

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LAIANE ANTUNES LOPES

HIDRÓLISE CONTROLADA DAS PROTEÍNAS DO LEITE DE
VACA COM PROTEASES IMOBILIZADAS PARA REDUÇÃO
DA ALERGENICIDADE

SÃO CARLOS-SP

2020

LAIANE ANTUNES LOPES

HIDRÓLISE CONTROLADA DAS PROTEÍNAS DO LEITE DE VACA COM
PROTEASES IMOBILIZADAS PARA REDUÇÃO DA ALERGENICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Coorientadora: Dra. Paula Kern Novelli

São Carlos-SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Laiane Antunes Lopes, realizada em 29/09/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSCar)

Profa. Dra. Gisella Maria Zanin (UEM)

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano (UNIFAL)

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Dedico esse trabalho à minha mãe
Rosângela pelo amor e apoio
incondicional!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder o dom da vida, por ouvir as minhas preces e alimentar o meu espírito.

Aos meus pais Rosângela e Wandick, meus irmãos Vinícius e Larissa, minha sobrinha Ana Lívia, meus cunhados Maíra e Adim pelo apoio e amor transmitidos, essenciais para que eu completasse essa jornada.

À Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano pela oportunidade de estar sob sua orientação desde o mestrado, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência e por sempre me incentivar.

Ao Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli agradeço pela disposição em coorientar este trabalho, pela paciência e imensurável apoio e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Paula Kern Novelli agradeço a coorientação, ensinamentos e amizade durante todos estes anos.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal pelo importante apoio na realização dos experimentos *in vivo*, bem como à ajuda dos alunos e técnicos do LIDI (Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas), especialmente à Carol e Karina.

Às minhas primas Bella, Aline e Lara pela amizade e irmandade que supera a distância e que estiveram sempre presentes.

Ao Peti por ser meu amigo fiel e à Mel pela doçura.

Aos queridos amigos que fiz em Sanca: Letícia, Thaís Baldez, Sheyla, Cíntia, Carlota, Manu, Murilo, Vitor, Mateus, Renato, Carlos Eduardo, Sofia, Thalita. Obrigada pela amizade, apoio e por todos os nossos momentos de distração que aliviaram essa jornada.

Aos colegas de AP35: Ediane, Carol, Juliana, Mayara, Taíse, Ana, Vanessa, Maria Carolina, Laís, Josivan, Erick, Daniel, Bruna, Natália, Tiago, Rafael Araújo, Rafael Akisue, Davi, Gabriel, Margarita, Felipe. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelas festinhas de aniversariantes e pelos momentos de “café”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (CNPq-Universal N° 422131/2016-4) e pela concessão de bolsa (Processo #141487/2016-0); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Novozymes Latin America Ltda (Araucária, PR) pela doação das enzimas Novo-Pro® D e Alcalase®.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

"Nothing in life is to be feared; it is only to be understood." (Marie Curie)

"The life is not about career; it is about life experiences." (Chadwick Boseman)

RESUMO

A alergia ao leite de vaca é clinicamente uma reação anormal às proteínas do leite de vaca reguladas por mecanismos imunológicos e que atinge principalmente crianças. A hidrólise parcial dessas proteínas, catalisada por proteases, oferece uma maneira eficiente de eliminar, ou pelo menos reduzir, o conteúdo alergênico do leite sem afetar consideravelmente suas propriedades físico-químicas e sensoriais. O uso de proteases livres (solúveis) requer inativação térmica da enzima ao final da reação, além de adicionar ao produto uma molécula contaminante. Por outro lado, o uso de proteases imobilizadas permite fácil separação entre enzima e produto e reutilização do catalisador. A imobilização multipontual pode levar ainda a importante aumento na estabilidade do biocatalisador. Neste trabalho, as proteases Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC) foram imobilizadas em suporte agarose 6% ativada com grupos glioxil (AgGly) e os derivados obtidos foram aplicados na hidrólise de proteínas do leite de vaca visando redução dos fatores alergênicos no leite. O estudo da imobilização de NPD em AgGly foi feito, inicialmente, usando-se caseína (alta massa molecular) e éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE, baixa massa molecular) como substratos. Os melhores resultados, rendimento de imobilização (RI) de 90%, atividade recuperada (AR) de 92% (medindo-se a hidrólise de BTEE) foram obtidos com tempo de imobilização de 24 h, a 20 °C e pH 10,0. Esse derivado foi cerca de 20 vezes mais estável do que a protease solúvel dialisada, a 50 °C e pH 6,5, e permitiu atingir grau de hidrólise (GH) da caseína (26g/L) mais alto (40%) que o atingido com NPD solúvel (34%), sob as mesmas condições reacionais, além de permitir reutilização do derivado por pelo menos dez bateladas de 2 h de reação. Foram ainda testadas diferentes estratégias para aumentar a estabilização da NPD em AgGly: aaminação química da superfície da enzima antes da imobilização em AgGly; revestimento do derivado de AgGly com polietilenoimina (PEI); e modificação parcial dos grupos glioxil do suporte com grupos carboxílicos, utilizando glicina para ser fixada no suporte, e subsequente imobilização e revestimento com PEI. No entanto, nenhuma dessas estratégias levou a uma estabilização maior do que a que já havia alcançado com a imobilização tradicional. A imobilização em suporte quitosana-glutaraldeído também não conduziu a melhores resultados que os já obtidos com AgGly. Dessa forma seguiu-se com o derivado AgGly-NPD tradicional e este foi comparado com a enzima ALC imobilizada em AgGly (AgGly-ALC). Os parâmetros de imobilização das enzimas ALC e NPD (dialisadas e não dialisadas) em AgGly, RI, AR e estabilidade, apresentaram valores semelhantes, obtidos nas mesmas condições de imobilização. As atividades recuperadas dos derivados de ALC e NPD foram menores quando medidas com hidrólise de caseína, o que sugere presença de impedimento estérico na hidrólise desse grande substrato. Na hidrólise de proteínas, maior o grau de conversão (GH), menores serão os peptídeos obtidos. Contudo, o aumento do grau de hidrólise a valores maiores que 5% mostraram conduzir também a alterações visíveis no produto. Ambos os derivados (AgGly-NPD e AgGly-ALC) permitiram obter aproximadamente 70% de peptídeos com tamanhos menores que 12,4 kDa, para grau de hidrólise de 5%, sugerindo que as principais proteínas alergênicas podem ter sido já suficientemente reduzidas com essa conversão. No caso da protease solúvel, somando-se às desvantagens já conhecidas comparando-se com protease imobilizada, ocorre ainda dificuldade de controle do GH final, devido à necessidade de inativação por aquecimento. Em relação à análise sensorial dos hidrolisados obtidos, os hidrolisados 5%, obtidos com proteases imobilizadas, apresentaram apenas pequenas alterações nas propriedades físico-químicas do leite, com AgGly-ALC levando a características sensoriais mais próximas do leite integral que AgGly-NPD. Visando reduzir o esperado sabor amargo que surge na hidrólise com a geração de peptídeos hidrofóbicos no produto, foram testadas as adições de 5 ou 10% de α -ciclodextrina (α -CD) no hidrolisado com AgGly-ALC, não se observando redução no sabor amargo, o que sugere que os peptídeos gerados na hidrólise do leite não se adequaram à cavidade da molécula de α -CD.

Os testes *in vivo* mostraram que grau de hidrólise das proteínas do leite de 5%, com os catalisadores AgGly-NPD e AgGly-ALC, permitiram reduzir a indução da alergenicidade às proteínas do leite frente ao modelo *in vivo* avaliado, o que não se observou com os hidrolisados com proteases solúveis, que atingiram mais altos graus de hidrólise. Com a enzima solúvel, embora tenha sido obtido maior porcentagem em massa de peptídeos menores de 6,5 kDa, o aquecimento do leite até a inativação da enzima (de 50 °C para 90 °C) pode ter levado à exposição de epítomos ocultos ou ao surgimento de novos epítomos com a desnaturação de proteínas, o que induziu a uma maior resposta alérgica desses hidrolisados comparada aos hidrolisados com AgGly-NPD e AgGly-ALC.

Palavras-chave: imobilização e estabilização enzimática; endoproteases; agarose-glioxil, hidrólise de proteínas; alergia ao leite de vaca.

ABSTRACT

Allergy to cow's milk is clinically an abnormal reaction to cow's milk proteins regulated by immunological mechanisms and which affects mainly children. The partial hydrolysis of these proteins, catalyzed by proteases, offers an efficient way to eliminate, or at least reduce, the allergenic content of milk without significantly affecting its physicochemical and sensory properties. The use of free (soluble) proteases requires thermal inactivation of the enzyme at the end of the reaction, in addition to adding a contaminating molecule to the product. The use of immobilized proteases allows easy separation between enzyme and product and reuse of the catalyst. Multipoint immobilization can also lead to an important increase in the stability of the biocatalyst. In this work, Novo-Pro[®] D (NPD) and Alcalase[®] (ALC) proteases were immobilized on 6% agarose support activated with glyoxyl groups (AgGly) and the derivatives obtained were applied to the hydrolysis of cow's milk proteins to reduce allergenic factors in milk. The study of NPD immobilization in AgGly was done, initially, using casein (large molecular weight) and N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE, low molecular weight) as substrates. The best results, immobilization yield (YI) of 90%, recovered activity (RA) of 92% (measuring the BTEE hydrolysis) were obtained with immobilization time of 24 h, at 20 °C and pH 10.0. This derivative was about 20 times more stable than the dialyzed soluble protease, at 50 °C and pH 6.5, and allowed to achieve a higher degree of hydrolysis (GH) of the casein (26g/L) (40%) than that reached with soluble NPD (34%), under the same reaction conditions. In addition, the derivative could be reused for at least ten batches of 2 hours of reaction. Different strategies were also tested to increase NPD stabilization in AgGly: chemical amination of the enzyme surface before immobilization on AgGly; coating the AgGly derivative with polyethyleneimine (PEI); and partial modification of the glyoxyl groups of the support with carboxylic groups, using glycine to be fixed on the support, and subsequent immobilization and coating with PEI. However, none of these strategies led to greater stabilization than that achieved with the traditional immobilization. Immobilization on chitosan-glutaraldehyde support also did not lead to better results than those already obtained with AgGly. Thus, it followed with the traditional AgGly-NPD derivative and this was compared with the enzyme ALC immobilized on AgGly (AgGly-ALC). The immobilization parameters of ALC and NPD enzymes (dialyzed and non-dialyzed) on AgGly, YI, RA and stability, presented similar values, obtained under the same immobilization conditions. The activities recovered from the derivatives of ALC and NPD were lower when measured with casein hydrolysis, which suggests the presence of a steric impediment in the hydrolysis of this large substrate. In the protein hydrolysis, the higher the degree of hydrolysis (DH), the lower the peptides obtained. However, increasing the degree of hydrolysis to values greater than 5% has also been shown to lead to visible changes in the product. Both derivatives (AgGly-NPD and AgGly-ALC) allowed to obtain approximately 70% of peptides with sizes smaller than 12.4 kDa, for a hydrolysis degree of 5%, suggesting that the main allergenic proteins may have already been sufficiently reduced with this conversion. In the case of soluble protease, in addition to the known disadvantages compared to immobilized protease, there is still difficulty in controlling the final GH, due to the need for inactivating by heating. Regarding the sensory analysis of the hydrolysates obtained, the hydrolysates with 5% DH, obtained with immobilized proteases, showed only small changes in the physicochemical properties of milk, with AgGly-ALC leading to sensory characteristics closer to whole milk than AgGly-NPD. In order to reduce the expected bitter taste that appears in hydrolysis with the generation of hydrophobic peptides in the product, the additions of 5 or 10% of α -cyclodextrin (α -CD) in the hydrolysate with AgGly-ALC were tested, with no reduction in the bitter taste, which suggests that the peptides generated in the hydrolysis of milk did not suit to the cavity of the α -CD molecule. In vivo tests showed that the DH of milk proteins of 5%, with the catalysts AgGly-NPD and

AgGly-ALC, allowed to reduce the induction of allergenicity to the milk proteins compared to the in vivo model evaluated, which was not observed with hydrolysates with soluble proteases, which reached higher DH. With the soluble enzyme, although a higher mass percentage of peptides less than 6.5 kDa was obtained, the heating of the milk until the enzyme inactivation (from 50 °C to 90 °C) may have led to the exposure of hidden epitopes or to the appearance of new epitopes with protein denaturation, which induced a greater allergic response of these hydrolysates compared to those hydrolyzed with AgGly-NPD and AgGly-NPD.

Keywords: enzyme immobilization and stabilization; endoproteases; agarose-glyoxyl; protein hydrolysis; cow's milk allergy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1- Visão geral dos eventos durante a sensibilização e uma reação alérgica. Quando o antígeno passa pela barreira epitelial, é captado e processado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Essas células apresentam o antígeno em uma molécula de MHC de classe II junto com moléculas coestimulatórias para células T naive específicas do antígeno, que são ativadas e desenvolvem um fenótipo Th2. As células T ativadas estimulam a diferenciação das células B em células plasmáticas, que passam a produzir anticorpos específicos para o antígeno (IgE). Esses anticorpos se ligam ao receptor de alta afinidade Fc3RI nos mastócitos. Após a reexposição do mesmo antígeno, os anticorpos reticulam e a desgranulação dos mastócitos é induzida. A liberação de uma variedade de compostos resulta em sintomas alérgicos..... 29
- Figura 2.2-Epítotos e suas estruturas básicas 30
- Figura 2.3- Métodos de imobilização de enzimas 39
- Figura 3.1- Representação esquemática de uma enzima (por exemplo, uma protease) imobilizada em um suporte poroso para ser usada na hidrólise de um substrato grande (por exemplo, uma proteína como a caseína)..... 43
- Figura 3.2 - Perfis de imobilização da Novo-Pro[®] D (NPD) em agarose-glioxil (20 °C, pH 10,0, carga de proteína de 4,6 mg/g de suporte). (■) Solução enzimática controle da enzima livre nas condições de imobilização, (●) atividade da suspensão e (▲) atividade do sobrenadante. As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2..... 49
- Figura 3.3 - Rendimento de imobilização da enzima (■), atividade recuperada (●) e fator de estabilidade a 50 °C e pH 8,0 (▲) para diferentes tempos de imobilização (20 °C, pH 10,0, carga de proteína 4,6 mg/g de suporte) de NPD em agarose-glioxil. Os fatores de estabilidade foram calculados como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizadas e livres dialisadas, obtidas a partir do modelo Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais de inativação térmica (Figura S1, Material Suplementar). As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2..... 50
- Figura 3.4 - Rendimento de imobilização da enzima (■), atividade recuperada (●) e fator de estabilidade (▲) para diferentes tempos de imobilização (20 °C, pH 10,0, carga de proteína 1 mg/g de suporte) de NPD em agarose-glioxil. O fator de estabilidade foi calculado como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizada e livre dialisada, obtido a partir do modelo Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais de inativação térmica (Figura S2 em Material Suplementar). As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2. 52
- Figura 3.5 - Efeito da carga de proteína no rendimento de imobilização da enzima (barras) e atividade recuperada (linha) na imobilização de NPD em agarose-glioxil a 20 °C, pH 10,0 e tempo de reação de 24 h. 53
- Figura 3.6 - Proteína imobilizada (■) e atividade relativa do biocatalisador (▲) em função da carga de proteína oferecida à imobilização de NPD em agarose-glioxil a 20 °C e pH 10,0 por 24 h de tempo de reação. 54
- Figura 3.7 - Perfil de atividade em função da temperatura para (■) NPD livre e (●) imobilizada (tempo de imobilização de 24 h em agarose-glioxil). Condições de ensaio de atividade: hidrólise de 0,36 mM de éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) em diferentes temperaturas e pH 7,0 por 5 min..... 55
- Figura 3.8 - (A) Atividades de NPD (■) livre e (●) imobilizado com 24 h em agarose-glioxil a 25 °C e diferentes pHs e (B) perfil de atividade enzimática residual, medido sob condições

padrão (hidrólise de solução BTEE 0,36 mM a 25 °C e pH 7,0 por 5 min, Seção 3.2.2), após 4 h de incubação em diferentes valores de pH.	55
Figura 3.9 - Perfis de inativação térmica da NPD, (■) livre dialisada e (●) imobilizada em agarose-glioxil, por 24 h a 50 °C e pH 6,5. As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2.....	56
Figura 3.10 - Perfil de hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e 500 rpm de agitação catalisada por NPD livre em cargas diferentes (g proteína/L reator): (■) 0,78, (●) 0,26 e (▲) 0,08.	57
Figura 3.11 - Perfil de hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e 500 rpm de agitação catalisada por NPD livre e imobilizada (AgGly-NPD carregada com 18,9 mg de proteína/g de suporte) usando uma concentração de enzima no reator de (A) 0,08 g/L e (B) 0,26 g/L.....	58
Figura 3.12 - Ensaio de reutilização (ciclos de batelada de reação de 2 h) de NPD imobilizada em agarose-glioxil (10 mg de proteína/g de suporte) na hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e agitação de 500 rpm, usando uma concentração de enzima no reator de 0,26 g/L....	59
Figura 4.1 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro [®] D (NPD) solúvel e derivados preparados agarose-glioxil (AgGly-NPD) e revestidos superficialmente com polietilenomina de diferentes massas moleculares (AgGly-NPD-PEI 2 kDa, 25 kDa e 750 kDa) a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais.....	68
Figura 4.2 – (A) Rendimento de imobilização enzimática (barras) e atividade recuperada (linha azul) para Novo-Pro [®] D aminada (NPDam) e não aminada (NPD) imobilizadas em agarose-glioxil em diferentes pHs (25 °C, tempo de reação de 24 h e carga de proteína de 1,2 mg/g suporte). (B) Perfis de inativação térmica da NPD solúvel, não aminada e aminada (NPDam), e derivados preparados com a enzima não aminada (AgGly-NPD) e aminada (AgGly-NPDam) a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais.....	70
Figura 4.3 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro [®] D (NPD) solúvel e derivados preparados em suportes AgGly, AgGly-glicina e AgGly-glicina-PEI a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais.	71
Figura 4.4 – Estabilidade térmica a 50 °C e pH 8,0 de Novo-Pro [®] D solúvel não dialisada (●), solúvel dialisada (▼), imobilizada em agarose-glioxil (▲) e quitosana-glutaraldeído (■). Linha continua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley (1987) ajustados aos dados experimentais.....	73
Figura 4.5 - (A) Perfis de inativação térmica de Novo-Pro [®] D solúvel não aminada (NPD) e aminada (NPDam) e derivados preparados em suportes AgGly e AgGly-glicina, seguido ou não de modificação com PEI a 50 °C, pH 6,5. (B) Perfis de inativação térmica de NPD e NPDam imobilizadas em AgGly a 50 °C, pH 6,5 ou pH 8,0	74
Figura 5.1 - Eletroforese SDS-PAGE de proteases usando gel de poliacrilamida 15%. Pistas 1-Marcador de massa molecular; 2-Novo-Pro [®] D (NPD) (26,7 mg/mL e 100 µg no gel); 3-Alcalase [®] (ALC) (25 mg/mL e 100 µg no gel); 4-NPD Dialisada (2,5 mg/mL e 10 µg no gel); 5-ALC Dialisada (8,04 mg/mL e 32 µg no gel); 6- NPD (25 mg/mL e 100 µg no gel); 7-NPD (25 mg/mL e 100 µg no gel.	84
Figura 5.2 – Perfis de inativação térmica das enzimas Novo-Pro [®] D (NPD) e Alcalase [®] (ALC) dialisadas e não dialisadas a 50 °C e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M).....	85

Figura 5.3 – Perfil de atividade enzimática residual medida com substrato BTEE das enzimas Alcalase® (ALC) não dialisada e dialisada, Novo-Pro® D (NPD) não dialisada e dialisada depois de 72 h de incubação a 25 °C em pH 6,5 e pH 10,0.....	86
Figura 5.4 - Perfil de inativação da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC), livres e imobilizadas, dialisadas e não dialisadas, a 50°C e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1M). Derivados carregados com 1,3 mg proteína/g suporte.	88
Figura 5.5 – Perfil de atividade enzimática residual medida com substrato BTEE das enzimas Alcalase® (ALC) imobilizada e Novo-Pro® D (NPD) imobilizada, não dialisadas e dialisadas, depois de 72 h de incubação a 25 °C em pH 6,5 e pH 10. Os dados de estabilidade para as enzimas solúveis que já foram apresentados na Figura 5.3 foram adicionados para fim de comparação: (■) pH 6,5 e (●) pH 10,0.	88
Figura 5.6 - Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. Pistas 1- Marcador de massa molecular; 2- Leite Pasteurizado, 3-Leite Integral, 4-Hidrolisado 5% com NPD solúvel (aquecimento), 5- Hidrolisado 5% com NPD solúvel (gelo), 6- Hidrolisado 5% com NPD imobilizada, 7- Marcador. Concentração das amostras: 1,0 mg proteína/mL. Quantidade de proteína no gel: 20 µg por poço.....	92
Figura 5.7 – Perfis de grau de hidrólise (GH) ao longo do tempo de reação da hidrólise das proteínas do leite integral catalisadas pela Novo-Pro® D e Alcalase® imobilizadas a 50 °C, [E]: 200 U/L, pH 6,5 controlado com KOH 20 mM. Derivados com baixa carga, 0,7 mg proteína/g suporte.	95
Figura 5.8 - Fotografias de leite UHT integral não hidrolisado (A), hidrolisados com GH 5 (B), 10 (C) e 20% (D), sob ação de NPD solúvel antes do aquecimento para inativação da enzima e hidrolisados com GH 5 (E), 10 (F) e 20% (G), sob ação de NPD solúvel depois do aquecimento para inativação da enzima.....	95
Figura 5.9 - Intensidades das características sensoriais de cor, presença de bolhas e consistência visual das amostras de leite integral e hidrolisados (GH de 5%): Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase® (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC imobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α-CD 10% (LH AgGly-ALC α-CD 10%); LH com ALC imobilizada em AgGly com adição de α-CD 5% (LH AgGly-ALC α-CD 5%); LH com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro® D imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral UHT.	102
Figura 5.10 - Intensidades das características sensoriais relacionadas à odor e sabor característico, sensação de adstringência e consistência na boca das amostras: Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase® (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC imobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α-CD 10% (LH AgGly-ALC α-CD 10%); LH com ALC imobilizada em AgGly com adição de α-CD 5% (LH AgGly-ALC α-CD 5%); LH com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro® D imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral.	103
Figura 5.11 - Intensidades das características sensoriais relacionadas aos gostos básicos: doce, salgado, amargo e residual amargo das amostras de leite integral e hidrolisados (GH de 5%): Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase® (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC imobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α-CD 10% (LH AgGly-ALC α-CD 10%); LH com ALC imobilizada em AgGly com adição de α-CD 5% (LH AgGly-ALC α-CD 5%); LH com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro® D imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral.	103

Figura 5.12 - Características sensoriais das amostras de leite avaliadas em relação à aparência, odor, sensação na boca e sabor (leite integral UHT e hidrolisados com GH de 5%). Área verde: atributos positivos. Área vermelha: atributos negativos.....	104
Figura 6.1 – Esquema de sensibilização e indução da alergia nos animais do experimento 1.	111
Figura 6.2 – Esquema de sensibilização e indução da alergia nos animais do experimento 2.	111
Figura 6.3- Contagem diferencial de (A) neutrófilos/mm ³ , (B) eosinófilos/mm ³ e (C) células mononucleares/mm ³ de sangue dos grupos experimentais: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média ±EPM. Os símbolos ** (p < 0,01) *** (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.	118
Figura 6.4- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm ³ , (B) eosinófilos/mm ³ e (C) células mononucleares/mm ³ de LBA dos grupos experimentais: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média ±EPM. Os símbolos * (p < 0,05) e **** (p < 0,0001) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.	120
Figura 6.5- Detecção de anticorpos IgE no <i>pool</i> do plasma dos animais após a sensibilização da placa com (A) α-lactalbumina (α-LA), (B) β-lactoglobulina (β-LG) e (C) caseína de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). O símbolo **** (p < 0,0001) representa a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.	122
Figura 6.6- Concentrações da citocina (A) IL-4 e (B) IL-5 em pg/mL no <i>pool</i> do plasma dos animais de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média ± EPM. Os símbolos * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e **** (p < 0,0001) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.....	124
Figura 6.7-Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: G1- controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2- sensibilizado e consumiu LNH, G3- sensibilizado e consumiu LH com NPD solúvel, G4- sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G5- controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite. Coloração: HE. Aumento 10X.....	125
Figura 6.8- Análise morfológica de cortes histológicos do intestino dos animais de cada grupo experimental: G1- controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2- sensibilizado e consumiu LNH, G3- sensibilizado e consumiu LH com NPD solúvel, G4- sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G5- controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite. Coloração: HE. Aumento 10X.....	126
Figura 6.9- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm ³ , (B) eosinófilos/mm ³ e (C) células mononucleares/mm ³ de sangue de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD), leite hidrolisado com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC), leite hidrolisado com ALC solúvel (LH ALC Solúvel) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média ±EPM. Os símbolos **	

(p < 0,01) e * (p < 0,05) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa..... 127

Figura 6.10- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de LCP de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD), leite hidrolisado com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC), leite hidrolisado com ALC solúvel (LH ALC Solúvel) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média ±EPM. Os símbolos * (p < 0,05), *** (p < 0,001) e **** (p < 0,0001) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa. 129

Figura 6.11- Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, G3-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G4-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, G5-sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, G6-sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH).Coloração: HE. Aumento 10X. 131

Figura 6.12- Análise morfológica de cortes histológicos do intestino dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, G3-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G4-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, G5-sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, G6-sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH). Coloração: HE. Aumento 10X. 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Distribuição das caseínas e principais proteínas de soro, do leite bovino e humano.	27
Tabela 2.2 – Principais propriedades das proteases.	34
Tabela 3.1 - Atividades recuperadas (AR) de derivados de NPD de baixa e alta carga (reação de 24 h a 20 °C e pH 10,0) medidas com substrato pequeno (BTEE) e grande (caseína).	57
Tabela 4.1 - Avaliação da aminação química e procedimento de diálise da Novo-Pro® D (NPD) por atividade enzimática e proteínas totais para diferentes amostras.	69
Tabela 4.2 - Avaliação da aminação química de Novo-Pro® D (NPD) pelo método colorimétrico do TNBS para a determinação de grupos amino.	70
Tabela 5.1 – Atividades Específicas da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC) utilizando substrato pequeno (BTEE) e grande (caseína).	83
Tabela 5.2 – Parâmetros do modelo de Sadana-Henley (1987) ajustados aos dados experimentais de inativação térmica da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC) solúveis dialisadas e não dialisadas (50 °C pH 6,5).	85
Tabela 5.3 – Parâmetros de imobilização da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC) não dialisadas imobilizadas em agarose-glioxil (20 °C, 24 h de reação, pH 10,0, e carga enzimática de 0,7 mg/g de suporte).	87
Tabela 5.4 – Perfil peptídico dos hidrolisados de leite de vaca integral a 50 °C e pH 6,5 e grau de hidrólise (GH) igual a 5%.	90
Tabela 5.5 - Perfil peptídico dos hidrolisados de leite de vaca integral a 50 °C, pH 6,5 e GH 5%.	92
Tabela 5.6 – Grau de hidrólise teórico do hidrolisado de leite de vaca (reação catalisada pela Novo-Pro® D solúvel a 50 °C, pH 6,5, [E] = 221,67 U _{BTEE} /L reator) calculado antes da inativação da enzima por aquecimento e grau de hidrólise real calculado após inativação da enzima por aquecimento (90 °C 10 minutos).	93
Tabela 5.7 - Perfil peptídico de hidrolisados de leite integral, preparados a 50°C e pH 6,5 com diferentes graus de hidrólise, usando como catalisador Novo-Pro® D imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD) baixa carga (0,7 mg proteína/g suporte ou 5,6 U/g gel), Alcalase® imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC) baixa carga (0,7 mg proteína/g suporte ou 7,3 U/g gel). [E]: 200 U _{BTEE} /L, pH 6,5 controlado com KOH 20 mM.	94
Tabela 6.1 – Delineamento experimental 1 para experimento <i>in vivo</i>	109
Tabela 6.2 – Delineamento Experimental 2 para experimento <i>in vivo</i>	110
Tabela 6.3 - Perfil peptídico das amostras de leite não hidrolisado (LNH), leite hidrolisado (LH) com NPD solúvel e leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH com AgGly-NPD) usados no experimento <i>in vivo</i> 1. As amostras foram analisadas em SE-HPLC.	114
Tabela 6.4- Perfil peptídico das amostras de leite integral não hidrolisado (LNH), leite integral hidrolisado com NPD imobilizada (LH com AgGly-NPD), leite integral hidrolisado com ALC imobilizada (LH com AgGly-ALC) e leite integral hidrolisado com ALC solúvel (LH com ALC solúvel) usados no experimento <i>in vivo</i> 2. As amostras foram fracionadas por cromatografia de exclusão molecular.	116

Tabela 9.1 - Parâmetros de imobilização da Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase (ALC) dialisadas imobilizadas em agarose-glioxil (20 °C, 24 h de reação, pH 10,0, e carga enzimática de 0,7 mg/g de suporte)..... 147

Tabela 9.2 – Parâmetros do modelo de Sadana-Henley ajustados aos dados experimentais da inativação térmica da NPD e ALC imobilizadas, dialisadas e não dialisadas (50°C e pH 6,5). Fatores de estabilização (FE) foram calculados como a razão entre a meia vida da “enzima imobilizada/enzima livre dialisada”. As meias-vidas da ALcalase e NPD livres foram (11 e 10,2 h) e (9,2 e 9,0 h) não dialisada e dialisada, respectivamente..... 147

Tabela 9.3 - Perfil peptídico de diferentes hidrolisados de leite integral (GH 2,5; 5 e 8%) usando como catalisador Novo-Pro[®] D solúvel (NPD) [E =0,13 U/mL reator]; Novo-Pro[®] D solúvel dialisada (NPD DIAL) [E =0,13 U/mL reator]; NPD imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD) [E =0,85 U/mL reator; derivado 211,6U/g gel]; NPD dialisada imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD-DIAL) [E =0,85 U/mL reator; derivado 237,9U/g gel]; Alcalase[®] solúvel (ALC) [E =0,13 U/mL reator]; Alcalase[®] solúvel dialisada (ALC DIAL) [E =0,13 U/mL reator]; ALC imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC) [E =0,85 U/mL reator; derivado 209 U/g gel]; ALC dialisada imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC-DIAL) [E =0,85 U/mL reator; derivado 252,7 U/g gel]..... 148

LISTA DE ABREVIATURAS

AgGly: agarose-glioxil

AgGly-glicina: agarose-glioxil-glicina

AgGly-ALC: Alcalase[®] imobilizada em agarose-glioxil

AgGly-NPD: Novo-Pro[®] D imobilizada em agarose-glioxil

AgGly-NPDam: Novo-Pro[®] D aminada imobilizada em agarose-glioxil

AgGly-NPD-PEI: Novo-Pro[®] D imobilizada em agarose-glioxil revestidos com polietilenoimina

ALC: Alcalase[®]

APCs: Células apresentadoras de alérgenos e antígenos

B. licheniformis: *Bacillus licheniformis*

BALB/c: Camundongo albino de linhagem isogênica

BSA: Albumina de soro bovino

BTEE: Éster etílico de N-benzoil-L-tirosina

CD: ciclodextrina

CDI: N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida

EDA: Etilenodiamina

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

IgG: Imunoglobulina G

IgE: Imunoglobulina E

IL: Interleucina

IFN- γ : Interferon-gama

LabEnz: Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos do DEQ-UFSCar

LBA: Lavado broncoalveolar

LCP: Lavado da cavidade peritoneal

NPD: Novo-Pro[®] D

NPDam: Novo-Pro[®] D aminada

PEI: Polietilenoimina

Th: T *helper*

TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

UHT: *Ultra High Temperature*

α -LA: α -Lactalbumina

β -LG: β -lactoglobulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Leite de Vaca.....	26
2.1.1 Alergia ao Leite de Vaca.....	27
2.1.2 Métodos para redução da alergenicidade das proteínas do leite de vaca.....	31
2.1.2.1 Hidrólise enzimática de proteínas	32
2.2 Proteases	34
2.3 Imobilização de Enzimas.....	38
3. IMOBILIZAÇÃO DE NOVO-PRO® D POR LIGAÇÃO COVALENTE EM AGAROSE ATIVADA COM GRUPOS GLIOXIL: DESEMPENHO DOS BIOCATALISADORES NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA	42
3.1 Introdução.....	42
3.2 Materiais e Métodos	45
3.2.1 Materiais	45
3.2.2 Ensaio de atividade enzimática padrão usando substrato pequeno.....	46
3.2.3 Procedimento de imobilização NPD.....	46
3.2.4 Efeitos de pH e temperatura na atividade enzimática.....	47
3.2.5 Estabilidades térmicas e de pH da NPD solúvel e imobilizada	47
3.2.6 Ensaio de hidrólise de proteínas e reutilização de biocatalisadores.....	48
3.2.7 Ensaio de Proteína	48
3.3 Resultados.....	48
3.3.1 Efeito do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização de NPD em suporte de agarose-glioxil.....	48
3.3.2 Efeito do carregamento de proteína no desempenho da enzima imobilizada.....	52
3.3.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade da NPD.....	54
3.3.4 Estabilidade térmica em pH 6,5 da NPD solúvel e imobilizada.....	55
3.3.5 Desempenho da NPD Solúvel e Imobilizada na Hidrólise de Caseína.....	56
3.4 Conclusões.....	59
3.5 Material Suplementar	60
4. DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA PROTEASE NOVO-PRO® D EM SUPORTES AGAROSE-GLIOXIL E QUITOSANA-GLUTARALDEÍDO.....	62
4.1 Introdução.....	62
4.2 Materiais e Métodos	64
4.2.1 Materiais	64

4.2.2	Preparação do suporte agarose-glioxil	64
4.2.3	Preparação do suporte quitosana-glutaraldeído	65
4.2.4	Ensaio de atividade enzimática padrão usando BTEE.....	65
4.2.5	Procedimento de imobilização	65
4.2.6	Modificação da superfície da enzima imobilizada	66
4.2.7	Aminação da superfície da enzima solúvel.....	66
4.2.8	Modificação do suporte de agarose-glioxil.....	67
4.2.9	Estabilidades térmicas e de pH da NPD solúvel e imobilizada	67
4.2.10	Ensaio de proteína	67
4.3	Resultados e Discussão.....	67
4.3.1	Modificação da NPD imobilizada em agarose-glioxil com PEI.....	67
4.3.2	Aminação química da NPD	68
4.3.3	Modificação parcial do suporte agarose-glioxil com glicina.....	71
4.3.4	Imobilização da NPD em quitosana-glutaraldeído	72
4.3.5	Estabilidade Térmica a pH 6,5 da Novo-Pro® D Solúvel e Imobilizada	73
4.4	Conclusões.....	74
5.	DESEMPENHO DA NOVO-PRO® D E ALCALASE® SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS NA HIDRÓLISE DO LEITE DE VACA: PERFIS PEPTÍDICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DOS HIDROLISADOS	76
5.1	Introdução.....	76
5.2	Materiais e Métodos	78
5.2.1	Materiais	78
5.2.2	Ensaio de atividade enzimática.....	78
5.2.3	Procedimento de Imobilização da NPD e ALC	79
5.2.4	Eletroforese SDS-PAGE.....	79
5.2.5	Estabilidades térmicas e de pH da NPD e ALC solúveis e imobilizadas	80
5.2.6	Hidrólise do Leite de Vaca	81
5.2.7	Fracionamento de Hidrolisados de Proteínas por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SE-HPLC)	81
5.2.8	Análises Físico-químicas e Sensorial	82
5.2.9	Ensaio de Proteína	82
5.3	Resultados e Discussão.....	82
5.3.1	Caracterização das Enzimas Livres	82
5.3.2	Efeito da Diálise na Estabilidade das Enzimas Solúveis	84
5.3.3	Imobilização de NPD e ALC dialisadas e não dialisadas em suporte agarose-glioxil	

5.3.4	Estabilidade das Enzimas Imobilizadas	87
5.3.5	Desempenho das enzimas livres e imobilizadas (dialisada e não dialisadas) na hidrólise das proteínas do leite a 50 °C e pH 6,5: Influência do GH nos perfis peptídicos ...	89
5.3.6	Análise Visual	95
5.3.7	Análise Físico-Química (ITAL): densidade, acidez, ponto crioscópico.....	96
5.3.8	Análise Sensorial dos Hidrolisados de Leite com GH de 5% e Formulações com α -ciclodextrina	97
5.4	Conclusões.....	104
6.	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ALERGENICIDADE DO LEITE DE VACA HIDROLISADO PELAS PROTEASES NOVO-PRO® D E ALCALASE® LIVRES E IMOBILIZADAS EM AGAROSE-GLIOXIL.....	106
6.1	Introdução.....	106
6.2	Materiais e Métodos	107
6.2.1	Materiais	107
6.2.2	Procedimento de Imobilização da NPD e ALC	108
6.2.3	Hidrólise do Leite	108
6.2.4	Fracionamento de Hidrolisados de Proteínas por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SE-HPLC)	108
6.2.5	Animais e Delineamento Experimental	108
6.2.6	Sensibilização e Indução da Alergia	110
6.2.7	Coleta do sangue, do lavado broncoalveolar (LBA) e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)	112
6.2.8	Análise histopatológica.....	112
6.2.9	Quantificação das citocinas e determinação dos anticorpos	113
6.2.10	Análise Estatística	113
6.3	Resultados e Discussão.....	113
6.3.1	Perfil peptídico dos hidrolisados de leite para análise <i>in vivo</i>	113
6.3.2	Avaliação Celular – Experimento 1	116
6.3.3	Avaliação da produção de anticorpos IgE – Experimento 1	120
6.3.4	Quantificação de citocinas no plasma – Experimento 1	123
6.3.5	Avaliação Histológica – Experimento 1	124
6.3.6	Avaliação Celular – Experimento 2.....	126
6.3.7	Avaliação Histológica – Experimento 2	130
6.4	Conclusões.....	133
7.	CONCLUSÕES GERAIS	134
8.	REFERÊNCIAS	136
9.	APÊNDICE A	147

10.	APÊNDICE B.....	149
------------	------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

A alergia a proteínas do leite de vaca é o resultado da reação imunológica a uma ou mais proteínas do leite (EL-AGAMY, 2007; MICINSKIA et al., 2013). A estimativa global da prevalência de alergia à proteína do leite de vaca é de 2% a 7,5% e bebês de até 2 anos são mais suscetíveis à alergia (PRASAD; SHIVAY, 2020).

Na maioria dos casos, os sintomas de alergia não são específicos e difíceis de diagnosticar, podem aparecer imediatamente ou iniciar várias horas ou mesmo dias após a ingestão de quantidades moderadas a grandes de leite de vaca. Muitos lactentes apresentam sintomas gastrointestinais ou lesões cutâneas (aproximadamente 50 a 60%), enquanto sintomas respiratórios ocorrem em 30% dos casos. Na maioria dos lactentes com alergia ao leite de vaca diagnosticada (75% - 92%), os sintomas incluem mais de dois sistemas de órgãos (EL-AGAMY, 2007; MICINSKIA et al., 2013).

Embora não haja um verdadeiro tratamento para a alergia alimentar, os sintomas podem ser evitados ou prevenidos pela administração de hidrolisados de leite de vaca (KIEWIET et al., 2015). A hidrólise enzimática destrói epítomos lineares e conformacionais (porção da proteína reconhecida pelo anticorpo) e é considerada o modo mais eficaz para reduzir a alergenicidade (KIEWIET et al., 2017).

A hidrólise de proteínas consiste na clivagem de ligações peptídicas gerando pequenos peptídeos e aminoácidos livres (BU et al., 2013; TAVANO, 2013). A hidrólise enzimática pode ser realizada sob condições suaves, evitando assim os ambientes extremos exigidos pelos tratamentos químicos. Geralmente, os processos enzimáticos evitam reações secundárias e não diminuem o valor nutricional da fonte proteica (TAVANO, 2013). Adicionalmente, a enzima empregada e sua especificidade também podem influenciar na eficiência da redução da resposta alérgica (KLEBER et al., 2004).

A modificação das proteínas do leite pela hidrólise enzimática deve ser realizada de forma controlada a fim de não comprometer as características organolépticas do leite. A degradação das proteínas de forma muito intensa pode gerar peptídeos e aminoácidos de sabor desagradável e amargo (MICINSKIA et al., 2013). O controle do grau de hidrólise é importante também porque uma hidrólise superficial pode aumentar a reatividade alérgica da proteína, revelando epítomos antes escondidos no núcleo da estrutura da proteína (TAVANO et al., 2018). Entre as proteínas alérgicas do leite de vaca, pelo menos 66% da alergia ao leite é causada pela β -lactoglobulina (β -LG), 57% pela caseína e porcentagem significativamente menor pela

α -lactalbumina (α -LA) e albumina sérica bovina (BSA) (18%) (MICINSKIA et al., 2013; SGARBIERI, 2005).

Ademais, a eficácia da hidrólise enzimática pode ser aumentada por meio do uso de enzimas imobilizadas no processo de hidrólise (MICINSKIA et al., 2013). O uso das proteases imobilizadas em suportes insolúveis, além de facilitar o controle do grau de hidrólise, permite a sua fácil reutilização. O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido importante para viabilizar o seu uso em processos industriais. A imobilização da enzima permite a sua reutilização, facilita a separação dos produtos e pode aumentar a estabilidade do biocatalisador em condições de processo (DI COSIMO et al., 2013).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos do DEQ-UFSCar (LabEnz) tem ampla experiência com imobilização de enzimas e já realizou trabalhos com hidrólise de proteínas de resíduos líquidos (soro de queijo) e sólidos (farelo e casca de soja), com proteases livres e imobilizadas. Para geração de pequenos peptídeos a partir da hidrólise controlada de proteínas de soro de queijo foram usadas endoproteases e exoproteases imobilizadas, tais como, tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.4), Alcalase[®] (EC 3.4.21.62) e carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) (GALVÃO et al., 2001; PINTO; GIORDANO; GIORDANO, 2009; SOUSA JR et al., 2004; TARDIOLI et al., 2003a, 2003b, 2005).

Neste trabalho foram utilizadas duas formulações líquidas de endoproteases comercializadas pela Novozymes A/S: Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC).

A NPD é uma protease de *Bacillus licheniformis* que apresenta atividade de subtilisina, e é produzida por cultivo submerso de um micro-organismo geneticamente modificado (NOVOZYMES A/S, 2007). Essa enzima opera em condições de pH entre 7,0 a 11,0 e temperatura entre 55 e 75°C (NOVOZYMES A/S, 2020). A NPD já foi estudada pelo grupo do LabEnz na hidrólise de proteínas do farelo de soja (MIRANDA, 2012) e casca de soja (ROJAS et al., 2014). Além disso, esta preparação enzimática tem mostrado resultados promissores na literatura científica na hidrólise de proteínas de polpa de batata (KAMNERDPETCH et al., 2006; WAGLAY; KARBOUNE, 2016), fígado de porco (MALUF et al., 2020), subproduto de bagre (TAN; CHANG; MENG, 2019) e proteínas de soro de leite (ROSA et al., 2018)

Não há relatos na literatura científica de estudo da redução de alergenicidade pela hidrólise de proteínas usando a NPD, bem como o uso dessa enzima na forma imobilizada, o que confere vários pontos de originalidade neste trabalho. Ainda, a obtenção de um processo utilizável industrialmente para geração de um leite consumível por alérgicos a proteínas do leite é perspectiva extremamente gratificante.

A ALC avaliada neste trabalho, Alcalase® 2.4 L FG (grau alimentício), é uma serina endo-peptidase e tem como principal componente enzimática a subtilisina A. É uma protease de *B. licheniformis* e opera em condições ótimas entre 30 e 65°C e pH entre 7,0 e 9,0 (NOVOZYMES A/S, 2016). A ALC é amplamente utilizada na literatura na hidrólise de diversas proteínas tanto na sua forma livre quanto imobilizada, inclusive na hidrólise de proteínas do leite para redução da alergenicidade. A enzima também foi estudada pelo grupo do LabEnz em estudo de modelo cinético da ALC imobilizada em agarose-glioxil na hidrólise de proteínas do soro de leite.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos a imobilização das endoproteases de *B. licheniformis*, NPD e ALC, e a avaliação destas na hidrólise controlada das proteínas do leite de vaca visando à redução dos fatores alergênicos. Visando cumprir os objetivos deste trabalho, propôs-se a seguinte estratégia experimental:

- Busca de um derivado ativo e estável da NPD por meio da imobilização da enzima em agarose e quitosana, ativadas com glicidol/oxidadas com periodato de sódio (grupos aldeídos alifáticos lineares - glioxil) e glutaraldeído, respectivamente;
- Caracterização dos derivados obtidos: efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática, avaliação da estabilidade térmica e operacional (reciclo);
- Caracterização das enzimas NPD e ALC solúveis e imobilizadas: avaliação da estabilidade térmica e de pH nas condições de hidrólise do leite de vaca;
- Estudo da hidrólise do leite de vaca pelas enzimas NPD e ALC, livres e imobilizadas, por meio da investigação da influência do grau de hidrólise no perfil proteico obtido, nas propriedades físico-químicas e sensoriais do leite e na sua alergenicidade.

A Tese está estruturada em capítulos, como segue:

Capítulo 2: “Revisão da Literatura” abordando os principais tópicos envolvidos neste trabalho.

Capítulo 3: “Imobilização de Novo-Pro® D por ligação covalente em agarose ativada com grupos glioxil: Desempenho dos biocatalisadores na hidrólise de caseína”. Este capítulo é apresentado em forma de artigo científico que foi publicado na revista *Catalysts* 2020, 10, 466 (doi:10.3390/catal10050466).

Capítulo 4: “Diferentes estratégias para imobilização e estabilização da protease NPD em suportes agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído”. Neste capítulo foram estudadas diferentes estratégias de estabilização da NPD: recobrimento do derivado com polietilenoimina

(PEI), aaminação da NPD solúvel, modificação do suporte agarose-glioxil com glicina e imobilização da enzima em suporte quitosana-glutaraldeído.

Capítulo 5: “Desempenho da NPD e ALC, solúveis e imobilizadas, na hidrólise do leite de vaca: Perfis peptídicos e propriedades físico-químicas e sensoriais dos hidrolisados”. Foram estudados os parâmetros de imobilização e atividade enzimática das proteases determinados por hidrólise de substrato grande (caseína) e pequeno (éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE)), bem como a estabilidade delas em temperatura e pH nas condições de hidrólise do leite. Também, os hidrolisados obtidos da hidrólise do leite de vaca pela NPD e ALC solúveis e imobilizadas foram caracterizados quanto ao perfil peptídico e análises físico-químicas e sensoriais.

Capítulo 6: “Avaliação *in vivo* da alergenicidade do leite de vaca hidrolisado pelas proteases NPD e ALC solúveis e imobilizadas em agarose-glioxil”. Neste capítulo foi avaliado o potencial alergênico dos hidrolisados de leite de vaca em modelo *in vivo* e a influência dos perfis peptídicos na alergenicidade dos hidrolisados frente ao modelo experimental estudado.

Capítulo 7: “Conclusões Gerais” a partir dos principais resultados obtidos neste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite de Vaca

O leite de vaca é composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas. As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (MICINSKIA et al., 2013; SGARBIERI, 2005).

As caseínas são fosfoproteínas que, em sua forma natural, apresentam-se formando agregados ou partículas (micelas), sendo as proteínas mais abundantes do leite de vaca (concentração no leite bovino 26 g/kg, ponto isoelétrico 4,6). As micelas medem de 500 a 3.000 angstroms de diâmetro e apresentam massa molecular da ordem de $2,5 \times 10^8$ Daltons. Seu conteúdo varia na faixa de 2,6 a 2,8%, o que representa aproximadamente 79% das proteínas totais do leite. Existem cinco frações de caseína no leite de vaca: α_1 , α_2 , β , κ e γ , que constituem 30%, 9%, 28%, 10% e 2% da quantidade total de caseína, respectivamente (MICINSKIA et al., 2013; SGARBIERI, 2005). Caseínas no leite das diferentes espécies diferem no número de fração, composição de aminoácidos e seus mapeamentos peptídicos (EL-AGAMY, 2007).

Proteínas do soro constituem aproximadamente 0,6% da composição do leite e apresentam-se como moléculas individualizadas e solúveis, representam um grupo importante com altas propriedades nutricionais e funcionais. As proteínas de soro incluem β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbumina (α -LA), lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas, transferrina e proteose-peptonas (MICINSKIA et al., 2013). O leite humano praticamente não contém β -LG (Tabela 2.1), entretanto, essa proteína está presente no soro de leite de vaca, búfala, ovelha, cabra, égua e burra (EL-AGAMY, 2007).

β -LG é a proteína mais abundante (massa molecular 18,3 kDa) no soro de leite, representando 50% da proteína total na fração de soro de leite (concentração no leite bovino 3,2 g/kg, ponto isoelétrico 5,2). A β -LG ocorre naturalmente como uma mistura de monômeros e dímeros, mas a proporção de monômeros aumenta após o aquecimento a 70 °C (MONACI et al., 2006). Em temperaturas superiores a 60 °C a desnaturação das proteínas do soro se inicia (em especial os aminoácidos sulfurados da β -LG) e a 90 °C / 5min a desnaturação é total. Essa desnaturação térmica é uma reação irreversível. No processo de desnaturação, as proteínas se desdobram e ligações sulfuradas começam a se formar entre as moléculas de β -LG, entre uma

molécula de β -LG e uma molécula de κ -caseína e entre a β -LG e a α -LA (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Tabela 2.1- Distribuição das caseínas e principais proteínas de soro, do leite bovino e humano.

	Leite Bovino	Leite Humano
Caseínas (g/L):		
Caseínas Totais	26,0	3,2
α - S1	10,0	Desprezível
α - S2	2,6	Desprezível
β	9,3	2,2
κ	3,3	1,0
γ	0,8	Desprezível
Proteínas de soro (g/L):		
Proteínas totais	5,6	5,0
β -lactoglobulina	3,2	Desprezível
α -lactalbumina	1,2	2,8
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Desprezível	0,4

Fonte: Adaptado de Sgarbieri (2005)

A α -LA é uma proteína globular de massa molecular 14,4 kDa, ponto isoelétrico 4,2 e sua concentração no leite bovino é 1,2 g/kg. A α -LA constitui 22% da proteína total do soro de leite. No pH natural do leite, pH 6,6 e acima, a α -LA apresenta-se como monômero com sua estrutura terciária (MICINSKIA et al., 2013; MONACI et al., 2006).

2.1.1 Alergia ao Leite de Vaca

A alergia alimentar é uma resposta imunológica anormal devido a uma sensibilização a um alimento ou componente alimentar. Representa um importante problema de saúde, especialmente em países industrializados, onde se estima que afeta cerca de 1 a 2% da população adulta e até 8% das crianças com menos de 3 anos de idade (MONACI et al., 2006). Os alérgenos alimentares mais comuns são leite de vaca, ovo, amendoim, nozes, soja, mariscos e peixes (TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015).

A alergia ao leite de vaca é clinicamente uma reação adversa anormal às proteínas do leite de vaca reguladas por mecanismos imunológicos (BU et al., 2013). A alergia ao leite de vaca é a alergia alimentar mais comum entre crianças pequenas (GRAVERSEN et al., 2020). A estimativa global da prevalência de alergia às proteínas do leite de vaca varia de 2% a 7,5%. A alergia ao leite de vaca é o resultado da reação imunológica a uma ou mais proteínas do leite.

O motivo que distingue a alergia de outras reações adversas ao leite de vaca, como a intolerância à lactose, é imunológico. As principais proteínas alergênicas no leite de vaca são: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína da caseína e α -LA e β -LG no soro de leite (PRASAD; SHIVAY, 2020).

As proteínas do leite de vaca são usadas como auxiliares de processamento e muitos produtos alimentares podem conter quantidades residuais de proteína do leite. O leite materno de mães que consumiram produtos contendo leite de vaca pode ser uma ameaça ao desenvolvimento de alergia devido à absorção de proteínas de vaca, sua passagem pela mucosa intestinal e sua liberação no leite humano (MONACI et al., 2006). A mudança na dieta que envolve a substituição do leite materno pelo leite de vaca é também um fator de risco para o desenvolvimento da alergia à proteína do leite (MICINSKIA et al., 2013). A exposição a proteínas alimentares, especialmente proteínas de leite de vaca durante o período neonatal, também pode desencadear alguns efeitos clínicos e imunológicos correlacionados à imaturidade dos sistemas imunológico e "digestivo" do recém-nascido. Fatores como baixa atividade de pepsina no estômago ao nascer, um mecanismo imaturo de geração de ácido estomacal (pH do estômago é $\pm 3,5$) e mau funcionamento das enzimas pancreáticas e intestinais contribuem para a estabilidade das proteínas do leite de vaca (β -LG e α -LA), limitando sua ingestão gástrica, proteólise e, portanto, expõem os neonatos a respostas alérgicas (MONACI et al., 2006).

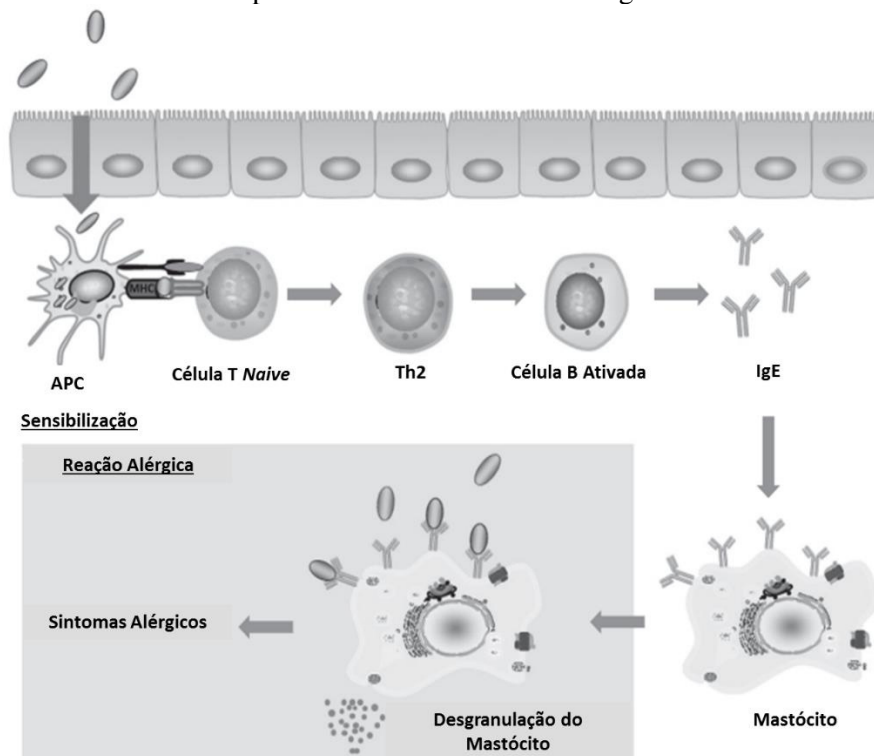
A resposta imune na alergia alimentar pode ser classificada como mediadas por imunoglobulina E (IgE) e não mediadas por IgE. As respostas alérgicas mediadas por IgE são a forma mais amplamente reconhecida de alergia alimentar e são caracterizadas pelo rápido início dos sintomas após a ingestão. Durante a "sensibilização" inicial aos alimentos, o consumo da proteína alimentar alergênica estimula a produção de anticorpos IgE específicos dos alimentos, que depois se ligam aos basófilos dos tecidos e mastócitos. Uma nova exposição à proteína alergênica leva à degranulação dos mastócitos e à liberação de mediadores, incluindo histamina. Isso leva aos sintomas alérgicos como urticária; angioedema; aperto na garganta; sintomas respiratórios, incluindo dificuldade de respiração, tosse e chiado no peito; sintomas gastrointestinais, incluindo dor abdominal, vômitos e diarreia; e sintomas cardiovasculares, incluindo tontura, confusão e hipotensão (FLOM; SICHERER, 2019; WASERMAN; BÉGIN; WATSON, 2018).

Os monócitos desempenham um papel importante no início da resposta imune específica por células apresentadoras de alérgenos e antígenos (APCs). Na fase de sensibilização, os antígenos são processados pelos APCs e apresentados às células T. Após a estimulação por APCs, as células Th0 (*T helper*), que estão em um estado ingênuo, podem se diferenciar em duas vias. O caminho para o fenótipo Th1 é estimulado pela interleucina (IL) 12, com as células

Th1 produzindo citocinas características, incluindo IL-2, IL-15 e interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$). O caminho para o fenótipo Th2 é estimulado pela IL-4, seguido pela liberação de citocinas características, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Mais importante ainda, as respostas Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias. Em termos de hipersensibilidade imediata às proteínas do leite, a via Th2 se torna dominante e IL-4 e IL-13 induzem à produção de IgE pelas células plasmáticas, o que leva à alergia mediada por IgE (Figura 2.1). Os anticorpos IgE específicos para o antígeno se ligam ao receptor de IgE de alta afinidade, Fc ϵ RI, nos mastócitos e basófilos. A reexposição ao mesmo antígeno resulta no entrecruzamento dos anticorpos IgE ligados ao Fc ϵ RI, induzindo à desgranulação dos mastócitos, causando uma reação imediata de hipersensibilidade (Figura 2.1). Enquanto isso, IL-5 secretada por Th2 pode resultar em alergia não mediada por IgE / mediada por células devido ao acúmulo e ativação de eosinófilos (Figura 2.1) (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019; KIEWIET et al., 2015).

Figura 2.1- Visão geral dos eventos durante a sensibilização e uma reação alérgica. Quando o antígeno passa pela barreira epitelial, é captado e processado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs).

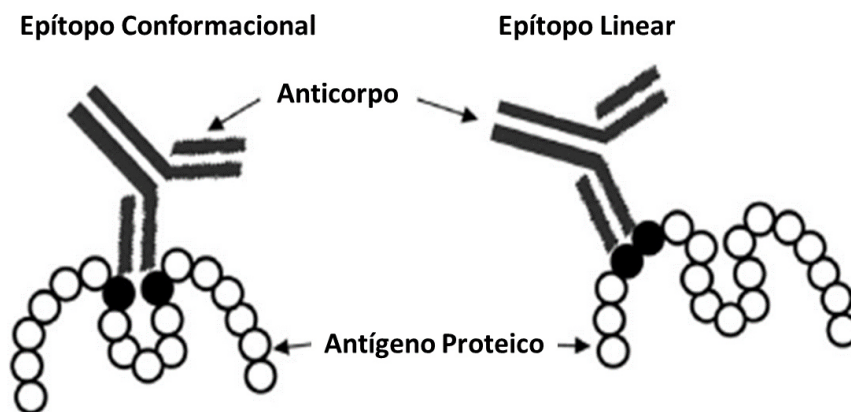
Essas células apresentam o antígeno em uma molécula de MHC de classe II junto com moléculas coestimulatórias para células T *naive* específicas do antígeno, que são ativadas e desenvolvem um fenótipo Th2. As células T ativadas estimulam a diferenciação das células B em células plasmáticas, que passam a produzir anticorpos específicos para o antígeno (IgE). Esses anticorpos se ligam ao receptor de alta afinidade Fc ϵ RI nos mastócitos. Após a reexposição do mesmo antígeno, os anticorpos reticulam e a desgranulação dos mastócitos é induzida. A liberação de uma variedade de compostos resulta em sintomas alérgicos.



Fonte: Adaptado de Kiewiet et al. (2015)

A porção da proteína reconhecida por IgE é chamada epítopo. O epítopo pode ser linear (sequencial) ou conformacional (não sequencial), dependendo da estrutura primária ou terciária (conformação tridimensional) da proteína (Figura 2.2). Os epítomos conformacionais podem ser interrompidos por processos de preparação de alimentos, tais como tratamento térmico, mas para os epítomos lineares esses tratamentos podem não ser suficientes. Para interromper epítomos lineares é necessário alcançar sequências de aminoácidos específicas na cadeia proteica e, nesses casos, a clivagem de ligações peptídicas é uma solução. Uma seleção adequada de uma protease com a especificidade desejada e um protocolo de hidrólise adequado pode diminuir radicalmente a alergenicidade da proteína (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019; TAVANO et al., 2018).

Figura 2.2-Epítomos e suas estruturas básicas



Fonte: Adaptado de Bogahawaththa; Chandrapala; Vasiljevic (2017)

A medida mais eficaz de prevenção e tratamento da alergia ao leite de vaca depende da eliminação completa do consumo do leite e seus derivados. O aleitamento materno é a melhor maneira para prevenir a sensibilização do sistema imune e alimentar de crianças alérgicas, sendo indicado que as mães evitem consumir leites e seus derivados quando a criança, em aleitamento exclusivo, apresenta sintomas da alergia ao leite de vaca. No entanto, é difícil evitar completamente as proteínas do leite de vaca, porque elas geralmente estão presentes em muitos alimentos processados (BU et al., 2013). Por esse motivo, tecnologias de processamento do leite de vaca têm sido estudadas para reduzir o conteúdo de alérgenos do leite e controlar a alergia (BU et al., 2013; GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019).

2.1.2 Métodos para redução da alergenicidade das proteínas do leite de vaca

A redução da alergenicidade das proteínas do leite tem sido estudada empregando-se diferentes métodos, tais como processamento térmico (BU et al., 2010; GRAVERSEN et al., 2020; KLEBER et al., 2004; MELTRETTER; BECKER; PISCHETSRIEDER, 2008), aquecimento por micro-ondas (EL MECHERFI et al., 2015; ZELLAL et al., 2011), hidrólise enzimática (CARVALHO et al., 2017; LIU; LUO; LI, 2012; PESSATO et al., 2016), fermentação ou hidrólise por bactérias do ácido láctico (EHN et al., 2005; PESCUA et al., 2011), polimerização enzimática pela transglutaminase (VILLAS-BOAS et al., 2015) e alta pressão (CHICÓN et al., 2008; KLEBER; MAIER; HINRICHS, 2007). Além disso, a aplicação combinada de hidrólise com alta pressão e radiação também foi testada (IZQUIERDO et al., 2008; JAVIER IZQUIERDO et al., 2005; MECHERFI et al., 2011).

O aquecimento é um processo importante na fabricação da maioria dos produtos lácteos. Durante os processos de aquecimento, ocorrem importantes mudanças estruturais e químicas nas proteínas, como desnaturação, agregação e reação de Maillard com outras moléculas (BU et al., 2013). A desnaturação altera a estrutura espacial de uma proteína e pode destruir a maioria dos epítomos conformacionais. No entanto, epítomos lineares permanecem inalterados por essas alterações estruturais e, portanto, persistem como problema alergênico após o aquecimento (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019). Por exemplo, as caseínas não possuem configuração altamente estruturada e contêm epítomos predominantemente lineares, que por sua vez os tornam altamente resistentes ao tratamento térmico (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019). Entre as proteínas do leite de vaca, a caseína é a mais estável ao calor; no entanto, as proteínas globulares do soro de leite são sensíveis ao calor na ordem das imunoglobulinas (Ig) < BSA < β -LG < α -LA (BU et al., 2013). A alergenicidade das proteínas também pode aumentar devido à criação de novos epítomos ou a um maior acesso a epítomos ocultos que podem ser revelados pela desnaturação da proteína (MONACI et al., 2006).

BU et al. (2009) estudaram os efeitos do tratamento térmico na antigenicidade de α -LA e β -LG no isolado de proteína de soro de leite (WPI). O trabalho mostrou que a antigenicidade de α -LA e β -LG aumentava com o aumento da temperatura de 50 para 90 °C e diminuiu notavelmente acima de 90 °C. O aumento da antigenicidade das proteínas do soro de 50 a 90 °C pode ser causado pela exposição de epítomos alergênicos ocultos no interior da molécula da proteína devido ao desdobramento da estrutura conformacional durante a desnaturação por calor (KLEBER; MAIER; HINRICHS, 2007). A diminuição da antigenicidade acima de 90 °C pode ser atribuída à destruição ou mascaramento de epítomos conformacionais expostos à

superfície da molécula por troca de sulfidril / dissulfeto e subsequente agregação (KLEBER; MAIER; HINRICHS, 2007). A temperaturas mais altas, ocorre uma redução notável da antigenicidade como resultado da desnaturação, agregação e reação de Maillard associadas a outras moléculas, como açúcares que mascaram áreas alergênicas e reduzem a ligação de anticorpos a áreas alérgicas (KLEBER; MAIER; HINRICHS, 2007; VAN HENGEL, 2007).

2.1.2.1 Hidrólise enzimática de proteínas

A hidrólise de proteínas consiste na clivagem de ligações peptídicas gerando pequenos peptídeos e aminoácidos livres (BU et al., 2013; TAVANO, 2013). A hidrólise enzimática oferece uma maneira eficiente de destruir epítomos alergênicos (BU et al., 2013). No processo de hidrólise, as diferentes especificidades das enzimas e o grau de hidrólise podem resultar em diferenças na composição peptídica e na antigenicidade residual do hidrolisado, bem como no sabor (BU et al., 2013). Além disso, a especificidade de substrato das enzimas permite o desenvolvimento de hidrolisados de proteínas com características químicas e nutricionais mais bem definidas (TAVANO, 2013).

Os hidrolisados enzimáticos foram primeiramente gerados com o uso de enzimas gastrointestinais, como tripsina, pepsina e quimotripsina para imitar potencialmente a digestão fisiológica e compensar a imaturidade dos sistemas intestinal e enzimático dos bebês recém-nascidos. A proteólise seletiva da proteína do soro de leite por pepsina e α -quimotripsina foi considerada a combinação mais eficiente de enzimas para reduzir a alergenicidade de α -LA e β -LG, o grau de hidrólise variou de 1 a 20%, dependendo da combinação enzimática e do tempo de incubação. No entanto, as condições usadas para produzir esses hidrolisados levaram a problemas. As condições de pH ácido necessárias para a hidrólise com pepsina exigiram altos níveis de sal para atingir um pH neutro para a formulação do hidrolisado. Já as caseínas α e β mostraram sensibilidade à tripsina (diferentemente das imunoglobulinas e da BSA) (MICINSKIA et al., 2013; MONACI et al., 2006).

Cada vez mais hidrolisados de leite comercializados são produzidos com novos tipos de enzimas, por exemplo de origem bacteriana ou fúngica, com uma especificidade mais ampla. Atualmente, endopeptidases e exopeptidases são combinadas para a produção de fórmulas hidrolisadas para melhorar ao mesmo tempo o sabor das fórmulas por redução do amargor, bem como a alergenicidade pela hidrólise de peptídeos hidrofóbicos, sugeridos como os principais responsáveis pelo potencial alergênico da fonte proteica (MONACI et al., 2006).

Boza et al. (1994) estudaram hidrolisados de caseína e proteínas de soro de leite, utilizando uma mistura de proteases de *B. licheniformis*, obtendo hidrolisados com peptídeos menores que 2500 Da para a fração de caseína e 8000 Da para proteínas de soro. Esses hidrolisados apresentaram elevados valores nutricionais e os mesmos aminoácidos que as proteínas nativas, indicando que a hidrólise enzimática preserva os aminoácidos originais. Além disso, o potencial alergênico (medido *in vitro* por ELISA) da fração de caseína e das proteínas do soro de leite foi reduzido 10.000 e 1.000, respectivamente, após a hidrólise. Izquierdo et al. (2008) obtiveram hidrolisados proteicos com menor imunorreatividade na hidrólise de concentrado de proteínas de soro com ALC ou papaína combinada ao tratamento por micro-ondas.

Van Esch et al. (2011) estudaram abordagens *in vitro* e *in vivo* para avaliar a alergenicidade residual de fórmulas infantis parcialmente hidrolisadas. Os padrões eletroforéticos indicaram que a β -LG e outras proteínas do soro foram amplamente degradadas. Em contraste com a sensibilização do soro de leite, não foram observados níveis elevados de IgE específica do soro, reações anafiláticas ou queda na temperatura corporal em camundongos sensibilizados expostos a hidrolisados de soro de leite. Isso indica que os hidrolisados de soro de leite perderam sua suposta capacidade de sensibilização em um modelo de camundongo com sensibilização oral, o que é altamente relevante em relação à situação humana (VAN ESCH et al., 2011).

As fórmulas hidrolisadas disponíveis comercialmente diferem pelo grau de hidrólise. Existem fórmulas extensivamente (eHF) ou parcialmente hidrolisadas (pHF) disponíveis, feitas a partir de soro de leite ou caseína (KIEWIET et al., 2015; MONACI et al., 2006). As eHF são caracterizadas pela mistura de peptídeos grandes e pequenos (<1500 Da) e aminoácidos livres (~100 Da) e destinam-se a evitar reações alérgicas em recém-nascidos alérgicos já diagnosticados. As pHF, contendo principalmente peptídeos grandes (> 8000 Da), são usadas em bebês com risco de desenvolver alergia alimentar (KIEWIET et al., 2015; MONACI et al., 2006; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015).

O tratamento térmico e a hidrólise enzimática são dois métodos convencionais frequentemente usados para reduzir a alergenicidade das proteínas do leite. Mas cada método tem suas desvantagens e nenhum é completamente satisfatório. Por exemplo, o tratamento térmico e a hidrólise das proteínas do leite não apenas reduzem a alergenicidade, mas afetam adversamente as propriedades nutricionais e sensoriais dos produtos lácteos tratados. Por outro lado, a hidrólise enzimática requer enzimas específicas que degradam epítomos antigênicos e podem exigir a remoção de peptídeos amargos. Além disso, em alguns casos, o tratamento

térmico e a hidrólise enzimática podem aumentar a alergenicidade das proteínas do leite, gerando novos epítomos (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019).

2.2 Proteases

As proteases catalisam a hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e peptídeos e representam um dos grupos mais importantes de enzimas comerciais e industriais. Segundo a Comissão de Enzimas (CE), as proteases pertencem ao grupo 3 das hidrolases e subgrupo 4, hidrólise das ligações peptídicas, mas ainda podem ser classificadas de acordo com a fonte de isolamento (animal, vegetal ou microbiana), ação catalítica (endo ou exopeptidase), sítio ativo, carga, tamanho molecular e especificidade do substrato (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; TAVANO et al., 2018).

Devido à sua enorme diversidade, a classificação das proteases é baseada principalmente no tipo de reação catalisada, em sua estrutura e em seu sítio ativo. As proteases são divididas de acordo com seu local de ação em: exopeptidases que clivam ligações peptídicas próximas aos grupos terminais e as endopeptidases que clivam ligações peptídicas distais aos grupos terminais no meio da cadeia. Com base no seu sítio ativo, as proteases são chamadas principalmente de proteases aspárticas, cisteína, serina e metalo proteases (Tabela 2.2). As proteases também podem ser nomeadas de acordo com a faixa de pH em que atuam: ácidas, neutras e alcalinas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

Tabela 2.2 – Principais propriedades das proteases.

Classificação	Massa Molar (kDa)	Faixa Ideal de pH	Faixa Ideal de Temperatura (°C)
Proteases Aspárticas	30 - 45	3 - 5	40 - 55
Cisteína Proteases	34 - 35	2 - 3	40 - 55
Metallo Proteases	19 - 37	5 - 7	65 - 85
Serina Proteases	18 - 35	6 - 11	50 - 70

Adaptado de Dos Santos Aguilar e Sato (2018)

As proteases de serina são conhecidas por sua tríade catalítica muito bem descrita, incluindo um resíduo catalítico de Ser, das quais as proteases subtilisina e tripsina são as mais interessantes famílias de enzimas considerando suas múltiplas aplicações. Entre as famílias de proteases, as subtilisinas são consideradas as enzimas mais eficientes nos meios orgânicos. As subtilisinas são serina proteases bacterianas, hoje classificadas como subtilisina BPN ou subtilisina Carlsberg, e são comercializadas por várias empresas (TAVANO et al., 2018).

Os micro-organismos representam uma excelente fonte de proteases, sendo também a principal fonte de produção. Embora as enzimas proteolíticas possam ser obtidas de animais e plantas, os micro-organismos são os principais produtores devido às suas vantagens econômicas e técnicas, além da diversidade bioquímica e da possibilidade de manipulação genética. Devido à sua versatilidade, as proteases microbianas podem ser utilizadas principalmente nas indústrias de limpeza, alimentos e têxteis. Tradicionalmente, as proteases microbianas, especialmente as proteases alcalinas, têm sido utilizadas na preparação de hidrolisados de proteínas de alto valor. Os hidrolisados têm uma variedade de aplicações e podem ser utilizados em formulações alimentares para lactentes, produtos alimentares terapêuticos específicos, sumos de fruta fortificantes e refrigerantes, como aditivos alimentares funcionais, rações para animais, entre outros (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

A hidrólise enzimática de proteínas é um dos métodos mais promissores para produzir peptídeos bioativos. Dependendo da sequência de aminoácidos, estes peptídeos podem exibir diversas atividades. Estudos mostraram que hidrolisados de proteínas produzidos por proteases microbianas podem exibir propriedades antioxidantes, antitrombóticos, anti-hipertensivo, regulador da saciedade ou imunomoduladoras e podem afetar os sistemas cardiovascular, imunológico, nervoso e digestivo (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018; TAVANO, 2013). Visto isso, é importante destacar os diferentes graus de especificidade das proteases. Existem proteases capazes de atacar peptídeos e proteínas em posições diferentes, enquanto outras proteases são muito mais seletivas atacando apenas uma sequência de aminoácidos específica. Essas diversas especificidades determinam os vários possíveis usos das proteases. Para algumas aplicações, uma alta especificidade ou seletividade pode ser uma desvantagem, enquanto em outros casos pode ser positiva ou até determinante para uma aplicação (TAVANO et al., 2018).

Uma das proteases utilizadas neste trabalho foi uma formulação líquida de uma endoprotease comercializada pela Novozymes A/S como Novo-Pro[®] D (NPD). A NPD é uma protease alcalina produzida por *B. licheniformis* geneticamente modificado e é eficaz para uma variedade de aplicações que incluem hidrolisado de proteína de penas, glicosaminoglicanos, gelatina e colágeno hidrolisados (NOVOZYMES A/S, 2020). É principalmente aplicada na indústria de *pet food* no processamento de proteínas animais para melhoramento do sabor (ROJAS et al., 2014). Opera em condições de pH entre 7,0 e 11,0 e temperatura entre 55 e 75°C (NOVOZYMES A/S, 2020).

A NPD já foi estudada pelo grupo do LabEnz na hidrólise de proteínas do farelo de soja (MIRANDA, 2012) e casca de soja (ROJAS et al., 2014). Pouco trabalhos foram encontrados na literatura utilizando esta enzima. Kamnerdpetch et al. (2006) realizaram a hidrólise

enzimática da polpa de batata utilizando quatro enzimas diferentes, Alcalase® (ALC), NPD, Flavourzyme® (E.C. 3.4.11.1) e Corolase® (preparação líquida de endoprotease bacteriana – metaloprotease e serina protease), e oito combinações de sistemas enzimáticos proteolíticos. Os autores reportaram que a NPD apresentou baixa eficiência de hidrólise da proteína de batata em relação às demais enzimas utilizadas. Waglay e Karboune (2016) investigaram a eficácia das proteases NPD, ALC, Flavourzyme® e papaína, que exibem diferentes especificidades de substrato e modos de ação de clivagem, para hidrolisar isolados de proteína de batata e caracterizaram as propriedades estruturais dos hidrolisados produzidos. Esses pesquisadores também reportaram que o menor grau de hidrólise da proteína de batata foi obtido pela ação catalítica da NPD, enquanto ALC, Flavourzyme® e papaína exibiram eficiências catalíticas similarmente altas.

Maluf et al. (2020) estudaram a produção de hidrolisados de proteínas de fígado suíno utilizando as enzimas comerciais ALC e NPD. Foram avaliadas as relações proteína/água e enzima/substrato. Os melhores resultados de hidrólise indicaram porcentagens médias de grau de hidrólise de 27,5% para ambas as enzimas. A presença de peptídeos de baixa massa molecular foi também comprovada pela técnica de eletroforese. Os autores concluíram que existe uma viabilidade positiva para a utilização de fígado suíno hidrolisado em aplicações alimentares diferenciadas com um agregado valor de mercado.

Rosa et al. (2018) investigaram o efeito de quatro proteases comerciais diferentes NPD, ALC, tripsina de pâncreas (TRY), e Flavourzyme® (FLA) na geração de hidrolisados com atividades emulsificantes e antioxidantes. Os processos de hidrólise foram realizados durante 5 horas, atingindo graus máximos de 18,5, 15,5, 9,2, e 8,7% para NPD, ALC, TRY, e FLA, respectivamente. Todas as enzimas testadas geraram perfis peptídeos muito diversos, mas conservadores, quando comparados os tratamentos ao longo do tempo, com as principais ações enzimáticas até 120 min de reações. Foi encontrado um aumento da atividade antioxidante *in vitro* para todos os tratamentos, atingindo 46%, 40%, 40% e 22% para ALC, TRY, NDP e FLA, respectivamente. O hidrolisado TRY manteve ou aumentou ligeiramente a sua capacidade emulsionante ao longo do tempo, contudo, foi encontrada uma diminuição da capacidade emulsionante para os hidrolisados ALC e NPD quando comparado com o concentrado proteico não hidrolisado de soro de leite (WPC). Os autores concluíram que todas as enzimas testadas geraram hidrolisados com atividades antioxidantes e/ou emulsificantes melhoradas, que podem ser utilizados como ingredientes alimentares e a escolha da enzima dependerá da necessidade.

A ALC, que foi uma das enzimas usadas neste trabalho, é uma enzima comercial largamente difundida na literatura científica. Muitos autores descrevem processos de hidrólise

utilizando a ALC na sua forma livre e imobilizada (ADLER-NISSEN, 1986; PESSATO et al., 2016; ROSA et al., 2018; SOUSA JR et al., 2004; TARDIOLI et al., 2003a; YANG et al., 2017; YUST et al., 2010). De acordo com Adler-Nissen (1986), a ALC é uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *B. licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a subtilisina Carlsberg (formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa). Quanto à sua especificidade, sabe-se que essa enzima hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos aromáticos (TAVANO, 2013).

A ALC foi usada por Pessato et al. (2016), na sua forma livre e imobilizada em agarose-glioxil, na hidrólise de proteína do soro isolada para caracterização e detecção de alérgenos residuais no hidrolisado obtido. Os autores constataram que os hidrolisados produzidos com ALC livre ou imobilizada em agarose-glioxil apresentaram diferentes propriedades físico-químicas (perfil de hidrofiliabilidade, distribuição de massa molecular, hidrofobicidade superficial) e diferentes níveis de alérgenos residuais do leite (α -LA e β -LG). Os hidrolisados produzidos com ALC imobilizada apresentaram uma maior detecção de proteínas alergênicas residuais em comparação com os produzidos com ALC livre. Embora, nas condições estudadas, a hidrólise com enzima imobilizada não tenha reduzido os níveis residuais de alérgenos tão eficazmente como a enzima livre, os resultados sugerem potenciais aplicações da ALC imobilizada para a produção de hidrolisados hipoalergênicos.

Carvalho et al. (2017) avaliaram o impacto do pH, com ou sem controle, da concentração do substrato (S%) e da razão enzima-substrato (E/S) nas características físico-químicas e antigênicas da proteína de soro de leite hidrolisada com ALC. S% e E/S afetaram o grau de hidrólise; as condições de pH resultaram em hidrolisados com diferentes características físico-químicas e concentrações de α -LA e β -LG. Embora o pH desempenhe um papel crucial nas características do hidrolisado devido à sua influência no padrão de clivagem enzimática, as respostas de anti- β -LG, anti- α -LA, IgE e IgG aos hidrolisados foram semelhantes e independentes do controle do pH. Na ausência de controle, o pH aumentou a resposta aos anticorpos anti-BSA. A hidrólise com ALC resultou em diferentes composições peptídicas, apresentando possivelmente diferentes bioatividades, mas a clivagem dos epítomos da β -LG e da α -LA não se alterou.

Uma característica particular e especialmente indesejável das proteases é a autólise. Esta acontece quando uma molécula de protease se torna o substrato para outra molécula de protease, produzindo contaminação das amostras com esses fragmentos da cadeia de protease. Para evitar isso, são utilizadas baixas concentrações de proteases, reduzindo assim o processo de autólise,

mas também diminuindo a taxa de reação alvo. Técnicas como imobilização, que será apresentada a seguir, é uma alternativa para evitar a autólise (TAVANO et al., 2018).

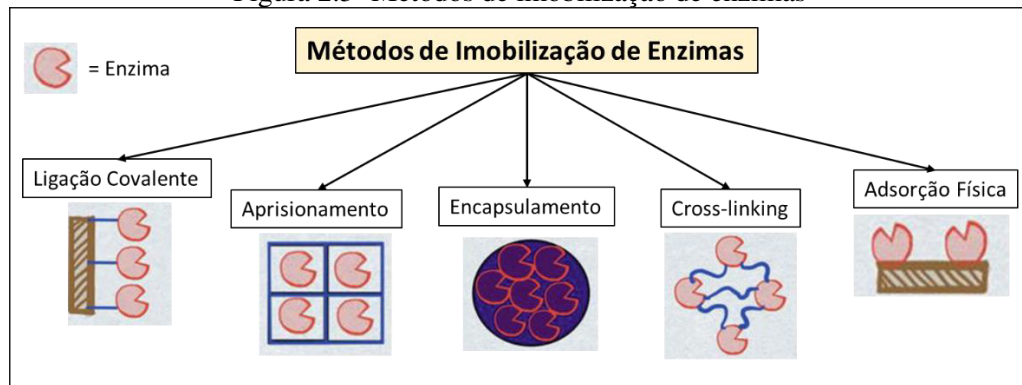
2.3 Imobilização de Enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido importante para viabilizar o seu uso em processos industriais. Apesar do elevado potencial das enzimas como biocatalisadores, a sua aplicação em processos industriais é limitada devido à sua estabilidade moderada, custo elevado e recuperação economicamente inviável (DI COSIMO et al., 2013). A imobilização da enzima permite a sua reutilização, facilita a separação dos produtos, pode melhorar a atividade e seletividade das moléculas, aumentar a estabilidade do biocatalisador em condições de processo e pode eliminar etapas de separação e purificação (BILAL et al., 2019a; CAO, 2005; CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; DI COSIMO et al., 2013; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015; HAKI; RAKSHIT, 2003; ILLANES, 1999; MATEO et al., 2007; ZDARTA et al., 2018).

O termo “enzimas imobilizadas” refere-se a “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região de espaço definida, com retenção da sua atividade catalítica, que pode ser utilizado várias vezes e continuamente” (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Vários métodos são utilizados para imobilização e vários fatores influenciam o desempenho das enzimas imobilizadas (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; HOMAEI et al., 2013; TISCHER; WEDEKIND, 1999; ZUCCA; SANJUST, 2014). A imobilização pode ocorrer por meio de adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional por meio de entrecruzamento (cross-linking), confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação no interior de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). A Figura 2.3 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

A ligação covalente é um método de imobilização de enzimas baseado na formação de ligação covalente entre uma molécula de enzima e grupos reativos do suporte. A ligação covalente possui uma alta força de ligação e pode aumentar a estabilidade da enzima devido ao aumento da sua rigidez (TISCHER; WEDEKIND, 1999; ZUCCA; SANJUST, 2014).

Figura 2.3- Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Osbon e Kumar (2020)

A imobilização enzimática por ligação covalente multipontual em suportes porosos, como a agarose, ativada com grupos aldeídos alifáticos, como os grupos glioxil, já provou ser uma excelente técnica para a imobilização e estabilização de várias enzimas (GRAZU et al., 2006; MATEO et al., 2006; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016), incluindo proteases (HUSSAIN et al., 2018; SIAR et al., 2017; TARDIOLI et al., 2003a). A imobilização multipontual ocorre quando é possível formar várias ligações entre a mesma molécula enzimática e o suporte. Quanto maior for o número de ligações, mais rígida se torna a estrutura tridimensional da proteína (GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2005, 2007). O número de ligações formadas dependerá do grau de ativação do suporte, ou seja, do número de grupos reativos disponíveis para reagir com a enzima e do número de grupos reativos na enzima, da geometria interna do suporte e do protocolo de imobilização (GUISÁN, 1988; PEDROCHE et al., 2007; SANTOS et al., 2015).

A ativação do suporte agarose para esse sistema de imobilização é feita pela introdução de grupos aldeído no suporte que oferece uma ligação enzima (amino) - suporte (aldeído) moderadamente separada do suporte. O gel de agarose inicialmente possui em sua superfície grupos hidroxila e grupos gliceril restantes do entrecruzamento do gel de agarose. A ativação do gel de agarose ocorre primeiramente pela eterificação do suporte com a adição de glicidol que resultará no suporte gliceril-agarose. Em seguida é feita a oxidação do gel gliceril-agarose utilizando periodato de sódio formando então o gel agarose-glioxil (GUISÁN, 1988; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Em relação ao pH de imobilização, é importante que a imobilização aconteça em pH alcalino (em torno de 10,0), para possibilitar que os resíduos lisina da enzima encontrem-se desprotonados para que se liguem efetivamente com os grupos aldeídos do suporte, uma vez que o pKa do grupo amino da lisina é 10,5. Além do pH, o tempo é um fator importante para

este sistema de imobilização/estabilização. O tempo de contato entre a enzima e o suporte deve ser longo, caso se deseje maior estabilização da enzima, já que a formação de novas ligações entre a enzima já imobilizada e o suporte ativado é muito mais lenta que a formação da primeira ligação entre a enzima solúvel e o suporte ativado. Isso é pelo fato dos grupos reativos remanescentes da enzima e do suporte não estarem em um correto alinhamento após a formação da primeira ligação (MATEO et al., 2006; PEDROCHE et al., 2007).

A agarose, obtida a partir do ágar isolado de certas algas marinhas, é um polímero de galactose, cujas unidades básicas são cadeias de agarobiose. A agarose possui várias propriedades interessantes que a torna uma boa escolha de suporte para imobilização, entre elas estão: é um suporte inerte, fácil de ativar com diferentes grupos, disponível com diferentes diâmetros de poros, oferecendo grandes superfícies planas à enzima, etc (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Tardioli et al. (2003a) obtiveram derivados estáveis de ALC imobilizada em agarose-glioxil para serem usados na hidrólise controlada de proteínas. Os derivados foram produzidos em agarose, 10% entrecruzada, usando graus de ativação baixo ($20 \mu\text{equiv mL}^{-1}$) e alto ($210 \mu\text{equiv mL}^{-1}$) do suporte e diferentes tempos de imobilização e comparados a outros derivados de agarose, preparados usando glutaraldeído e CNBr como reagentes de ativação. O desempenho dos derivados foi testado na hidrólise de caseína. Em pH 8,0 e 50°C , os derivados de ALC produzidos com 1 h de tempo de imobilização em agarose ativada com glutaraldeído, CNBr e baixa e alta concentração de grupos glioxil apresentaram meia-vida de aproximadamente 10, 29, 60 e 164 h, respectivamente. O aumento do tempo de imobilização produziu derivados de ALC mais estáveis. O derivado de ALC glioxil mais estável foi produzido com 96 h de reação e alto grau de ativação do suporte ($210 \mu\text{equiv mL}^{-1}$). A enzima imobilizada apresentou meia-vida de aproximadamente 23 h, a pH 8,0 e 63°C e foi cerca de 500 vezes mais estável do que a enzima solúvel. O grau de hidrólise da caseína a 80°C com a enzima imobilizada mais estável foi 2 vezes maior do que o obtido com a enzima solúvel, em decorrência da inativação térmica desta última.

Hussain et al. (2018) imobilizaram ALC em agarose, 4% entrecruzada, ativada com grupos glioxil e obtiveram derivados com retenção de atividade de 50% (usando éster 4-nitrofenílico de Boc-L-alanina como substrato). No entanto, a atividade recuperada versus caseína foi abaixo de 20% a 50°C . A aminação química da enzima imobilizada ou o tratamento da enzima com glutaraldeído não produziu nenhuma estabilização significativa (fator 2) com grande perda de atividade. No entanto, a modificação com glutaraldeído da enzima previamente aminada aumentou a estabilidade da imobilizada modificada em relação à enzima imobilizada

não modificada (por exemplo, mais de 80% e menos de 30% de retenção de atividade, respectivamente, quando incubadas em pH 7,0 e 9,0). O biocatalisador mais estável (ALC imobilizada em agarose-glioxil, aminada e tratada com glutaraldeído) foi usado na hidrólise de caseína a 67 °C e pH 9,0, retendo cerca de 50% da atividade após 5 ciclos hidrolíticos, enquanto a enzima imobilizada não modificada praticamente inativou-se após 3 ciclos. A enzima modificada foi reutilizada na hidrólise da caseína a 45 °C e pH 9,0 por 6 ciclos (6 h) sem qualquer diminuição na atividade enzimática.

Não há relatos na literatura científica de estudo da redução de alergenicidade pela hidrólise de proteínas usando a NPD, bem como estudos de imobilização dessa enzima. Tendo em vista os excelentes resultados da ALC imobilizada em suporte agarose-glioxil, selecionou-se a NPD para estudos de imobilização nesse suporte e posterior comparação com ALC imobilizada na hidrólise das proteínas do leite. Na sequência serão apresentados os resultados da imobilização da NPD em agarose-glioxil (Capítulo 3) e posteriormente a comparação entre as enzimas NPD e ALC (Capítulo 5).

3. IMOBILIZAÇÃO DE NOVO-PRO[®] D POR LIGAÇÃO COVALENTE EM AGAROSE ATIVADA COM GRUPOS GLIOXIL: DESEMPENHO DOS BIOCATALISADORES NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA

O estudo apresentado neste capítulo foi publicado na forma de artigo científico na revista *Catalysts* (LOPES et al., 2020), doi:10.3390/catal10050466, e será aqui reproduzido na sua versão em português.

Resumo: Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de uma protease comercial (Novo-Pro[®] D (NPD)), tanto na forma solúvel quanto na imobilizada, na hidrólise de proteínas (utilizando caseína como proteína modelo). A imobilização da protease NPD em agarose 6% ativada com grupos glioxil por 24 h a 20 °C e pH 10,0 permitiu a preparação de um biocatalisador imobilizado com cerca de 90% de rendimento de imobilização, 92% de atividade recuperada medida em hidrólise de substrato pequeno e uma estabilidade térmica 5,3 vezes maior do que a enzima solúvel dialisada a 50 °C e pH 8,0. Tempos de imobilização superiores a 24 horas levaram à diminuição da atividade recuperada e não melhoraram a estabilidade do biocatalisador. A 50 °C e pH 6,5, a NPD imobilizada foi cerca de 20 vezes mais estável do que a protease solúvel dialisada. Na hidrólise da caseína, a NDP imobilizada apresentou um nível de atividade de 10%, mas permitiu a hidrólise da caseína (26 g / L) a 50 °C e pH 6,5 até um grau de hidrólise (GH) de 40% após 2 h de reação, enquanto sob as mesmas condições, apenas um GH de 34% foi alcançado com NPD solúvel. Além disso, a NPD imobilizada mostrou boa reutilização, mantendo o GH da caseína por pelo menos dez bateladas de 2h de reação.

Palavras-chave: imobilização de enzima; estabilização de enzima; protease; hidrólise de proteína; agarose-glioxil.

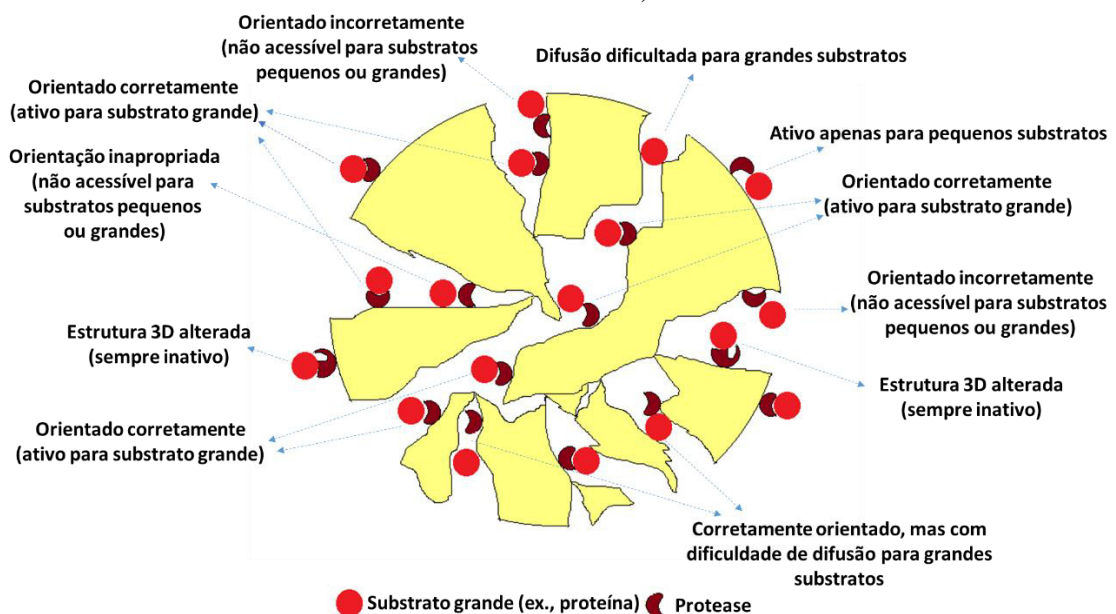
3.1 Introdução

Apesar do alto potencial das enzimas como biocatalisadores, sua aplicação em processos industriais é limitada devido à sua estabilidade moderada, alto custo e recuperação economicamente inviável (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; DI COSIMO et al., 2013). Isso pode ser parcialmente resolvido usando enzimas imobilizadas (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; GARCIA-GALAN et al., 2011; ZHAO et al., 2006). A imobilização de enzimas permite seu reuso e viabiliza economicamente o uso de uma alta concentração de catalisador no reator, o que diminui o tempo de reação necessário para se obter uma conversão desejável. Além disso, ao final da reação, é permitida a simples separação física do catalisador, evitando a necessidade de inativação térmica da enzima, o que pode causar alterações nas propriedades do produto e evitar a contaminação do produto com a enzima. Essas duas últimas vantagens das enzimas imobilizadas são tarefas especialmente importantes ao usar enzimas na indústria de alimentos (BILAL et al., 2019b). Além disso, a imobilização pode

aumentar a estabilidade térmica e melhorar outras características da enzima, como atividade, especificidade e seletividade (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013).

Alguma melhora da estabilidade operacional da enzima por imobilização no interior de suportes porosos sempre ocorre porque irá prevenir a agregação da enzima e interação com interfaces externas (GARCIA-GALAN et al., 2011). A imobilização de enzimas em suportes porosos também evita a autólise (GARCIA-GALAN et al., 2011), uma vantagem muito significativa no caso das proteases (hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018; TAVANO et al., 2018)). No entanto, o tamanho do poro deve ser grande o suficiente para acomodar a enzima e minimizar os atrasos difusionais (TAVANO et al., 2018), o que também é particularmente importante na imobilização de proteases, porque tanto a enzima quanto o substrato são proteínas, moléculas grandes. A este respeito, uma orientação de protease adequada em relação à superfície de suporte também é necessária, uma vez que apenas enzimas devidamente orientadas serão ativas contra substrato grande como proteínas (Figura 3.1) (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; TAVANO et al., 2018).

Figura 3.1- Representação esquemática de uma enzima (por exemplo, uma protease) imobilizada em um suporte poroso para ser usada na hidrólise de um substrato grande (por exemplo, uma proteína como a caseína).



A imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual em suportes de poros grandes, como agarose, ativados com grupos aldeído alifáticos, como grupos glioxil, já provou

ser uma excelente técnica para a imobilização e estabilização de várias enzimas (MATEO et al., 2006), incluindo proteases (BLANCO; GUI SAN, 1989; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005a; SIAR et al., 2017; TARDIOLI et al., 2003a). A imobilização multipontual ocorre quando é possível formar várias ligações entre a mesma molécula de enzima e o suporte (MATEO et al., 2007). Quanto maior o número de ligações formadas, mais rígida se torna a estrutura tridimensional da proteína (MATEO et al., 2007). O número de ligações formadas dependerá do grau de ativação do suporte, ou seja, o número de grupos reativos disponíveis para reagir com a enzima e do número de grupos reativos na enzima, a geometria interna do suporte e o protocolo de imobilização (PEDROCHE et al., 2007; SANTOS et al., 2015). A agarose é uma boa escolha de suporte porque cumpre muitas das condições requeridas: um suporte inerte, fácil de ativar com diferentes grupos, disponível com diâmetros de poros diferentes, oferecendo grandes superfícies planas à enzima, etc. (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Uma peculiaridade dos suportes de agarose-glioxil é que eles precisam imobilizar a enzima por meio da formação simultânea de várias ligações enzima-suporte (MATEO et al., 2005). As enzimas têm um grupo amino pK baixo (o grupo amino terminal) e muitos grupos Lys, com grupos ϵ -aminos com um pK em torno de 10,5, tornando obrigatório o uso de um pH alcalino para imobilizar as enzimas em agarose-glioxil (MATEO et al., 2005). As exceções a esta regra são aquelas proteínas que possuem vários grupos amino terminais, por exemplo, enzimas multiméricas (BOLIVAR et al., 2009; GRAZU et al., 2006) ou enzimas que formam agregados bimoleculares (MATEO et al., 2005), por exemplo, lipases (DE LIMA et al., 2013). Em consequência, como regra, esta estratégia de imobilização/estabilização só é aplicável a enzimas que são estáveis em valores de pH alcalinos (cerca de 10,0).

Em geral, endo e exoproteases são aplicadas em diversos processos biotecnológicos, incluindo produtos alimentícios, redução de alergias a proteínas de alimentos, liberação de peptídeos bioativos, aditivos de detergentes e usos farmacêuticos, entre outros (TAVANO et al., 2018). Assim, a exploração de técnicas para imobilizar e estabilizar proteases é o foco de muitos estudos recentes (ATACAN; ÇAKIROĞLU; ÖZACAR, 2017; BASHIR et al., 2018; PEDROCHE et al., 2002; SIAR et al., 2017; TARDIOLI et al., 2003a, 2003b).

Diferentes proteases estão disponíveis comercialmente para uso nas indústrias de alimentos (humanos e animais de estimação), como Alcalase[®] (ALC) (KAMNERDPETCH et al., 2006; MALUF et al., 2020; WAGLAY; KARBOUNE, 2016) e Novo-Pro[®] D (NPD) (KAMNERDPETCH et al., 2006; MALUF et al., 2020; ROJAS et al., 2014; TAN; CHANG; MENG, 2019; WAGLAY; KARBOUNE, 2016), respectivamente, ambos comercializados pela Novozymes A/S.

Particularmente, a protease ALC foi imobilizada com sucesso em diferentes suportes (AIT BRAHAM et al., 2019; FERREIRA et al., 2003; YANG et al., 2017; ŽUŽA et al., 2017), incluindo agarose-glioxil (HUSSAIN et al., 2018; SOUSA JR et al., 2004; TARDIOLI et al., 2003a, 2005), mostrando uma alta estabilização térmica e bom desempenho na hidrólise de proteínas. A protease NPD apresenta atividade de subtilisina, e é produzida por cultivo submerso de um micro-organismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, que por si só não é modificada geneticamente, é separada e purificada do organismo produtor (*B. licheniformis*) (NOVOZYMES A/S, 2007). Esta preparação enzimática tem mostrado resultados promissores na hidrólise de proteínas de casca de soja (ROJAS et al., 2014), polpa de batata (KAMNERDPETCH et al., 2006; WAGLAY; KARBOUNE, 2016), fígado de porco (MALUF et al., 2020), subproduto de bagre (TAN; CHANG; MENG, 2019) e proteínas de soro de leite (ROSA et al., 2018), mas não foram encontrados estudos de imobilização de NPD na literatura científica.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo imobilizar/estabilizar a protease NPD em suporte agarose-glioxil. A influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização foi avaliada considerando o rendimento de imobilização, a atividade recuperada e a estabilidade térmica da enzima imobilizada na ausência de substrato. NPD solúvel e imobilizada também foram caracterizadas quanto aos perfis de atividade em função de pH e temperatura. A preparação NPD imobilizada mais estável foi avaliada quanto ao seu desempenho na hidrólise da caseína (como modelo de proteína).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

Protease Novo-Pro[®] D (NPD) foi gentilmente fornecida pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil). Sepharose[™] CL-6B (6% agarose) foi adquirido da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). O éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE), glicidol, albumina de soro bovino (BSA), membrana de acetato de celulose e reagente de Bradford foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O periodato de sódio foi obtido na Qhemis (Jundiaí-SP, Brasil) e o borohidreto de sódio na Neon (São Paulo-SP, Brasil). Todos os outros reagentes eram de grau analítico e foram usados como recebidos. A agarose-glioxil foi preparada conforme relatado anteriormente (GUISÁN, 1988).

3.2.2 Ensaio de atividade enzimática padrão usando substrato pequeno

A atividade enzimática foi medida por espectrofotometria a 25 °C seguindo o aumento da absorbância a 258 nm, durante 5 min, que ocorreu devido à hidrólise do BTEE (HUMMEL, 1959). A mistura de reação era composta por 140 µL de BTEE 8 mM em etanol anidro, 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 140 µL de solução de enzima. A concentração final de BTEE no ensaio foi de 0,36 mM. A atividade foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 870 M⁻¹cm⁻¹ e expresso em unidades BTEE (U_{BTEE}).

3.2.3 Procedimento de imobilização NPD

Uma suspensão de proporção final de 1:10, massa de suporte: volume de solução de enzima (em 100 mM de tampão bicarbonato de sódio pH 10,0), foi agitada suavemente a 20 °C por diferentes tempos. As atividades na solução enzimática inicial, no sobrenadante da imobilização e em um controle enzimático mantido nas mesmas condições da suspensão de imobilização foram monitoradas durante a reação de imobilização (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Para finalizar a reação enzima/suporte, borohidreto de sódio sólido foi adicionado à suspensão para uma concentração final de 1 mg de borohidreto de sódio/mL de suspensão para converter as bases Schiff em ligações de amina secundária e para reduzir grupos glioxil residuais em grupos hidroxil inertes (BLANCO; GUIBAN, 1989). Após 30 min de reação a 20 °C, os biocatalisadores foram recuperados por filtração à vácuo, lavados com água destilada e 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0. O biocatalisador foi suspenso neste tampão e sua atividade foi medida em condições ideais (descrito na Seção 3.2.2).

Diferentes cargas enzimáticas (expressas em U/g de suporte) foram avaliadas na imobilização de NDP nas mesmas condições descritas anteriormente. Em todos os ensaios foram avaliadas cargas de proteína de 5 ou 1 mg/g suporte, exceto para ensaios de carga máxima do suporte, onde foram avaliadas cargas de proteína de 1 a 70 mg/g de suporte. Para todos os casos, a solução enzimática foi preparada em tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10,0 pela adição de um volume conhecido da enzima comercial, cuja atividade foi previamente medida em condições ótimas (descritas na Seção 3.2.2). Os parâmetros de rendimento de imobilização (RI), atividade teórica imobilizada (referida à atividade desaparecida do sobrenadante) e atividade recuperada (AR) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020) foram calculados de acordo com as Equações (1) - (3):

$$RI (\%) = \left(1 - \frac{\text{Atividade do Sobrenadante ao Fim da Reação}}{\text{Atividade da Solução Controle ao Fim da Reação}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Atividade Teórica no Derivado} \left(\frac{U}{g} \text{ suporte} \right) = RI \times \text{carga oferecida} \quad (2)$$

$$AR (\%) = \left(\frac{\text{Atividade da Enzima Imobilizada} \left(\frac{U}{g} \text{ suporte} \right)}{\text{Atividade Teórica no Derivado} \left(\frac{U}{g} \text{ suporte} \right)} \right) \times 100 \quad (3)$$

3.2.4 Efeitos de pH e temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH sobre as atividades enzimáticas da NPD solúvel e imobilizada na hidrólise do BTEE foi avaliado a 25 °C, usando diferentes tampões de: citrato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 e carbonato de sódio pH 9,0, 10,0 e 11,0 (100 mM). Outras especificações foram descritas na Seção 3.2.2.

O efeito da temperatura nas atividades enzimáticas da NPD solúvel e imobilizada na hidrólise do BTEE foi avaliado em pH 7,0 (fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0) em uma faixa de 25–80 °C. Outras especificações são descritas na Seção 3.2.2.

3.2.5 Estabilidades térmicas e de pH da NPD solúvel e imobilizada

Estabilidades térmicas da NPD imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD), enzimas comerciais solúveis e enzimas solúveis dialisadas (diálise durante 15 h a 4 °C contra 10 mM de tampão fosfato de sódio pH 8,0 em uma membrana de acetato de celulose de corte 12-14 kDa, para eliminar prováveis agentes estabilizadores) foram avaliados a 50 °C, pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) até 96 h e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) até 268 h. Um modelo de desativação térmica (SADANA; HENLEY, 1987) foi usado para ajustar os dados experimentais e a meia-vida do biocatalisador foi calculada. O fator de estabilidade foi definido como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizadas e solúveis dialisadas.

A estabilidade da NPD solúvel e imobilizada foi avaliada a 25 °C em diferentes valores de pH usando diferentes tampões de 100 mM: citrato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 e carbonato de sódio a pH 9,0, 10,0 e 11,0. Após 4 h, as atividades enzimáticas residuais na hidrólise de BTEE foram medidas sob condições padrão (pH 7,0 e 25 °C conforme descrito na Seção 3.2.2).

3.2.6 Ensaio de hidrólise de proteínas e reutilização de biocatalisadores

A hidrólise da caseína (26 g/L) foi realizada a 50 °C e pH 6,5 por 4 h usando NPD solúvel e a enzima imobilizada mais estável nas cargas enzimáticas no reator de 0,78, 0,26 e 0,08 g de proteína/ L. A concentração da solução de caseína foi selecionada para estar próxima de sua concentração no leite de vaca (cerca de 30 g/L) (MICINSKIA et al., 2013; TSABOURI; DOUROS; PRIFTIS, 2014). Os resultados do grau de hidrólise (GH) foram calculados a partir do volume de solução de hidróxido de potássio consumido para manter o pH 6,5 constante usando a Equação (4) (ADLER-NISSEN, 1986):

$$GH (\%) = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (4)$$

em que B é o volume de base consumido para manter o pH constante (em mL), N_b é a concentração de base (em mol/L), α é o grau médio de dissociação dos grupos α -amina (valores relatados por Adler-Nissen para cada temperatura e pH (ADLER-NISSEN, 1986)), M_p é a massa da proteína (em g) e h_{tot} é o número total de ligações peptídicas que podem ser clivadas no substrato de proteína (para caseína, 8,2 mEq/g).

Os ensaios de reuso foram realizados com hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C e pH 6,5 por 2 h usando como catalisador o derivado AgGly-NPD mais estável. A carga enzimática no reator foi de 0,26 g de proteína/L. Entre cada batelada, o biocatalisador foi recuperado por filtração à vácuo e lavado com água destilada. A Equação (4) foi utilizada para calcular os valores de GH.

3.2.7 Ensaio de Proteína

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

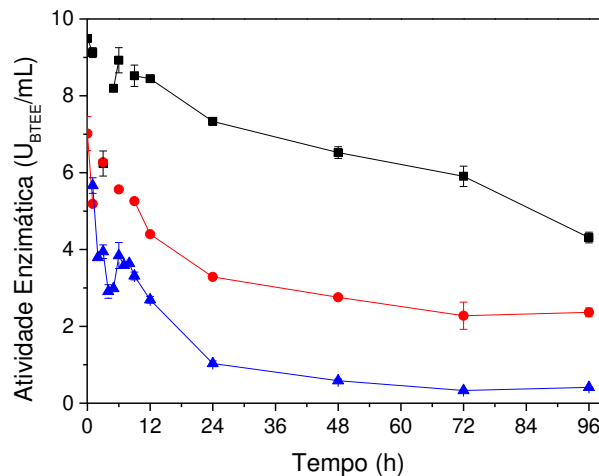
3.3 Resultados

3.3.1 Efeito do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização de NPD em suporte de agarose-glioxil

Inicialmente, uma carga de enzima de 4,6 mg de proteína/g de suporte foi oferecida para diferentes tempos de imobilização (1-96 h). A Figura 3.2 mostra que a imobilização do NPD em agarose-glioxil foi lenta, exigindo 24 horas para imobilizar cerca de 90% da atividade oferecida. A baixa taxa de imobilização em comparação com outras enzimas imobilizadas neste suporte pode estar relacionada ao fato da protease ser glicosilada (N- ou O-glicosilação)

tornando menos acessível o núcleo da proteína para reação com o suporte (GOETTIG, 2016). As cadeias glicosílicas que cobrem os resíduos de Lys também podem reduzir a congruência geométrica e química entre a enzima e as superfícies de suporte, por sua vez, reduzindo a taxa de imobilização e a formação de ligações múltiplas entre a enzima e o suporte, o que afetará negativamente a estabilização da enzima alcançada após imobilização. Recentemente, Bonzom et al. (2019) relataram que a imobilização por adsorção de feruloil esterase (glicosilada e não glicosilada) em sílica mesoporosa carregada negativamente exibiu grandes diferenças na taxa de imobilização e no rendimento de imobilização. A enzima não glicosilada foi rapidamente imobilizada em todos os pHs avaliados, enquanto a enzima glicosilada foi imobilizada lentamente e dependente do pH. Esse comportamento diferente foi atribuído às diferenças nos pontos isoelétricos das duas formas enzimáticas devido às cadeias glicosílicas que protegem a superfície da proteína.

Figura 3.2 - Perfis de imobilização da Novo-Pro® D (NPD) em agarose-glioxil (20 °C, pH 10,0, carga de proteína de 4,6 mg/g de suporte). (■) Solução enzimática controle da enzima livre nas condições de imobilização, (●) atividade da suspensão e (▲) atividade do sobrenadante. As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2.

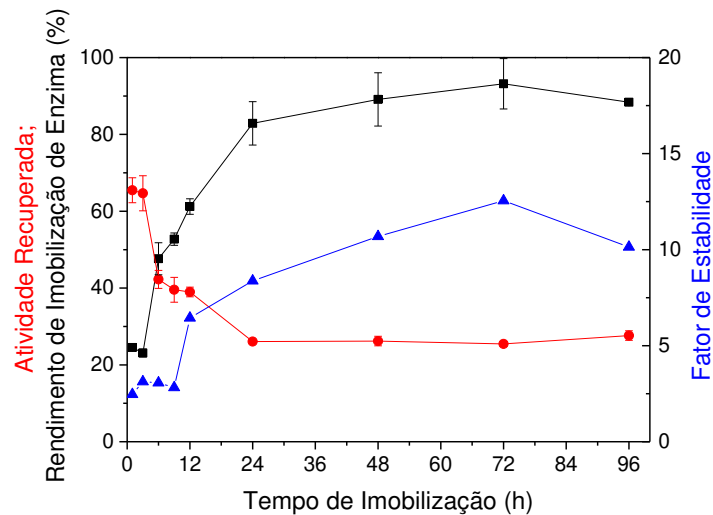


A enzima solúvel perdeu cerca de 20% da atividade até 24 horas nas condições de imobilização, talvez parcialmente devido à autólise.

A Figura 3.3 mostra o rendimento da imobilização da enzima, a atividade recuperada (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020) e o fator de estabilidade para os derivados da enzima imobilizada preparados com diferentes tempos de imobilização. Tempos de imobilização mais longos permitiram que uma maior quantidade de enzima se ligasse ao suporte, atingindo um rendimento de imobilização de 93,2% após 72 h de reação. Por outro lado, a atividade recuperada foi reduzida ao prolongar o tempo de imobilização,

diminuindo de cerca de 65% (por 1 h) para 25% (por 24-96 h). De acordo com Mateo et al. (2005), a primeira ligação entre os grupos amino primários da enzima e o grupo aldeído do suporte é rápida e reversível. Entretanto, ligações adicionais são necessárias para imobilizar irreversivelmente a enzima ao suporte, e ainda mais tempo para aumentar o número de ligações entre enzima e suporte e, dessa forma, aumentar a estabilidade da enzima devido à rigidificação de sua estrutura. De fato, as meias-vidas a 50 °C e pH 8,0 para os diferentes derivados aumentam até um valor máximo com o tempo de reação de imobilização, mas esses tempos de reação enzima-suporte mais longos diminuem a atividade recuperada. Resultados semelhantes foram relatados por Tardioli et al. (2003b) para a imobilização da exoprotease carboxipetidase A (CPA) em agarose-glioxil, onde a estabilidade da enzima aumentou de 44 vezes para cerca de 260 vezes quando o tempo de imobilização aumentou de 1 h para 48 h, mas a atividade recuperada diminuiu de 80% a 42%.

Figura 3.3 - Rendimento de imobilização da enzima (■), atividade recuperada (●) e fator de estabilidade a 50 °C e pH 8,0 (▲) para diferentes tempos de imobilização (20 °C, pH 10,0, carga de proteína 4,6 mg/g de suporte) de NPD em agarose-glioxil. Os fatores de estabilidade foram calculados como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizadas e livres dialisadas, obtidas a partir do modelo Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais de inativação térmica (Figura S1, Material Suplementar). As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2.



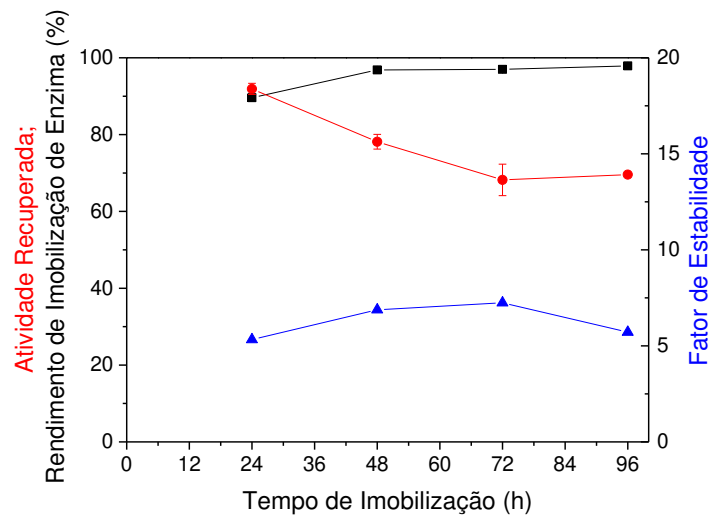
As meias-vidas das enzimas dialisadas e não dialisadas, calculadas com base no modelo Sadana-Henley ⁽¹⁹⁸⁷⁾, foram 9,0 e 19,3 h, respectivamente. Estes resultados mostraram que a enzima comercial bruta contém alguns agentes estabilizadores, e eles causaram um aumento de 2,2 vezes na meia-vida da enzima nas condições empregadas. Portanto, os perfis de inativação térmica dos diferentes derivados (Figura S1, Material Suplementar) foram comparados com o NPD solúvel e dialisado, pois os agentes estabilizadores presentes na preparação comercial da

enzima não são imobilizados no suporte, eles são eliminados após lavagem da enzima imobilizada (TARDIOLI et al., 2003a). Conforme mostrado na Figura 3.3, o derivado incubado por 72 h foi o mais estável, atingindo um fator de estabilidade de 12,6 vezes em pH 8,0 (meia-vida em torno de 110 h).

Os resultados apresentados na Figura 3.3 indicaram que, conforme esperado, quanto maiores os tempos de imobilização, maior o rendimento de imobilização e a estabilidade dos derivados enzimáticos imobilizados e menores as atividades recuperadas. A ligação covalente multipontual requer um longo tempo para permitir o correto alinhamento entre a enzima e os grupos de suporte, e no caso de proteínas não muito ricas em Lys que são glicosiladas, este tempo pode ser ainda maior (PEDROCHE et al., 2007). Isso pode causar também distorção da estrutura da enzima e, conseqüentemente, diminuição da atividade recuperada (PEDROCHE et al., 2007). No entanto, os baixos valores da atividade recuperada, mesmo para tempos de imobilização curtos, indicaram que outro fenômeno também pode estar ocorrendo no experimento, por exemplo, alguns problemas de limitação de difusão do substrato que impedem a visualização da atividade da enzima imobilizada (BOLIVAR et al., 2013; BONIELLO et al., 2010; PRONK; LINDAHL; KASSON, 2014; REGAN; LILLY; DUNNILL, 1974; SHEN; CHEN, 2007). A hidrólise do substrato sintético N-benzoil-L-tirosina etil éster (BTEE) usado para determinar a atividade enzimática é muito rápida (a atividade esperada deste biocatalisador foi em torno de 70 U_{BTEE}/g de suporte para derivados carregados com 4,6 mg de proteína/g) e a concentração do substrato era bastante baixa (0,36 mM), dificultando a mensuração de toda a atividade enzimática imobilizada dentro dos poros do suporte. Para verificar essa hipótese, um novo experimento de imobilização foi realizado com uma carga enzimática menor. A Figura 3.4 mostra os parâmetros de imobilização enzimática (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020), determinados para derivados obtidos com diferentes tempos de imobilização (24, 48, 72 e 96 h), utilizando uma carga de proteína de 1 mg proteína/g suporte. Pode-se observar que um rendimento de imobilização de 90%, um fator de estabilidade de 5,3 vezes (meia-vida em torno de 48h) e uma atividade recuperada de 92% (um valor muito próximo a 100%) foram obtidos após 24h de imobilização. Ou seja, se a carga enzimática do suporte for baixa o suficiente, os parâmetros de imobilização inerentes serão determinados mais precisamente (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Tempos de reação mais longos permitiram um aumento no rendimento de imobilização (97,9% após reação de 96 h), porém uma atividade recuperada inferior (69,6%) foi obtida, sem um aumento significativo no fator de estabilização (5,7 vezes) obtido em 24 h de reação (comparado à enzima solúvel dialisada). Em outro ensaio, o uso de uma carga enzimática ainda menor (0,5

mg de proteína/g suporte) permitiu a obtenção de 100% da atividade recuperada após 24 horas de reação (dados não mostrados). Novamente, não foi observado aumento da estabilidade para tempos de reação superiores a 24 h. Portanto, o fator de 12 vezes obtido anteriormente na estabilização da enzima pode estar relacionado a uma falha na determinação da atividade enzimática inicial por efeitos de limitação de difusão do substrato.

Figura 3.4 - Rendimento de imobilização da enzima (■), atividade recuperada (●) e fator de estabilidade (▲) para diferentes tempos de imobilização (20 °C, pH 10,0, carga de proteína 1 mg/g de suporte) de NPD em agarose-glioxil. O fator de estabilidade foi calculado como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizada e livre dialisada, obtido a partir do modelo Sadana-Henley (1987) ajustado aos dados experimentais de inativação térmica (Figura S2 em Material Suplementar). As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2.



Os fatores de estabilidade obtidos para NPD imobilizada em agarose-glioxil foram inferiores do que aqueles relatados anteriormente para outras enzimas imobilizadas neste suporte; isso pode ser milhares de ordens de magnitude maior para algumas proteases como tripsina e quimiotripsina, por exemplo (MATEO et al., 2006). Alcançar um alto fator de estabilidade ao realizar a imobilização multipontual requer uma área de superfície enzimática rica em resíduos de Lys, localizada em um mesmo plano (HUSSAIN et al., 2018; MILESSI et al., 2016).

3.3.2 Efeito do carregamento de proteína no desempenho da enzima imobilizada

Após os resultados obtidos anteriormente, foi realizado um estudo mais sistemático do efeito da carga da enzima sobre o desempenho da enzima imobilizada. A Figura 3.5 mostra os dados de rendimento de imobilização da enzima e atividade recuperada (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020) em função das cargas de proteína utilizadas.

Altos rendimentos de imobilização (até 90%) e atividades recuperadas (até 92%) foram alcançados quando baixas cargas enzimáticas foram oferecidas ao suporte. No entanto, quanto maior a carga da enzima, menor o rendimento de imobilização e a atividade recuperada. Quando 68,6 mg de proteína/g de suporte foram oferecidos, o rendimento da imobilização foi de apenas 20,9% após 24 h. Mesmo aumentando o tempo de reação para 72 h, o rendimento de imobilização foi de 35% (Figura S3, Material Suplementar). A partir dos dados mostrados na Figura 3.6, a quantidade máxima de proteína imobilizada foi de 18,9 mg/g de suporte, embora a atividade relativa do biocatalisador na hidrólise de BTEE (razão entre a atividade medida da NPD imobilizada e a atividade teoricamente imobilizada) diminuiu rapidamente quando o carregamento aumentou. A diminuição na atividade relativa do biocatalisador deve ser, como foi discutido, associada a limitações difusionais, que aumentam com a carga enzimática (BOLIVAR et al., 2013; BONIELLO et al., 2010; PRONK; LINDAHL; KASSON, 2014; REGAN; LILLY; DUNNILL, 1974; SHEN; CHEN, 2007). Porém, o uso real deste biocatalisador não ocorrerá na hidrólise de BTEE, mas na hidrólise de proteínas, em concentrações muito maiores, e talvez esses problemas possam ser minimizados.

Considerando o fato de que o aumento do tempo de imobilização (de 24 para 72 h) permitiu um aumento de apenas 26% na estabilidade térmica do biocatalisador, o tempo de imobilização de 24 h foi selecionado para estudos posteriores. A carga de 1 mg proteína/g suporte também foi selecionada, a fim de evitar efeitos de difusão do substrato que interferem na determinação da estabilidade da enzima imobilizada.

Figura 3.5 - Efeito da carga de proteína no rendimento de imobilização da enzima (barras) e atividade recuperada (linha) na imobilização de NPD em agarose-glioxil a 20 °C, pH 10,0 e tempo de reação de 24 h.

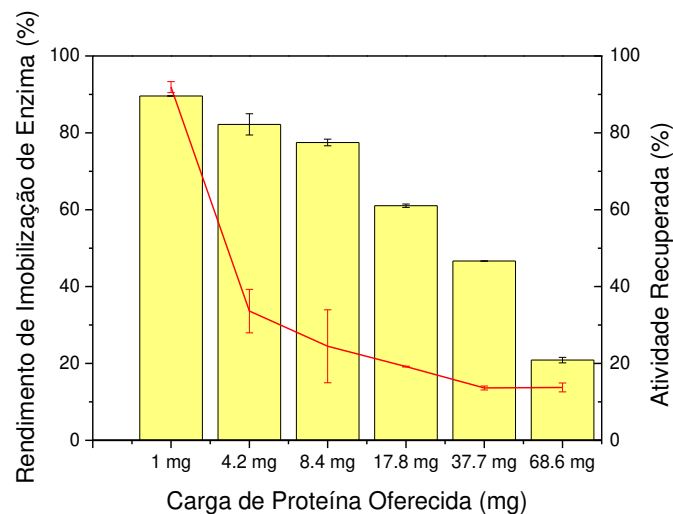
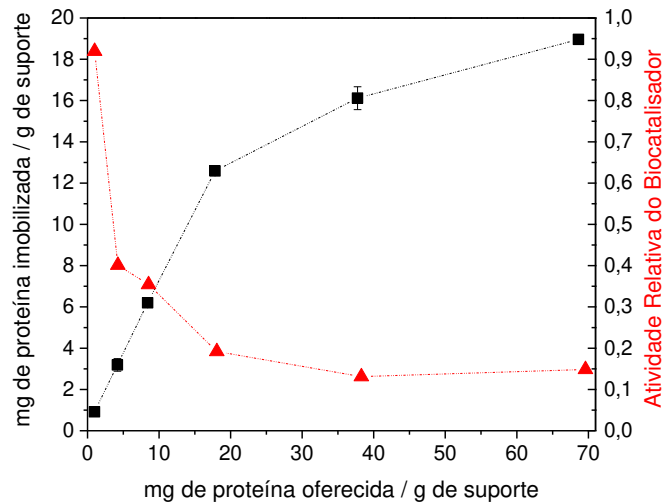


Figura 3.6 - Proteína imobilizada (■) e atividade relativa do biocatalisador (▲) em função da carga de proteína oferecida à imobilização de NPD em agarose-glioxil a 20 °C e pH 10,0 por 24 h de tempo de reação.



3.3.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade da NPD

A Figura 3.7 mostra o efeito da temperatura nas atividades de NPD solúvel e imobilizada em agarose-glioxil. Tanto a enzima solúvel quanto a imobilizada apresentaram atividade máxima a 50 °C. No entanto, a enzima imobilizada reteve cerca de 30% da atividade a 80 °C, enquanto a enzima solúvel foi totalmente inativada a 70 °C. Esta retenção relativamente alta de atividade em temperaturas bem superiores àquelas em que a enzima livre está totalmente inativada, embora não altere a temperatura ideal, sugere que alguma população minoritária de moléculas de enzima pode se tornar mais fortemente estabilizada após a imobilização da enzima (por exemplo, uma subpopulação de moléculas de enzima com menor grau de glicosilação), mantendo sua atividade em temperaturas mais elevadas, mas não aumentando a temperatura global onde os biocatalisadores expressaram a atividade máxima.

Em qualquer caso, isso aumentou a janela de condições em que a enzima pode ser utilizada. Resultados semelhantes foram relatados em outros casos (DAL MAGRO et al., 2019, 2020).

O efeito do pH na atividade NPD (solúvel e imobilizada) é mostrado na Figura 3.8A. Os valores de pH de atividade máxima para enzimas, solúvel e imobilizada, foram em torno de pH 8,0-9,0. Em pH ácido, as atividades das enzimas, livre e imobilizada, diminuíram, mas a enzima imobilizada sempre manteve mais atividade do que a livre. Isso pode ser correlacionado com a estabilidade da enzima nos diferentes valores de pH (Figura 3.8B); aqui a maior diferença

foi em pH 6,0, onde a atividade residual da enzima imobilizada dobrou em comparação com a da enzima livre.

Figura 3.7 - Perfil de atividade em função da temperatura para (■) NPD livre e (●) imobilizada (tempo de imobilização de 24 h em agarose-glioxil). Condições de ensaio de atividade: hidrólise de 0,36 mM de éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) em diferentes temperaturas e pH 7,0 por 5 min.

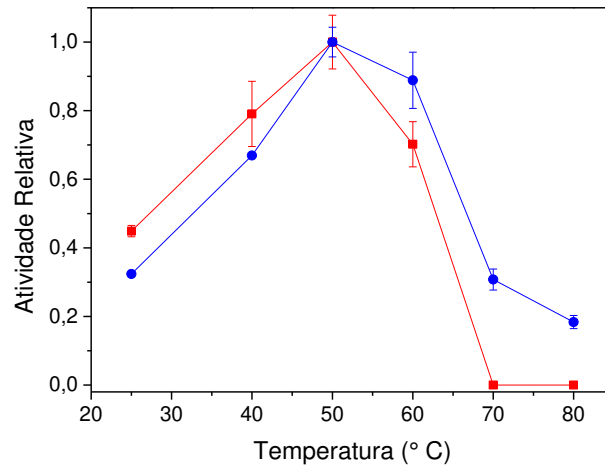
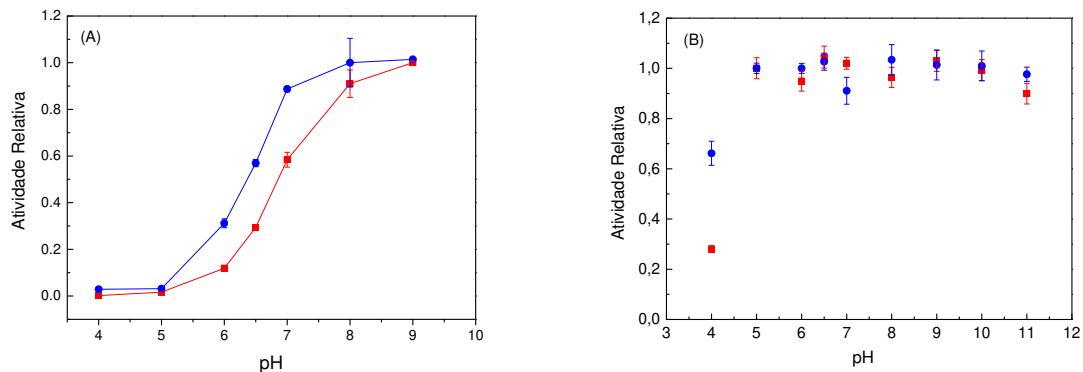


Figura 3.8 - (A) Atividades de NPD (■) livre e (●) imobilizado com 24 h em agarose-glioxil a 25 °C e diferentes pHs e (B) perfil de atividade enzimática residual, medido sob condições padrão (hidrólise de solução BTEE 0,36 mM a 25 °C e pH 7,0 por 5 min, Seção 3.2.2), após 4 h de incubação em diferentes valores de pH.



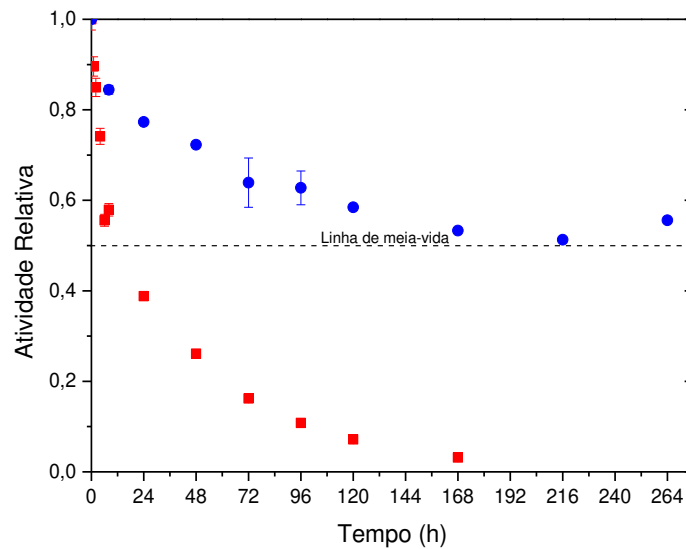
Em geral, as diferenças nas propriedades das enzimas imobilizadas daquelas isoladas e purificadas (o caso das enzimas livres) são relatadas, porque a aglomeração macromolecular no microambiente da enzima imobilizada e as interações enzima-suporte podem imitar interações inespecíficas com constituintes heterogêneos no interior de células vivas (MINTON, 2006).

3.3.4 Estabilidade térmica em pH 6,5 da NPD solúvel e imobilizada

As estabilidades térmicas da NPD solúvel dialisada e imobilizada (24 h de reação em agarose-glioxil) foram avaliadas a 50 °C e pH 6,5. Este pH foi escolhido por ser um valor adequado para hidrolisar caseínas, que são as principais proteínas do leite de vaca, cujo pH está

em torno de 6,4 a 6,8 (SGARBIERI, 2005; VIEIRA et al., 2013). A Figura 3.9 mostra que a NPD imobilizada era cerca de 20 vezes mais estável do que a enzima solúvel nessas condições (216 e 10,6 h de meia-vida, respectivamente). A diferença na estabilidade da enzima foi maior nessas condições. As explicações podem ser diversas; uma maior proteólise da enzima livre, ou uma maior tendência à agregação, ou que a enzima imobilizada protegeu a área mais relevante para a inativação da enzima sob pH 6,5 e não se a inativação fosse realizada em pH 8,0 (SANCHEZ et al., 2016).

Figura 3.9 - Perfis de inativação térmica da NPD, (■) livre dialisada e (●) imobilizada em agarose-glioxil, por 24 h a 50 °C e pH 6,5. As atividades foram medidas conforme descrito na Seção 3.2.2.



3.3.5 Desempenho da NPD Solúvel e Imobilizada na Hidrólise de Caseína

A Tabela 3.1 mostra a atividade recuperada imobilizando 1,4 e 18,9 mg de proteína/g de suporte. A tabela mostra que enquanto a atividade medida em hidrólise de BTEE diminuiu drasticamente quando a carga enzimática aumentou (63,3 para 13,8%), o mesmo não ocorreu quando se usou caseína, onde (em ambas as cargas) a atividade foi um pouco acima da média de 15%. Isso sugeriu que não houve limitações difusionais de substrato nesta reação, e que a diminuição na atividade da enzima foi causada pela distorção da enzima, o que poderia afetar mais drasticamente a hidrólise da ligação peptídica (mais estável) na caseína do que a ligação no éster BTEE. Impedimentos estéricos também podem ser descartados, visto que esses devem ser muito severos em suportes altamente carregados (RODRIGUES et al., 2013).

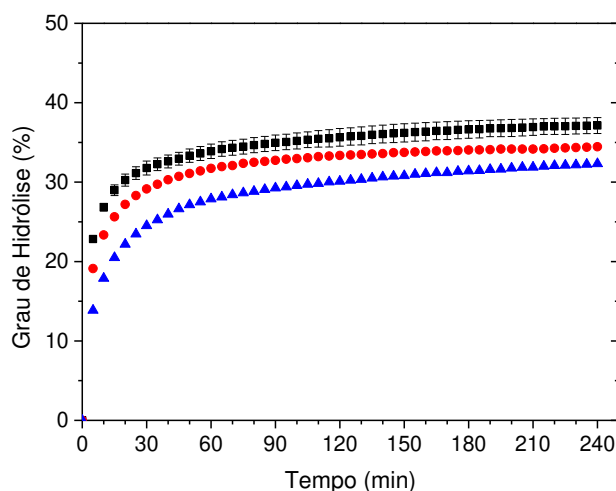
Tabela 3.1 - Atividades recuperadas (AR) de derivados de NPD de baixa e alta carga (reação de 24 h a 20 °C e pH 10,0) medidas com substrato pequeno (BTEE) e grande (caseína).

Carga de Proteína (mg/g)	Atividade Teórica Imobilizada (U_{BTEE}/g)	Atividade Teórica Imobilizada ($U_{caseína}/g$)	AR (%) usando substrato pequeno (0,36 mM BTEE)	AR (%) usando substrato grande (20 g/L caseína) ¹
1,4	20,6 ± 0,2	88,1 ± 7,0	63,3 ± 0,7	16,3 ± 0,9
18,9	275,6 ± 0,2	1166,4 ± 93,3	13,8 ± 1,2	14,5 ± 4,4

¹ Hidrólise de 25 mL de solução de caseína (2%, m/v, em água destilada) a 50 °C e pH 6,5. O pH da reação foi controlado pela adição de solução de KOH em um titulador Titrimo 907 (Metrohm, Herisau, Suíça). Uma unidade de caseína foi expressa em μ mol de ligações peptídicas clivadas por minuto.

A Figura 3.10 mostra o grau de hidrólise (GH) da caseína (26 g/L) a 50 °C e pH 6,5 usando diferentes concentrações de NPD solúvel (g proteína/L reator). Um alto grau de hidrólise foi alcançado para todas as concentrações de enzima testadas em um curto tempo de reação (4 h), ou seja, 32,3%, 34,5% e 37,1% para 0,08, 0,26 e 0,78 g de proteína/L reator, respectivamente. Do ponto de vista industrial, pelo menos se for considerado apenas o custo das enzimas, um aumento de cerca de 5% na GH exigindo um aumento de cerca de 10 vezes na concentração da enzima não seria economicamente viável. Assim, a menor concentração de enzima foi selecionada para avaliar o desempenho da NPD imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD) carregado com 18 mg de proteína/g de suporte na hidrólise de caseína nas condições que foram descritas.

Figura 3.10 - Perfil de hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e 500 rpm de agitação catalisada por NPD livre em cargas diferentes (g proteína/L reator): (■) 0,78, (●) 0,26 e (▲) 0,08.

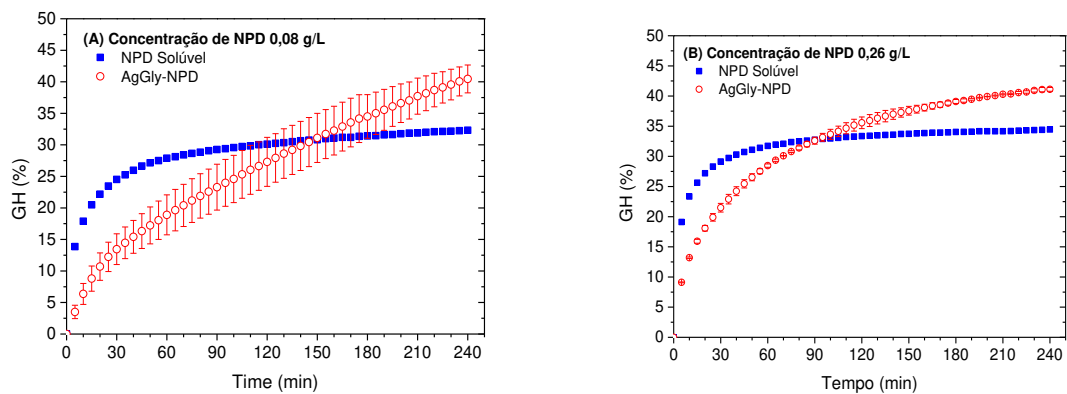


A Figura 3.11 (A e B) mostra que usando AgGly-NPD, as taxas iniciais foram significativamente menores do que usando a enzima livre, até cerca de 5 vezes, como esperado

a partir dos dados da Tabela 3.1. No entanto, os graus de hidrólise atingiram 40,5 % e 41,1%, respectivamente, usando concentrações de enzima imobilizada no reator de 0,08 e 0,26 g proteína/L.

Tardioli et al. (2003a) relataram um grau máximo de hidrólise em torno de 20% para a hidrólise de caseína (10 g/L) por Alcalase[®] imobilizada em agarose-glioxil após 4 h de reação a 45 °C e pH 8,0. Em outro trabalho, Rosa et al. (2018) avaliaram o desempenho de Alcalase[®] e NPD (ambos na forma livre) na hidrólise de concentrado protéico de soro de leite (240 g/L) a 65 °C (pH 8,0) e 50 °C (pH 9,0), respectivamente. Após 5 horas de reação, os graus de hidrólise atingiram 15,5% e 18,5%. Os autores observaram uma rápida taxa de hidrólise até 90 minutos de reação, chegando a um platô após 120 minutos de reação. Comportamento semelhante foi observado neste trabalho usando NPD livre (Figuras 3.10 e 3.11), mas o platô foi atingido após 60 min, provavelmente devido às diferentes razões enzima/substrato usadas. Em um trabalho recente, Maluf et al. (2020) hidrolisaram proteína de fígado de porco (20% em massa em água) com Alcalase[®] livre e NPD livre a 60-64 °C e pH 6,4 para reação de 5 h. Os autores relataram um grau de hidrólise de até 28%, com NPD sendo mais eficiente do que Alcalase[®]. Essas comparações mostram que a NPD é uma boa opção para ser utilizada na preparação de hidrolisados de proteínas. Além disso, o maior GH obtido nesse trabalho com a enzima imobilizada (em torno de 40%) pode ser devido à inativação da enzima solúvel nas condições do processo que a impedem de atingir o GH máximo, o que pode sugerir novas vantagens no uso de enzimas imobilizadas (SIAR et al., 2017, 2018, 2019, 2020).

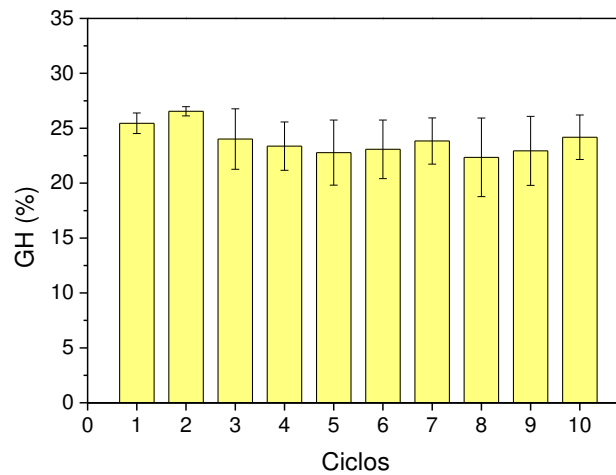
Figura 3.11 - Perfil de hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e 500 rpm de agitação catalisada por NPD livre e imobilizada (AgGly-NPD carregada com 18,9 mg de proteína/g de suporte) usando uma concentração de enzima no reator de (A) 0,08 g/L e (B) 0,26 g/L.



A Figura 3.12 mostra o GH alcançado em bateladas repetidas de hidrólise de caseína reutilizando o biocatalisador imobilizado (AgGly-NPD). Após dez bateladas de reação de 2 h,

o grau de hidrólise da caseína diminuiu apenas de um máximo de 26,5% para 24,2% (que não é significativo). Assim, a NPD imobilizada em agarose-glioxil apresentou excelente desempenho para hidrólise de proteínas, mesmo que inicialmente a atividade enzimática frente a esse substrato parecesse muito baixa.

Figura 3.12 - Ensaio de reutilização (ciclos de batelada de reação de 2 h) de NPD imobilizada em agarose-glioxil (10 mg de proteína/g de suporte) na hidrólise de caseína (26 g/L) a 50 °C, pH 6,5 e agitação de 500 rpm, usando uma concentração de enzima no reator de 0,26 g/L.



3.4 Conclusões

A imobilização covalente da NDP em agarose ativada com grupos glioxil (AgGly) permitiu a preparação de um biocatalisador 20 vezes mais estável do que a enzima livre a 50 °C e pH 6,5. O suporte AgGly pôde ser carregado com cerca de 20 mg de proteína/g de suporte e o derivado de alta carga exibiu excelente desempenho na hidrólise da caseína, embora a atividade inicial tenha diminuído quase 10 vezes. A enzima imobilizada atingiu em torno de 40% de grau de hidrólise a 50 °C e pH 6,5 em um curto tempo de reação. Além disso, a atividade do derivado de alta carga foi mantida inalterada quando reutilizada por 10 ciclos de reação. O excelente desempenho nessas condições torna o derivado atraente para ser explorado na hidrólise de proteínas do leite (não apenas caseínas, mas também α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) (MICINSKIA et al., 2013; NAITO et al., 2020; SGARBIERI, 2005), e talvez de outras proteínas de alto valor nutricional descartadas como subprodutos nas indústrias de alimentos, por exemplo, proteínas do soro de leite (TARDIOLI et al., 2003a) e do fígado de porco (MALUF et al., 2020).

3.5 Material Suplementar

Figura S1 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro[®] D (NPD) livre e imobilizada a 50 °C e pH 8,0 (tampão de fosfato de sódio 0,1 M). Linha contínua: modelo de inativação térmica Sadana-Henley⁽¹⁹⁸⁷⁾ ajustado aos dados experimentais.

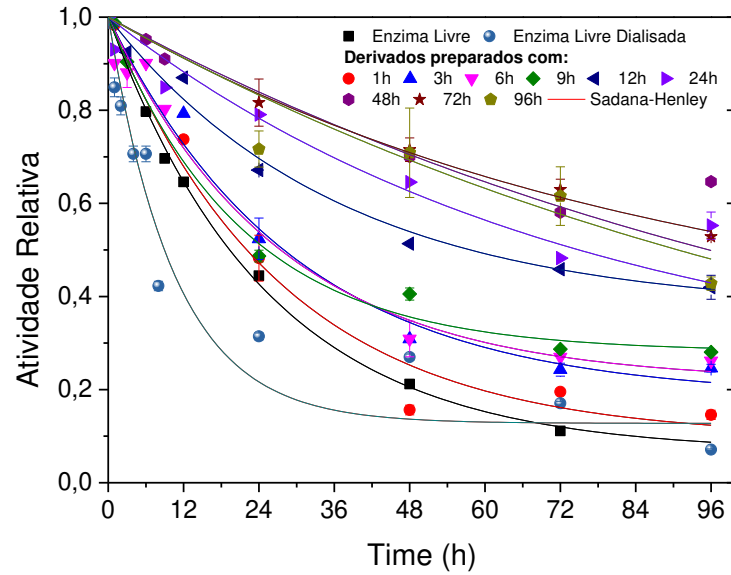


Figura S2 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro[®] D (NPD) solúvel e imobilizada a 50 °C e pH 8,0 (tampão de fosfato de sódio 0,1 M). Linha contínua: modelo de inativação térmica Sadana-Henley⁽¹⁹⁸⁷⁾ ajustado aos dados experimentais.

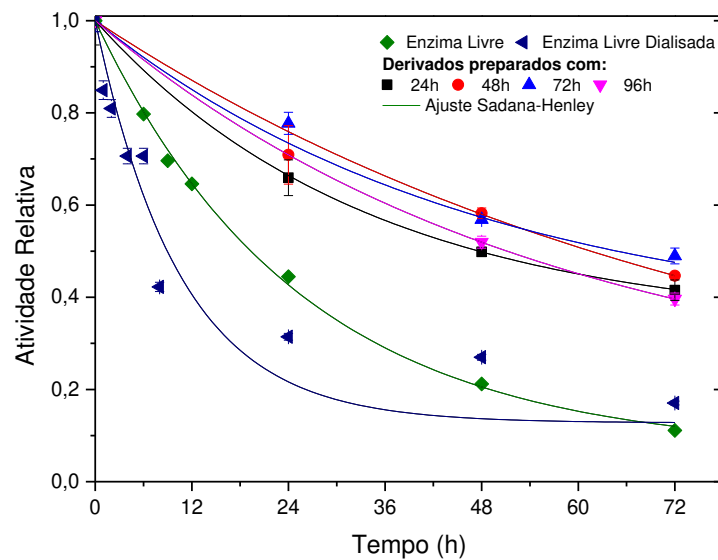
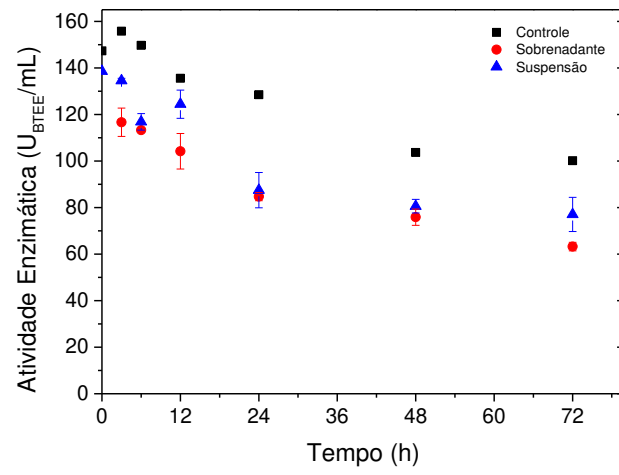


Figura S3 - Perfis de imobilização de Novo-Pro® D (NPD) em agarose-glioxil (20 °C, pH 10,0, carga de proteína oferecida de 66,3 mg/g de suporte).



4. DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA PROTEASE NOVO-PRO[®] D EM SUPORTES AGAROSE-GLIOXIL E QUITOSANA-GLUTARALDEÍDO

4.1 Introdução

Apesar do alto potencial das enzimas como biocatalisadores, a moderada estabilidade é uma das limitações para a sua aplicação em processos industriais (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; DI COSIMO et al., 2013). Como visto no Capítulo 3, a imobilização da Novo-Pro[®] D (NPD) em agarose-glioxil (AgGly) permitiu uma estabilização de 20 vezes em relação à enzima livre dialisada a 50 °C e pH 6,5, além de ter mostrado um excelente desempenho na hidrólise da caseína. Apesar disso, os fatores de estabilidade obtidos para NPD imobilizada em AgGly foram muito inferiores comparados aos relatados pela literatura para outras proteases imobilizadas neste suporte (MATEO et al., 2006; TARDIOLI et al., 2003a). Dessa forma, neste capítulo serão estudadas diferentes estratégias para aumentar a estabilização da NPD em AgGly, além da imobilização da NPD em suporte quitosana ativada com glutaraldeído.

Uma das estratégias que pode melhorar as propriedades das enzimas é a modificação química de alguns grupos funcionais da superfície externa ou grupos funcionais chaves da enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014; RUEDA et al., 2016). A aaminação química da superfície da enzima é uma estratégia que pode aumentar a interação entre a enzima e suporte ativado para imobilização covalente (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005a; RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Além disso, a aaminação química altera as interações iônicas na superfície da proteína que podem afetar a conformação da enzima e, portanto, sua estabilidade, atividade, especificidade ou seletividade (RODRIGUES et al., 2014).

A polietilenimina (PEI) é um polímero que contém grupos amino primários, secundários e terciários com forte capacidade de troca aniônica. Este polímero tem sido usado para ativar suportes e imobilizar enzimas por meio de troca iônica, bem como para melhorar as propriedades e estabilidade de enzimas imobilizadas, estabelecendo reticulações adicionais com grupos carboxílicos da superfície da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2014; RUEDA et al., 2016; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017; ZAAK et al., 2017) e do suporte (quando disponível). O uso do PEI para modificar a superfície de uma enzima previamente imobilizada em um suporte pode melhorar o desempenho da enzima, alterando características como estabilidade, especificidade ou atividade. A melhora da estabilidade de uma enzima imobilizada revestida pode ocorrer provavelmente devido à

impedimentos dos movimentos da enzima causados pela presença de um polímero próximo à sua superfície, alteração do microambiente ao redor da enzima, prevenção da interação com interfaces ou proteólise reduzida (RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico natural derivado da quitina e é conhecido como um bom suporte para imobilização devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade, alta resistência mecânica, baixo custo e suscetibilidade a modificações químicas. A quitosana é obtida a um custo relativamente baixo de exoesqueletos de crustáceos (principalmente caranguejo, camarão e lagosta), resíduos da indústria de frutos do mar (CHANG; JUANG, 2007; MALMIRI; JAHANIAN; BERENJIAN, 2012; MUZZARELLI, 1980). A quitosana possui grupos amino e hidroxila reativos que, após outras modificações químicas, podem formar ligações covalentes com grupos reativos da enzima. Devido aos seus grupos amina, a quitosana é um polieletrólito catiônico ($pK_a = 6,5$) sendo insolúvel em soluções aquosas neutras, mas é solúvel em soluções ácidas abaixo de pH 6,5 (CHANG; JUANG, 2007; KRAJEWSKA, 2004; MALMIRI; JAHANIAN; BERENJIAN, 2012; RODRIGUES et al., 2008). As propriedades mecânicas deste polímero podem ser melhoradas por reticulação adicional usando reagentes bifuncionais como o glutaraldeído. Os grupos amino da quitosana podem reagir diretamente com o glutaraldeído para gerar grupos aldeído, que por sua vez formarão bases de Schiff com a enzima (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b; LÓPEZ-GALLEGO; GUISÁN; BETANCOR, 2013; RODRIGUES et al., 2008).

O glutaraldeído é um reagente bifuncional com capacidade de polimerização que pode reagir principalmente com grupos amino primários de proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos (tióis, fenóis e imidazóis) (BARBOSA et al., 2012, 2014; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b; MIGNEAULT et al., 2004). Diferente dos grupos glioxil, que somente são capazes de imobilizar proteínas em pH acima de 10,0 porque o pK_a dos resíduos de lisina é 10,5, a alta reatividade dos grupos aldeído do glutaraldeído o torna muito versátil, podendo ser utilizado em condições de pH diversas (BARBOSA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2008; VESCOVI et al., 2016). O pH usual para realizar a imobilização em suportes ativados com glutaraldeído é em torno de 7,0 a 8,5, pois esses grupos aldeídos são mais estáveis nesta faixa de pH. No entanto, nesses valores de pH mais neutros, pode-se esperar que a reatividade dos grupos ϵ -aminos da Lys seja bastante baixa e a intensidade da ligação covalente multipontual pode não ser muito alta (BARBOSA et al., 2012; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b; MIGNEAULT et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008).

Neste capítulo diferentes estratégias foram avaliadas na tentativa de estabilizar ainda mais a protease NPD: a aminação química da superfície da enzima antes da imobilização em AgGly; revestimento do derivado de AgGly com PEI; e modificação parcial dos grupos glioxil do suporte com grupos carboxílicos (utilizando glicina para ser fixada no suporte via grupo amino de glicina e aldeído de suporte) e subsequente imobilização e revestimento com PEI. No último caso, o PEI pode estabelecer reticulação com grupos carboxílicos da enzima e do suporte. Todos os biocatalisadores foram avaliados quanto à estabilidade térmica. Além dessas estratégias de estabilização do derivado de AgGly, a NPD foi também imobilizada em suporte quitosana ativada com glutaraldeído e avaliada quanto aos parâmetros de imobilização e estabilidade térmica.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Protease Novo-Pro[®] D (NPD) foi gentilmente fornecida pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil). Sepharose[™] CL-6B (agarose 6%) e glicina foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Quitosana (grau de desacetilação 85%) foi adquirida da Polymar Ind. Com. Imp. Exp. Ltda (Brasil). O éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE), glicidol, albumina de soro bovino (BSA), etilenodiamina, cloridrato de N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida (CDI), solução de polietilenoimina, solução de ácido picrilsulfônico (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico, TNBS), membrana de acetato de celulose e reagente de Bradford foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O periodato de sódio foi obtido na Qhemis (Jundiaí-SP, Brasil) e o borohidreto de sódio na Neon (São Paulo-SP, Brasil). Todos os outros reagentes eram de grau analítico e foram usados como recebidos.

4.2.2 Preparação do suporte agarose-glioxil

Suportes de agarose-glioxil foram preparados por eterificação da agarose com glicidol e subsequente oxidação com periodato de sódio conforme descrito anteriormente (GUISÁN, 1988). Sob um banho de gelo e agitação suave, 105 gramas de agarose foram adicionados a 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 50 mL de NaOH 1,7 M (preparado a frio e contendo 1,425 g de boro-hidreto de sódio) e 36 mL de glicidol (adicionados gota a gota). A suspensão foi mantida sob agitação mecânica à temperatura ambiente durante 15 horas. O suporte eterificado (agarose-gliceril) foi lavado com água destilada, seco a vácuo e suspenso em água destilada (relação massa/volume de 1/10). Em seguida, para 105 g de agarose-gliceril,

3,21 g de periodato de sódio foram adicionados à suspensão. Após 2 horas de agitação suave à temperatura ambiente, o suporte de agarose-glioxil foi lavado com água destilada, seco a vácuo e armazenado a 4 °C. A quantificação dos grupos aldeído formados por grama de suporte foi determinada por iodometria (GUISÁN, 1988).

4.2.3 Preparação do suporte quitosana-glutaraldeído

Quitosana em pó foi dissolvida a 2% (m/v) em solução de ácido acético (2% v/v) à temperatura ambiente. Após a homogeneização, a solução foi aquecida a 50 °C e adicionado solução de KOH 0,5 M (a 50 °C), na proporção 3:2 (v/v) (solução de KOH/solução de quitosana) que permaneceu sob agitação durante 30 min para coagulação da quitosana. A ativação de suporte foi feita com a adição de glutaraldeído a 0,2% (v/v). Após 30 min de agitação a 50 °C, o suporte foi filtrado sob vácuo, lavado com água destilada até a neutralidade e utilizado em seguida para imobilização da enzima (SILVA et al., 2012).

4.2.4 Ensaio de atividade enzimática padrão usando BTEE

A atividade enzimática foi medida por espectrofotometria a 25 °C seguindo o aumento da absorbância a 258 nm, durante 5 min, que ocorreu devido à hidrólise do BTEE (HUMMEL, 1959). A mistura de reação era composta por 140 µL de BTEE 8 mM em etanol anidro, 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 140 µL de solução de enzima. A concentração final de BTEE no ensaio foi de 0,36 mM. A atividade foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de $870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expresso em unidades BTEE (U_{BTEE}).

4.2.5 Procedimento de imobilização

Uma suspensão de proporção final de 1:10, massa de suporte: volume de solução de enzima (em tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10,0), foi agitada suavemente a 20 °C por 24 h. As atividades na solução enzimática inicial, no sobrenadante da imobilização e em um controle enzimático mantido nas mesmas condições da suspensão de imobilização foram monitoradas durante a reação de imobilização (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Para finalizar a reação enzima/suporte, borohidreto de sódio foi adicionado à suspensão (1mg/mL suspensão) para converter as bases de Schiff em ligações de amina secundária e para reduzir grupos glioxil residuais em grupos hidroxil inertes (BLANCO; GUISAN, 1989). Após 30 min de reação a 20 °C, os biocatalisadores foram recuperados por filtração à vácuo, lavados com água destilada e tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. O

biocatalisador foi suspenso neste tampão e sua atividade foi medida em condições ideais (descrito na Seção 4.2.4).

Os parâmetros de rendimento de imobilização (RI), atividade teórica imobilizada (referida à atividade desaparecida do sobrenadante) e atividade recuperada (AR) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020) foram calculados de acordo com as Equações (1) - (3) descritas na Seção 3.2.3.

4.2.6 Modificação da superfície da enzima imobilizada

A superfície da enzima imobilizada em agarose-glioxil foi modificada com polietilenoimina (PEI) de diferentes massas moleculares (2.000, 25.000 e 750.000 Da) de acordo com uma adaptação da metodologia relatada por Wilson et al. ⁽²⁰⁰⁶⁾. Uma solução de PEI (1 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH final 7,0) foi adicionada ao derivado de agarose-glioxil na proporção de 1:1 (g de derivado/mL de solução de PEI). A suspensão foi agitada a 25 °C durante 1 hora. Em seguida, o derivado modificado foi lavado com água destilada e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0.

4.2.7 Aaminação da superfície da enzima solúvel

A superfície da protease NPD foi quimicamente aminada com etilenodiamina (EDA) de acordo com a metodologia relatada anteriormente (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1995). Resumidamente, uma solução de enzima (4,5 mg/mL) foi misturada a uma solução de EDA 0,5 M pH 4,75 em uma proporção de 1:10 (v/v) e, em seguida, CDI foi adicionada nesta solução para uma concentração final de 10 mM. Após agitação suave durante 1,5 h, a solução enzimática foi dialisada a 4 °C com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 durante 24 h, usando uma membrana de celulose de corte de 12-14 kDa. Após este procedimento, a enzima aminada foi imobilizada em agarose-glioxil de acordo com o procedimento geral descrito na Seção 4.2.4, exceto pela alteração do pH (substituindo tampão de carbonato de sódio 100 mM pH 10,0 por tampão de carbonato de sódio 100 mM pH 9,0 ou tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0).

A aaminação da superfície da enzima foi avaliada colorimetricamente usando TNBS (SNYDER; SOBOCINSKI, 1975). Soluções contendo 0,25 mg/mL de TNBS e 0,03 mg/mL de enzima modificada ou não modificada foram preparadas em borato de sódio 100 mM pH 9,0 e incubadas a 25 °C por 30 min. Em seguida, as absorbâncias foram medidas a 420 nm e relacionadas à concentração de grupos aminos usando uma curva padrão construída com o aminoácido glicina (0,25 a 1 mg/mL).

4.2.8 Modificação do suporte de agarose-glioxil

Os grupos glioxil do suporte de agarose-glioxil foram parcialmente modificados com grupos carboxil por ligação covalente do aminoácido glicina. O suporte de agarose-glioxil foi suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 10,0 (1:10 m/v) contendo 0,2 mg/mL de glicina para modificar os grupos aldeído do suporte. A suspensão foi agitada a 25 °C até o completo desaparecimento da glicina do sobrenadante ou até sua concentração permanecer constante. A concentração de glicina no sobrenadante foi monitorada pela medida de concentração de grupos aminos pelo método colorimétrico do TNBS (SNYDER; SOBOCINSKI, 1975). O suporte foi lavado com água destilada, seguido por tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0.

4.2.9 Estabilidades térmicas e de pH da NPD solúvel e imobilizada

Estabilidades térmicas da NPD imobilizada, solúvel, solúvel dialisada (diálise durante 15 h a 4 °C preparada em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 8,0 em uma membrana de acetato de celulose de corte 12-14 kDa, para eliminar prováveis agentes estabilizadores) foram avaliados a 50 °C, pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) até 96 h e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) até 268 h. Um modelo de desativação térmica (SADANA; HENLEY, 1987) foi usado para ajustar os dados experimentais e a meia-vida do biocatalisador foi calculada. O fator de estabilidade foi definido como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizadas e solúveis dialisadas.

4.2.10 Ensaio de proteína

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

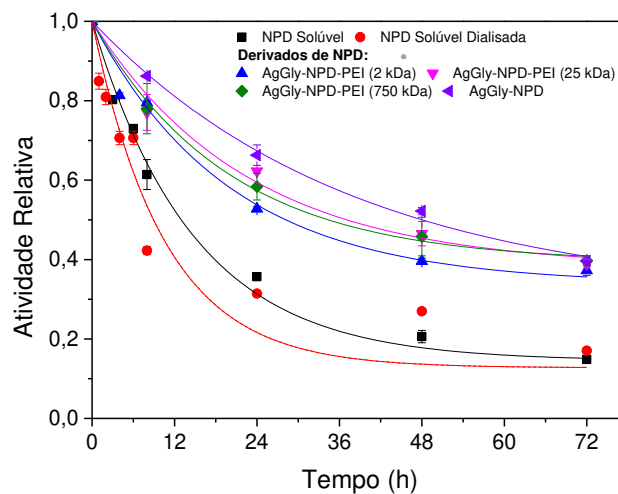
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Modificação da NPD imobilizada em agarose-glioxil com PEI

Derivados de NPD preparados em agarose-glioxil (AgGly-NPD) (com uma carga de enzima de 0,91 mg/g de suporte e 24 h de tempo de imobilização) foram revestidos com PEI de diferentes massas moleculares (2, 25 e 750 kDa) e então submetidos à inativação térmica a 50 °C e pH 8,0 (Figura 4.1). O revestimento dos derivados AgGly-NPD com PEI não afetou suas atividades enzimáticas. No entanto, diferentemente de estudos anteriores com outras

enzimas (DE OLIVEIRA et al., 2018; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017), o derivado AgGly-NPD não revestido foi mais estável do que aqueles derivados revestidos com PEI (AgGly-NPD-PEI). Dentre os derivados AgGly-NPD-PEI, os revestidos com PEI de 2 kDa foram menos estáveis do que os revestidos com PEI de 25 e 750 kDa, que alcançaram estabilidade semelhante.

Figura 4.1 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro[®] D (NPD) solúvel e derivados preparados agarose-glioxil (AgGly-NPD) e revestidos superficialmente com polietilenomina de diferentes massas moleculares (AgGly-NPD-PEI 2 kDa, 25 kDa e 750 kDa) a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley ⁽¹⁹⁸⁷⁾ ajustado aos dados experimentais.



De Oliveira et al. ⁽²⁰¹⁸⁾ imobilizaram dois coquetéis comerciais enzimáticos diferentes de xilanases (Bioxilanase L Plus e Depol[™] 333MDP) em agarose-glioxil 10%, obtendo derivados do primeiro coquetel 10 vezes (para derivado não revestido) e 100 vezes (para revestido com PEI de 10 kDa) mais estáveis do que a preparação solúvel. No entanto, usando o segundo coquetel de enzimas, os derivados revestidos com camada de PEI de diferentes tamanhos (1,5, 10 e 25 kDa) foram menos estáveis devido a alguma desestabilização das regiões cobertas pelo polímero induzida por forte interação iônica entre o grande polímero catiônico (contendo grupos amino ionizados terciários, secundários e primários) e os grupos aniônicos (como resíduos de aspartato e glutamato) na superfície da enzima (DE OLIVEIRA et al., 2018; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017).

4.3.2 Aminoação química da NPD

A Tabela 4.1 mostra que a aminoação química da NPD não afetou a sua atividade enzimática (tanto a enzima aminada quanto a não aminada tinham atividades específicas

semelhantes). Apenas uma pequena perda de proteína foi observada durante o procedimento de diálise, mas não afetando a atividade específica.

Tabela 4.1 - Avaliação da aminação química e procedimento de diálise da Novo-Pro® D (NPD) por atividade enzimática e proteínas totais para diferentes amostras.

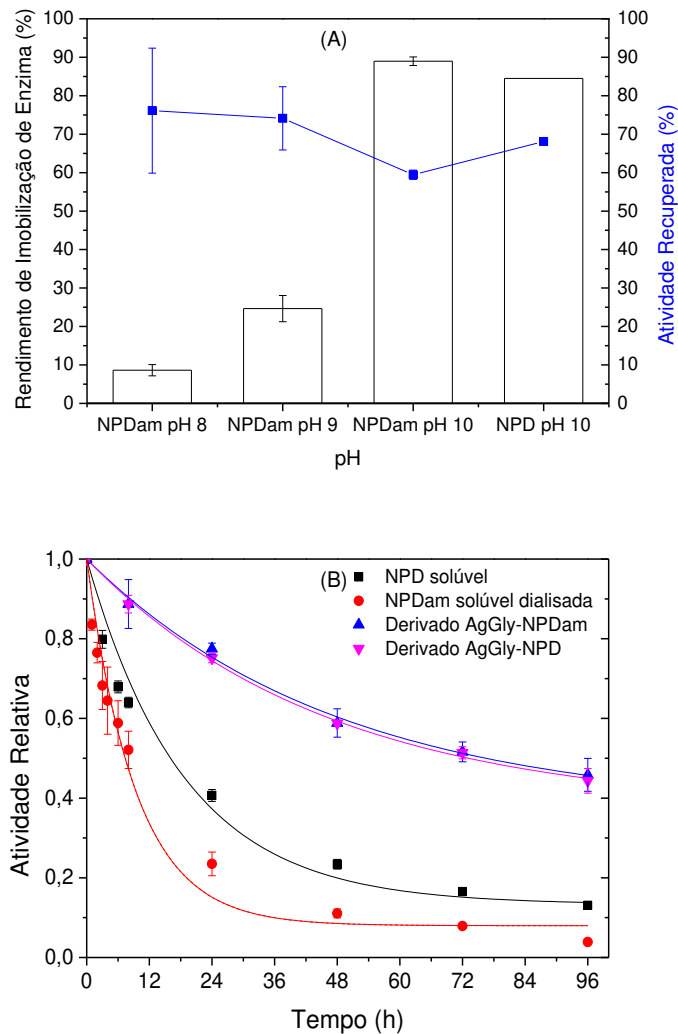
Enzima	Atividade Enzimática (U _{BTEE} /mL)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Específica (U _{BTEE} /mg protein)
NPD antes da aminação	58,2 ± 2,1	4,5 ± 0,5	12,9
NPD aminada	57,6 ± 0,5	4,5 ± 0,2	12,8
NPD aminada dialisada	45,3 ± 2,0	3,5 ± 0,1	12,9

Como os novos grupos aminos têm valor de pKa (9,2) menor do que os grupos aminos de resíduos de Lys (10,5) (RODRIGUES et al., 2014; RUEDA et al., 2016), a imobilização da NPD aminada em suporte agarose-glioxil foi avaliada em valores de pH de 8, 9 e 10. Para este conjunto de experimentos, foi usada uma carga de enzima de 1,2 mg de proteína/g de suporte. A Figura 4.2 (A) mostra que derivados de NPD aminada (AgGly-NPDam) preparados em pH 8,0 e 9,0 tiveram baixos rendimentos de imobilização, 8,6 e 24,6%, respectivamente. No entanto, esses derivados expressaram altas atividades (76,1 e 74,1% de atividades recuperadas, respectivamente). Por outro lado, os derivados preparados em pH 10,0 com NPD aminada e não aminada exibiram rendimentos de imobilização muito próximos (85-88%), mas menor atividade recuperada após aminação (em torno de 60 e 68%, respectivamente). Nesse caso, a enzima aminada poderia estar mais intensamente ligada ao suporte porque a quantidade de grupos amino aumentou de 582 (enzima não aminada) para 803 μ mol de grupos aminos/g proteína (enzima aminada), conforme mostrado na Tabela 4.2, assim diminuindo sua atividade devido a algumas alterações conformacionais deletérias. Mas, mesmo a enzima estando provavelmente mais intensamente ligada ao suporte não foi suficiente para aumentar sua estabilidade térmica, ou seja, NPD aminada e não aminada imobilizadas em agarose-glioxil em pH 10,0 exibiram perfis de inativação semelhantes (Figura 4.2 B). Resultados semelhantes foram relatados por Hussain et al. (2018), que imobilizaram a protease Alcalase® (ALC) modificada com etilenodiamina em agarose 4% ativada com grupos glioxil. Os autores relataram que não houve estabilização em relação à enzima não modificada imobilizada no mesmo suporte. Mas, ao contrário da NPD, a ALC perdeu cerca de 30% de sua atividade após a aminação.

Tabela 4.2 - Avaliação da aaminação química de Novo-Pro[®] D (NPD) pelo método colorimétrico do TNBS para a determinação de grupos amino.

Enzima Solúvel	Absorbância a 420 nm	[Grupos Amino] $\pm \sigma$ (μmol
	$\pm \sigma$	grupos amino/g proteína)
Não aminada	$0,156 \pm 0,009$	$582,20 \pm 34,60$
Aminada	$0,216 \pm 0,005$	$803,17 \pm 16,79$

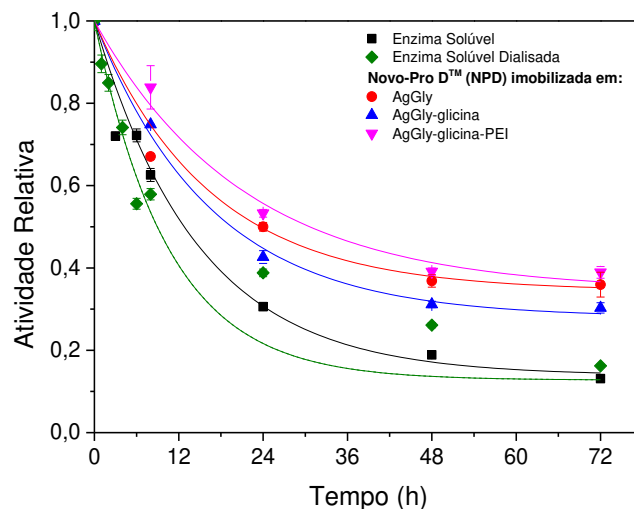
Figura 4.2 – (A) Rendimento de imobilização enzimática (barras) e atividade recuperada (linha azul) para Novo-Pro[®] D aminada (NPDam) e não aminada (NPD) imobilizadas em agarose-glioxil em diferentes pHs (25 °C, tempo de reação de 24 h e carga de proteína de 1,2 mg/g suporte). (B) Perfis de inativação térmica da NPD solúvel, não aminada e aminada (NPDam), e derivados preparados com a enzima não aminada (AgGly-NPD) e aminada (AgGly-NPDam) a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley⁽¹⁹⁸⁷⁾ ajustado aos dados experimentais



4.3.3 Modificação parcial do suporte agarose-glioxil com glicina

A modificação da superfície do suporte agarose-glioxil (AgGly) com o aminoácido glicina foi avaliada com o objetivo de fornecer, além dos grupos aldeído do suporte, grupos carboxílicos da glicina capazes de interagir com grupos carregados positivamente na superfície da enzima, bem como com grupos aminos carregados da PEI. Após incubação do suporte de agarose-glioxil em solução de glicina 0,2 mg/mL, 12,2 μ mol de glicina/g de suporte foram ligados ao suporte (calculado pelo desaparecimento da glicina no sobrenadante da reação), indicando que 10,7% dos grupos aldeído do suporte foram modificados. NPD imobilizada em suporte agarose-glioxil-glicina (AgGly-glicina) levou a um rendimento de imobilização de $79,2 \pm 4,1\%$, um rendimento próximo ao obtido para NPD imobilizada no controle de agarose-glioxil ($88,4 \pm 3,9\%$). As atividades recuperadas para ambos os derivados foram muito próximas ($71,3 \pm 6,0\%$ e $71,8 \pm 3,7\%$ para NPD imobilizada em suportes AgGly-glicina e AgGly, respectivamente). NPD imobilizada em suporte AgGly-glicina também foi revestida com PEI 25 kDa (derivado AgGly-glicina-PEI) para ser avaliada quanto à estabilidade térmica (pH 8,0, 50 °C) e comparado à enzima solúvel e NPD imobilizada em suportes AgGly-glicina e AgGly. A Figura 4.3 mostra que o derivado de NPD preparado em AgGly-glicina apresentou a menor estabilidade em relação aos outros derivados (apenas 2,1 vezes mais estável do que a enzima solúvel dialisada). Os derivados de NPD preparados em AgGly e AgGly-glicina-PEI apresentaram perfis de inativação térmica semelhantes, mas com o revestimento com PEI a enzima imobilizada exibiu uma ligeira estabilização quando comparada à enzima imobilizada em AgGly.

Figura 4.3 - Perfis de inativação térmica de Novo-Pro[®] D (NPD) solúvel e derivados preparados em suportes AgGly, AgGly-glicina e AgGly-glicina-PEI a 50 °C, pH 8,0. Linha contínua: modelo de inativação térmica Sadana-Henley⁽¹⁹⁸⁷⁾ ajustado aos dados experimentais.



Por último, a NPD foi imobilizada em quitosana-glutaraldeído a fim de avaliar os parâmetros de imobilização, a estabilidade térmica e comparação com o derivado de AgGly.

4.3.4 Imobilização da NPD em quitosana-glutaraldeído

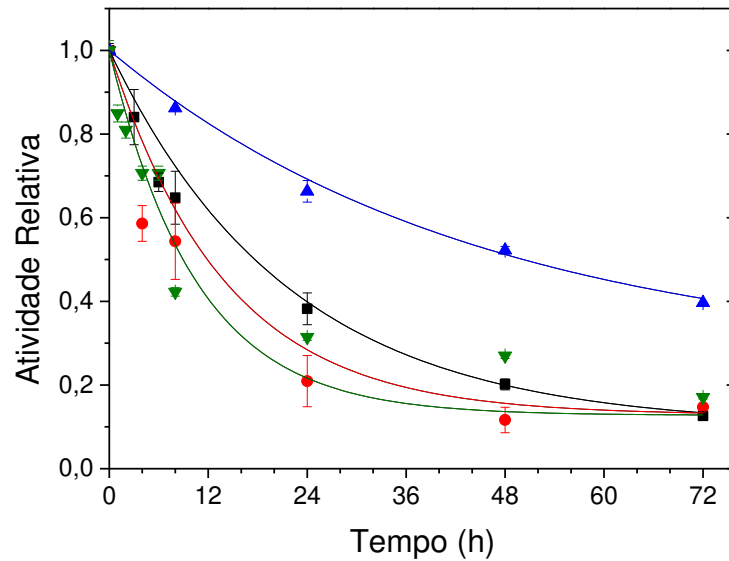
Devido à reatividade do glutaraldeído, a imobilização é realizada em pH próximo da neutralidade, além de permitir a interação de diferentes grupos funcionais da enzima com o suporte ativado (BARBOSA et al., 2014; VESCOVI et al., 2016). Neste estudo a reação de imobilização ocorreu em pH 10,0 para comparação com a imobilização em AgGly, uma vez que a NPD é estável nesse pH e a reatividade dos grupos ϵ -aminos da Lys é mais alta. Isso pode levar a uma diferente orientação da enzima sobre o suporte em relação àquela obtida com a imobilização da NPD em AgGly, portanto, alterando as propriedades catalíticas da enzima.

A imobilização da NPD em quitosana-glutaraldeído (carga oferecida de 0,9 mg/g suporte) obteve rendimento de imobilização maior do que em AgGly nas mesmas condições (93,5% e 89,6%, respectivamente). Entretanto, o derivado de quitosana-glutaraldeído-NPD apresentou menor atividade recuperada (34,7%) em relação ao derivado AgGly-NPD (91,9%). O baixo valor da atividade recuperada pode estar associado à distorção da estrutura da enzima imobilizada devido à formação de várias ligações com o glutaraldeído ou à inativação da enzima pelo glutaraldeído. A enzima solúvel, dialisada e não dialisada, e os diferentes derivados obtidos foram avaliados quanto à estabilidade térmica a 50 °C e pH 8,0 (Figura 4.4). As meias-vidas da NPD dialisada e não dialisada, calculadas a partir do modelo Sadana-Henley⁽¹⁹⁸⁷⁾ foram de 9,0 e 17,7 h, respectivamente. Esses resultados mostram que o derivado NPD preparado em AgGly (fator de estabilidade de 5,6 vezes) foi mais estável do que o preparado com quitosana-glutaraldeído (fator de estabilidade de 1,3 vezes). A menor estabilidade do derivado quitosana-glutaraldeído em comparação com a AgGly pode ser explicada pelas diferenças morfológicas entre esses materiais. A fibra de agarose apresenta uma estrutura plana e rígida que favorece a ligação da enzima à fibra, em duas dimensões. Os suportes de quitosana apresentam uma estrutura mais maleável e disforme, o que pode permitir que a fibra se adapte à estrutura da enzima durante o processo de imobilização ao invés de induzir alterações na enzima, levando a um aumento pequeno na sua estabilidade (GARCIA-GALAN et al., 2011). Baseados nos resultados obtidos, o suporte quitosana-glutaraldeído não foi mais utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho.

Os resultados obtidos até então indicaram que nenhuma das estratégias avaliadas foi capaz de melhorar os parâmetros iniciais de imobilização ao avaliar os catalisadores em pH 8,0.

Como o pH de operação da NPD na hidrólise de proteínas do leite neste trabalho será em torno de 6,5, os melhores derivados obtidos foram testados quanto à estabilidade térmica a 50 °C e pH 6,5.

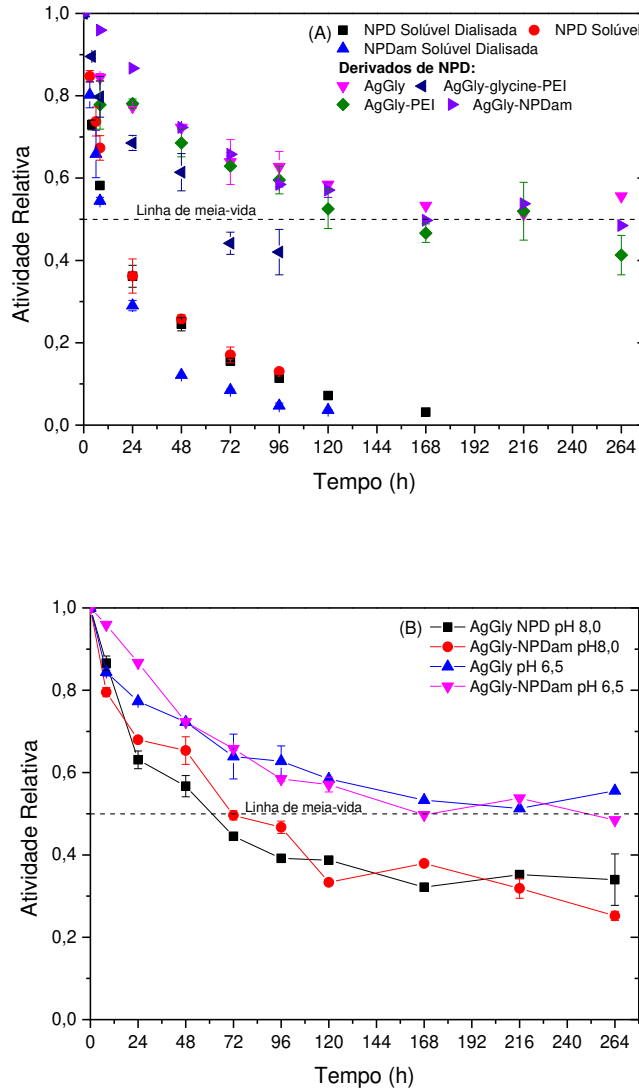
Figura 4.4 – Estabilidade térmica a 50 °C e pH 8,0 de Novo-Pro® D solúvel não dialisada (●), solúvel dialisada (▼), imobilizada em agarose-glioxil (▲) e quitosana-glutaraldeído (■). Linha contínua: modelo de inativação térmica de Sadana-Henley (1987) ajustados aos dados experimentais.



4.3.5 Estabilidade Térmica a pH 6,5 da Novo-Pro® D Solúvel e Imobilizada

A enzima solúvel e os diferentes derivados obtidos foram avaliados quanto à estabilidade térmica a 50 °C e pH 6,5 (Figura 4.5 A). As enzimas solúveis dialisadas, aminada e não aminada, exibiram tempos de meia-vida em torno de 9,3 e 10,6 h, respectivamente. Conforme mostrado na Figura 4.5 (B), os derivados de NPD (não aminada e aminada) preparados em AgGly foram mais estáveis em pH 6,5 do que em pH 8, atingindo meias-vidas em torno de 216 h, enquanto em pH 8,0 esses derivados obtiveram meias-vidas de 58,5 e 77,8 h, respectivamente. Ambos os derivados foram 20 vezes mais estáveis em pH 6,5 e 50 °C do que as enzimas solúveis (NPD e NPDam) dialisadas.

Figura 4.5 - (A) Perfis de inativação térmica de Novo-Pro® D solúvel não aminada (NPD) e aminada (NPDam) e derivados preparados em suportes AgGly e AgGly-glicina, seguido ou não de modificação com PEI a 50 °C, pH 6,5. (B) Perfis de inativação térmica de NPD e NPDam immobilizadas em AgGly a 50 °C, pH 6,5 ou pH 8,0



4.4 Conclusões

Dentre os derivados AgGly-NPD-PEI, os revestidos com PEI de 25 e 750 kDa foram mais estáveis do que os revestidos com PEI de 2 kDa em pH 8,0 e 50 °C, porém nenhum deles foi mais estável do que a AgGly-NPD tradicional. A aminação química da NPD aumentou a quantidade de grupos amino (de 582 para 803 μmol de grupos aminos/g proteína) sem afetar a sua atividade enzimática. E sua imobilização em AgGly (pH 10,0) rendeu altos valores de RI (85 %) e AR (60%). Da mesma forma, a imobilização da NPD em AgGly-glicina permitiu altos valores de RI (79,2%) e AR (71,3%), porém nenhuma das estratégias mencionadas aumentou

a estabilidade dos derivados obtidos em relação ao derivado tradicional de AgGly-NPD (50 °C pH 8,0 e 6,5). A imobilização da NPD em quitosana-glutaraldeído obteve rendimento de imobilização maior do que em AgGly nas mesmas condições (93,5% e 89,6%, respectivamente). Porém, o derivado de quitosana-glutaraldeído-NPD apresentou menor atividade recuperada (34,7%) em relação ao derivado AgGly-NPD (91,9%) e menor fator de estabilidade em pH 8,0 e 50 °C (1,3 e 5,6 vezes, respectivamente).

Os resultados deste capítulo mostraram que as estratégias avaliadas não tiveram sucesso em melhorar significativamente a estabilidade da NPD em relação à imobilização pelo protocolo tradicional em AgGly. Assim, o derivado AgGly-NPD foi selecionado para experimentos seguintes.

5. DESEMPENHO DA NOVO-PRO[®] D E ALCALASE[®] SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS NA HIDRÓLISE DO LEITE DE VACA: PERFIS PEPTÍDICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DOS HIDROLISADOS

5.1 Introdução

Neste capítulo as enzimas Novo-Pro D[®] (NPD) e Alcalase[®] (ALC) (solúveis e imobilizadas) foram caracterizadas e comparadas quanto à atividade em diferentes substratos (BTEE e caseína), efeito da diálise, parâmetros de imobilização em agarose-glioxil (AgGly), estabilidade térmica e de pH, além do desempenho dos catalisadores obtidos na hidrólise do leite vaca. Dos hidrolisados obtidos foram avaliados os perfis peptídicos e propriedades físico-químicas e sensoriais. A hidrólise de proteína é um dos métodos mais usados para reduzir a alergenicidade das proteínas do leite. É importante que a hidrólise das proteínas do leite seja feita de forma controlada a fim de não comprometer as características organolépticas do leite (MICINSKIA et al., 2013). Durante a reação de hidrólise, grupos apolares que estavam inicialmente dentro da estrutura tridimensional da proteína ficam expostos e levam à sensação de gosto amargo. A adsorção por carvão ativado, microencapsulação e adição de ciclodextrinas (CDs) são alternativas que têm sido empregadas para reduzir o amargor de hidrolisados proteicos (LI et al., 2014; MONGE NETO et al., 2017).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos constituídos por seis (α -CD), sete (β -CD), oito (γ -CD) ou mais unidades de glicopiranosose ligadas por ligações α -(1,4) (VENTURINI et al., 2008). São produzidas a partir de amido ou derivados de amido por meio de uma conversão enzimática catalisada pela ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) (LI et al., 2014). Devido à sua conformação espacial como cones truncados, com uma cavidade interna apolar e uma borda externa polar, elas possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos de interesse. As CDs são amplamente utilizadas na indústria de alimentos como aditivos alimentares, para estabilização de sabores, para eliminação de sabores indesejáveis ou outros compostos indesejáveis como o colesterol e para evitar contaminações microbiológicas e reações de escurecimento (ASTRAY et al., 2009). A formação de complexos de inclusão de aminoácidos com CDs para redução de sabor amargo tem sido descrita na literatura (LINDE et al., 2009, 2010; MONGE NETO et al., 2017). Linde et al., (2009) aplicaram a α -CD em solução de hidrolisado de proteína de soja (5% m/v) nas concentrações de 5% e 10% (m/v) e obtiveram redução significativa na intensidade de amargor em 40% e 60%, respectivamente; além disso, detectaram a formação dos complexos de inclusão de fenilalanina, triptofano, tirosina, isoleucina, prolina e histidina com α -CD por técnicas de ressonância magnética nuclear. Monge Neto et al. (2017) usaram concentrações de 1,5; 2,0 e

2,5% (m/m) de α -CD, β -CD ou γ -CD em hidrolisado de proteína de soja e concluíram que a β -CD, na concentração de 2,0%, foi considerada a melhor para a redução do amargor do hidrolisado proteico obtido do farelo de soja, devido aos bons resultados apresentados e seu menor custo de produção.

A Portaria nº 370, de 1997 (BRASIL, 1997), estabelece as características mínimas físico-químicas e microbiológicas do leite UHT, bem como os aspectos sensoriais mínimos do produto. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade aprovado por esta legislação exige como requisitos apenas as características de aspecto líquido, cor branca, odor e sabor característicos, sem sabores nem odores estranhos. Assim, mesmo que um leite UHT esteja em conformidade com os padrões da legislação brasileira, este poderá ser de baixa qualidade sensorial. Aparência, sabor e textura do leite são características sensoriais importantes para os produtores e comerciantes para satisfazer as preferências do consumidor (ADHIKARI et al., 2010).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para leite UHT, presente nessa legislação, estabelece o mínimo de 3% de gordura para o leite integral e o mínimo de 8,2% de extrato seco desengordurado (ESD), o máximo de 0,5% de gordura para o leite desnatado e o mínimo de 8,4% de ESD, e 0,6 a 2,9% de gordura para o semidesnatado e o mínimo de 8,3% de ESD. Além disso, determina que o leite UHT com diferentes teores de gordura apresente acidez titulável entre 0,14 e 0,18% de ácido láctico e estabilidade ao etanol 68% (BRASIL, 1997). Uma particularidade do leite UHT é a permissão da adição de sais estabilizantes para melhorar a estabilidade das proteínas que, frente ao agressivo tratamento térmico, podem precipitar trazendo transtornos à indústria e problemas de aceitação pelo consumidor. A Portaria nº 370, de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), aprova a adição de citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio, separados ou em combinação, em quantidade não superior a 0,1g/100 mL. O índice crioscópico e a densidade do leite são alterados pela adição dos estabilizantes de proteína.

A Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), discorre sobre a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, não incorporando o leite UHT. Segundo esta mesma norma, o leite pasteurizado deve atender, dentre outros requisitos, os seguintes parâmetros físico-químicos: acidez de 0,14 a 0,18 em g de ácido láctico/100 mL; densidade relativa 15/15 °C: 1,028 a 1,034 para o integral e 1,028 a 1,036 para o semidesnatado ou desnatado; índice crioscópico entre $-0,530^{\circ}\text{H}$ (quinhentos e trinta milésimos de grau Hortvet

negativos) e $-0,555^{\circ}\text{H}$ (quinhentos e cinquenta e cinco milésimos de grau Hortvet negativos) (BRASIL, 2018).

Neste contexto, foram avaliadas as características sensoriais dos hidrolisados de leite produzidos com ALC solúvel, NPD imobilizada em AgGly e ALC imobilizada em AgGly. O hidrolisado de NPD solúvel não foi avaliado quanto à característica sensorial por não ser de grau alimentício. Além disso, no hidrolisado de ALC imobilizada em AgGly foi adicionado α -CD em duas concentrações, 5% ou 10% m/v, a fim de avaliar a redução do sabor amargo com a inclusão desse aditivo. As características físico-químicas dos hidrolisados (densidade relativa, índice crioscópico e acidez) também foram avaliadas.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

As proteases Novo-Pro D[®] (NPD) e Alcalase[®] (ALC) foram gentilmente fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil). α -ciclodextrina (Cavamax W6) foi adquirida da Wacker (Estados Unidos). Sepharose[™] CL-6B (agarose 6%), azul de bromofenol, acrilamida, persulfato de amônio foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Leite integral líquido UHT Ninho (Nestlé, Araraquara, Brasil). O éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE), glicidol, albumina de soro bovino (BSA), membrana de acetato de celulose corte 12-14 kDa (diâmetro 16 mm) e reagente de Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O periodato de sódio foi obtido na Qhemis (Jundiaí-SP, Brasil), 2-mercaptoetanol e borohidreto de sódio na Neon (São Paulo-SP, Brasil). TEMED (N, N, N', N'-tetrametilenodiamina) foi adquirido da Labsolute[®] e Chemsolute[®]. Bis-acrilamida foi adquirida da Ludwig Biotecnologia (Alvorada-RS, Brasil). Todos os outros reagentes eram de grau analítico e foram usados como recebidos. A agarose-glioxil foi preparada conforme descrito na Seção 4.2.2 usando o protocolo padrão (GUISÁN, 1988).

5.2.2 Ensaio de atividade enzimática

Foram usados dois procedimentos de medida de atividade enzimática. Para medida de atividade com substrato pequeno foi usada a hidrólise do BTEE cuja metodologia está descrita na Seção 4.2.3. Para medida de atividade enzimática com substrato grande foi feita a hidrólise de 25 mL de solução de caseína (2%, m/v, em água destilada) a 50 °C e pH 6,5. O pH da reação foi controlado pela adição de solução de KOH em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau,

Suíça). Uma unidade de caseína foi expressa em μmol de ligações peptídicas clivadas por minuto (U_{CAS}).

5.2.3 Procedimento de Imobilização da NPD e ALC

Uma suspensão de proporção final de 1:10, massa de suporte:volume de solução de enzima (em tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10,0), foi agitada suavemente a 20 °C por 24 h. As atividades na solução enzimática inicial, no sobrenadante da imobilização e em um controle enzimático mantido nas mesmas condições da suspensão de imobilização foram monitoradas durante a reação de imobilização (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Para finalizar a reação enzima/suporte, borohidreto de sódio foi adicionado à suspensão (1 mg/mL de suspensão) para converter as bases Schiff em ligações de amina secundária e para reduzir grupos glioxil residuais em grupos hidroxil inertes (BLANCO; GUIBAN, 1989). Após 30 min de reação a 20 °C, os biocatalisadores foram recuperados por filtração à vácuo, lavados com água destilada e tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. O biocatalisador foi suspenso neste tampão para medida de atividade enzimática.

Os parâmetros de rendimento de imobilização (RI), atividade teórica imobilizada (referida à atividade desaparecida do sobrenadante) e atividade recuperada (AR) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020) foram calculados de acordo com as Equações (1) - (3) descritas na Seção 3.2.3.

5.2.4 Eletroforese SDS-PAGE

O gel de poli(acrilamida) 15% (contendo SDS 0,1%) foi preparado misturando-se 1,25 mL de tampão de separação (Tris base 1,5 M; SDS 0,4% m/v; pH 8,8), 2,5 mL de solução Acril-bis (acrilamida 30% m/v e bis-acrilamida 0,8% m/v), 1,22 mL de água destilada, 7 μL de TEMED e 25 μL de solução de persulfato de amônio 10% m/v. A solução final foi cuidadosamente transferida entre as placas de eletroforese, deixando-se 1 cm livre, onde foi adicionado butanol para nivelar o gel. Após 1 hora de polimerização, preparou-se o gel de concentração 5% misturando-se 750 μL de tampão de concentração (Tris base 0,5 M; SDS 0,4% m/v; pH 6,8), 300 μL de Acril-bis, 1,55 mL de água destilada, 200 μL de bis-acrilamida 2% m/v, 5 μL de TEMED e 15 μL de solução de persulfato de amônio 10% m/v. Depois de retirado o butanol, foi adicionado o gel de concentração 5% e em seguida foi introduzido o pente de eletroforese para a formação das pistas de aplicação de amostras. As amostras foram diluídas na razão 1:1 em tampão de ruptura (em 0,378g de Tris base dissolvido em 15 mL de água

destilada e pH ajustado em 6,8, foram adicionados: 2,5 mL de mercaptoetanol, 1g de SDS, 5 mL de glicerina, 0,003 g de azul de bromofenol e o volume final foi acertado para 25 mL e pH conferido em 6,8), em seguida foram aquecidas em banho de água fervente por 1 minuto. Após 1 hora de polimerização do gel de concentração foram aplicados 8 µL de amostra, devidamente preparada, por pista, sendo a primeira pista destinada ao marcador de massa molecular (5 µL). As placas contendo o gel de eletroforese foram transferidas para uma cuba (Mini-PROTEAN Tetra Cell adquirida da Bio-Rad) contendo eletrólito (30,29 g de tris base foi dissolvido em 800 mL de água destilada e foram adicionados 144,4 g de glicina e 10 g de SDS, completando-se o volume para 1 L com água destilada, para uso foi diluída 10x). O tempo de corrida foi de aproximadamente 1 h e 50 min a uma corrente constante de 20 mA por placa. O gel de eletroforese foi retirado da célula e transferido para um recipiente contendo corante de azul brilhante de Coomassie. Após coloração por aproximadamente 1 hora, o gel de eletroforese foi revelado com solução descolorante (para 1 L de solução aquosa foram misturados 370 mL de metanol e 11,3 mL de ácido acético glacial).

5.2.5 Estabilidades térmicas e de pH da NPD e ALC solúveis e imobilizadas

Estabilidades térmicas da NPD e ALC imobilizadas em agarose-glioxil, suas preparações comerciais solúveis e solúveis dialisadas (diálise durante 24 h a 4 °C contra tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7 em uma membrana de acetato celulose de corte 12-14 kDa, para eliminar prováveis agentes estabilizadores) foram avaliados a 50 °C, pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) até 168 h para as enzimas solúveis e 312 h para enzimas imobilizadas. As atividades enzimáticas residuais foram medidas pela hidrólise de BTEE sob condições padrões (pH 7,0 e 25 °C conforme descrito na Seção 4.2.3). Um modelo de dois parâmetros (k_1 e α_1), proposto por Sadana-Henley (1987), foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica conforme Equação 5:

$$a_R = (1 - \alpha_1) \times \exp(-k_1 \times t_I) + \alpha_1 \quad (5)$$

Em que a_R é a atividade relativa (A/A_0); α_1 é a razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0); k_1 é a constante da taxa de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}) e t_I é o tempo ensaiado de inativação térmica. As meias-vidas (tempo de inativação necessário para que a enzima perca 50% de sua atividade inicial) foram calculadas a partir da equação modelo ajustada aos dados experimentais. O fator

de estabilidade foi definido como a razão entre as meias-vidas das enzimas imobilizadas e solúveis dialisadas.

As estabilidades da NPD e ALC solúveis e imobilizadas (dialisadas e não dialisadas) também foram avaliadas a 25 °C em pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M) e pH 10,0 (tampão carbonato de sódio 0,1 M). Após 72 h, as atividades enzimáticas residuais na hidrólise de BTEE foram medidas sob condições padrões (pH 7,0 e 25 °C conforme descrito na Seção 4.2.3).

5.2.6 Hidrólise do Leite de Vaca

A hidrólise do leite integral foi realizada a 50 °C e pH 6,5 por até 4 h usando NPD e ALC solúveis e imobilizadas (dialisadas e não dialisadas). Os resultados do grau de hidrólise (GH) foram calculados a partir do volume de solução de hidróxido de potássio consumido para manter o pH 6,5 constante usando a Equação (4) conforme Seção 3.2.6, considerando o h_{tot} (número total de ligações peptídicas que podem ser clivadas no substrato de proteína) para o leite, 8,1 mEq/g (ADLER-NISSEN, 1986).

5.2.7 Fracionamento de Hidrolisados de Proteínas por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SE-HPLC)

O perfil peptídico dos hidrolisados foi acompanhado por análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters modelo e2695, em coluna de exclusão de tamanho BioSep - SEC s2000 (Phenomenex) com fase móvel tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 0,15 M, pH 6,8 e fluxo de 1 mL/min e detector UV-visível a 214 nm, com injeção de 20 µL de amostra por 30 min. Foram utilizados padrões de massa molecular de 6,5 kDa, 12 kDa, 29 kDa e 66 kDa. Antes das análises, as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 e 0,22 µm, sucessivamente. O método utilizado, descrito por Gupta (1983), consiste em considerar a área do cromatograma diretamente proporcional à concentração de proteínas e peptídeos presentes na amostra. Assim, o perfil peptídico é determinado dividindo o cromatograma em várias regiões (limitadas pelo tempo de retenção de marcadores padrões de massa molecular) e calculando-se o percentual de cada fração de área cromatográfica em relação à área total do cromatograma. Conhecendo-se a concentração total de proteínas na amostra, supõe-se que o percentual em área é equivalente ao percentual em massa de proteínas e/ou peptídeos.

5.2.8 Análises Físico-químicas e Sensorial

As análises físico-químicas (acidez, ponto crioscópico e densidade relativa) e sensoriais foram realizadas em laboratórios externos especializados do Centro de Tecnologia de Laticínios (Tecnolat) e Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (LAFISE/CCQA), respectivamente, ambos do Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL, Campinas, SP).

A análise das características sensoriais foi baseada em normas padrões da ABNT (2017a, 2017b) e Instituto Adolfo Lutz (2008). O exame das características sensoriais das amostras foi feito de forma consensual por equipe de cinco avaliadores do LAFISE/CCQA/ITAL, selecionados quanto à acuidade sensorial, de acordo com a norma ABNT NBR ISO-8586 (2016). Foram avaliados os atributos de aparência, odor, sensação na boca e sabor. A amostra foi recebida e mantida sob refrigeração até a realização da análise. Para quantificar a intensidade de cada atributo, a equipe de avaliadores empregou uma escala de 0 a 10 em que o valor 0 corresponde a inexistente ou intensidade extremamente fraca, o valor 5, à intensidade moderada e o valor 10 à intensidade extremamente forte.

As análises físico-químicas de acidez (g ácido láctico/100ml amostra) e densidade (g/mL) foram realizadas conforme metodologias padrões descritas em BRASIL (1981). A análise de crioscopia foi realizada conforme BRASIL (2018).

A lactose foi analisada no Departamento de Engenharia Química da UFSCar por HPLC utilizando um cromatógrafo Waters e2695 equipado com coluna Sugar-PakTMI (300×6,5 mm) utilizando água ultra pura como fase móvel num fluxo de 0,6 mL/min, temperatura de 80 °C e detectores de índice de refração e UV-visível, utilizando uma curva de calibração para lactose. Antes das análises, as amostras foram devidamente filtradas em membranas de 0,45 e 0,22 µm.

5.2.9 Ensaio de Proteína

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Caracterização das Enzimas Livres

A tabela 5.1 mostra as atividades proteolíticas das proteases solúveis NPD e ALC medidas usando como substratos a caseína (substrato natural da protease e de alta massa molecular) e o BTEE (substrato sintético de baixa massa molecular). A NPD e a ALC

apresentaram atividades próximas, tanto para o substrato BTEE (701 U_{BTEE}/mL e 880 U_{BTEE}/mL , respectivamente) quanto para a caseína (2537 U_{CAS}/mL e 2784 U_{CAS}/mL). Além disso, as atividades específicas das duas formulações foram muito próximas para o substrato BTEE (15 U/mg de NPD e 18 U/mg de ALC) e para caseína (54,23 U/mg de NPD e 57,19 U/mg de ALC). Tardioli et al. (2003a) encontraram para a ALC uma atividade específica de 69 $\mu\text{equiv min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ medida em caseína (8%, m/v), pH 8,0 e 40 °C, próximo ao encontrado neste trabalho (57,19 U/mg de ALC medida em 2 %, m/v de caseína, 50°C, pH 6,5). Segundo a literatura, as duas proteases são produzidas pelo mesmo micro-organismo, *B. licheniformis*, e ambas têm atividade de subtilisina; porém, a protease NPD é de um microrganismo geneticamente modificado, mas a proteína em si não é geneticamente modificada (NOVOZYMES A/S, 2007). Além disso, a ALC usada nesse trabalho (Alcalase® 2.4 L FG) é de grau alimentício, o que deve levar a um maior rigor em sua purificação, enquanto a NPD é uma formulação de subtilisina para uso em *pet food*. Quanto à especificidade, ambas NPD e ALC são classificadas como serina proteases, em que a NPD cliva preferencialmente ligações peptídicas de aminoácidos aromáticos e contendo enxofre, tais como, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina; e a ALC tem uma ampla especificidade, hidrolisando preferencialmente ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos aromáticos (WAGLAY; KARBOUNE, 2016).

A Figura 5.1 mostra o gel de eletroforese obtido para a estimativa do tamanho molecular das enzimas. Tanto a ALC quanto a NPD apresentaram uma banda na região de 35 kDa e uma banda densa na região menor que 17 kDa, mostrando que as formulações possuem pequenas proteínas contaminantes. Além disso, a ALC apresentou também uma banda um pouco acima de 100 kDa.

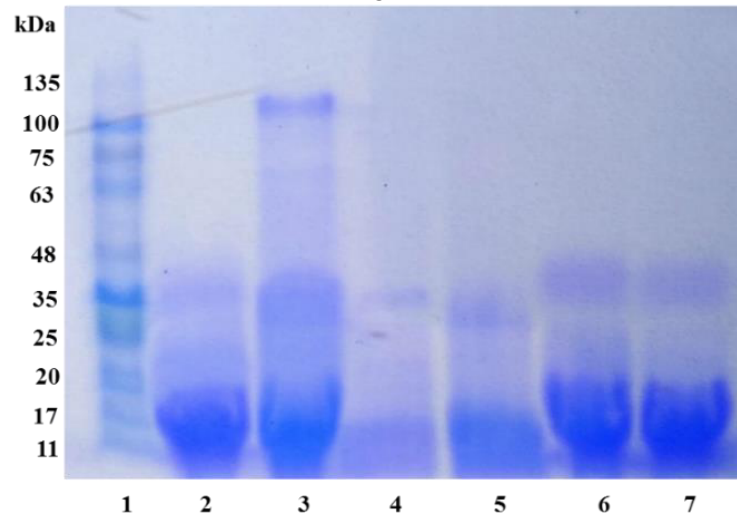
Tabela 5.1 – Atividades Específicas da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC) utilizando substrato pequeno (BTEE) e grande (caseína).

Enzima	Substrato	Atividade (U/mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
NPD	BTEE ¹	701,72 ± 11,38	46,78 ± 3,33	15,0
	Caseína ²	2537,06 ± 248,50	46,78 ± 3,33	54,23
ALC	BTEE ¹	880,00 ± 45,52	48,69 ± 3,90	18,07
	Caseína ²	2784,56 ± 245,49	48,69 ± 3,90	57,19

¹ Hidrólise de solução de caseína (2%, m/v, em água destilada) a 50 °C e pH 6,5.

² Hidrólise do BTEE (0,36 mM) a 25°C e pH 7,0.

Figura 5.1 - Eletroforese SDS-PAGE de proteases usando gel de poliacrilamida 15%. Pistas 1- Marcador de massa molecular; 2-Novo-Pro[®] D (NPD) (26,7 mg/mL e 100 µg no gel); 3-Alcalase[®] (ALC) (25 mg/mL e 100 µg no gel); 4-NPD Dialisada (2,5 mg/mL e 10 µg no gel); 5-ALC Dialisada (8,04 mg/mL e 32 µg no gel); 6- NPD (25 mg/mL e 100 µg no gel); 7-NPD (25 mg/mL e 100 µg no gel).



5.3.2 Efeito da Diálise na Estabilidade das Enzimas Solúveis

A diálise (24 h a 4 °C, conduzida com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7 em uma membrana de acetato de celulose de corte 12-14 kDa) foi realizada para eliminar os agentes estabilizadores (monopropilenoglicol ou glicerol, por exemplo) que atuam como inibidores da enzima estabilizando as moléculas em meio líquido. Durante a imobilização da enzima em suporte glioxil-agarose os estabilizantes não se ligam ao suporte, apenas a proteína é imobilizada (TARDIOLI et al., 2003a). Por isso, a estabilidade da enzima imobilizada (que não contém os estabilizantes) foi comparada com a estabilidade da enzima solúvel dialisada. As preparações enzimáticas de NPD e ALC não dialisadas e dialisadas foram avaliadas quanto à estabilidade térmica a 50 °C, pH 6,5, em tampão fosfato de sódio 100 mM (Figura 5.2). A Equação de Sadana-Henley (1987) foi ajustada aos dados experimentais. Os valores estimados dos parâmetros α_1 e k_1 e o tempo de meia-vida calculado a partir da equação encontram-se na Tabela 5.2. As meias-vidas para enzimas não dialisadas e dialisadas, calculadas a partir da equação de Sadana-Henley (1987), foram 11 e 10,2 h, respectivamente, para ALC e 9,2 e 9 h, respectivamente, para a NPD. A NPD e ALC apresentaram tempo de meia-vida semelhantes e pequena redução no tempo de meia-vida de suas soluções dialisadas.

Figura 5.2 – Perfis de inativação térmica das enzimas Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC) dialisadas e não dialisadas a 50 °C e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1 M).

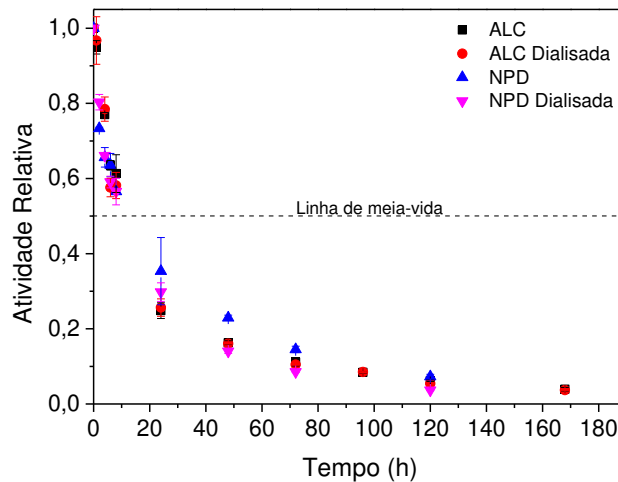
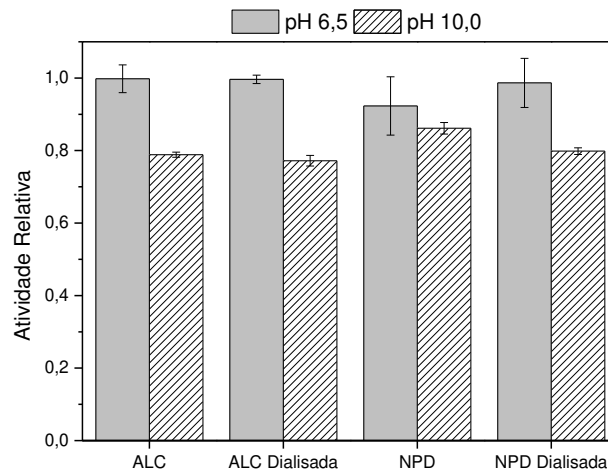


Tabela 5.2 – Parâmetros do modelo de Sadana-Henley (1987) ajustados aos dados experimentais de inativação térmica da Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC) solúveis dialisadas e não dialisadas (50 °C pH 6,5).

Enzima	α_1	k_1 (h ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (h)
ALC	0,08328 ± 0,01368	0,07197 ± 0,00451	0,99	11,0
ALC Dialisada	0,08394 ± 0,0196	0,07742 ± 0,00696	0,98	10,2
NPD	0,17087 ± 0,04429	0,10054 ± 0,01831	0,93	9,2
NPD Dialisada	0,1015 ± 0,03277	0,09047 ± 0,01124	0,97	9,0

As enzimas foram avaliadas também quanto à estabilidade em pH 6,5 e pH 10,0 medindo a atividade residual após 72 h de incubação a 25 °C. Em pH 6,5 todas as enzimas (ALC não dialisada e dialisada, NPD não dialisada e dialisada) se mostraram estáveis sem perda de atividade enzimática significativa. As preparações enzimáticas mostraram ser menos estáveis em pH 10,0. A ALC não dialisada e dialisada e a NPD dialisada mantiveram perto de 80% de suas atividades iniciais após incubação em pH 10,0, já a NPD não dialisada foi um pouco mais estável, preservando cerca de 86% da atividade inicial. A escolha do pH 6,5 para avaliação da estabilidade foi devido a aplicação dos catalisadores neste trabalho na hidrólise do leite de vaca, cujo pH está em torno de 6,4 a 6,8 (SGARBIERI, 2005; VIEIRA et al., 2013). Já o pH 10,0 é o pH de incubação da reação de imobilização em suporte agarose-glioxil que será estudado na próxima seção.

Figura 5.3 – Perfil de atividade enzimática residual medida com substrato BTEE das enzimas Alcalase® (ALC) não dialisada e dialisada, Novo-Pro® D (NPD) não dialisada e dialisada depois de 72 h de incubação a 25 °C em pH 6,5 e pH 10,0.



5.3.3 Imobilização de NPD e ALC dialisadas e não dialisadas em suporte agarose-glioxil

De acordo com o estudo apresentado no Capítulo 3, onde foi avaliada a influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização, o tempo de 24 h foi considerado mais adequado para imobilização da NPD. Por isso foi fixado o tempo de 24 h para estudo dos parâmetros de imobilização das enzimas NPD e ALC dialisadas e não dialisadas. A reação de imobilização foi acompanhada pela medida de atividade pela hidrólise do substrato BTEE; além disso, as atividades do derivado e da enzima solúvel também foram medidas por hidrólise de caseína para avaliar a influência do tamanho do substrato nos parâmetros de imobilização.

Os rendimentos de imobilização (RI) foram superiores a 90 % para todas as preparações enzimáticas, com uma pequena diminuição entre as preparações não dialisadas e dialisadas, sendo RI de 94,2 % para NPD não dialisada, 91,5 % para NPD dialisada, 98,6 % para ALC não dialisada e 97,3 % para ALC dialisada (Tabela 5.3 e Tabela 9.1 do Apêndice A). A atividade recuperada (AR) não sofreu grandes alterações entre as preparações enzimáticas não dialisadas e dialisadas. A NPD não dialisada alcançou AR de 80,7 % enquanto a dialisada rendeu 79,9 %, medida do derivado com substrato BTEE (Tabela 5.3 e Tabela 9.1 do Apêndice A). Quando a atividade do derivado de NPD não dialisada foi medida com substrato caseína houve uma queda na atividade recuperada para 21,67%. A ALC não dialisada alcançou AR de 75,8% e a dialisada 74,3% (medida com substrato BTEE). Quando a atividade do derivado de ALC não dialisada foi medida com substrato caseína a AR caiu para 24,33 %. Essa baixa AR com a caseína, tanto para NPD quanto para ALC, pode ser devido a uma incorreta orientação da enzima imobilizada que mesmo ativa tem seu sítio ativo impedido esterificamente ao acesso de substratos

macromoleculares, como a caseína, o que não se verifica com substratos pequenos, como o BTEE. Além disso, alguma perda de atividade por distorção da estrutura tridimensional da enzima imobilizada, ou mesmo problemas de atraso difusional, poderiam justificar que mesmo usando substrato pequeno a atividade recuperada não atingiu 100%.

Tabela 5.3 – Parâmetros de imobilização da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC) não dialisadas imobilizadas em agarose-glioxil (20 °C, 24 h de reação, pH 10,0, e carga enzimática de 0,7 mg/g de suporte).

Enzima	Substrato	Atividade Oferecida (U/g suporte)	RI ¹ (%)	AR ² (%)	Atividade da Enzima Imobilizada (U/g suporte)
NPD	BTEE	7,40	94,25 ± 0,44	80,73 ± 0,20	5,63 ± 0,01
	Caseína	26,82	94,25	21,67	5,48
ALC	BTEE	9,70	98,61 ± 0,15	75,78 ± 0,85	7,26 ± 0,07
	Caseína	30,82	98,61	24,33	7,39

¹ Rendimento de Imobilização de Enzima

² Atividade Recuperada

5.3.4 Estabilidade das Enzimas Imobilizadas

As estabilidades térmicas da NPD e ALC solúveis e imobilizadas em agarose-glioxil (dialisada e não dialisada) foram avaliadas a 50 °C e pH 6,5. Como explicado anteriormente, este pH foi escolhido por ser próximo ao pH do leite (em torno de 6,4 a 6,8) (SGARBIERI, 2005; VIEIRA et al., 2013), cuja hidrólise foi avaliada neste trabalho. A Figura 5.4 mostra que a NPD imobilizada não dialisada foi cerca de 21 vezes mais estável do que a enzima solúvel dialisada (196 h e 9 h de meia-vida, respectivamente, calculadas a partir dos dados mostrados na Tabela 9.2 do Apêndice A). A partir da Figura 5.4, nota-se que os derivados de NPD dialisada e ALC dialisada apresentaram meia-vida em torno de 200 h, enquanto o derivado de ALC não dialisada parece ter sido um pouco mais estável com tempo de meia-vida próximo de 300 h.

As enzimas imobilizadas em agarose-glioxil foram avaliadas também quanto à estabilidade em pH 6,5 e pH 10,0 medindo a atividade residual após 72 h de incubação a 25 °C. De acordo com a Figura 5.5 não houve diferença significativa entre as estabilidades em pH 6,5 e 10,0, além disso, os diferentes biocatalisadores (ALC imobilizada, não dialisada e dialisada, NPD imobilizada, não dialisada e dialisada) se mostraram estáveis, retendo mais de 90% de suas atividades iniciais. Ao comparar as estabilidades das enzimas imobilizadas com as solúveis, observa-se que os derivados de ALC, não dialisada e dialisada, se mostraram mais

estáveis em pH 10,0 do que suas preparações solúveis. Já para os derivados de NPD essa diferença de estabilidade em pH 10,0 em relação à solúvel foi menos significativa.

Figura 5.4 - Perfil de inativação da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC), livres e imobilizadas, dialisadas e não dialisadas, a 50°C e pH 6,5 (tampão fosfato de sódio 0,1M). Derivados carregados com 1,3 mg proteína/g suporte.

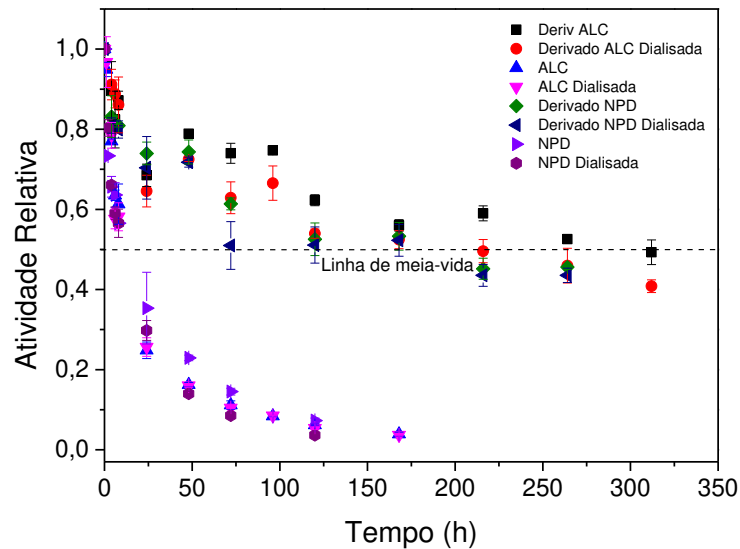
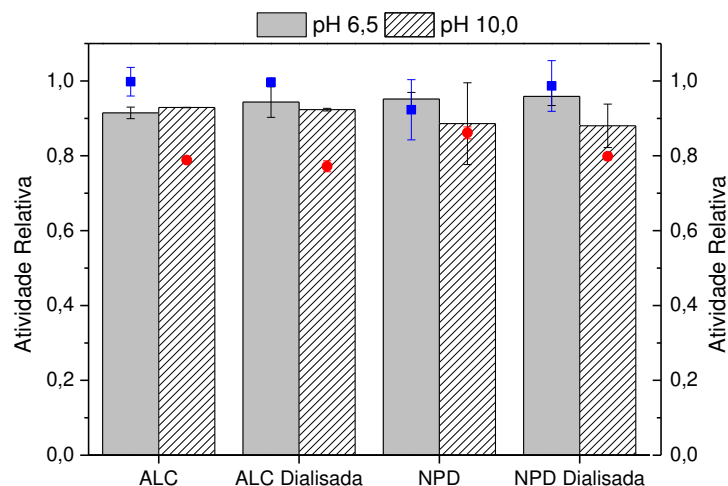


Figura 5.5 – Perfil de atividade enzimática residual medida com substrato BTEE das enzimas Alcalase® (ALC) imobilizada e Novo-Pro® D (NPD) imobilizada, não dialisadas e dialisadas, depois de 72 h de incubação a 25 °C em pH 6,5 e pH 10. Os dados de estabilidade para as enzimas solúveis que já foram apresentados na Figura 5.3 foram adicionados para fim de comparação: (■) pH 6,5 e (●) pH 10,0.



5.3.5 Desempenho das enzimas livres e imobilizadas (dialisada e não dialisadas) na hidrólise das proteínas do leite a 50 °C e pH 6,5: Influência do GH nos perfis peptídicos

As Tabelas 5.4 e 9.3 (Apêndice A) mostram a distribuição de tamanho (por massa molecular) das proteínas do leite integral não hidrolisadas e hidrolisadas com as enzimas NPD e ALC solúveis e imobilizadas em suporte AgGly (dialisadas e não dialisadas). As reações ocorreram a 50 °C e o pH foi mantido constante em 6,5 pela adição de KOH (20 mM) até o grau de hidrólise de 5% (Tabela 5.4). A reação com enzima solúvel foi interrompida por aquecimento a 90 °C por 10 min. A reação com enzima imobilizada foi interrompida com a separação do biocatalizador imobilizado por filtração à vácuo. A hidrólise do leite utilizando a NPD solúvel gerou peptídeos em sua maioria (95%) menores que 12,4 kDa, sendo que aproximadamente 82% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 5.4). Levando-se em consideração a massa molecular das principais proteínas alergênicas no leite de vaca: α 1- (23,6 kDa), α 2- (25,2 kDa), β - (24 kDa) e κ -caseína (19 kDa) da caseína e α -LA (14,4 kDa) e β -LG (18,3 kDa) no soro de leite (PRASAD; SHIVAY, 2020), o perfil peptídico obtido pela hidrólise do leite com NPD solúvel indica que as principais proteínas alergênicas mencionadas foram hidrolisadas em peptídeos de menor massa molecular. O hidrolisado do leite usando a NPD solúvel dialisada apresentou perfil peptídico semelhante ao obtido com a NPD solúvel não dialisada, com 92,4% dos peptídeos menores que 12,4 kDa e 78% deles menores que 6,5 kDa. O leite obtido da hidrólise com NPD imobilizada (não dialisada) apresentou 67,36% de peptídeos menores que 12,4 kDa, sendo que 60,29% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 5.4). Tanto NPD solúvel quanto NPD imobilizada reduziram significativamente a quantidade de proteínas não hidrolisadas (no leite de vaca) nas faixas de 66-29 kDa (redução total) e 29-12,4 kDa (redução de 50 a 70%). Entretanto, nota-se que o leite hidrolisado com NPD imobilizada ainda continha proteínas não hidrolisadas (25,24%) com massa molecular maior que 66 kDa, mas em menor porcentagem que aquela presente no leite não hidrolisado. Por isso, pode ser que ainda exista neste leite alguma proteína alergênica entre as mencionadas que não sofreu hidrólise pela enzima.

Os perfis peptídicos dos hidrolisados da ALC solúvel dialisada e não dialisada foram muito semelhantes. A hidrólise do leite utilizando a ALC solúvel não dialisada como catalisador gerou peptídeos em sua maioria (94,07%) menores que 12,4 kDa, sendo que aproximadamente 76,77% são de tamanhos menores que 6,5 kDa (Tabela 5.4). Entretanto, essa enzima rendeu hidrolisados contendo uma maior quantidade de peptídeos menores que 6,5 kDa comparada à

quantidade destes nos hidrolisados obtidos com a NPD não dialisada. Novamente, a forma imobilizada (dialisada ou não) rendeu hidrolisados ainda contendo proteínas não hidrolisadas (ou peptídeos grandes) nas faixas de 29-66 kDa (7,42-7,55%) e maiores de 66 kDa (aproximadamente 24,5%). Mas, de modo geral, a maior concentração de peptídeos (aproximadamente 70%) continha tamanhos menores que 12,4 kDa. Resultados similares foram reportados por Pessato et al. (2016), os quais utilizaram ALC solúvel e imobilizada em agarose 4B-CL ativada com grupo glioxil como catalisador na hidrólise de proteínas do soro e produziram hidrolisados com diferentes perfis de massas moleculares, sendo que o hidrolisado produzido com ALC imobilizada continha maiores quantidades de peptídeos com massas moleculares maiores que 14 kDa do que o hidrolisado produzido com ALC solúvel.

A presença de peptídeos de maiores massas moleculares nos hidrolisados preparados com as enzimas imobilizadas em agarose-glioxil pode ser devido a possíveis limitações difusionais de proteínas de alta massa molecular, como a caseína, no interior dos poros do suporte, dificultando o acesso destas ao sítio ativo da enzima. É importante ressaltar que a caseína encontra-se no leite na forma de micelas que medem de 500 a 3.000 angstroms de diâmetro e apresentam massa molecular da ordem de $2,5 \times 10^8$ Daltons (SGARBIERI, 2005).

Tabela 5.4 – Perfil peptídico dos hidrolisados de leite de vaca integral a 50 °C e pH 6,5 e grau de hidrólise (GH) igual a 5%.

Amostra	Composição (%) por faixa de massa molecular				
	> 66 kDa	66 -29 kDa	29-12,4 kDa	12,4-6,5 kDa	< 6,5 kDa
Leite não hidrolisado	29,88	16,31	15,94	2,9	34,97
Leite hidrolisado com:					
NPD Solúvel		5,11 ± 0,24		12,74 ± 0,45	82,17 ± 0,21
NPD Solúvel Dialisada	0,32 ± 0,01	7,29 ± 0,14		13,73 ± 0,20	78,68 ± 0,33
AgGly-NPD	25,24 ± 0,11	7,41 ± 0,08		7,07 ± 0,21	60,29 ± 0,17
AgGly-NPD Dialisada	21,81 ± 0,34	8,59 ± 0,30		8,01 ± 0,01	61,61 ± 0,62
ALC Solúvel	0,05 ± 0,05		5,89 ± 0,00	17,30 ± 0,05	76,77 ± 0,02
ALC Solúvel Dialisada			5,39 ± 0,27	18,97 ± 1,13	75,64 ± 0,86
AgGly-ALC	24,50 ± 0,91	7,55 ± 0,46		10,58 ± 0,32	57,38 ± 1,69
AgGly-ALC Dialisada	24,51 ± 0,08	7,42 ± 0,04		10,84 ± 0,08	57,24 ± 0,04

Atividades enzimáticas dos biocatalisadores (Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC)) no reator: NPD solúvel (130 U_{BTEE}/L reator); NPD solúvel dialisada (130 U_{BTEE}/L reator); NPD imobilizada em agarose-glioxil – AgGly-NPD (846,4 U_{BTEE}/L reator; derivado com 211,6 U_{BTEE}/g sólido de atividade teórica imobilizada (ATI)); AgGly-NPD dialisada (846,4 U_{BTEE}/L reator; derivado com 237,9 U_{BTEE}/g sólido de ATI); ALC solúvel (E =130 U_{BTEE}/L reator); ALC solúvel dialisada (130 U_{BTEE}/L reator); AgGly-ALC (846,4 U_{BTEE}/L reator; derivado com 209 U_{BTEE}/g sólido de ATI); AgGly-ALC dialisada (846,4 U_{BTEE}/L reator; derivado com 252,7 U_{BTEE}/g sólido de ATI). Os derivados tinham carga proteica teórica imobilizada de 10-11 mg/g gel.

Como não houve grande diferença entre os perfis peptídicos dos hidrolisados preparados com enzimas dialisadas e não dialisadas, os estudos prosseguiram apenas com as enzimas solúveis ou imobilizadas não dialisadas.

Outra hipótese levantada para a diferença entre os perfis peptídicos de hidrolisados com enzima solúvel e enzima imobilizada está no método de inativação do catalisador, uma vez que a enzima solúvel para ser inativada é levada a 90 °C por 10 minutos, porém no tempo necessário para que o leite aqueça de 50 °C para 90 °C a enzima pode estar ativa e atuando na hidrólise do leite. Dessa forma, o perfil peptídico apresentado para o hidrolisado preparado com a enzima solúvel pode não ser o perfil para um grau de hidrólise de 5%, mas sim maior do que 5%. Por isso, foi realizada uma nova hidrólise de leite integral usando NPD solúvel e imobilizada como catalisadores, porém quando a reação com a enzima solúvel atingiu o grau de hidrólise de 5%, uma amostra foi rapidamente resfriada em banho de gelo, filtrada em membrana de 45 µm e 22 µm (processo padrão para todas as amostras) e imediatamente analisada por SE-HPLC. Os resultados da Tabela 5.5 mostram perfis peptídicos diferentes para as amostras de hidrolisados preparados com NPD solúvel quando a reação foi interrompida por aquecimento (90 °C por 10 minutos) para inativação da enzima ou interrompida por resfriamento rápido. A fração de peptídeos menores que 6,5 kDa foi de 82,50% para a amostra que passou por aquecimento e 63,72% para a amostra resfriada. Além disso, as amostras de hidrolisados resfriados apresentaram peptídeos maiores que 66 kDa (2,84%) e entre 12,4 e 29 kDa (12,11 %), o que não se observou nas amostras de hidrolisados obtidas após inativação por aquecimento (Tabela 5.5). Estes resultados sugerem que a hidrólise do leite continua ocorrendo durante o aquecimento do hidrolisado até a temperatura de inativação da enzima.

Para calcular o grau de hidrólise real dos hidrolisados de leite foram feitos testes com três graus de hidrólise teóricos diferentes (2,5; 5 e 8%) em que as amostras foram tituladas após o processo de inativação da enzima livre (90 °C, 10 minutos) até o pH inicial (6,5), e então calculado o grau de hidrólise. Os resultados da Tabela 5.6 confirmam que o grau de hidrólise real dos hidrolisados de leite de vaca após o aquecimento para inativação da enzima é maior do que o grau de hidrólise medido antes da inativação. Alguma diferença nos hidrolisados preparados com NPD solúvel, em que as amostras foram obtidas após aquecimento ou resfriamento, pode ser observada também no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.6).

Tabela 5.5 - Perfil peptídico dos hidrolisados de leite de vaca integral a 50 °C, pH 6,5 e GH 5%.

Amostra	Composição (%) por faixa de massa molecular				
	> 66 kDa	66 -29 kDa	29-12,4 kDa	12,4-6,5 kDa	<6,5 kDa
1-Leite não hidrolisado	34,45	17,23	21,06	-	27,26
Leite hidrolisado com:					
2-NPD solúvel, interrupção da reação por aquecimento	-	-	-	17,50 ± 2,02	82,50 ± 2,02
3-NPD solúvel, interrupção da reação em banho de gelo	2,84 ± 0,44	-	12,11 ± 3,63	21,34 ± 3,50	63,72 ± 0,58
4-NPD imobilizada, interrupção da reação por filtração	16,85 ± 5,29	5,31 ± 2,06	5,59 ± 0,64	17,66 ± 2,08	56,45 ± 5,00
Varição percentual nas composições das diferentes frações obtidas nas amostras 1 e 3.	92	100	57	100	43
Varição percentual nas composições das diferentes frações obtidas nas amostras 1 e 4.	49	31	26	100	48

Atividades enzimáticas dos biocatalisadores (Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase® (ALC)) no reator: NPD solúvel (221,67 U_{BTEE}/L reator com inativação da enzima por aquecimento); NPD solúvel (221,67 U_{BTEE}/L reator com interrupção da reação no banho de gelo); NPD imobilizada em AgGly (219,82 U_{BTEE}/L reator, derivado com 176,8 U_{BTEE}/g sólido de atividade teórica imobilizada e 11,24 mg de proteína/g gel teórica imobilizadas)

Figura 5.6 - Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. Pistas 1- Marcador de massa molecular; 2- Leite Pasteurizado, 3-Leite Integral, 4-Hidrolisado 5% com NPD solúvel (aquecimento), 5- Hidrolisado 5% com NPD solúvel (gelo), 6- Hidrolisado 5% com NPD imobilizada, 7- Marcador. Concentração das amostras: 1,0 mg proteína/mL. Quantidade de proteína no gel: 20 µg por poço.

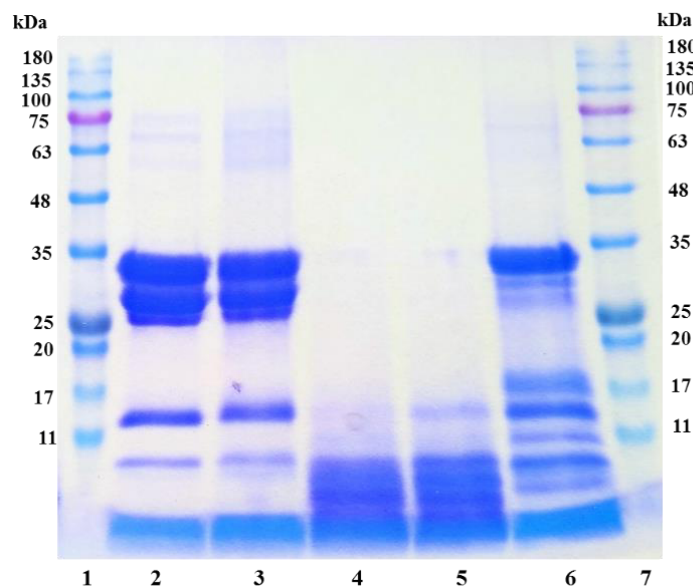


Tabela 5.6 – Grau de hidrólise teórico do hidrolisado de leite de vaca (reação catalisada pela Novo-Pro® D solúvel a 50 °C, pH 6,5, [E] =221,67 U_{BTEE}/L reator) calculado antes da inativação da enzima por aquecimento e grau de hidrólise real calculado após inativação da enzima por aquecimento (90 °C 10 minutos).

GH Teórico (%)	GH Real (%)
2,5	8,12 ± 0,67
5,0	11,59 ± 1,19
8,0	12,6 ± 0,09

Os graus de hidrólise calculados que estão mostrados na Tabela 5.6 indicam que o aquecimento para inativação implica continuidade da hidrólise até se obter total inativação da enzima. As variações percentuais entre as frações presentes inicialmente no leite e obtidas após hidrólise com enzima livre e imobilizada (Tabela 5.5), sem a influência do aquecimento e, portanto, para graus de hidrólise realmente próximos, indicam que a maior diferença no desempenho da enzima livre e imobilizada ocorre para as frações maiores. Aparentemente, tanto o aquecimento quanto efeitos difusivos e estéricos interferem nos perfis obtidos. Assim, a fim de avaliar a influência do grau de hidrólise no perfil peptídico do leite hidrolisado foi realizado um experimento apenas com as enzimas imobilizadas, ALC e NPD, para que não houvesse a interferência da inativação da enzima por aquecimento no grau de hidrólise. Além disso, foi usado para a reação derivados de baixa carga (0,7 mg/g suporte) para minimizar efeitos difusionais. O tempo de hidrólise foi fixado em 4 horas.

A Tabela 5.7 apresenta os perfis peptídicos dos hidrolisados para diferentes graus de hidrólise, em que é possível observar o aumento na composição dos peptídeos menores que 6,5 kDa à medida que se aumentou o grau de hidrólise. Ao comparar o desempenho da AgGly-NPD e da AgGly-ALC (particularmente para GHs de 8 e 10%), conclui-se que a AgGly-NPD foi capaz de produzir uma maior quantidade de peptídeos com massas moleculares menores que 6,5 kDa. Esse comportamento não era esperado, uma vez que resultados similares foram obtidos anteriormente (Tabela 5.4) usando derivados de AgGly-NPD e AgGly-ALC mais carregados (10-11 mg proteína/g suporte), e ainda considerando que as duas preparações enzimáticas contêm a mesma protease (uma subtilisina) como principal componente enzimático. Mais estudos são necessários para explicar este comportamento.

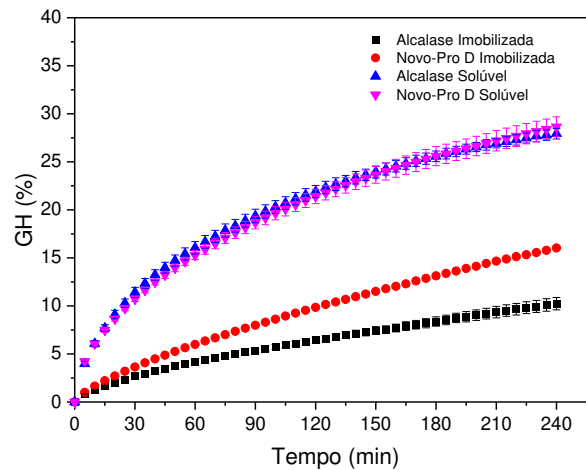
Tabela 5.7 - Perfil peptídico de hidrolisados de leite integral, preparados a 50°C e pH 6,5 com diferentes graus de hidrólise, usando como catalisador Novo-Pro® D imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD) baixa carga (0,7 mg proteína/g suporte ou 5,6 U/g gel), Alcalase® imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC) baixa carga (0,7 mg proteína/g suporte ou 7,3 U/g gel). [E]: 200 U_{BTEE}/L, pH 6,5 controlado com KOH 20 mM.

Amostra de leite hidrolisado com:	Composição (%) por faixa de massa molecular (kDa)				
	> 66	66 - 29	29 - 12,4	12,4 - 6,5	< 6,5
AgGly-NPD, GH 2,5%	28,99 ± 3,51	9,78 ± 1,24	5,98 ± 0,50	12,00 ± 1,31	43,26 ± 0,47
AgGly-NPD, GH 5%	23,60 ± 1,84	8,54 ± 0,25		18,02 ± 0,22	49,85 ± 1,38
AgGly-NPD, GH 8%	19,04 ± 3,16	7,23 ± 0,04		8,49 ± 0,57	65,26 ± 3,78
AgGly-NPD, GH 10%	14,47 ± 3,05	4,75 ± 0,51		9,07 ± 0,56	71,73 ± 3,01
AgGly-NPD, GH 12%	12,46 ± 0,92	4,22 ± 0,09		8,45 ± 0,15	74,90 ± 0,86
AgGly-NPD, GH 15%	8,73 ± 0,94	3,82 ± 0,02		8,42 ± 0,25	79,04 ± 1,17
AgGly-NPD, GH Final 16,03 ± 0,07 %	7,44 ± 0,56	3,49 ± 0,01		8,13 ± 0,06	80,95 ± 0,63
AgGly-ALC, GH 2,5%	33,25 ± 4,76	6,68 ± 1,22		5,66 ± 0,00	43,52 ± 3,87
AgGly-ALC, GH 5%	31,27 ± 1,32	4,75 ± 0,59		18,21 ± 0,76	45,79 ± 0,05
AgGly-ALC, GH 8%	24,56 ± 3,72	4,89 ± 0,22		19,70 ± 0,77	50,86 ± 4,27
AgGly-ALC, GH 10%	21,25	4,03		19,89	54,84
AgGly-ALC, GH Final 10,23 ± 0,65 %	17,73 ± 0,85	4,09 ± 0,23		19,71 ± 0,62	58,48 ± 0,47

A Figura 5.7 mostra os perfis de hidrólise do leite com o tempo usando NPD e ALC nas suas formas livres e imobilizadas. Para uma mesma carga enzimática no reator (200 U/L), não houve diferença nos perfis de hidrólise usando as enzimas livres (GH de aproximadamente 28% foi obtido após 4 horas de reação). Entretanto, com as enzimas imobilizadas, o desempenho da NPD foi superior ao da ALC (por exemplo, GH de 10% foi obtido com aproximadamente 2 e 4 horas usando NPD e ALC imobilizadas, respectivamente). Esse comportamento pode ser um indicativo que as enzimas foram imobilizadas em agarose-glioxil com diferentes orientações, tornando o sítio ativo mais ou menos impedido estericamente ao acesso de substratos macromoleculares, o que não é evidente usando substratos pequenos e rapidamente hidrolisados (BTEE, por exemplo). Essa diferença na orientação das enzimas poderia ser justificada por diferenças em seus estados de glicosilação, considerando que essas proteases são produzidas de forma diferente (NOVOZYMES A/S, 2007), embora contenham o mesmo componente enzimático (uma subtilisina). De fato, a Figura 5.1 mostra que a banda de subtilisina na ALC

está um pouco abaixo de 35 kDa, sugerindo que na NPD a subtilisina seja mais glicosilada. Tardioli (2003) também observou em gel SDS-PAGE (15% poliacrilamida) da ALC duas bandas distintas, identificando a enzima como a banda pouco acima de 30 kDa.

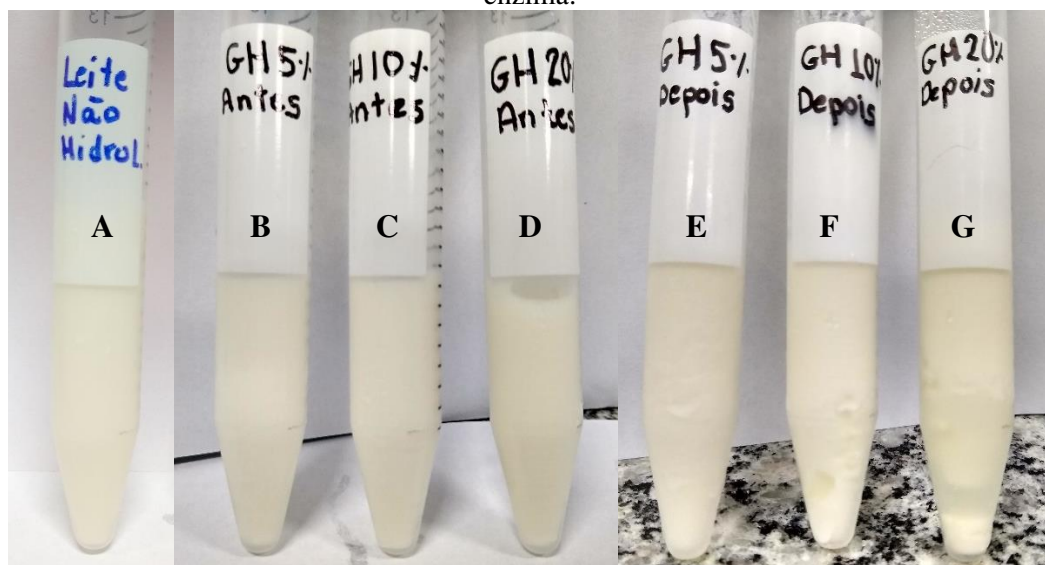
Figura 5.7 – Perfis de grau de hidrólise (GH) ao longo do tempo de reação da hidrólise das proteínas do leite integral catalisadas pela Novo-Pro[®] D e Alcalase[®] imobilizadas a 50 °C, [E]: 200 U/L, pH 6,5 controlado com KOH 20 mM. Derivados com baixa carga, 0,7 mg proteína/g suporte.



5.3.6 Análise Visual

Na Figura 5.8 são apresentadas fotografias do leite não hidrolisado e hidrolisado em diferentes GH, com NPD solúvel, antes e depois do aquecimento para inativação da enzima (90 °C por 10 minutos).

Figura 5.8 - Fotografias de leite UHT integral não hidrolisado (A), hidrolisados com GH 5 (B), 10 (C) e 20% (D), sob ação de NPD solúvel antes do aquecimento para inativação da enzima e hidrolisados com GH 5 (E), 10 (F) e 20% (G), sob ação de NPD solúvel depois do aquecimento para inativação da enzima.



Pode-se observar que o grau de hidrólise de 5%, antes do processo de aquecimento, não gera alteração visível no hidrolisado 5% obtido com enzima livre, em relação ao leite integral UHT. Hidrolisados com GH 5%, obtidos com enzima imobilizada (sem foto), também não mostraram alterações visíveis. Por outro lado, o aumento do grau de hidrólise e o aquecimento provocam alterações visíveis. A seguir, apresenta-se a análise físico-química de leite integral e hidrolisado em diferentes condições.

5.3.7 Análise Físico-Química (ITAL): densidade, acidez, ponto crioscópico

A Tabela 5.8 mostra os parâmetros físico-químicos determinados no ITAL para leite integral UHT não hidrolisado, leite hidrolisado com NPD solúvel e imobilizada (GH 5%) e ALC solúvel e imobilizada (GH 5%). As concentrações de lactose no leite integral e hidrolisados foram determinados nos laboratórios do DEQ/UFSCar, por HPLC.

Tabela 5.8 – Análises de acidez, crioscopia e densidade para diferentes amostras de leite de vaca integral UHT e para seus hidrolisados protéicos (GH 5%).

Amostra	Acidez (g ác.lático / 100 mL amostra)	Crioscopia (°Horvet)	Densidade (g/mL)	Lactose* (g/L)
Leite Integral UHT	0,14 ± 0,00	-0,547 ± 0,001	1,035 ± 0,001	44,3±0,7
Leite hidrolisado com:				
AgGly-NPD	0,19 ± 0,01	-0,580 ± 0,000	1,037 ± 0,001	45,2 ± 0,4
AgGly-ALC	0,21 ± 0,00	-0,572 ± 0,001	1,035 ± 0,001	44,5 ± 0,6
NPD solúvel	0,27 ± 0,00	-0,591 ± 0,001	1,037 ± 0,001	45,1 ± 0,5
ALC solúvel	0,27 ± 0,00	-0,593 ± 0,001	1,038 ± 0,001	44,2 ± 0,7

*Análise *in-house*.

Na comparação das propriedades acidez e crioscopia do leite integral (acidez 0,14; crioscopia -0,547), os resultados mostrados na Tabela 5.8 indicam que as alterações dessas propriedades nos hidrolisados GH 5%, obtidos com as proteases AgGly-NPD e AgGly-ALC, foram pequenas, em relação ao leite integral. No teste da acidez onde a amostra é titulada com uma base N/9, o leite integral normal já apresenta uma acidez titulável, chamada aparente, pela reação da base com citratos, fosfatos, proteínas e gás carbônico dissolvido. Assim, acidez até 0,18 g ácido/100 mL de amostra é considerada normal. Os resultados da Tabela 5.8 indicam que a acidez de 0,14 g/100 mL do leite integral aumentou para 0,19 e 0,21 para hidrolisados preparados com NPD e ALC imobilizadas, respectivamente. Esse aumento foi ainda maior para os hidrolisados preparados com NPD e ALC solúveis (acidez de 0,27 g/100mL amostra). O

aumento da acidez para os hidrolisados era esperado, já que o pH da reação de hidrólise não foi controlado e a hidrólise de proteínas diminui o pH devido à liberação de aminoácidos e peptídeos como produto da reação. Para as amostras das análises físico-químicas e sensoriais, tanto as hidrólises com enzimas solúveis quanto com imobilizadas o pH não foi controlado com adição de base, nesses casos o que foi controlado foi o tempo de reação necessário para alcançar o GH de 5%. Dessa forma, o aumento da acidez de 0,14 g/100 mL (leite integral) para 0,19 e 0,21 (hidrolisados preparados com NPD e ALC imobilizadas, respectivamente) corresponde ao GH de 5%. A diferença na acidez entre os hidrolisados de AgGly-NPD (0,19) e AgGly-ALC (0,21) indica que os GHs destas amostras podem estar diferentes e variando para pouco mais ou menos que 5%. Já a maior acidez para os hidrolisados preparados com enzima solúvel comprova o fato de que o grau de hidrólise real para esses hidrolisados foi bem maior do que 5%, conforme já havia sido verificado ocorrer para a enzima solúvel, cujo processo de inativação, a 90 °C, aumentava o grau de hidrólise de 5% obtido no pHstato a um grau real de cerca de 12%, resultando numa acidez titulada 0,27, para essas amostras. A grande dificuldade de controle da hidrólise com enzima solúvel mais uma vez comprova inviabilizar o processo com ela, tornando mandatário o uso de enzima imobilizada.

A diminuição do ponto de congelamento (crioscópico) do leite em relação ao da água está associada ao número de moléculas solúveis em água nesse material. Espera-se, assim, para o leite normal, uma redução ao redor do valor observado, -0,547 graus. Espera-se que a hidrólise das proteínas irá alterar esse valor, pois ocorrerá aumento do número de moléculas na solução, já que o grau de hidrólise reflete exatamente a quebra de uma molécula grande de proteínas em várias moléculas menores. Essa propriedade torna-se, assim, uma medida indireta da ação das proteases nas proteínas do leite, com o ponto de congelamento mostrando maior redução para as enzimas livres, onde se atingiu maior grau de hidrólise, com a correspondente maior porcentagem de moléculas menores. Os valores medidos para concentração de lactose, conforme esperado, não foram afetados pela hidrólise das proteínas. Da mesma forma, também não eram esperadas alterações significativas nos valores de densidade.

5.3.8 Análise Sensorial dos Hidrolisados de Leite com GH de 5% e Formulações com α -ciclodextrina

Foram realizadas análises sensoriais em amostras de leite integral UHT hidrolisado com ALC solúvel (GH 5%), AgGly-ALC (GH 5%) e AgGly-NPD (GH 5%), bem como em leite hidrolisado com AgGly-ALC (GH 5%) e formulado com a adição de α -ciclodextrina (α -CD)

(5% e 10%, m/v). Os leites hidrolisados com as enzimas imobilizadas foram pasteurizados após a filtração e separação do catalisador. Tais análises tiveram como objetivo identificar se houve e quais foram as alterações sensoriais após a hidrólise das proteínas do leite.

Foram avaliados os atributos de aparência, odor, sensação na boca e sabor. As amostras foram recebidas e mantidas sob refrigeração até a realização da análise. Para quantificar a intensidade de cada atributo, a equipe de avaliadores empregou uma escala de 0 a 10 em que o valor 0 corresponde a inexistente ou intensidade extremamente fraca, o valor 5, à intensidade moderada e o valor 10 à intensidade extremamente forte. Para a cor, a equipe definiu o valor 0 como cor branca e o valor 10 como creme claro. Quanto à consistência, tanto na avaliação da aparência (visual) como na sensação na boca, o valor 10 foi considerado pela equipe como consistência característica de iogurte líquido integral. Para o odor e sabor de leite tratado termicamente, o valor 10 foi considerado como o odor/sabor característicos de leite em pó integral. Os valores atribuídos pela equipe estão apresentados entre parênteses após a descrição de cada atributo.

No Quadro 5.1 estão descritas as características sensoriais analisadas nas amostras de leite integral e dos hidrolisados avaliadas em relação à aparência, odor, sensação na boca e sabor. Nas Figuras de 5.9, 5.10 e 5.11 são apresentados gráficos que permitem a comparação entre as amostras para cada atributo avaliado. A Figura 5.12 apresenta os perfis sensoriais de cada amostra, com base no conhecimento da equipe de avaliadores, que tomaram por referência as características de leite tratado termicamente, as quais foram classificadas em: atributos positivos: odor e sabor característicos e gosto doce; atributos positivos quando em pouca intensidade: gosto salgado, cor clara, formação de poucas ou nenhuma bolha e pouca consistência; atributos negativos: adstringência, amargor e sabor residual amargo. Nesta Figura, os atributos positivos são apresentados em verde e os negativos em vermelho.

Os leites hidrolisados com AgGly-ALC e AgGly-NPD apresentaram algumas características semelhantes como formação de bolhas em intensidade fraca (2); cor entre branco e creme claro em intensidade moderada (6 para NPD e 5 para ALC imobilizadas); odor característico com intensidade 6 para as duas, que foi próximo do atribuído ao leite integral (7); entre pouco e moderadamente doce para o hidrolisado preparado com AgGly-ALC (3-4) e moderadamente doce para o hidrolisado preparado com AgGly-NPD (4), também com intensidade próxima ao leite integral (4); pouco salgado para hidrolisado de AgGly-NPD (2) e para AgGly-ALC (2-3) que também estão próximos do atribuído ao leite integral (2). Porém, as amostras de hidrolisados preparados com ALC e NPD imobilizadas se diferenciaram quanto à aparência de consistência, em que o hidrolisado preparado com AgGly-NPD obteve uma

consistência moderada (5), já o hidrolisado preparado com AgGly-ALC mostrou-se muito pouco consistente (2), sendo este último um ponto positivo e semelhante ao caracterizado para o leite integral (1). Quanto aos atributos de sensação na boca, o hidrolisado preparado com AgGly-ALC teve suas características mais próximas ao do leite integral, que foi pouco adstringente (2-3) e pouco consistente (2), enquanto o hidrolisado preparado com AgGly-NPD foi avaliado como moderadamente adstringente (4) e com consistência entre pouco e moderada (3-4). Quanto ao sabor característico de leite tratado termicamente, o hidrolisado preparado com AgGly-ALC também foi avaliado com intensidade mais próxima ao do leite integral, com intensidade moderada (5-6), enquanto para o leite integral foi avaliado como forte (8) e para o hidrolisado preparado com AgGly-NPD como fraca a moderada (3), sendo este um atributo positivo. Quanto ao sabor amargo, o leite integral foi avaliado como sem amargor (0) e sem sabor residual amargo (0). Nesse atributo, os leites hidrolisados com NPD e ALC imobilizadas foram bem distintos, sendo avaliados quanto ao sabor em muito amargo (7) e moderadamente amargo (4), respectivamente, e quanto ao amargor residual em muito amargo (7) e amargo moderado (5), respectivamente. Dessa forma, o leite hidrolisado com AgGly-ALC apresentou mais aspectos positivos do que o leite hidrolisado com AgGly-NPD, o que pode ser percebido também pela Figura 5.12.

Ao comparar a avaliação das características sensoriais dos hidrolisados preparados com AgGly-ALC e ALC solúvel, observa-se que o hidrolisado preparado com a AgGly-ALC teve suas características mais próximas ao do leite integral em todos os itens avaliados, exceto para presença de bolhas. O hidrolisado preparado com ALC solúvel, assim como o leite integral, não apresentou bolhas em sua aparência, diferentemente ao do hidrolisado preparado com AgGly-ALC, que foi avaliado com presença de algumas bolhas (2). A presença de bolhas para todos os hidrolisados preparados com enzima imobilizada pode ter ocorrido no processo de separação do catalisador por filtração a vácuo, onde foi observado a formação de bolhas e espuma, dependendo da pressão na bomba.

Quadro 5.1 - Características sensoriais das amostras de leite (integral UHT e hidrolisados com GH de 5%) avaliadas em relação à aparência, odor, sensação na boca e sabor.

Amostras	Aparência	Odor	Sensação na Boca	Sabor
Leite Integral UHT	Líquido de cor entre branca e creme claro (4), muito pouco consistente (1) e sem bolhas (0).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade forte (7).	Muito pouco adstringente (1) e muito pouco consistente (1).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade forte (8), moderadamente doce (4), pouco salgado (2), sem amargor (0) e sem sabor residual amargo (0).
Leite hidrolisado com AgGly-NPD	Líquido de cor entre branca e creme claro (6), com consistência moderada (5) e presença de algumas bolhas (2).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade entre moderada e forte (6).	Moderadamente adstringente (4) e consistência entre pouco e moderada (3-4).	Característico de leite tratado termicamente com intensidade entre fraca e moderada (3), moderadamente doce (4), pouco salgado (2), muito amargo (7) e com sabor residual muito amargo (7).
Leite hidrolisado com AgGly-ALC	Líquido de cor entre branca e creme claro (5), muito pouco consistente (2) e presença de algumas bolhas (2).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade entre moderada e forte (6).	Pouco adstringente (2-3) e pouco consistente (2).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade moderada (5-6), entre pouco e moderadamente doce (3-4), pouco salgado (2-3), moderadamente amargo (4) e com sabor residual amargo moderado (5).
Leite hidrolisado com AgGly-ALC e adição de α-CD (5%)	Líquido de cor entre branca e creme claro (5), com aparência entre moderada e muito consistente (6-7) e presença de bolhas em quantidade entre moderada e muito grande (6-7).	Característico de leite tratado termicamente, em intensidade entre fraca e moderada (3-4).	Adstringência moderada (4-5) e consistência moderada (5).	Característico de leite tratado termicamente em intensidade entre fraca e moderada (3-4), moderadamente doce (5), pouco salgado (1-2), moderadamente amargo (5-6) e com sabor residual amargo moderado (5).
Leite hidrolisado com AgGly-ALC e adição de α-CD (10%)	Líquido de cor próxima do branco (2), muito consistente (7-8) e com muitas bolhas (8-9).	Característico de leite tratado termicamente em intensidade fraca (2).	Pouco adstringente (3) e muito consistente (7).	Característico de leite tratado termicamente, que lembra leite em pó integral, em intensidade entre moderada e forte (6-7), moderadamente doce (4-5), pouco salgado (2-3), moderadamente amargo (4) e com moderado sabor residual amargo (5).
Leite hidrolisado com ALC Solúvel	Líquido de cor próxima de creme claro (8), pouco consistente (3) e sem bolhas (0).	Característico de leite tratado termicamente, em intensidade entre fraca e moderada (3-4).	Moderadamente adstringente (4-5) e pouco consistente (2 3).	Não característico de leite tratado termicamente (0), extremamente amargo (10) e com sabor residual amargo muito forte (8-9), não foi percebido o gosto doce (0) e nem o gosto salgado (0).

Pode-se destacar alguns aspectos negativos no hidrolisado preparado com ALC solúvel, como a cor próxima de creme claro (8), sem sabor característico de leite tratado termicamente (0), não foi percebido gosto salgado (0) ou gosto doce (0), extremamente amargo (10) e com sabor residual amargo muito forte (8-9). Sabe-se que durante a hidrólise de proteínas ocorre a liberação de aminoácidos e peptídeos de sabor amargo (LINDE et al., 2009). Nas proteínas globulares intactas, a maioria dos aminoácidos hidrofóbicos são orientados para o interior da molécula, entretanto, durante a proteólise, peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos são liberados e interagem com as papilas gustativas resultando em um sabor amargo. Conforme a proteólise continua, mais resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ficam expostos e, portanto, o amargor do hidrolisado geralmente aumenta com o aumento da hidrólise (SPELLMAN; O'CUINN; FITZGERALD, 2009). Na hidrólise do leite com ALC solúvel, embora o GH tenha sido controlado para 5%, após a inativação térmica da enzima o GH elevou-se para $11,59 \pm 1,19\%$ (ver Seção 5.3.4), o que pode justificar o amargor mais intenso para este hidrolisado (10) em relação ao hidrolisado preparado com AgGly-ALC (4) com GH de 5%. O sabor extremamente amargo e o sabor residual amargo muito forte do hidrolisado preparado com ALC solúvel pode ter sido responsável pela diminuição da percepção do sabor característico de leite termicamente tratado.

A fim de reduzir o sabor amargo dos hidrolisados, α -CD foi adicionada aos hidrolisados preparados com AgGly-ALC nas concentrações de 5% e 10% (m/v), sendo essas formulações também analisadas sensorialmente.

As amostras dos hidrolisados preparados com AgGly-ALC com adição de α -CD tiveram em sua aparência a presença de bolhas em quantidade entre moderada e muito grande para hidrolisado com adição de 5% de α -CD (6-7) e com muitas bolhas para hidrolisado com adição de 10% de α -CD (8-9), intensidades bem maiores do que os demais hidrolisados e leite integral, mostrando um ponto negativo. Os hidrolisados formulados com α -CD apresentaram aparência entre moderada e muito consistente (6-7) com 5% de α -CD e muito consistente (7-8) com 10% de α -CD, que foram intensidades altas em relação aos outros hidrolisados e leite integral. Essa alta consistência pode ter ocorrido devido a altas concentrações de α -CD usadas, já que para um litro de leite foram adicionados 100 g de α -CD (10 %, m/v). Em relação à cor, o hidrolisado com 5% de α -CD apresentou cor entre branca e creme claro (5), enquanto o hidrolisado com 10% de α -CD apresentou cor próxima do branco (2), mostrando que houve diminuição da intensidade da cor em relação aos outros hidrolisados sem α -CD e ao leite integral. A amostra de hidrolisado com adição de 10% de α -CD apresentou sabor característico

mais próximo ao do leite integral (6-7 e 8, respectivamente). Os hidrolisados com a adição de 5 ou 10% de α -CD não apresentaram grandes alterações no sabor doce e salgado em relação às demais amostras analisadas. Não houve diminuição de intensidade no sabor amargo e sabor residual amargo em relação ao hidrolisado preparado com AgGly-ALC e sem a adição de α -CD. Provavelmente, o tamanho dos peptídeos hidrofóbicos gerados na hidrólise do leite não seja adequado para se acomodarem na cavidade da molécula de α -CD (4,7-5,3 Å) (TARDIOLI, 1998). Segundo Astray et al., (2009), a compatibilidade geométrica entre a cavidade do “hospedeiro” (ciclodextrina) e o “hóspede” (composto de interesse), a estrutura, carga e polaridade do “hóspede”, o efeito do meio de reação (solvente) e a temperatura são importantes para a formação do complexo de inclusão. A β -CD poderia ser uma melhor alternativa para a redução do sabor amargo dos hidrolisados de leite, pois o diâmetro de sua cavidade (6,5-6,5 Å, (TARDIOLI, 1998)) é maior que o da α -CD, sendo a ciclodextrina mais versátil para o aprisionamento molecular dentre as diferentes CDs (ASTRAY et al., 2009).

Figura 5.9 - Intensidades das características sensoriais de cor, presença de bolhas e consistência visual das amostras de leite integral e hidrolisados (GH de 5%): Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase[®] (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC immobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α -CD 10% (LH AgGly-ALC α -CD 10%); LH com ALC immobilizada em AgGly com adição de α -CD 5% (LH AgGly-ALC α -CD 5%); LH com ALC immobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro[®] D immobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral UHT.

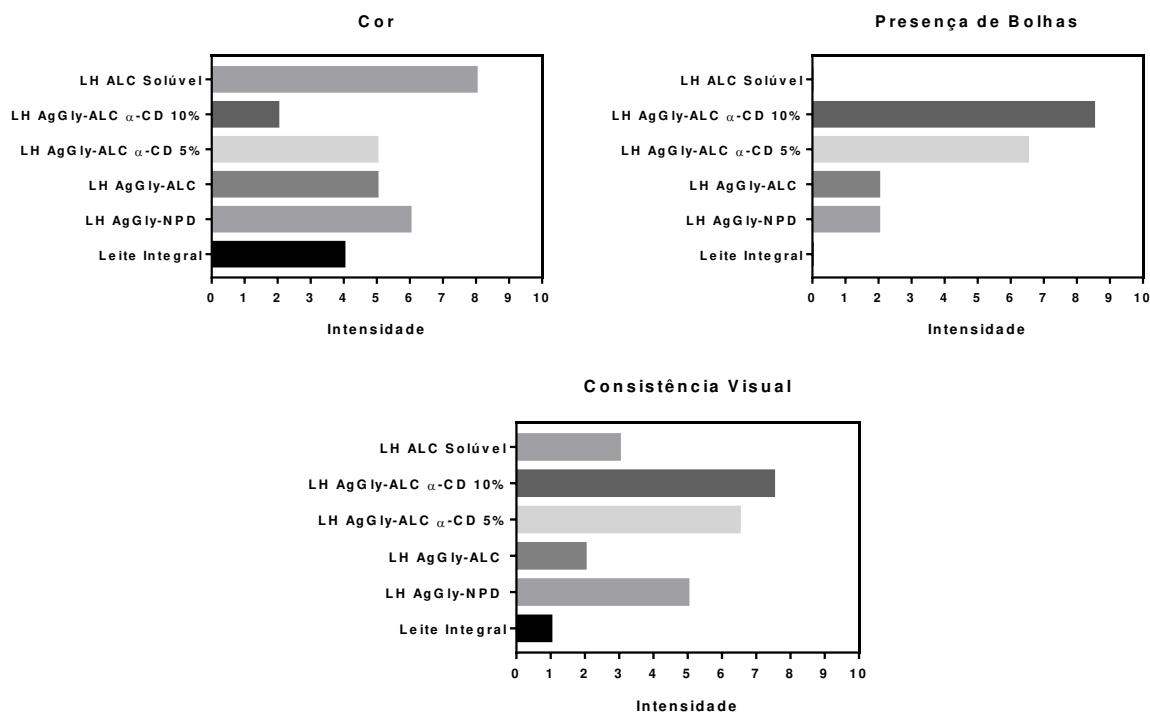


Figura 5.10 - Intensidades das características sensoriais relacionadas à odor e sabor característico, sensação de adstringência e consistência na boca das amostras: Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase® (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC immobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α -CD 10% (LH AgGly-ALC α -CD 10%); LH com ALC immobilizada em AgGly com adição de α -CD 5% (LH AgGly-ALC α -CD 5%); LH com ALC immobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro® D immobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral.

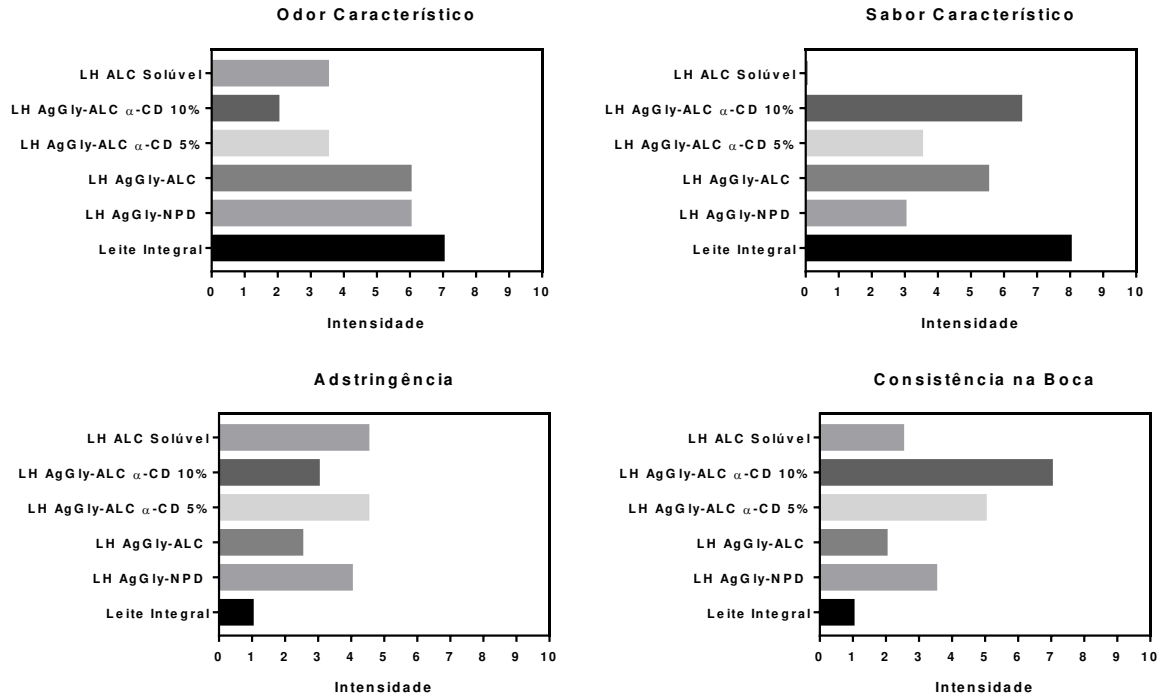


Figura 5.11 - Intensidades das características sensoriais relacionadas aos gostos básicos: doce, salgado, amargo e residual amargo das amostras de leite integral e hidrolisados (GH de 5%): Leite Hidrolisado (LH) com Alcalase® (ALC) solúvel (LH ALC Solúvel); LH com ALC immobilizada em agarose-glioxil (AgGly) com adição de α -CD 10% (LH AgGly-ALC α -CD 10%); LH com ALC immobilizada em AgGly com adição de α -CD 5% (LH AgGly-ALC α -CD 5%); LH com ALC immobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC); LH com Novo-Pro® D immobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD); Leite Integral.

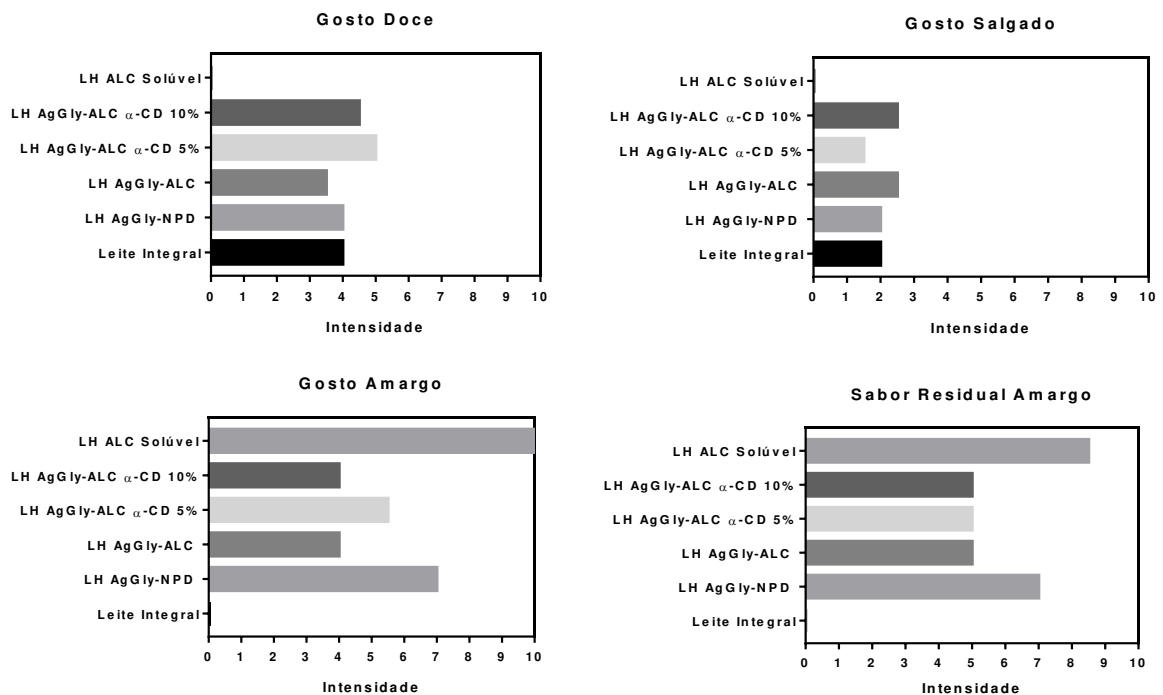
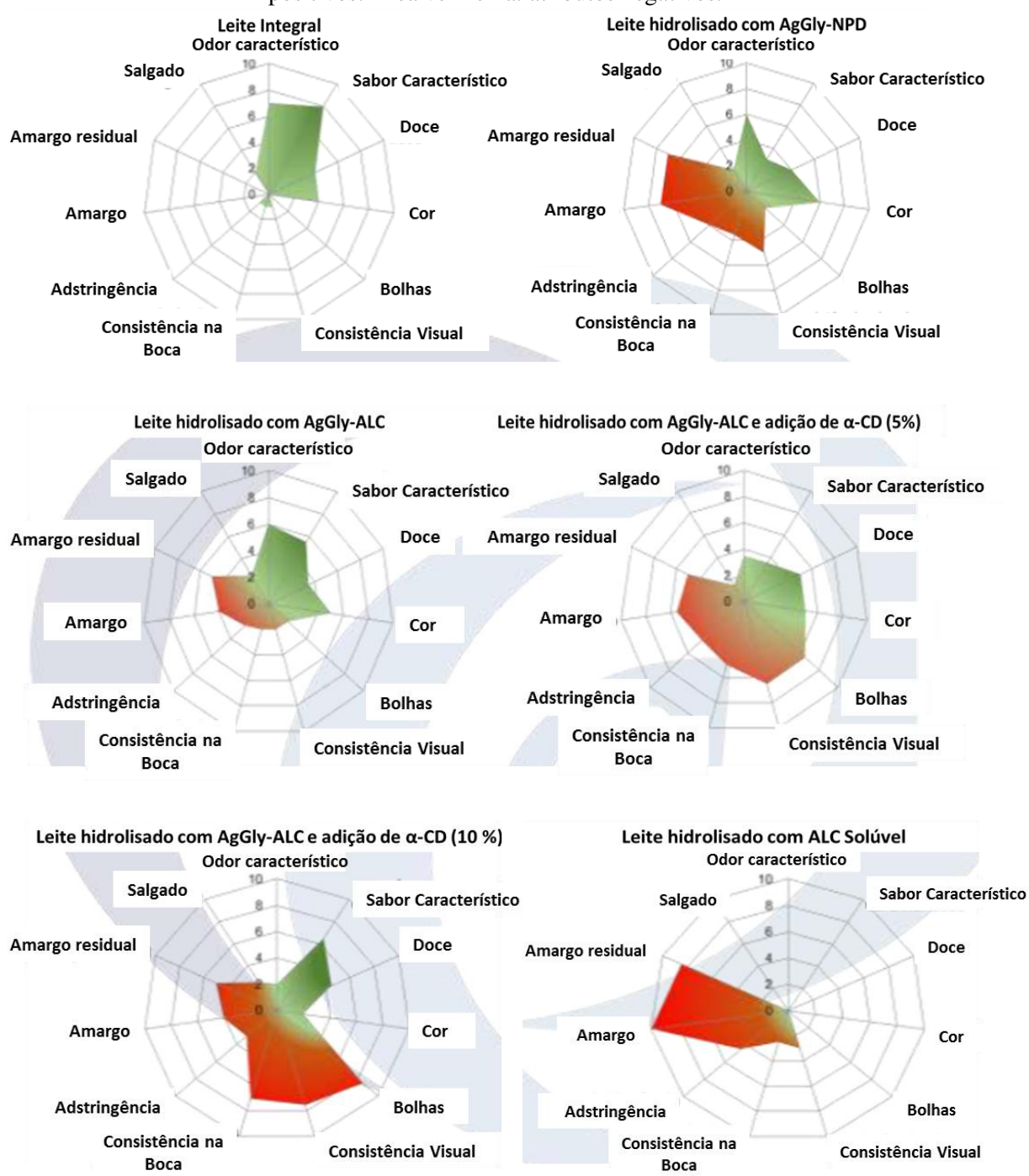


Figura 5.12 - Características sensoriais das amostras de leite avaliadas em relação à aparência, odor, sensação na boca e sabor (leite integral UHT e hidrolisados com GH de 5%). Área verde: atributos positivos. Área vermelha: atributos negativos.



5.4 Conclusões

As proteases NPD e ALC (dialisadas e não dialisadas) foram imobilizadas em AgGly e alcançaram parâmetros de imobilização semelhantes, sendo os valores de RI superiores a 90% e AR em torno de 80% (medida com BTEE), nas mesmas condições de imobilização (24 h e 20

°C). Os substratos usados na medida de atividade influenciaram na AR dos derivados AgGly-NPD e AgGly-ALC, uma vez que a atividade enzimática medida com caseína levou a uma queda na AR sugerindo prováveis problemas de impedimento estérico no acesso ao sítio ativo da enzima por substratos macromoleculares como a caseína. As estabilidades em pH 6,5 e 50 °C da AgGly-NPD e AgGly-ALC, bem como seus derivados de enzimas dialisadas, não apresentaram grandes diferenças entre os fatores de estabilização. No desempenho na hidrólise do leite de vaca, os hidrolisados com enzima imobilizada (AgGly-NPD e AgGly-ALC) apresentaram concentração de peptídeos (aproximadamente 70%) com tamanhos menores que 12,4 kDa, enquanto os hidrolisados de enzima solúvel (NPD e ALC) apresentaram concentração de peptídeos (superior a 90%) com tamanhos menores que 12,4 kDa, sugerindo que as principais proteínas alergênicas podem ter sido hidrolisadas em peptídeos de menor massa molecular. Além disso, concluiu-se que o GH real dos hidrolisados de enzimas solúveis (ALC e NPD) eram maiores do que o GH teórico calculado, uma vez que houve dificuldade de controlar o GH na reação com enzimas solúveis devido ao procedimento de inativação por aquecimento. Em relação à análise sensorial dos hidrolisados obtidos, o hidrolisado preparado com AgGly-ALC apresentou mais aspectos positivos e teve características sensoriais mais próximas do leite integral comparado aos leites hidrolisados com AgGly-NPD e ALC solúvel. A adição de 5 ou 10% de α -CD no hidrolisado AgGly-ALC não diminuiu a intensidade no sabor amargo e sabor residual amargo, provavelmente porque os peptídeos gerados na hidrólise do leite não se adequaram à cavidade da molécula de α -CD.

Os resultados obtidos com as propriedades analisadas neste item permitiram concluir que o processo é inviável com enzima livre, pela necessidade de inativação térmica da enzima, o que dificulta o controle do grau de hidrólise. Torna-se, assim, mandatário o uso de enzima imobilizada.

Os hidrolisados GH 5%, obtidos com NPD e ALC imobilizadas mostraram pequenas alterações nas propriedades físico-químicas e sensoriais, sendo a mais significativa o esperado sabor amargo (TARDIOLI et al., 2003a, 2003b), que foi maior para NPD do que para ALC. O derivado AgGly-NPD, por outro lado, apresentou vantagens em relação a AgGly-ALC, em outras propriedades. Ficou claro, portanto, que as duas enzimas geraram diferentes peptídeos. Entretanto, a decisão de qual protease imobilizada usar também irá depender dos testes *in vivo*, caso esse estudo permita diferenciar as respostas obtidas com os dois hidrolisados.

6. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ALERGENICIDADE DO LEITE DE VACA HIDROLISADO PELAS PROTEASES NOVO-PRO® D E ALCALASE® LIVRES E IMOBILIZADAS EM AGAROSE-GLIOXIL

6.1 Introdução

A alergia ao leite de vaca é a alergia alimentar mais comum entre as crianças na 1ª infância, com uma prevalência de aproximadamente 0,5% - 3%, variando entre populações distintas nos países ao redor do mundo. A resposta imune na alergia alimentar pode ser classificada como tipo I ou reação de hipersensibilidade imediata, que é mediada por anticorpos, do tipo Imunoglobulina E (IgE). A resposta alérgica às proteínas do leite de vaca do tipo I é caracterizada por uma resposta *T helper*₂ (Th₂) resultando na produção de anticorpos do tipo IgE específico ao alérgeno oriundo do leite (fase de sensibilização). A ligação do IgE ao receptor de alta afinidade FcRI nos mastócitos e/ou basófilos, seguida de ligação cruzada dos anticorpos IgE pelos alérgenos alimentares provoca a degranulação dessas células e a liberação de mediadores importantes na resposta alérgica, como a histamina (fase de efeito/*challenge*). Após desencadeadas essas respostas de hipersensibilidade, podem ocorrer sintomas clínicos na pele, no trato gastrointestinal ou nas vias respiratórias. A alergia ao leite de vaca é considerada o primeiro e mais comum tipo de alergia durante a primeira infância (EL MECHERFI et al., 2015; VAN ESCH et al., 2011). A porção da proteína reconhecida pelo anticorpo IgE é chamada epítopo. O epítopo pode ser linear (sequencial) ou conformacional (não sequencial), dependendo da estrutura primária ou terciária (conformação tridimensional) da proteína (GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019). Essa é a menor parte que uma vez reconhecida é capaz de induzir uma resposta imune específica e desencadear respostas mais exacerbadas, como o que ocorre na alergia ao leite.

Embora, a amamentação seja considerada o padrão ideal para a nutrição infantil nem todas as mães conseguem amamentar, e assim as fórmulas hipoalergênicas são uma boa alternativa para bebês de alto risco ou para bebês diagnosticados com alergia ao leite de vaca (VAN ESCH et al., 2011). A hidrólise enzimática é a estratégia mais promissora para diminuir a antigenicidade e alergenidade das proteínas do leite de vaca. Este procedimento enzimático destrói epítopos lineares e conformacionais, evitando a indução de respostas mediadas por IgE (BU et al., 2013). As fórmulas hidrolisadas são geralmente classificadas como parcialmente e extensivamente hidrolisadas com base no grau de hidrólise e podem ser caracterizadas pela avaliação da distribuição da massa molecular das proteínas residuais. Fórmulas extensamente

hidrolisadas são caracterizadas pela mistura de peptídeos grandes e pequenos (<1500 Da) e aminoácidos livres (~100 Da) e destinam-se a evitar reações alérgicas em recém-nascidos alérgicos já diagnosticados. As fórmulas parcialmente hidrolisadas, contendo principalmente peptídeos grandes (> 8000 Da) são usadas em bebês com risco de desenvolver alergia alimentar (KIEWIET et al., 2015; MONACI et al., 2006; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015). No entanto, a alergenicidade residual não pode ser determinada apenas com base na distribuição do tamanho do peptídeo (MONACI et al., 2006). Muitas vezes o tipo de proteína e a forma como ela é reconhecida pelos indivíduos pré-dispostos a desenvolver alergias aumenta a chance de serem ou não alérgico no futuro.

Vários modelos *in vivo* têm sido utilizados para estudar a alergenicidade residual das fórmulas hipoalergênicas, tais modelos animais incluem ratos, camundongos e porcos-da-índia. No estudo da alergia ao leite de vaca, os camundongos BALB/c são os mais frequentemente utilizados entre os modelos de experimentos *in vivo* para avaliar a alergenicidade e a possibilidade de desenvolvimento de leites que não induzam à alergia. Este modelo é utilizado principalmente porque a sensibilização intra-gástrica gera anticorpos IgE específicos às proteínas do leite que são de especificidade semelhante aos produzidos pelo homem (MENG et al., 2016). Outra vantagem é que foi introduzido nos últimos anos um modelo de camundongo predominantemente mediado por IgE para alergia às proteínas do leite de vaca induzida oralmente para certos alérgenos do leite, indicando que este modelo pode ser amplamente utilizado para avaliar a alergenicidade de produtos à base de leite de vaca (ADEL-PATIENT et al., 2012; BENHATCHI et al., 2019; CHIKHI et al., 2019; GOMES-SANTOS et al., 2015; MENG et al., 2016).

O objetivo deste capítulo foi avaliar o potencial alergênico dos hidrolisados de leite de vaca obtidos pela atuação das proteases Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC) nas formas livre e imobilizadas em agarose-glioxil. Além disso, estudar a influência dos perfis peptídicos na alergenicidade dos hidrolisados frente ao modelo experimental estudado.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Materiais

As proteases Novo-Pro[®] D (NPD) e Alcalase[®] (ALC) foram gentilmente fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil). Leite integral líquido UHT Ninho (Nestlé, Araraquara, Brasil). Sepharose[™] CL-6B (agarose 6%) e glicina foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Glicidol, α -lactalbumina de leite bovino (α -LA), β -lactoglobulina

de leite bovino (β -LG), ovoalbumina e caseína de leite bovino foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O periodato de sódio foi obtido na Qhemis (Jundiaí-SP, Brasil) e o borohidreto de sódio na Neon (São Paulo-SP, Brasil). Todos os outros reagentes foram de grau analítico e foram usados como recebidos.

6.2.2 Procedimento de Imobilização da NPD e ALC

O procedimento de imobilização das enzimas NPD e ALC em suporte AgGly foi realizado conforme a Seção 5.2.3.

6.2.3 Hidrólise do Leite

A hidrólise do leite foi realizada a 50 °C e pH inicial de 6,5 usando diferentes catalisadores: NPD solúvel e NPD imobilizada em AgGly (AgGly-NPD) para o Experimento 1; AgGly-NPD, ALC imobilizada em AgGly (AgGly-ALC) e ALC solúvel para o Experimento 2. As diferentes reações de hidrólise eram interrompidas quando se atingisse o tempo necessário para que o grau de hidrólise fosse igual a 5%, tanto para hidrólise com enzima solúvel quanto para enzima imobilizada (o tempo foi pré-determinado usando as mesmas condições de volume de reação, concentração de enzima e concentração de substrato). A reação com enzima solúvel foi interrompida por aquecimento a 90 °C por 10 minutos. A reação com enzima imobilizada foi interrompida com a separação da enzima imobilizada do leite por filtração à vácuo. O grau de hidrólise (GH) foi calculado pelo volume de solução hidróxido de potássio consumido para manter o pH 6,5 constante usando a Equação (4) conforme Seção 3.2.6, considerando o h_{tot} (número total de ligações peptídicas que podem ser clivadas no substrato de proteína) para o leite 8,1 mEq/g (ADLER-NISSEN, 1986).

6.2.4 Fracionamento de Hidrolisados de Proteínas por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SE-HPLC)

O procedimento de análise de peptídeos por SE-HPLC foi realizado conforme a Seção 5.2.7.

6.2.5 Animais e Delineamento Experimental

O delineamento experimental deste trabalho se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em

Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, CEUA nº 7214200917 (Apêndice B).

Para os ensaios *in vivo* foram realizados dois experimentos independentes utilizando camundongos Balb/C fêmeas, pesando entre 15 e 18 g, com 4-6 semanas de vida. Os animais foram alocados no biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, em caixas divididas em isoladores individuais em rack ventilada, com controle de ar e temperatura (@ALESCO), com livre acesso à água e ração.

(A) Para o **delineamento experimental 1** os animais foram divididos em grupos com 7-8 animais cada conforme Tabela 6.1. O (G1): Grupo controle, animais não sensibilizados e sem tomar leite (n=7); (G2): Sensibilizado, animais que tomaram leite integral não hidrolisado (LNH) (n=8); (G3): Sensibilizado e tomaram leite integral hidrolisado com enzima protease Novo-Pro[®] D (NPD) solúvel (LH com NPD solúvel) (n=7); (G4): Sensibilizado e tomaram leite integral hidrolisado com NPD imobilizada em agarose-glioxil (LH com AgGly-NPD) (n=8); (G5): Controle sensibilizado (+) sem tomar leite (n=7).

Tabela 6.1 – Delineamento experimental 1 para experimento *in vivo*.

Grupo	Número de Animais	Sensibilização	Ingestão de Leite
G1- Controle	7	Não (PBS 1X (100µl/i.p.) ¹)	Não
G2- LNH	8	Sim	Leite ² não hidrolisado
G3- LH com NPD Solúvel	7	Sim	Leite ² hidrolisado com NPD Solúvel
G4- LH com AgGly-NPD	8	Sim	Leite ² hidrolisado com AgGly-NPD
G5- Controle (+)	7	Sim	Não

¹ i.p.: intraperitoneal.

² Leite Integral UHT (Ninho/Nestlé).

(B) Para o **delineamento experimental 2** os animais foram divididos em grupos com 7-8 animais cada conforme Tabela 6.2. O (G1) Grupo controle, animais não sensibilizados e sem tomar leite (n=5); (G2) Controle sensibilizado (+) e não tomaram leite (n=6); (G3) Sensibilizado e tomaram LH com AgGly-NPD (n=6); (G4) Sensibilizado e tomaram leite integral hidrolisado com a enzima Alcalase[®] (ALC) imobilizada em suporte agarose-glioxil (LH com AgGly-ALC) (n=9); (G5) Sensibilizado e tomaram leite integral hidrolisado com a enzima ALC solúvel (LH com ALC solúvel) (n=9); (G6) Sensibilizado e tomaram leite integral não hidrolisado (LNH) (n=6).

Tabela 6.2 – Delineamento Experimental 2 para experimento *in vivo*.

Grupo	Número de Animais	Sensibilização	Ingestão de Leite
G1- Controle	5	Não (PBS 1X (100µl/i.p.) ¹)	Não
G2- Controle (+)	6	Sim	Não
G3- LH com AgGly-NPD	6	Sim	Leite ² hidrolisado com AgGly-NPD
G4- LH com AgGly-ALC	9	Sim	Leite ² hidrolisado com AgGly-ALC
G5- LH com ALC Solúvel	9	Sim	Leite ² hidrolisado com ALC Solúvel
G6- LNH	6	Sim	Leite ² não hidrolisado

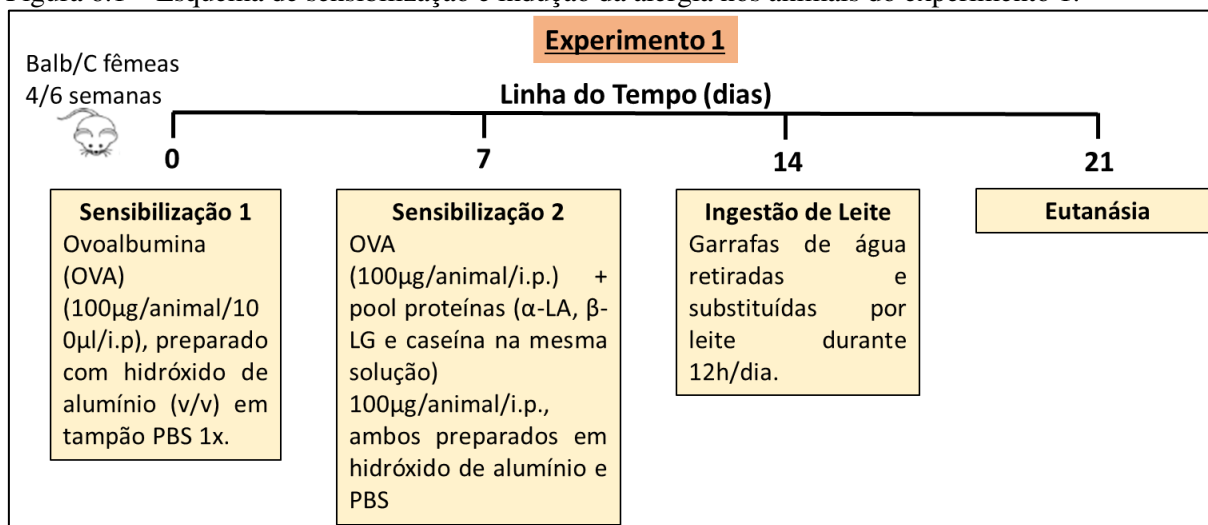
¹ i.p.: intraperitoneal.

² Leite Integral UHT (Ninho/Nestlé).

6.2.6 Sensibilização e Indução da Alergia

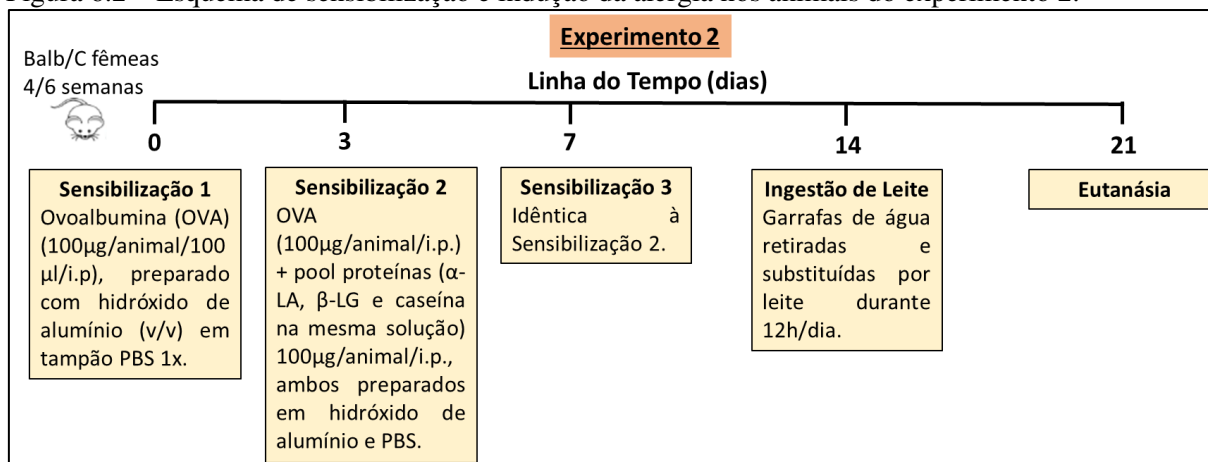
Para definir o modelo alérgico e avaliar se o leite hidrolisado diminuía as respostas alérgicas nos animais foi utilizado o modelo adaptado com ovalbumina (OVA) por via intraperitoneal (i.p.) (EL-HOUSSEINY; IBRAHIM; SELLINGER, 2017). Para o experimento 1 (Figura 6.1), a sensibilização dos animais dos grupos G2, G3, G4 e G5 foi realizada com uma primeira dose de OVA (100µg/animal/100µl/i.p.), preparado com hidróxido de alumínio (v/v) em tampão PBS 1X. O grupo G1 recebeu tampão PBS 1X (100µl/i.p.). Após sete dias foi realizada a segunda dose de OVA (100µg/animal/i.p.) e foram acrescentadas as proteínas do leite (*pool*- α -lactalbumina, β -lactoglobulina e caseína juntas na mesma solução) 100µg/animal, ambos preparados em hidróxido de alumínio e PBS, para os respectivos grupos G2, G3, G4 e G5. O grupo G1 recebeu tampão PBS 1X. Após intervalo de 7 dias da segunda dose os animais tiveram suas garrafas de água retiradas e os mesmos receberam durante 12h/dia o leite específico para cada grupo experimental. Após sete dias do consumo do leite, 12h/dia, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para obtenção do sangue para contagem de células, e obtenção do soro para dosar anticorpos e citocinas, e retirada dos órgãos (fígado e baço) para avaliar histopatológica.

Figura 6.1 – Esquema de sensibilização e indução da alergia nos animais do experimento 1.



Para o Experimento 2 (Figura 6.2), a sensibilização dos animais foi realizada com uma primeira dose de OVA (100µg/animal/100µl/i.p.) preparada com hidróxido de alumínio (v/v) em tampão PBS 1X por via i.p. para os animais dos grupos G2, G3, G4, G5 e G6. O grupo G1 recebeu tampão PBS 1X (100ul/i.p.). No terceiro e no sétimo dia após a 1ª dose de OVA ocorreu a segunda e terceira dose para a sensibilização com a OVA (100µg/animal/i.p.) e foram acrescentadas as proteínas do leite (*pool*- α-lactalbumina, β-lactoglobulina e caseína juntas na mesma solução) 100µg/animal/i.p., ambos preparados em hidróxido de alumínio e PBS, para os respectivos grupos G2, G3, G4, G5 e G6. O grupo G1 recebeu tampão PBS 1X via i.p.. Após intervalo de 7 dias da segunda dose os animais tiveram suas garrafas de água retiradas, e substituídas por leite. Os animais receberam durante 12h por dia o respectivo leite para cada grupo experimental. Após sete dias do consumo do leite, os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente.

Figura 6.2 – Esquema de sensibilização e indução da alergia nos animais do experimento 2.



6.2.7 Coleta do sangue, do lavado broncoalveolar (LBA) e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)

A coleta de sangue foi feita por meio de punção braquial, e foram coletados entre 800 µl e 1,2 mL de sangue/animal com pipeta contendo anticoagulante. Após a coleta, foi realizado esfregaço sanguíneo e realizou-se a contagem global e diferencial das células do sangue. As técnicas de lavagem broncoalveolar (LBA) e da cavidade peritoneal (LCP) foram utilizadas para recuperação de células da cavidade pulmonar e peritoneal, respectivamente. Para obtenção do LBA utilizou-se 1,0 ml de solução salina tamponada (PBS), contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando cânulas de polietileno introduzidas na parte superior da traqueia, o procedimento foi repetido duas vezes, totalizando um volume final de 2 ml e para o lavado da cavidade peritoneal (LCP) foi utilizado 2 ml de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando uma agulha intraperitonealmente. A contagem diferencial foi feita nos esfregaços sanguíneos e naqueles preparados em citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem) (LCP) e corados pelo corante Panótico-Laborclin. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000 x. O número total de células/mm³ nos diferentes compartimentos foi determinado empregando solução de Turk (Ácido Acético 3%, 0,05% violeta genciana) para a lise das hemácias na diluição 1:20 e posterior contagem em câmara de Neubauer.

6.2.8 Análise histopatológica

Após a eutanásia, foi feita coleta dos órgãos fígado e intestino, de três animais por grupo, como representativo, conservados em formol tamponado (NaH₂PO₄ 4 g, Na₂HPO₄ 6,5 g para 1 L de formol 10%) para a realização da análise histológica desses órgãos. E foi realizada a observação clínica dos camundongos durante o período experimental. Para análise histológica esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm, sendo as lâminas coradas com Hematoxilina/Eosina (H.E.) (Hematoxilina 5 g, Álcool Absoluto 5%, Alúmem de potássio e Amônio 100 g, Óxido Vermelho Mercúrio 2.5 g/ Eosina 1%, Floxina 1%, Álcool Absoluto 95%, Ác. Acético Glacial 0.5%), para a avaliação celular por microscopia óptica. As lâminas foram gentilmente confeccionadas no laboratório de Anatomia Patológica, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Soares Garcia do Departamento de Patologia da FMRP-USP (Experimento 1) e pela Dra Mayara Caroline Rosolem (Laboratório PatoCet, São Carlos, SP) (Experimento 2). As lâminas foram fotografadas, com o auxílio de microscópio

(NIKON) contendo máquina fotográfica adaptada (NIKON-COOLPIZ S3100) em aumento de 100x e 400x, e elas tiveram laudos emitidos pelos Patologistas.

6.2.9 Quantificação das citocinas e determinação dos anticorpos

Após a retirada do sangue foi realizada a centrifugação e armazenamento do plasma a -80 °C. Posteriormente, foram quantificadas as citocinas séricas IL-4 e IL-5 e anticorpos específicos IgE. Os ensaios ELISA foram conduzidos de acordo com as instruções de fabricante (BD Biosciences) utilizando anticorpos de captura purificados anti-IL-4 e IL-5 e soluções de caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina como antígenos (Ag) para sensibilizar a placa e detectar a presença de anticorpos IgE. Para os testes de citocinas foi utilizada curva padrão de IL-4 (7,8–500 pg/ml) e IL-5 (15,6–1000 pg/ml) e para o anticorpo foi observada a diferença de absorvância em relação aos animais controle. As placas de ELISA foram lidas em espectrofotômetro (Microquant-Sellex, Inc 450 nm) específico para leitura de placas de 96 poços.

6.2.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média \pm EPM e analisados no programa GraphPad Prism, versão 5.01 – 2005 (San Diego, Califórnia, USA). Foi aplicado, para todos os dados obtidos, o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste One-way ANOVA (One-way Analysis of Variance) e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey (Tukey's Multiple Comparison Test). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste foi realizado pelo método de Dunn (Dunn's Multiple Comparison Test). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Perfil peptídico dos hidrolisados de leite para análise *in vivo*

A Tabela 6.3 mostra a distribuição em massa molecular das amostras de leite integral não hidrolisado (LNH), leite hidrolisado com enzima NPD imobilizada em suporte agarose-glixil (LH com AgGly-NPD) e leite hidrolisado com NPD solúvel (LH com NPD solúvel) que foram oferecidos aos animais do Experimento 1. Foram feitas sete reações de hidrólise para cada condição (uma por dia de experimento) mantendo sempre os valores de concentração da enzima e tempo, a Tabela 6.3 mostra a média \pm desvio padrão das sete hidrólises.

A hidrólise do leite utilizando a NPD solúvel como catalisador gerou peptídeos em sua maioria (99%) menores que 12,4 kDa, sendo que aproximadamente 90% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 6.3). As principais proteínas alergênicas no leite de vaca são: α 1- (23,6 kDa), α 2- (25,2 kDa), β - (24 kDa) e κ -caseína (19 kDa) da caseína e α -LA (14,4 kDa) e β -LG (18,3 kDa) no soro de leite (PRASAD; SHIVAY, 2020). Dessa forma, o perfil peptídico obtido pela hidrólise do leite com NPD solúvel indica que as principais proteínas alergênicas mencionadas foram hidrolisadas em peptídeos de menor massa molecular, o que sugere modificação na apresentação dessas proteínas vias células imunológicas numa ativação de resposta imune específica, e uma possível modulação na ativação dessa resposta durante o processo que desencadeia a alergia ao leite.

O LH com AgGly-NPD (Experimento 1) apresentou 78,52 % de peptídeos menores que 12,4 kDa, sendo que 60,42% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 6.3). Nota-se que LH com AgGly-NPD ainda continha peptídeos em todas as faixas de massa molecular dos padrões analisados, mas em menor porcentagem quando comparado à mesma faixa de massa molecular no leite não hidrolisado. O que sugere que possa ainda existir neste leite alguma proteína com atividade alergênica entre as mencionadas, principalmente as que não sofreram hidrólise pela enzima, o que também sugere modificação na apresentação dessas proteínas durante o reconhecimento por células imunológicas conhecidas como células apresentadoras de alérgenos e antígenos (APC), as quais são as responsáveis pela ativação de resposta imune específica. Sendo assim, pode haver uma possível modulação da ativação dessa resposta durante o processo que desencadeia a alergia ao leite.

Tabela 6.3 - Perfil peptídico das amostras de leite não hidrolisado (LNH), leite hidrolisado (LH) com NPD solúvel e leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH com AgGly-NPD) usados no experimento *in vivo* 1. As amostras foram analisadas em SE-HPLC.

Amostra	Composição (% mássica) por faixa de massa molecular (kDa)				
	> 66	66 - 29	29 - 12,4	12,4 - 6,5	< 6,5
LNH	38,9	15,6	10,12	1,8	33,57
LH com AgGly-NPD	10,45 ± 3,18	7,42 ± 1,46	4,82 ± 0,91	18,10 ± 3,35	60,42 ± 2,02
LH com NPD Solúvel	0,10 ± 0,06	-	-	9,71 ± 0,60	90,20 ± 0,56

A permanência de peptídeos de maior massa molecular no LH com AgGly-NPD pode ter ocorrido devido a possíveis limitações difusionais de proteínas de alta massa molecular, como a caseína, no interior dos poros do suporte dificultando o acesso da enzima a substratos de massa molecular maiores. É importante ressaltar que a caseína encontra-se no leite na forma de micelas que medem de 500 a 3.000 angstroms de diâmetro e apresentam massa molecular da ordem de $2,5 \times 10^8$ Daltons (SGARBIERI, 2005).

A Tabela 6.4 mostra a distribuição em massa molecular das amostras de leite integral não hidrolisado, LH com AgGly-NPD, leite hidrolisado com enzima ALC imobilizada em suporte agarose-glioxil (LH com AgGly-ALC) e leite hidrolisado com ALC solúvel (LH com ALC solúvel) que foram oferecidos aos animais do Experimento 2. Foram feitas sete reações de hidrólise para cada condição (uma por dia de experimento) mantendo sempre os valores de concentração da enzima e tempo, por isso a Tabela 6.4 mostra a média \pm desvio padrão das sete hidrólises.

A hidrólise do leite utilizando a ALC solúvel como catalisador gerou peptídeos em sua maioria (99,9%) menores que 12,4 kDa, sendo que aproximadamente 80,7% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 6.4). Dessa forma, o perfil peptídico obtido pela hidrólise do leite com ALC solúvel indica que as principais proteínas alergênicas mencionadas foram hidrolisadas em peptídeos de menor massa molecular. Esses dados reforçam a hipótese de que essas hidrólises permitindo as modificações nessas proteínas estariam favorecendo uma menor chance do desenvolvimento da alergia ao leite nesse modelo experimental.

O LH com AgGly-NPD (Experimento 2) apresentou 66,13% de peptídeos menores que 12,4 kDa, sendo que 57,96% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 6.4). O LH com AgGly-ALC apresentou perfil de distribuição de peptídeos por massa molecular com 65,78% de peptídeos menores que 12,4 kDa, sendo que 58,26% destes são menores que 6,5 kDa (Tabela 6.4), semelhante ao perfil do leite hidrolisado com NPD imobilizada (Experimento 2). Tanto o LH com AgGly-NPD quanto o LH com AgGly-ALC apresentam peptídeos em todas as faixas de massa molecular dos padrões analisados, indicando que os leites podem conter ainda alguma proteína alergênica entre as mencionadas que não sofreu hidrólise pela enzima. Como discutido anteriormente, o fato de a enzima estar imobilizada no suporte pode dificultar o acesso de substrato de alta massa molecular no interior dos poros do suporte.

No entanto, a alergenicidade dos hidrolisados obtidos não pode ser determinada apenas com base na distribuição dos tamanhos dos peptídeos (MONACI et al., 2006), por isso a avaliação da alergenicidade destes hidrolisados foram analisados em dois experimentos *in vivo* e os resultados serão apresentados e discutidos a seguir.

Tabela 6.4- Perfil peptídico das amostras de leite integral não hidrolisado (LNH), leite integral hidrolisado com NPD imobilizada (LH com AgGly-NPD), leite integral hidrolisado com ALC imobilizada (LH com AgGly-ALC) e leite integral hidrolisado com ALC solúvel (LH com ALC solúvel) usados no experimento *in vivo* 2. As amostras foram fracionadas por cromatografia de exclusão molecular.

Amostra	Composição (%) por faixa de massa molecular (kDa)				
	> 66	66 - 29	29 - 12,4	12,4 - 6,5	< 6,5
LNH	32,56	10,4	9,76	2,29	44,99
LH com AgGly-NPD	24,57 ± 2,52	8,61 ± 0,40	1,61 ± 0,86	8,17 ± 1,77	57,96 ± 1,95
LH com AgGly-ALC	24,52 ± 3,27	7,66 ± 0,31	2,86 ± 0,43	7,52 ± 1,91	58,26 ± 2,08
LH com ALC Solúvel	0,09 ± 0,08	-	-	19,29 ± 0,62	80,68 ± 0,66

6.3.2 Avaliação Celular – Experimento 1

6.3.2.1 Contagem diferencial de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no sangue

A Figura 6.3 mostra o número de (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ do sangue nos animais dos grupos experimentais: controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, sensibilizado e consumiu leite hidrolisado (LH) com NPD solúvel (LH com NPD solúvel), sensibilizado e consumiu LH com NPD imobilizada em AgGly (LH com AgGly-NPD), sensibilizado e consumiu leite integral não hidrolisado (LNH).

Os animais do grupo que consumiram LNH apresentaram quantidade significativamente menor de neutrófilos no sangue quando comparados aos grupos que consumiram LH com AgGly-NPD e LH com NPD solúvel (Figura 6.3A). Os animais que consumiram LH com AgGly-NPD apresentaram menor número de neutrófilos no sangue quando comparados ao grupo que consumiu LH com NPD solúvel, embora não seja observada diferença estatisticamente significativa entre tais grupos. Os neutrófilos são as células que se encontram em maior número no sangue periférico, sua presença está associada ao controle de infecções, funcionando com uma barreira celular da imunidade inespecífica. Assim, seu papel em respostas alérgicas não tem associação direta. Embora, em alguns trabalhos há relatos que a presença de neutrófilos pode estar associada a quadros mais severos durante respostas alérgicas (HOSOKI et al., 2016). No entanto, nesse estudo, parece que os neutrófilos não estão relacionados diretamente com severidade da alergia ao leite.

Os eosinófilos são importantes células relacionadas com respostas alérgicas. Sendo usadas em algumas alergias como biomarcadores complementar ao diagnóstico e a severidade dos quadros. Além dos eosinófilos, os mastócitos também são células com envolvimento direto em respostas alérgicas (FULKERSON; ROTHENBERG, 2013).

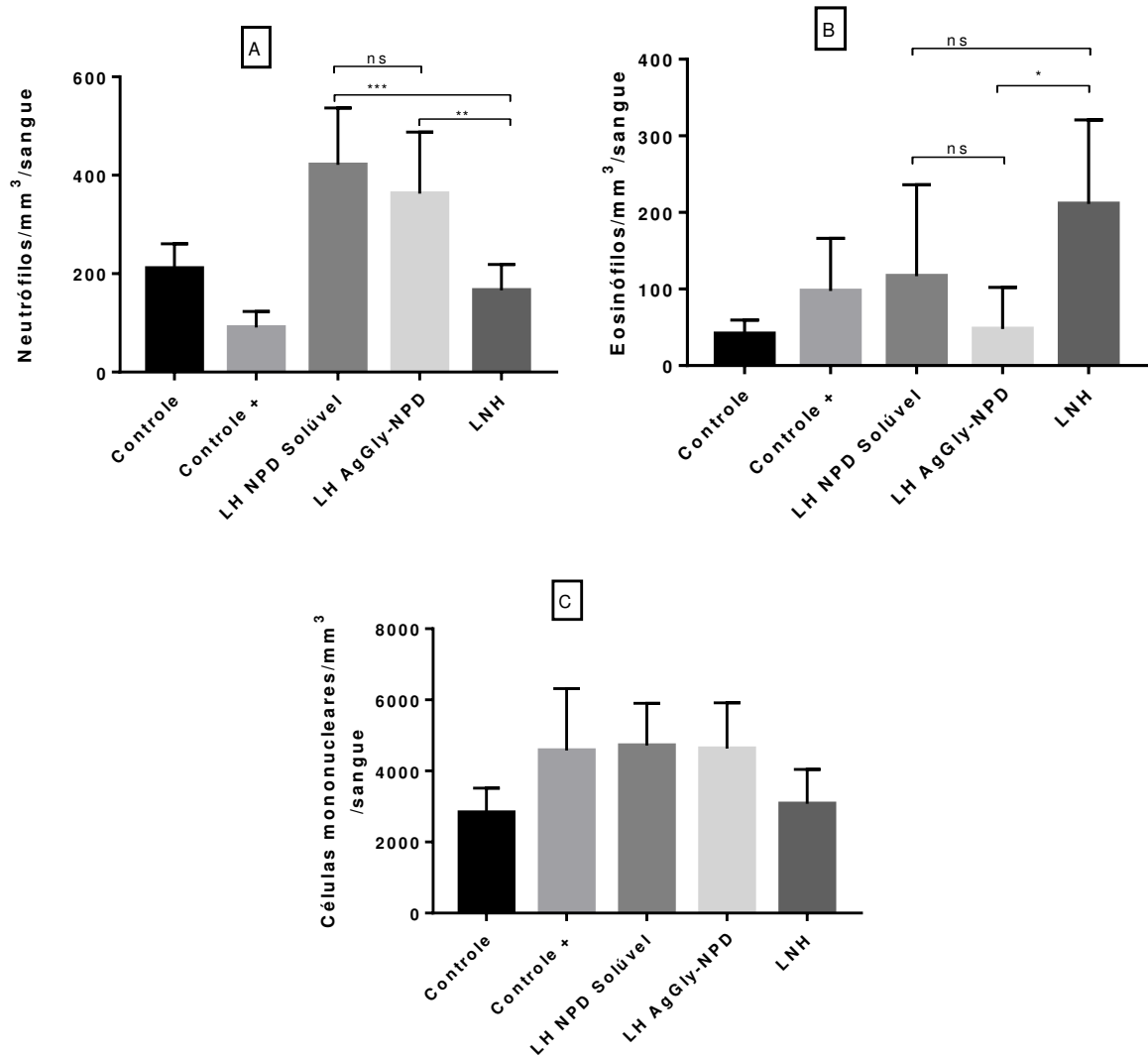
Tanto os eosinófilos como os mastócitos são células granulosas que podem secretar vários mediadores inflamatórios envolvidos em respostas Th₂, a principal resposta imune envolvida em quadros alérgicos. Além disso, possuem receptores específicos para o anticorpo IgE, um dos principais indutores e marcadores de alérgenos em diferentes processos (METCALFE et al., 2016). A resposta inflamatória após a ativação de eosinófilos e mastócitos mediada por IgE ocorre como uma reação imediata, começando em segundos, e uma reação tardia que se desenvolve nas 8-12 horas seguintes. A reação de fase tardia é causada pela síntese e liberação induzidas de mediadores, incluindo prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas e citocinas como IL-5 e IL-13 dos mastócitos e basófilos ativados. Estas recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th₂ para o local da inflamação. Dessa forma, a presença de eosinófilos pode ser caracterizada como biomarcador de inflamação num processo alérgico (SALDANHA et al., 2004), mas sua presença dependerá de associações entre outros dados laboratoriais, sinais clínicos e compartimentos que são encontrados nesses indivíduos.

Como esperado, os animais do grupo LNH apresentou maior número de eosinófilos, sugerindo ativação de processo alérgico, uma vez que as proteínas deste leite não passaram por nenhuma modificação (Figura. 6.3B). Os animais que consumiram LH com AgGly-NPD apresentaram quantidade significativamente menor de eosinófilos no sangue quando comparados ao grupo que consumiu LNH, sugerindo que a hidrólise enzimática foi eficaz na destruição de epítomos alergênicos das proteínas do leite, e o LH com AgGly-NPD não foi capaz de estimular e ativar uma resposta alergênica nesses animais de maneira imediata. O grupo que consumiu o LH com NPD solúvel apresentou mais eosinófilos no sangue do que o grupo que consumiu LH com AgGly-NPD e menos eosinófilos do que o grupo que consumiu LNH. Porém, as diferenças entre o primeiro grupo citado em relação aos demais não foram estatisticamente significativas. Esses dados reforçam a hipótese de que a hidrólise foi fundamental na modificação das proteínas que seriam capazes de estimular e desencadear uma alergia ao leite nesse modelo, mas de maneira discreta biologicamente.

As células mononucleares são células importantes na ativação da resposta e reconhecimento específicos de antígenos durante uma resposta imune. Essas células são caracterizadas pela presença de monócitos e linfócitos, no entanto, como não foi realizado uma técnica específica de diferenciação, como por exemplo marcação e análise por citometria de

fluxo, assim não foi possível diferenciar esses tipos celulares. Entretanto, embora as quantidades de células mononucleares no sangue, o grupo que consumiu LNH tenha sido menor em relação aos grupos que consumiram LH com AgGly-NPD ou NPD solúvel, não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Figura 6.3C). O que indica que essas células não estão diretamente relacionadas aos quadros de alergia ao leite no período avaliado nesse modelo.

Figura 6.3- Contagem diferencial de (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de sangue dos grupos experimentais: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média \pm EPM. Os símbolos ** (p < 0,01) *** (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



6.3.2.2 *Contagem diferencial de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no lavado broncoalveolar*

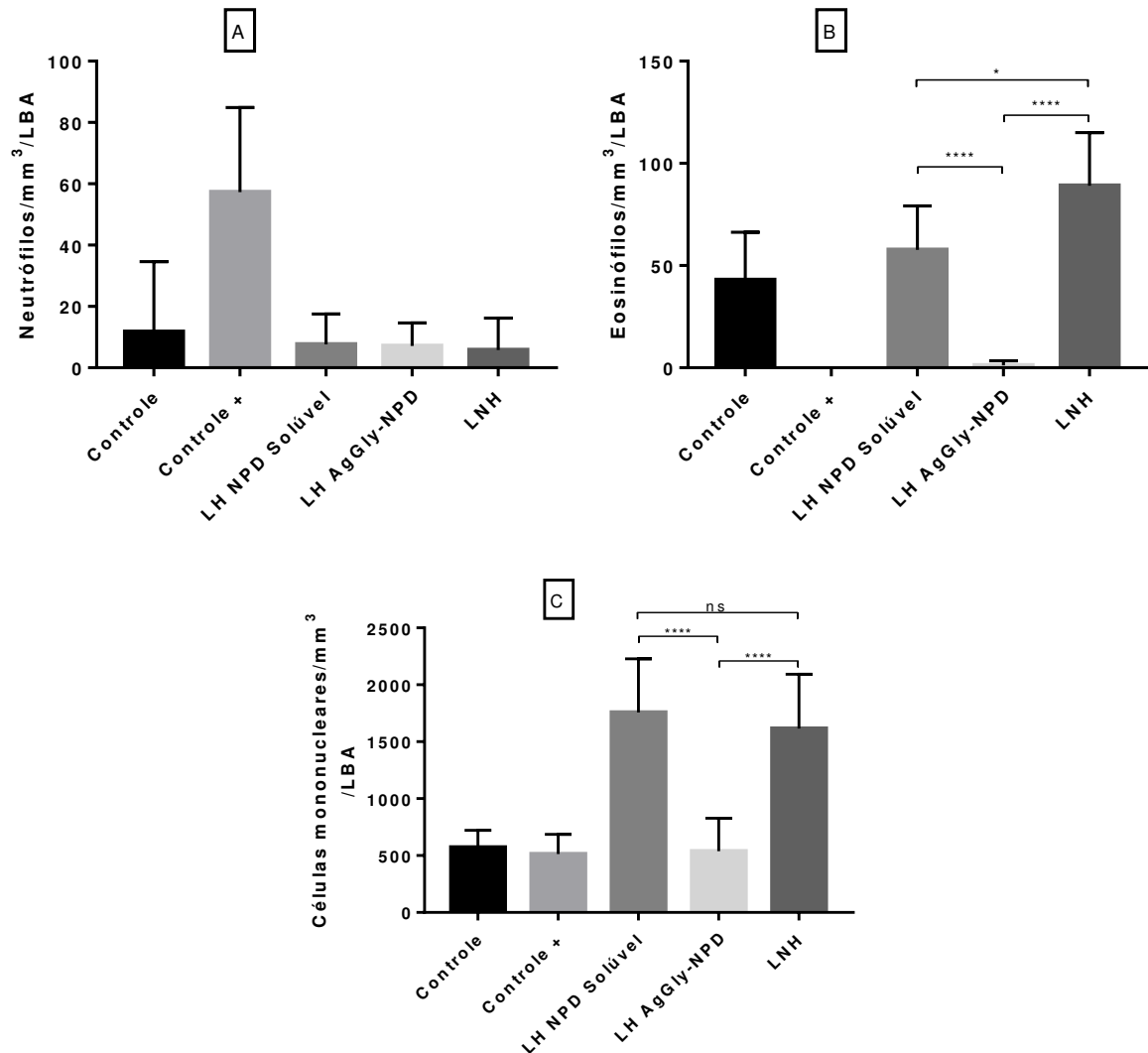
A Figura 6.4 mostra o número de (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais dos grupos experimentais: controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, sensibilizado e consumiu Leite Hidrolisado (LH) com NPD solúvel (LH com NPD solúvel), sensibilizado e consumiu LH com NPD imobilizada em AgGly (LH com AgGly-NPD), sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH). O pulmão é um órgão relacionado a diferentes quadros alérgicos, mesmo que o sítio alérgico principal não seja esse. Há na literatura uma abordagem sobre o eixo pulmão-intestino relacionado a diferentes processos que desencadeiam respostas imunes exacerbadas, incluindo processos alérgicos e infecciosos. Por isso, nesse modelo avaliou-se o perfil celular nesse tecido, de forma indireta, usando a metodologia da coleta de células do parênquima pulmonar via lavado broncoalveolar.

Em relação ao número de neutrófilos no LBA não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que tomaram LH com NPD solúvel, LH com AgGly-NPD e LNH (Figura 6.4A). Os animais que consumiram LH com AgGly-NPD apresentaram quantidade significativamente menor de eosinófilos no LBA quando comparados aos grupos de LH com NPD solúvel e LNH (Figura 6.4B). Esses dados estão de acordo com os dados obtidos na avaliação dessas células no sangue, e assim sugere-se que o leite LH com AgGly-NPD se caracteriza como o mais promissor para ser disponibilizado a indivíduos com pré-disposição a ter alergia ao leite. O grupo que consumiu o LH com NPD solúvel apresentou mais eosinófilos no LBA do que o grupo que consumiu LH com AgGly-NPD e menos eosinófilos do que o grupo que consumiu LNH. Assim como ocorreu com o número de eosinófilos no sangue, o leite não hidrolisado induziu maior número de eosinófilos, sugerindo que nesse grupo ocorreu indução do processo alérgico, uma vez que as proteínas deste leite não passaram por nenhuma modificação. Já a hidrólise com leite NPD imobilizada pode ter contribuído diretamente com a destruição de epítomos alergênicos, uma vez que a ausência ou diminuição drástica de eosinófilos no LBA indica um perfil não alérgico deste grupo.

Em relação à quantidade de células mononucleares no LBA, os animais que consumiram LH com AgGly-NPD apresentaram em média quantidade significativamente menor de células mononucleares no LBA quando comparados aos grupos de LH com NPD solúvel e LNH (Figura 6.4C). A média de células mononucleares do LBA dos grupos LH com NPD solúvel e LNH não possuem diferença estatisticamente significativa (Figura 6.4C). Como citado

anteriormente, no sangue, os dados indicam que essas células não estão diretamente relacionadas aos quadros de alergia ao leite no período avaliado nesse modelo.

Figura 6.4- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de LBA dos grupos experimentais: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média \pm EPM. Os símbolos * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



6.3.3 Avaliação da produção de anticorpos IgE – Experimento 1

Na Figura 6.5 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, sensibilizado e consumiu leite hidrolisado (LH) com NPD solúvel, sensibilizado e consumiu

LH com AgGly-NPD, sensibilizado e consumiu leite não hidrolisado (LNH) após a sensibilização da placa com α -lactalbumina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG) e caseína. Dessa forma, foi avaliado se houve produção de anticorpos IgE específicos para cada uma das proteínas usadas na sensibilização pelo método imunoenzimático ELISA.

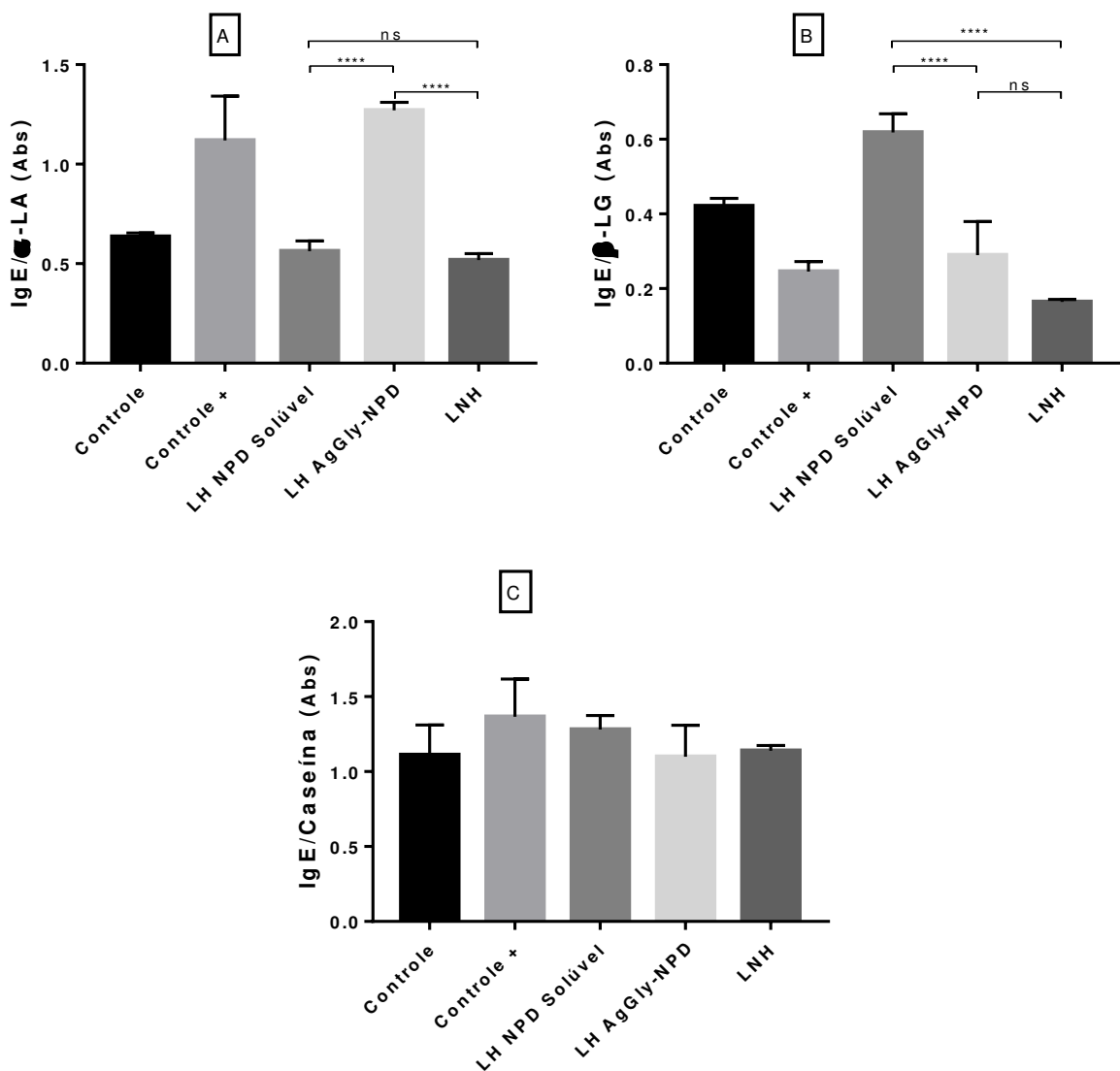
É importante ressaltar que uma das fases experimentais nesse modelo *in vivo* foi a fase de sensibilização, onde os animais receberam por via intraperitonal as principais proteínas alergênicas do leite (α -LA, β -LG e caseína), além da ovoalbumina, para indução do quadro alérgico com perfil imunológico Th₂. Espera-se que todos os grupos sensibilizados tenham produção de anticorpos IgE específicos para cada proteína. Por isso, espera-se maior produção de IgE do controle sensibilizado (+) em relação ao controle não sensibilizado, quando comparados aos demais grupos que não tomaram nenhum leite. Para os grupos que tomaram algum leite espera-se que ocorra a presença de IgE igual ou maior que o controle sensibilizado. Entre os grupos que tomaram leite espera-se que maior quantidade de IgE indique maior resposta alérgica. Embora, tenha sido observado resultados contraditórios em relação aos eosinófilos e a produção de IgE nos diferentes grupos experimentais, os dados ainda podem sugerir que o leite LH com AgGly-NPD é o mais promissor no controle da alergia induzida pelo leite. A presença de IgE sozinha não é capaz de ativar quadro de hipersensibilidade imediata, caracterizado nesse tipo de alergia alimentar. Essa ativação via IgE é sempre dependente das células granulares como os eosinófilos (Figuras 6.3B e 6.4B) e mastócitos (dados não mostrados) os quais não foram observados nesses animais, células essas que apresentam receptores constitutivos para esse tipo de anticorpo, e são fundamentais na ativação de respostas alérgicas exacerbadas (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010).

Assim, o dado observado nos animais do grupo que consumiram LH com AgGly-NPD terem maior produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo LH com NPD solúvel e LNH após sensibilização da placa com α -LA (Figura 6.5A), o fato dos mesmos terem apresentados diminuição de eosinófilos (Figura 6.3B) sugere que a ativação da resposta Th₂ não efetiva nesses animais e pode haver uma redução da atividade alergênica desse leite, visto que esse evento requer associações celulares e humorais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LH com NPD imobilizada e controle sensibilizado na produção de IgE para α -LA.

Os animais do grupo que consumiram LH com NPD solúvel apresentaram maior produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo LH com AgGly-NPD, LNH e controle + após sensibilização da placa com β -LG (Figura 6.5B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LH com AgGly-NPD, LNH e controle

sensibilizado na produção de IgE para β -LG. Juntos esses dados sugerem que a imobilização das proteínas de forma específica contribuiu para redução da atividade alergênica que esses leites pudessem apresentar nesse modelo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados para a produção de IgE após sensibilização da placa com caseína.

Figura 6.5- Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais após a sensibilização da placa com (A) α -lactalbumina (α -LA), (B) β -lactoglobulina (β -LG) e (C) caseína de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). O símbolo **** ($p < 0,0001$) representa a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



6.3.4 Quantificação de citocinas no plasma – Experimento 1

A partir do plasma, duas citocinas foram quantificadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA: IL-4 e IL-5. Para a citocina IL-4 (Figura 6.6A), o grupo que recebeu LH com AgGly-NPD apresentou a maior concentração da IL-4, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa quando comparado aos grupos LNH, controle e controle sensibilizado (+). Da mesma forma, o grupo LH com NPD solúvel obteve a menor concentração de IL-4, esta diferença não foi estatisticamente significativa quando comparado aos grupos LNH, controle e controle (+).

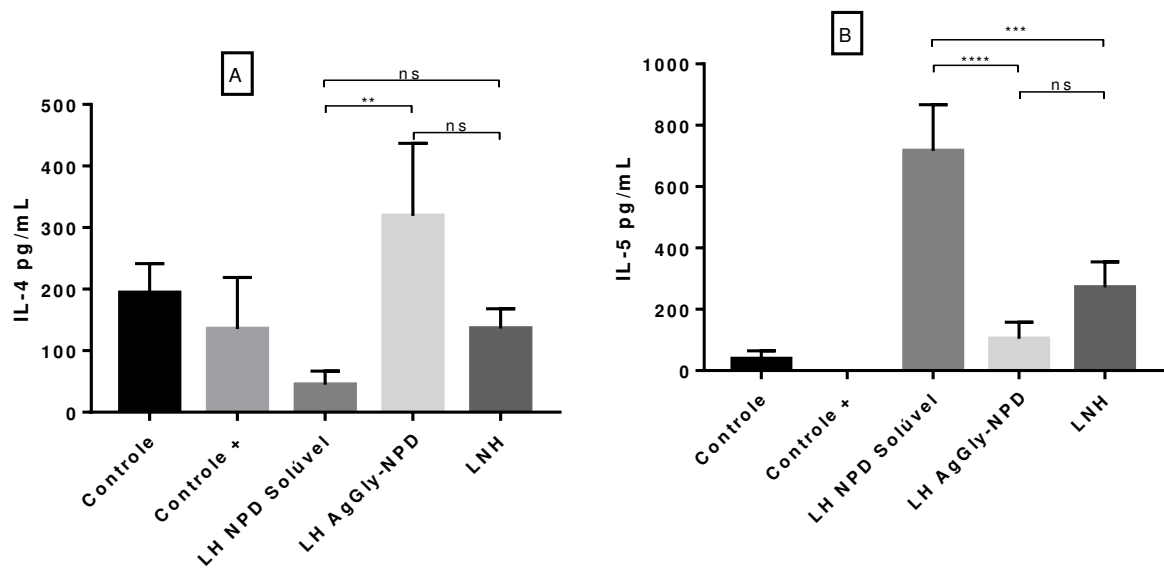
Para a citocina IL-5 (Figura 6.6B), o grupo LH com NPD solúvel apresentou maior concentração de IL-5 em relação aos demais grupos. O grupo LH com AgGly-NPD apresentou concentração de IL-5 significativamente menor em relação ao LH com NPD solúvel e uma redução estatisticamente não significativa em relação ao LNH.

Os dados obtidos para a quantificação das citocinas IL-4 (Figura 6.6A) e IL-5 (Figura 6.6B) estão de acordo com os resultados obtidos para eosinófilos nos animais que consumiram leite hidrolisado com proteína imobilizada, onde foram observados menor número de eosinófilos. E sabendo que a eosinofilia sanguínea é na maioria das vezes dependente de IL-5, os dados confirmam isso no modelo experimental avaliado (MOULD et al., 1997). E em relação a IL-4, os resultados explicam o aumento de IgE nesses animais, visto que para que a produção específica de IgE ocorra, há a necessidade da presença de IL-4 para ativar os plasmócitos a secretarem esse tipo de anticorpo (PUNNONEN; YSSEL; DE VRIES, 1997). No entanto, uma resposta exacerbada que caracteriza os processos alérgicos é um conjunto de eventos imunológicos. Assim, com base nos resultados pode-se sugerir que a hidrólise e a imobilização foram fatores relevantes para regular alguns desses parâmetros e isso, sugere a capacidade promissora dessas formulações no controle da alergia ao leite.

Gomes-Santos et al. (2015) também observaram diminuição da indução alérgica em hidrolisados ao investigarem os efeitos imunológicos da proteína de soro de leite hidrolisada em camundongos alérgicos. Os autores utilizaram um modelo de alergia alimentar em camundongos BALB/c sensibilizados com β -LG por injeção intraperitoneal e os animais ingeriram por via oral proteína de soro de leite ou hidrolisado de soro de leite comercial. Os animais que tomaram proteína do soro apresentaram inflamação intestinal, aumento dos níveis de IL-5 e diminuição da produção de IL-4 e IL-10 na mucosa intestinal. Por outro lado, os camundongos desafiados com hidrolisado mantiveram os níveis normais de IgE, IL-4 e IL-5 e não mostraram sinal evidente de inflamação intestinal, provavelmente devido à regulação de

citocinas no intestino, sugerindo que o consumo de leite hidrolisado modulou o desenvolvimento de sinais clínicos de alergia alimentar nesses camundongos.

Figura 6.6- Concentrações da citocina (A) IL-4 e (B) IL-5 em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD solúvel (LH NPD Solúvel), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média \pm EPM. Os símbolos * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



6.3.5 Avaliação Histológica – Experimento 1

Nas Figuras 6.7 e 6.8 estão representadas as fotomicrografias de cortes de fígado (Figura 6.7) e intestino (Figura 6.8) dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH), G3-sensibilizado e consumiu Leite Hidrolisado (LH) com NPD solúvel, G4-sensibilizado e consumiu LH com NPD imobilizada (LH com AgGly-NPD), G5-controle sensibilizado (+) e sem consumo de leite.

A histologia do fígado representada pela Figura 6.7, demonstrada na foto do grupo LH com AgGly-NPD (G4) sugere vasculite discreta, e o fígado do controle (+) (G5) está tumefeito, sugerindo extravasamento de líquido para o tecido, os demais grupos não foram observadas alterações consideráveis. Os resultados anteriores em relação ao perfil celular e a resposta Th₂ sugerem uma regulação da alergenicidade nos animais do grupo que receberam LH com AgGly-NPD (G4), embora, tenha sido observado discreta vasculite no fígado em um vaso, esse dado não tem relação com a resposta alérgica nesse tecido. E quando observa-se o parênquima como

um todo, o tecido apresenta-se íntegro muito semelhante aos animais do grupo controle (G1), os quais não receberam nenhuma formulação (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

Na histologia do intestino, representada pela figura 6.8, o grupo que recebeu LH com NPD solúvel (G3) aparentemente apresenta tumefação da mucosa intestinal, e os demais grupos não foram observadas alterações consideráveis. Esse achado de aparente tumefação na mucosa do grupo que recebeu LH com NPD solúvel (G3) não parece estar relacionado diretamente com o processo alérgico, visto que nesses tecidos quando há resposta alérgica pode-se observar também infiltrado eosinófilo (GARRETT; GORDON; GLIMCHER, 2010), o qual não foi evidenciado nesses animais.

Figura 6.7-Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: G1- controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2- sensibilizado e consumiu LNH, G3- sensibilizado e consumiu LH com NPD solúvel, G4- sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G5- controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite. Coloração: HE. Aumento 10X.

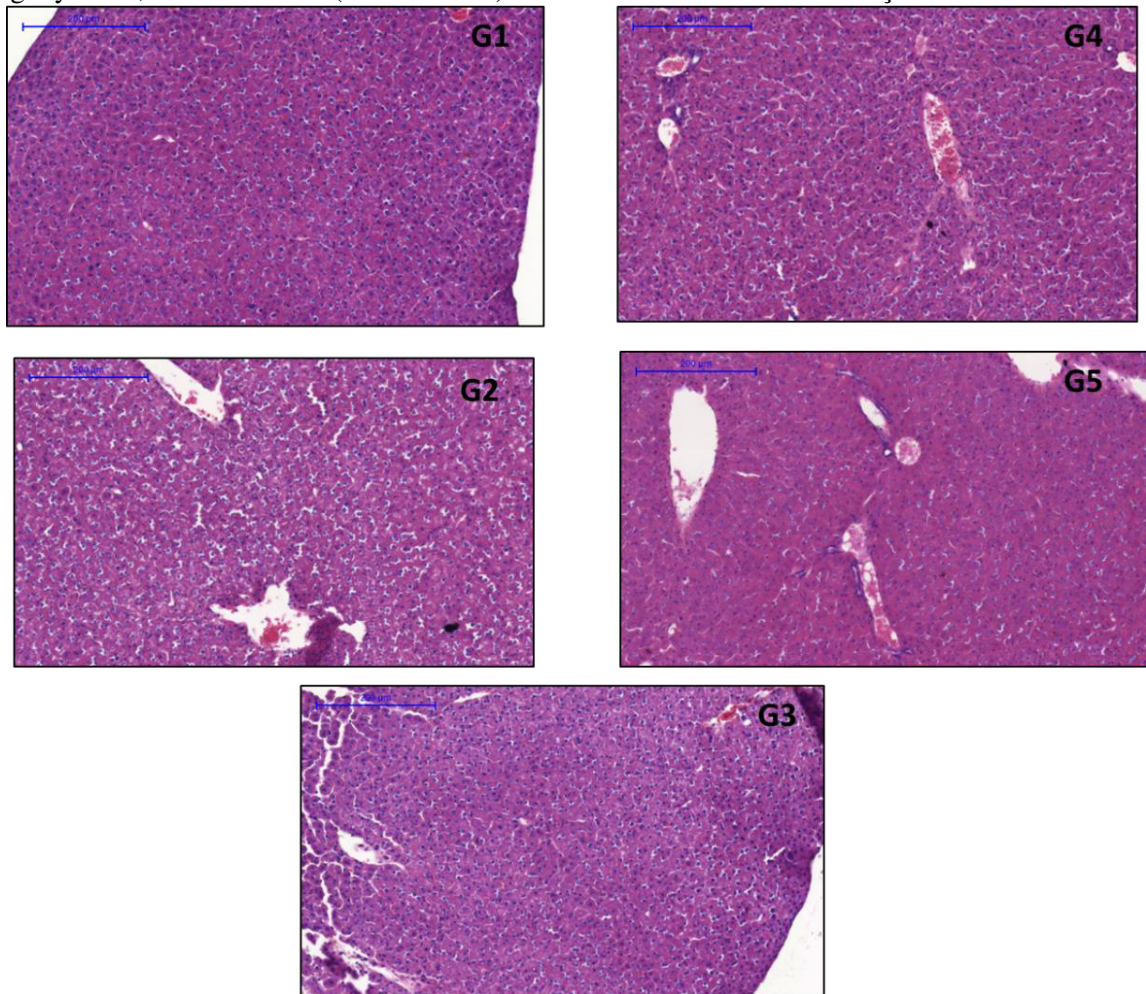
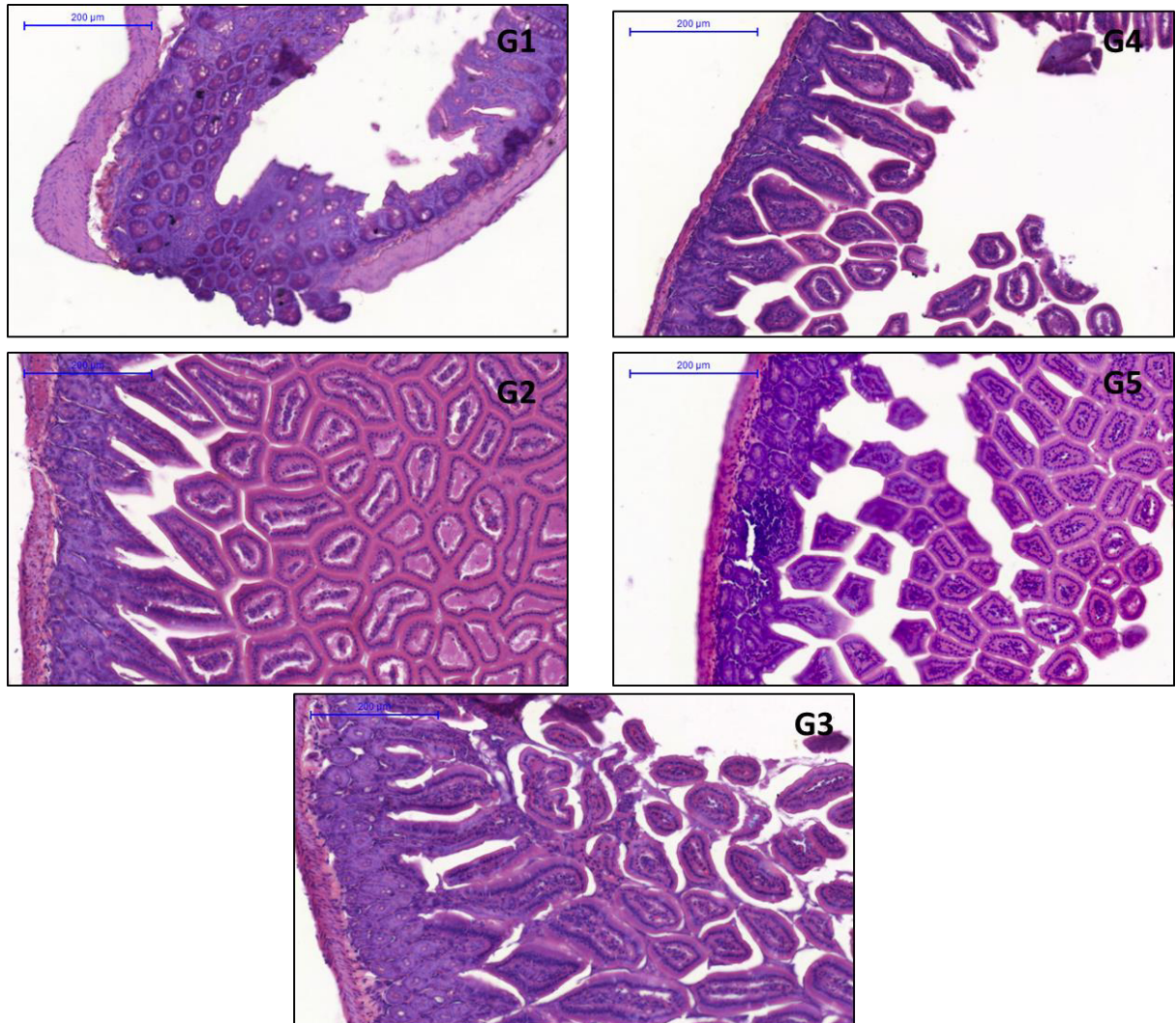


Figura 6.8- Análise morfológica de cortes histológicos do intestino dos animais de cada grupo experimental: G1- controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2- sensibilizado e consumiu LNH, G3- sensibilizado e consumiu LH com NPD solúvel, G4- sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G5- controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite. Coloração: HE. Aumento 10X.



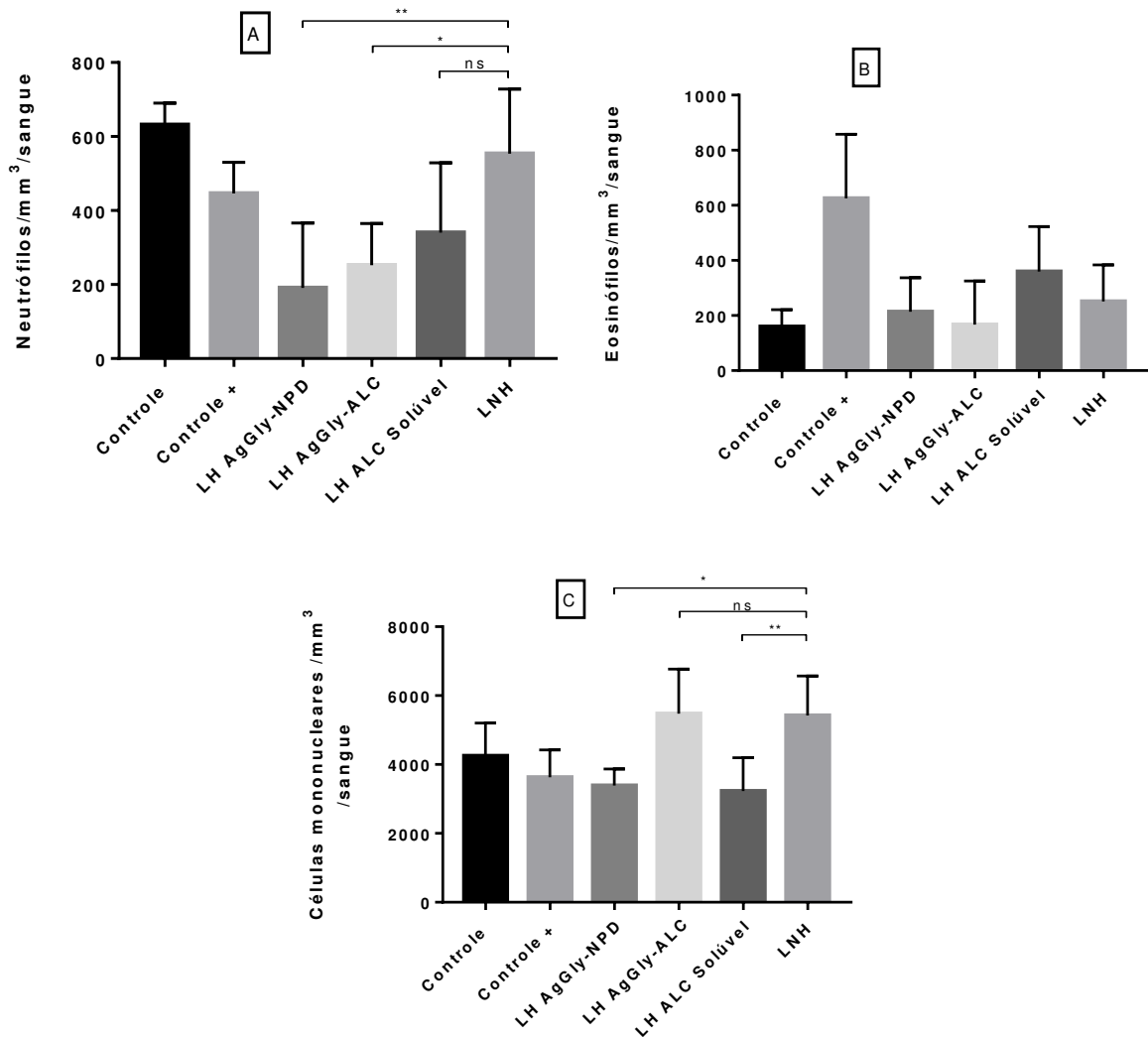
6.3.6 Avaliação Celular – Experimento 2

6.3.6.1 Contagem diferencial de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no sangue

A Figura 6.9 mostra o número de (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de sangue nos animais dos grupos experimentais: controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, sensibilizado e consumiu leite hidrolisado (LH) com NPD imobilizada em AgGly (LH com AgGly-NPD), sensibilizado e consumiu LH com ALC imobilizada em AgGly (LH com AgGly-ALC), sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH).

Os animais do grupo que consumiram LNH apresentaram em média quantidade significativamente maior de neutrófilos no sangue quando comparados aos grupos que consumiram LH com AgGly-NPD ($p < 0,01$) e LH com AgGly-ALC ($p < 0,05$) (Figura 6.9A). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo LNH e os grupos LH com ALC solúvel, controle e controle sensibilizado.

Figura 6.9- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de sangue de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD), leite hidrolisado com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC), leite hidrolisado com ALC solúvel (LH ALC Solúvel) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média \pm EPM. Os símbolos ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



Segundo Hosoki et al. (2016), estudos recentes demonstraram que os neutrófilos estão associados à gravidade da inflamação alérgica, ao início da inflamação alérgica e à

sensibilização. Dessa forma, o maior número de neutrófilos no grupo de animais que tomou leite sem tratamento pode estar associado ou sugerir uma inflamação alérgica, assim como os grupos que tomaram LH com AgGly-NPD e AgGly-ALC apresentaram menor número de neutrófilos, sugerindo regulação na indução do quadro alérgico por esses leites. Embora no Experimento 1 não tenha sido possível visualizar uma relação direta com os neutrófilos e a resposta alérgica, algumas modificações no Experimento 2, como maior número de sensibilizações em intervalos menores, podem ter contribuído para diferenças na indução no quadro alérgico, e favorecido a presença de neutrófilos no processo inflamatório analisado.

Em relação ao número de eosinófilos no sangue (Figura 6.9B), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LH com AgGly-NPD, LH com AgGly-ALC, LH com ALC solúvel e LNH. O grupo controle sensibilizado apresentou maior média de eosinófilos no sangue, como esperado por ser o grupo que teve o processo alérgico estimulado.

Os animais do grupo que consumiram LNH apresentaram em média quantidade significativamente maior de células mononucleares no sangue quando comparados aos grupos que consumiram LH com AgGly-NPD ($p < 0,05$) e LH com ALC solúvel ($p < 0,01$) (Figura 6.9C). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo LNH e os grupos LH com AgGly-ALC, controle e controle (+). Como observado anteriormente no Experimento 1, no sangue, os dados indicam que essas células não estão diretamente relacionadas aos quadros de alergia ao leite no período avaliado nesse modelo.

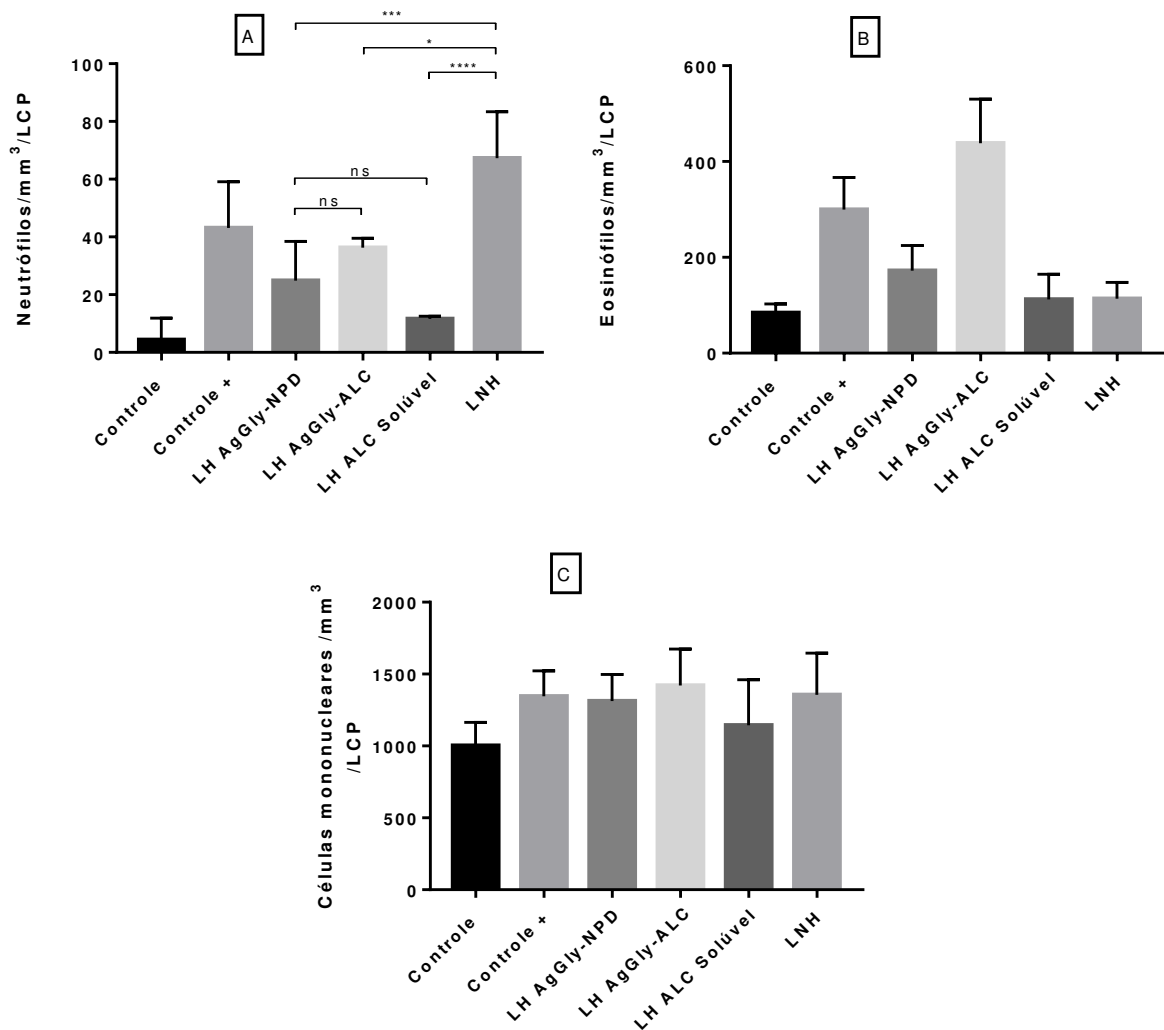
6.3.6.2 Contagem diferencial de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no lavado da cavidade peritoneal

A Figura 6.10 mostra o número de (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ no lavado da cavidade peritoneal (LCP) dos animais dos grupos experimentais: controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, sensibilizado e consumiu Leite Hidrolisado (LH) com AgGly-NPD, sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH).

Os animais do grupo que consumiram LNH apresentaram em média quantidade significativamente maior de neutrófilos no LCP quando comparados aos grupos que consumiram LH com AgGly-NPD ($p < 0,001$), LH com AgGly-ALC ($p < 0,05$) e LH com ALC solúvel ($p < 0,0001$) (Figura 6.10A). O grupo LH com ALC solúvel apresentou menor quantidade média de neutrófilos no LCP quando comparado aos grupos LNH, LH com AgGly-

NPD, LH com AgGly-ALC e controle sensibilizado, embora a diferença com o grupo LH com AgGly-NPD não tenha sido estatisticamente significativa. Semelhante ao observado na avaliação destas células no sangue, o maior número de neutrófilos no grupo de animais que tomou leite não hidrolisado pode estar associado a uma inflamação alérgica, uma vez que as proteínas deste leite não passaram por nenhuma modificação. Os grupos que tomaram leite hidrolisado com AgGly-NPD, AgGly-ALC e ALC solúvel apresentaram menor número de neutrófilos no LCP sugerindo redução na indução do quadro alérgico.

Figura 6.10- Contagem diferencial (A) neutrófilos/mm³, (B) eosinófilos/mm³ e (C) células mononucleares/mm³ de LCP de cada grupo experimental: controle, controle sensibilizado (+), leite hidrolisado com NPD imobilizada em AgGly (LH AgGly-NPD), leite hidrolisado com ALC imobilizada em AgGly (LH AgGly-ALC), leite hidrolisado com ALC solúvel (LH ALC Solúvel) e leite não hidrolisado (LNH). Os dados representam a média \pm EPM. Os símbolos * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) representam a diferença significativa entre os grupos indicados e ns que não há diferença estatisticamente significativa.



O grupo LH com AgGly-ALC apresentou maior média de eosinófilos no LCP em relação aos demais grupos testados (Figura 6.10B), sugerindo que nesse grupo ocorreu modificações na resposta imune, o que poderia induzir um processo alérgico nesses animais. Como discutido anteriormente, a presença de eosinófilos pode ser caracterizada como um biomarcador de inflamação em um processo alérgico (SALDANHA et al., 2004), mas sua presença dependerá de associações entre outros dados laboratoriais, sinais clínicos e compartimentos que são encontrados nesses indivíduos. Os grupos LH com AgGly-NPD, LH com ALC solúvel e LNH apresentaram baixo número de eosinófilos no LCP não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, sugerindo um perfil não alérgico para esses grupos. Tais resultados reforçam o observado no Experimento 1 de que o leite LH com AgGly-NPD se caracteriza como um produto promissor para ser disponibilizado a indivíduos com pré-disposição a ter alergia ao leite.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados para a concentração de células mononucleares no LCP (Figura 6.10C), indicando que essas células não estão diretamente relacionadas aos quadros de alergia ao leite no período avaliado nesse modelo.

6.3.7 Avaliação Histológica – Experimento 2

Nas Figuras 6.11 e 6.12 estão representadas as fotomicrografias de cortes de fígado (Figura 6.11) e intestino (Figura 6.12) dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, G3-sensibilizado e consumiu leite hidrolisado (LH) com AgGly-NPD, G4-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, G5-sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, G6-sensibilizado e consumiu leite não hidrolisado (LNH).

Na Figura 6.11 o fígado do grupo controle (+) (G2) apresentou vasculite discreta (células mononucleares ao redor de veias centro-lobulares); tumefação celular moderada e difusa; e congestão discreta. No grupo que recebeu LH com AgGly-NPD (G3) o fígado apresenta degeneração hidrópica moderada, difusa, congestão de sinusoides, discreta e difusa; células de Kupffer em moderada evidenciação. No que recebeu LH com AgGly-ALC (G4) observou-se vasculite ao redor de veias centro-lobulares, presença de pequenos focos de infiltrado inflamatório mononuclear no parênquima, degeneração hidrópica moderada, difusa, células de Kupffer em moderada evidenciação e congestão acentuada. No grupo que recebeu

LH com ALC solúvel G5 foi observado vasculite discreta ao redor de veias e degeneração hidrópica moderada.

Na Figura 6.12 representada pela histologia do intestino o grupo controle (+) (G2) apresenta infiltrado de células mononucleares presentes de forma discreta em camada mucosa, o intestino do grupo que recebeu LH com ALC solúvel (G5) apresenta infiltração discreta de células mononucleares em região de base de vilos, e o grupo que recebeu LNH (G6) foi observado presença de área focalmente extensa de degeneração hidrópica de base de criptas. Nos demais grupos não foram observadas nenhuma alteração digna de consideração.

Figura 6.11- Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, G3-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G4-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, G5-sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, G6-sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH).Coloração: HE. Aumento 10X.

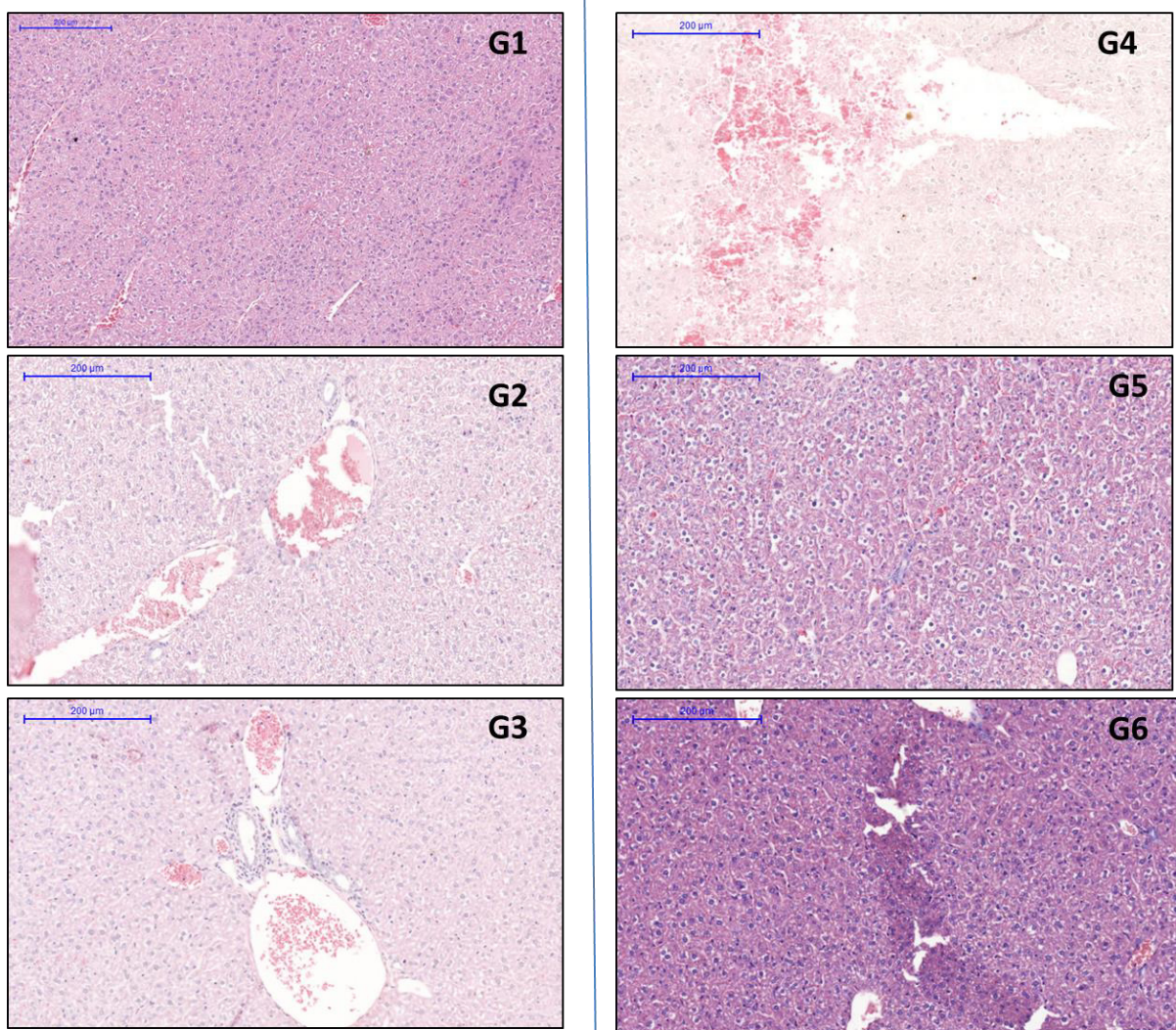
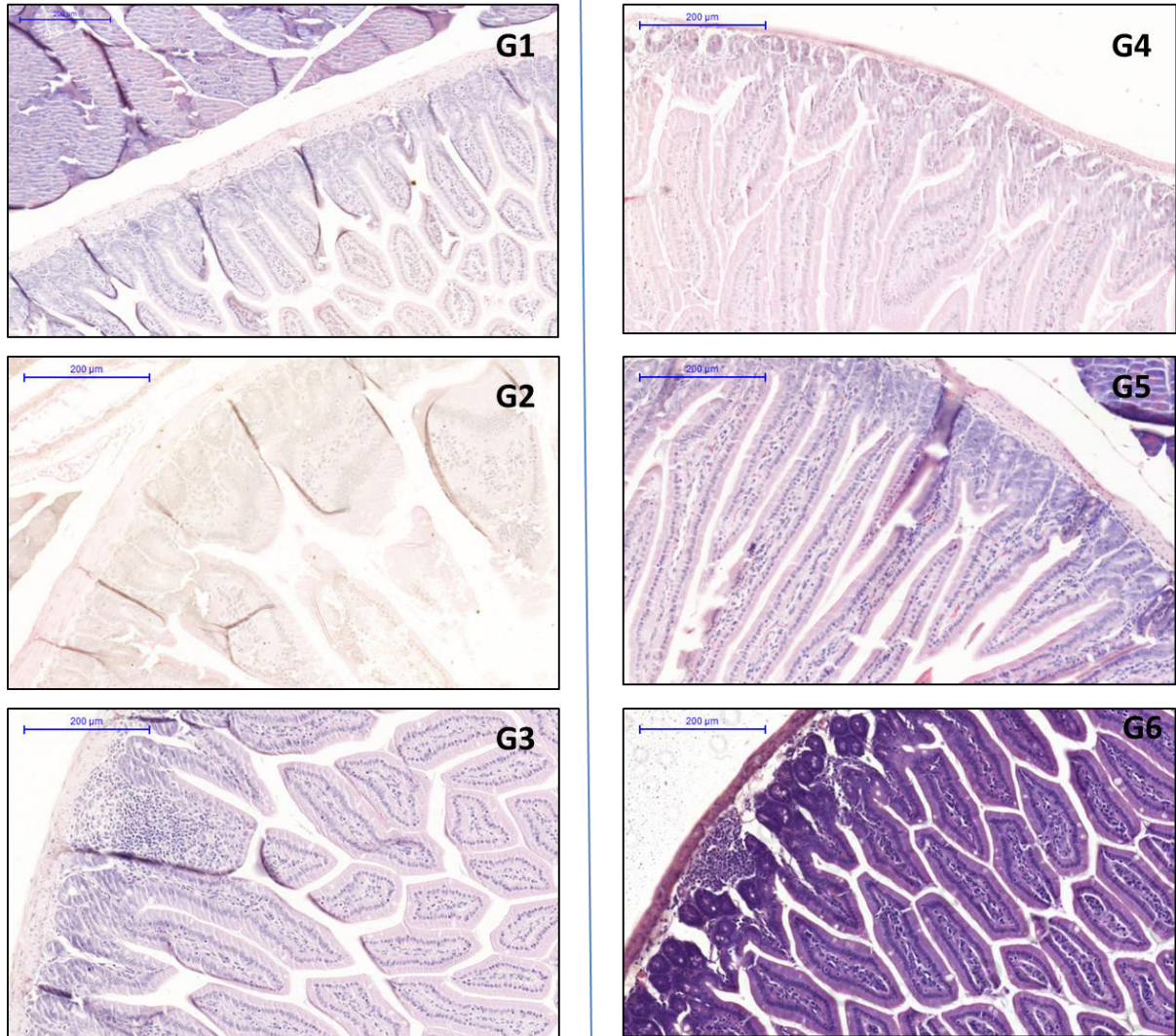


Figura 6.12- Análise morfológica de cortes histológicos do intestino dos animais de cada grupo experimental: G1-controle (não sensibilizado) e sem consumo de leite, G2-controle + (sensibilizado) e sem consumo de leite, G3-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-NPD, G4-sensibilizado e consumiu LH com AgGly-ALC, G5-sensibilizado e consumiu LH com ALC solúvel, G6-sensibilizado e consumiu Leite Não Hidrolisado (LNH). Coloração: HE. Aumento 10X.



Os resultados anteriores relacionados ao perfil celular sugerem uma regulação da alergenicidade do leite para os animais do grupo que receberam LH com AgGly-NPD (G3) e AgGly-ALC (G4), embora, tenha sido observado alterações no fígado desses grupos (Figura 6.11), esses dados não parecem estar relacionados diretamente com o processo alérgico, visto que nesses tecidos quando há resposta alérgica pode-se observar também infiltrado eosinófilo (GARRETT; GORDON; GLIMCHER, 2010), que não foi evidenciado nesses animais. Quando se analisa a histologia do intestino (Figura 6.12) para os grupos que receberam LH com AgGly-NPD e AgGly-ALC, o tecido apresenta-se íntegro muito semelhante aos animais do grupo controle (G1), os quais não receberam nenhuma formulação. Os resultados da histologia deixam

claro que os grupos que receberam LH com AgGly-NPD (G3) e AgGly-ALC (G4) são mais promissores para o controle da alergia.

6.4 Conclusões

Os resultados deste capítulo sugerem que a hidrólise de proteínas do leite com os catalisadores AgGly-NPD e AgGly-ALC foi capaz de reduzir a indução da alergenicidade às proteínas do leite frente ao modelo *in vivo* avaliado. Apesar dos hidrolisados com ALC e NPD solúvel terem apresentado um perfil peptídico com maior porcentagem em massa de peptídeos menores de 6,5 kDa, o aquecimento do leite até a inativação da enzima (de 50 °C para 90 °C) pode ter levado à exposição de epítomos ocultos ou ao surgimento de novos epítomos com a desnaturação de proteínas, o que induziu uma maior resposta alérgica desses hidrolisados comparada aos hidrolisados com AgGly-NPD e AgGly-ALC. É necessário uma investigação profunda para confirmar estas hipóteses e também para validar o leite obtido como uma fórmula hipoalergênica, embora os resultados aqui obtidos já sugerem que os hidrolisados obtidos de hidrólise com enzima imobilizada são extremamente promissores para serem consumidos por indivíduos com hipersensibilidade às proteínas do leite de vaca, além dos muitos benefícios do uso de enzimas imobilizadas em termos de processo, tais como reuso do biocatalisador e consequente redução de custos.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo avaliou a imobilização e estabilização das proteases NPD e ALC em suporte AgGly, bem como o desempenho dos derivados obtidos na hidrólise das proteínas do leite de vaca e a caracterização dos hidrolisados de leite quanto ao perfil peptídico, análise sensorial, análise físico-química e alergenicidade em modelo *in vivo*.

A imobilização covalente da NDP em AgGly permitiu a preparação de um biocatalisador 20 vezes mais estável do que a enzima livre a 50 °C e pH 6,5. O derivado de alta carga exibiu excelente desempenho na hidrólise da caseína permitindo o uso do biocatalisador por dez bateladas de 2h de reação mantendo o GH. As diferentes estratégias avaliadas com o intuito de aumentar a estabilidade do biocatalisador (aminação química da NPD solúvel, recobrimento do derivado AgGly-NPD com PEI e modificação da superfície do suporte com glicina) bem como a imobilização da NPD em quitosana-glutaraldeído não proporcionaram aumento de estabilização em relação ao derivado tradicional de AgGly-NPD.

A protease ALC foi imobilizada em AgGly nas mesmas condições da AgGly-NPD e os parâmetros de imobilização e estabilidade térmica obtidos foram bastante semelhantes entre os derivados. As hidrólises de leite com estes derivados de baixa carga renderam perfis peptídicos diferentes, o que precisa ser investigado uma vez que as duas enzimas possuem o mesmo componente enzimático que é a subtilisina. Os estudos da hidrólise de leite de vaca com as enzimas NPD e ALC mostraram a dificuldade de controle do grau de hidrólise com o uso das enzimas solúveis, uma vez que o aquecimento para a inativação da enzima aumentou o GH real em relação ao teórico. Além disso, a análise sensorial do hidrolisado de ALC solúvel apresentou vários aspectos negativos, como a cor próxima de creme claro, gosto extremamente amargo e sabor residual amargo muito forte. O hidrolisado de AgGly-ALC foi o que apresentou menos alterações nas características sensoriais em relação ao leite integral não hidrolisado, ou seja, teve suas características mais próximas ao leite integral não hidrolisado nos atributos avaliados.

O estudo da resposta alérgica dos hidrolisados em modelo *in vivo* mostrou que dentre os hidrolisados avaliados (ALC e NPD solúvel, AgGly-NPD e AgGly-ALC) e leite integral, os hidrolisados de AgGly-NPD e AgGly-ALC apresentaram menor indução na resposta alérgica, sendo os hidrolisados mais promissores para o controle da alergia.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a vantagem do uso de enzimas imobilizadas na hidrólise de proteínas, além de permitir o reuso do biocatalisador, a imobilização viabiliza economicamente o uso de altas concentrações de catalisador no reator, permite a simples separação física do catalisador, evitando a necessidade de inativação térmica

da enzima, que pode causar alterações nas características do produto como se observou neste estudo, além de evitar a contaminação do produto com a enzima.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se para trabalhos futuros:

- a) Aminoação química da AgGly-NPD e posterior modificação com glutaraldeído com o objetivo de aumentar a estabilidade do derivado;
- b) Avaliar a adição de outras CDs (β -CD e γ -CD) no leite hidrolisado com o objetivo de reduzir o sabor amargo;
- c) Usar o processo de ultrafiltração após a hidrólise para remover peptídeos maiores ou não hidrolisados que podem ainda conter epítomos não modificados com o objetivo de reduzir a resposta alérgica.

8. REFERÊNCIAS

- ADEL-PATIENT, K. et al. Immunomodulatory potential of partially hydrolyzed β -lactoglobulin and large synthetic peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 43, p. 10858–10866, 2012.
- ADHIKARI, K. et al. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 113–118, 2010.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Barking, Essex: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AIT BRAHAM, S. et al. Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: Enzyme stabilization and improved proteolytic activity. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 2, p. 1–4, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 8586: Análise sensorial – Guia geral para a seleção, treinamento e monitoramento de avaliadores selecionados e de especialistas ou experts**. Rio de Janeiro, 36 p. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 5492: Análise sensorial - Vocabulário**. Rio de Janeiro, 29 p., 2017a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 13299: Análise sensorial – Metodologia – Orientação geral para o estabelecimento de um perfil sensorial**. Rio de Janeiro, 50 p., 2017b.
- ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631–1640, 2009.
- ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 148–155, 2017.
- BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012.
- BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BASHIR, F. et al. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 944–951, 2018.
- BENHATCHI, S. et al. Induction of sublingual immunotherapy to cow's milk (raw, pasteurized and sterilized) in Balb/c mice sensitized to beta-lactoglobulin. **Revue Francaise d'Allergologie**, v. 59, n. 1, p. 9–14, 2019.
- BILAL, M. et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 3, p. 159–182, 2019a.
- BILAL, M. et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 2019b.
- BLANCO, R. M.; GUIBAN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose aldehyde gels - Borohydride reduction of trypsin agarose derivatives.

- Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 6, p. 360–366, 1989.
- BOGAHAWATHTHA, D.; CHANDRAPALA, J.; VASILJEVIC, T. Modulation of milk immunogenicity by thermal processing. **International Dairy Journal**, v. 69, p. 23–32, 2017.
- BOLIVAR, J. M. et al. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 158–163, 2009.
- BOLIVAR, J. M. et al. Shine a light on immobilized enzymes: Real-time sensing in solid supported biocatalysts. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 194–203, 2013.
- BONIELLO, C. et al. Intraparticle concentration gradients for substrate and acidic product in immobilized cephalosporin C amidase and their dependencies on carrier characteristics and reaction parameters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 528–540, 2010.
- BONZOM, C. et al. Glycosylation influences activity, stability and immobilization of the feruloyl esterase 1a from *Myceliophthora thermophila*. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019.
- BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66–80, 2020.
- BOZA, J. J. et al. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 10, p. 1978–1986, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos**. Brasília: 1981.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 370 de 04 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão do Citrato de Sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 52, 08 set. 1997.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Resolve: Ficam estabelecidos como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p.9, n. 134, 13 jul. de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, edição 230, p. 9, 30 nov. 2018.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: **Immobilization of enzymes and cells**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 15-31.
- BU, G. et al. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. **Food and Agricultural Immunology**, v. 20, n. 3, p. 195–206, 2009.
- BU, G. et al. Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions. **Food and Agricultural Immunology**, v. 21, n. 2, p.

143–156, 2010.

BU, G. et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review **Dairy Science and Technology**, v. 93, n. 3, p. 211–223, 2013.

CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.

CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387–394, 2003.

CARVALHO, N. C. DE et al. Physicochemical characteristics and antigenicity of whey protein hydrolysates obtained with and without pH control. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 24–34, 2017.

CHANG, M. Y.; JUANG, R. S. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 93–98, 2007.

CHICÓN, R. et al. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 367–376, 2008.

CHIKHI, A. et al. Evaluation of the efficiency of hydrolyzed whey formula to prevent cow's milk allergy in the BALB/c mouse model. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 30, n. 3, p. 370–377, 2019.

DAL MAGRO, L. et al. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 234–243, 2019.

DAL MAGRO, L. et al. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, n. August 2019, p. 109397, 2020.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2018.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2012.

DE LIMA, L. N. et al. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118–123, 2013.

DE OLIVEIRA, S. M. et al. Covalent immobilization-stabilization of β -1,4-endoxyranases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 64, n. August 2017, p. 170–176, 2018.

DI COSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018.

EHN, B. M. et al. Modification of IgE binding to β -lactoglobulin by fermentation and Proteolysis of cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p.

3743–3748, 2005.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 64–72, 2007.

EL-HOUSSEINY, L.; IBRAHIM, M. K.; SELLINGER, R. Th2 related markers in milk allergic inflammatory mice model, versus OVA. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 453–461, 2017.

EL MECHERFI, K. E. et al. Peptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin under microwave treatment reduces its allergenicity in an *ex vivo* murine allergy model. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 356–364, 2015.

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, n. 5, p. 2065–2082, 2015.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 6, p. 517–523, 1995.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Coating of Soluble and Immobilized Enzymes with Ionic Polymers: Full Stabilization of the Quaternary Structure of Multimeric Enzymes. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 742–747, 2009.

FERREIRA, L. et al. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 4–6, p. 189–199, 2003.

FLOM, J. D.; SICHERER, S. H. Epidemiology of cow 's milk allergy. **Nutrients**, v. 11, n. 1051, p. 2–14, 2019.

FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 117–129, 2013.

GALVÃO, C. M. A. et al. Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and α -chymotrypsin. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 761–776, 2001.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859–870, 2010.

GOETTIG, P. Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1–24, 2016.

GOLKAR, A.; MILANI, J. M.; VASILJEVIC, T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 159–172, 2019.

GOMES-SANTOS, A. C. et al. Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to β -lactoglobulin in sensitized mice. **Cellular Immunology**, v. 298, n. 1–2, p. 47–53, 2015.

GRAVERSEN, K. B. et al. Cow's milk allergy prevention and treatment by heat-treated whey—A study in Brown Norway rats. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 50, n. 6, p. 708–721, 2020.

- GRAZU, V. et al. Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 960–966, 2006.
- GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.
- GUPTA, B. B. Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 282, n. C, p. 463–475, 1983.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.
- HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.
- HOSOKI, K. et al. Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–50, 2016.
- HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 12, p. 1393–1399, 1959.
- HUSSAIN, F. et al. Further stabilization of alcalase immobilized on glyoxyl supports: Amination plus modification with glutaraldehyde. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.
- ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 1999.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed., 1ª Ed. Digital. São Paulo, 2008. 1020 p.
- IZQUIERDO, F. J. et al. Effects of combined microwave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 9, p. 918–922, 2008.
- JAVIER IZQUIERDO, F. et al. Effects of high pressure and microwave on pronase and α -chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 713–719, 2005.
- KAMNERDPETCH, C. et al. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 508–514, 2006.
- KIEWIET, M. B. G. et al. Immunomodulating properties of protein hydrolysates for application in cow's milk allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 26, n. 3, p. 206–217, 2015.
- KIEWIET, M. B. G. et al. Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 11, p. 1–12, 2017.
- KLEBER, N. et al. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 2, p. 105–110, 2004.
- KLEBER, N.; MAIER, S.; HINRICHS, J. Antigenic response of bovine β -lactoglobulin

influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 39–45, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

LI, Z. et al. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 151–160, 2014.

LINDE, G. A. et al. Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by α -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 814–818, 2009.

LINDE, G. A. et al. The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 187–192, 2010.

LIU, X.; LUO, Y.; LI, Z. Effects of pH, temperature, enzyme-to-substrate ratio and reaction time on the antigenicity of casein hydrolysates prepared by papain. **Food and Agricultural Immunology**, v. 23, n. 1, p. 69–82, 2012.

LOPES, L. A. et al. Glyoxyl-activated agarose as support for covalently link Novo-Pro D: Biocatalysts performance in the hydrolysis of casein. **Catalysts**, v. 10, n. 5, p. 6–8, 2020.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005a.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70–75, 2005b.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; GUISÁN, J. M.; BETANCOR, L. Glutaraldehyde-mediated protein immobilization. In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 33–41.

MALMIRI, H. J.; JAHANIAN, M. A. G.; BERENJIAN, A. Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 203–219, 2012.

MALUF, J. U. et al. Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 4, 2020.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 456–462, 2005.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MECHERFI, K. E. EL et al. Combined microwave and enzymatic treatments for β -lactoglobulin and bovine whey proteins and their effect on the IgE immunoreactivity. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 859–867, 2011.

MELTRETTER, J.; BECKER, C. M.; PISCHETSRIEDER, M. Identification and site-specific

relative quantification of β -lactoglobulin modifications in heated milk and dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5165–5171, 2008.

MENG, X. et al. Characterization of the potential allergenicity of irradiated bovine α -lactalbumin in a BALB/c mouse model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 402–410, 2016.

METCALFE, D. D. et al. Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. **World Allergy Organization Journal**, v. 9, n. 1, p. 7, 2016.

MICINSKIA, J. et al. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. **Polish Annals of Medicine**, v. 20, n. 1, p. 69–76, 2013.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.

MINTON, A. P. How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes? **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 14, p. 2863–2869, 2006.

MIRANDA, L. C. **Obtenção e Caracterização de Hidrolisados Enzimáticos de Proteínas do Farelo de Soja**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

MONACI, L. et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 149–179, 2006.

MONGE NETO, A. Á. et al. Interaction of peptides obtained from the enzymatic hydrolysis of soybean meal with cyclodextrins: an evaluation of bitterness reduction. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 59–69, 2017.

MOULD, A. W. et al. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 1064–1071, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 3, p. 177–184, 1980.

NAITO, K. et al. Binding analysis of bovine milk proteins, especially casein interactions and the interaction between α -casein and lactoferrin, using beads immobilised with zinc ion, poly-L-lysine or α -casein. **International Dairy Journal**, v. 105, p. 104690, 2020.

NOVOZYMES A/S. **Novo-Pro® D, Product Data Sheet**. 2007; 1–2.

NOVOZYMES A/S. **Proteases for biocatalysis for smarter chemical synthesis**. Jun. de 2016 - No. 2014-12715-04. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/pharma>>. Acesso em 05 de set. de 2020.

NOVOZYMES A/S. **Novo-Pro® D**. 2020. Disponível em: <<https://new.novozymes.com/food-beverages/animal-protein/novo-pro-d>>. Acesso em 05 de set. de 2020.

OSBON, Y.; KUMAR, M. Biocatalysis and strategies for enzyme improvement. **Biophysical Chemistry - Advance Applications**, 2020.

PEDROCHE, J. et al. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-

agarose gels: A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 711–718, 2002.

PEDROCHE, J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

PESCUMA, M. et al. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 487–492, 2011.

PESSATO, T. B. et al. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, v. 83, p. 112–120, 2016.

PINTO, G. A.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Remote engineering for a cheese whey biorefinery: An internet-based application for process design, economic analysis, monitoring, and control of multiple plant sites. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 69–78, 2009.

PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S. Cow milk protein allergy and lactose intolerance. **Current Science**, v. 118, n. 9, p. 1375, 2020.

PRONK, S.; LINDAHL, E.; KASSON, P. M. Dynamic heterogeneity controls diffusion and viscosity near biological interfaces. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2014.

PUNNONEN, J.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6 I, p. 792–801, 1997.

REGAN, D. L.; LILLY, M. D.; DUNNILL, P. Influence of intraparticle diffusional limitation on the observed kinetics of immobilized enzymes and on catalyst design. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, n. 8, p. 1081–1093, 1974.

ROBINSON, M. W.; HARMON, C.; O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 267–276, 2016.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. et al. Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: Coupling genetic modification and physicochemical tools. **RSC Advances**, v. 4, n. 72, p. 38350–38374, 2014.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216–2238, 2011.

ROJAS, M. J. et al. Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 202–210, 2014.

ROSA, L. O. L. DA et al. A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of

- commercial proteases. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 31–36, 2018.
- RUEDA, N. et al. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Chemical Record**, v. 16, n. 3, p. 1436–1455, 2016.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717–723, 1987.
- SALDANHA, J. C. S. et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 6, p. 809–816, 2004.
- SANCHEZ, A. et al. Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures. **RSC Advances**, v. 6, n. 33, p. 27329–27334, 2016.
- SANTOS, J. C. S. D. et al. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015.
- SGARBIERI, V. C. Revisão : Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian journal of food technology**, v. 8, n. 1, p. 43–56, 2005.
- SHEN, L.; CHEN, Z. Critical review of the impact of tortuosity on diffusion. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 14, p. 3748–3755, 2007.
- SIAR, E. H. et al. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. **Process Biochemistry**, v. 58, n. April, p. 98–104, 2017.
- SIAR, E. H. et al. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. **Catalysts**, v. 8, n. 4, 2018.
- SIAR, E. H. et al. Amination of ficin extract to improve its immobilization on glyoxyl-agarose: Improved stability and activity versus casein. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 412–419, 2019.
- SIAR, E. H. et al. Use of glyoxyl-agarose immobilized ficin extract in milk coagulation: Unexpected importance of the ficin loading on the biocatalysts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 419–426, 2020.
- SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.
- SNYDER, S. L.; SOBOCINSKI, P. Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. **Analytical Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 284–288, 1975.
- SOUSA JR, R. et al. Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 147–153, jun. 2004.
- SPELLMAN, D.; O’CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 440–446, 2009.
- STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S73–S80, 2010.
- SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial

- biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211–220, 2006.
- TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; MENG, S. Comparing the kinetics of the hydrolysis of by-product from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet processing by eight proteases. **LWT**, v. 111, n. February, p. 809–820, 2019.
- TARDIOLI, P. W. **Produção de Ciclodextrinas em Reator de Leite Fluidizado com a Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase Imobilizada**. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.
- TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 352–360, 2003a.
- TARDIOLI, P. W. et al. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase a derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 565–574, 2003b.
- TARDIOLI, P. W. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro de Queijo Usando Carboxipeptidase A e Alcalase® Imobilizadas Multipontualmente em Agarose**. 2003. 204 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- TARDIOLI, P. W. et al. Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase immobilized on 10% glyoxyl-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 555–564, 2005.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.
- TAVANO, O. L. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.
- TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: Methods and applications. **Biocatalysis - From Discovery to Application**, v. 200, p. 95–126, 1999.
- TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K. Cow's Milk Allergenicity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 16–26, 2014.
- TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 3–25, 2015.
- VAN ESCH, B. C. A. M. et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 3, p. 264–269, 2011.
- VAN HENGEL, A. J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 111–118, 2007.
- VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.
- VESCOVI, V. et al. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055–2066, 2016.
- VIEIRA, D. C. et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54–64, 2013.

- VILLAS-BOAS, M. B. et al. Epitopes resistance to the simulated gastrointestinal digestion of β -lactoglobulin submitted to two-step enzymatic modification. **Food Research International**, v. 72, p. 191–197, 2015.
- VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 36, p. 7461–7490, 2017.
- WAGLAY, A.; KARBOUNE, S. Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 420–429, 2016.
- WASERMAN, S.; BÉGIN, P.; WATSON, W. IgE-mediated food allergy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. s2, p. 1–11, 2018.
- WILSON, L. et al. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 750–755, 2006.
- YANG, A. et al. Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 199–206, 2017.
- YUST, M. DEL M. et al. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1212–1217, 15 out. 2010.
- ZAAK, H. et al. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, n. July, p. 67–74, 2017.
- ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.
- ZELLAL, D. et al. Allergenic changes in β -lactoglobulin induced by microwave irradiation under different pH conditions. **Food and Agricultural Immunology**, v. 22, n. 4, p. 355–363, 2011.
- ZHAO, X. S. et al. Immobilizing catalysts on porous materials. **Materials Today**, v. 9, n. 3, p. 32–39, 2006.
- ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.
- ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014.
- ŽUŽA, M. G. et al. Design and characterization of alcalase–chitosan conjugates as potential biocatalysts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1713–1723, 2017.

9. APÊNDICE A

Tabela 9.1 - Parâmetros de imobilização da Novo-Pro® D (NPD) e Alcalase (ALC) dialisadas imobilizadas em agarose-glioxil (20 °C, 24 h de reação, pH 10,0, e carga enzimática de 0,7 mg/g de suporte).

Enzima	Substrato	Atividade Oferecida (U/g suporte)	RI ¹ (%)	AR ² (%)	Atividade da Enzima Imobilizada (U/g suporte)
NPD Dialisada	BTEE	7,55	91,52 ± 0,18	79,91 ± 0,43	5,85 ± 0,02
	Caseína	21,84	91,52	28,79	5,75
Alcalase Dialisada	BTEE	8,9	97,29 ± 1,11	74,3 ± 0,71	6,42 ± 0,13
	Caseína	18,36	97,29	41,04	7,34

¹ Rendimento de Imobilização de Enzima

² Atividade Recuperada

Tabela 9.2 – Parâmetros do modelo de Sadana-Henley ajustados aos dados experimentais da inativação térmica da NPD e ALC imobilizadas, dialisadas e não dialisadas (50°C e pH 6,5). Fatores de estabilização (FE) foram calculados como a razão entre a meia vida da “enzima imobilizada/enzima livre dialisada”. As meias-vidas da ALcalase e NPD livres foram (11 e 10,2 h) e (9,2 e 9,0 h) não dialisada e dialisada, respectivamente.

Biocatalisador	a ₁	k ₁	R ²	t _{1/2} (h)	FE
ALC AgGly	0,48499	0,01133	0,91	312,0	30,61
ALC AgGly (dialisada)	0,44805	0,0139	0,94	170,0	16,68
NPD AgGly	0,4919	0,02112	0,89	196,0	21,81
NPD AgGly (dialisada)	0,47691	0,025	0,83	124,8	13,89

Tabela 9.3 - Perfil peptídico de diferentes hidrolisados de leite integral (GH 2,5; 5 e 8%) usando como catalisador Novo-Pro® D solúvel (NPD) [E =0,13 U/mL reator]; Novo-Pro® D solúvel dialisada (NPD DIAL) [E =0,13 U/mL reator]; NPD imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD) [E =0,85 U/mL reator; derivado 211,6U/g gel]; NPD dialisada imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-NPD-DIAL) [E =0,85 U/mL reator; derivado 237,9U/g gel]; Alcalase® solúvel (ALC) [E =0,13 U/mL reator]; Alcalase® solúvel dialisada (ALC DIAL) [E =0,13 U/mL reator]; ALC imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC) [E =0,85 U/mL reator; derivado 209 U/g gel]; ALC dialisada imobilizada em agarose-glioxil (AgGly-ALC-DIAL) [E =0,85 U/mL reator; derivado 252,7 U/g gel].

Amostra	Composição (%) por faixa de massa molecular				
	>66 kDa	66 -29 kDa	29-12,4 kDa	12,4-6,5 kDa	<6,5 kDa
NPD GH 2,5%		5,55 ± 1,22		12,63 ± 0,52	81,83 ± 0,70
NPD GH 5%		5,11 ± 0,24		12,74 ± 0,45	82,17 ± 0,21
NPD GH 8%		2,12 ± 2,12		15,82 ± 1,51	82,06 ± 0,61
NPD DIAL GH 2,5%		8,14 ± 0,03		8,99 ± 0,90	82,88 ± 0,93
NPD DIAL GH 5%	0,32 ± 0,01	7,29 ± 0,14		13,73 ± 0,20	78,68 ± 0,33
NPD DIAL GH 8%		2,60 ± 2,60		16,83 ± 2,61	87,69 ± 7,11
AgGly-NPD GH 2,5%	31,34 ± 0,53	9,05 ± 0,54	2,19 ± 1,02	4,85 ± 0,10	52,59 ± 0,91
AgGly-NPD GH 5%	25,24 ± 0,11	7,41 ± 0,08		7,07 ± 0,21	60,29 ± 0,17
NPD IMB GH 8%	16,03 ± 0,37	3,81 ± 0,08		8,75 ± 0,37	71,42 ± 0,06
AgGly-NPD-DIAL GH 2,5%	29,91 ± 0,77	16,76 ± 2,67		5,56 ± 0,00	50,55 ± 0,66
AgGly-NPD-DIAL GH 5%	21,81 ± 0,34	8,59 ± 0,30		8,01 ± 0,01	61,61 ± 0,62
AgGly-NPD-DIAL GH 8%	15,53 ± 0,93	4,39 ± 0,55		8,60 ± 0,24	71,49 ± 1,23
ALC GH 2,5%	0,27 ± 0,05	9,52 ± 0,43		16,30 ± 1,66	73,93 ± 2,04
ALC GH 5%	0,05 ± 0,05		5,89 ± 0,00	17,30 ± 0,05	76,77 ± 0,02
ALC GH 8%	0,04 ± 0,04			19,89 ± 1,07	80,08 ± 1,10
ALC DIAL GH 2,5%	0,33 ± 0,07		8,12 ± 0,76	21,54 ± 0,88	70,00 ± 1,72
ALC DIAL GH 5%			5,39 ± 0,27	18,97 ± 1,13	75,64 ± 0,86
ALC DIAL GH 8%				21,89 ± 0,42	78,11 ± 0,41
AgGly-ALC GH 2,5%	30,70 ± 1,84	10,55 ± 0,15	5,10 ± 0,16	7,27 ± 0,54	46,39 ± 0,99
AgGly-ALC GH 5%	24,50 ± 0,91	7,55 ± 0,46		10,58 ± 0,32	57,38 ± 1,69
AgGly-ALC GH 8%	13,74 ± 0,02	0,61 ± 0,02	3,53 ± 0,09	9,22 ± 0,14	72,90 ± 0,04
AgGly-ALC-DIAL GH 2,5%	32,95 ± 1,21	10,88 ± 0,18	12,68 ± 0,19		43,50 ± 0,84
AgGly-ALC-DIAL GH 5%	24,51 ± 0,08	7,42 ± 0,04		10,84 ± 0,08	57,24 ± 0,04
AgGly-ALC-DIAL GH 8%	14,70 ± 1,17	3,58 ± 0,73		9,68 ± 0,04	72,05 ± 1,85

10. APÊNDICE B

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Hidrólise proteolítica controlada de leite de vaca com enzimas imobilizadas para redução dos fatores alergênicos", protocolada sob o CEUA nº 7214200917, sob a responsabilidade de **Paula Kern Novelli e equipe; Paula Kern Novelli; Fernanda de Freitas Anibal; Laiane Antunes Lopes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/12/2017.

We certify that the proposal "Controlled proteolytic hydrolysis of cow milk with immobilized enzymes for allergenic reduction", utilizing 72 Isogenic rats (72 females), protocol number CEUA 7214200917, under the responsibility of **Paula Kern Novelli and team; Paula Kern Novelli; Fernanda de Freitas Anibal; Laiane Antunes Lopes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 12/18/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **03/2018**

Área: **Morfologia E Patologia**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 6 semanas**

N: **72**

Linhagem: **Balb/C**

Peso: **15 a 18 g**

Resumo: A hipersensibilidade às proteínas do leite de vaca é uma das principais causas de alergias alimentares, as quais afetam principalmente crianças. O leite de vaca contém mais de 20 proteínas com potencial alergênico já descrito, sendo que alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina são as mais importantes, em especial a segunda, pois não existe no leite humano. Diversos trabalhos reportam que hidrólise parcial dessas proteínas reduz seu potencial alergênico, mas nenhum hidrolisando proteínas diretamente no leite. O uso de enzimas imobilizadas covalentemente a suportes insolúveis permite sua reutilização e fácil separação do produto, com redução dos custos do processo. Nesse cenário, este estudo tem como objetivo investigar a viabilidade técnica da geração de um leite com potencial alergênico reduzido, através da hidrólise das principais proteínas alergênicas, mantendo suas características físicas e organolépticas e qualidades adequadas para consumo, usando endoprotease comercial Novo Pró-D® imobilizada em agarose. Estudos preliminares realizados com enzima solúvel mostraram produção de leite com sensível redução do peso molecular de suas proteínas e manutenção de suas características visuais, uma indicação, portanto, de viabilidade desta proposta. Neste estudo, se pretende gerar produtos com tamanho controlado de peptídeos para serem submetidos a testes in vivo. Confirmada a redução da alergenicidade pela hidrólise protéica, novos processos poderão ser estudados usando-se, inclusive, outras endoproteases e protocolos de imobilização.

Local do experimento: Biotério de experimentação do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São Carlos, 19 de dezembro de 2017

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos