et al., 2014; MARTINS et al., 2012; PASCALĂU et al., 2012; PEREIRA et al., 2009; UY et al., 2005).

Entre os 1600 e 1800 cm<sup>-1</sup> encontra-se a região mais interessante do espectro do hidrogel de pectina, pois nesta encontram-se as bandas de absorvância do grupo carbonilo (C=O) do ácido carboxílico e do éster metil carboxílico. Deste modo, é observada uma banda de baixa intensidade em 1740 cm<sup>-1</sup> corresponde à deformação axial de C=O do metil éster, sua baixa intensidade é atribuída ao baixo grau de esterificação da pectina. Outra banda em

1600  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo C=O na sua forma  $\text{COO}^-$  (BIGUCCI et al., 2008; MA et al., 2011; MARUDOVA et al., 2004).

O espectro do hidrogel híbrido apresentou bandas semelhantes às detectadas nos hidrogéis de pectina e carragenana, porém menos intensas ou levemente deslocadas, indicando boa miscibilidade dos polímeros.

### 5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos hidrogéis secos de carragenana, pectina e o híbrido podem ser observados na Figura 14. Foi observado que os hidrogéis possuem tamanhos diferentes, os hidrogéis de carragenana, pectina e o híbrido possuem aproximadamente 0,99; 0,73 e 1,19 mm de diâmetro respectivamente. As esferas de todos os hidrogéis apresentavam forma esférica distorcida (Fig.14a, 14c e 14e) com algumas rugas na superfície presumivelmente devido ao processo de secagem.

Como os hidrogéis são formados na presença de uma grande quantidade de água, devido à baixa concentração da solução polimérica, estes sofrem deformação considerável durante o processo de secagem (mesmo ocorrendo a  $4^\circ\text{C}$ ). A forma esférica das pérolas em estado úmido é geralmente alterada depois de secas formando uma superfície relativamente irregular e, no caso do hidrogel de pectina, as esferas tendem a se aglomerarem. A evaporação da água durante o processo de secagem provavelmente é responsável pela determinação das morfologias obtidas (JUNG et al., 2013).

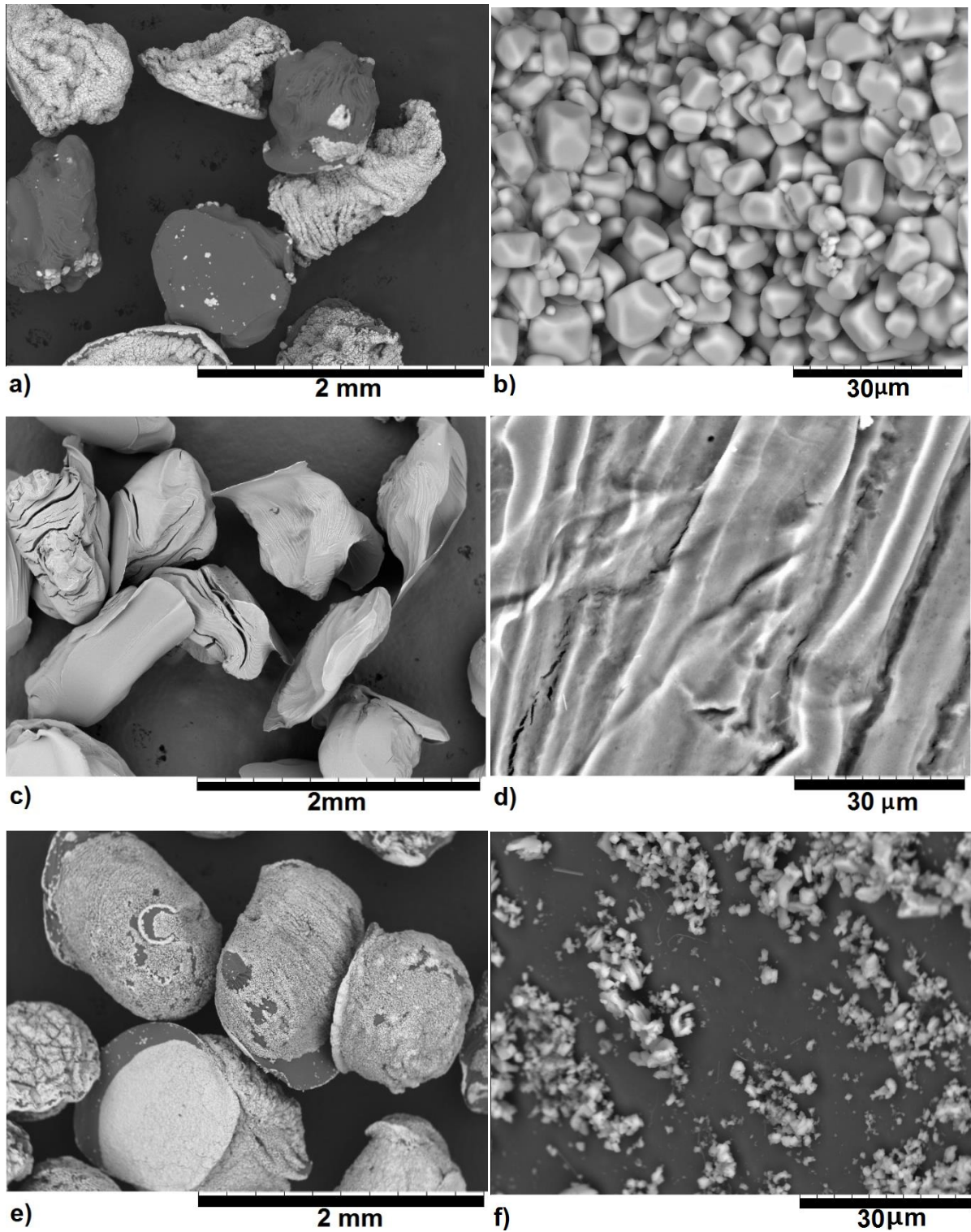


Figura 14- Imagens de MEV dos hidrogéis.

Legenda: a) Carragenana, com aumento de 50 x, b) Carragenana, com aumento de 2000 x, c) Pectina com aumento de 50 x, d) Pectina com aumento de 2000 x, e) Híbrido com aumento de 50 x e f) Híbrido com aumento de 2000 x.

Fonte: Do autor.

O hidrogel de carragenana apresenta grãos com formas geométricas irregulares formando conglomerados, como pode ser visto na Fig. 14b, a mesma característica é apresentada nos hidrogéis de carragenana preparados no trabalho de Paşcalcu et al., 2012. No entanto no presente trabalho esses grãos não estão igualmente distribuídos na superfície, formando esferas com superfície heterogênea (Fig. 14a). Enquanto que o hidrogel de pectina apresenta uma superfície rugosa com grandes fissuras. O hidrogel híbrido também apresenta grãos como no hidrogel de carragenana, porém menores e mais dispersos sobre a superfície das esferas, como observado na Fig. 14f.

#### 5.3.4 Intumescimento

O intumescimento  definido como sendo a ampliao de volume do polímero imerso em um solvente. Quando um hidrogel  colocado em água ou em outro meio, sua rede polimérica pode interagir com o solvente, levando  expansão da mesma (BORTOLIN et al., 2012). A liberao do material imobilizado a partir do hidrogel seco geralmente envolve absoro de água e dessoro do material através de um mecanismo controlado por inao (GUPTA, et al., 2002). A quantidade de meio absorvido pelo hidrogel depende da temperatura e da interao específica entre as moléculas de água (provenientes do meio) e da cadeia do polímero (ULLAH et al., 2015). O hidrogel  composto por uma rede polimérica reticulada responsável pela expansão e contrao do hidrogel, quando as interao eletrostáticas entre cadeias do polímero são de atrao, as cadeias poliméricas ficam próximas, mantendo o tamanho dos poros pequenos, quando as interao eletrostáticas são de repulsão as cadeias poliméricas se afastam uma das outras, expandindo a rede polimérica e conseqüentemente aumentando o tamanho dos poros desta rede (MCCLEMENTS, 2017).

A Tabela 8 descreve a porcentagem de intumescimento dos hidrogéis em diferentes meios: gua destilada, meio gástrico simulado pH 1,2 composto por soluço de HCl 1 M e meio intestinal simulado pH 7,0 composto por tampão fosfato 100 mM.

Tabela 8- Grau de intumescimento dos hidrogéis imobilizados com  $\beta$ -galactosidase em diferentes meios (n=3).

	Água	Meio gástrico simulado	Meio intestinal simulado
<b>Carragenana</b>	3.313±269%	613±128%	911±72 %
<b>Pectina</b>	5.767±547%	219±7% <sup>a</sup>	Valor não calculado <sup>*</sup>
<b>Pectina/carragenana</b>	2.371±327%	224±11% <sup>a</sup>	Valor não calculado <sup>*</sup>

Fonte: Do autor.

\* Impossibilidade de cálculo devido ao fato dos hidrogéis terem desmanchado.

a Valores estatisticamente iguais, seguindo o teste ANOVA .

Em água destilada o hidrogel de pectina apresentou maior intumescimento. No entanto, em meio gástrico simulado, o hidrogel de pectina e o hidrogel híbrido apresentaram resultados estatisticamente iguais usando o *teste t* com 95% de confiabilidade. Neste meio, tais hidrogéis apresentaram menor dilatação da rede polimérica a fim de evitar que a enzima seja lixiviada do interior do hidrogel. Este comportamento é desejável uma vez que o local de ação da  $\beta$ -galactosidase deverá ocorrer, preferencialmente, no intestino delgado. Em meio intestinal simulado, houve rompimento da estrutura polimérica dos hidrogéis de pectina e do híbrido, destaca-se que esse rompimento foi detectado passado o período de duas horas, de modo que não foi avaliado o intumescimento no decorrer do teste. Por sua vez, o hidrogel de carragenana apresentou resultado satisfatório considerando que o seu grau de intumescimento foi maior em meio intestinal do que em meio gástrico simulado. Mediante tais dados, considera-se que todos os hidrogéis analisados são adequados para a liberação controlada da  $\beta$ -galactosidase.

#### 5.4 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Neste estudo foram selecionados valores de pH entre 1,0 a 7,0 para avaliar as condições encontradas no trato gastrointestinal. Além disso, a atividade liberada (8,7 U) pelo hidrogel de pectina em pH 7,0, material que apresentou melhor resultado nesta condição, foi usada como parâmetro para determinar a quantidade de enzima livre empregada no ensaio. A Figura 15 mostra o comportamento dos materiais quando submetidos à variação de pH (Figura 15a) e de temperatura (Figura 15b).

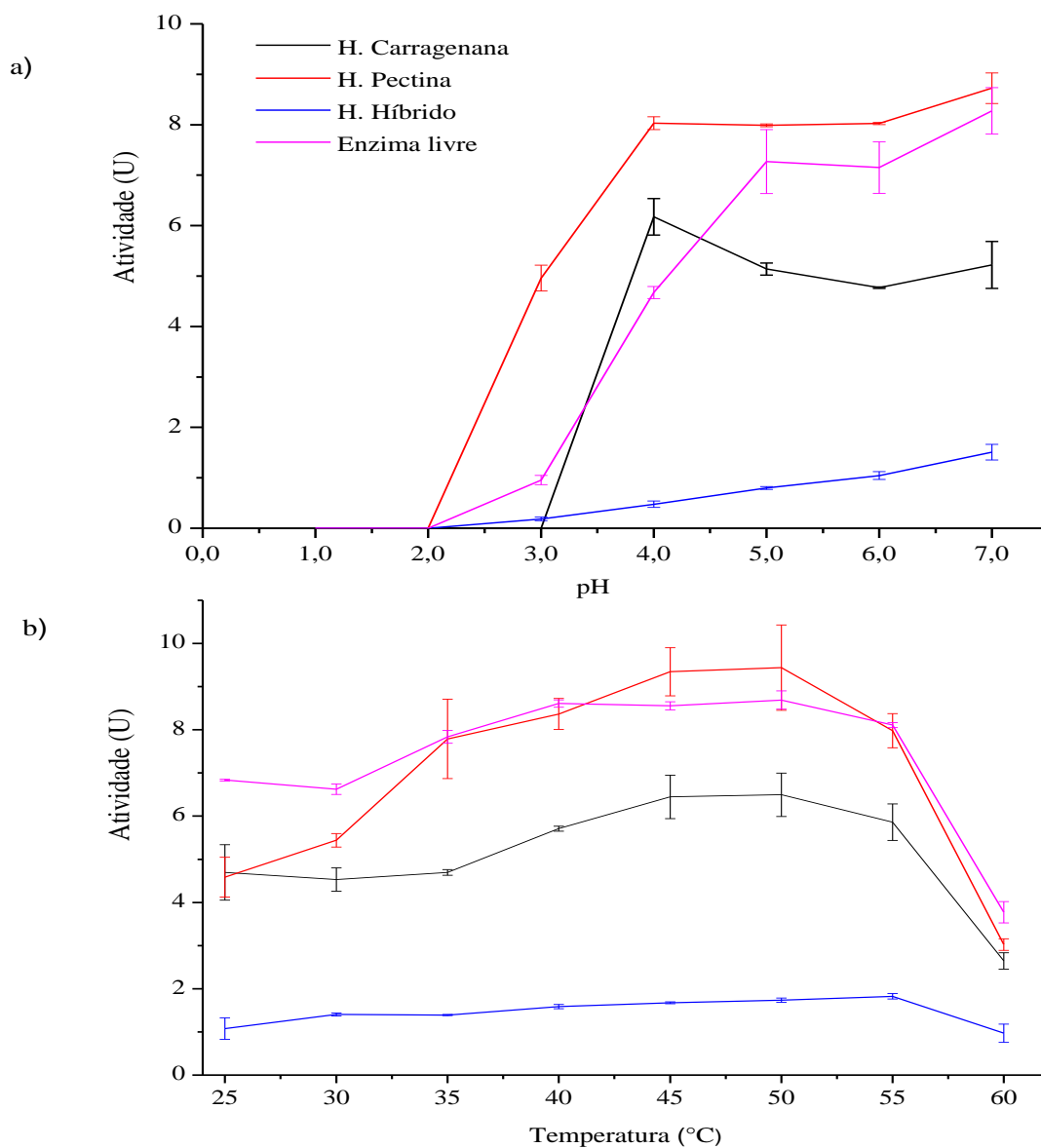


Figura 15 - Influência do pH e da temperatura na estabilidade dos hidrogéis e também na  $\beta$ -galactosidase sem ser submetida ao processo de reticulação.

Legenda: a) efeito de pH e b) efeito de temperatura. Para a realização deste teste os materiais avaliados ficaram durante 30 minutos em contato com os respectivos meios.

Nota: A atividade catalítica foi determinada por análise espectrofotométrica (n=3).

Fonte: Do autor.

De acordo com os resultados disponíveis na Figura 15a, em pH 1,0 e 2,0 foi observada atividade enzimática próxima ao limite de quantificação ( $\leq LQ=0,01$  U) em todos os hidrogéis e também na enzima livre. Este efeito pode ser atribuído a mudanças na estrutura tridimensional da enzima quando o pH é reduzido, o que leva a alterações na morfologia e na superfície do sítio ativo da mesma, indicando que as esferas de hidrogel não inibem a perda de

atividade enzimática em meio ácido. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao fato dos íons  $H^+$  provenientes do meio serem pequenos o suficiente para migrarem através dos poros das esferas para dentro da matriz do hidrogel alterando as propriedades do sítio ativo da enzima (ZHANG et al., 2016). Um novo estudo analisou a utilização de um tampão básico (hidróxido de magnésio) com a finalidade de evitar a desativação da  $\beta$ -galactosidase devido a presença do íon  $H^+$  no interior do hidrogel, criando um pH interno diferente do pH no meio externo, dessa forma o tampão foi utilizado para controlar o pH interno do hidrogel, quando o hidrogel contendo  $Mg(OH)_2$  foi exposto a um ambiente gástrico altamente ácido, o microambiente dentro do hidrogel permaneceu próximo do neutro, possivelmente porque quando os íons hidrogênio ( $H^+$ ) entram no hidrogel e são neutralizados pelo íon hidroxila ( $OH^-$ ) provenientes do tampão (ZHANG et al., 2017). Além disso, há relatos na literatura que indicam que íons de  $Mg^{2+}$  favorecem a atividade da  $\beta$ -galactosidase, no entanto, existe uma concentração ótima de íons  $Mg^{2+}$  ( $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ ) acima do qual o grau de hidrólise começa a diminuir. (DEMIRHAN et al., 2008).

O hidrogel de carragenana também não apresentou atividade significativa em pH 3,0, indicando que a  $\beta$ -galactosidase não foi liberada no meio nesta condição, uma vez que a enzima livre mostrou-se ativa neste pH. Este hidrogel apresentou melhor resultado em pH 4,0, valor próximo ao pH ótimo da enzima que é de 4,5. Por outro lado, o hidrogel de pectina em pH 3,0 apresentou  $5,0 \pm 0,3 \text{ U}$ , ou seja, 57,4% da atividade esperada em pH 7,0 ( $8,7 \pm 0,3 \text{ U}$ ). Ao se comparar com a enzima livre, o hidrogel de pectina teve resultado 5 vezes maior de atividade. Todos estes dados demonstram o caráter parcial de preservação da estrutura tridimensional da enzima encapsulada neste material.

O hidrogel de pectina foi o material que apresentou maior atividade de  $\beta$ -galactosidase nos pHs 3,0, 4,0 e 6,0. Em pH 5,0 e 7,0, a atividade encontrada foi estatisticamente igual (teste *t* de *student*, com grau de confiabilidade de 95%) quando comparado a enzima livre. O hidrogel de pectina apresentou atividade significativamente igual na faixa de pH de 4,0 a 7,0. Especificamente em pH 7,0, pode-se observar que o hidrogel de pectina apresentou atividade de  $\beta$ -galactosidase 1,7 e 5,8 vezes maior que o hidrogel de carragenana e o híbrido, respectivamente.

Comportamento semelhante ao relatado aqui foi observado no trabalho de Zhang et al., (2016). O estudo de estabilidade do hidrogel de carragenana em diferentes valores de pH demonstraram que a atividade enzimática foi nula dentro do intervalo de pH de 2,0 a 4,0, sendo incapaz de proteger a enzima do ácido, induzindo a perda de atividade. O encapsulamento da  $\beta$ -galactosidase nas esferas de hidrogel levou a um aumento de 76% de

atividade quando comparada a enzima livre ( $\beta$ -galactosidase produzido por fermentação da levedura *Kluyveromyces lactis*) em pH 7,0 (ZHANG et al., 2016).

Nichele et al., (2011), imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase em gel de sílica usando o método sol-gel, eles avaliaram o efeito do pH (faixa de 2,0 a 8,5). Neste estudo foi constatado que a atividade da enzima encapsulada atinge seu máximo em pH 7,4, isto é, próximo ao pH intestinal e ainda que houve preservação parcial de atividade (15% da atividade apresenta em pH 7,4) em pH fortemente ácido (pH 2,0) (NICHELE et al., 2011).

O hidrogel híbrido foi o material que apresentou menores quantidades de enzima liberada, fato que nos surpreendeu negativamente, uma vez que este hidrogel foi o que apresentou maior eficiência de encapsulação. Uma possível hipótese pode ser atribuída ao fato de que uma maior quantidade de enzima tenha sido encapsulada no hidrogel híbrido, porém sem preservar sua estrutura tridimensional, afetando o resultado de atividade em diferentes valores de pH.

Todos os hidrogéis apresentaram uma atividade maior em pH mais alto (pH 7,0) do que em relação a condição ácida (pH 3,0). Isso é explicado pelo fato de hidrogéis aniônicos, como é o caso de hidrogéis formados por carragenana e pectina, terem grupos (por exemplo,  $\text{-COO}^-$  ou  $\text{-SO}^4$ ), onde a desprotonação ocorre quando o pH do meio está acima da capacidade de ionização destes grupos que, por sua vez, aumenta o inchaço do hidrogel, expandindo a rede polimérica e permitindo a liberação da enzima (ULLAH et al., 2015).

A atividade enzimática depende da temperatura do meio à qual ela está inserida, sendo que existe uma temperatura ótima, que no caso da  $\beta$ -galactosidase é de 50°C para a atuação da mesma. Acima desta temperatura a atividade enzimática diminui devido à desnaturação da biomolécula. Conforme mostrado na Figura 15b, em geral, a  $\beta$ -galactosidase encapsulada no hidrogel de pectina apresentou comportamento semelhante ao da enzima livre mantendo-se estável, ou seja, com mesma atividade entre 35-55°C (dados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiabilidade pelo teste *t* de *student*). Já o hidrogel de carragenana não sofreu influência da temperatura entre 40-55°C. Por sua vez, o hidrogel híbrido apresentou a mesma atividade de enzima em toda a faixa de temperatura avaliada, exceto a 60°C.

Em temperaturas mais baixas como 25 e 30°C todos os hidrogéis apresentaram diminuição acentuada na atividade enzimática. O hidrogel de pectina, por exemplo, apresentou uma perda de 51 e 42% nas temperaturas de 25 e 30°C respectivamente, quando comparada com sua atividade temperatura ótima (50°C), indicando que em temperaturas menores a rede polimérica expande-se menos e, conseqüentemente, libera menor quantidade de enzima no meio. Ressalta-se ainda que nenhum hidrogel manteve-se estável na temperatura



de 60°C. De acordo com os resultados obtidos, houve uma redução de 59, 68 e 47% para os hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido, respectivamente, considerando o maior valor de atividade enzimática encontrado para cada um destes materiais no teste em questão.

Enfatiza-se que o perfil de liberação da  $\beta$ -galactosidase encontrado no presente trabalho difere do relatado por Zhang et al., 2016. No trabalho destes autores, a atividade da  $\beta$ -galactosidase encapsulada em hidrogel de carragenana foi menor a partir de 40°C, sendo nula a partir de 55°C. Nesse sentido, os hidrogéis preparados com a metodologia apresentada aqui podem ser considerados mais estáveis a altas temperaturas.

O estudo realizado por Freitas et al., 2011, descreve a imobilização da  $\beta$ -galactosidase *Aspergillus oryzae* em esferas de alginato-gelatina reticulados com glutaraldeído. Foi estudado o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada. Os autores relatam a enzima livre e imobilizada apresentaram perfis semelhantes, comportamento semelhante ao apresentado no presente trabalho. A atividade máxima para  $\beta$ -galactosidase livre foi encontrada a 55°C enquanto que para a enzima imobilizada foi a 60°C indicando que a enzima imobilizada possui melhor tolerância ao calor, a partir dessas temperaturas a atividade diminuiu rapidamente devido à desnaturação enzimática (FREITAS et al., 2011).

## 5.5 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

Neste teste foi verificado se o período de armazenamento associado a diferentes pH do meio e a temperatura influenciava no perfil de liberação/atividade da  $\beta$ -galactosidase.

A Figura 16 revela o comportamento dos hidrogéis após um período de três meses de armazenamento em geladeira a 4°C embalados hermeticamente quando submetidos ao teste de liberação da enzima em diferentes valores de pH. O hidrogel híbrido foi o que demonstrou maior perda relativa de atividade já que após o período de incubação não foi observada nenhuma atividade ( $\leq LQ=0,01$  U). A Figura 16 mostra ainda que o hidrogel de pectina, apesar de apresentar maior atividade/liberação de  $\beta$ -galactosidase em toda a faixa de pH avaliada no material recém preparado, após os três meses houve uma perda de atividade de 79% em pH 4,0 e de 69% em pH 7,0. Por outro lado, o hidrogel de carragenana apresentou maior estabilidade. Foi notada uma diminuição de apenas 8 e 29% de atividade em pH 4,0 e 7,0,

respectivamente. Este fato fez com que o hidrogel de carragenana armazenado por 3 meses apresentasse resultados de atividade/liberação superiores ao do hidrogel de pectina incubado nas mesmas condições.

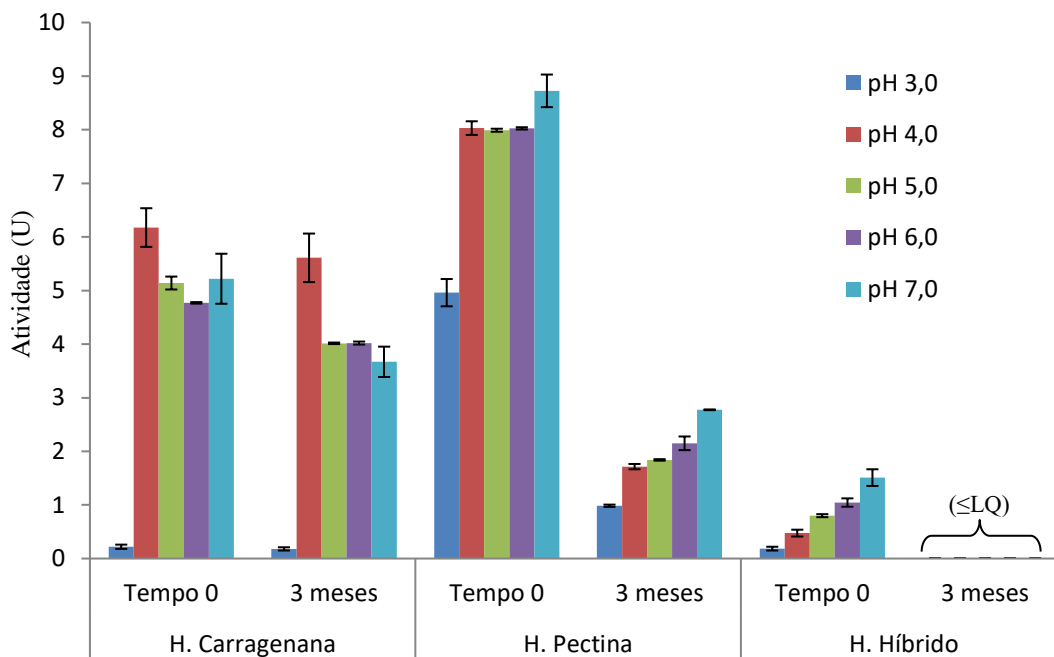


Figura 16 - Comparação da quantidade de  $\beta$ -galactosidase liberada ( $n=3$ ) a diferentes pH em hidrogéis usando amostras recém preparadas e amostras armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 3 meses.

Nota: Para a realização deste teste os materiais avaliados ficaram durante 30 minutos em contato com os respectivos meios. A atividade catalítica foi determinada por análise espectrofotométrica ( $\leq\text{LQ}=0,01$  U).

Fonte: Do autor.

A Figura 17 representa o comportamento dos hidrogéis recém formados e após o período de armazenamento quando submetidos ao teste de liberação da enzima em diferentes temperaturas.

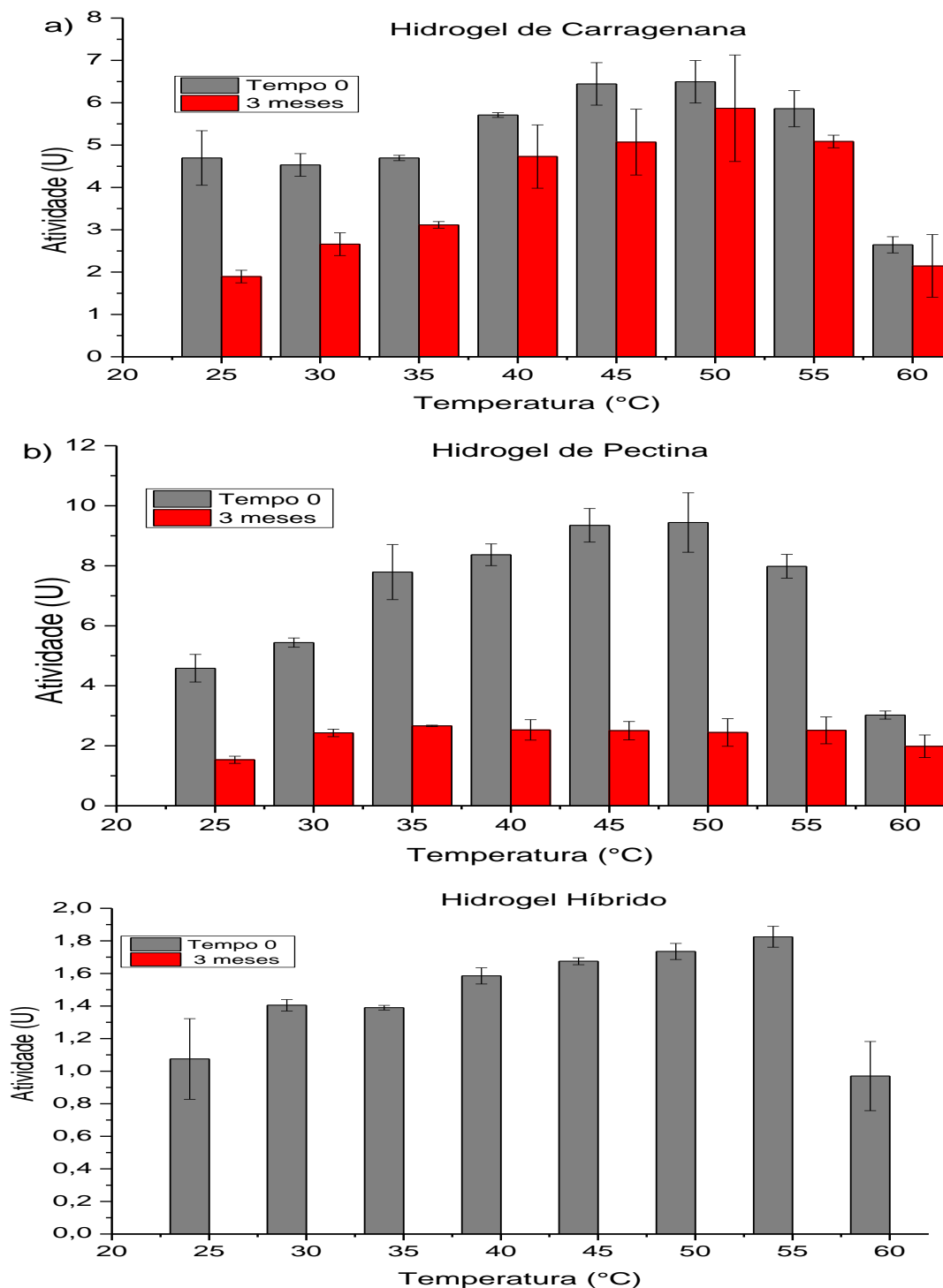


Figura 17 - Comparação da quantidade de  $\beta$ -galactosidase liberada (n=3) em diferentes temperaturas em hidrogéis usando amostras recém preparadas e amostras armazenadas por 3 meses à 4°C.

Legenda: a) Hidrogel de carragenana; b) hidrogel de pectina; c) hidrogel híbrido.

Nota: Para a realização deste teste os materiais avaliados ficaram durante 30 minutos em solução tampão tris/HCl 50 mM pH 7,0 nas respectivas temperaturas. A atividade catalítica foi determinada por análise espectrofotométrica ( $\leq LQ=0,01$  U).

Fonte: Do autor.

No hidrogel de carragenana, uma maior influência do armazenamento pode ser observada em temperaturas mais baixas, de 25 a 35°C. Nas temperaturas de 40 a 60°C o armazenamento demonstrou ter pouca ou nenhuma influência na liberação, uma vez que nas temperaturas de 50 e 60°C a atividade enzimática antes e depois do armazenamento são estatisticamente iguais (dados com 95% de confiabilidade pelo teste *t* de *student*). A maior perda de atividade no hidrogel de carragenana pode ser observada a 25°C com perda de aproximadamente 60%.

O hidrogel de pectina foi o que apresentou maior perda de atividade após o armazenamento, entretanto, a temperatura não influencia na liberação da  $\beta$ -galactosidase dos hidrogéis armazenados após 3 meses, uma vez que a atividade apresentada nas temperaturas de 25 a 60°C são estatisticamente iguais (dados ao nível de 95% de confiabilidade pelo teste *t* de *student*) com perda de aproximadamente 74% de atividade.

O hidrogel híbrido, assim como observado na Figura 16, também foi o que demonstrou maior perda de atividade durante a estocagem, sendo que após o período de armazenamento a atividade não pode ser determinada por estar abaixo do limite de quantificação ( $\leq$ LQ=0,01 U).

## 5.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE *IN VITRO*

Este estudo foi realizado para avaliar o comportamento dos hidrogéis simulando as condições no trato gastrointestinal. Os hidrogéis foram colocados em cápsulas gastroresistentes de hipromelose, uma vez que o teste de influência do pH revelou que em pH próximo do estomacal (pH 1,2) a enzima, mesmo encapsulada não apresentou atividade. Esse procedimento não inviabiliza a questão da liberação controlada, uma vez que é esperado que em meio intestinal a liberação seja contínua, de modo que liberação da enzima seja controlada pela taxa de absorção de água da rede polimérica. Além disso, procedimento semelhante envolvendo a  $\beta$ -galactosidase para a avaliação de “*delivery system*” foi adotado por He, et al., (2014) e Perissinato, et al., (2017).

Estudos recentes de Perissinato, et al., (2017) mostraram que comprimidos comerciais contendo a  $\beta$ -galactosidase ao serem submetidos às condições simuladas do trato gastrointestinal apresentaram um tempo de desintegração de aproximadamente 2 minutos,

ainda em meio ácido. Isso indica que estes comprimidos possuem uma liberação imediata da enzima. Neste sentido, foi comprovado que o comprimido comercial não forneceu proteção em fluido gástrico simulado, uma vez que  $86,0 \pm 0,8\%$  de  $\beta$ -galactosidase foi liberada em 5 minutos do ensaio de dissolução, restando no final do teste (210 min.) somente 14,0% da atividade indicada no rótulo. No entanto, ao colocar os comprimidos comerciais em cápsulas gastroresistentes a atividade enzimática foi 6,7 vezes maior (PERISSINATO et al., 2017).

De acordo com o perfil apresentado na Figura 18, nota-se que as cápsulas gastroresistentes apresentaram proteção durante todo o período de permanência em meio gástrico (até 120 minutos) não havendo liberação da enzima ( $\leq LQ=0,01$  U). Depois do meio gástrico ter sido substituído pelo meio intestinal, as cápsulas se desintegram em aproximadamente 8 minutos. Após a desintegração, os hidrogéis de carragenana e pectina liberaram a  $\beta$ -galactosidase à medida que o tempo avançava, atingindo atividade maior que a encontrada no comprimido comercial ao final do teste (180 minutos).

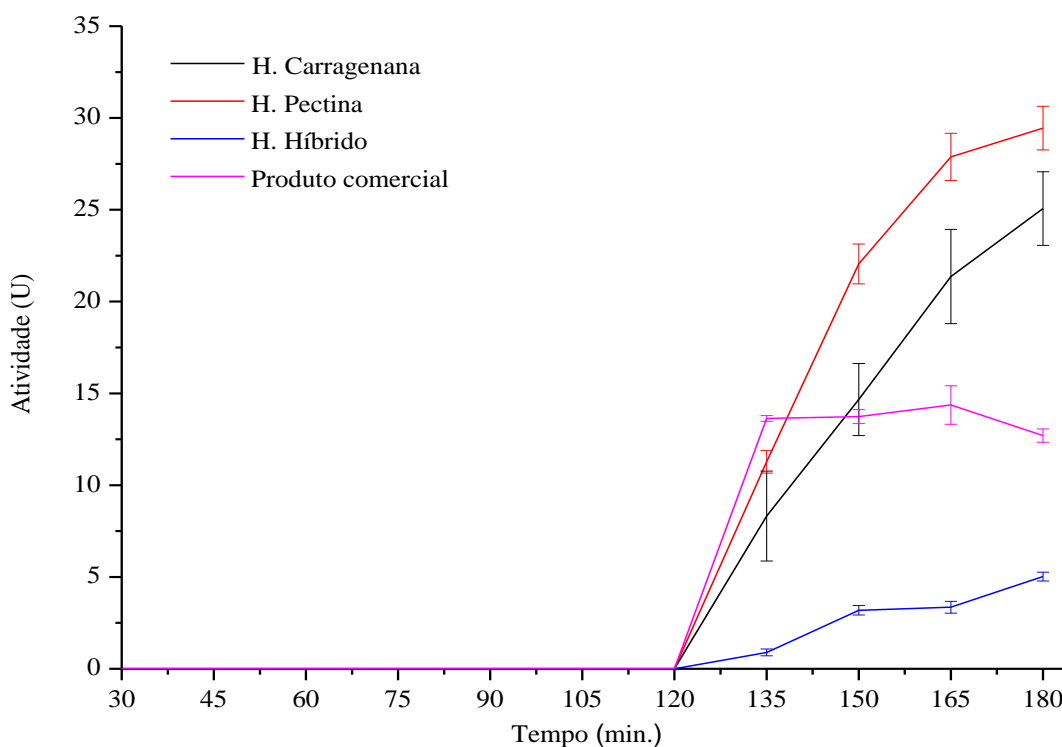


Figura 18 - Perfil de liberação dos hidrogéis e do produto comercial colocado nas cápsulas gastroresistentes (n=3).

Fonte: Do autor.

Especificamente, em 150 min. de teste, ou seja, em 30 min. no meio intestinal simulado, os hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido obtiveram liberação de  $14\pm 2$ ,  $22\pm 2$  e  $3,0\pm 0,3U$ , respectivamente. Estes dados conferem com a atividade encontrada no teste da influência do pH onde foi observada a liberação de  $5,0\pm 0,5$ ,  $8,5\pm 0,5$  e  $1,5\pm 0,2$  U para os hidrogéis de carragenana, pectina e híbrido em pH 7,0, considerando que naquele caso a massa de hidrogel utilizada foi três vezes menor do que a usada no teste de liberação *in vitro*.

Foi possível notar ainda que a liberação da  $\beta$ -galactosidase do hidrogel de carragenana é mais lenta quando comparada com o hidrogel de pectina. Uma vez que foi observado que a atividade liberada pelo hidrogel de carragenana aos 165 minutos é igual a atividade liberada pelo hidrogel de pectina aos 150 minutos. O mesmo comportamento ocorre ao comparar a atividade liberada pelo hidrogel de carragenana aos 180 min. com o hidrogel de pectina aos 165 min. Este resultado pode estar relacionado ao fato do hidrogel de carragenana gerar esferas maiores. De acordo com o resultado de MEV, o diâmetro das esferas do hidrogel de carragenana é 1,4 vezes maior que as esferas do hidrogel de pectina. As dimensões do hidrogel têm um grande impacto na sua capacidade de reter e liberar agentes bioativos imobilizados. A taxa de liberação do agente bioativo diminui com o aumento do tamanho do hidrogel, uma vez que as moléculas então têm uma distância adicional para migrar até o meio circundante. Um cuidadoso controle das dimensões do hidrogel é, portanto, muitas vezes necessário para garantir um perfil de retenção e liberação adequado de um agente bioativo encapsulado (MCCLEMENTS, 2017).

Os dados do teste revelam também que a partir de 135 min. a atividade liberada pelo comprimido comercial permanece constante, indicando que toda a enzima colocada na cápsula está disponível quando ela se desintegra. Além disso, houve uma diminuição de 50% em relação à atividade esperada para este material (26 U). Os hidrogéis de pectina e carragenana foram 2,4 e 2,0 vezes, respectivamente, mais eficazes na liberação que o comprimido comercial no tempo de 180 minutos.

Resultado semelhante foi apresentado no trabalho de He, et al., (2014) onde foram preparadas nanocápsulas poliméricas composta por poli(ácido láctico) contendo a  $\beta$ -galactosidase. Após o preparo as nanocápsulas foram liofilizadas e colocadas em cápsula de gelatina que posteriormente foram revestidas com hidroxipropil metil celulose ftalato (HP55). Os resultados *in vitro* revelaram que a cápsula revestida com HP55 permaneceu intacta no fluido gástrico simulado e protegeu de forma eficiente da  $\beta$ -galactosidase da desnaturação ácida. Sob a condição intestinal simulada, o revestimento entérico se dissolveu rapidamente e

liberou as nanocápsulas carregadas com  $\beta$ -galactosidase, que apresentaram maior estabilidade que a  $\beta$ -galactosidase livre (HE et al., 2014)

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que os resultados provenientes dos testes de atividade enzimática indicaram que houve uma encapsulação de aproximadamente  $58\pm 1,0$ ,  $73\pm 1,0$  e  $77\pm 2,0\%$  de  $\beta$ -galactosidase nos hidrogéis de carragenana, pectina e pectina/carragenana, respectivamente. Apesar do hidrogel híbrido ter apresentado maior eficiência de encapsulação, o hidrogel de pectina obteve o melhor rendimento ao ser considerado o parâmetro relacionado à quantidade de unidade enzimática por miligrama de hidrogel seco produzido. O hidrogel de pectina apresentou cerca de 1,5 vezes maior rendimento que o hidrogel de carragenana e 2 vezes maior que o hidrogel híbrido.

A caracterização dos hidrogéis por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TG/DTG) mostrou que o hidrogel híbrido apresentou semelhanças tanto com o hidrogel de pectina quanto com o hidrogel de carragenana. Isso indica que houve interação entre os dois materiais para a formação deste hidrogel. Por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar que os hidrogéis de carragenana, pectina e o híbrido secos possuem diâmetro de aproximadamente 1,0, 0,7 e 1,2 mm, respectivamente. O teste de intumescimento revelou que todos os hidrogéis apresentaram uma elevada capacidade de absorver líquidos e que o intumescimento em pH estomacal é menor que em pH intestinal simulado. Este comportamento é ideal para materiais que devam ser utilizados para liberação de princípios ativos, preferencialmente na porção intestinal, como é o caso da  $\beta$ -galactosidase.

O estudo da influência do pH na atividade enzimática indicou que a imobilização da enzima nas esferas de hidrogel não foi suficiente para evitar a perda de atividade induzida por valores de pH extremamente ácidos. O estudo da influência da temperatura mostrou ainda que todos os hidrogéis apresentaram estabilidade térmica entre 40 a 55°C, sendo que o hidrogel de pectina apresentou atividade semelhante à enzima livre. Após o armazenamento de 3 meses, o hidrogel de carragenana foi o que apresentou melhor estabilidade, inclusive com atividade/liberação superior ao do hidrogel de pectina.

O estudo de liberação da  $\beta$ -galactosidase *in vitro* indicou que os hidrogéis de carragenana e pectina foram mais eficazes na liberação que o comprimido comercial. No entanto, a liberação da  $\beta$ -galactosidase do hidrogel de carragenana é mais lenta quando comparada com o hidrogel de pectina. Este resultado pode estar relacionado ao fato do hidrogel de carragenana gerar esferas 1,4 vezes maiores que as esferas do hidrogel de pectina.



Desse modo, as moléculas de  $\beta$ -galactosidase têm uma distância maior para migrar até o meio circundante.

O presente trabalho confirmou que é possível a imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase usando diferentes biopolímeros por meio da gelificação ionotrópica. Contudo, a estratégia de formar um hidrogel híbrido (unindo as propriedades químicas de ambos os materiais), muitas vezes relatada para melhorar a eficiência do material, não foi adequada para encapsular e depois liberar a  $\beta$ -galactosidase em local apropriado.

Ambos os hidrogéis de pectina e carragenana apresentaram pontos positivos. No entanto para fim terapêutico, como proposto nesse trabalho, o hidrogel de carragenana pode ser considerado o melhor biopolímero gerado, visto que, este foi o que apresentou maior estabilidade após o armazenamento. Esta característica é um ponto importante e deve ser considerado.

## REFERÊNCIAS

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 545–551, 2013.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis by galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, p. 68–74, 2010.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Food and Bioproducts processing**, v. 90, p. 351-359, 2012.

BETANCOR, L.; et al. Three-Dimensional Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on a Silicon Surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, p. 263-267, 2008.

BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of applied polymer science**, v. 132, 2015. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.42125/full>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

BIGUCCI, F. et al. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 35, p. 435–441, 2008.

BLENDON, R. J. et al. Americans' views on the use and regulation of dietary supplements. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, p. 805-810, 2001.

BORTOLIN, A. et al. 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.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução RDC 2005 n° 205. Enzimas e preparações enzimáticas para o uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov. 2006.

BROWN-ESTERS, O.; MC NAMARA, P.; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 98-103, 2012.

CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, p. 149-157, 2012.

CHAN, S. Y. et al. Pectin as a Rheology Modifier: Origin, Structure, Commercial Production and Rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118-139, 2017.

CHOURASIA, M. K.; JAIN S. K., Polysaccharides for colon targeted drug delivery. **Drug Delivery**, v. 11, p. 129-148, 2004.

COLLINSON, M. M. Recent trends in analytical application of organically modified silicate matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 30–37, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004

DEMIRHAN, E.; APAR, D. K.; OZBEK B. Effect of hydrolysis products and  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions on whey lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase stability. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 625–636, 2008.

ELNASHAR, M. M.; YASSIN, M. A. Lactose Hydrolysis by  $\beta$ -Galactosidase Covalently Immobilized to Thermally Stable Biopolymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 159, p. 426–437, 2009.

EŞ I, VIEIRA J. D. G., AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065–2082, 2015.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, v. 64, p. 134–140, 2014.

FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of  $\beta$ -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, v.179, p. 44–51, 2015.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent Developments and Applications of Immobilized Lactase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2012.

FRANCIS, S; KUMAR, M; VARSHNEY, L. Radiation synthesis of superabsorbent poly (acrylic acid)-carrageenan hydrogels. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 69, p. 481- 486, 2004.

FREITAS, F. F. et al. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 33–38, 2011.

GHAFFARI, A. et al. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit intended for sigmoidal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 175–186, 2007.

GUIDINI, C. Z. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

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

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 43–54, 2006.

HARRINGTON, L. K.; MAYBERRY, J. F.; A re-appraisal of lactose intolerance. **International Journal of Clinical Practice**, v. 62, p 1541–1546, 2008.

HE, H.; ZHANG, X.; SHENG, Y. Enteric-coated capsule containing  $\beta$ -galactosidase-loaded polylactic acid nanocapsules: enzyme stability and milk lactose hydrolysis under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Research**, v. 81, p. 479–484, 2014.

HEIDTMANN, R. B. et al. Caracterização Cinética e Termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 Fracionada Com Sulfato de Amônio. **Brazilian Journal of Food Technol**, v. 15, p. 41-49, 2012.

HILLIOU, L. et al. Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 201-208, 2006.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2012.

HUSAIN, Q.  $\beta$ -Galactosidases and their potential applications: a review. **Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 41–62, 2010.

JOCHEMS, P. et al. Characterization and optimization of  $\beta$ -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 580–58, 2011.

JUNG, J.; ARNOLD, R.; WICKER, L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116–121, 2013.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 3. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

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, J. et al. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 27–36, 2015

MA, X. et al. Synthesis and characterization of pectin/poly (sodium acrylate) hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 313– 319, 2011.

MAHMOOD, W. A. K.; KHAN, M. M. R.; YEE, T. C. Effects of Reaction Temperature on the Synthesis and Thermal Properties of Carrageenan Ester. **Journal of Physical Science**, v. 25, p. 123–138, 2014.

MAMMARELLA, E. J.; RUBIOLO, A. C. Study of the deactivation of galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 7–13, 2005.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-olissacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 203-240, 2009.

MARTINS, J. T. et al. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of ediblefilms made thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 280-289, 2012.

MARUDOVA, M.; MACDOUGALL, A. J. ; RING, S. G. Pectin–chitosan interactions and gel formation. **Carbohydrate Research**, v. 339 , p. 1933–1939, 2004.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATTHEWS, S. B. et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgraduat Medical Journal**, v 81: p. 167–73, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31–59, 2017.

MEHRDAD, H.; AMIR, A.; PEDRAM, R. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Drug Delivery Reviews**, v. 60 , p. 1638–1649, 2008.

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

MITSUKA, M. **Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano**. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MONTALTO, M. et al., Management and treatment of lactose malabsorption. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12. p. 187–191, 2006.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 681-689, 2012.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDINI, E.  $\beta$ -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 10–15, 2011.

NGUYEN, B. T. et al. Synergistic effects of mixed salt on the gelation of k-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 10–15, 2014.

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

PANESAR, P. S. et al. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-16, 2010.

PAȘCALCĂU, V. et al. The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 536, p. 418– 423, 2012

PATIL, J. S. et al. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, p. 241-248, 2010.

PEREIRA, L. et al. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIRATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1903-1909, 2009.

PERISSINATO, A. G. et al. Simple Strategy to Protect Lactase Activity in Solid Formulation. **Current Drug Delivery**, v. 14, p. 28521-28524, 2017.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p. 362-369, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SMITH, K. et al. Sol-gel encapsulated horseradish peroxidase: A catalytic material for peroxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 4247–4252, 2002.

SOUZA, R. J. M. et al. Imobilização de  $\beta$ -galactosidase em PHB magnetizado. **Evolvere Science**, v. 3, p. 181-184 , 2014.

SQUILLANTE, E. et al. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with Eudragit L-100. **Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers**, v. 20, p. 153–167, 2003.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, p. 206-228, 2003.

SRIAMORNSAK, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169, p. 213-220, 1998.

TUMTURK, H. et al. Preparation and application of poly (N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide/ $\kappa$ -Carrageenan hydrogels for



immobilization of lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 281–285, 2007.

ULLAH, F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 414–433, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. The United States Pharmacopeia Convention. Rockville, 2005. Part 2, p. 745-823.

UY, S. F. et al. Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: a preliminary investigation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1357-1364, 2005.

VAN DE VELDE, F. et al. The structure of  $\kappa/\iota$ -hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1113-1129, 2005.

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.

WAHBA, M. I. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 877–886, 2016.

WEBBER V. **Extração e caracterização de carragenana obtida de *kappaphycus alvarezii***. 2010. 135 f. Dissertação (Mestre Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 213-230, 2001.

ZHANG, Z. et al. Encapsulation of lactase ( $\beta$ -galactosidase) into  $\kappa$ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food Chemistry**, v. 200, p. 69–75, 2016.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; MCCLEMENTS, D. J. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, v. 67, p. 85-93, 2017.