



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Co-imobilização de β -galactosidase e lipase em filmes de blenda
de gelatina-carboximetil celulose utilizados como componente de
embalagem ativa para produtos lácteos**

Indira Sardinha Caló Esteves

Salvador

2024

INDIRA SARDINHA CALÓ ESTEVES

Co-imobilização de β -galactosidase e lipase em filmes de blenda de gelatina-carboximetil celulose utilizados como componente de embalagem ativa para produtos lácteos

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Mamede José

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Rigoli

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Geany Peruch Camilloto

Linha de Pesquisa: Materiais e Polímeros

Salvador

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Bernadete
Sinay Neves, Escola Politécnica – UFBA.

E79 Esteves, Indira Sardinha Caló.

Co-imobilização de β -galactosidase e lipase em filmes de blenda de gelatina-carboximetil celulose utilizados como componente de embalagem ativa para produtos lácteos / Indira Sardinha Caló Esteves. – Salvador, 2024.

115f.: il. color.

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Mamede José.

Coorientadoras: Profa. Dra. Isabel Cristina Rigoli.

Profa. Dra. Geany Peruch Camilloto.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, 2024.

1. Biopolímeros. 2. β -galactosidase. 3. Lipase. 4. Gelatina. 5. Carboximetil celulose. I. José, Nádia Mamede. II. Rigoli, Isabel Cristina. III. Camilloto, Geany Peruch. IV. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDD: 620.192



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

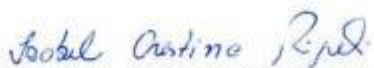


A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “**CO-MOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E LIPASE EM FILMES DE BLEND A DE GELATINA-CARBOXIMETIL CELULOSE UTILIZADOS COMO COMPONENTE DE EMBALAGEM ATIVA PARA PRODUTOS LÁCTEOS.**” de **INDIRA SARDINHA CALÓ ESTEVES** como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Salvador, 18 de outubro de 2024.

Comissão Examinadora:


PROFA. DRA. NADIA MAMEDE JOSÉ – UFBA
ORIENTADORA


PROFA. DRA. ISABEL CRISTINA RIGOLI
COORDINADORA


PROFA. DRA. GEANY PERUCH CAMILLOTO - UEFS
COORDINADORA

Programa de Pós-graduação em Eng^a Química - UFBA - Escola Politécnica - UFBA
Rua Aristides Novis, nº 2 - 2º Andar - Federação
CEP: 40.210-630 Salvador - Bahia
<http://www.ppeq.ufba.br> - E-mail: ppeq@ufba.br Tel. 71-3283-9809 Fax.3283-9810




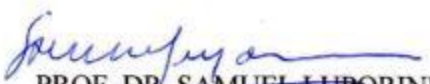
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA




PROFA. DRA. JÂNIA BETÂNIA ALVES DA SILVA
Examinadora Interna


PROF. DR. LUCAS GUIMARÃES CARDOSO,
Examinador Interno


PROF. DR. GUILHERME AUGUSTO FERREIRA
DEPTO FÍSICO-QUÍMICA - UFBA
Examinador Externo


PROF. DR. SAMUEL LUPERINI
DEPTO ENG. QUÍMICA - UFBA
Examinador Externo

*Dedico à minha mãe, meu marido e minha
filha, que foram o meu alicerce em toda a
caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai Amado, que é a minha fonte de vida. Sem Ele eu não chegaria até aqui! Só Ele sabe o quanto precisei do seu colo e da sua força e eu senti o seu cuidado, proteção e ajuda a todo o tempo. Obrigada, Pai!

A minha orientadora Nádia Mamede pela oportunidade e confiança e as minhas co-orientadoras Isabel Rigoli e Geany Peruch, por todas as colaborações e amizade.

Ao meu marido Esteves por todo apoio, parceria, paciência para entender os momentos de ausência, por todo amor e cuidado. E ao nosso maior tesouro, nossa filha Bianca, que sempre me carrega de força com o seu sorriso e abraço. Eu amo vocês!

A minha mãe, meu alicerce e melhor amiga, que sempre faz do meu sonho o seu e quem me inspira a dar sempre o meu melhor!

Aos meus familiares em especial a Gustavo, minha avó Josete, Laura e ao meu pai Luiz, por todo apoio e cuidado.

A Geisa por todo cuidado e dedicação a minha filha nos momentos em que estive ausente.

Aos meus amigos e colegas de pesquisa Patrik, Luan, Juscivaldo e Ivo pela parceria e por tornaram os dias mais leves e em especial a Iluska por nossa conexão, só nós sabemos o quanto uma foi essencial para a vida da outra nesta jornada.

Ao professor Humberto pela disponibilidade e questionamentos.

Aos meus pastores, Emerson e Letícia, por todos os ensinamentos, direções e pelas orações sobre a minha vida e da minha família. Vocês são bênçãos de Deus para nós!

A CAPES pelo apoio financeiro concedido.

Ao PPEQ e UFBA pela oportunidade.

“O SENHOR protegerá a tua vida contra todos os males! O Senhor o guarda em tudo que você faz, agora e sempre.”

Salmos 121:7-8 – Bíblia Sagrada

RESUMO

O consumo de lácteos enfrenta desafios atribuídos a digestão e absorção geral, como intolerância à lactose e níveis elevados de gordura saturada e açúcar, levando a indústria ao desenvolvimento de processos adequados à produção de alimentos com características específicas. Com isso, β -galactosidase (3% m/m) e lipase (2% m/m) foram co-imobilizadas em blendas poliméricas de Gelatina (GEL) e Carboximetil celulose (CMC) preparadas com diferentes proporções de GEL:CMC (v/v): A (0:100), B (25:75), C (50:50), D (75:25) e E (100:0). A compatibilidade dos polímeros e a interação com as enzimas adicionadas foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por meio da técnica de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Testes mecânicos foram realizados para avaliar a resistência à tração e as propriedades de barreira foram definidas pelo teste de permeabilidade ao vapor de água (PVA). Propriedades térmicas foram definidas pelos testes de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG e DTG) e a cristalinidade relativa foi obtida por difratometria de raios-x (DRX). Testes enzimáticos colorimétricos foram realizados para avaliar a hidrólise de lactose e triglicerídeos e a eficiência dos filmes ativos foi avaliada por FTIR-ATR. Como resultado, os filmes apresentaram estrutura regular e uniforme, maior barreira a luz UV para filmes com maior teor de GEL em sua composição, entretanto, formaram filmes menos transparentes. A adição de CMC conferiu ao filme uma maior resistência mecânica, apresentaram uma resistência à tração 82,8% superior aos filmes de GEL, a adição de enzimas não provocou efeito sob a resistência mecânica, porém aumentou o alongamento dos filmes. A TG mostrou que a CMC traz maior estabilidade térmica para os filmes ativos e uma maior massa residual, além de maior interação das enzimas com os grupos volumosos da CMC, confirmados por DSC e uma cristalinidade superior em até 5,8% em relação ao filme de Gel. A CMC apresentou-se como o polímero mais hidrofílico, com conteúdo de umidade superior de 57,7% e PVA 100% superior em relação a GEL. Os filmes ativos apresentaram maior atividade enzimática comparada com atividade da enzima em sua forma livre, favorecendo o processo de imobilização das enzimas nos filmes de GEL:CMC, aumentando a segurança do processo e reduzindo custos operacionais.

Palavras chaves: β -galactosidase; Lipase; Gelatina; Carboximetil celulose; Co-imobilização de enzimas.

ABSTRACT

Dairy consumption faces challenges related to digestion and general absorption, such as lactose intolerance and high levels of saturated fat and sugar, leading the industry to develop processes suitable for the production of foods with specific characteristics. Thus, β -galactosidase (3% w/w) and lipase (2% w/w) were co-immobilized in polymeric blends of Gelatin (GEL) and Carboxymethyl cellulose (CMC) prepared with different GEL:CMC ratios (v/v): A (0:100), B (25:75), C (50:50), D (75:25) and E (100:0). The compatibility of the polymers and the interaction with the added enzymes were evaluated through scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy using the attenuated total reflection technique (FTIR-ATR). Mechanical tests were performed to evaluate the tensile strength and the barrier properties were defined by the water vapor permeability test (WVP). Thermal properties were defined by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG and DTG) tests and the relative crystallinity was obtained by X-ray diffractometry (DRX). Colorimetric enzymatic tests were performed to evaluate the hydrolysis of lactose and triglycerides and the efficiency of the active films was evaluated by FTIR-ATR. As a result, the films presented regular and uniform structure, greater barrier to UV light for films with higher GEL content in their composition, however, they formed less transparent films. The addition of CMC gave the film greater mechanical strength, presenting a tensile strength 82.8% higher than the GEL films, the addition of enzymes had no effect on the mechanical strength, but increased the elongation of the films. TG showed that CMC provides greater thermal stability to the active films and a higher residual mass, in addition to greater interaction of the enzymes with the bulky groups of CMC, confirmed by DSC and a higher crystallinity of up to 5.8% compared to the Gel film. CMC was the most hydrophilic polymer, with a higher moisture content of 57.7% and PVA 100% higher compared to GEL. The active films presented greater enzymatic activity compared to the activity of the enzyme in its free form, favoring the process of immobilization of the enzymes in the GEL:CMC films, increasing process safety and reducing operating costs.

Keywords: β -galactosidase; Lipase; Gelatin; Carboxymethyl cellulose; Enzyme Co-immobilization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação da análise SWOT da co-imobilização enzimática em filmes baseados em GEL/CMC para uso em produtos lácteos.....	3
Figura 2. Mecanismo de liberação controlada por intumescimento da matriz polimérica.....	9
Figura 3. Mecanismo de liberação controlada por erosão do polímero.....	9
Figura 4. Mecanismo de liberação controlada do sistema reservatório.....	10
Figura 5. Biopolímeros de ocorrência natural com utilização em filmes e revestimentos biodegradáveis.....	12
Figura 6. Estrutura da fibra de colágeno	14
Figura 7. Representação da obtenção de GEL a partir da hidrólise do colágeno.....	15
Figura 8. Renaturação parcial do colágeno	16
Figura 9. Principais aminoácidos que compõe a GEL.....	16
Figura 10. Estrutura química básica da GEL.....	17
Figura 11. Estrutura da celulose e seus principais derivados.....	19
Figura 12. Esquema da reação de formação da CMC.....	19
Figura 13. Estrutura química do sorbitol.....	21
Figura 14. Síntese de obtenção do D-sorbitol.....	22
Figura 15. Métodos de imobilização de enzimas.....	23
Figura 16. Hidrólise enzimática da lactose e formação de galactose e glicose.....	26
Figura 17. Hidrólise enzimática de triglicerídeos e formação de ácido graxo e glicerol	29
Figura 18. Ativação interfacial da lipase.....	30
Figura 19. Esquema simplificado da reação simultânea de hidrólise da lactose e transgalactosilação.....	34
Figura 20. Estrutura geral de uma molécula de triacilglicerol (TAG).....	36
Figura 21. Fluxograma das metodologias utilizadas para preparo e caracterização das amostras.....	38
Figura 22. Solução filmogênica GEL e CMC.....	39
Figura 23. Solução filmogênicas das blendas GEL:CMC.....	40
Figura 24. Ilustração do método <i>casting</i> para produção dos filmes.....	41
Figura 25. Difratoograma de Raios-X da GEL, explicativo do método de determinação de Índice de Cristalinidade Relativa pelo cálculo de áreas.....	46

Figura 26. Difratoograma de Raios-X da CMC, explicativo do método de determinação de Índice de Cristalinidade Relativa pelo cálculo da intensidade de picos.	47
Figura 27. Preparo das amostras para o teste de hidrólise.....	50
Figura 28. Teste de hidrólise dos triglicerídeos.....	52
Figura 29. Efeito da adição de gelatina na transparência dos filmes.....	54
Figura 30. Filmes depositados nas placas de Petri.....	55
Figura 31. MEV da superfície e seção transversal dos filmes controles Ac, Cc e Ec e dos filmes ativos Ba, Ca e Da.....	56
Figura 32. Permeação de água através da matriz polimérica dos filmes ativos para a sílica gel nas diferentes formulações testados.....	63
Figura 33. TGA e DTG dos precursores dos filmes poliméricos: Sorbitol, CMC, GEL e lipase.....	66
Figura 34. TGA dos filmes controles (a) e filmes ativos (b).....	67
Figura 35. Deconvolução das curvas DTG dos filmes controles e ativos. (a) A(0GEL:100CMC); (b) B(25GEL:75CMC); (c) C(50GEL:50CMC); (d) D(75GEL:50CMC); (e) E (100GEL:0CMC).....	69
Figura 36. Curva DSC dos filmes GEL:CMC controles (a) e ativos (b).....	72
Figura 37. Difração de raios-X do sorbitol, GEL e CMC.....	74
Figura 38. Difração de raios X dos filmes GEL:CMC controles.....	74
Figura 39. Difração de raios X dos filmes GEL:CMC ativos.....	77
Figura 40. (a) Espectros FTIR para o sorbitol, GEL em pó, CMC em pó, lipase e lactase; (b) filmes controle GEL-CMC; (c) filmes ativos – GEL:CMC. Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2%(m/v) lipase.....	79
Figura 41. Resistência máxima à tração dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%)	82
Figura 42. Alongamento dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%)	83
Figura 43. Módulo de elasticidade dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%)	84
Figura 44. Esquema das reações envolvidas no método DNS.....	86
Figura 45. Curva padrão da concentração de glicose (mg/mL) em relação a absorbância pelo método DNS.....	86
Figura 46. Variação colorimétrica da reação do ácido DNS com diferentes concentrações de glicose para elaboração da curva padrão.....	87

Figura 47. Hidrólise da lactose presente na solução padrão de lactose 5% (m/v) por meio da β -Gal livre e dos filmes ativos em relação ao tempo de reação.....	88
Figura 48. Atividade enzimática específica para a β -Gal livre e filmes ativos na hidrólise de lactose.....	89
Figura 49. Estabilidade da β -Gal livre e dos filmes ativos após 150 dias de estocagem sob refrigeração.....	90
Figura 50. Teor de ácido graxo liberado pela hidrólise de triglicerídeos por meio da lipase livre e dos filmes ativos por tempo de reação.	91
Figura 51. Atividade enzimática específica para a lipase livre e filmes ativos na hidrólise de triglicerídeos.....	92
Figura 52. Estabilidade da lipase livre e dos filmes ativos após 150 dias de estocagem sob refrigeração.....	93
Figura 53. (a) FTIR-ATR para o creme de leite (CL) e CL zero lactose; CL em contato com os filmes ativos: (b) A (0GEL:100CMC:LL), (c) B (25GEL:75CMC:LL), (d) C (50:GEL:50CMC:LL), (e) D (75GEL:25CMC:LL) e E (100GEL:0CMC:LL). LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.....	94
Figura 54. (a) 3000 - 2800 cm^{-1} : Gordura B; (b) 1800-1700 cm^{-1} : Gordura A e (c) 3000-1700 cm^{-1} : Hidrólise da gordura e liberação de AG.....	95
Figura 55. 1700 - 900 cm^{-1} : Hidrólise da lactose.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de formação de filme com GEL e CMC.....	40
Tabela 2. Conteúdo de umidade nos filmes controle e ativos.....	57
Tabela 3. Valores de PVA para as formulações dos filmes controle e ativos de GEL:CMC	61
Tabela 4 Valores de transmissão de luz em comprimentos de onda selecionados dos filmes controles e ativos de GEL:CMC com diferentes formulações.....	64
Tabela 5. Transparência dos filmes controles e ativos de GEL:CMC com diferentes formulações.....	64
Tabela 6. Dados das TGs dos filmes controles e ativos de GEL:CMC.....	70
Tabela 7. Índice de cristalinidade relativa dos filmes (GEL:CMC) controles e ativos....	76
Tabela 8. Espessura média dos filmes GEL:CMC ativos e controles.....	81

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AG: Ácidos Graxos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATR: Reflexão Total Atenuada

CL: Creme de Leite

CLA: Ácido Linoleico Conjugado

CMC: Carboximetilcelulose

DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

DRX: Difração de Raios X

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

DTG: Derivada Termogravimétrica

EC: Comissão Enzimática

EL: Enzima Livre

FDA: Administração de alimentos e drogas

FTIR: Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier

GEL: Gelatina

GOS: Galacto-oligossacarídeos

GRAS: Geralmente considerado como seguro

GS: Grau de substituição

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

IC: Índice de Cristalinidade

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LL: Lipase e Lactase (β -Gal)

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

PVA: Permeabilidade ao Vapor de Água

RDC: Resolução de Diretoria Colegiada

SF: Solubilidade dos filmes

SLC: Sistemas de liberação controlada

sn: Numeração estereoespecífica

TAG: Triacilglicerol

TG: Termogravimetria

Tg: Temperatura de transição vítrea

Tm: Temperatura de fusão

TPVA: Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água

UHT: Ultra alta temperatura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 EMBALAGENS ATIVAS	6
3.2 BIOPOLÍMEROS	12
3.2.1 Gelatina	13
3.2.2 Carboximetil Celulose	18
3.2.3 Sorbitol	21
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	22
3.3.1 Lactase (β -Galactosidase)	26
3.3.2 Lipase	28
3.4 PRODUTOS LÁCTEOS	31
3.4.1 Transgalactosilação	33
3.4.2 Transformações na gordura do leite	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL	38
4.2 MÉTODOS	39
4.2.1 Preparação dos filmes	39
4.2.2 Medidas de espessura dos filmes	41
4.2.3 Solubilidade	42
4.2.4 Determinação do teor de umidade	42
4.2.5 Permeabilidade do vapor de água (PVA)	43
4.2.6 Transmissão de luz e transparência	44
4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.2.8 Termogravimetria (TG)	45
4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	45
4.2.10 Análise de difração de raios-X (DRX)	45
4.2.11 Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	47
4.2.12 Ensaio de tração	47
4.2.13 Hidrólise enzimática da lactose padrão	48
4.2.14 Hidrólise enzimática de lipídios	51

4.2.15 Análise da hidrólise enzimática por FTIR.....	52
4.2.16 Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 ASPECTOS VISUAIS E MICROGRAFIA DOS FILMES.....	54
5.2 CONTEÚDO DE UMIDADE E SOLUBILIDADE	57
5.4 TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA	63
5.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)	65
5.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	71
5.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)	73
5.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	77
5.9 ENSAIOS DE TRAÇÃO	80
5.10 HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	85
5.11 HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS	90
5.12 ANÁLISE DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA POR FTIR.....	93
6. CONCLUSÃO	98
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de embalagens ativas biodegradáveis tem recebido uma atenção crescente na indústria de alimentos, explicado pela procura dos consumidores por alimentos de alta qualidade, fatores de saúde e preocupações ambientais sobre a eliminação das embalagens de alimentos de materiais não renováveis (Zheng *et al.*, 2023).

O fator mais importante que afeta a biodegradabilidade dos materiais poliméricos é a estrutura química, que é responsável pela estabilidade, reatividade e hidrofilicidade. Alguns outros fatores importantes são propriedades físicas e mecânicas, massa molar, porosidade, elasticidade e estrutura molecular (cristalina e amorfa).

Neste contexto, os polímeros biodegradáveis podem ser inseridos como alternativa para substituir os plásticos convencionais, em aplicações tradicionais do mesmo, como em embalagens alimentícias, aumentando a segurança alimentar, a qualidade e a redução de resíduos. Além disso, materiais biodegradáveis como polissacarídeos, proteínas e lipídios, são versáteis como veículos para aditivos químicos ou biológicos, característicos dos filmes ativos para embalagens de alimentos (Yin *et al.*, 2023).

A gelatina (GEL) é uma proteína solúvel em água com uma ampla gama de propriedades e aplicações funcionais, incluindo capacidade de espessamento, formação de gel, estabilização, emulsificação, espumação, encapsulamento e formação de filmes não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (Azarifar *et al.*, 2019). No entanto, sua baixa resistência mecânica e permeabilidade ao vapor de água limitam sua aplicação como material de embalagem e como solução para resolver essas desvantagens a combinação da GEL com outros polímeros como amido, goma xantana e quitosana é uma abordagem relativamente promissora. Sendo assim, carboximetilcelulose (CMC) é uma boa opção para produzir filmes de mistura (blendas) devido a sua alta compatibilidade com proteínas, fácil disponibilidade e baixo custo comparado a outros polissacarídeos.

Revestimentos e filmes a base de polissacarídeos mostram uma boa barreira de oxigênio, barreira de aroma, juntamente com boas propriedades de resistência mecânica. A natureza polar dos grupos carboxílicos da CMC o torna altamente hidrofílico e solúvel em água (Ghadernazi *et al.*, 2019). A presença de grupos hidroxila livres favorece a

formação de ligações de hidrogênio com agentes ativos que podem ser adicionados para formar embalagens ativas, por exemplo, enzimas usadas em produtos lácteos.

A lactose é o principal açúcar no leite e nos produtos lácteos, mas os problemas digestivos limitam seu consumo por algumas pessoas. Em todo o mundo, cerca de 5,2 milhões de pessoas sofrem com intolerância à lactose (Pinto *et al.*, 2021). Como uma importante fonte de energia, a lactose é hidrolisada pela lactase (β -Galactosidase E.C.3.2.1.23) no trato intestinal. A intolerância à lactose é uma doença prevalente relacionada com a eficiência da β -galactosidase (β -Gal) em seres humanos, que compromete a capacidade de digerir e absorver lactose. O dissacarídeo, então, entra no trato intestinal não digerido e causa problemas como dor de estômago, inchaço, flatulência, náusea e diarreia (Lomer *et al.*, 2008).

Para prevenir os efeitos da intolerância a lactose duas soluções podem ser aplicadas: a hidrólise da lactose antes do consumo ou o uso de lactase para promover a hidrólise da lactose no trato gastrointestinal. A hidrólise da lactose, por meio de β -Gals, para o desenvolvimento de produtos sem lactose ou com baixo teor de lactose é um processo promissor. Contudo, é difícil utilizar esta enzima na forma livre, uma vez que é vulnerável a desnaturação, possui falta de estabilidade operacional a longo prazo, dificuldade de recuperação e sensibilidade a mudanças nas condições ambientais (Inanan, 2022). Dessa forma, a imobilização ou incorporação da lactase em materiais poliméricos é uma alternativa para melhorar a estabilidade e aplicabilidade da enzima, a fim de ampliar a oferta de produtos zero lactose, reduzir custos operacionais e prevenir contaminações cruzadas.

Além disso, o leite é rico em nutrientes, incluindo proteínas, gorduras, açúcares, minerais e vitaminas. Deve-se destacar que a gordura do leite possui características importantes e benéficas à saúde humana. Porém, entre os ácidos graxos constituintes há também grande porcentagem de ácidos graxos hipercolesterolêmicos (saturados de cadeia média) e o consumo excessivo desse tipo de gordura tem sido associado a doenças cardiovasculares (Santos *et al.*, 2020). As lipases (triacilglicerol acil hidrolases E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas para aplicação biotecnológica. Este grupo de enzimas catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula e promovendo a troca controlada de ácidos graxos entre as distintas moléculas de éster pelo processo de interesterificação, visando a obtenção de produtos com novas propriedades químicas e físicas e minimizando a formação de subprodutos, obtendo um leite com melhores propriedades nutracêuticas,

que podem proporcionar, além das necessidades nutricionais básicas, efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, como a prevenção e o tratamento de doenças (Paula *et al.*, 2018).

Neste estudo, foi incluído uma análise SWOT para melhor apresentar os pontos fortes e fracos, bem como as oportunidades e ameaças do desenvolvimento de filmes ativos para embalagens de produtos lácteos com a técnica de co-imobilização enzimática, bem como suas vantagens e desafios, Figura 1.

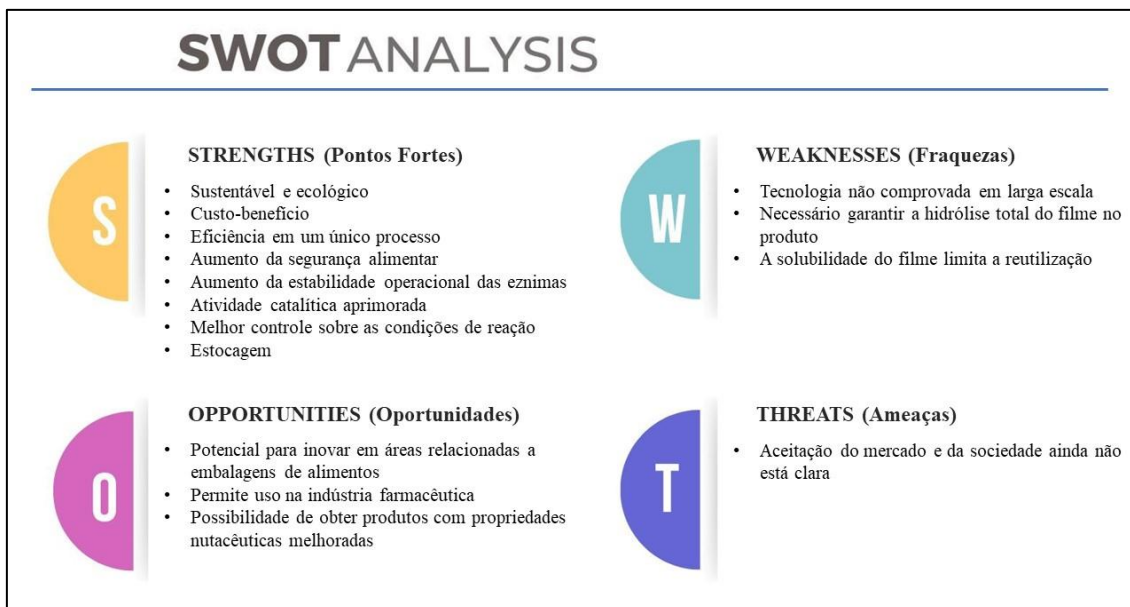


Figura 1. Apresentação da análise SWOT da co-imobilização enzimática em filmes baseados em GEL/CMC para uso em produtos lácteos. (Elaborado pelo autor, 2024)

O mercado de enzimas tem apresentado uma tendência de crescimento mundial, estimulado pela ampla aplicação de biocatalisadores em diversos campos. O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 13,11 bilhões em 2022 e estima-se que cresça 6,5% de 2023 a 2030, quando deverá atingir uma receita de US\$ 20,31 bilhões. Esses biocatalisadores são aplicados principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas, seguidos pelas indústrias de detergentes, ração animal, biocombustíveis, têxteis, celulose e papel, nutracêuticos, cuidados pessoais e cosméticos e tratamento de águas residuais (Gupta, 2024).

Para atender às diversas necessidades das indústrias, alternativas como misturas de polímeros podem ser utilizadas para obter materiais com propriedades melhoradas. Portanto, este trabalho propõe a associação de polímeros GEL e CMC para produzir filmes ativos com melhores propriedades físicas e mecânicas para a incorporação de enzimas lipase e β -Gal.

Assim, com o processo de co-imobilização das enzimas lipase e β -Gal, é possível obter produtos lácteos isentos de lactose, com teor reduzido de triglicerídeos e, por meio de embalagens ativas, potencial formação de galactooligossacarídeos (GOS) e ácidos graxos benéficos à saúde. Esse processo possibilitaria o consumo seguro de produtos lácteos isentos de lactose, ofereceria um produto com maiores benefícios à saúde e ampliaria as possibilidades desse mercado alimentício, pela facilidade do processo.

O uso de enzimas imobilizadas em sistemas industriais aumenta a viabilidade técnica e econômica. Para reações envolvendo enzimas imobilizadas, é crucial determinar a combinação ideal de enzima-suporte para atingir rendimentos e produtividade satisfatórios (Gennari *et al.*, 2024). Além disso, a tecnologia tem potencial para inovações envolvendo hidrogéis baseados em pontos de carbono, que podem ser usados para desenvolver biossensores e melhorar áreas como embalagens de alimentos, liberação controlada de medicamentos, detecção de doenças e outras aplicações diversas (Cui *et al.*, 2023).

As vantagens de usar filmes ativos como embalagens de alimentos podem beneficiar tanto o setor industrial quanto os consumidores. No campo industrial, esses filmes podem reduzir os custos operacionais e garantir maior segurança para o produto final, eliminando problemas de contaminação por traços de lactose causados por ineficiências na higienização da linha de produção. Além disso, a incorporação de lipase melhora as propriedades nutricionais do produto, aumentando seu valor agregado. Para os consumidores, esses filmes podem servir como uma alternativa aos comprimidos tipicamente tomados por aqueles que são intolerantes à lactose, pois a lactase incorporada aos filmes atuará diretamente nos produtos lácteos. Assim, a caracterização dos filmes ativos é essencial para entender o suporte de imobilização e seu impacto na eficiência enzimática, levando a melhores resultados e facilitando a expansão da produção e implementação de embalagens ativas na indústria.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir filmes poliméricos biodegradáveis a base de GEL e CMC como suporte para liberação controlada de enzimas (lipase e β -Gal) em embalagens para produtos lácteos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver blendas de GEL:CMC;
- Imobilizar as enzimas β -Gal e lipase em blendas GEL:CMC;
- Caracterizar os filmes ativos em relação às propriedades mecânicas, térmicas, de barreira e microscópica;
- Avaliar a interação polímero-polímero nos filmes e a interação polímero-enzima por meio de espectroscopia no infravermelho;
- Avaliar a taxa de hidrólise da lactose e de triglicerídeos dos filmes ativos e comparar com a enzima livre;
- Avaliar a hidrólise em produto lácteo;
- Obtenção de produtos com teor reduzido ou isento de lactose e a hidrólise de triglicerídeos presentes naturalmente no leite.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EMBALAGENS ATIVAS

Considerado como uma das “maiores invenções” do século XX, os plásticos, em sua maioria derivados de polímeros à base de combustíveis fósseis, estão sendo amplamente utilizados por causa do seu baixo custo de produção, alta estabilidade química, facilidade de processamento e versatilidade (Laskar & Kumar, 2019). Na indústria de embalagem de alimentos os plásticos convencionais têm uma presença significativa devido à sua natureza rígida, flexibilidade, excelentes propriedades de barreira e propriedades mecânicas, baixo custo e facilidade na produção (Muthuraj, Valerio & Mekonnen, 2022).

No entanto, a maioria possui um alto custo para reciclagem, além de serem difíceis de decompor por microrganismos, mantendo um longo ciclo de degradação e a liberação de componentes tóxicos à base de petróleo que causam problemas ambientais significativos para todo o mundo. De acordo com as estatísticas, estima-se que até 2050, a produção cumulativa global de plásticos será de 34 bilhões de toneladas e a produção anual de resíduos plásticos será de aproximadamente 300 milhões de toneladas (Williams & Rangel-Buitrago, 2022).

A indústria global de embalagens testemunhou uma mudança de paradigma nos últimos anos, impulsionada pela crescente preocupação dos consumidores com as questões ambientais e de saúde, com preferências em relação a alimentos pouco processados, produtos com maior prazo de validade e maior conveniência, que levou ao estudo e desenvolvimento de materiais de base biológica para as embalagens. De maneira significativa, o conhecimento do consumidor sobre a natureza não biodegradável dos plásticos convencionais e a lixiviação de produtos químicos para os alimentos é o principal fator que alimenta a expansão da indústria de embalagens de bioplásticos (Sid *et al.*, 2021). Embora que, em comparação com os plásticos convencionais, eles têm qualidades mecânicas e de barreiras de vapor de água inferiores, o que restringe seu uso industrial. Sendo assim, alternativas estão sendo criadas para o uso de polímeros biodegradáveis como material de embalagem, como combinações entre materiais com o objetivo de ampliar as qualidades da embalagem (Riahi *et al.*, 2024).

A ANVISA através da Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, define que embalagem para alimentos é o artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações (BRASIL, 2001).

De acordo com os princípios da legislação sobre embalagens para contato com alimentos, esta deve ser inerte, não liberar substância para o alimento que podem colocar em risco a saúde humana, além de não causar alterações sensoriais. Entretanto, os recentes desenvolvimentos na área de alimentos atribuem a embalagens novas funções que tem como princípio a interação intencional e benéfica com o alimento melhorando algumas de suas características, que são as embalagens ativas, ou comunicando-se com o consumidor a partir da interação com o ambiente interno e externo que está condicionado o alimento, as embalagens inteligentes (Lu *et al.*, 2024).

Embalagens ativas podem ser definidas como aquelas que, além de exercer a função básica de manter e proteger os alimentos, os constituintes subsidiários (aditivos) são deliberadamente incluídos no material ou no espaço-livre da embalagem, com o objetivo de obter melhorias dos aspectos sensoriais, de segurança, aumento de vida útil e qualidade dos alimentos. Devido à inclusão de sistemas funcionais, incluindo controle de temperatura, controle microbiológico, controle de qualidade, sistema de liberação, sistema de absorção e sistema de remoção, a embalagem ativa preserva os alimentos. O princípio básico subjacente à utilização de embalagens ativas depende tanto da incorporação de componentes particulares no polímero, como das características intrínsecas do próprio polímero usado como veículo de embalagem (Priyanca *et al.*, 2023).

Modificações de superfície, revestimentos, incorporação ou imobilização de agentes ativos no material de embalagem são maneiras de formar materiais de embalagens ativas. Dentre as inúmeras embalagens ativas, podem-se destacar os filmes antimicrobianos, as embalagens com atmosferas modificadas, absorvedores de oxigênio e de etileno, absorvedores e geradores de CO₂, reguladores de umidade, liberadores de aditivos, liberadores e/ou absorvedores de sabores e odores, indicadores de temperatura, incorporadores de enzimas e absorvedores de radiação UV (Guzman-Puyol, Benítez & Heredia-Guerrero, 2022; Deshmukh *et al.* 2022; Wang, Yue & Wang, 2023).

Em relação às embalagens ativas seu processo de tecnologia é implementada via (i) utilização de materiais de embalagem biodegradável para a liberação de componentes

bioativos, (ii) encapsulamento de bio ingredientes ativos nos alimentos ou nos materiais de embalagem, e (iii) introdução de materiais de embalagem exibindo atividade enzimática capaz de transformar alguns componentes dos alimentos para fornecer benefícios para a saúde. O desenvolvimento de tais sistemas de embalagem exerce efeito na promoção da saúde envolvendo o conceito de óleos vegetais, prebióticos, probióticos, vitaminas encapsuladas, fitoquímicos, alimentos sem lactose (incorporação enzimática), flavonoides biodisponíveis, e impulsiona a indústria de embalagens por causa da crescente consciência da saúde humana (Majid *et al.*, 2018)

As embalagens ativas podem ser projetadas na forma de filmes ou revestimentos comestíveis e apresentam em sua composição polímeros capazes de formar película e criar uma camada fina protetora na superfície dos alimentos sem interferir em suas propriedades organolépticas. Os requisitos de barreira desses filmes e revestimentos comestíveis dependem da sua aplicação e das propriedades do alimento a ser protegido. Quando destinado para o revestimento de frutas e vegetais frescos, por exemplo, devem ter baixa permeabilidade ao vapor de água para reduzir as taxas de dessecação, enquanto a permeabilidade ao oxigênio deve ser baixa o suficiente para retardar a respiração, mas não muito baixa para criar condições anaeróbicas favoráveis a produção de etanol e formação de sabores indesejados (Otoni *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2018).

As embalagens ativas com incorporação de enzimas vêm sendo utilizadas na área de liberação controlada de agente ativo (AA). Sistemas de liberação controlada (SLC), ou embalagens de liberação controlada, são, idealmente, uma nova geração de materiais de embalagens que disseminam um AA, por meio da difusão através da matriz polimérica, em taxas controladas, para melhorar a qualidade, a segurança e características sensoriais de uma ampla gama de alimentos durante o armazenamento (Yuan & Yam, 2024). Portanto, para atingir os índices de liberação adequados é importante conhecer as propriedades físico-químicas tanto do AA quanto do polímero utilizados para produção dos filmes.

De forma geral, os SLC podem ser divididos em sistemas matriciais e reservatórios. No sistema matricial o AA homogeneamente dissolvido ou disperso na matriz polimérica, é incapaz de difundir-se à extensão significativa dentro da matriz por causa de seu baixo coeficiente de difusão. A liberação depende da concentração do AA, da natureza dos componentes e da geometria do dispositivo. Quando a matriz polimérica é colocada em um meio quimicamente compatível, pode ocorrer a hidratação do material devido a absorção de líquido (penetrante) do meio e a progressiva gelificação das cadeias

poliméricas, formando uma camada de alta viscosidade na interface água-polímero. Essa camada viscosa aumenta de espessura à medida que a hidratação ou o intumescimento progride, Figura 2. Por consequência, a difusão do AA é determinada pela velocidade de intumescimento do polímero (Omrani, Naimi-Jamal & Far, 2022).

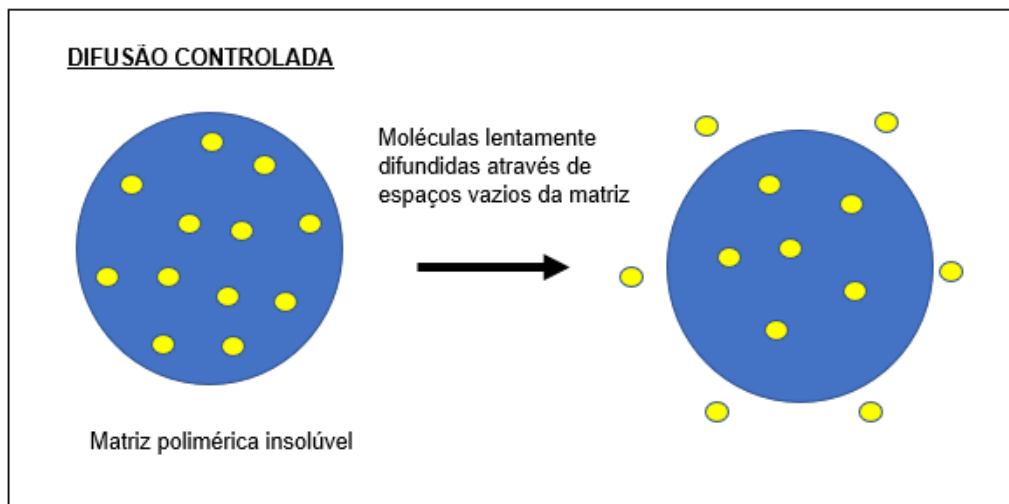


Figura 2. Mecanismo de liberação controlada por intumescimento da matriz polimérica. (Elaborado pelo autor, 2024)

O sistema também pode ser controlado pela erosão ou dissolução retardada, Figura 3, o AA é fisicamente imobilizado na matriz que passa pelo processo de erosão, na qual ocorre a liberação controlada. A taxa de erosão da matriz polimérica é controlada por sua capacidade de intumescimento e absorção de fluidos, bem como da sua afinidade química com o fluido do ambiente (Zheng *et al*, 2021).

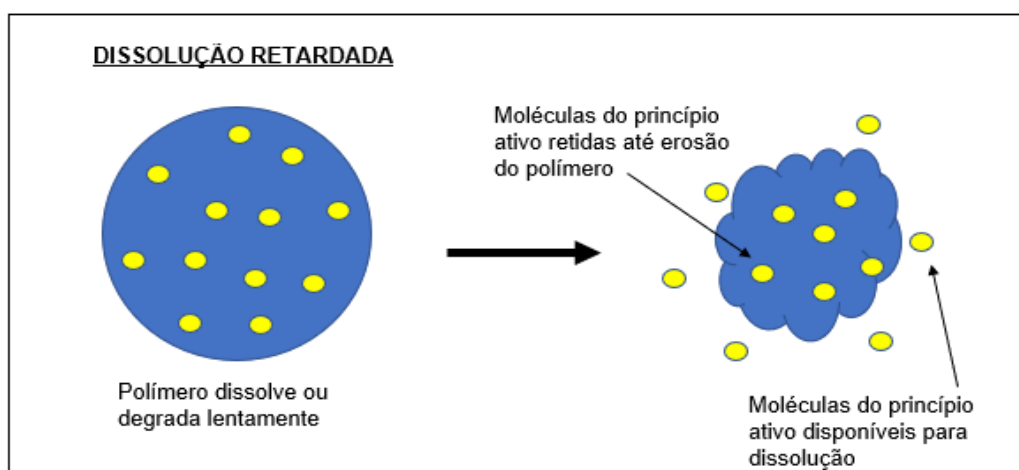


Figura 3. Mecanismo de liberação controlada por erosão do polímero. (Elaborado pelo autor, 2024)

Por outro lado, um sistema reservatório consiste na encapsulação do AA por um compartimento polimérico (barreira de controle de taxa). Este material polimérico irá controlar a permeação do AA para o meio externo, Figura 4, que pode ser microporoso, macroporoso ou não poroso; estes últimos sistemas barreiras são as mais usadas. Portanto, a porosidade, espessura, a cristalinidade do polímero, a afinidade entre o polímero e o AA podem afetar o perfil de permeação (Chen, *et al.*, 2024).

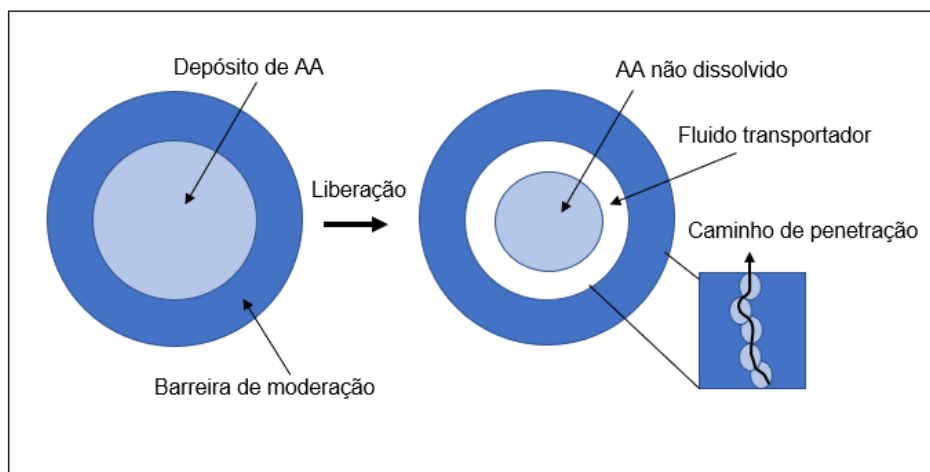


Figura 4. Mecanismo de liberação controlada do sistema reservatório.
(Elaborado pelo autor, 2024)

A difusão de um AA ocorre preferencialmente através das regiões amorfas do polímero, nas quais as cadeias encontram-se mais desordenadas e o volume livre entre as cadeias é maior. Uma das maneiras utilizadas para ajustar a difusão de um AA através de uma matriz polimérica é a formação de ligações cruzadas polímero-polímero ou a adição de plastificantes (Evangelista, 1998; Wang *et al.*, 2002). O aumento das ligações cruzadas num SLC promove a diminuição da difusão do AA devido à restrição no movimento das cadeias poliméricas. Por outro lado, os plastificantes têm a capacidade de interpor-se entre as cadeias poliméricas, reduzindo as interações polímero-polímero e aumentando, conseqüentemente, o volume livre do sistema (Min *et al.*, 2022) permitindo o aumento da difusão do AA.

Quando um AA se encontra disperso na matriz, a difusão acontecerá à medida que ocorrer sua solubilização no polímero. Já num sistema em que o AA se encontra solubilizado na matriz polimérica, essa etapa será suprimida, permitindo uma difusão mais rápida (Roy, Manna & Pal, 2022).

Quando o AA incorporado as embalagens ativas é uma enzima (biocatalisador), a utilização de embalagens produzidas a partir de proteínas ou polissacarídeos têm contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre a embalagem e o biocatalisador, criando um microambiente favorável, beneficiando a atividade enzimática. Dentre as vantagens de utilizar estas embalagens como suportes para biocatalisadores em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliabilidade, atoxicidade, e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo. A escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado (Kuai *et al.*, 2021).

As embalagens ativas são obtidas a partir de uma solução ou dispersão do agente formador de filme e do AA, seguido da formação de uma camada fina, normalmente obtidas por dois métodos: extrusão e *casting*. Entre eles, o *casting* é o mais utilizado.

O método de *casting* consiste no preparo de uma dispersão coloidal da macromolécula (solução filmogênica) adicionada ou não de aditivos, sua deposição em um suporte adequado e posterior secagem do solvente. A medida que o solvente evapora, o polímero na solução filmogênica agrega-se continuamente para formar a película (Ochoa-Yepes *et al.*, 2019). Em algumas situações, como no caso dos recobrimentos comestíveis, o processo de secagem se dá no próprio alimento, no qual a solução foi aplicada por imersão ou spray. Estas macromoléculas devem possuir a capacidade de formar uma matriz contínua e coesa para que o filme possa ser formado.

No método de extrusão, o polímero termoplástico é introduzido em um cilindro aquecido e o material amolecido é forçado, por um parafuso rotativo, a entrar através de uma abertura em uma matriz, para a obtenção de formas contínuas. Depois de sair do molde, a peça extrusada deve ser resfriada, geralmente, abaixo da temperatura de transição vítrea do material, de modo a assegurar a estabilidade dimensional requerida. O resfriamento é geralmente realizado com jato de ar ou com água. A extrusão tem como vantagem o baixo custo, além de possuir um sistema de produção contínuo e versátil, sendo adequado para escala industrial (Berti *et al.*, 2023).

Várias alternativas têm sido investigadas para minimizar o impacto ambiental dos polímeros convencionais, incluindo a utilização de biopolímeros. Em comparação com os polímeros sintéticos, os polímeros naturais como materiais de embalagens de alimentos, têm as vantagens da biodegradabilidade e obtenção a partir de recursos renováveis. Diversos biopolímeros foram relatados quanto ao seu potencial de aplicação

na formação dessas embalagens, como a quitosana, o amido, o colágeno, glúten, GEL e os derivados da celulose (Oun *et al.*, 2022).

3.2 BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros são polímeros produzidos a partir de fontes naturais através de processos químicos ou biossíntese por microrganismos vivos, que consistem em unidades monoméricas que são ligadas covalentemente, formando moléculas de cadeias semelhantes. Assim, os biopolímeros têm a capacidade de serem degradados através da ação de microrganismos que ocorrem naturalmente, resultando em subprodutos orgânicos, como CO₂ e H₂O, que são seguros em relação ao meio ambiente (Getahum, Kassie & Alemu, 2024).

Os biopolímeros têm sido considerados como materiais alternativos ao plástico feito de petróleo porque são biodegradáveis, renováveis e abundantes, possuem boa compatibilidade e também excelentes propriedades incluindo bom desempenho de barreira e propriedades mecânicas favoráveis, tornando-os adequados para várias aplicações (Kumar *et al.*, 2023). Porém, os biopolímeros possuem algumas propriedades inferiores aos plásticos convencionais para uso em alimentos, como a solubilidade em alimentos de alta umidade e forte solubilidade em água. Com isso, misturas de materiais biopoliméricos, introdução de reticulantes e nanocompósitos vem sendo utilizado para melhorar as características dos filmes e revestimentos produzidos.

Os diversos biopolímeros que ocorrem naturalmente e que podem ser utilizados na produção de filmes e revestimentos estão ilustrados na Figura 5. Estas biomoléculas são compatíveis entre si e com outros hidrocoloides, surfactantes e aditivos.

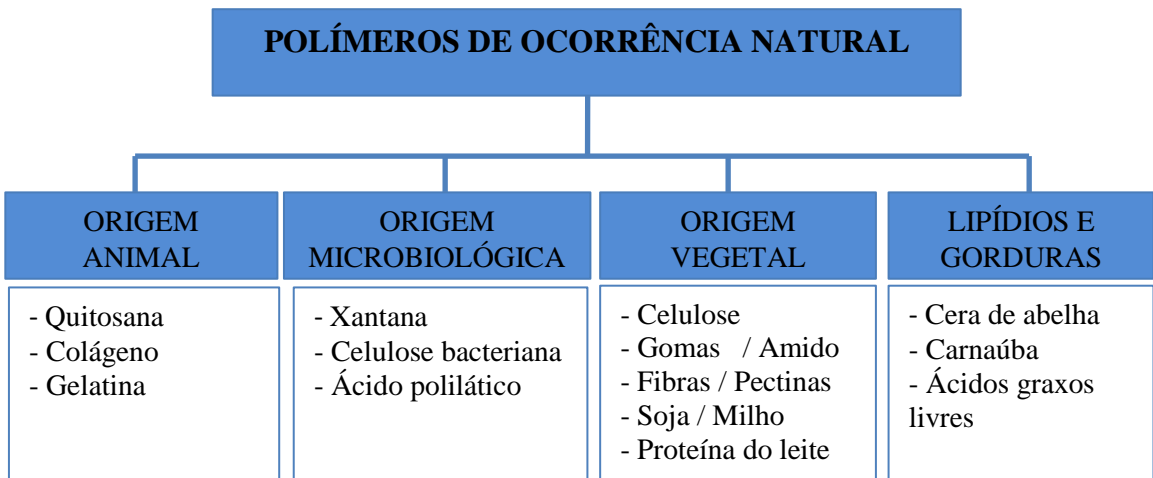


Figura 5. Polímeros de ocorrência natural com utilização em filmes e revestimentos biodegradáveis. (Elaborado pelo autor, 2024)

Para obtenção de filme polimérico é necessário pelo menos um polímero de alta massa molar (agente formador de filme, também denominado macromolécula), para que seja obtida uma matriz com força de coesão e tensão adequada além de solvente e um plastificante (Al-Hassan, 2024).

Proteínas e polissacarídeos são dois tipos de biopolímeros naturais comumente usados em várias aplicações, como em alimentos e indústrias cosméticas, engenharia biomédica, etc. As interações de proteínas/polissacarídeos são geralmente dominadas por forças eletrostáticas, mas também dependem de outras interações mais fracas como forças de ligação de hidrogênio e van der Waals (Kan *et al.* 2024).

As proteínas oferecem características valiosas para a produção de embalagens de alimentos devido à sua abundância, boa capacidade de formação de filme, transparência e excelentes propriedades de barreira contra O₂, CO₂ e lipídios. Estudos anteriores mostraram que a combinação de alguns polissacarídeos e GEL produz materiais com propriedades melhoradas e perfis modificados de liberação de AA, oferecendo liberação rápida de substâncias ativas (Lupina *et al.*, 2022; Kowalczyk *et al.*, 2020).

Proteínas como a GEL são ricas em sítios funcionais (-COO / -COOH / -OH e NH₂), que podem interagir facilmente com vários materiais ativos para compor o sistema de embalagem e melhorar a resistência mecânica e atividade biológica dos filmes formados. No entanto, filmes à base de GEL tem alta hidrofilicidade e baixa resistência física, em vista disso, a mistura de polissacarídeos com GEL para produzir filmes pode expandir a resistência à tração e outras propriedades físico-químicas (Lv *et al.*, 2024). Dentre os polissacarídeos que podem ser utilizados para este fim, a CMC é um polímero derivado da celulose mais comumente utilizado devido ao seu potencial renovável, baixo custo, não toxicidade e biocompatibilidade por meio dos grupos funcionais abundantes.

A CMC é obtida pela substituição de alguns grupos hidroxila da cadeia da celulose por grupos carboxila (-CH₂COOH) (Sun *et al.*, 2024). Sendo assim, a demanda por polissacarídeos está crescendo para produzir filme de embalagem de alta qualidade com melhores propriedades e formulados a partir de técnicas avançadas de fabricação para garantir melhor qualidade e textura (Tarique *et al.*, 2021).

3.2.1 Gelatina

Do ponto de vista químico, a GEL é composta por grandes cadeias de aminoácidos, uma série de até 20 diferentes tipos de L- α -aminoácidos, ligados por

ligações peptídicas e estes aminoácidos contêm grupos funcionais ácidos e básicos. É uma proteína solúvel em água, obtida pela hidrólise controlada (65 a 68 °C) do colágeno, que inicialmente é insolúvel em água e que muitas vezes é descartado durante o processamento e abate dos animais (Al-Hassan, 2024).

As proteínas são as macromoléculas mais úteis nos organismos vivos e desempenham diversas funções vitais em todos os processos biológicos. Elas funcionam como catalisadores, transportam e armazenam oxigênio, geram movimento, transmitem impulsos nervosos, fornecem suporte mecânico e proteção imunológica, bem como controlam o crescimento e diferenciação (Devi *et al.*, 2016).

O colágeno é uma importante proteína estrutural dos tecidos conjuntivos presentes em vasos sanguíneos, cartilagens, pele, tendões, ligamentos e ossos. A GEL e o colágeno existem como cadeias polipeptídicas, mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre os aminoácidos de cadeias adjacentes (estrutura secundária) (Yuswan *et al.*, 2021). O colágeno consiste em três cadeias polipeptídicas que se entrelaçam firmemente e formam a conformação tripla hélice altamente estável, de modo que essas moléculas são organizadas em feixes de fibrila em um alto grau de organização, Figura 6.

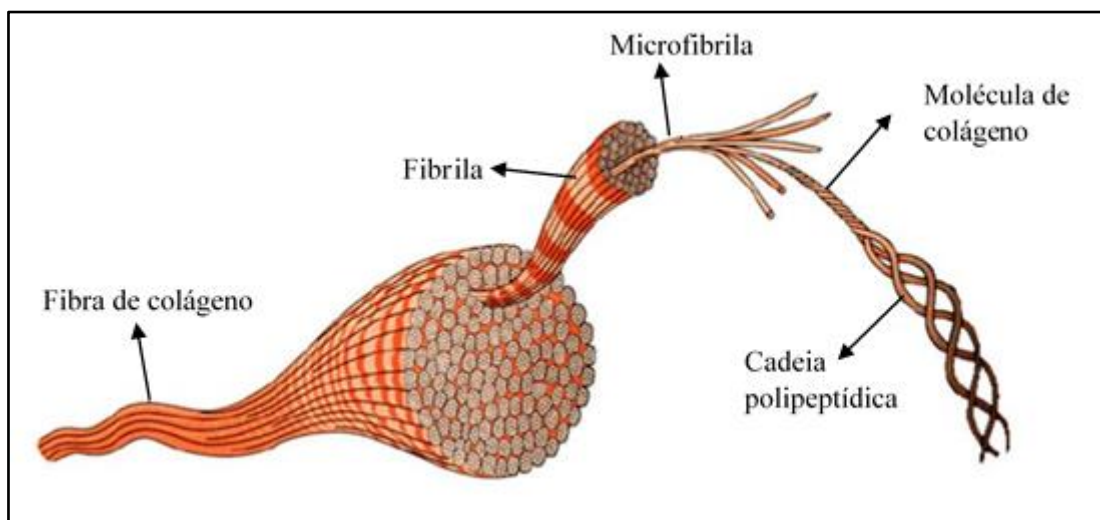


Figura 6. Estrutura da fibra de colágeno (Adaptado de Daniels *et al.*, 2007).

Quando o colágeno é hidrolisado sob calor, Figura 7, a tripla hélice se desenrola e a estrutura secundária é parcialmente perdida (desnaturação do colágeno). Como o colágeno é insolúvel em água, a reação de hidrólise é catalisada sob condições ácidas (Gelatina Tipo A) ou básicas (Gelatina Tipo B) e a qualidade resultante depende da fonte

do colágeno e do método de extração. A obtenção pelo método alcalino contém mais grupos carboxílicos do que a obtida pelo tratamento ácido (Mozuraityte *et al.*, 2024).

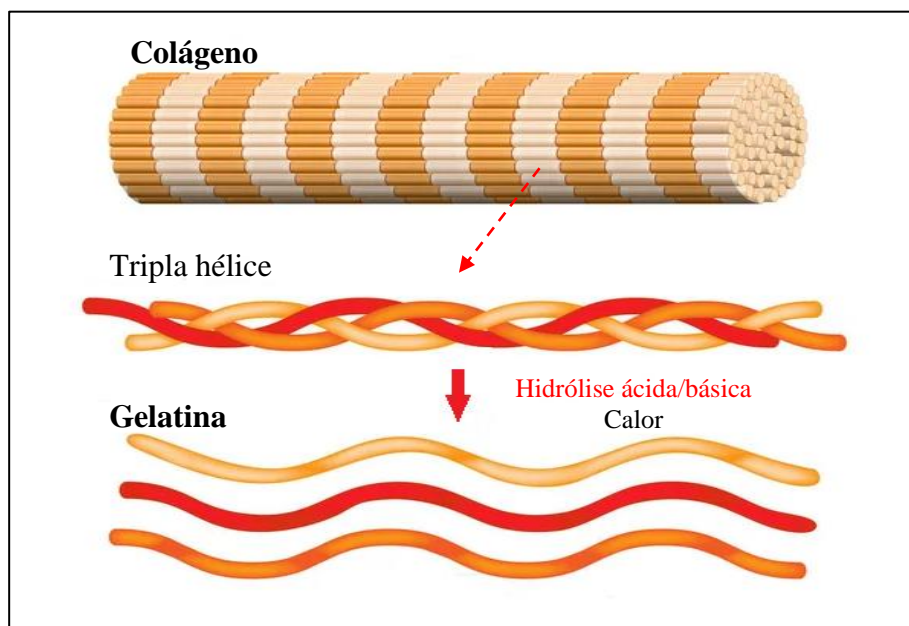


Figura 7. Representação da obtenção de GEL a partir da hidrólise do colágeno.
(Elaborado pelo autor, 2024)

A GEL forma geis reversíveis induzidos por frio que são estabilizados por ligações de hidrogênio. No entanto, a dissociação e a agregação do colágeno em GEL solúvel (o componente de gelificação) necessitam de umidade e calor prolongados. Na GEL, partes da estrutura do colágeno são regeneradas quando a solução é resfriada a temperaturas abaixo de 35°C (temperatura de transição solução-gel), Figura 8. As regiões onde há a renaturação das triplas hélices são chamadas de zonas de junção, enquanto as regiões na qual as cadeias se enrolam aleatoriamente são chamadas de amorfas (Haug, Draget & Smidsrod, 2004).

O gel obtido a partir de GEL consiste em longas cadeias lineares, cada uma delas com ligações cruzadas com outras moléculas, em diversas posições (zona de junção) no decorrer da cadeia. As cadeias moleculares flexíveis entre as ligações cruzadas são longas, o que faz com que o gel seja extensível. É um gel predominantemente elástico, pois as ligações cruzadas são permanentes (em temperaturas mais baixas) (Ahmad *et al.*, 2024).

Geralmente, como o colágeno, a GEL é caracterizada pela repetição do trio de aminoácidos (Gly-X-Pro/Hyp)_n, responsável pela estrutura tripla hélice da GEL. Um terço da cadeia é composto de glicina (Gly), enquanto outro terço é prolina (Pro) ou

hidroxiprolina (Hyp), Figura 9, e o X representa os outros aminoácidos presentes na cadeia da GEL, Figura 10.

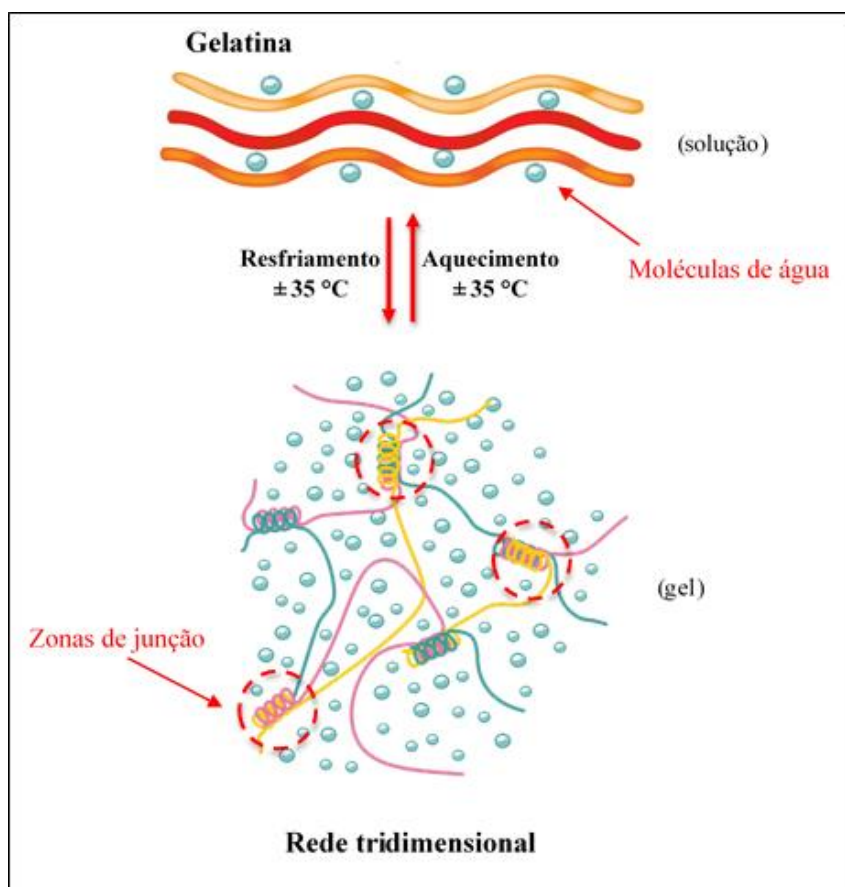


Figura 8. Renaturação parcial do colágeno. (Elaborado pelo autor, 2024)

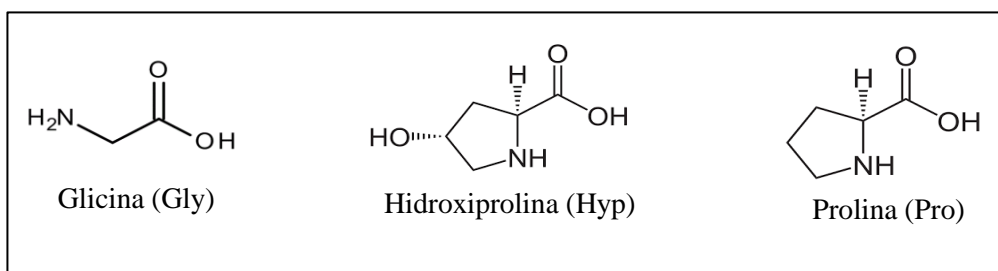


Figura 9. Principais aminoácidos que compõe a GEL. (Elaborado pelo autor, 2024)

A GEL possui grupos catiônicos e aniônicos, juntamente com grupos hidrofóbicos, em uma proporção aproximada de 1:1:1. Sendo assim, a cadeia peptídica consiste em resíduos de aminoácidos carregados positivamente (resíduos de lisina e arginina), carregados negativamente (principalmente ácido glutâmico e aspártico) e de resíduos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, metionina e valina). A GEL é composta de

carbono (50,5 %), hidrogênio (6,8 %), nitrogênio (17 %) e oxigênio (25,2 %) (Elzoghby, 2013).

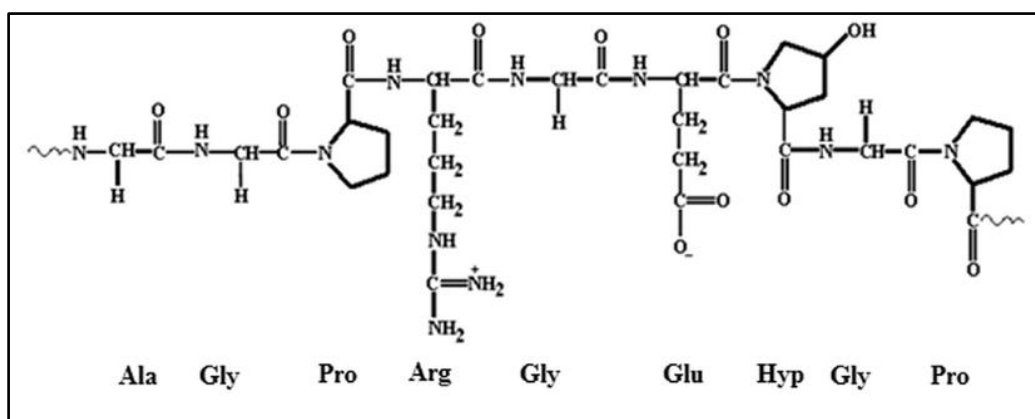


Figura 10. Estrutura química básica da GEL. (Adaptado de Devi *et al.*, 2016)

As propriedades físico-químicas da GEL e do colágeno levaram a sua ampla aplicação, por exemplo, eles são utilizados como estabilizadores, espessantes e emulsificantes em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e medicamentos. A maior parte das GELS comerciais são fabricadas a partir de fontes bovinas ou suínas, especificamente de peles e ossos. Entre as GELS, a GEL de peixe tem atraído muita atenção como alternativa de GEL de mamífero devido a restrições religiosas e encefalopatia espongiforme bovina (Yuswan *et al.*, 2021).

As GELS são materiais de qualidade alimentar insípidos com excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, de modo que possuem um grande potencial como filmes para embalagens de alimentos. Além disso, eles podem ser usados como transportadores de componentes bioativos e nanopartículas, embora a incorporação desses materiais possa afetar as propriedades dos filmes de GEL (Nobrega *et al.*, 2022).

Os filmes com base de GEL geralmente têm boas propriedades funcionais, no entanto, vários problemas limitam a aplicação como material de embalagem. É frágil, possui fraca barreira ao vapor de água, estabilidade térmica e absorve alta umidade. Além disso, sua resistência mecânica também é menor do que a dos filmes de polímeros sintéticos (Sun *et al.*, 2024). Os filmes de GEL são frágeis e suscetíveis a rachaduras por causa da alta densidade de energia coesa das proteínas. Portanto, os plastificantes são muitas vezes adicionados para melhorar a flexibilidade, extensibilidade e dispensabilidade dos filmes. Os plastificantes mais comumente utilizados para os filmes

de GEL são glicerol e sorbitol. Estudos comprovam que a proporção de plastificante adicionado causa impacto nas características dos filmes, com efeito significativo na permeabilidade ao vapor de água (PVA) e no conteúdo de umidade (Cao, Yang & Fu, 2009). Além disso, os plastificantes provocaram um efeito significativo na resistência e extensibilidade dos filmes, reduzindo a resistência à tração e aumentando a porcentagem de alongamento até a ruptura (Al-Hassan, 2022).

Uma estratégia eficaz e direta para melhorar as deficiências intrínsecas nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de GEL envolve sua combinação com outros polímeros, entre eles a CMC.

3.2.2 Carboximetil Celulose

A celulose, polímero de cadeia longa, é normalmente preparado como microfibrilas ligadas entre si para formar nanofibras de celulose. Bioquimicamente, a celulose, é um composto orgânico linear com a fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, formado por uma cadeia polimérica de unidades de repetição de dois anéis de anidroglicose unidas por ligações glicosídicas $\beta \rightarrow 1-4$ (Tampichai *et al.*, 2022). Sendo assim, a cadeia da celulose é montada e através de extensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e forças de van der Waals entre os grupos hidroxila adjacentes e o oxigênio são formadas as fibrilas elementares (Acharya, Hu & Abidi, 2021).

A conversão de celulose em ésteres e éteres de celulose, Figura 11, ganhou atenção significativa nos campos da química verde e sustentável e proporcionou o desenvolvimento de tecnologias ambientais amigáveis. As características destas celulosas modificadas levam a aplicações mais amplas e melhores propriedades como biocompatibilidade, alta estabilidade química, solubilidade, maleabilidade, porosidade e boa degradabilidade (Gul *et al.*, 2023). Pode ser obtida a partir de biomassa abundante e barata, como o bagaço da cana-de-açúcar proveniente de usinas de açúcar e álcool, é facilmente encontrada e de baixo valor no mercado.

A CMC, principal derivado da celulose, é produzida pela adição de grupos carboximetil ($-CH_2-COOH$) com alguns dos grupos hidroxila dos monômeros de glucopirranose da estrutura da celulose. É mais comumente isolada e comercializada na forma de sal de sódio ($CH_2COO-Na^+$). É um polieletrólito aniônico formado a partir da síntese de Williamson (reação de substituição), na qual pode ser solúvel em água e solventes orgânicos devido a presença de vários grupos carboxílico e hidroxila,

mostrando excelentes propriedades de ligação à água, além de aumentar a interação com outras moléculas. (Suman, Awasthi, Bajaj, 2024).

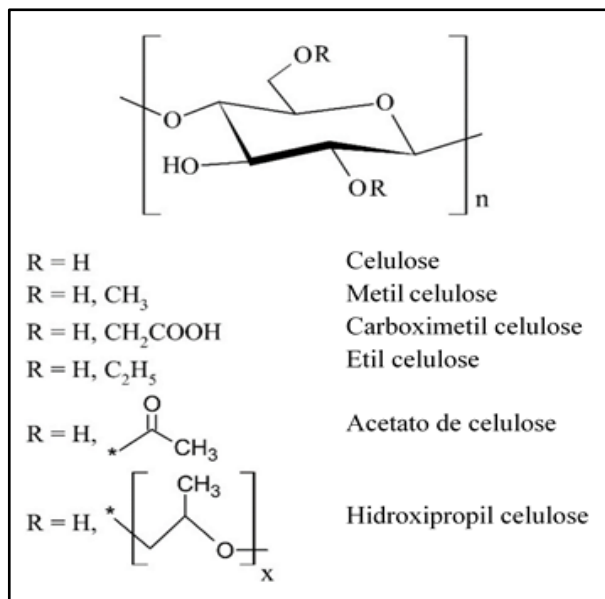


Figura 11. Estrutura da celulose e seus principais derivados. (Kerwald *et al.*, 2023)

A produção da CMC compreende duas etapas, em primeiro lugar, a celulose é convertida em celulose alcalina na presença de hidróxido de sódio (alcalinização), seguida por uma reação da celulose alcalina com ácido monocloroacético (carboximetilação) para formar a CMC, Figura 12 (Joshi *et al.*, 2015).

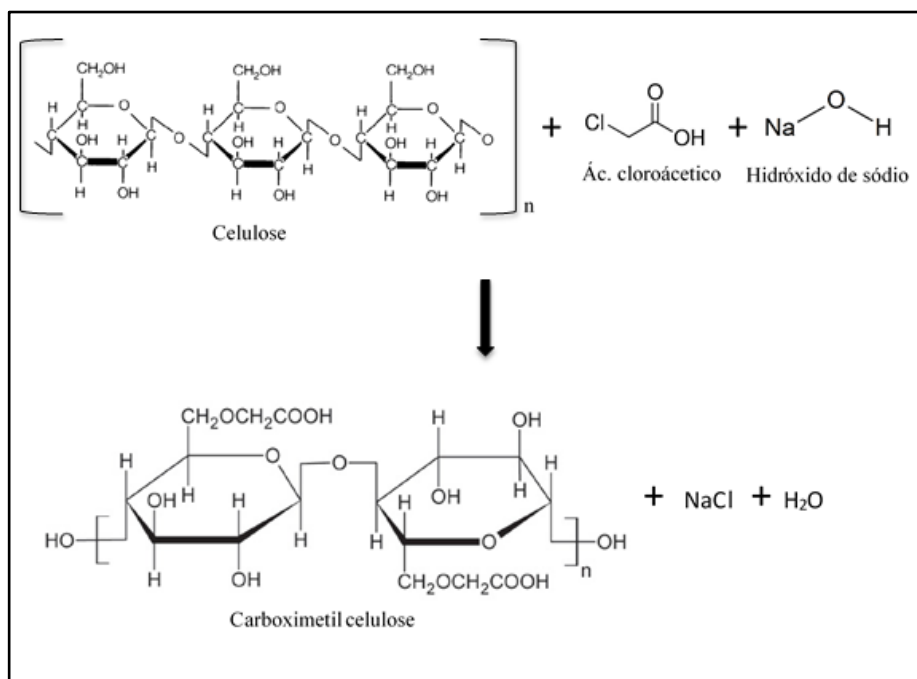


Figura 12. Esquema da reação de formação da CMC. (Elaborado pelo autor, 2024)

As propriedades físico-químicas e biológicas da CMC o tornam útil em vários setores industriais, como alimentos, rações, produtos farmacêuticos, agrícolas e tratamento de águas residuais (Ahmad, Wahab & Omar, 2014) Suas propriedades e aplicações dependem, essencialmente, da viscosidade de suas soluções aquosas, do grau médio de substituição (GS), definido como o número médio de grupos hidroxila substituídos por unidade D-glicopiranosil da cadeia polimérica, e da distribuição dos grupos carboximetil. Este último fator, a distribuição dos grupos carboximetil ao longo das cadeias, influencia fortemente suas propriedades, o comportamento reológico de suas soluções e a abrangência de suas aplicações (Caraschi & Filho, 1999).

O GS é uma das características mais importantes da CMC. A faixa típica de GS da CMC (0,5-1,5 para produtos comerciais) é um parâmetro-chave que controla suas aplicações finais e permite estabilizar emulsões e absorver a umidade da atmosfera. Visto que, são obtidos por reação heterogênea, a distribuição dos substituintes inseridos nas cadeias de celulose depende da acessibilidade dos reagentes aos sítios reativos da macromolécula, sendo uma característica de difícil controle. Geralmente, CMC com valores de GS na faixa de 0,7 e 1,2 possuem boa solubilidade em água e transparência, que é crítica para aplicações alimentares (Shakun, Heinze & Radke, 2013).

De acordo com o *Food and Drugs Administration* (FDA), a CMC é listada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) na utilização para embalagens de alimentos, ou seja, não há nenhuma evidência nas informações disponíveis sobre a CMC que demonstre ou sugira motivos razoáveis para suspeitar de algum tipo de perigo para o público quando é usada em alimentos ou embalagens.

A CMC tem sido geralmente utilizada como espessante e estabilizante no setor alimentício devido à sua boa capacidade hidrofílica e de ligação à água (Akhtar *et al.*, 2024). É também utilizada como biopolímero para fabricação de embalagens biodegradáveis e filmes ativos para aplicação em embalagens de alimentos (Perera, Jaiswal & Jaiswal, 2023; Yaashikaa *et al.*, 2023; Yildirim-Yalcin, Tornuk e Toker, 2022). No entanto, os filmes de CMC puros, apresentam limitações como baixa resistência mecânica, estabilidade térmica, fracas barreiras ao vapor de água e flexibilidade, mas com impressionante biocompatibilidade.

Para resolver essas deficiências, a CMC pode ser combinada com vários outros polímeros, extratos naturais, nanopartículas, enzimas, aminoácidos e biomateriais. Estas modificações permitem o desenvolvimento de materiais à base de CMC com melhor resistência mecânica, estabilidade térmica e flexibilidade, expandindo sua aplicabilidade

em diferentes setores (Aggarwal *et al.*, 2024). Além disso, plastificantes como glicerol, sorbitol, propilenoglicol, polietilenoglicol e glicerina ajudam a melhorar a flexibilidade e trabalhabilidade do filme. Esses compostos químicos não voláteis e de baixa massa molar “amolecem” os materiais poliméricos quando adicionados. Ao ocupar o espaço intermolecular entre as cadeias de biopolímeros esses aditivos podem diminuir a dureza e a tensão de deformação e aumentar a plasticidade e ductilidade dos filmes (Tarique *et al.*, 2021).

3.2.3 Sorbitol

Sorbitol é um poliálcool de açúcar linear contendo seis carbonos ($C_6H_{14}O_6$) caracterizado por extensas ligações de hidrogênio, sua estrutura química é mostrada na Figura 13. Também conhecido como D-glucitol, ocorre naturalmente em diversas frutas como cerejas, peras, maçãs e ameixas e é usado como adoçante a granel em vários produtos alimentícios. Devido a sua ampla gama de derivados o sorbitol encontra aplicação em muitas indústrias, incluindo alimentos e bebidas, médica e farmacêutica, bem como indústrias de cosméticos e cuidados pessoais (Heerden *et al.*, 2024).

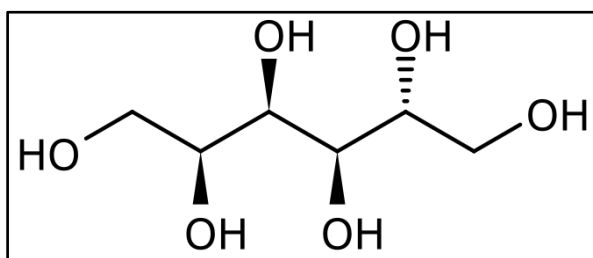


Figura 13. Estrutura química do sorbitol. (Elaborado pelo autor, 2024)

A principal rota de síntese do sorbitol é obtida a partir da hidrogenação catalítica da glicose (redução do grupo aldeído livre da D-glicose), Figura 14. Como outros poliois, é altamente solúvel em água e penetra livremente através das membranas celulares. Ainda que sua composição química seja próxima a da glicose, sua topologia difere significativamente, pois não é capaz de formar anel hemiacetal, o que confere maior grau de liberdade conformacional levando ao aumento da flexibilidade em relação à glicose. No sorbitol, a molécula pode sofrer rotações conformacionais em torno de cada uma das ligações simples de C-C, permitindo uma flexibilidade conformacional significativa, que implica nas propriedades físicas da molécula (Lerbret *et al.*, 2009).

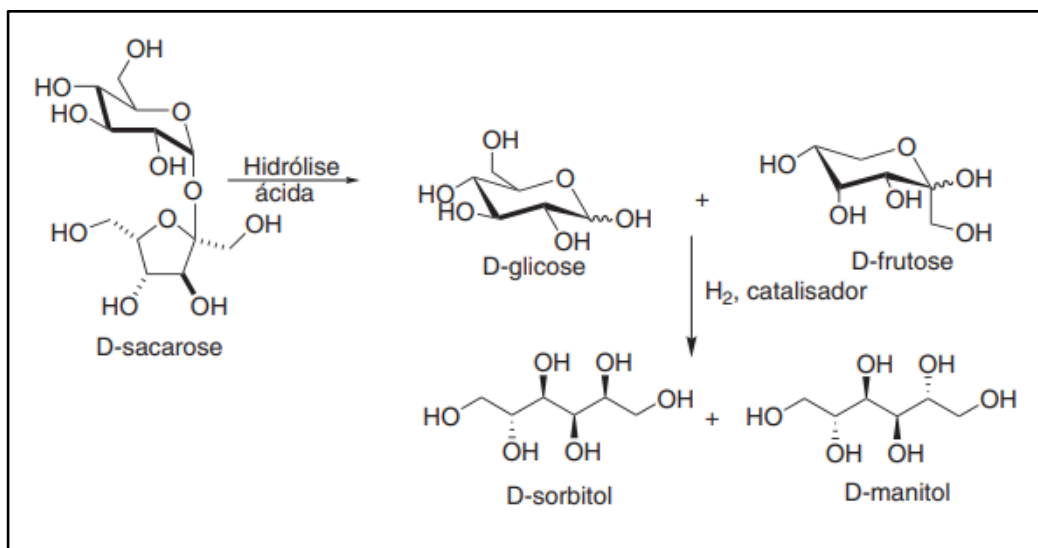


Figura 14. Síntese de obtenção do D-sorbitol. (Elaborado pelo autor, 2024)

O sorbitol e o glicerol são os plastificantes mais utilizados para formação de filmes de GEL e CMC, eles se dispersam entre as cadeias de polímeros e quebram as ligações de hidrogênio aumentando a flexibilidade e as propriedades térmicas dos filmes, além de interagir com as ligações de hidrogênio das moléculas dos polímeros melhorando as propriedades mecânicas (Ma *et al*, 2023).

Assim, filmes com melhores propriedades são formados a partir da interação da GEL/CMC/sorbitol, obtendo filmes com excelente biocompatibilidade e melhores condições para a adição de AA em sua estrutura, como por exemplo, a imobilização de enzimas.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas, conhecidas como proteínas catalíticas, são amplamente utilizadas em vários campos, como biotecnologia, alimentos e medicina, e também desempenham um papel significativo em processos biológicos devido à sua especificidade e seletividade. As enzimas têm a capacidade de catalisar reações, sob condições muito brandas com um alto grau de especificidade do substrato, diminuindo assim a formação de subprodutos (Bat-Ozmatara, Unlu & Gevrek, 2023).

Na indústria de alimentos, o uso de enzimas destaca-se no setor lácteo. O setor de lácteos é um tradicional usuário de enzimas. Além da sua utilização na coagulação do leite para fabricação de queijo, a indústria de lácteos também faz uso de enzimas como lipases, proteases não-coagulantes, aminopeptidases, lisozima, lactase e lactoperoxidase. Algumas destas aplicações são tradicionais, como por exemplo, a lipase para realçar o

sabor, enquanto outras são relativamente novas, como a hidrólise da lactose para acelerar a maturação dos queijos, controlar a deterioração microbiológica, e alterar a funcionalidade das proteínas.

No entanto, a utilização de enzimas em aplicações industriais é limitada por fatores como alto custo, curto prazo de validade, baixa estabilidade e suscetibilidade à inativação por várias configurações/condições do processo, além da dificuldade em sua remoção do ambiente de reação. Para superar esses desafios, métodos de imobilização são empregados para aumentar a estabilidade e durabilidade da enzima (Maghraby *et al.*, 2023). A ideia de imobilização de enzimas foi introduzida por Nelson e Griffin em 1916 depois que eles notaram que a invertase pode hidrolisar a sacarose após ser absorvida pelo carvão (Kim, Grate & Wang, 2008). Desde então, as tecnologias de imobilização se desenvolveram progressivamente e os avanços biotecnológicos e nanotecnológicos revitalizaram o interesse nas estratégias de imobilização de enzimas.

As estratégias de imobilização envolvem a fixação ou aprisionamento de enzimas em materiais de suporte sólido, com métodos reversíveis e irreversíveis que podem melhorar as propriedades físico-químicas. A imobilização reversível de enzimas envolve adsorção física, ligação de afinidade e ligação iônica. No entanto, a imobilização irreversível de enzimas compreende aprisionamento em gel/fibra, encapsulamento, reticulação e ligação covalente. Os métodos de imobilização enzimática mencionados acima são mostrados na Figura 15.

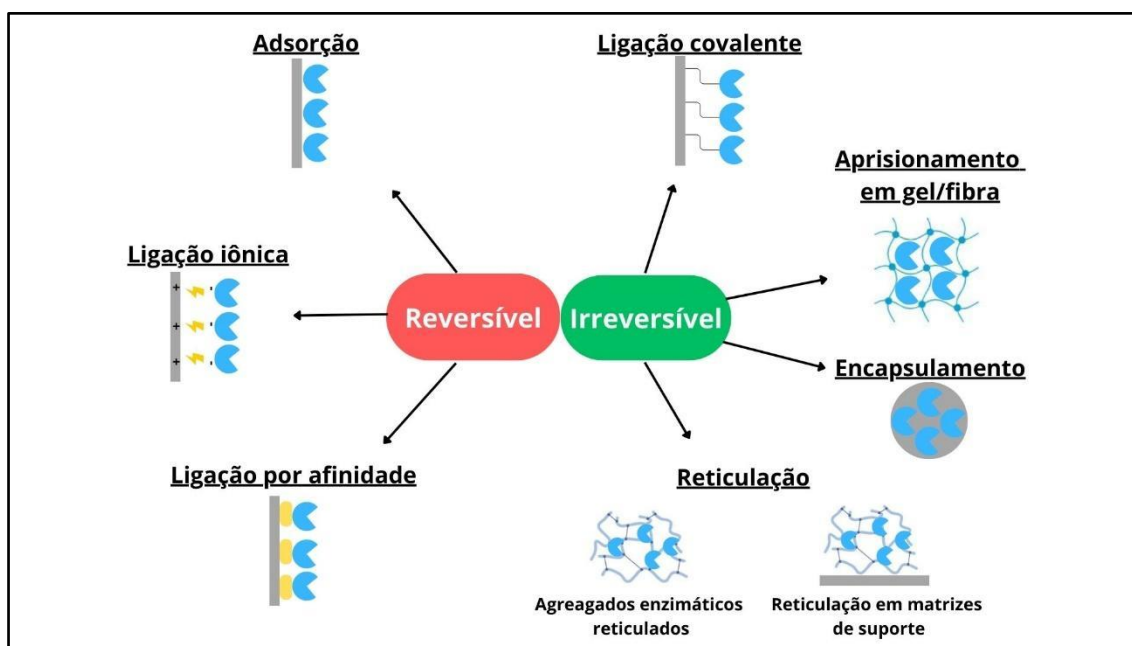


Figura 15. Métodos de imobilização de enzimas. (Elaborado pelo autor, 2024)

A imobilização por adsorção é uma técnica simples e conveniente na qual a imobilização reversível é obtida. Desta técnica deriva a adsorção física, adsorção de íons e adsorção de afinidade, sendo a adsorção física mais usada. Os materiais geralmente utilizados são resinas de trocas iônicas, sílica gel, carvão ativado, alumina, vidro de poro controlado e cerâmica. É um método relativamente barato e de fácil implementação, porém, possui fraca força de interação (ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas) entre o transportador e a enzima. A afinidade entre a enzima e o carreador é de vital importância para uma adsorção bem sucedida e a força das ligações são suscetíveis a mudança de pH, temperatura e força iônica (Zhong *et al.*, 2020).

A ligação iônica é uma técnica simples na qual os materiais de suporte são geralmente carregados, pois as proteínas devem ter cargas opostas para que se liguem. A força de ligação é mais forte comparada a adsorção física e a ligação é revertida alterando o pH ou por meio da salinização das enzimas (Maghraby *et al.*, 2023). A imobilização por ligação de afinidade explora a especificidade da enzima para seu suporte sob diferentes condições fisiológicas e a presença de grupos específicos na enzima é obrigatório. Dessa forma, a imobilização é alcançada de maneira que a matriz é pré-acoplada a um ligante de afinidade para a enzima alvo ou a enzima é conjugada a um material que desenvolve a afinidade com a matriz (Christena & Rajaram, 2013).

A ligação covalente é um método bem estabelecido para a imobilização de enzimas. Neste método, ligações covalentes são formadas por meio de ligações fortes e altamente estáveis de materiais de suporte (por exemplo, sílica porosa, poliacrilamida, agarose, vidro poroso, etc.) e aminoácidos da cadeia lateral das enzimas, como lisina, cisteína ou resíduos de ácidos aspártico e glutâmico (Wong, Thirlway & Micklefield, 2008). Além disso, grupos funcionais de aminoácidos são favoráveis à formação de ligações covalentes como os grupos amino, carboxílico, imidazol, indolil e hidroxila fenólica. Esse tipo de ligação aumenta a estereoespecificidade das enzimas, aumentando a sua estabilidade.

A imobilização de reticulação é uma técnica na qual as enzimas são interconectadas através de ligação covalente, na presença de agente de ligação, que é usado como ponte entre duas moléculas de enzimas adjacentes. O glutaraldeído é o reticulante mais comumente utilizado. Além disso, as enzimas podem ser reticuladas entre si, sem carreador, como agregados enzimáticos reticulados por meio de ligações não covalentes. As ligações cruzadas dos agregados tornam as enzimas insolúveis,

preservando suas estruturas organizadas e sua eficiência catalítica (Rafiee & Rezaee, 2021). Entretanto, os agentes de reticulação podem alterar a conformação das enzimas e levar a perda da atividade enzimática. Portanto, a combinação com outros métodos de imobilização, como a adsorção, pode minimizar este problema.

As enzimas tendem a se agregar, diminuindo assim a atividade catalítica. A técnica de imobilização por encapsulamento envolve aprisionar várias biomoléculas dentro das paredes da membrana, embora se mantenham em posição de flutuação livre em um espaço controlado, prevenindo sua agressão e desnaturação. A membrana é semipermeável, o que permite o fluxo de nutrientes e substratos de fora e mantém a enzima dentro. O tamanho dos poros é o ponto chave e deve ser decidido a partir do tamanho do material do núcleo e torna esta técnica menos adaptável para escala industrial (Sharma *et al.*, 2022).

O aprisionamento é um método de imobilização na qual as enzimas ficam ocluídas em um material de suporte, seja em uma estrutura de rede de fibras ou de membrana dos polímeros, por meio de ligações covalentes ou não covalentes. Várias matrizes podem ser usadas para o aprisionamento como quitosana, alginato de cálcio, colágeno, derivados da celulose, poliacrilamida, GEL, ágar, borracha de silicone, álcool polivinílico, entre outros. Neste método, as enzimas ficam retidas na rede enquanto substratos e produtos podem passar, o que irá diminuir a lixiviação das enzimas, melhorar a estabilidade mecânica e permitir a geração de reações enzimáticas. As conformações enzimáticas são mantidas, garantindo alta atividade catalítica e alta capacidade de carga das enzimas (Liu, Chen & Shi, 2018).

Na indústria de alimentos, o setor de lácteos é um tradicional usuário de enzimas. Além da sua utilização na coagulação do leite para fabricação de queijo, a indústria de lácteos também faz uso de enzimas como lipases, proteases não-coagulantes, aminopeptidases, lisozima, lactase, e lactoperoxidase.

A imobilização de enzimas vem sendo amplamente aplicada no setor alimentício devido a vários benefícios, incluindo sua alta termoestabilidade e resistência nas etapas prolongadas de processamento de alimentos. Em produtos lácteos, β -Gal e lipase imobilizadas têm sido utilizadas para a hidrólise da lactose, na obtenção de produtos zero lactose, para a hidrólise de triglicerídeos e modificação da gordura do leite, por meio de interesterificação, com diferente composição em triacilgliceróis e, conseqüentemente, com diferentes características físicas e nutricionais.

3.3.1 Lactase (β -Galactosidase)

A enzima β -Gal é codificada pela Comissão Enzimática sob o número 3.2.1.23, é uma proteína habitualmente chamada de lactase, produzida pela maioria dos seres vivos e está distribuída na natureza de acordo com suas multiplicidades de funções. É encontrada basicamente em microorganismos, como bactérias, leveduras, fungos e no trato intestinal dos mamíferos. A β -Gal é classificada como uma hidrolase de ácido glicosil (GH35), se trata de uma enzima em que a água participa na quebra das ligações covalentes do substrato (Dong & Zhong, 2019).

A β -Gal é responsável pela hidrólise enzimática da ligação glicosídica β -1,4 do terminal ou de uma extremidade não redutora de uma variedade de substratos, incluindo polissacarídeos, glicolipídios e glicoproteínas (Alghmdi *et al.*, 2024). No setor de laticínios, as β -Gals são amplamente utilizadas para hidrólise da lactose originando como produto os monossacarídeos glicose e galactose, os quais são transportados do intestino delgado para corrente sanguínea (Thatikonda *et al.*, 2024). Na Figura 16 é ilustrada a reação de hidrólise da lactose.

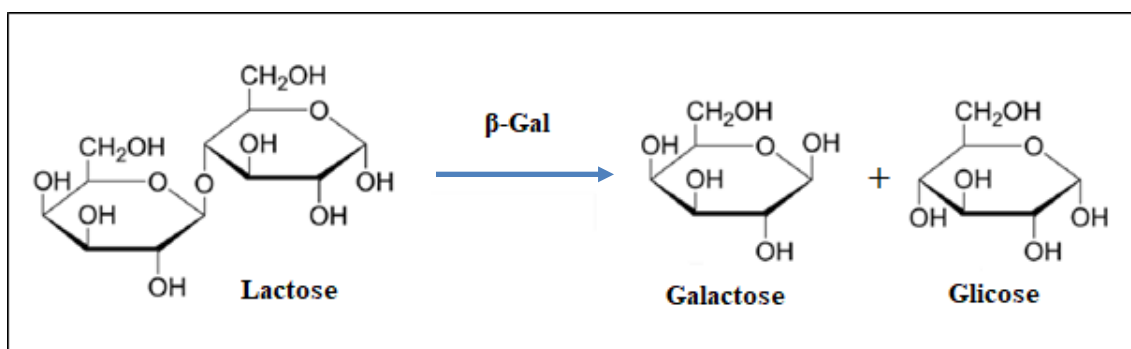


Figura 16. Hidrólise enzimática da lactose e formação de galactose e glicose.
(Elaborado pelo autor, 2024)

A hidrólise da lactose em glicose e galactose pela β -Gal é um importante processo na indústria de alimentos para produção de derivados de baixo teor de lactose e de alto valor nutricional, benéficos para aqueles com intolerância à lactose, que é causada por baixos níveis intestinais de β -Gal.

Outras aplicações da β -Gal incluem a produção de etanol e xarope doce a partir da lactose do soro do leite e a prevenção da cristalização relacionada à lactose em produtos congelados e leite condensado (Kalathinathan *et al.*, 2023). Além disso, a enzima catalisa o processo de transgalactosilação transferindo a molécula de galactose

para um nucleófilo diferente contendo um grupo hidroxila. Este processo resulta na produção de oligossacarídeos prebióticos industrialmente valiosos, como galacto-oligossacarídeos (GOS), lactulose, lacto-sacarose, oligossacarídeos derivados de lactulose e alquil galactosídeos (Kareb & Aider, 2019).

GOS foram identificados como um possível alimento funcional com potenciais benefícios à saúde humana como resultado de avanços recentes na glicotecnologia. O GOS é inativo no sistema digestivo e promove o crescimento de duas espécies de bactérias benéficas, como ácido láctico e bifidobactérias, que melhoram a saúde digestiva, controlam açúcares e lipídios no sangue e modificam marcadores imunológicos (Hu, Aljumaah & Azcarate-Peril, 2024).

De acordo com a Resolução nº 205, de 17/11/ 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) complementada pela resolução RDC nº 26, de 26/05/2009, a enzima lactase utilizada pela indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos fungos: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus Níger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp*, geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Recognized as Safe*).

A lactase produzida por fungos filamentosos (*AspergillusNíger* e *Aspergillus oryzae*) possui pH ótimo na faixa ácida de 2,5 a 4,5, enquanto a produzida por leveduras (*Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.*) possui pH ótimo próximo à neutralidade (6,5 e 7,5). Essa característica é importante para os processos industriais, pois a escolha da fonte da lactase deve estar de acordo com as necessidades impostas pela natureza do substrato e do produto (Souza, Garcia-Rojas & Favaro-Trindade, 2018).

As enzimas β -Gals de *Kluyveromyces lactis* estão entre as mais relatadas na literatura, devido às inúmeras aplicações que elas possibilitaram nas indústrias ambiental, alimentícia e biotecnológica. Na indústria alimentícia, esta enzima é essencial na fabricação de produtos lácteos sem lactose e alternativas mais saudáveis, fornecendo uma variedade de opções de laticínios sem lactose, incluindo iogurte, sorvete, queijo e doce de leite, pois há um vasto e crescente número de pessoas que não conseguem digerir o carboidrato. Aproximadamente 65% da população mundial tem capacidade insuficiente para quebrar a lactose após a infância devido a um declínio na produção de β -Gal (Catanzaro, Sciuto & Marotta, 2021).

As aplicações industriais de β -Gal livre são limitadas por questões relacionadas à estabilidade operacional (na qual ocorre a degradação ou perda de β -Gal), separação de reagentes e reutilização, que constituem um fator de custo substancial no processamento. Sendo assim, as tecnologias de imobilização de enzimas é uma estratégia eficaz para abordar as deficiências das aplicações de β -Gal livre, desenvolvendo enzimas imobilizadas com alta estabilidade térmica e robusta tolerabilidade ao pH, alto rendimento de imobilização e baixa contaminação microbiana, vazamento de enzimas e toxicidade de reagentes existentes na catálise enzimática tradicional (Duan *et al.*, 2022).

β -Gal imobilizadas têm sido tradicionalmente usadas na hidrólise e na síntese de prebióticos GOS em todo o mundo. As inovações em imobilizações de β -Gal promovem ainda mais suas aplicações tradicionais e atualmente estão sendo usadas para hidrolisar ligações glicosídicas em pró-fármacos para liberar fármacos ativos e sintetizar oligossacarídeos e glicosídeos biologicamente importantes. Também estão sendo usadas em biossensores para detecção de lactose com alta especificidade e sensibilidade. Outra vertente é a combinação de β -Gal imobilizadas com outras enzimas ou células inteiras, para produzir uma série de aditivos alimentares promissores e produtos industriais, como tagatose e bioetanol, de forma econômica e ecologicamente correta usando matérias-primas baratas (Lu *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2022).

Além disso, as β -Gals imobilizadas são aplicadas na degradação da lactose nos resíduos de laticínios, uma vez que a descarga de lactose não degradada aumenta as demandas bioquímicas e químicas de oxigênio dos corpos d'água (Shafi, Ahmed & Husain, 2021).

A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em suas composições. Essa operação oferece certas vantagens tecnológicas, na medida em que diminui os riscos de cristalização nos derivados lácteos e aumenta o poder adoçante.

3.3.2 Lipase

As lipases possuem uma posição privilegiada entre as enzimas com interesse industrial. As hidrolases (EC 3, de acordo com o número da Comissão Enzimática) são as enzimas mais usadas em biotransformações, devido à sua ampla especificidade de substrato, acessibilidade comercial, ausência de qualquer dependência de cofator e capacidade de trabalhar em altas concentrações de substrato, não apenas em seu ambiente natural (solução aquosa), mas também em solventes orgânicos. Entre elas, as lipases (EC

3.1.1.3, triacilglicerol acil-hidrolase) são o grupo mais proeminente (Rodrigues *et al.*, 2019).

As aplicações industriais de lipases são altamente diversificadas, variando de biodiesel e produção de aromas, cosméticos e produtos de cuidados pessoais, tratamento de águas residuais, aditivos em detergentes para roupas, indústria de papel e celulose (remoção de piche), indústria têxtil, resolução cinética de misturas racêmicas, kit de diagnóstico e auxílio digestivo, atuando na hidrólise de triacilgliceróis formando ácidos graxos livres e glicerol em meio aquoso ou na reação inversa em meio orgânico (Costa-Silva *et al.*, 2022), como representado na Figura 17.

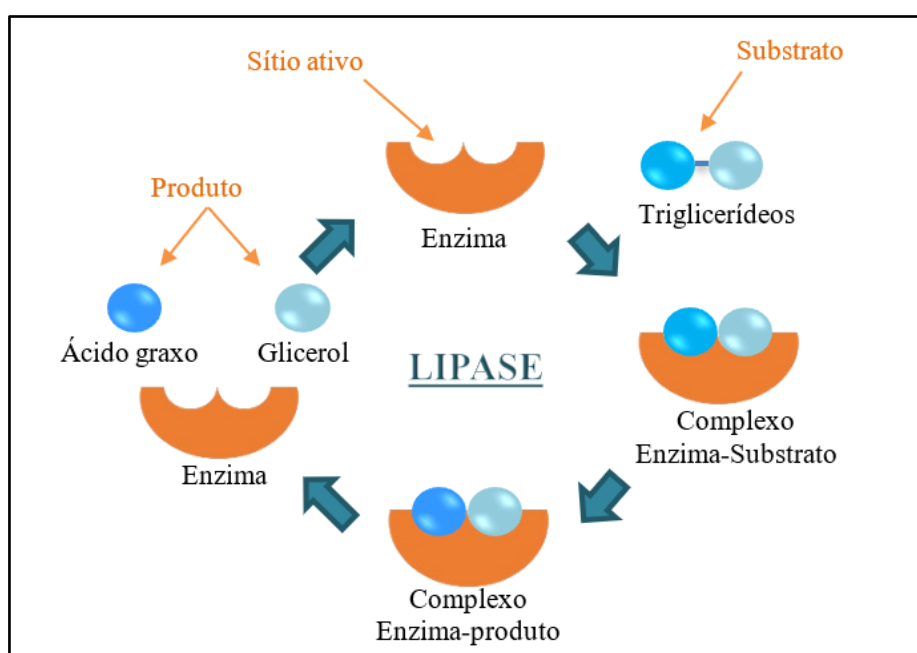


Figura 17. Hidrólise enzimática de triglicerídeos e formação de ácido graxo e glicerol. (Elaborado pelo autor, 2024)

Estes biocatalisadores são comumente encontrados na natureza, podendo ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais ou microbiana. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente, por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento e serem mais estáveis e terem propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes (Danthine & Blecker, 2014).

Essas enzimas são interfaciais, ou seja, atuam na interface entre o substrato insolúvel e a água e o seu peculiar mecanismo catalítico sofre um fenômeno chamado ativação interfacial. Este fenômeno envolve o deslocamento de uma cadeia polipeptídica hidrofóbica, chamada de “tampa”, sobre o sítio ativo, que na forma fechada da enzima

isola o centro ativo. Esta cadeia polipeptídica apresenta vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na sua face interna, que interagem com as regiões hidrofóbicas ao redor do sítio ativo. Quando a tampa se move e se estabiliza por interações iônicas ou ligações de hidrogênio com uma parte específica da superfície da enzima, um grande bolso hidrofóbico e o centro ativo é exposto ao meio, permitindo o contato direto do sítio ativo ao substrato pouco solúvel em água. A atividade das lipases tende a aumentar quando o substrato começa a formar gotas insolúveis (Arana-Peña *et al.*, 2021). O mecanismo descrito está ilustrado na Figura 18.

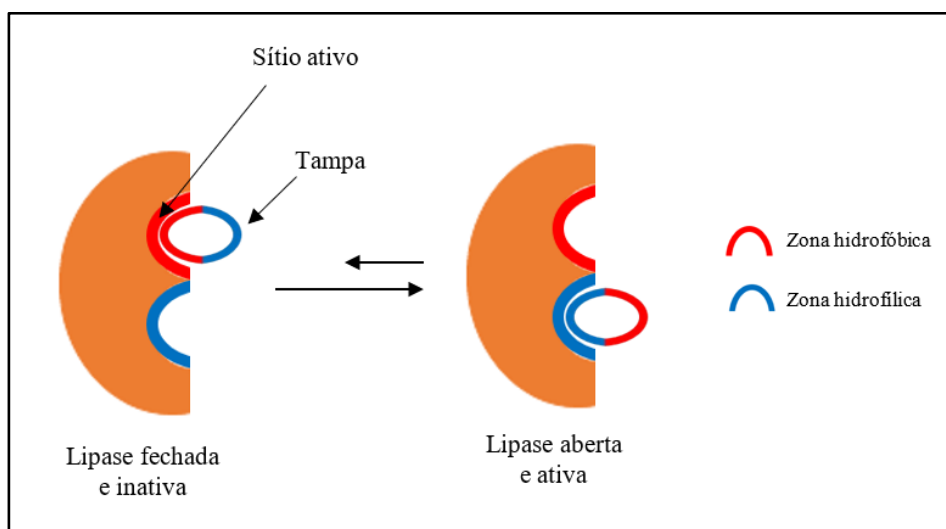


Figura 18. Ativação interfacial da lipase. (Elaborado pelo autor, 2024)

Em relação à regioespecificidade, as lipases podem ser classificadas em sn-1,3-específicas, sn-2-específicas ou não específicas. Essa classificação é baseada na capacidade da enzima de hidrolisar ácidos graxos em posições específicas da cadeia de glicerol na estrutura do triglicerídeo (Remonatto *et al.*, 2022).

Um procedimento comumente usado para melhorar as propriedades da enzima é o processo de imobilização. No caso das lipases, o processo de imobilização demonstrou ser uma excelente ferramenta para modificar o comportamento catalítico (atividade, seletividade, especificidade, estabilidade e inibição por produtos de reação) da enzima devido ao seu peculiar mecanismo catalítico (ativação interfacial) (Aggarwal, Chakravarty & Ikram, 2021).

Um sistema de imobilização adequada deve proporcionar uma imobilização suficientemente forte para evitar a liberação da enzima que pode contaminar o produto e resultar em perda de enzima e atividade catalítica. Deste modo, para uma escolha do

método de imobilização deve-se levar em consideração a seleção do suporte, o rendimento de imobilização e análise superficial dos biocatalisadores imobilizados. Lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisar diferentes reações, tais como hidrólise, esterificação e interesterificação (alcoólise, acidólise e transesterificação).

A interesterificação em especial tem sido o método mais usado para obtenção de óleos e gorduras com funções desejáveis para a manufatura de produtos específicos (Paula *et al.*, 2018). Essa reação promove a redistribuição e a troca de ácidos graxos dentro e entre as moléculas de triacilglicerol dos óleos e gorduras. O resultado é uma mudança nas propriedades físico-químicas da matéria-prima empregada, como comportamento de fusão e cristalização, viscosidade e funcionalidade (Kadhum & Shamma, 2017). Buscando obter um produto que alie os atributos organolépticos e de composição da gordura do leite, com melhores propriedades físicas e nutricionais, a interesterificação enzimática vem sendo utilizada na indústria de lácteos.

De forma geral, as lipases são responsáveis por características desejáveis ou não, em alguns produtos alimentícios desde que, empregadas em condições controladas; caso contrário, elas atuam sobre os lipídeos hidrolisando-os quase que totalmente resultando no aparecimento de sabores indesejáveis como em processos de rancificação de carnes, peixes, derivados do leite e de outros produtos ricos em lipídeos. O processo de imobilização de lipases permite um maior controle do processo de hidrólise, além de, em alguns casos, maior atividade enzimática devido a enzima ser imobilizada em sua forma ativa, garantindo maior efetividade nas ligações com o substrato.

3.4 PRODUTOS LÁCTEOS

Os laticínios são amplamente reconhecidos como um componente essencial de uma dieta saudável devido ao seu alto valor nutricional e vários benefícios à saúde, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e de reforço imunológico. Leite e laticínios eram uma fonte importante de nutrição diária, eles foram considerados imperativos para a saúde humana e faziam parte das recomendações nutricionais oficiais em muitos países (Dong *et al.*, 2023).

Embora minerais, vitaminas e biomoléculas específicas, como ferro e folato, possam ser relativamente escassos neste leite, o leite bovino ainda é uma substância nutritiva que contém elementos essenciais. As proteínas nos laticínios incluem

principalmente caseína, proteína de soro de leite e uma pequena quantidade de proteínas de membrana de glóbulos de gordura. A proteína é a principal fonte de nutrição em produtos lácteos (Borkent *et al.*, 2019). A proteína no leite desempenha um papel fundamental na digestão intestinal e na síntese de gordura (Kashyap *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019) e tem uma série de funções biológicas. Portanto, cada vez mais atenção tem sido prestada às diferenças de proteínas no leite de diferentes espécies.

No entanto, a popularidade deste leite diminuiu desde 2012, atribuída a desafios na digestão e absorção geral (Silva, Silva & Ribeiro 2020). As principais preocupações abrangem questões como intolerância à lactose, alergias à proteína do leite de vaca, níveis elevados de gordura saturada e açúcar, conteúdo hormonal e o uso de antibióticos em bovinos (Reyes-Jurado *et al.*, 2023).

As exigências do consumidor por produtos mais saudáveis, associadas às novas descobertas científicas sobre os efeitos na saúde humana de diversos alimentos, tradicionais ou desenvolvidos mais recentemente pela indústria, têm motivado a busca por processos adequados à produção de alimentos com características específicas. Entre eles, os óleos e gorduras modificados têm recebido especial atenção, graças à importância do consumo adequado na dieta, visando a promoção e manutenção da saúde.

A gordura do leite é uma mistura de mais de 100.000 tipos de triacilgliceróis nos quais estão distribuídos diferentes ácidos graxos, sendo provavelmente a mais complexa de todas as gorduras naturais e o macronutriente mais variável no leite. Essa composição tão variada é responsável por propriedades organolépticas, físicas e nutricionais exclusivas. Normalmente, a gordura representa 3% – 5% do leite cru, composta principalmente de triglicerídeos (95% – 98%), mono- e diacilgliceróis (< 2%) e fosfolípidios (< 1%) (Bourlieu *et al.*, 2009). Em produtos lácteos processados, a gordura original do leite cru é concentrada ou removida, levando a diferentes teores de gordura em produtos lácteos: 4 – 10% em iogurte, 6% – 16% em sorvete e 25 – 35% em queijo (Santos & Lannes, 2022). O perfil de ácidos graxos da gordura do leite deriva da dieta do animal, biohidrogenação ruminal e lipogênese mamária. Outros fatores como raça, paridade, estágio de lactação e práticas de alimentação, também são conhecidos por influenciar o perfil de ácidos graxos do leite bovino (Wilms *et al.*, 2022).

Geralmente, a gordura serve como enchimento estrutural e transportadora de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis em produtos lácteos para seres humanos. Notavelmente, a gordura é a principal fonte de sabor atraente em produtos lácteos, afetando sua qualidade sensorial (Zhao *et al.*, 2023). No entanto, embora ainda

controverso, a ingestão excessiva de gordura do leite leva à obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo II e riscos cardiovasculares como pressão alta, alto nível de açúcar no sangue e colesterol alto no sangue, devido a presença de alto teor de ácidos graxos saturados e colesterol em sua composição (Mayor, 2018). Os consumidores estão, portanto, cada vez mais interessados no consumo de alimentos com baixo teor de gordura, como parte de um estilo de vida saudável.

A lactose é o principal açúcar naturalmente presente no leite e tem grande importância nutricional como fonte de energia e melhora da absorção de vitaminas, cálcio e magnésio. Redução do índice glicêmico e do risco cariogênico e uso como prebiótico, são outros benefícios potenciais. Como uma importante fonte de energia, a lactose é hidrolisada no trato intestinal pela lactase (β -Gal). No entanto, a lactose não é bem absorvida pela maioria da população mundial, devido à baixa produção da enzima lactase no intestino delgado e como consequência problemas como dor de estômago, inchaço, flatulência, náusea e diarreia causados pela intolerância à lactose (Lomer, Parkes & Sanderson, 2008). A hidrólise da lactose do leite na indústria de laticínios é uma alternativa para pessoas com tal intolerância. No entanto, os níveis de hidrólise da lactose devem estar em conformidade com os requisitos legais (Ribeiro *et al.*, 2023).

O mercado de produtos lácteos com baixo teor de lactose está se expandindo e deve atingir US\$ 24,36 bilhões até 2031. Na União Europeia, produtos lácteos com baixo teor de lactose/sem lactose são reconhecidos como alimentos funcionais (Sem *et al.*, 2024). A hidrólise da lactose é um método promissor em operações biotecnológicas para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose ou sem lactose, como iogurte, leite UHT e bebidas lácteas, sorvete, kefir e queijo, apresentando uma forte presença no mercado devido ao crescente interesse em consumidores intolerantes à lactose (Li *et al.*, 2023).

O uso da enzima lactase em sua forma livre é dificultada pois ela é vulnerável à desnaturação, além da falta de estabilidade operacional a longo prazo, dificuldade de recuperação e sensibilidade a mudanças nas condições ambientais. Para superar essas desvantagens, métodos de imobilização de enzimas são utilizados pela indústria láctea. A imobilização resulta em um armazenamento aprimorado, estabilidade operacional, maior resistência à desnaturação e aumento na produtividade (Inanan, 2022).

3.4.1 Transgalactosilação

Galacto-oligosacarídeos (GOS), uma classe de oligômeros de carboidratos de cadeia curta (3–10 moléculas) não digeríveis de galactose e glicose, é um importante açúcar do leite e está associado a produtos lácteos. Eles demonstram fornecer benefícios à saúde e melhorar a qualidade de muitos alimentos que são produzidos principalmente a partir de lactose, além de exibirem propriedades prebióticas. Embora a concentração de GOS no leite seja baixa, pode ser produzido por transgalactosilação enzimática de lactose usando β -Gal (Ponnusamy & Sankaranarayanan, 2023).

A formação de GOS por transgalactosilação de lactose é particularmente relevante como uma plataforma tecnológica sólida para atualização de subprodutos contendo lactose da indústria láctea. A reação é controlada cineticamente, na qual as reações de hidrólise da lactose e transgalactosilação ocorrem simultaneamente, como apresentado na Figura 19.

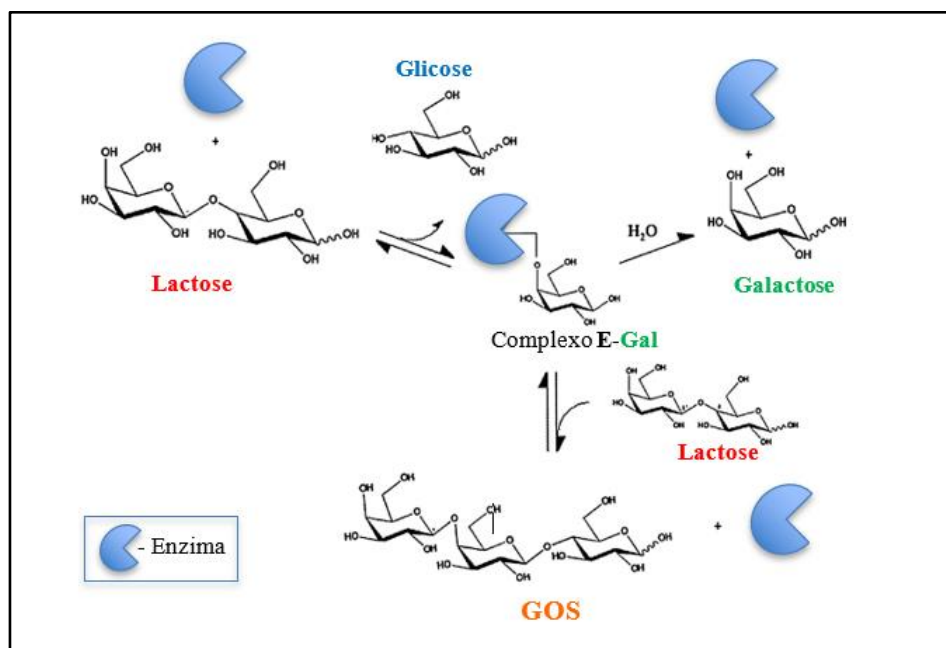


Figura 19. Esquema simplificado da reação simultânea de hidrólise da lactose e transgalactosilação. (Elaborado pelo autor, 2024)

Na presença de lactose, a atividade hidrolítica compete com a atividade de transgalactosilação, que prevalece no início da reação quando a concentração de lactose é alta. Conforme a reação prossegue, a atividade hidrolítica se torna predominante, levando a formação de glicose e galactose. O mecanismo de síntese de GOS procede em duas etapas consecutivas: a formação do complexo galactosil-enzima, com liberação simultânea de glicose, seguida pela transferência da fração galactose do complexo para um aceptor de galactose contendo um grupo hidroxila, sendo ele água (ocorrendo a

hidrólise e liberando galactose) ou outro carboidrato levando a derivados galactosilados (Guerrero *et al.*, 2015).

A nível industrial, apenas são utilizadas galactosidases microbianas, sendo maioritariamente provenientes de leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*) ou bolores (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*), tendo este último a vantagem do baixo preço, elevada estabilidade térmica e alta atividade específica de transgalactosilação (Vera *et al.*, 2016).

3.4.2 Transformações na gordura do leite

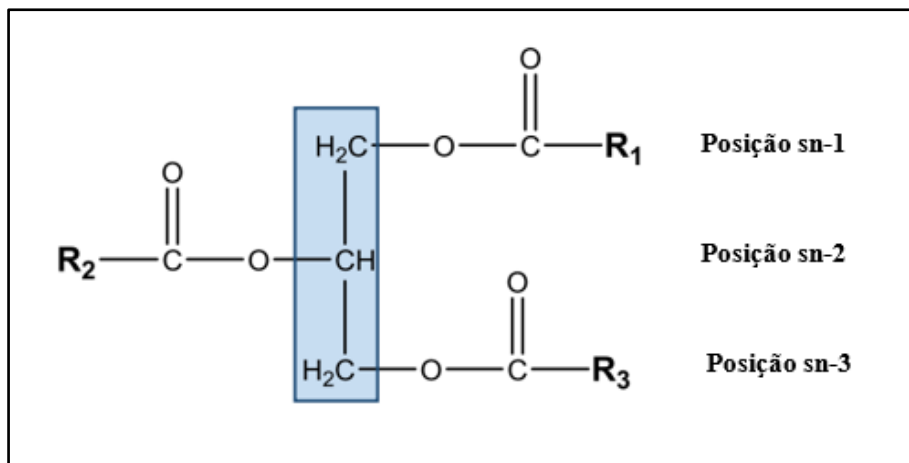
O leite das principais raças bovinas contém 3,5% a 5% de gordura, que é composta por mais de 400 ácidos graxos diferentes, principalmente presentes como triacilgliceróis (TAGs), tradicionalmente chamados de triglicerídeos. As frações de gordura do leite são amplamente utilizadas em uma variedade de produtos alimentícios, devido às muitas propriedades físicas, químicas e nutricionais favoráveis da gordura do leite (Feng *et al.*, 2024).

Na maioria dos países industrializados, o consumo de produtos lácteos está em declínio devido a uma imagem nutricional negativa da gordura do leite, relacionada à concepção de que a ingestão de gordura do leite está associada a um risco aumentado de desenvolver doença cardíaca coronária ou síndrome metabólica, associado principalmente a certos ácidos graxos saturados de cadeia média e longa, notavelmente os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), que são considerados como tendo ação aterogênica, por meio do aumento dos níveis de colesterol plasmático e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Miettinen *et al.*, 2013). Esses ácidos graxos compreendem cerca de 40% da gordura total do leite.

Outros ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite, como ácido esteárico (C18:0) e ácidos de cadeia curta (C4:0 e C10:0) são considerados como tendo efeitos neutros, enquanto os ácidos linoleico (C18:1) ou linolênico (C18:2) podem reduzir o nível de colesterol. No entanto, alguns componentes menores da gordura do leite, especialmente ácido linoleico conjugado (CLA), esfingomielina, ácido butírico, e ésteres de lipídios podem ter efeitos benéficos à saúde (Kontkanen *et al.*, 2011).

A fração lipídica no leite é muito heterogênea. A classe lipídica mais abundante no leite é o triacilglicerol (TAG), que é composto de três ácidos graxos esterificados em uma estrutura de glicerol, Figura 20, constituindo aproximadamente 95% de todos os lipídios. Cada ácido graxo pode ocupar uma das três posições, que são referidas usando

um sistema de numeração estereoespecífico (sn), com as duas posições extremas referidas como ácidos graxos sn-1 e sn-3 e a posição central como ácido graxo sn-2. Existem vários determinantes das propriedades físicas e bioquímicas de uma molécula de TAG, incluindo a posição de seus ácidos graxos, seu grau de saturação (número de ligações duplas) e sua configuração (cis ou trans).



Ácidos graxos (R1, R2 e R3) variam em seu comprimento e grau de insaturação em cada uma das três posições estereoespecíficas (sn-1, sn-2 e sn-3). A área sombreada representa a molécula de glicerol.

Figura 20. Estrutura geral de uma molécula de triacilglicerol (TAG).
(Elaborado pelo autor, 2024)

Recursos tecnológicos associados a métodos enzimáticos ou físico-químicos para modificar a composição da gordura do leite vem sendo utilizados. Lipases são esterases que catalisam a hidrólise da ligação éster de triacilgliceróis. A gordura do leite é hidrolisada por lipase para a produção de mono e diacilgliceróis que são usados como agentes emulsificantes e concentrados de sabor lácteo. Dessa forma, podem ser obtidos produtos de gordura do leite mais saudáveis usando lipases para remoção seletiva de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa dos TGAs (Kontkanen *et al.*, 2011).

A interesterificação enzimática usa enzimas lipase de origem microbiana e fornece uma redistribuição aleatória ou específica de ácidos graxos, dependendo da especificidade das lipases usadas (Mensink 2016).

As lipases usadas para interesterificação enzimática podem ser regeoespecíficas, estereoespecíficas ou específicas de ácidos graxos. As lipases regeoespecíficas, como as lipases derivadas de *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, são regeo-seletivas sn 1,3, portanto, elas reagem apenas com as ligações éster dos ácidos graxos localizados em sn-1 e sn-3 do TAG, no entanto, não com a posição sn-2 devido ao impedimento estérico. As lipases estereoespecíficas possuem a capacidade de hidrolisar as ligações localizadas

em sn-1 e sn-3 em taxas diferentes. As lipases específicas de ácidos graxos são específicas para uma classe particular de ácidos graxos, independentemente de sua posição (Sivakanthan & Madhujith, 2020).

O termo interesterificação se refere a um processo químico ou enzimático que reorganiza os ácidos graxos na estrutura de glicerol de uma molécula TAG, de uma maneira aleatória ou específica, que resulta em propriedades físico-químicas desejadas, ou aumentando ou incorporando ácidos graxos essenciais, como ácidos graxos poli-insaturados ou ácidos graxos de cadeia curta e média para produzir lipídios modificados com valor nutritivo aprimorado usando lipase específica para ácidos graxos (Kadhum & Shamma, 2017).

Neste estudo, as enzimas β -Gal e Lipase foram imobilizadas em suporte hidrofílico, biodegradável, usando como base os polímeros GEL e CMC para obtenção dos filmes ativos a serem utilizados como componente de embalagem de produtos lácteos. O objetivo principal da embalagem ativa desenvolvida é a hidrólise de lactose e triglicerídeos oriundos do leite bovino e concomitante as reações de transgalactosilação e interesterificação, obtendo produtos com baixo ou zero teor de lactose e formação de galacto-oligossacarídeos, redução do teor de gordura e modificações nos ácidos graxos liberados, resultando em produtos com melhores propriedades nutraceuticas e funcionais

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos utilizados para o preparo e caracterização dos filmes poliméricos foram executados de acordo com o fluxograma ilustrado na Figura 21.

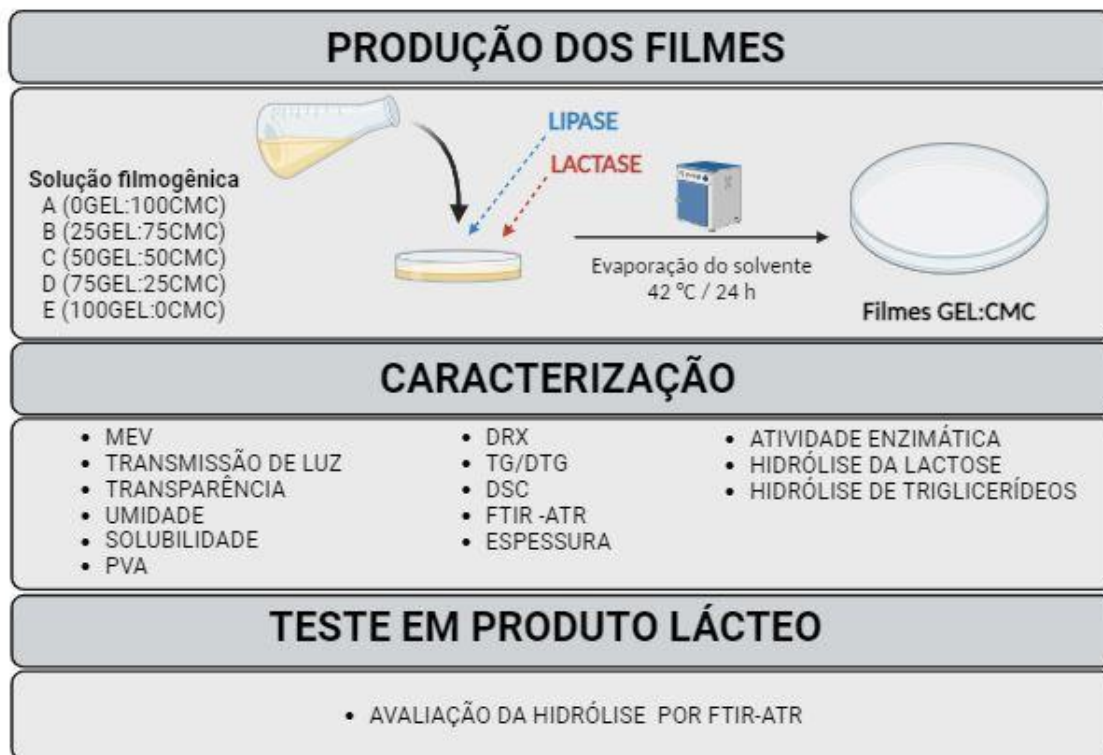


Figura 21. Fluxograma das metodologias utilizadas para preparo e caracterização das amostras.

4.1 MATERIAL

Gelatina alimentícia comercial de origem bovina, tipo B;

Carboximetilcelulose (CpKelco – Cekol 150);

Sorbitol (Exôdo);

β -galactosidase - *Kluyveromices lactis* (Docina Nutrição, Juiz de Fora, MG);

Lipase EC 3.2.1.1.3 *Aspergillus niger* 50,000 FIP/g (Fine Pharma – China);

Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Exôdo);

Tartarato duplo de sódio e potássio (Exôdo) ;

Glicose (Exôdo);

Lactose (Exôdo);;

Creme de leite integral e zero lactose (Piracanjuba, Laticínio Bela Vista S.A., Bela Vista de Goiás, GO, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos filmes

As soluções filmogênicas foram preparadas de acordo com o método descrito por Harizah, Isa e Sarbon (2016), com algumas modificações. Inicialmente preparou-se as soluções filmogênicas de GEL e CMC separadamente.

A solução de GEL foi preparada dissolvendo GEL em pó ($8\% \text{ m/v}_{\text{solução}}$) em água destilada à temperatura ambiente, mantendo em repouso por 20 min para hidratação do polímero, em seguida o sistema foi aquecido a 45°C por 20 min sob agitação lenta e contínua para gelatinização do polímero e adição do agente plastificante sorbitol ($20\% \text{ m/m}_{\text{sólido}}$), até total solubilização.

A solução de CMC foi preparada dissolvendo o polímero em pó ($3\% \text{ m/v}_{\text{solução}}$) juntamente com o sorbitol ($20\% \text{ m/m}_{\text{sólido}}$) em água destilada à temperatura ambiente e mantendo sob agitação contínua de 700 rpm, por 1 h (tempo necessário para completa solubilização do polímero em água). As soluções filmogênicas de GEL e CMC estão apresentadas na Figura 22.

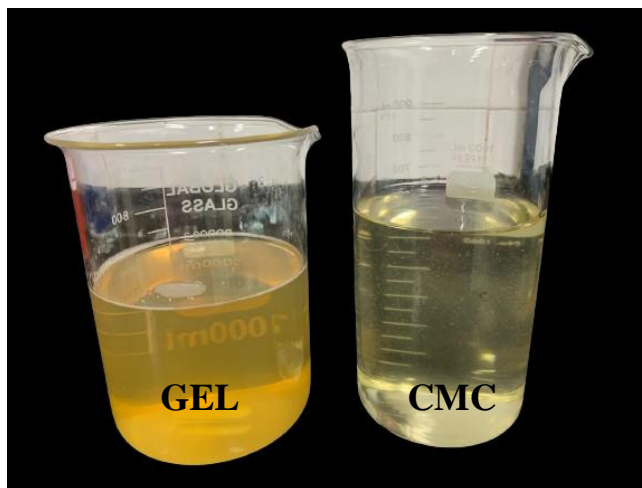


Figura 22. Solução filmogênica de GEL e CMC.

Os filmes foram preparados pelo método *casting*, seguindo a composição descrita na Tabela 1. A solução filmogênica foi espalhada em placas de Petri ($\Phi = 15 \text{ cm}$) e mantidas em estufa com circulação de ar a 42°C por 24 h, para evaporação do solvente. A massa de solução depositada nas placas de Petri foi determinada por testes prévios e variou de acordo com a composição dos filmes para que houvesse homogeneidade na

espessura dos filmes formados. Os filmes sem adição de enzimas foram estabelecidos como os filmes controles e os filmes com adição de enzimas como filmes ativos. As soluções filmogênicas das blendas estão apresentadas na Figura 23.

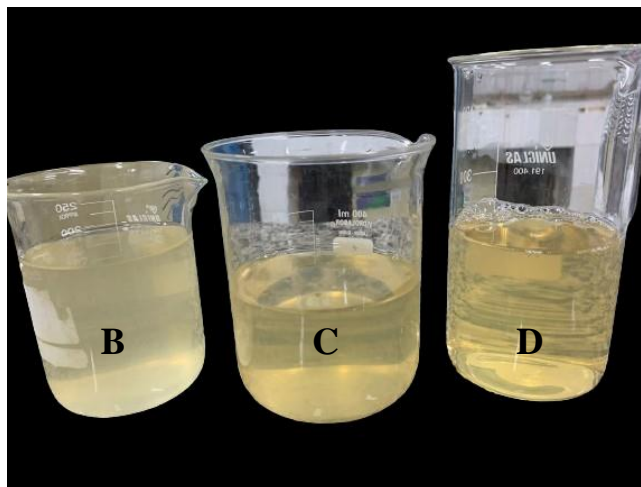


Figura 23. Solução filmogênicas das blendas GEL:CMC. Legenda: B(25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC) E D (75GEL:25CMC).

Tabela 1

Composição da solução de formação de filme com GEL e CMC.

Composição da solução de formação de filme			
Formulação	GEL (% m/v)	CMC (% m/v)	Massa (g)
A (0GEL:100CMC)	-	100	36
B (25GEL:75CMC)	25	75	34
C (50GEL:50CMC)	50	50	32
D (75GEL:25CMC)	75	25	30
E (100GEL:0CMC)	100	-	28

Para os filmes ativos adicionou-se enzima β -Gal (3% m/v_{solução}) e lipase (2% m/v_{solução}) as soluções filmogênicas, previamente preparadas, que foram homogeneizadas e depositadas nas placas de Petri com mesma composição dos filmes controle (sem enzima) descritas acima e submetidos às mesmas condições de secagem. Os cálculos para as concentrações de enzimas foram feitos previamente de acordo com as informações dos fornecedores e testes de bancada. A abreviação LL foi utilizada neste trabalho para indicar a presença das enzimas (lipase e lactase) nos filmes GEL:CMC.

A enzima β -Gal utilizada, a Lactase Docina (*Kluyveromices lactis*), é uma solução líquida de cor clara, tendendo ao marrom, que apresenta em sua composição glicerina (45-55%), água (35-45%), lactase (5-10%) e cloreto de magnésio (4,5-5,5%), é um

preparo utilizado para fabricação de produtos lácteos com baixo teor de lactose (leite fluido, leite aromatizado e leite condensado), produtos lácteos cultivados (iogurte, bebidas com iogurtes e queijos), sorvetes e soro de leite. Sua inativação é obtida a 75°C em 15 segundos. Foram realizados testes prévios com outras soluções enzimáticas e esta foi a que apresentou os melhores resultados de hidrólise e de estabilidade na imobilização. A lipase utilizada foi a LIPASE 50.000 FIP/g EC 3.2.1.1.3, obtida de *Aspergillus niger*, liofilizada, apresentando-se como um pó fino e branco, do fabricante Fine Pharma.

Após a secagem, os filmes foram mantidos em repouso à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), em bancada, por 24 horas para posterior remoção das placas, como ilustrado na Figura 24.

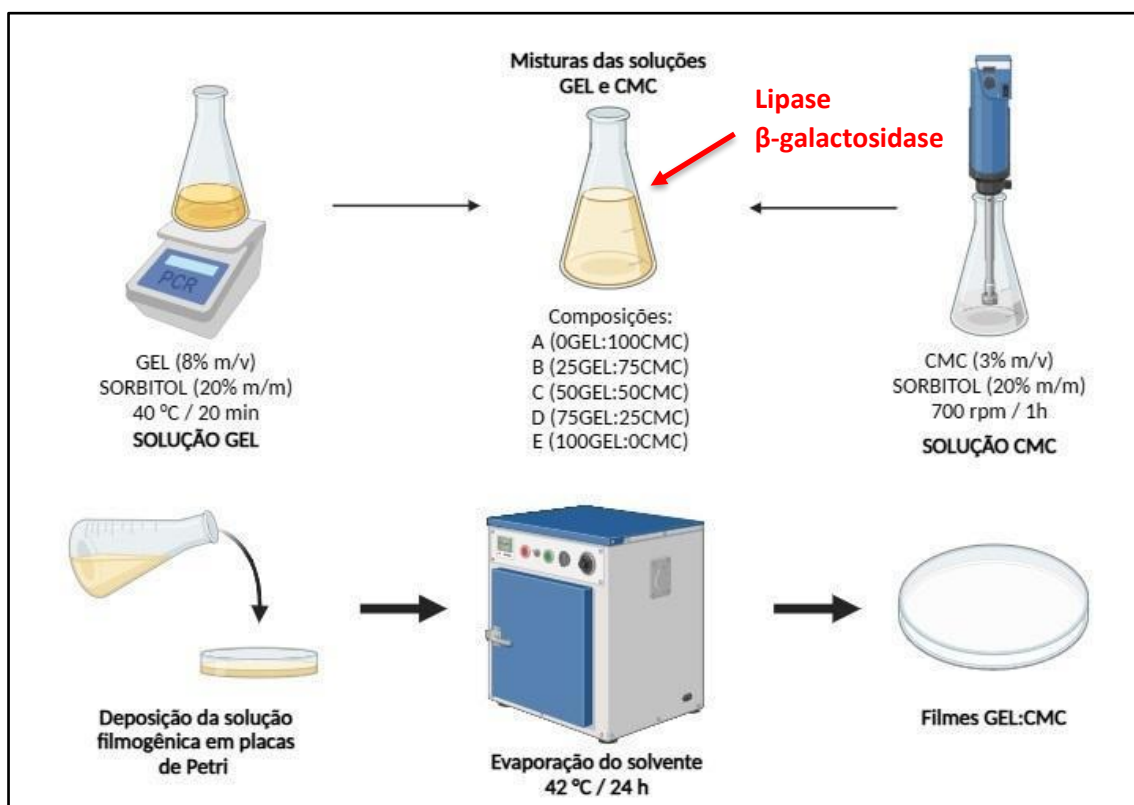


Figura 24. Ilustração do método *casting* para produção dos filmes.
(Elaborado pelo autor, 2024)

4.2.2 Medidas de espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (Digimatic Micrometer 406-350, Mitutoyo Corp., Japan) com precisão 0,001 mm. Para

cada formulação, foram feitas 5 medidas em 10 corpos de prova com dimensão de 20 x 90 mm, com 3 repetições e foi calculada a média dos valores coletados.

4.2.3 Solubilidade

A solubilidade dos filmes em água foi realizada de acordo com o método abordado por Onyeaka *et al.* (2023), com algumas modificações. Amostras do filme com 2,5 cm de diâmetro foram cortadas e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, a 80°C durante 24 h. Após este período, os filmes foram recuperados e pesados para determinar a sua massa seca inicial ($M_i \pm 0,0001$ g). Posteriormente, as amostras foram imersas em 30 mL de água destilada e o sistema foi mantido em agitação, durante 24 h à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e à 40 ± 3 °C. A água foi então escoada e a fração não solubilizada do filme foi seca em estufa de circulação de ar forçado (80 °C, 24 h) e pesada ($M_f \pm 0,0001$ g). As análises foram realizadas em triplicata, para cada repetição e para todas as formulações. A solubilidade do filme (SF%) foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$SF (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

No qual,

M_i é a massa inicial do filme seco (g);

M_f é a massa final do filme seco (g).

4.2.4 Determinação do teor de umidade

Um método padrão de secagem em estufa foi usado para determinar o teor de umidade como descrito por Akhtar *et al.* (2023), com algumas modificações. Aproximadamente 2 cm de diâmetro de filme cortado foi pesado ($M_i \pm 0,0001$ g) e seco em estufa a 80 °C por 24 h e após a secagem foi feita a medida da massa seca ($M_f \pm 0,0001$ g). As análises foram realizadas em triplicata, para cada repetição e para todos as formulações. O teor de umidade (%) foi calculado como a porcentagem da perda de massa seca de acordo com a Equação 2:

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

No qual,

Mi é a massa inicial do filme(g);

Mf é a massa final do filme seco (g).

4.2.5 Permeabilidade do vapor de água (PVA)

A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, segundo a metodologia ASTM E 96-00 (ASTM, 2000), com algumas modificações conforme descrito por Zafar *et al.* (2022). Potes de vidro contendo 15 g de sílica gel foram hermeticamente vedados com os filmes e rosqueados com a tampa contendo um furo circular de 4 cm de diâmetro. Os potes foram condicionados em câmara dessecadora (temperatura média de $26,5 \pm 0,7$ °C e umidade relativa média de $75 \pm 3\%$), contendo solução saturada de cloreto de sódio em seu interior, e mantidos sob esta condição por 48 h. Após este período, para determinar a quantidade de vapor de água permeado pelo filme, foi utilizada balança de precisão analítica para pesagens periódicas dos potes a cada 30 min, durante 7 h. O experimento foi realizado em triplicata, para cada repetição e para todas as formulações.

O ganho de massa, associado à umidade permeada pelo filme, em função do tempo foi representado graficamente e os pontos correspondentes ao trecho linear foram usados para cálculo da TPVA como mostra a Equação 3:

$$TPVA \text{ (g/h.m}^2\text{)} = \frac{G}{t * A} \quad \text{(Equação 3)}$$

No qual,

G/t é o coeficiente angular do trecho linear da reta ganho de massa x tempo (g/h), obtido pela regressão de mínimos quadrados;

A é a área exposta do filme (m²), correspondendo ao orifício das células de teste.

A PVA foi calculada conforme mostra a Equação 4:

$$PVA \text{ (g.mm/ h.m}^2\text{. kPa)} = \frac{TPVA * x}{\Delta P} \quad \text{(Equação 4)}$$

No qual,

TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água obtido (g/h.m²);

ΔP é a diferença de pressão de vapor considerando a umidade relativa do ambiente 75% e da sílica 0%, obtendo um valor de 1,7535 kPa;

x é a espessura do filme (mm).

4.2.6 Transmissão de luz e transparência

As propriedades da barreira de luz ultravioleta (UV) e visível (Vis) foram medidas usando um espectrofotômetro UV-Vis 1800 – Shimadzu (GPEEM-UFBA) de acordo com o descrito por Onyeaka *et al.* (2023), com algumas modificações. Tiras de filme de 1 x 4 cm foram cortadas e colocadas diretamente em uma célula de teste para filmes. Foi medido a transmitância em uma faixa de comprimento de onda selecionada (200-800 nm) e um teste de célula vazia foi usado como referência. As análises foram realizadas em triplicata, para cada repetição e para todas as formulações. A transparência do filme foi calculada de acordo com a Equação 5:

$$\text{Transparência} = \frac{-\log T_{600}}{x} \quad (\text{Equação 5})$$

No qual,

T é a transmissão (%) a 600 nm;

x é a espessura do filme (mm).

4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura dos filmes formados foi estudada na superfície e seção transversal usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610lv Jeol, Tokyo, Japan) operando a uma tensão de aceleração de 10,0 kV sob condição de alto vácuo. As amostras foram fixadas no suporte por uma fita de alumínio e depois revestidas com uma fina camada de ouro. A análise foi realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME), Instituto de Física, Universidade Federal da Bahia.

Durante o teste foi aumentada a corrente de 10 kV para 15 kV e foi observado que a carga mais alta provocava danos à estrutura do filme, causando perfurações na

superfície. Sendo assim, as micrografias foram capturadas na carga de 10 kV para garantir a segurança da amostra e a confiança das imagens.

4.2.8 Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas dos polímeros, das enzimas β -Gal e lipase e dos filmes ativos foram realizadas em analisador termogravimétrico (TG, Pyris 1, Massachusetts, EUA). Amostras de 5,0 mg foram acondicionadas em cápsula de platina e analisadas sob atmosfera de gás nitrogênio, com fluxo de 20 mL.min⁻¹, a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, entre 25 e 700°C. A análise foi realizada em triplicata para cada formulação.

4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A estabilidade térmica dos materiais foi avaliada através de um calorímetro exploratório diferencial (DSC-60 Plus, Shimadzu / Central Analítica PPEQ-UFBA). Aproximadamente 5 mg ($\pm 0,001$ mg) de filme foi cortado em pedaços pequenos e selado em placas de alumínio. Cada amostra foi aquecida a uma taxa de 10°C.min⁻¹ de 30 a 200°C. Uma panelinha de alumínio vazia foi usada como referência. A temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m) foram obtidas a partir das curvas de DSC.

4.2.10 Análise de difração de raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios-X para cada formulação de filme foram analisados por difratômetro de raios-X BRUKER AXS, modelo D2 PHASER do Laboratório de Tecnologia Mineral - Raios X do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com radiação Cu k- α ($\lambda = 1,54$ Å) a 30 kV e 15 mA. Amostras de filme (2 cm²) foram colocados no suporte da amostra e fixados por fita adesiva. Cada amostra foi digitalizada entre $2\theta = 3$ -60° a uma taxa de digitalização de 2°.min⁻¹.

O Índice de Cristalinidade Relativa (IC) dos filmes e da GEL foi quantitativamente estimado de acordo com o método de áreas proposto por Hermans & Weidinger (1948) e modificado por Rabek (1980), Figura 25. O Índice de Cristalinidade (em porcentagem) é definido como a razão entre a área da região cristalina (A_c) e a área

total coberta pela curva ($A_c + A_a$), composta pela área da região cristalina (A_c) e a área da região amorfa (A_a), a partir da Equação 6.

$$IC (\%) = \frac{A_c}{(A_c + A_a)} * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

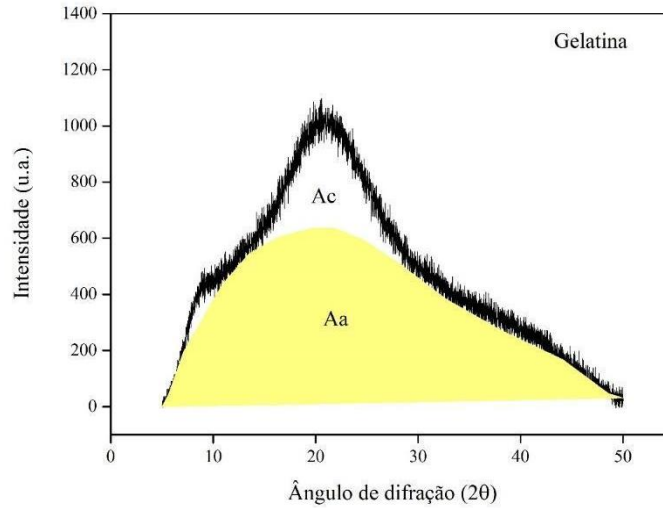


Figura 25. Difratograma de Raios-X da GEL, explicativo do método de determinação de Índice de Cristalinidade Relativa pelo cálculo de áreas. (Elaborado pelo autor, 2024)

Para materiais fibrosos e derivados celulósicos, o índice de cristalinidade relativo é quantificado de acordo com a relação das intensidades do pico cristalino e amorfo, conforme a metodologia proposta por Segal *et al.* (1959), como mostra a Equação 7 e Figura 26.

$$IC (\%) = \frac{I(002) - I(am)}{I(002)} * 100 \quad (\text{Equação 7})$$

No qual,

I_c = Índice de cristalinidade em percentagem;

$I(002)$ = máxima intensidade do pico de difração que representa o material cristalino na vizinhança de $2\theta = 22$;

$I(am)$ = mínima intensidade do pico de difração que representa o material amorfo na região de $2\theta = 18$.

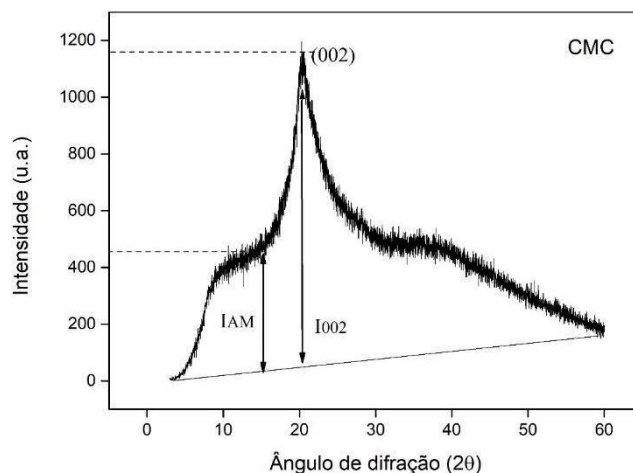


Figura 26. Difratoograma de Raios-X da CMC, explicativo do método de determinação de Índice de Cristalinidade Relativa pelo cálculo da intensidade de picos. (Elaborado pelo autor, 2024)

4.2.11 Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As estruturas secundárias dos filmes preparados foram analisadas através do modo de reflexão total atenuada (ATR) do Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (IRPrestige-21, Shimadzu, Cental Analítica PPEQ-UFBA). Tiras de filme de aproximadamente 1 cm² foram colocadas no suporte de amostra do Smart iTR ATR. Os espectros FTIR foram registrados de 600 a 4000 cm⁻¹ com uma resolução de 8 cm⁻¹ com um total de 32 digitalizações.

4.2.12 Ensaios de tração

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando-se o Texturômetro (TA.XT Plus, LABEA-UEFS), com célula de carga de 50 kg, velocidade e distância de separação entre as garras de 5 mm/min e 50 mm, respectivamente (ASTM, 2009). Para cada formulação, foram analisadas 10 amostras com dimensões de 20 mm x 90 mm. Dados de força e alongamento foram plotados em gráficos para determinação da força de tração (MPa), alongamento até o ponto de ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa) dos filmes.

A força de tração foi calculada através da razão entre a carga máxima e a área da seção transversal ($b * x$), da seguinte forma:

$$\sigma \text{ (MPa)} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{b * x} \quad \text{(Equação 8)}$$

No qual,

$F_{\text{máx}}$ é a carga máxima (N)

b é a largura da amostra (m);

x é a espessura da amostra (m).

A porcentagem de alongamento dos filmes até o ponto de ruptura foi calculada da seguinte forma:

$$AR (\%) = (l_{\text{máx}} / l_o) * 100 \quad (\text{Equação 9})$$

No qual,

$l_{\text{máx}}$ é a elongação do filme até o momento da ruptura (mm);

l_o é o comprimento inicial de cada amostra (mm).

O módulo de elasticidade (ϵ) é medido pela razão entre a tensão (σ) (Mpa) e a deformação relativa (D), dentro do limite elástico, em que a deformação é totalmente reversível, da seguinte forma:

$$\epsilon (\text{MPa}) = \sigma / D \quad (\text{Equação 10})$$

4.2.13 Hidrólise enzimática da lactose padrão

Para quantificar a lactose presente nas amostras foi utilizado o método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$), como método alternativo, proposto por Bai et al. (2023) com algumas modificações, que consiste na quantificação da glicose livre em reação.

A solução utilizada no método proposto é composta por ácido 3,5-dinitrosalicílico, substância que irá sofrer redução por meio do açúcar redutor, formando o 3-amino-5-nitrosalicílico, tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle, que é responsável por dificultar a reação do ácido com o oxigênio dissolvido e estabilizar a coloração obtida ao final dos procedimentos), hidróxido de sódio (utilizado para auxiliar na redução e dissolução do ácido 3,5-dinitrosalicílico). Neste método, a presença de açúcares redutores é identificada devido a mudança de coloração amarela, proveniente do DNS, para avermelhado, devido a formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. A intensidade da

coloração final da solução é proporcional à concentração de açúcares redutores provenientes da amostra.

O reagente DNS foi preparada utilizando-se 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico dissolvido em 40 mL de NaOH 1M, 30 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), completando o volume, em balão volumétrico de 100 mL, com água destilada.

Preparo da curva-padrão

Para elaboração da curva padrão, preparou-se soluções de glicose com concentrações de 70, 35, 14, 7, 0,7 e 0,07 mg/mL, com água Mili-Q. Após este procedimento foram coletadas alíquotas de 0,5mL, para cada concentração, e adicionado 0,5 mL do reativo DNS em tubos de ensaio. Em seguida, levou-se ao banho-Maria, mantendo a ebulição por 5 minutos. As amostras foram, então, resfriadas em banho de gelo por 3 minutos e completou-se o volume dos tubos para 10 mL. Para o preparo do padrão de referência, adicionou-se em um tubo 0,5 mL de água Mili-Q e 0,5 mL de reativo DNS e o mesmo procedimento descrito anteriormente para as soluções de glicose foi aplicado. Os tubos foram homogeneizados e foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis (1800 – Shimadzu, GPEEM-UFBA).

β -galactosidase livre

Para avaliar a hidrólise da lactose preparou-se uma solução padrão de lactose (5% m/v_{solução} - valor médio de lactose presente no leite) e β -Gal livre foi adicionada na concentração de 3% m/v solução (mesma proporção adicionada aos filmes ativos). O sistema foi mantido a 40°C por 2h (temperatura e tempo descritos na orientação do fabricante para ação da enzima). A reação foi preparada como descrito para o preparo da curva padrão. Foi feita uma amostra para reação com a enzima livre e uma amostra controle (apenas com a solução padrão de lactose 5% m/v). Para o preparo do padrão de referência, adicionou-se em um tubo 0,5 mL de água Mili-Q e 0,5 mL de reativo DNS e o mesmo procedimento descrito anteriormente para as soluções de glicose foi aplicado. Os tubos foram homogeneizados e foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis (1800 – Shimadzu, GPEEM-UFBA).

Filme ativo

Para avaliar a atividade enzimática do filme ativo em relação à hidrólise de lactose, cortou-se 3 círculos com área de 10 cm² de todas as formulações dos filmes e foram imersos, cada um, em 10 mL de solução padrão de lactose 5% (m/v solução), mantidos a 40°C por 240 min, Figura 27. A proporção de filme ativo para os testes enzimáticos foi de 1cm² por mL de solução.

Para o preparo do padrão de referência, adicionou-se em um tubo 0,5 mL de água Mili-Q e 0,5 mL de reativo DNS e o mesmo procedimento descrito anteriormente para as soluções de glicose foi aplicado. Os tubos foram homogeneizados e foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis (1800 – Shimadzu, GPEEM-UFBA). Para cada filme foi feito um branco utilizando o filme controle para eliminar qualquer interferência no valor da hidrólise da lactose.

Uma unidade de atividade de β -Gal (U) foi definida como a quantidade de enzima (mL) que catalisa a formação de 1 μ mol de açúcar redutor (AR) por min de reação sob as condições específicas acima.

$$U (\mu\text{mol}/\text{min.g}) = \frac{\text{Acréscimo de AR } [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}] * E [\text{mL}]} \quad (\text{Equação 11})$$

No qual,

t = tempo de reação (min);

E = quantidade de enzima utilizada (mL).

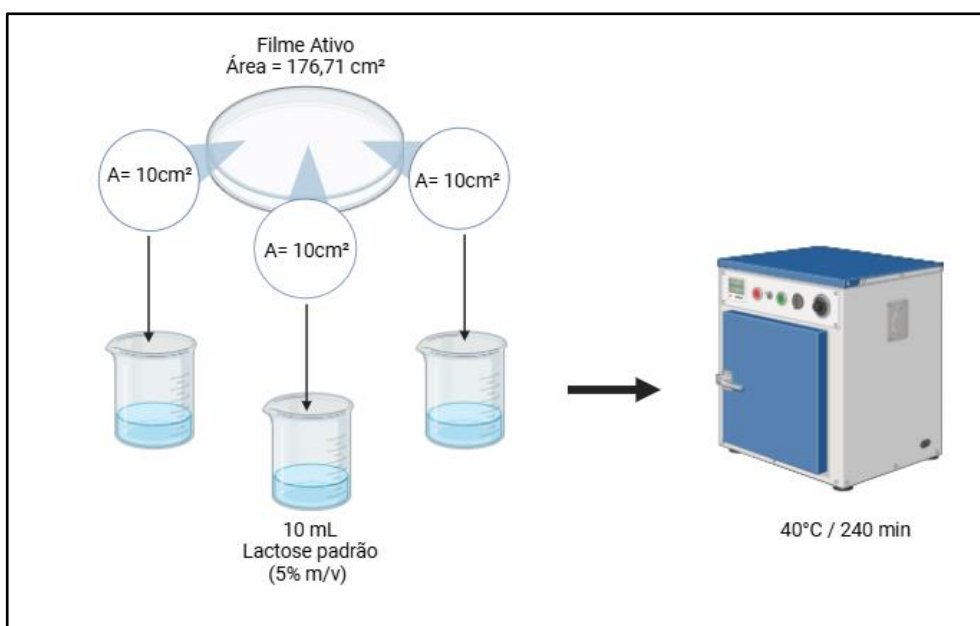


Figura 27. Preparo das amostras para o teste de hidrólise. (Elaborado pelo autor, 2024)

4.2.14 Hidrólise enzimática de lipídios

A eficiência da hidrólise lipídica foi avaliada pela determinação do teor total de ácidos graxos produzidos antes e após a hidrólise enzimática usando tanto a enzima livre como a imobilizada nos filmes poliméricos de GEL:CMC, conforme a metodologia descrita por Neves *et al.* (2024), com algumas modificações. Como substrato para a reação foi utilizado o creme de leite, da marca Piracanjuba, devido ao maior teor lipídico em sua composição entre os produtos disponíveis no mercado. A amostra foi diluída em água destilada com uma proporção de 1:1, para melhor dispersão dos lipídios em solução. Em seguida pedaços de filmes ativos foram cortados com uma área de 2 cm² e posicionados no fundo de frascos Erlenmeyer (50 mL) e 2 mL da amostra diluída foi adicionado, mantido em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C por 240 min. A hidrólise dos triglicerídeos foi determinada ao fim do tempo de reação adicionando-se 5 mL de álcool absoluto para paralisar a ação enzimática e foi feita a titulação com KOH (0,02M), utilizando fenolftaleína como indicador, Figura 28. A padronização do titulante foi feita com biftalato de potássio e o cálculo do teor de ácidos graxos hidrolisados foi feito da seguinte forma:

$$\text{Teor de ácido graxo (g/L)} = \frac{V \cdot N \cdot MM}{m} \quad (\text{Equação 12})$$

No qual,

V= volume gasto de KOH (mL);

N= normalidade da solução KOH (mol/L);

MM= massa molecular do ácido oleico (g/mol);

m= volume de amostra titulada (mL).

Foi avaliado o efeito da hidrólise para enzima livre adicionando 2% (m/v) da lipase diretamente na amostra e o experimento foi conduzido da mesma maneira para os filmes ativos. Foi quantificado também o teor inicial de ácidos graxos da amostra controle, sem adição de enzimas ou filmes ativos, para ser usado como referência na comparação dos resultados. Uma unidade de atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima (g) necessária para catalisar a formação de 1 μmol de ácido graxo por min de reação sob as condições específicas acima.

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}.\text{g}) = \frac{\text{Acréscimo de ácido graxo } [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}] * E [\text{g}]} \quad (\text{Equação 13})$$

No qual,

t = tempo de reação (min);

E = quantidade de enzima utilizada (mL).

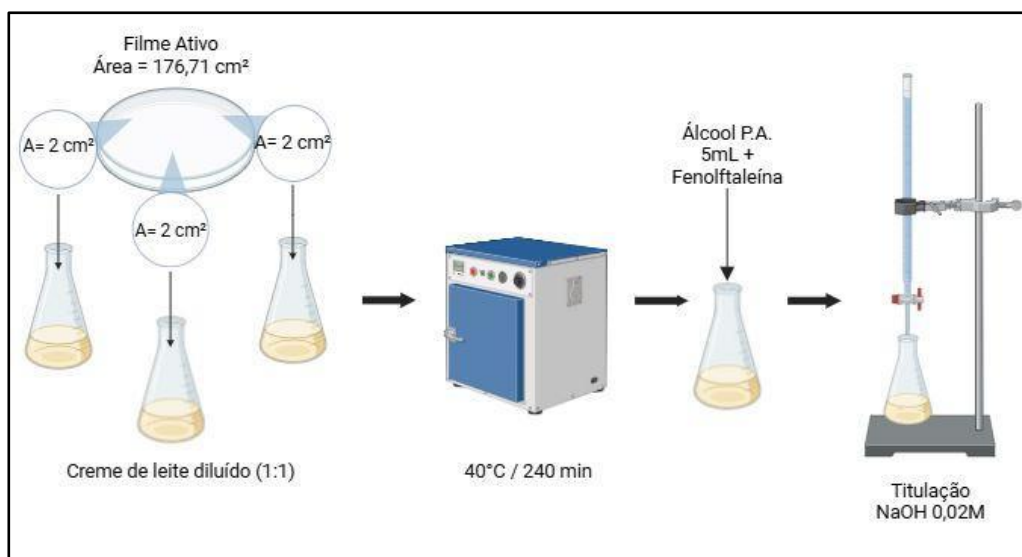


Figura 28. Teste de hidrólise dos triglicerídeos. (Elaborado pelo autor, 2024)

4.2.15 Análise da hidrólise enzimática por FTIR

O efeito simultâneo da hidrólise enzimática da lactose e dos triglicerídeos obtidas pelo contato com os filmes ativos de GEL:CMC pode ser observado por meio de análises de FTIR, como mostrado por Ribeiro *et al.* (2023) e Sharma *et al.* (2019). A espectroscopia no infravermelho médio é um dos métodos mais utilizados para análise de leite e produtos lácteos e vários aspectos favorecem o uso do FTIR para o controle de qualidade do leite, especialmente seu potencial como método de triagem para detectar adulteração.

Para avaliar a hidrólise da lactose e dos triglicerídeos presentes no leite, foram utilizadas amostras de creme de leite e como referência o creme de leite sem lactose da mesma marca (Piracanjuba). Pedacos do filme (2 cm²) foram cortados e colocados em contato com uma solução contendo 2 g de creme de leite e 2 mL de água. O sistema foi agitado e levado à estufa e aquecido a 40 °C por 2 h. O sistema foi agitado a cada 20 min para homogeneização e dissolução completa dos filmes no meio líquido. Após o período

de reação, os espectros foram lidos utilizando o modo de reflexão total atenuada (ATR) do espectrômetro FTIR, com os mesmos parâmetros descritos no item 4.2.11 desta seção

4.2.16 Análise estatística

A regressão linear e o teste de Tukey, onde se aplicam, foram utilizados para detectar o efeito da formulação dos filmes e da adição das enzimas nas propriedades dos filmes, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico STATISTIC 7.0 e Origin 9.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS VISUAIS E MICROGRAFIA DOS FILMES

Após a evaporação do solvente, os filmes foram retirados das placas de Petri, os aspectos visuais dos filmes controles e ativos foram avaliados e apresentaram-se uniformes, transparentes, homogêneos e com boa flexibilidade. Observando o desprendimento dos filmes das placas de acrílico, os filmes ativos apresentaram maior aderência à superfície, explicado pelo aumento do teor de plastificante com a adição da enzima β -Gal, que contém glicerina em sua composição e conferiu maior elasticidade à estrutura polimérica e maior aderência.

Os filmes de composição A (0GEL:100CMC) apresentaram-se mais translúcidos que os demais filmes que continham GEL na composição e à medida que aumentou a concentração da GEL na composição, os filmes apresentaram uma tonalidade mais escura (amarelada), característico da solução de GEL, como mostra as Figuras 29 e 30.

O efeito da GEL na transparência dos filmes foi estudado por meio do teste de transparência, utilizando a quantificação da transmissão de luz em comprimento de onda específico, discutido posteriormente neste trabalho e confirmando o observado.



Figura 29. Efeito da adição de gelatina na transparência dos filmes.

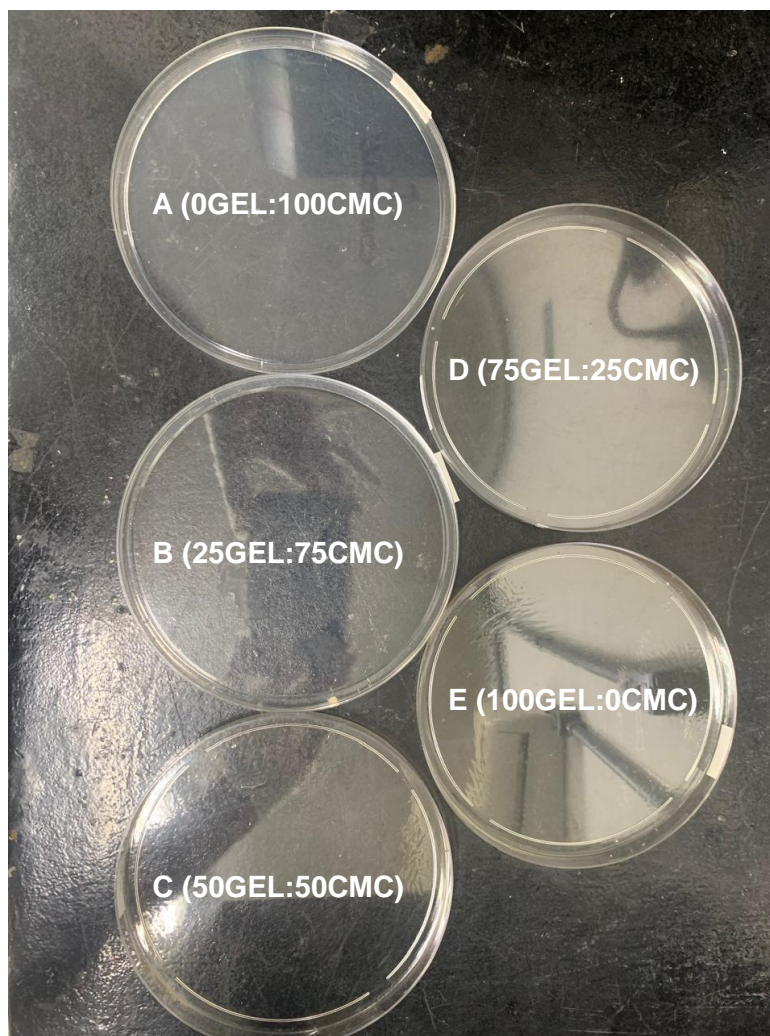


Figura 30. Filmes depositados nas placas de Petri.

Os aspectos visuais dos filmes foram confirmados, também, por meio das imagens de MEV. As imagens da superfície foram ampliadas x1000, porém, as imagens da seção transversal foram ampliadas em escalas variadas para obter a melhor captura, os filmes (devido a sua maleabilidade) não conseguiam ficar em um ângulo de 90° variando a inclinação no suporte e consequentemente a aproximação. Através das micrografias da superfície e da seção transversal foi possível observar a formação de uma estrutura regular e uniforme, indicando que há boa interação entre os polímeros utilizados e que não houve, para os filmes, sedimentação das enzimas adicionadas nem comprometimento da estrutura.

Na micrografia do filme E controle (100GEL:0CMC), Figura 31, é possível observar algumas manchas escuras na superfície do filme, possivelmente ligadas a estrutura química da proteína da GEL, ou seja, durante a secagem, pode ter ocorrido a

reorganização das cadeias de polímeros formando uma estrutura fibrosa, como observado por Samsi *et al.* (2019), e/ou a deposição do filme na fita de alumínio pode ter acentuado a formação das manchas, o filme não aderiu uniformemente na fita, criando pequenas bolhas.

De maneira similar, o filme D ativo (75GEL:25CMC:LL) apresentou rugosidades em sua estrutura ocasionadas provavelmente por vibrações da estufa durante o processo de evaporação do solvente. Estes fenômenos observados não estão associados a formação de poros, nem a estrutura de esponja como observado por Esteghlal, Niakousari e Hosseini (2018) em seu estudo para filmes de GEL:CMC, no qual uma maior concentração de CMC ocasionou maior estabilidade e resultou em filmes homogêneos e com uma estrutura regular, iguais aos resultados encontrados na presente pesquisa.

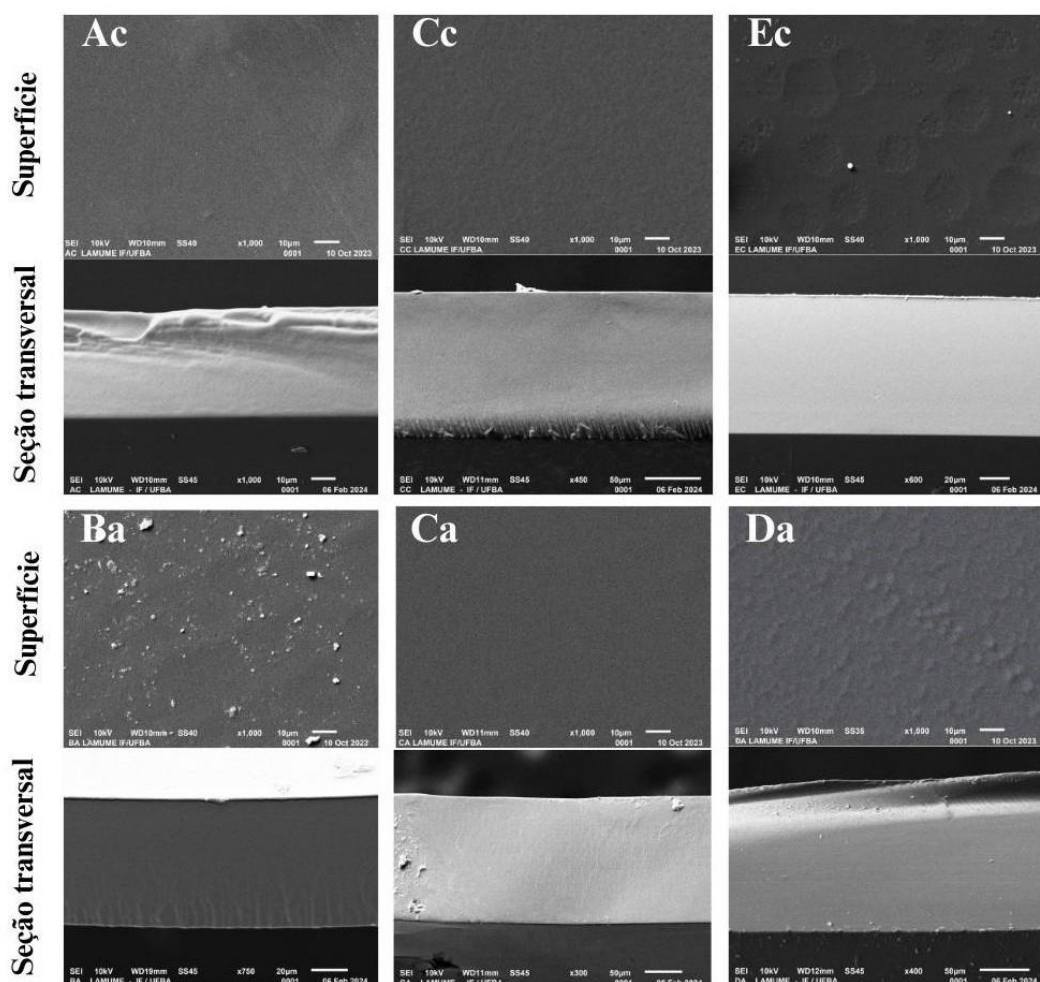


Figura 31. MEV da superfície e seção transversal dos filmes controles Ac (0GEL:100CMC), Cc (50GEL:50CMC) e Ec (100GEL:0CMC) e dos filmes ativos Ba (25GEL:75CMC:LL), Ca (50GEL:50CMC:LL) e Da (75GEL:25CMC:LL). *LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v)

As partículas que foram capturadas na micrografia da formulação B ativo (25GEL:75CMC:LL) estão na superfície do filme e não em sua estrutura, caracterizando possíveis sujidades que aderiram ao filme durante a manipulação. No geral, as micrografias dos filmes foram semelhantes, garantindo que todas as formulações observadas estão com uma matriz homogênea e uma estrutura uniforme, firme, densa e coesa.

Na imagem da fratura C do filme controle (50GEL:50CMC) e do B ativo (25GEL:75CMC:LL) é possível observar uma série de estratificações estriadas da superfície em que foi aplicada a força de quebra para o interior da amostra. Este perfil característico indica que a amostra estava rígida (devido ao efeito do congelamento por nitrogênio líquido) e fraturou-se sob efeito da força aplicada sem mostrar tendência à flexibilidade, ocasionando uma certa ranhura na estrutura da seção transversal.

5.2 CONTEÚDO DE UMIDADE E SOLUBILIDADE

Os valores correspondentes ao conteúdo de umidade para as diferentes formulações de filmes de GEL:CMC e o efeito da adição das enzimas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

Conteúdo de umidade nos filmes controle e ativos.

Formulação	Filme Controle (%)	Filme Ativo (%)
A (0GEL:100CMC)	17,35 ± 1,73 ^{aB}	22,91 ± 1,06 ^{aA}
B (25GEL:75CMC)	15,50 ± 0,22 ^{abB}	19,34 ± 0,14 ^{bA}
C (50GEL:50CMC)	14,83 ± 0,70 ^{bB}	17,10 ± 0,20 ^{cA}
D (75GEL:25CMC)	13,59 ± 0,10 ^{bA}	14,43 ± 0,43 ^{dA}
E (100GEL:0CMC)	11,00 ± 0,56 ^{cA}	12,74 ± 0,86 ^{dA}

Médias seguidas da mesma letra minúscula em mesma coluna correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias seguidas da mesma letra maiúscula em mesma linha correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores são expressos pela média ± desvio padrão.

Analisando o efeito da composição dos filmes controles, o conteúdo de umidade do filme A (0GEL:100CMC) foi de 17,35 ± 1,73% e diferiu significativamente ($p < 0,05$) das formulações com a concentração de GEL maiores que 50%, indicando que a adição

de GEL na matriz, a partir desta concentração, reduz a umidade do filme formado. A diferença relativa de umidade do filme A para o C (50GEL:50CMC) foi de aproximadamente 14,52%.

O filme E (100GEL:0CMC) obteve um teor de umidade de $11,00 \pm 0,56\%$, sendo 36,6% menor que o filme A e diferiu significativamente das demais formulações ($p < 0,05$), indicando que a CMC possui maior absorção da umidade em relação a GEL, sendo o polímero mais hidrofílico.

Dessa forma, o conteúdo de umidade para as blends GEL:CMC apresentaram valores intermediários, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles (filmes B, C e D), com uma média de $14,64 \pm 0,97\%$ de umidade.

A CMC apresenta uma pequena porção hidrofóbica em sua estrutura molecular e, ao mesmo tempo, grupos hidroxila e carboxil hidrofílicos, que dão a CMC a capacidade de se ligar à água e absorver umidade, tornando um polímero anfifílico, permitindo a interação entre meios com diferentes polaridades. A presença de substituintes com grupos -CH₂-COOH (carboxila) em sua cadeia polimérica promove o afastamento das cadeias reduzindo a cristalinidade da CMC, quando comparado com a celulose “in natura”, viabilizando a penetração de água, o que confere a CMC elevada solubilidade neste solvente, ainda que a frio. Quanto maior for o grau de substituição do grupo hidroxila (-OH) da cadeia polimérica por grupos contendo carboxilas, maior será a absorção de água e a complexidade das ligações de hidrogênio, aumentando a solubilidade em água, e mais estável e viscosa será a solução formada (Pourmadadi *et al.*, 2023).

Geralmente, interações entre proteínas e polissacarídeos podem ocorrer de forma não covalente ou covalente (Dickinson, 2008). As interações não-covalentes são inespecíficas e podem ser divididas em dois grupos: atração e repulsão entre polímeros de cargas opostas. Este tipo de interação em solução contribui para a formação de complexos e para a imiscibilidade (incompatibilidade termodinâmica) de polímeros. Estas interações são afetadas principalmente por fatores intrínsecos (natureza do polímero, densidade de carga e concentração) e fatores extrínsecos (pH, força iônica, temperatura). Já as interações covalentes são altamente específicas, estabelecendo uma ligação permanente e uma interação irreversível entre proteínas e polissacarídeos (Schmitt *et al.*, 1998).

Interações não específicas e específicas têm sua própria funcionalidade, que é afetada pela magnitude dessas interações (atração ou repulsão, grau de energia de ligação,

etc). Interações específicas, fortes e irreversíveis entre a proteína e o polissacarídeo durante a formação do complexo são estabelecidas por ligação covalentes ou hidrofóbicas. Essa interação é comumente conhecida como glicosilação de proteínas e polissacarídeos, alcançada pela reação química de grupos amino das proteínas e grupos carboxílicos dos polissacarídeos, resultando em uma amida ligada covalentemente. A ligação covalente pode ser induzida pela desidratação do complexo (por exemplo, através da reação de Maillard), com aquecimento ou pela adição de um agente de reticulação (por exemplo, a CMC) (Schmitt *et al.*, 1998).

O aumento da concentração de GEL na matriz do filme pode ter estabelecido interações específicas que reduziram a acessibilidade aos grupos carboxílicos e hidroxilas que se ligam com a água reduzindo o teor de umidade dos filmes formados. Em relação aos filmes ativos, foi observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) no conteúdo de umidade a partir da adição de 25% de GEL na composição dos filmes. Os filmes ativos possuem maior quantidade de plastificante em sua matriz, devido ao teor de glicerina que compõe a solução enzimática da β -Gal. Dessa forma, as enzimas e a glicerina interagem com os constituintes da matriz polimérica aumentando o espaço livre entre as cadeias, facilitando a ligação e a permeação da água no filme e consequentemente, aumentando o seu caráter hidrofílico. A redução da umidade entre as diferentes formulações dos filmes ativos é explicada, da mesma forma para os filmes controle, pela associação da GEL com a CMC, reduzindo a disponibilidade de hidroxilas, resultando em menos interações com a água, afetando assim o conteúdo de umidade dos filmes.

Comparando o efeito da adição das enzimas em relação ao filme controle, observa-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC) e C (50GEL:50CMC) dos filmes controles em relação aos filmes ativos. Essas formulações são as que possuem maiores concentrações de CMC reforçando a redução da cristalinidade da cadeia polimérica dos filmes devido às ligações das enzimas e dos plastificantes com os grupos hidroxila, juntamente com outros grupos da matriz hidrofílica de CMC, facilitando a permeação de água, obtendo um teor de umidade superior para os filmes ativos. Nas formulações D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC) a adição das enzimas não ocasionou efeito ($p > 0,05$) sobre o teor de umidade, mostrando que a interação das enzimas com a GEL não compromete a disponibilidade dos grupamentos responsáveis pela interação com a água.

Um efeito semelhante às diferentes composições dos filmes foi observado por Sadi & Ferfera-Harrar (2023) produziram filmes de GEL:CMC incorporados com

nanopartículas de Ge-montmorilonita e antocianinas de repolho roxo como indicador de pH colorimétrico e extrato de folhas de pistache como agente ativo, no qual houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no teor de umidade dos filmes incorporados com as nanopartículas em relação ao filme controle (GEL:CMC) que apresentou um teor de umidade de $18,33 \pm 0,23\%$. A redução de umidade foi explicada pela interação das nanopartículas com os grupamentos hidroxilas e outros grupos presentes na matriz, reduzindo a interação com a água.

Akhtar *et al.* (2023) encontrou valores de teor de umidade para os filmes de CMC de $27,91 \pm 1,81\%$ havendo uma redução significativa ($p < 0,05$) do valor com a adição de polissacarídeos de folhas de amoreira, da mesma forma foi observado uma redução na solubilidade dos filmes. Para o filme de CMC a solubilidade foi de $73,11 \pm 1,15\%$ e a medida que aumentava a concentração de polissacarídeos este valor era reduzido devido às ligações estabelecidas com a matriz, deixando os grupos hidroxila e carboxil menos disponíveis para interagir com as moléculas de água.

No presente estudo, todas as formulações, tanto para os filmes controles como para os ativos foram 100% solúveis em água, mantendo a característica hidrofílica dos polímeros utilizados. O teste foi realizado em temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) e a $40 \pm 3^\circ\text{C}$. A diferença entre as duas temperaturas foi o tempo de solubilização. Para os filmes expostos à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) a solubilização completa de todas as amostras foi em torno de 20 min de contato com a água, sob agitação. Na temperatura $40 \pm 3^\circ\text{C}$, o tempo reduziu para 5 min.

Etxabide *et al.* (2024) estudou o efeito da foto reticulação em filmes antimicrobianos de GEL contendo nanocristais obtidos a partir d quitina e obteve resultado semelhante a solubilidade dos filmes de GEL deste estudo, por exemplo o filme E (100GEL:0CMC), sendo 100% solúveis em água. Foi realizada uma foto reticulação em tempos variados e à medida que o tempo aumentou para até 2 h, a solubilidade foi reduzida em 71% devido à formação de um sistema altamente reticulado.

Este resultado indica que os filmes, solúveis em água, irão solubilizar inteiramente na embalagem, garantindo a completa distribuição das enzimas para todo o produto, uma vez que os filmes produzidos serão depositados na ultima camada de uma embalagem multicamada, em contato diereto com o produto lácteo.

5.3 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes são medidas importantes para aplicação de materiais de embalagens na maioria dos casos, as transferências de umidade através do material de embalagem de alimentos devem ser minimizadas. As propriedades de barreiras dos filmes dependem da temperatura e da umidade relativa do ambiente, das características e das interações entre os polímeros utilizados e o permeante, associado à polaridade de cada componente. Dentre as características mais importantes do filme, relacionadas à permeação, estão a espessura, a estrutura química do polímero, sua estrutura molecular (especialmente a cristalinidade), a energia de coesão e o espaço-livre entre as macromoléculas. Estas propriedades são definidas a partir do processo de obtenção dos filmes (produção) e do material (polímeros e plastificantes) utilizados em cada formulação. Os dados coletados de PVA para as diferentes formulações de blendas produzidas a partir dos polímeros GEL e CMC e a comparação entre os filmes controles e ativos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3

Valores de PVA para as formulações dos filmes controle e ativos de GEL:CMC.

PVA (g.mm/h.m². kPa)		
Formulação	Filme Controle	Filme Ativo
A (0GEL:100CMC)	0,398 ± 0,047 ^{aB}	1,136 ± 0,087 ^{aA}
B (25GEL:75CMC)	0,447 ± 0,031 ^{aB}	1,272 ± 0,083 ^{aA}
C (50GEL:50CMC)	0,343 ± 0,052 ^{bB}	1,300 ± 0,060 ^{aA}
D (75GEL:25CMC)	0,330 ± 0,176 ^{bB}	1,099 ± 0,173 ^{aA}
E (100GEL:0CMC)	0,198 ± 0,010 ^{bB}	0,569 ± 0,161 ^{bA}

Médias seguidas da mesma letra minúscula em mesma coluna correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias seguidas da mesma letra maiúscula em mesma linha correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores são expressos pela média ± desvio padrão.

Em relação aos filmes controles, as formulações A (0GEL:100CMC) e B (25GEL:75CMC) não diferem significativamente ($p > 0,05$), indicando assim que a adição de 25% de GEL na composição da blenda não altera a hidrofiliabilidade característica da CMC. Já as formulações C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos filmes A e B, não diferindo entre si, indicando que a partir da composição de 50% em relação ao teor de GEL, os filmes apresentam menor hidrofiliabilidade, ou seja, a CMC possui maior permeabilidade

ao vapor de água do que a GEL, que pode ser explicado pelo aumento do volume livre da matriz composta causada pelos grupos aniônicos mais volumosos da CMC, levando assim a uma maior absorção de água através do filme, como observado por Nazmi, Isa e Sarbon (2017) em seu estudo, comparado GEL bovina e de pele de frango reticuladas com a CMC. Para a GEL bovina, obtiveram um valor de PVA de $1,59 \pm 0,18$ (g.mm/h.m². kPa), aproximando-se do valor encontrado para os filmes ativos neste trabalho.

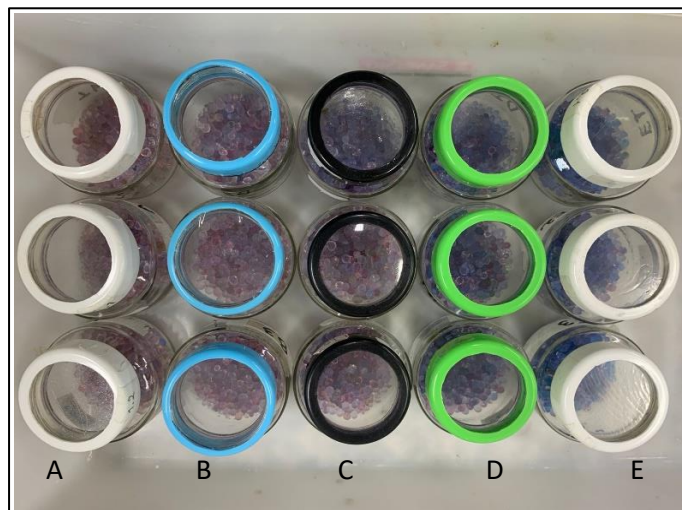
O valor da PVA é característico de cada composição devido a influência de diversos fatores sendo assim, He *et al.* (2022) avaliou o efeito da secagem no valor da PVA em filmes de GEL:CMC e a redução da umidade relativa das condições de secagem resultou em valores de PVA mais altos. Para secagem a uma temperatura de 23°C a PVA foi de $1,607 \pm 0,062$ (g.mm/h.m².kPa) e para secagem a 50°C foi de $2,015 \pm 0,157$ (g.mm/h.m².kPa), contrariando o sugerido de que as cadeias poliméricas seriam mais coesas sob maior temperatura de secagem, apresentando menor valor de PVA.

Observa-se um aumento na PVA dos filmes ativos em relação aos filmes controle ($p < 0,05$), explicado pela adição das enzimas β -Gal e lipase, que consequentemente eleva o conteúdo de plastificante pela presença de glicerina na composição da β -Gal. O aumento da concentração de plastificante na formulação ocasiona uma redução nas propriedades de barreira contra o vapor de água, devido a característica hidrofílica do plastificante, facilitando a solubilização do permeante (vapor de água) no polímero. Os plastificantes conferem uma flexibilidade maior à estrutura polimérica, aumentando a mobilidade das macromoléculas, facilitando a difusão da água nas moléculas do filme. O efeito do plastificante depende da concentração na matriz polimérica. Além do efeito do plastificante há também a interação entre as enzimas e a matriz que promove um afrouxamento na estrutura do filme, facilitando a permeação da água.

Entre os filmes ativos as formulações A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC) e D (75GEL:25CMC) não diferiram significativamente ($p > 0,05$), diferindo apenas de E (100GEL:0CMC) ($p < 0,05$). Esse resultado indica que a associação da enzima e da CMC, trazendo maior conteúdo de plastificante, provocou uma redução significativa nas propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes, aumentando a PVA, mas este efeito foi reduzido no filme E (100GEL:0CMC), reforçando o resultado obtido para os filmes controle de que a GEL possui maior barreira ao vapor de água do que a CMC.

A diferença entre as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes foi observada, também, pela saturação da sílica com a umidade permeada em maior

proporção para os filmes contendo maior quantidade de CMC na formulação, como mostra a Figura 32 com a sílica mais saturada (rosa) para o filme A e menos saturada (azul) para o filme E.



Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 32. Permeação de água através da matriz polimérica dos filmes ativos para a sílica gel nas diferentes formulações testadas.

5.4 TRANSMISSÃO DE LUZ E TRANSPARÊNCIA

Os resultados da espectrofotometria UV-vis, em comprimentos de onda selecionados, dos filmes controles e ativos de GEL:CMC em diferentes composições estão dispostos na Tabela 4.

A adição de 25% de GEL, filme B (25GEL:75CMC), na composição do filme controle provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) na transmissão de luz UV (280 nm) comparado ao filme A (0GEL:100CMC). A formulação E (100GEL:0CMC) obteve uma transmissão de $1,969 \pm 0,836$ %, com uma absorção de luz UV de aproximadamente 98%, indicando que a GEL possui melhor propriedade de barreira contra luz UV do que a CMC, que apresentou uma transmissão de $68,180 \pm 1,247$ %. Os valores mais baixos de transmitância de luz UV nos filmes de GEL podem ser atribuídos à presença de aminoácidos aromáticos ao longo da estrutura polipeptídica da GEL (Bakry, Isa & Sarbon, 2017).

Tabela 4

Valores de transmissão de luz em comprimentos de onda selecionados dos filmes controles e ativos de GEL:CMC com diferentes formulações.

	Transmissão de luz (%)						
	200 nm	280 nm	350 nm	400 nm	500 nm	600 nm	800 nm
<i>Controle</i>							
A	0,572 ± 0,204 ^a	68,180 ± 1,247 ^a	80,797 ± 0,863 ^a	84,403 ± 1,013 ^a	86,417 ± 1,004 ^{abcd}	87,334 ± 0,953 ^{bc}	88,250 ± 0,884 ^{cd}
B	0,622 ± 0,011 ^a	19,646 ± 0,808 ^d	61,370 ± 0,830 ^{abc}	75,657 ± 0,687 ^{ab}	85,190 ± 0,492 ^{bcde}	88,071 ± 0,443 ^{abc}	89,678 ± 0,424 ^{abc}
C	0,629 ± 0,022 ^a	8,835 ± 3,563 ^{ce}	52,668 ± 4,820 ^{bc}	71,083 ± 3,185 ^b	82,508 ± 1,683 ^{de}	86,096 ± 1,171 ^{cd}	88,449 ± 0,796 ^{bc}
D	0,628 ± 0,007 ^a	18,664 ± 3,399 ^d	72,687 ± 1,586 ^{ab}	84,628 ± 0,546 ^a	89,374 ± 0,121 ^a	90,268 ± 0,091 ^a	90,624 ± 0,056 ^a
E	0,672 ± 0,021 ^a	1,969 ± 0,836 ^{ef}	45,199 ± 6,788 ^c	69,760 ± 3,776 ^b	81,556 ± 1,621 ^e	84,639 ± 1,109 ^d	85,935 ± 0,951 ^c
<i>Ativo</i>							
A	0,031 ± 0,022 ^b	47,750 ± 4,865 ^b	78,935 ± 1,890 ^a	85,719 ± 0,917 ^a	89,115 ± 0,428 ^{ab}	90,135 ± 0,282 ^a	90,623 ± 0,206 ^a
B	0,088 ± 0,029 ^b	13,800 ± 4,552 ^{cd}	54,549 ± 5,466 ^{bc}	70,566 ± 3,685 ^b	82,919 ± 1,642 ^{de}	87,418 ± 0,661 ^{bc}	89,233 ± 0,237 ^{ab}
C	0,029 ± 0,019 ^b	1,575 ± 0,422 ^{ef}	50,089 ± 12,908 ^c	71,611 ± 7,211 ^b	84,782 ± 2,578 ^{cde}	88,375 ± 1,247 ^{abc}	89,744 ± 0,777 ^a
D	0,079 ± 0,013 ^b	1,860 ± 0,518 ^{ef}	55,925 ± 15,123 ^{bc}	77,324 ± 7,145 ^{ab}	87,361 ± 1,884 ^{abc}	89,485 ± 0,706 ^{ab}	90,309 ± 0,352 ^a
E	0,063 ± 0,016 ^b	0,793 ± 0,277 ^f	55,177 ± 6,954 ^{bc}	77,670 ± 2,239 ^{ab}	87,366 ± 0,197 ^{abc}	89,118 ± 0,573 ^{ab}	90,118 ± 0,658 ^a

Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β-Gal e 2% (m/v) lipase. *Médias seguidas da mesma letra em mesma coluna correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p < 0,05). Os valores são expressos pela média ± desvio padrão.

Tabela 5

Transparência dos filmes controles e ativos de GEL:CMC com diferentes formulações.

Formulação	A	B	C	D	E
Controle	47,354 ± 4,182 ^{aA}	30,512 ± 1,758 ^{bA}	25,946 ± 3,795 ^{bA}	23,819 ± 2,151 ^{bA}	12,145 ± 3,444 ^{cA}
Ativo	23,654 ± 2,845 ^{aB}	21,908 ± 2,307 ^{abA}	16,150 ± 7,437 ^{abA}	15,894 ± 3,454 ^{abA}	11,962 ± 3,305 ^{bA}

Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β-Gal e 2% (m/v) lipase. Médias seguidas da mesma letra minúscula em mesma linha correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p < 0,05). Médias seguidas da mesma letra maiúscula em mesma coluna correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p < 0,05). Os valores são expressos pela média ± desvio padrão.

A incorporação das enzimas nos filmes ativos provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) da transmissão de luz UV para os filmes de CMC, filme A (0GEL:100CMC), aumentando a absorção de luz UV de aproximadamente 32% para 52%, explicado pelas possíveis associações moleculares entre o polímero e as enzimas que vibram de maneira específica, diferente das ligações existentes no filme controle, absorvendo maior quantidade de luz.

Na luz visível este efeito ainda é observado nos filmes controle, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois polímeros, filmes A (0GEL:100CMC) e E (100GEL:0CMC). Este efeito é minimizado nos filmes ativos, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) entre as duas composições.

Corroborando com o observado em relação ao aspecto visual dos filmes, houve diferença significativa ($p < 0,05$) do filme controle A (0GEL:100CMC) com as demais formulações indicando que a CMC forma filmes mais transparentes do que a GEL. Da mesma forma, houve diferença entre as duas formulações (A e E) quando analisados os filmes ativos.

Nota-se para os filmes ativos que as blends B (25GEL:75CMC, C (50GEL:50CMC) e D (75GEL:25CMC) possuem as características dos dois polímeros, ou seja, são estatisticamente iguais ao filme A (0GEL:100CMC) e concomitantemente ao E (100GEL:0CMC). Já para os filmes controles as blends não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) mas diferem ($p < 0,05$) dos filmes A e E.

Em relação ao efeito da incorporação de enzimas, só foi significativo ($p < 0,05$) para o filme A (0GEL:100CMC), indicando que a adição da enzima reduz a transparência dos filmes de CMC, devido às interações entre a enzima e o polímero.

5.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)

A análise termogravimétrica é comumente utilizada para avaliar a perda ou o ganho de massa de uma espécie em função do tempo ou da temperatura. As curvas de TG e as DTG (derivada primeira da TG) para os precursores sorbitol, GEL, CMC e a enzima lipase são apresentadas na Figura 33.

A GEL apresentou três eventos de degradação, o primeiro até 200 °C referente à perda de água existente sob diferentes formas na GEL, em específico, como a água associada ao interior ou da superfície da tripla hélice, por meio das ligações de hidrogênio,

ou até mesmo água situada entre as camadas de proteínas, com uma perda de 23% da massa. A água fortemente ligada à proteína pode estar presente nos filmes até 170°C (Coppola *et al.*, 2012). O segundo evento variando entre 200 - 472 °C e perda de massa de 53%, está associado a decomposição dos grupos de aminoácidos ligados à proteína, quebra de peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos e estruturas de tripla hélice da GEL (Bastos *et al.*, 2021). E o terceiro evento térmico a partir de 472 °C no qual ocorre a degradação da rede de GEL e compostos orgânicos residuais (Sadi, Ferfera-Harrar, 2023). A massa residual ao final do processo foi de 5,7%.

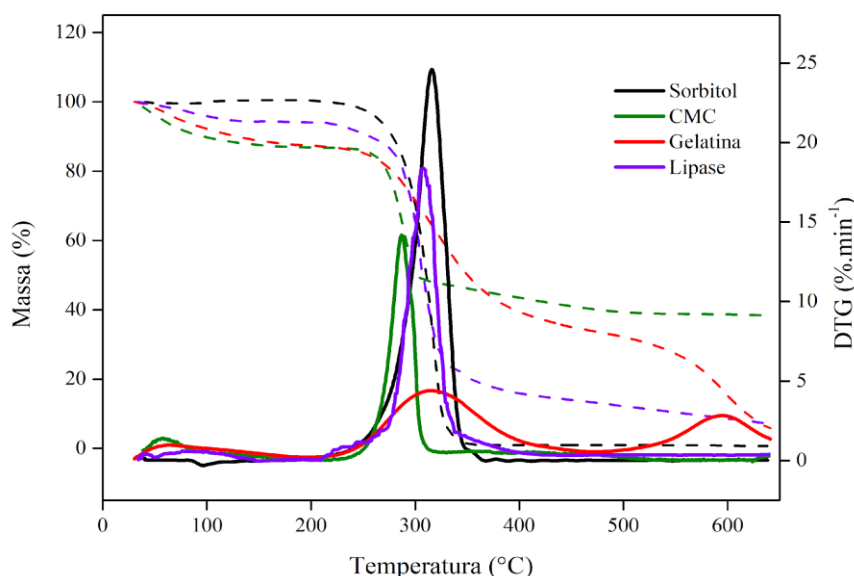
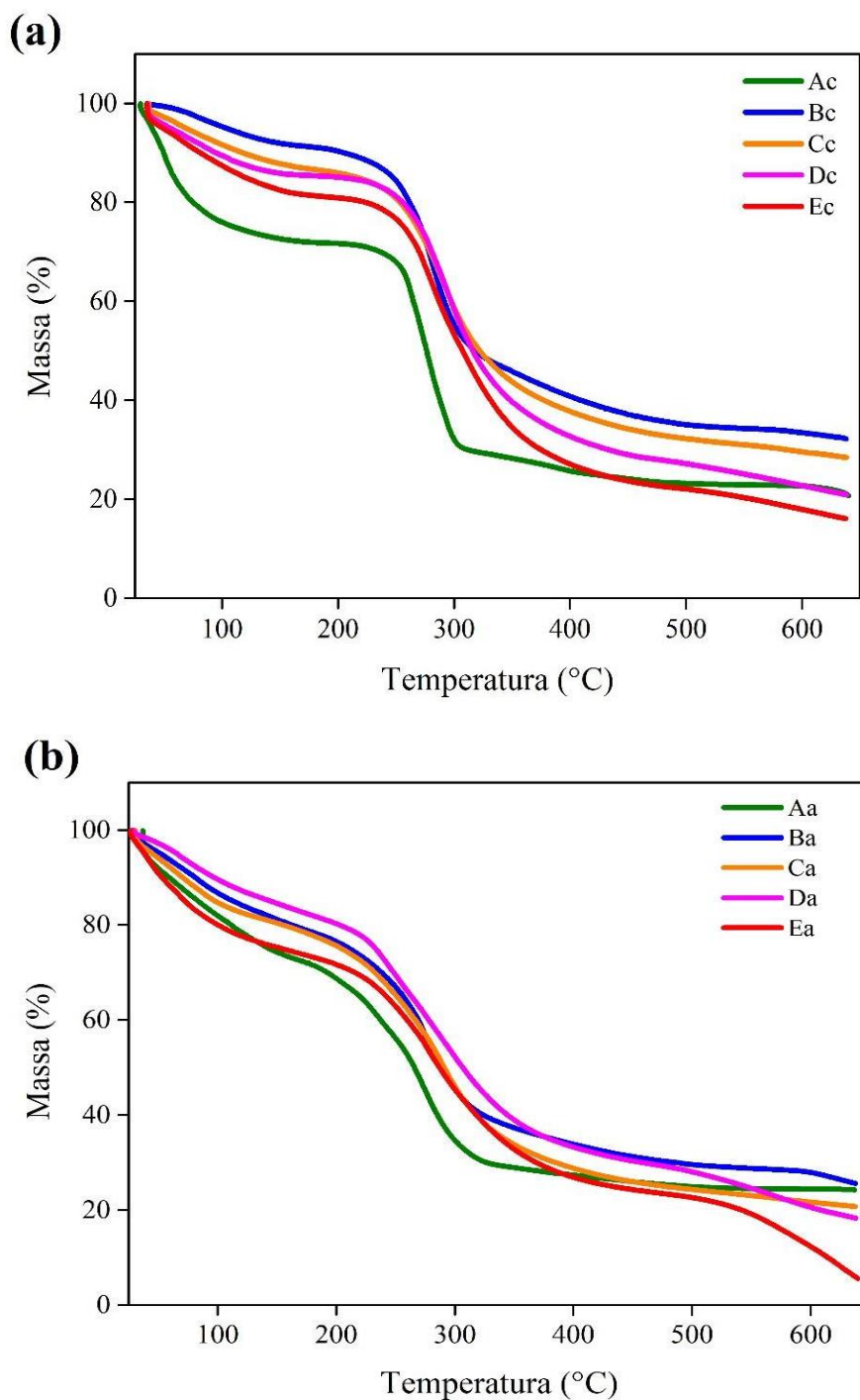


Figura 33. TGA e DTG dos precursores dos filmes poliméricos: Sorbitol, CMC, GEL e lipase.

A CMC apresentou dois eventos principais, o primeiro atribuído a perda de água livre (25-91°C) e água ligada (até 207°C), representando 14% da massa da amostra e o segundo evento a degradação térmica das cadeias laterais e grupos carbonílicos entre 207-335°C, com máximo de degradação em 286°C. A perda de massa foi de 40% e a massa residual da amostra foi 38%, apresentando maior massa residual entre os componentes (Akhtar *et al.*, 2023). O sorbitol apresentou um único evento que representa a degradação térmica da estrutura, na faixa de 215 – 365°C com uma perda de massa de 99%, havendo a decomposição de quase toda a estrutura.

O primeiro evento de degradação apresentado pela lipase (25 – 152°C) com perda de massa 5,7%, está associado a perda de água superficial e água ligada à estrutura molecular da enzima. O segundo evento (254 – 387°C) com uma perda de massa de

73,7%, com pico de degradação (ponto em que ocorre a inflexão da curva de degradação) em 306,4°C e a massa residual é de 7,12%. Não foi possível realizar a TG da lactase por estar em meio aquoso, sendo observado seu efeito a partir da comparação dos filmes controles (sem adição de enzima) com os filmes ativos (com adição de enzima). Os valores obtidos de TG para os filmes controles e ativos estão apresentados na Figura 34.



Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25 GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 34. TG dos filmes controles (a) e filmes ativos (b).

Os resultados sugerem que a interação entre os dois polímeros favorece a resistência térmica dos biofilmes, além de reduzir o teor de perda de água no primeiro evento térmico devido à alta afinidade química e eletrostática dos polímeros, formando uma rede polimérica mais fortemente ligada e impedindo que a água ligada às estruturas mais internas ou de ligações mais fortes, seja liberada. O aprimoramento da estabilidade térmica pode ser atribuído à interação intermolecular e intramolecular entre os polímeros. A presença da CMC na solução formadora de filme de GEL é capaz de aumentar a estabilidade térmica dos filmes devido à sua estrutura mais cristalina e afinidade com a GEL. A decomposição térmica dos filmes de GEL:CMC é deslocada para uma temperatura mais alta em comparação aos filmes de GEL.

Para os filmes, o primeiro estágio de perda de massa é observado a partir das temperaturas iniciais de aquecimento, associadas a perda de água livre e ligadas adsorvida na rede de filmes, sendo o filme A (0GEL:100CMC) o que possui maior taxa de adsorção pela característica hidrofílica do material.

Observando os valores dos resíduos, pode-se afirmar que os filmes B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC) e D (75GEL:25CMC) são mais termorresistentes em relação aos filmes A (0GEL:100CMC) e E (100GEL:0CMC) com os polímeros isolados, sendo o mais termorresistente o filme B, com 25% de GEL e 75% de CMC na composição e um resíduo de 32% em relação à massa inicial da amostra. Para esta composição de filme, a perda de massa no primeiro evento térmico (25-176°C) que está associada a perda de água da estrutura, foi de aproximadamente 9%, enquanto o filme A (0GEL:100CMC) obteve uma perda de massa de 28% no primeiro evento e um resíduo de aproximadamente 21%. A adição de 25% de GEL na estrutura do filme de CMC provocou uma redução de 19% na perda de massa pela formação de complexos altamente ligados entre os polímeros. Em relação ao filme B (25GEL:75CMC) o aumento da resistência térmica foi de 100% comparado ao filme E (100GEL:0CMC) e a perda de água no primeiro evento de degradação houve uma redução de 10%. Dentre as outras composições da blenda (C–50GEL:50CMC e D– 75GEL:25CMC) foi observado que à medida que aumenta o conteúdo de GEL na blenda a resistência térmica diminui.

As curvas de TG dos filmes controles e ativos de GEL:CMC, com suas diferentes composições, mostram que a adição da enzima afeta a estabilidade térmica dos filmes, sendo reduzida em relação ao filme controle. Como já foi discutida, a β -Gal apresentava um teor de glicerina em sua composição, o que tornou os filmes com um maior volume molecular no qual os grupos hidroxila dos plastificantes (sorbitol e glicerina) limitavam

às ligações de hidrogênio entre os polímeros enfraquecendo a interação entre as cadeias proteína-polissacarídeos (Bakry, Isa & Sarbon, 2017).

As curvas DTG dos filmes controles e ativos estão apresentadas na Figura 35, os picos foram determinados por meio da deconvolução das curvas DTG, obtidas no Origin 9.0.

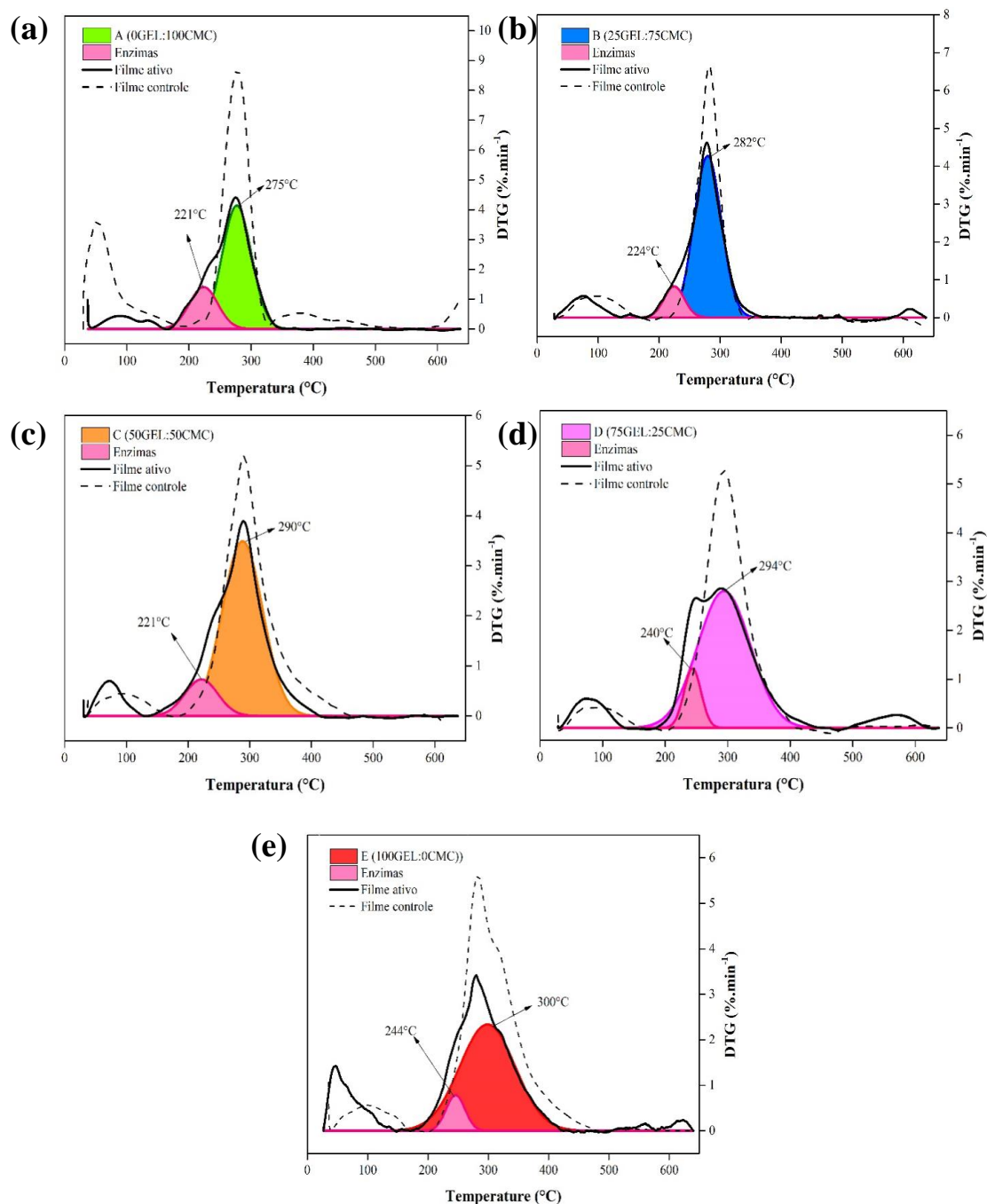


Figura 35. Deconvolução das curvas DTG dos filmes controles e ativos. (a) A(0GEL:100CMC); (b) B(25GEL:75CMC); (c) C(50GEL:50CMC); (d) D(75GEL:50CMC); (e) E (100GEL:0CMC).

Há o aparecimento de um evento, em todos as formulações dos filmes ativos, antes do evento principal de degradação dos polímeros, variando de 136-263°C, que pode estar associado a degradação térmica da enzima β -Gal, como foi relatado por Bernal, Lopez & Mesa (2007), em que a β -Gal imobilizada apresentou degradação térmica entre 152- 272°C.

Nos filmes com mistura de polímeros, Figura 35 (b-d), observa-se que as enzimas possuem maior interação com o filme de maior concentração de CMC na formulação (filme B- 25GEL:75CMC) sendo o pico de menor intensidade em relação aos demais filmes. No filme D (75GEL:25CMC) foi possível observar a separação dos picos no evento principal de degradação térmica, confirmando a maior interação da enzima com a CMC. A perda de massa aproximada dos filmes foi mostrada na Tabela 6, ilustrando melhor o aumento da estabilidade das blendas (B – 25GEL:75CMC, C – 50GEL:50CMC e D – 75GEL:25CMC) obtendo temperaturas superiores para a decomposição de uma massa específica em relação aos filmes dos polímeros isolados (composição A (0GEL:100CMC) e E (100GEL:0CMC)) e o filme B (25GEL:75CMC) obteve maior resíduo de massa correspondente a 32,2%.

Tabela 6

Dados da TG dos filmes controles e ativos de GEL:CMC.

		Temperatura (°C)				
*Perda de massa (%)		A	B	C	D	E
5%	Controle	39,4	103	68,4	55,1	48,7
	Ativo	38,8	51,6	44,8	65,6	38,1
10%	Controle	49,3	204,7	117,3	94,2	80,52
	Ativo	58,9	80,8	70,1	96,85	52,78
25%	Controle	110,1	271	268,1	270,5	256,5
	Ativo	143,3	211,2	204,6	232,7	154
50%	Controle	275,0	317,5	321,9	315,8	306,9
	Ativo	265,5	288	290,6	306	286,5
75%	Controle	419,5	>637,9	>638,0	551,7	426
	Ativo	494,4	637,6	475,9	544,4	431,8
Massa residual (%)	Controle	20,7	32,2	28,4	20,9	16,1
	Ativo	24,3	25,6	20,7	18,3	5,6

*Aproximadamente.

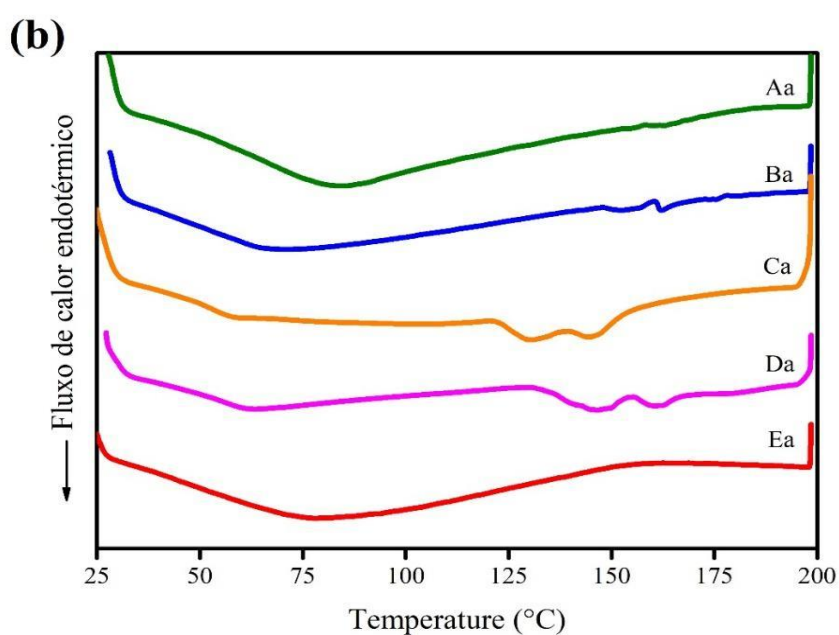
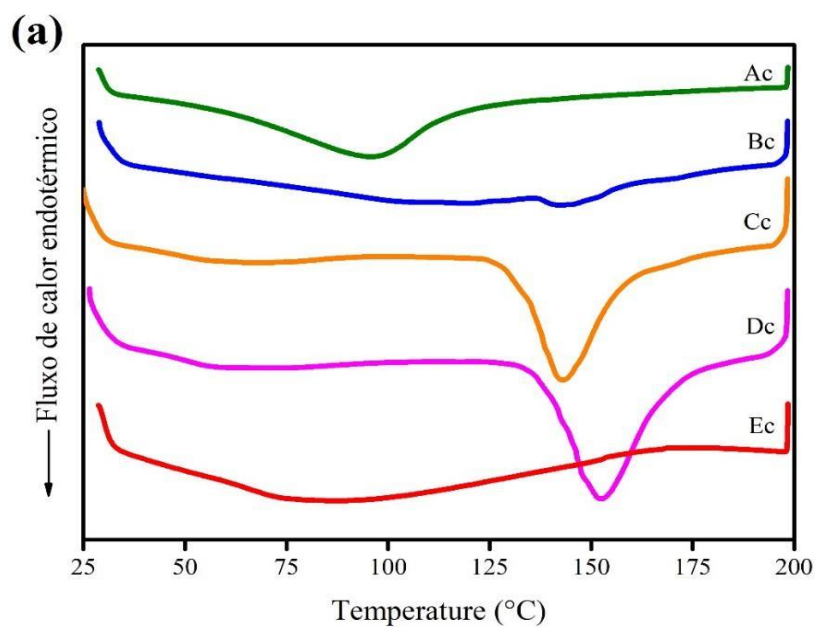
Formulações: A (0GEL:100CMC), B (25 GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2%(m/v) lipase.

Yaradoddi *et al.* (2020), em seu estudo de desenvolvimento de embalagens sustentáveis utilizando material a base de CMC e GEL apresentou a análise termogravimétrica em três estágios de degradação, variando entre 43-192°C, 192-373°C e 373-692°C. Os autores concluíram que os materiais foram difundidos uniformemente e foram fortemente combinados. Além disso, os resíduos dos filmes de mistura foram aumentados com o aumento do componente CMC, o que implicava que a adição de CMC contribuiu para a propriedade de estabilidade térmica. O primeiro estágio está associado a perda de água livre e ligada, o segundo estágio entende-se que houve degradação ou deformação dos constituintes da CMC e da GEL e o terceiro estágio, gases significativos, como monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO₂), água e alguns compostos voláteis, são liberados com outros resíduos carbonáceos.

5.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Um calorímetro exploratório diferencial (DSC) foi usado para determinar o comportamento térmico de cada filme produzido. As curvas de DSC para os filmes ativos e controles de GEL:CMC estão presentes na Figura 36. Comparando os filmes controles de GEL (E – 100GEL:0CMC) e CMC (A – 0GEL:100CMC), observa-se um amplo evento endotérmico atribuído a desidratação e decomposição dos componentes instáveis, com valor máximo em torno de 87 e 95°C, respectivamente, e um deslocamento dos picos endotérmicos dos filmes ativos, Figura 36. (b), de mesma composição para 78 e 84°C, indicando que a adição das enzimas reduz a estabilidade térmica dos filmes, provavelmente envolvendo ligações com os grupamentos (-OH) laterais dos polímeros com interações mais fracas e consequentemente menos estáveis termicamente. Além disso, ocorre a degradação de aminoácidos à base de proteína, que são os principais componentes dos filmes de GEL, e o grupo carbonilo das cadeias laterais da CMC (Tran *et al.*, 2023).

As interações intermoleculares e intramoleculares da GEL e do polissacarídeo aumentam a estabilidade térmica das membranas, atribuída a uma reação de ligação cruzada entre as macromoléculas e a formação de ligações de hidrogênio estáveis e estruturas ordenadas sendo possível a identificação de picos de transição vítrea (T_g) e picos de fusão (T_m) (Chen *et al.*, 2024). No entanto, a medição das temperaturas T_g da CMC e GEL por DSC são difíceis uma vez que a alteração da capacidade térmica ou sinal no fluxo de calor é usualmente muito mais fraco do que o dos polímeros convencionais.



Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25 GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC). Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 36. Curvas DSC dos filmes GEL:CMC controles (a) e ativos (b).

Na Figura 36 (a), é possível observar o deslocamento dos picos endotérmicos, nos filmes com mistura dos polímeros, para temperaturas maiores e na formulação B (25GEL:75CMC) há um pequeno evento endotérmico, provavelmente associado a grupos

instáveis ligados a estrutura com um pico principal, provavelmente, acima de 200°C, indicando maior estabilidade térmica.

O perfil para o comportamento térmico é mantido para os filmes ativos, Figura 36 (b), porém, a interação das enzimas com os grupos hidroxila e carboxila dos polímeros e o seu posicionamento na matriz polimérica ocasiona um enfraquecimento nas ligações entre polímeros, demandando menor energia para a fusão. Observa-se que há o aparecimento de dois picos, o primeiro provavelmente associado a enzima fracamente ligada aos grupos laterais das moléculas na matriz e o segundo associado aos componentes dos polímeros. No filme B ativo (25GEL:75CMC:LL) há um pico de baixa intensidade em 162°C, podendo ser compatível com a degradação de grupamentos da enzima, com temperatura mais elevada, confirmando melhor estabilidade térmica do filme.

5.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Os resultados da análise de difração de raios X para os precursores dos filmes, estão apresentados na Figura 37. Foi analisado o plastificante sorbitol e os polímeros utilizados (GEL e CMC), em forma de pó fino. A GEL apresentou um difratograma característico de uma amostra amorfa, com uma extensa reflexão entre $2\theta = 15-35^\circ$, indicando que a macromolécula de GEL é predominantemente em uma conformação irregularmente enrolada, apresentando uma cristalinidade relativa de 8,3%.

A CMC apresentou um pico característico em torno de $2\theta = 9^\circ$ e entre 18° a 28° , com maior intensidade em 20° , configurando uma estrutura semi-cristalina, e índice de cristalinidade relativo de 49%, semelhante ao encontrado por Tavares, *et al.* (2020) com um índice de cristalinidade de 51%, quando avaliou o efeito da adição de CMC em filmes de amido de milho. Os autores discutem que a cristalinidade da CMC pode estar relacionada com o método aplicado na obtenção da celulose antes da síntese da CMC. Por exemplo, no processo de branqueamento das fibras ocorre a remoção da lignina e da hemicelulose que são conhecidas por contribuir com sua amorfosidade, obtendo então uma CMC com maior grau de cristalinidade em relação a uma CMC obtida de fibras limpas.

O sorbitol apresentou-se como o material mais cristalino e a cristalinidade relativa foi de 79,3% , corroborando com o resultado obtido por Queiroz, *et al.* (2023) que obteve

um índice de cristalinidade relativa para o sorbitol de 80,8%. Os resultados das análises de difração dos raios X dos filmes de GEL:CMC estão apresentados na Figura 38.

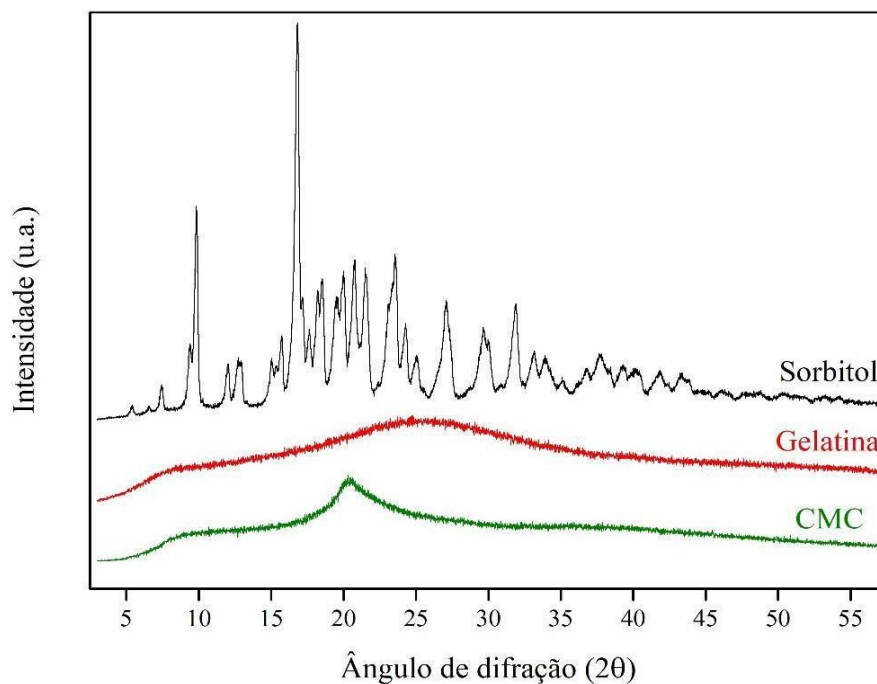
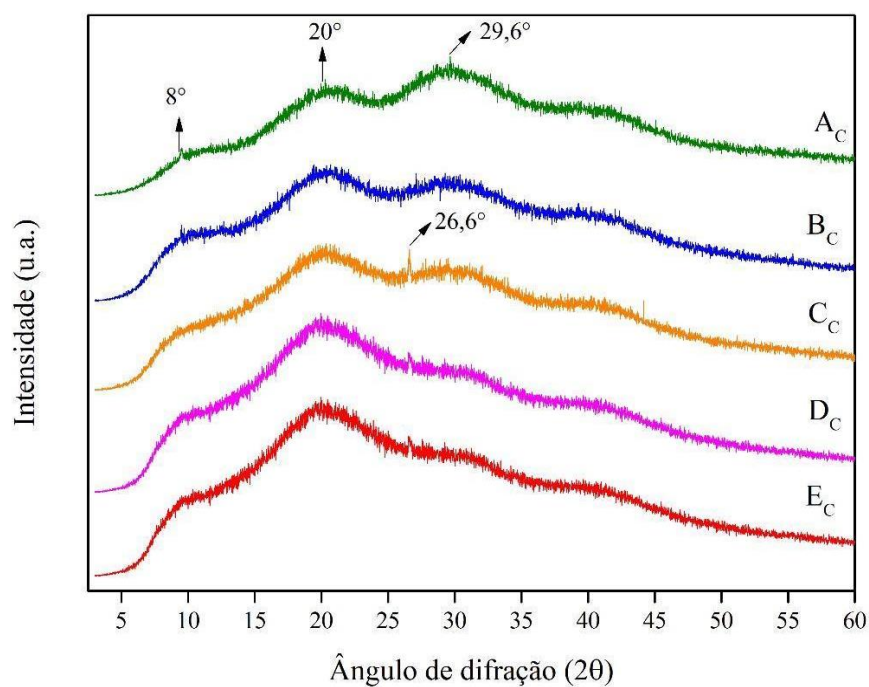


Figura 37. Difração de raios-X do sorbitol, GEL e CMC.



Legenda: A (0GEL:100CMC), B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC), D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC).

Figura 38. Difração de raios X dos filmes GEL:CMC controles.

Um pico de difração em torno de $2\theta = 8^\circ$ foi observado e é atribuído a gelificação devido à renaturação de cadeias de GEL em uma estrutura semelhante a colágeno de tripla hélice discutido, semelhantemente, por Mosleh *et al.*, 2024. É uma renaturação parcial de hastes de colágeno nativo, enquanto uma parte substancial das cadeias de GEL permanecem em uma contorção aleatória de bobina. As hélices se posicionam alternadamente entre as porções de bobina não se agregando ao gel (López-Ângulo *et al.*, 2020).

Quando resfriada, a solução de GEL retoma a estrutura tripla-hélice característica do colágeno, formando um hidrogel. Isso ocorre porque as moléculas de água se posicionam nos interstícios e ocorre a formação de ligações de hidrogênio com os grupamentos CO e NH (Kamath & Park, 1993). Sendo assim, as estruturas tripla-hélices tendem a se embalar em pacotes na superfície do filme, ocasionando a difração dos raios X. O pico acentuado é formado e a sua posição depende da umidade residual do filme. Esta banda também foi relatada por Pereda, *et al.* (2011) em seu estudo sobre compósitos de GEL-quitosana e filmes de dupla camada com potencial atividade antimicrobiana. Além disso, eles observaram o aumento de cerca de 6,4% na cristalinidade da GEL hidrolisada em forma de filme comparando com a GEL em pó, valor próximo ao encontrado neste trabalho, com um aumento de aproximadamente 5% em relação a cristalinidade da GEL nativa. Para o filme A controle (0GEL:100CMC) também foi observado um halo nesta região, é possível que esteja associado a separação de fase dos componentes durante o processo de *casting* ou interações entre a CMC e o sorbitol.

O significativo pico entre $2\theta = 13^\circ - 28^\circ$, presente em todos os filmes, corresponde a fase amorfa das estruturas e está associado a presença de água, glicerol, CMC e bobinas aleatórias de GEL. A medida que a concentração de CMC na formulação dos filmes foi aumentada, a intensidade do pico referente ao componente amorfo foi reduzida devido às interações ocorridas entre a GEL e a CMC, por meio das substituições das hidroxilas da CMC por componentes da estrutura da GEL e do sorbitol, tornando a estrutura mais complexa e com ligações mais coesas. Um pico cristalino aparece nas formulações com maiores concentrações de GEL (E- 100GEL:0CMC, D- 75GEL:25CMC e C- 50GEL:50CMC) em $2\theta = 26,6^\circ$, correspondendo provavelmente a um resíduo molecular de microcristalito desorganizado do grupo lateral aniônico mais volumoso da CMC, que interrompeu a formação de rede cristalina durante a preparação do filme. Este resultado é semelhante ao encontrado por Harizah, Isa e Sarbon (2016) avaliando o efeito da goma xantana em filmes de GEL:CMC, em que o pico cristalino foi identificado em $2\theta = 29,07^\circ$,

no filme controle (sem adição da goma xantana). Outros picos foram identificados e estão atribuídos às diversas interações entre os componentes dos filmes e principalmente do efeito do sorbitol que apresenta maior cristalinidade, como os picos na região $2\theta = 29,6^\circ$, $41,7^\circ$ e $44,2^\circ$.

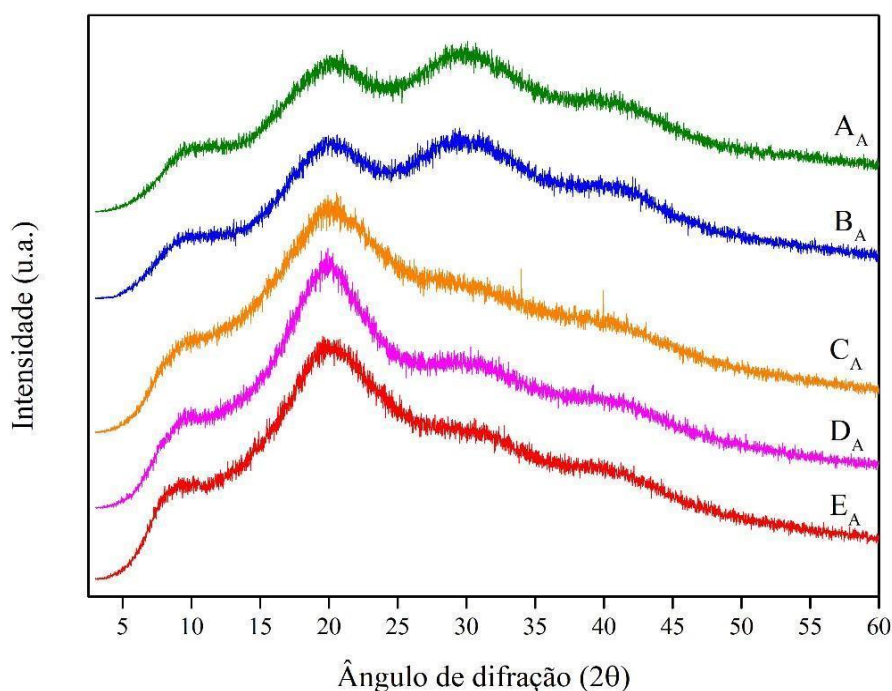
Para confirmar o observado nos difratogramas, foi calculado a cristalinidade relativa referente aos filmes controles e ativos por meio da proporcionalidade entre a área amorfa e cristalina, Tabela 7, sendo possível observar que os filmes com maior proporção de CMC na formulação apresentam uma cristalinidade mais elevada em até 5,8%. A cristalinidade também sofreu efeito da adição das enzimas, sendo reduzida em maior proporção nas blendas (B (25GEL:75CMC), C (50GEL:50CMC) e D (75GEL:25CMC)), devido ao enfraquecimento das interações entre a GEL e a CMC. A formulação que sofreu menor efeito foi o E (100GEL:0CMC), mostrando maior interação das enzimas com os grupos aniônicos volumosos da CMC.

Tabela 7

Índice de cristalinidade relativa dos filmes (GEL:CMC) controles e ativos.

Formulação	Cristalinidade Relativa (%)	
	Filme Controle	Filme Ativo
A (0GEL:100CMC)	19,1%	15,7%
B (25GEL:75CMC)	17,0%	11,2%
C (50GEL:50CMC)	14,0%	9,5%
D (75GEL:25CMC)	13,6%	8,7%
E (100GEL:0CMC)	13,3%	11,8%

A difração dos raios X foi quantificada para os filmes ativos e estão apresentados na Figura 39. O comportamento foi semelhante ao observado para os filmes controles variando, na maioria das formulações, a intensidade do pico correspondente à fase amorfa, aumentando ou reduzindo a intensidade, variando assim o índice de cristalinidade relativo. Observa-se que nenhum novo pico de difração apareceu no espectro de DRX quando a GEL foi adicionada à estrutura dos filmes, indicando uma boa interação com os polímeros e o sorbitol, além da redução da intensidade do pico de difração próximo a $2\theta = 8^\circ$, indicando possivelmente interações de hidrogênio entre a GEL e as enzimas reduzindo a estrutura de tripla hélice, da mesma forma que a adição de CMC.



Legenda: A (0GEL:100CMC:LL), B (25GEL:75CMC:LL), C (50GEL:50CMC:LL), D (75GEL:25CMC:LL) e E (100GEL:0CMC:LL). LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 39. Difração de raios X dos filmes GEL:CMC ativos.

5.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros FTIR dos precursores CMC, GEL, sorbitol, lipase e β -Gal, Figura 40 (a), foram utilizados como referência para identificar a influência de cada material e as modificações que ocorreram na estrutura dos filmes. A GEL exibiu uma larga banda de absorção entre 3500 e 3000 cm^{-1} que corresponde às características sobrepostas do alongamento O-H dos grupos hidroxila e alongamentos -NH da amina, que caracteriza a amida A (3387 cm^{-1}) e a amida B (3109 cm^{-1}). O alongamento O-H indica a presença de água ligada por ligações de hidrogênio a amida. As bandas de vibração dos grupamentos simétricos de $-\text{CH}_3$ foram observados em 2924 cm^{-1} . Duas bandas de absorção discerníveis são observadas em 1635 e 1550 cm^{-1} que podem ser atribuídas à amida I com alongamento C=O ou ligações de hidrogênio acopladas com COO^- e amida II com vibrações para o alongamento N-H, respectivamente, uma vez que a GEL é uma mistura de peptídeos e proteínas obtidos da hidrólise parcial do colágeno (Sadi, Ferfera-Harrar, 2023). Bandas em 1257 cm^{-1} refletem vibrações do plano de amida III dos alongamentos

C-N e -NH da amida ligada e banda em 1041 cm^{-1} atribuídos ao alongamento C-O do grupo carboxila. A banda de baixa intensidade na região da amida III é devido a perda do estado de tripla hélice durante o processo de extração da GEL(Hassan *et al.*, 2021).

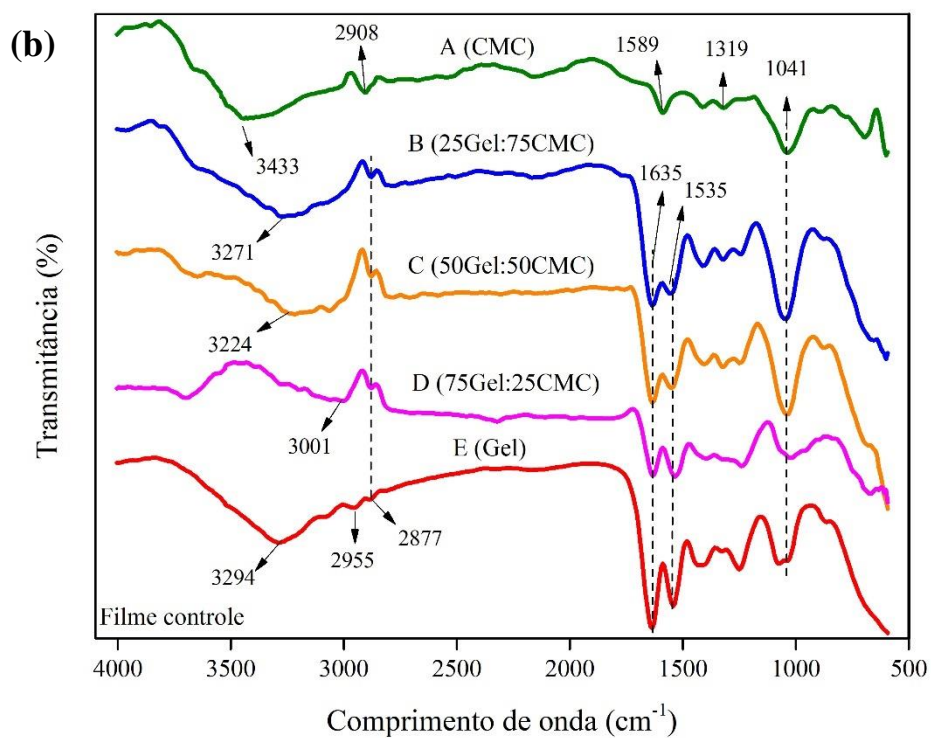
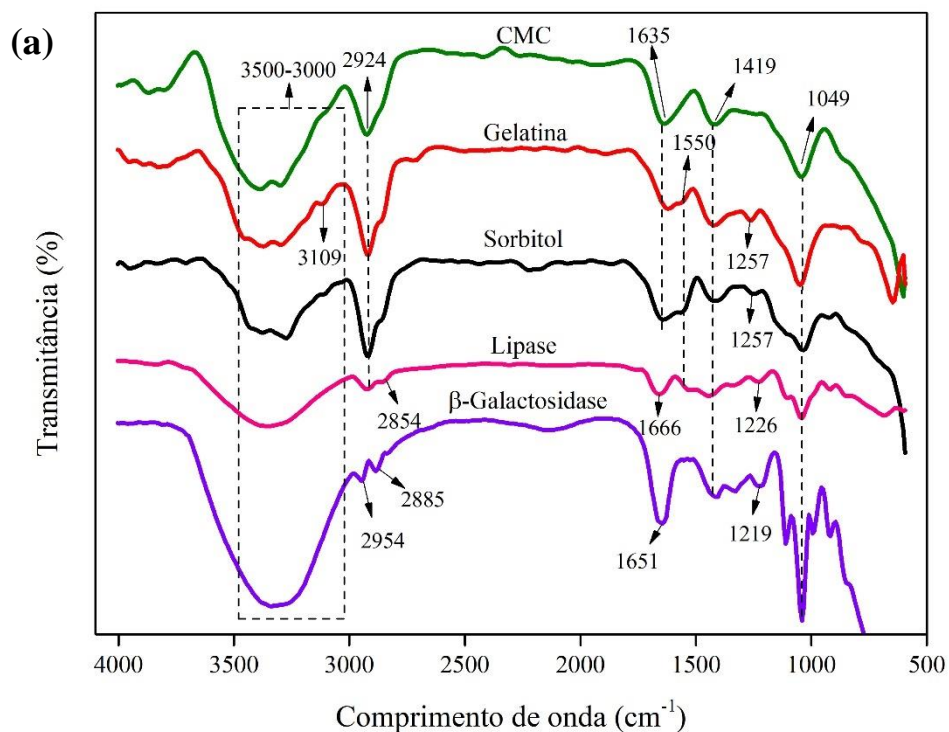
A CMC apresentou uma banda larga em torno de 3394 cm^{-1} correspondendo ao alongamento O-H de grupos hidroxila e bandas fracas em 2924 cm^{-1} devido ao alongamento C-H simétrico de grupos de metileno, respectivamente (Zhang *et al.*, 2023). A banda em torno de 1635 é atribuída ao alongamento C=O dos grupos carboxílicos e a banda 1419 cm^{-1} com o alongamento O-H no plano. A banda em 1049 cm^{-1} pode ser característica do alongamento C-O-CH₂ presente nas bandas de absorção da estrutura da celulose.

O espectro do Sorbitol apresentou bandas com maiores intensidades em 3379 e 2924 cm^{-1} correspondentes aos alongamentos -OH e C-H, respectivamente. Os políois têm bandas de alcance entre 1500 e 1200 cm^{-1} , como a banda destacada em 1419 cm^{-1} , essas bandas são atribuídas a sobreposição de C-H em planos e -OH em curvaturas nas moléculas de poliol. A banda em 1049 cm^{-1} foi atribuída às vibrações do alongamento C-OH (Pourfazard *et al.*, 2018).

Os espectros FTIR-ATR das enzimas lipase e β -Gals livres revelam várias bandas referentes a diferentes grupos funcionais. A banda registrada entre 3500 e 3000 cm^{-1} está associada às vibrações dos grupos O-H e -NH presentes nas enzimas. As bandas entre 3000 e 2800 cm^{-1} são devido ao alongamento C-H assimétrico e simétrico (Souza *et al.*, 2019). As bandas registrados em 1666 , 1442 e 1226 cm^{-1} para a lipase e 1651 , 1419 e 1219 cm^{-1} para a β -Gal são atribuídos, respectivamente, a amida I relacionada a vibração do estiramento C=O, a amida II correspondente a vibrações de flexões N-H e alongamento C-N, e amida III atribuída ao alongamento C-C, C-N e vibrações de flexão N-H (Sharma *et al.*, 2019; Mohammadi *et al.*, 2020). A intensa banda em torno 1041 cm^{-1} corresponde provavelmente a alongamentos C-O de grupos carboxílicos presentes na estrutura das enzimas.

O espectro do filme controle A (OGEL:100CMC), Figura 40 (b), apresentou bandas característicos do pó de CMC, Figura 40 (a), com uma ligeira mudança na intensidade das bandas, atribuída aos grupos funcionais do plastificante e das ligações formadas, com maior intensidade em 1319 cm^{-1} do estiramento simétrico C-H e redução em 1041 cm^{-1} , indicando boa miscibilidade entre eles. Em relação ao espectro do filme ativo A (OGEL:100CMC), observa-se um aumento na intensidade das bandas, indicando

que as enzimas ligam-se a estrutura do filmes nos grupamentos laterais sobrepondo as bandas e com maior intensidade na banda 1033 cm^{-1} dos grupamentos C-O das enzimas.



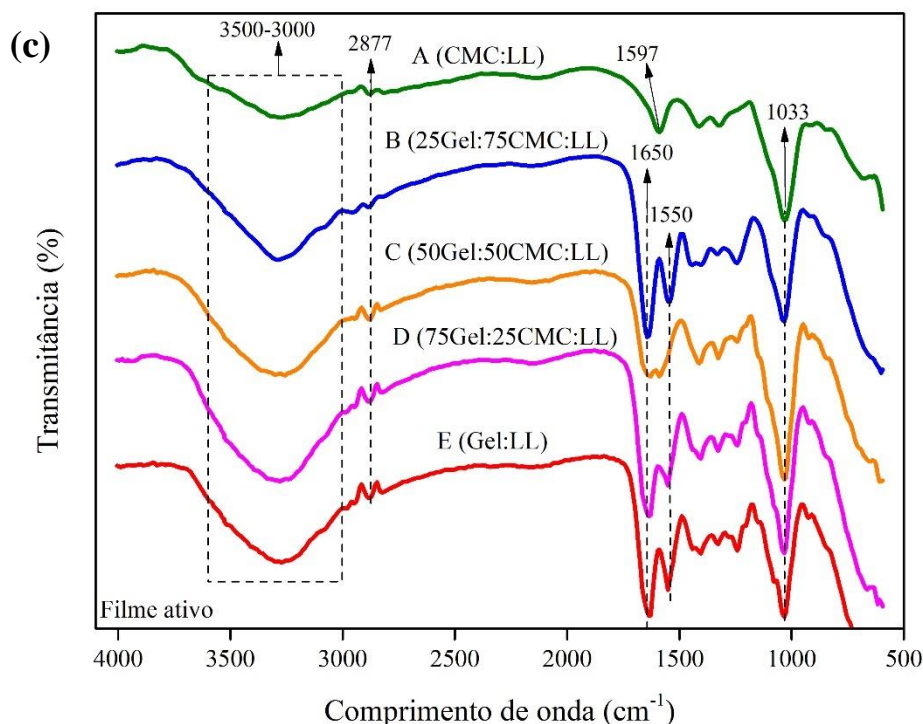


Figura 40. (a) Espectros FTIR para o sorbitol, GEL em pó, CMC em pó, lipase e lactase; (b) filmes controle GEL-CMC; (c) filmes ativos – GEL:CMC. Ativos: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

O espectro do filme E (100GEL:0CMC) mostra que a GEL apresentou menor interação com o sorbitol, aumentando a intensidade da banda na região entre 1600-1200 cm^{-1} associado aos estiramento C-H em planos e -OH em curvaturas nas moléculas de sorbitol. Os espectros para os filmes ativos, Figura 40 (c), apresentaram um aumento da intensidade na região de 1100 e 900 cm^{-1} característicos das enzimas adicionadas.

Conforme os espectros FTIR de filmes B, C e D controles, Figura 40 (b), é evidente que os filmes de mistura GEL:CMC exibem características semelhantes aos filmes dos polímeros isolados e os filmes com maior concentração de CMC possui maior intensidade na banda 1041 cm^{-1} correspondente ao grupamento C-O da CMC. Com a adição da enzima houve o aumento da intensidade da banda 1033 cm^{-1} , para o alongamento O-H e C-O, explicado pelas interações moleculares entre o grupo hidroxila da CMC e o grupo carboxílico da GEL, além da interação com os grupos OH do sorbitol aumentando a carga superficial da estrutura (Nguyen *et al.*, 2023).

5.9 ENSAIOS DE TRAÇÃO

Os resultados obtidos para a resistência máxima à tração, alongamento e módulo de elasticidade dos filmes ativos e controles foram apresentados graficamente e feita a correlação linear dos dados. A resistência máxima à tração é uma propriedade fundamental dos materiais que descreve a máxima tensão que um material pode suportar antes da ruptura e é uma medida da força por unidade de área (seção transversal), sendo a espessura fundamental para a medida. A espessura média dos filmes controles e ativos foram medidas e estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8

Espessura média dos filmes GEL:CMC ativos e controles.

Formulação	Espessura (mm)	
	Filme controle	Filme ativo
A (0GEL:100CMC)	$0,046 \pm 0,006^c$	$0,054 \pm 0,004^b$
B (25GEL:75CMC)	$0,052 \pm 0,004^{bc}$	$0,062 \pm 0,006^b$
C (50GEL:50CMC)	$0,067 \pm 0,007^b$	$0,078 \pm 0,009^a$
D (75GEL:25CMC)	$0,090 \pm 0,008^a$	$0,091 \pm 0,006^a$
E (100GEL:0CMC)	$0,091 \pm 0,003^a$	$0,093 \pm 0,003^a$

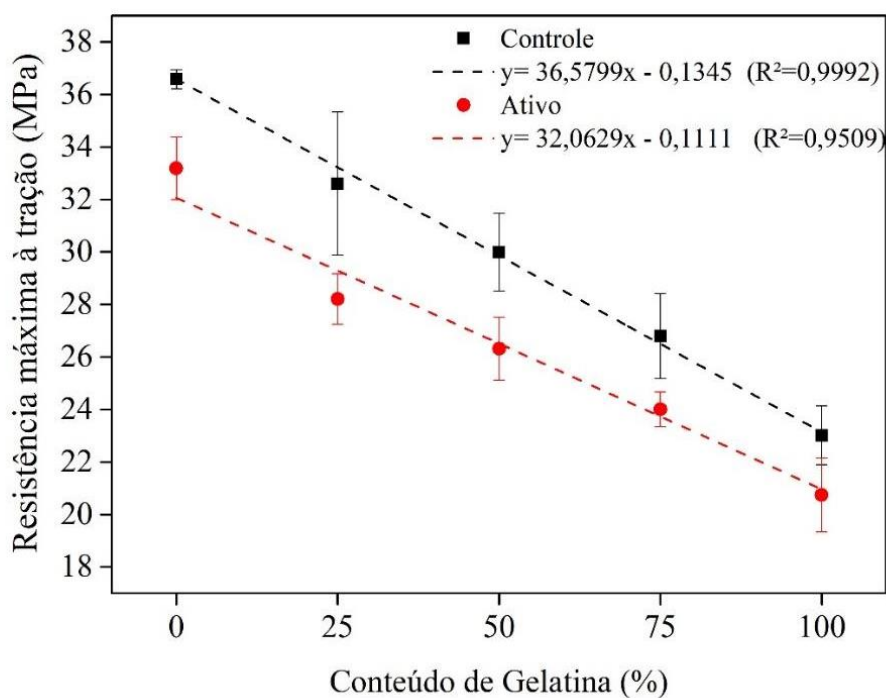
Médias seguidas da mesma letra minúscula em mesma coluna correspondem a médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A espessura média dos filmes foi maior à medida que aumentava-se a concentração de GEL na composição, sendo $0,091 \pm 0,003$ mm para os filmes de GEL – E (100GEL:0CMC) e de $0,046 \pm 0,006$ mm para os filmes de CMC – A (0GEL:100CMC), constituindo metade do valor de espessura do filme E. . Isto porque na solução formadora de filme de GEL a concentração do polímero foi de 8% em relação ao volume da solução, enquanto a concentração de CMC foi de 3%. Dessa forma, quando a solução passava pelo processo de evaporação do solvente (*casting*) a massa residual era maior para os filmes contendo GEL e aumentava proporcionalmente a sua concentração. Embora, não houve diferença significativa entre as formulações D (75GEL:25CMC) e E (100GEL:0CMC), devido a baixa concentração da CMC na solução, não influenciando no valor da espessura. A adição da enzima não influenciou a espessura dos filmes por sua baixa concentração na solução formadora de filme.

A correlação linear dos valores da resistência máxima à tração para as formulações foi significativa ($p < 0,05$) para os filmes controles e ativos e estão representados na

Figura 41. Na faixa estudada, a adição de 1% de GEL na composição do filme reduz o valor da resistência em 0,13 MPa para os filmes controle e 0,11 MPa para os filmes ativos.

Comparando os valores encontrados para a resistência máxima à tração dos filmes de GEL:CMC controles e ativos, observa-se que na concentração adicionada neste trabalho, as enzimas não alteraram significativamente ($p > 0,05$) o limite de resistência do filme E (100GEL:0CMC). Já o filme com 100% de CMC (filme A – 0GEL:100CMC) houve redução da resistência máxima à tração com a adição da enzima em sua estrutura, havendo um enfraquecimento da sua rede cristalina justificada pelas interações dos grupos hidroxila e carboxila com o glicerol presente na enzima β -Gal e também associado à ocupação dos espaços vazios da estrutura polimérica pelas enzimas adicionadas, provocando um afastamento da estrutura e redução da resistência. Este efeito é confirmado pela redução do índice de cristalinidade relativa, obtida por meio da difração dos raios X, quando comparados os filmes controles e ativos.



y = resistência máxima à tração (MPa); x = concentração de GEL na formulação (%).

Figura 41. Resistência máxima à tração dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%).

A deformação do filme ocasionada pela força aplicada no corpo de prova em relação ao comprimento inicial até a ruptura, está representada nos valores de alongamento, Figura 42. A partir dos valores obtidos para os filmes controles por meio

da correlação linear significativa ($p < 0,05$), nota-se que o conteúdo de GEL presente na formulação exerce influência em relação ao alongamento, ou seja, a medida que aumenta-se a concentração de GEL em 1% na formulação, provoca uma redução de aproximadamente 0,032% na elongação até a ruptura pela alteração da estrutura do filme em relação a forças intermoleculares, aumentando o grau de interação e tornando a matriz polimérica menos flexível.

Da mesma forma, para os filmes ativos a adição de 1% de GEL provoca a redução de 0,074% do alongamento mas, neste caso, a flexibilidade entre as cadeias é aumentada devido ao posicionamento da enzima nos espaços vazios entre as moléculas, enfraquecendo as interações existentes entre os polímeros e o plastificante, além de formar novas interações corroborando com o resultado obtido para resistência máxima à tração, no qual apresentou menores valores de resistência para os filmes ativos.

Quando a concentração de CMC na estrutura dos filmes é maior, provavelmente, fortes interações nas zonas de junção da estrutura de GEL são formadas, correspondentes à zona cristalina da estrutura, aumentando a resistência à tração. Como consequência, ocorreu também um aumento de grupos aniônicos volumosos, que se localizaram entre as cadeias peptídicas na região amorfa, enfraquecendo as interações entre as cadeias e permitindo melhor extensibilidade da estrutura.

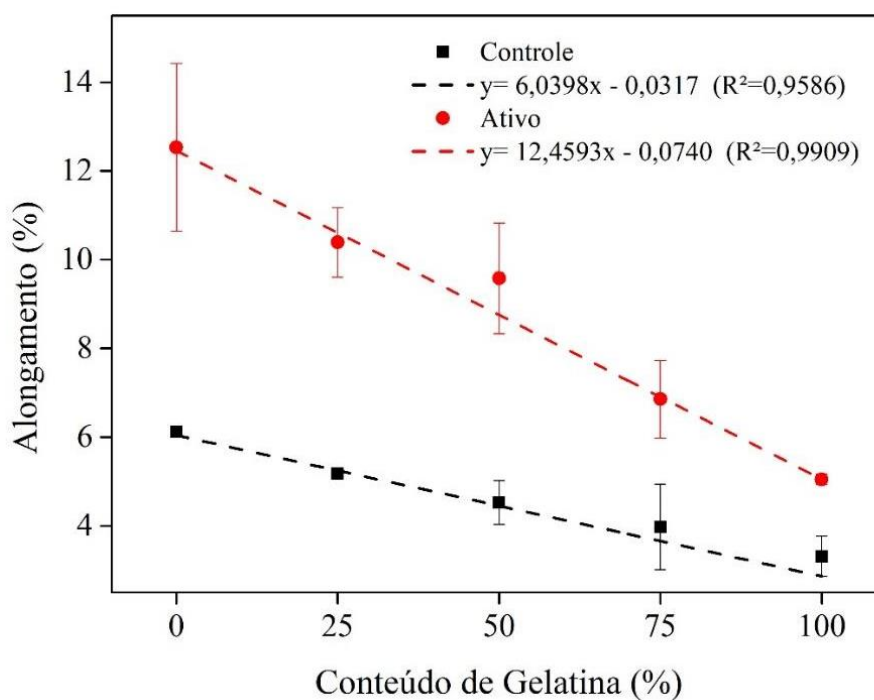


Figura 42. Alongamento dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%).

Os polímeros são materiais com cadeias longas e flexíveis, o que resulta em módulos de elasticidade menores em comparação a outros materiais como os metais. O módulo de elasticidade em polímeros é influenciado pela densidade de entrelaçamentos das cadeias moleculares, o grau de cristalinidade e pela presença de aditivos. Ele mede a resistência de um material ao ser deformado elasticamente, de maneira reversível, quando uma tensão é aplicada.

A correlação linear aplicada para os filmes controle foi significativa ($p < 0,05$), indicando que a adição de 1% de enzima na composição do filme provoca uma redução de 5,19 MPa no valor do módulo de elasticidade, Figura 43.

Quando avaliado a adição de enzima (filmes ativos), há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos filmes controle, mas os valores obtidos não apresentaram correlação linear significativa ($p > 0,05$), indicando que a quantidade de enzima presente e como consequência o aumento da quantidade de plastificante na estrutura cuja ação consiste em diminuir a intensidade de ligação das moléculas do polímero, reduziram a cristalinidade do material, reduzindo a resistência à deformação na região elástica de maneira que o módulo de elasticidade não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para todas as formulações.

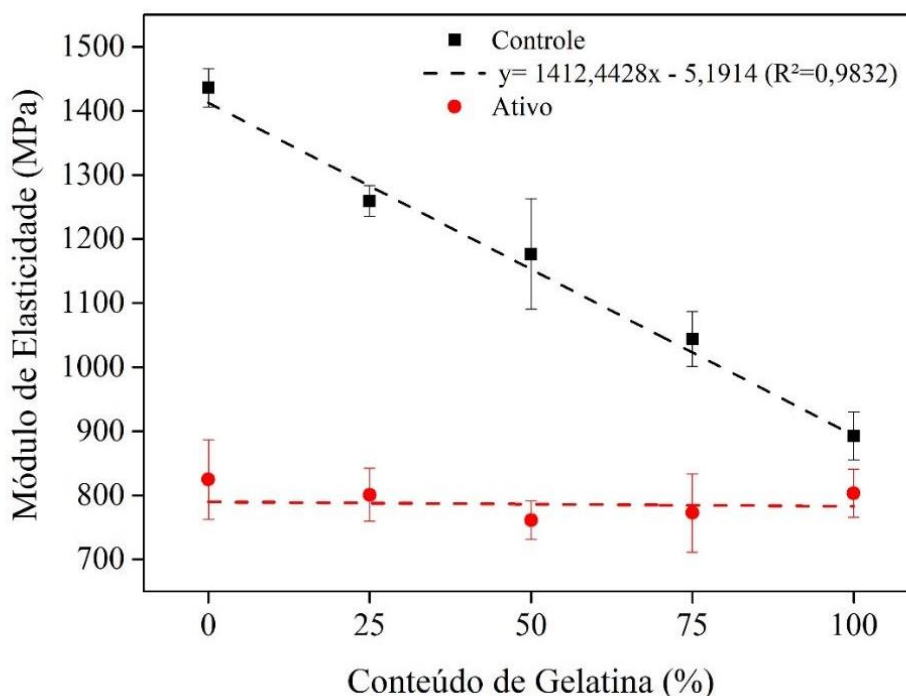


Figura 43. Módulo de elasticidade dos filmes ativos e filmes controles em relação ao conteúdo de GEL na composição dos filmes (%).

Quando as enzimas foram adicionadas à solução filmogênica, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para as mesmas composições poliméricas quanto à resistência, mostrando que as enzimas não interagem na zona de junção da estrutura do filme.

De maneira similar, Shabahzi *et al.* (2021) incorporou óleo essencial de *Mentha longifolia* L. em filmes nanofibrosos de GEL e CMC com o objetivo de produzir embalagens ativas para aumentar a vida útil de camarão gigante de água doce e o efeito da adição do óleo essencial foi significativo em relação aos valores dos testes mecânicos. A concentração das soluções filmogênicas de CMC foi de 2% (m/v) e de GEL 10% (m/v) e a composição da solução formadora de filme foi de 50:50. A adição do óleo essencial provocou uma redução na força de tração explicado pela interação do óleo essencial com a matriz polimérica, havendo uma substituição parcial de fortes interações intermoleculares na rede dos polímeros, gerando filmes mais fracos, como ocorre no presente estudo pela adição das enzimas a estrutura polimérica.

5.10 HIDRÓLISE DA LACTOSE

O método colorimétrico empregado para a determinação de açúcares redutores utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico como agente oxidante do reativo DNS. Este método foi descrito primeiramente por Sumner e Graham (1921), com objetivo de avaliar a presença de açúcares redutores (glicose) na urina de pacientes portadores de diabetes. Com o passar dos anos, surgiram algumas variações, destacando-se o método proposto por Miller (1959), o qual vem sendo utilizado nos últimos anos em diferentes aplicações, fornecendo uma alternativa não específica para métodos mais aprofundados e demorados como cromatografia gasosa e HPLC.

A reação ocorre conforme a Figura 44, na qual o ácido 3,5-dinitrosalicílico reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores e se reduz a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto corado, cuja absorção máxima da luz ocorre a 540 nm.

A curva-padrão de glicose obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e a variação colorimétrica das concentrações padrões medidas, estão apresentadas nas Figuras 45 e 46. A partir da curva-padrão é possível fazer uma estimativa da concentração dos açúcares redutores presentes na amostra hidrolisada (lactose padrão em contato com os filmes ativos) e comparar com a amostra controle (lactose padrão 5% m/v), uma vez que, a hidrólise da lactose libera glicose e galactose na solução, aumentando a

concentração dos açúcares redutores, provocando maior redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico, intensificando a coloração e a intensidade de absorção no comprimento de onda selecionado. O aumento de 0,1 unidade da absorbância corresponde ao aumento de 10,28 mg/mL de glicose.

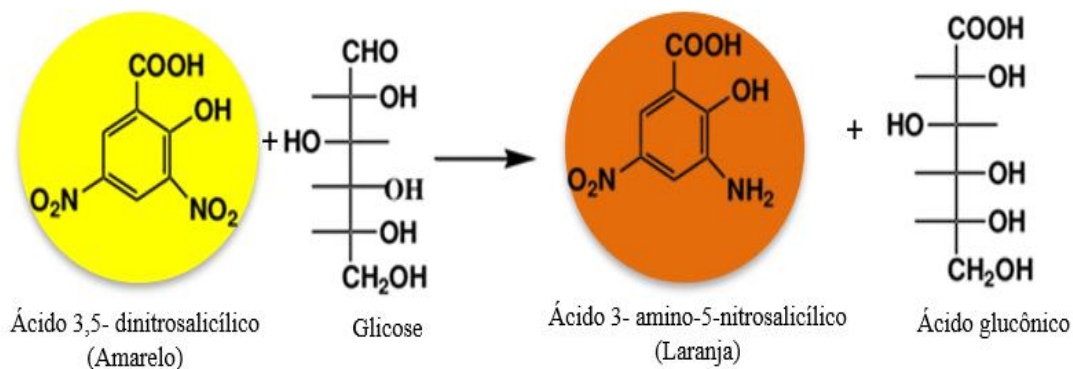


Figura 44. Esquema das reações envolvidas no método DNS.

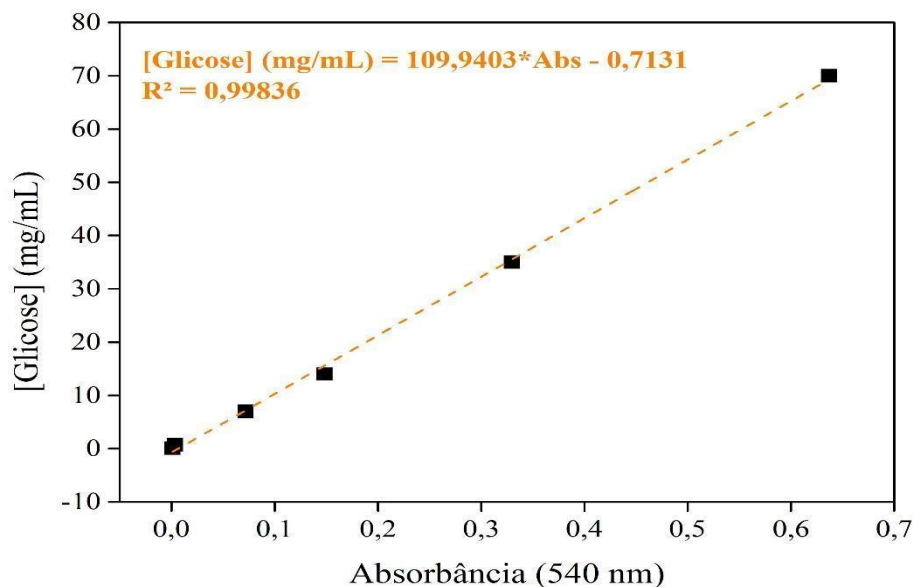


Figura 45. Curva padrão da concentração de glicose (mg/mL) em relação a absorbância pelo método DNS.

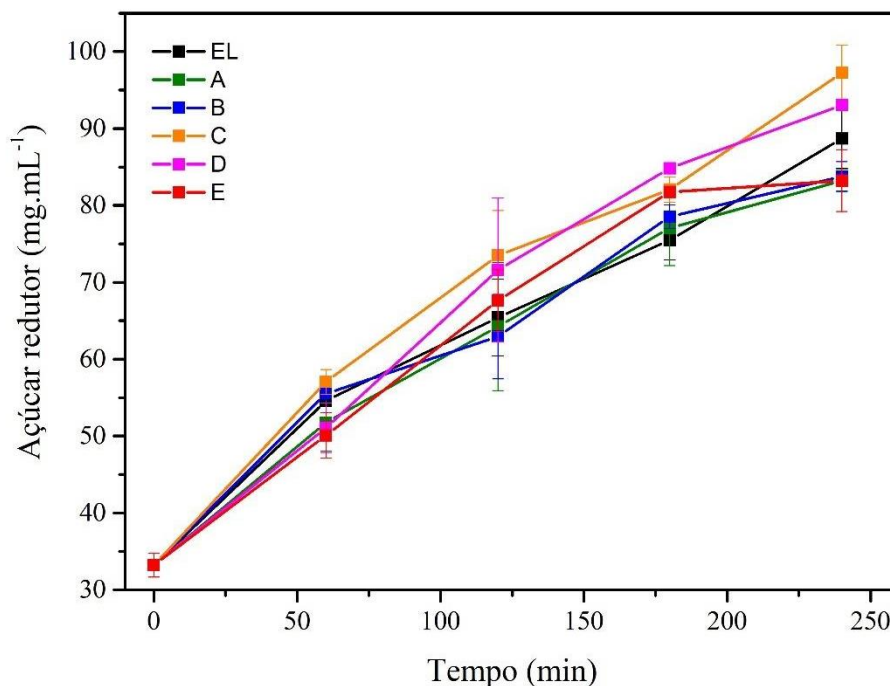


Da direita para esquerda: Branco, 0,07 mg/mL, 0,7 mg/mL, 7 mg/mL, 14 mg/mL, 35 mg/mL, 70 mg/mL.

Figura 46. Variação colorimétrica da reação do ácido DNS com diferentes concentrações de glicose para elaboração da curva padrão.

Os resultados obtidos a partir da hidrólise da lactose presente na solução padrão, expressos em concentração de açúcar redutor (mg/mL) por tempo de reação (min), estão apresentados na Figura 47. No tempo zero (início da reação) a solução de lactose padrão utilizada obteve um valor estimado de concentração de açúcar redutor de 33,8 mg/mL. Com base neste valor, foi possível avaliar a eficiência dos filmes ativos em hidrolisar a lactose, pela quantificação da glicose liberada. Sendo este método pouco qualitativo para glicose pois o reagente pode ser reduzido por outros açúcares presentes na solução, mas, apresenta um valor de variação da concentração desses açúcares a partir da hidrólise da lactose.

Além dos filmes ativos, foi testada a hidrólise da lactose utilizando a enzima em sua forma livre, na mesma concentração que foi imobilizada nos filmes ativos de GEL:CMC. Para a enzima livre, a concentração de açúcar redutor em 240 min de reação foi de 88,70 mg/mL, indicando que a quantidade de enzima utilizada oferece boa taxa de hidrólise obtendo uma concentração de açúcar redutor maior que duas vezes a concentração na solução padrão. O mesmo ocorreu quando a solução foi posta em contato com os filmes ativos. Todas as formulações apresentaram uma concentração de açúcar redutor 100% maior que o encontrado para a solução padrão a partir de 180 min de reação e a maior taxa de hidrólise ao final dos 240 min foi obtida para o filme C (50GEL:50CMC:LL) e D (75GEL:25CMC:LL) com concentração de açúcar redutor de 97,24 mg/mL e 93,06 mg/mL, respectivamente, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). As demais formulações e a enzima livre não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), porém houve diferença significativa com os filmes C e D ($p > 0,05$).



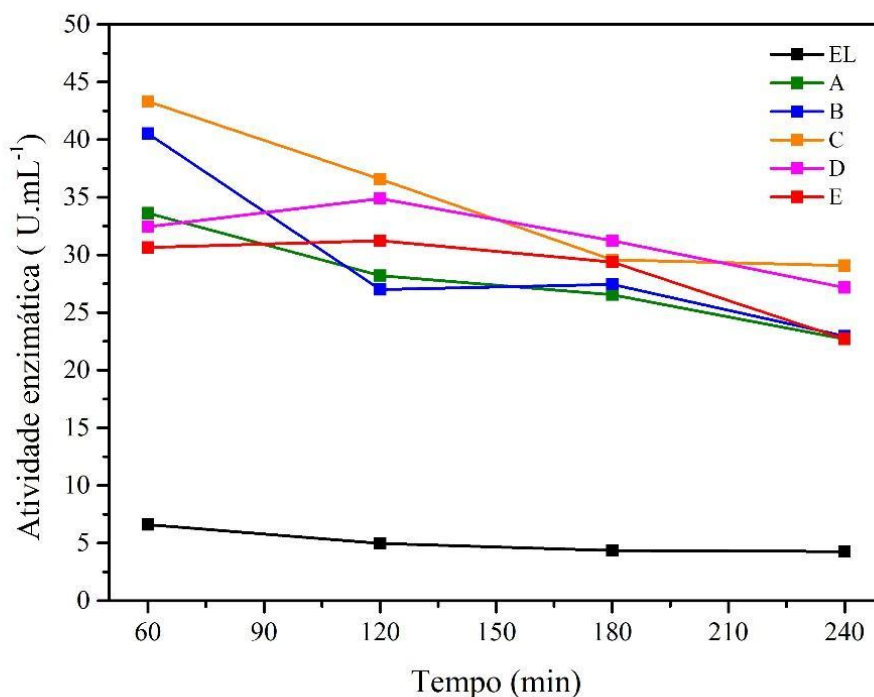
Legenda: **EL**: Enzima livre (β -Gal 3% m/v), **A** (0GEL:100CMC:LL), **B** (25GEL:75CMC:LL), **C** (50GEL:50CMC:LL), **D** (75GEL:25CMC:LL) e **E** (100GEL:0CMC:LL). LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 47. Hidrólise da lactose presente na solução padrão de lactose 5% (m/v) por meio da β -Gal livre e dos filmes ativos em relação ao tempo de reação.

É importante ressaltar que foi utilizado uma área de filme de 10 cm² em 10 mL de solução para avaliar a eficiência hidrolítica. Com isso, apenas uma pequena parte da enzima imobilizada nos filmes foi utilizada, sendo a área total do filme 176,71 cm² com 0,9 mL de enzima incorporada e na área de filme utilizada no teste (10 cm²) a quantidade de enzima presente na solução corresponde proporcionalmente a 0,051 mL de enzima. Para o mesmo volume de solução, a quantidade de enzima livre adicionada foi de 0,3 mL. A atividade enzimática específica dos filmes e da enzima livre foi calculada a partir da concentração açúcar redutor acrescentado à solução. Uma unidade de atividade foi então definida como a quantidade de enzima (mL) utilizada para formar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação, mostrado na Figura 48.

Como a reação hidrolítica ocorre em sítios ativos específicos na molécula da enzima (catálise enzimática ocorre por meio de aproximação e orientação), o processo de imobilização afeta sua atividade catalítica, que é frequentemente influenciada pela reatividade de grupos de aminoácidos em um meio de reação aquoso. Esta informação sugere que no processo de imobilização das enzimas nos filmes poliméricos, houveram

reações ou posicionamentos específicos que favoreceram a atividade da enzima, indicando que o filme ativo possui maior atividade enzimática que a enzima livre, podendo reduzir os custos do processo de obtenção de produtos zero lactose e favorecer reações de transgalactosilação.



Legenda: **EL**: Enzima livre (β -Gal 3%*m/v*), **A** (0GEL:100CMC:LL), **B** (25GEL:75CMC:LL), **C** (50GEL:50CMC:LL), **D** (75GEL:25CMC:LL) e **E** (100GEL:0CMC:LL). LL: 3% (*m/v*) β -Gal e 2% (*m/v*) lipase.

Figura 48. Atividade enzimática específica para a β -Gal livre e filmes ativos na hidrólise de lactose.

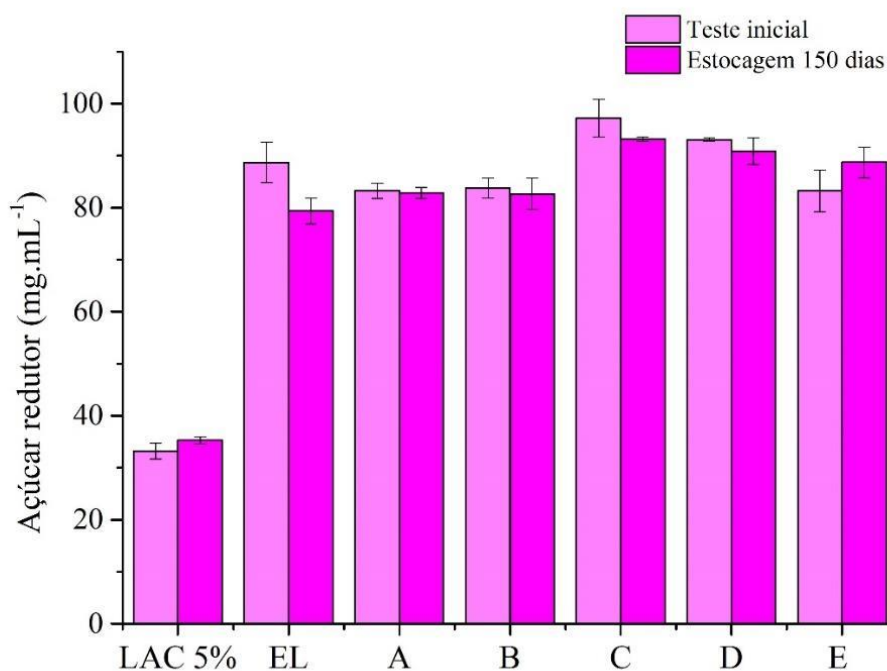
Quando o AA incorporado as embalagens ativas é uma enzima (biocatalisador), a utilização de embalagens produzidas a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre a embalagem e o biocatalisador, criando um microambiente favorável, beneficiando a atividade enzimática (Mohidem *et al.*, 2023).

No estudo realizado por Cargnin, Gasparin & Paulino (2020) em que β -Gal foi imobilizada em hidrogeis de pectina, concentrações mais altas de glicose foram produzidas nas enzimas imobilizadas quando comparadas com sua forma livre, associado à maior resistência mecânica e térmica do hidrogel, além de ocorrer a desnaturação da enzima livre no contato direto com a lactose, reduzindo a concentração de glicose, da

mesma forma que ocorreu no presente estudo. Este efeito pode ser melhor avaliado por meio da cinética enzimática.

A estabilidade dos filmes ativos à estocagem sob refrigeração foi testada após um período de 150 dias. O mesmo teste enzimático foi aplicado e os resultados estão apresentados na Figura 49.

A atividade enzimática dos filmes ativos foi mantida após o período de teste. Não houveram perdas significativas ($p < 0,05$) na taxa de hidrólise dos filmes, sendo um resultado favorável para o processo de imobilização da enzima nos filmes de GEL:CMC. Já para a enzima livre, houve uma redução significativa ($p > 0,05$) na taxa de hidrólise, sendo o valor obtido após 150 dias correspondente a 89,5% do valor inicial, confirmando as vantagens da imobilização a longo prazo.



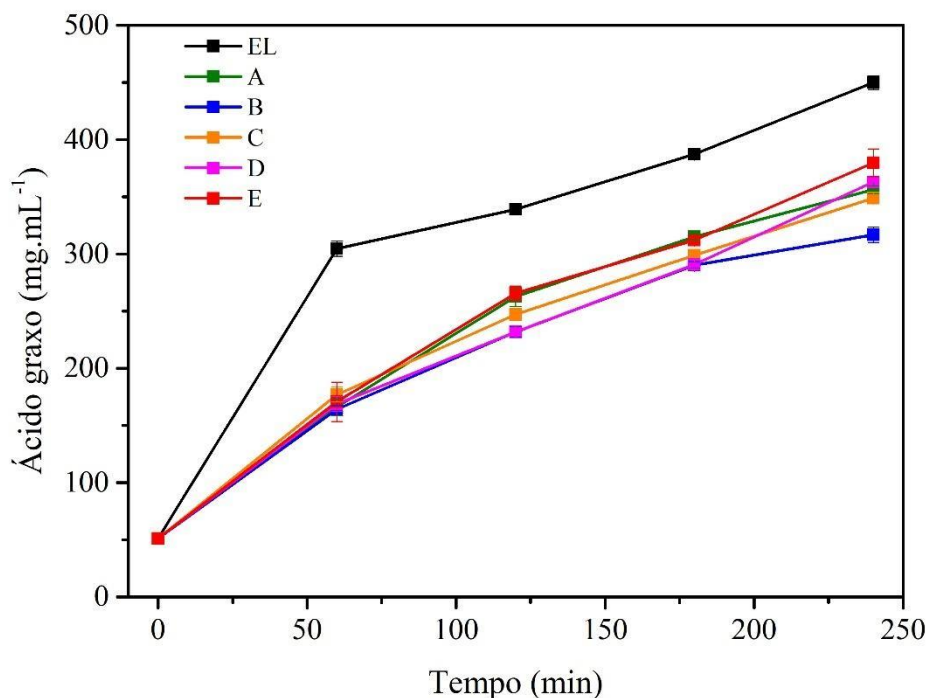
Legenda: **LAC 5%**: Solução padrão de lactose 5% mg/mL; **EL**: Enzima Livre (β -Gal 3% m/v); **A**: filme 0GEL:100CMC:LL; **B**: filme 25GEL:75CMC:LL; **C**: filme 50GEL:50CMC:LL; **D**: filme 75GEL:25CMC:LL e **E**: filme 100GEL:0CMC:LL. LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 49. Estabilidade da β -Gal livre e dos filmes ativos após 150 dias de estocagem sob refrigeração.

5.11 HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS

O resultado da hidrólise de triglicerídeos avaliada pelo teor de ácidos graxos (mg/mL) liberados da amostra de creme de leite por um tempo de reação equivalente a

240 min, está demonstrada graficamente na Figura 50. Observa-se que a amostra de creme de leite (CL) apresentou um teor inicial de ácido graxo correspondente a $51,14 \pm 1,43$ mg/mL. Em contato com a enzima livre (EL) os triglicerídeos do creme de leite são hidrolisados e liberam ácidos graxos importantes para a manutenção da saúde em uma concentração de $450 \pm 5,85$ mg/mL. Os filmes ativos apresentaram um valor de ácidos graxos hidrolisados em torno de 353 ± 23 mg/mL.

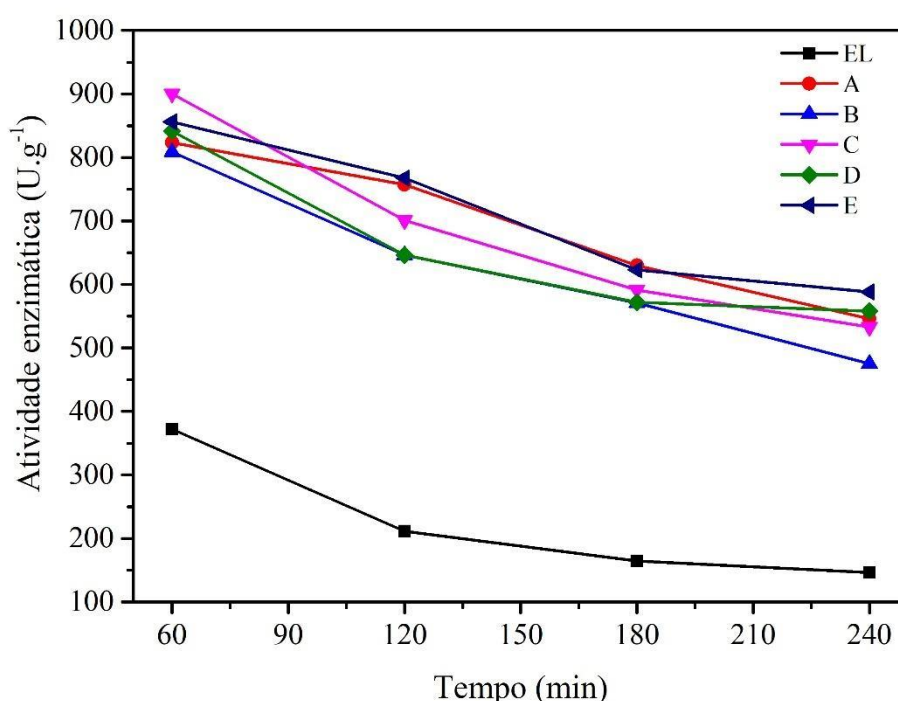


Legenda: **EL**: Enzima Livre (Lipase 2% m/v); **A**: filme 0GEL;100CMC:LL; **B**: filme 25GEL;75CMC:LL; **C**: filme 50GEL;50CMC:LL; **D**: filme 75GEL;25CMC:LL e **E**: filme 100GEL;0CMC:LL. LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 50. Teor de ácido graxo liberado pela hidrólise de triglicerídeos por meio da lipase livre e dos filmes ativos por tempo de reação.

Para avaliar a atividade enzimática específica da lipase livre e dos filmes ativos foi feita a correlação da área de filme com a quantidade de enzima adicionada, sendo que para uma área de 2 cm² (utilizada no teste em 2 mL de creme de leite) a quantidade de enzima correspondente foi de 0,0082 g e para a mesma quantidade de amostra foram utilizados 0,04 g de enzima livre (2% m/v). O cálculo foi feito a partir da concentração de ácido graxo acrescentado à solução. Uma unidade de atividade foi então definida como a quantidade de enzima (g) utilizada para formar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação, mostrado na Figura 51.

Semelhante ao que foi analisado para imobilização da β -Gal, durante o processo de imobilização há um favorecimento a estrutura da enzima, provavelmente, promovendo conformações mais abertas possibilitando a lipase ser imobilizada com ativação interfacial aprimorada, beneficiando as interações efetivas entre enzima e substrato. Além disso, pode ter ocorrido forte ancoragem das enzimas na estrutura dos filmes devido às interações das enzimas com os grupos funcionais dos polímeros, aumentando assim sua atividade e estabilidade. A atividade dos filmes ativos foi 2 vezes maior que a atividade apresentada para a enzima livre, favorecendo o processo de imobilização.

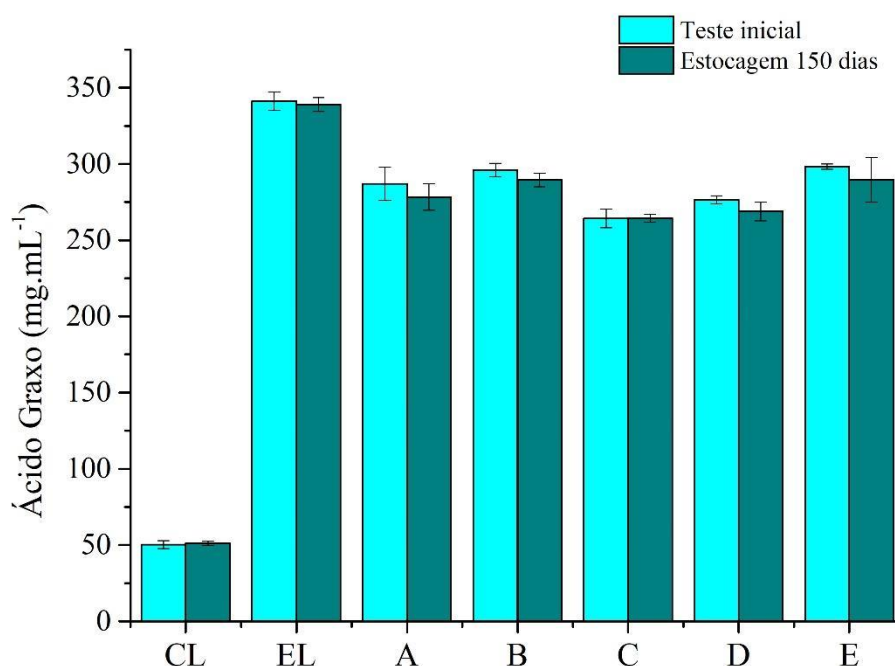


Legenda: **EL**: Enzima Livre (Lipase 2% m/v); **A**: filme 0GEL;100CMC:LL; **B**: filme 25GEL:75CMC:LL; **C**: filme 50GEL:50CMC:LL; **D**: filme 75GEL:25CMC:LL e **E**: filme 100GEL:0CMC:LL. LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 51. Atividade enzimática específica para a lipase livre e filmes ativos na hidrólise de triglicerídeos.

A estabilidade da enzima livre e dos filmes ativos à estocagem sob refrigeração foi testada após um período de 150 dias. O mesmo teste enzimático foi aplicado e os resultados estão apresentados na Figura 52. Não houve diferença significativa no valor da taxa de hidrólise quando comparados o teste inicial e após 150 dias para cada amostra. A taxa de hidrólise permaneceu a mesma, indicando que os filmes possuem boa estabilidade enzimática também para a lipase, favorecendo o processo de imobilização.

Guan *et al.* (2021), realizaram um estudo comparativo entre lipases livres e imobilizadas em nanotubos de α -lactalbumina para aumentar a liberação de ácidos graxos que conferem sabor característico aos queijos com baixo teor de gordura. Os resultados obtidos para a atividade enzimática foram semelhantes ao encontrado no presente trabalho, sendo que as enzimas imobilizadas obtiveram uma atividade consideravelmente superior à enzima livre e os autores explicam que este aumento está atribuído as lipases serem fortemente adsorvidas na superfície do nanotubo e o equilíbrio conformacional ser deslocado para a forma aberta com alta atividade.



Legenda: **CL**: Creme de Leite; **EL**: Enzima Livre (Lipase 2% m/v); **A**: filme 0GEL:100CMC:LL; **B**: filme 25GEL:75CMC:LL; **C**: filme 50GEL:50CMC:LL; **D**: filme 75GEL:25CMC:LL e **E**: filme 100GEL:0CMC:LL. LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Figura 52. Estabilidade da lipase livre e dos filmes ativos após 150 dias de estocagem sob refrigeração.

5.12 ANÁLISE DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA POR FTIR

Para confirmar a eficiência dos filmes na hidrólise de lactose e lipídios em produtos lácteos foi realizado o teste em creme de leite através da espectroscopia FTIR-ATR. O creme de leite zero lactose foi utilizado como referência, Figura 53.

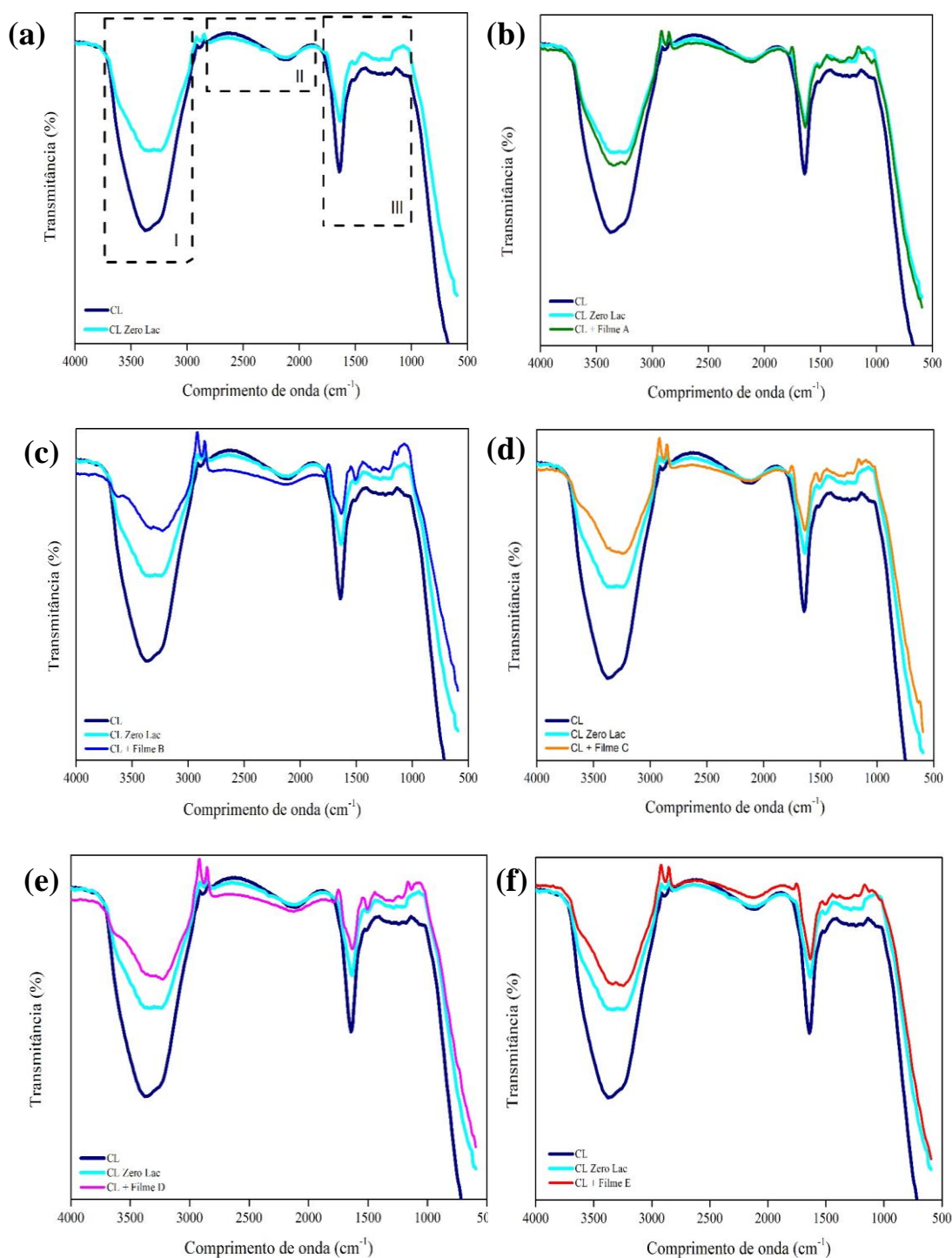
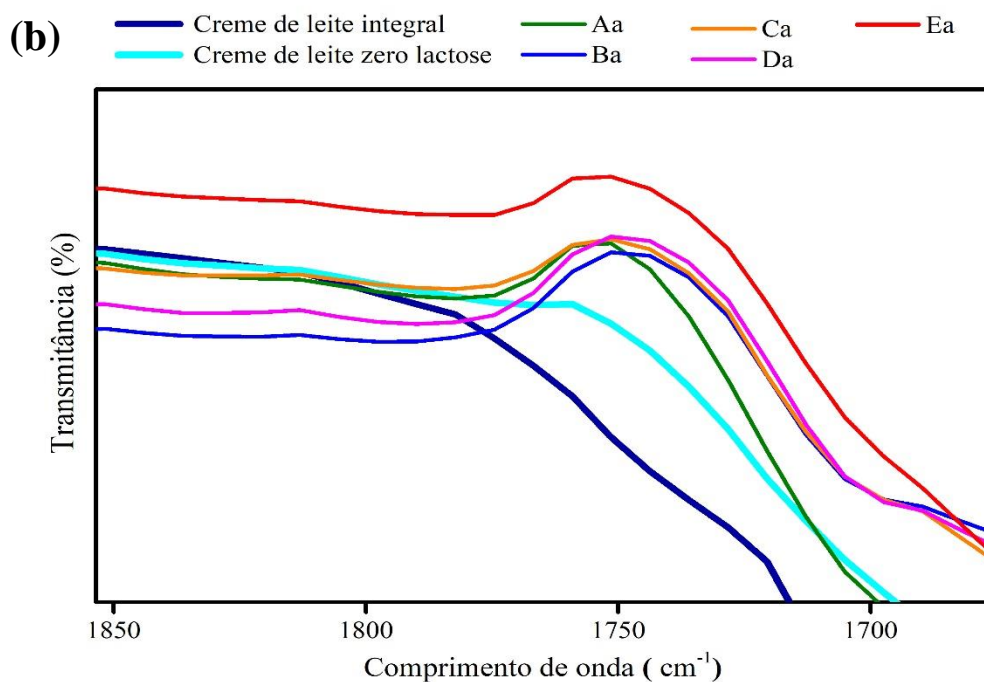
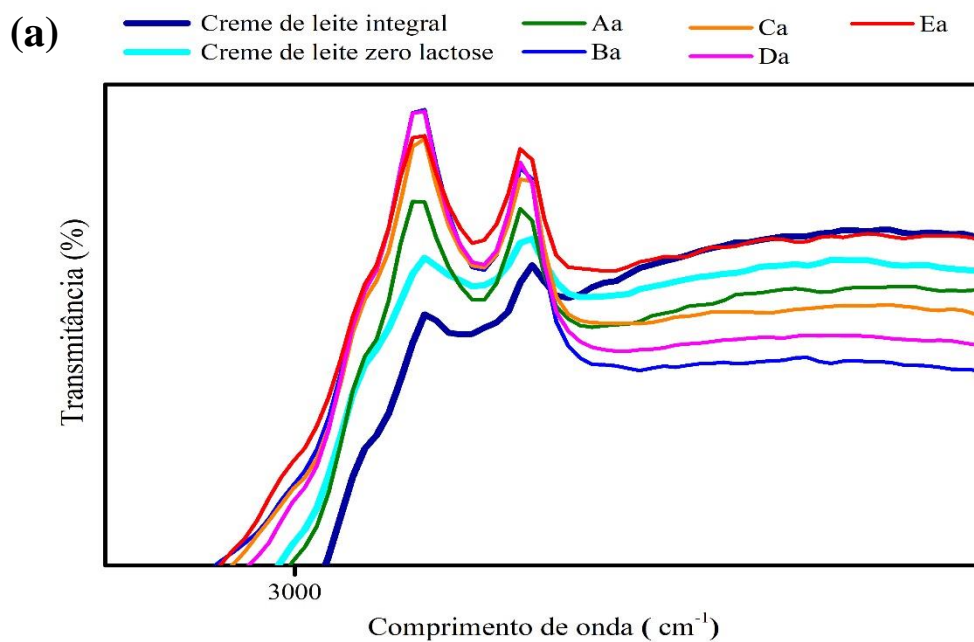


Figura 53. (a) FTIR-ATR para o creme de leite (CL) e CL zero lactose; CL em contato com os filmes ativos: (b) A (0GEL:100CMC:LL), (c) B (25GEL:75CMC:LL), (d) C (50:GEL:50CMC:LL), (e) D (75GEL:25CMC:LL) e E (100GEL:0CMC:LL). LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Normalmente, as ligações de ácidos graxos são identificadas por bandas na faixa de 3000 e 2800 cm^{-1} ligados a gordura B, Figura 54 (a), advindo das ligações CH_2 presentes nas cadeias acil dos lipídios do leite, respectivamente triglicerídeos e

fosfolipídios e as bandas entre 1800 e 1700 cm^{-1} correspondentes a gordura A, Figura 54 (b), com a vibração do estiramento C-O das ligações estéricas dos triacilgliceróis ligados à associação proteína-lipídio através do grupo carbonil (Nguyen *et al.*, 2023). As bandas na região entre 1700 e 1500 cm^{-1} corresponde a Amida I e II dos grupos funcionais C=O, N-H e a região de 1500 a 900 cm^{-1} associada a Amida III (C-N) e aos carboidratos (C-O/C-C/C-O-O/ C-H).



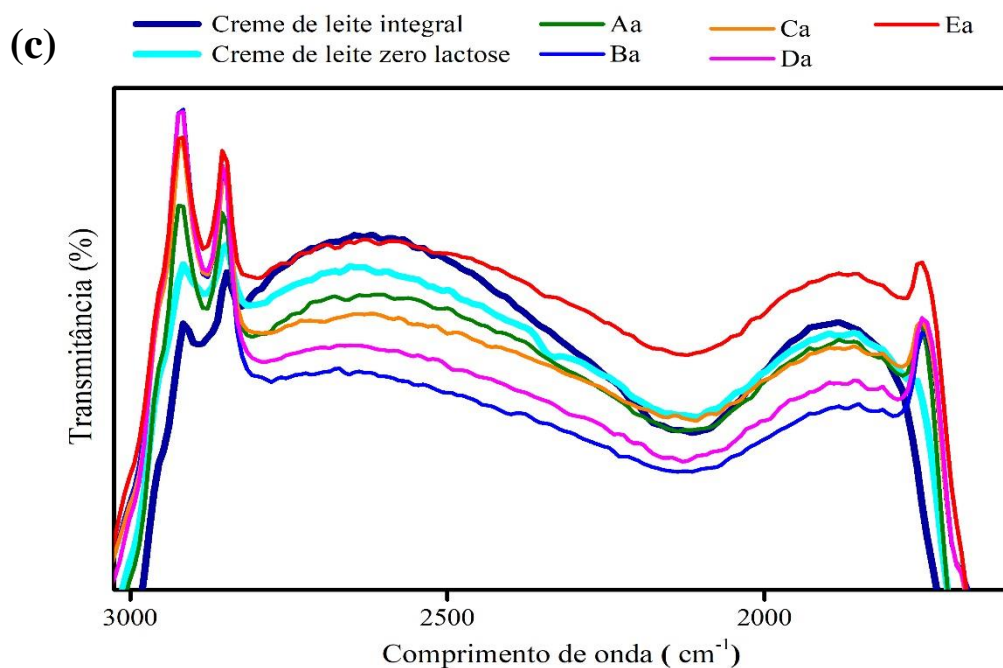


Figura 54. (a) 3000 - 2800 cm^{-1} : Gordura B; (b) 1800-1700 cm^{-1} : Gordura A e (c) 3000-1700 cm^{-1} : Hidrólise da gordura e liberação de AG. Legenda: Aa (0GEL:100CMC:LL), Ba (25GEL:75CMC:LL), Ca (50:GEL:50CMC:LL); Da (75GEL:25CMC:LL) e Ea (100GEL:0CMC:LL). * LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

Observando o espectros do creme de leite e do creme de leite zero lactose, observa-se que com a hidrólise da lactose há uma variação na intensidade das bandas mais intensa na região I entre 3500 - 3000 cm^{-1} e na região III entre 1700 - 900 cm^{-1} . A primeira pelo consumo de -OH na quebra da ligação glicosídica, além das interações dos polímeros com os componentes do creme de leite e a segunda relacionada à ausência das ligações glicosídicas devido a hidrólise da lactose em moléculas menores de glicose e galactose alterando a vibração dos grupos (C-O, C-C, C-O-O, C-H) (Pinto *et al.*, 2021), representada na Figura 55. Quando o creme de leite foi colocado em contato com os filmes ativos houve ainda maior redução na intensidade das bandas nestas regiões, indicando hidrólise da lactose quando comparada com o creme de leite zero lactose.

Na região II, comparando o creme de leite e o creme de leite zero lactose praticamente não houveram alterações. Porém, quando em contato com os filmes ativos observa-se uma redução na intensidade das bandas em 2885 cm^{-1} correspondente ao estiramento CH_2 da gordura B e na região II um aumento na intensidade das bandas pela hidrólise dos lipídios em ácidos graxos, Figura 54 (c). Indicando assim, que os filmes ativos, atuam satisfatoriamente na hidrólise da lactose e dos lipídios. Sendo o filme B

(25GEL:75CMC) com o maior potencial hidrolítico, apresentando maior redução da lactose e maior taxa de hidrólise de triglicerídeos.

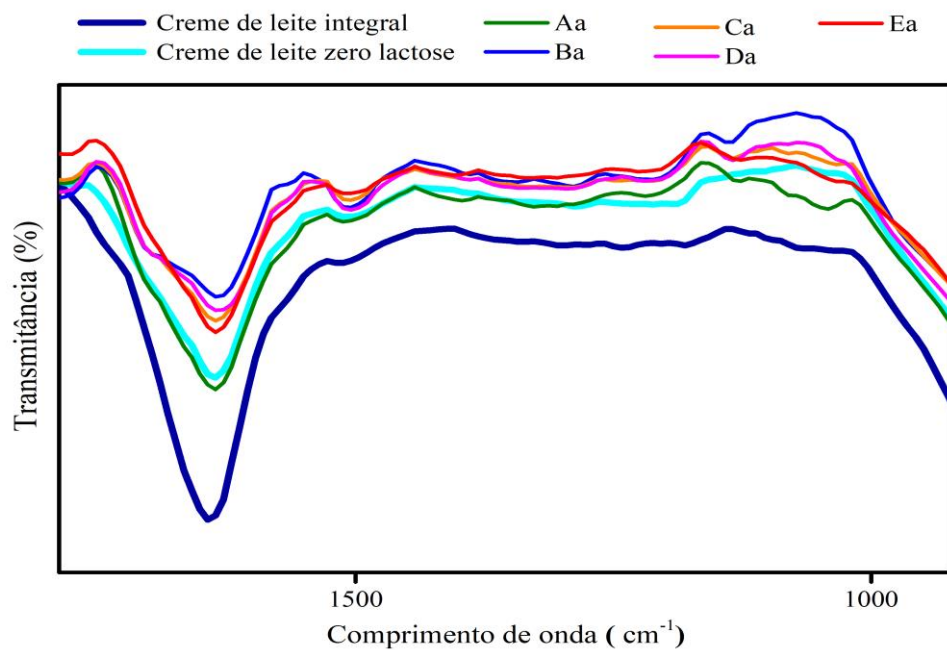


Figura 55. 1700 - 900 cm^{-1} : Hidrólise da lactose. Legenda: Aa (0GEL:100CMC:LL), Ba (25GEL:75CMC:LL), Ca (50:GEL:50CMC:LL); Da (75GEL:25CMC:LL) e Ea (100GEL:0CMC:LL). * LL: 3% (m/v) β -Gal e 2% (m/v) lipase.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de blendas poliméricas é uma estratégia para superar as deficiências de filmes individuais baseados em polímeros. Neste trabalho, blendas poliméricas de GEL e CMC foram produzidas e a biocompatibilidade entre os polímeros foi confirmada por meio de análises morfológicas. As propriedades físicas e químicas das blendas foram avaliadas, obtendo a melhor composição para incorporação das enzimas lipase e β -Gal, para seu uso em embalagens de produtos lácteos, especificamente produtos sem lactose com reduzido teor de triglicerídeos, aumentando suas propriedades nutraceuticas. A CMC foi caracterizada como o polímero com maior hidrofilicidade, obtendo maiores níveis de PVA e teor de umidade, maior resistência mecânica e melhores propriedades térmicas. A CMC também formou filmes mais transparentes e, quanto maior sua proporção na solução filmogênica, melhores as propriedades da blenda. Em relação às propriedades enzimáticas, os filmes ativos foram capazes de hidrolisar a lactose e os triglicerídeos presentes na amostra. As blendas se destacam como um bom suporte para imobilização enzimática, aumentando a estabilidade térmica e apresentando boas taxas de hidrólise quando em contato com um produto lácteo. O desenvolvimento de embalagens ativas utiliza uma tecnologia de baixo custo e oferece maior segurança para pessoas intolerantes à lactose, evitando contaminação cruzada e é um processo promissor para suporte de outros agentes ativos. As matrizes são completamente solúveis em água, permitindo liberação completa do agente ou ingrediente ativo adicionado e podem ser utilizadas tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica. A co-imobilização enzimática em materiais de embalagens ainda é pouco explorada, possibilitando obter processos inovadores com a técnica. Além disso, os filmes ativos podem promover transformações que vão agregar valor nutricional, como a produção de GOS e modificações na gordura do leite aumentando o teor de ácidos graxos benéficos à saúde. A hidrólise enzimática é beneficiada quando as enzimas estão imobilizadas nos filmes o que viabiliza a produção e utilização dos filmes ativos como componentes de embalagem para produtos lácteos. De maneira geral, a formulação C (50GEL:50CMC) apresentou-se como a composição de blenda com melhores resultados para produção em maior escala, com boas propriedades físicas, mecânicas, de barreiras, térmicas e enzimáticas com a obtenção de um processo promissor de embalagem ativa.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos é possível confirmar a eficácia dos filmes ativos quanto a hidrólise da lactose e dos triglicerídeos. Se faz necessário um estudo mais detalhado quanto aos subprodutos da hidrólise e a quantificação dos mesmos. Sendo assim, com técnicas específicas, como a cromatografia gasosa e análises de HPLC, pode-se determinar a presença dos GOS e ácidos graxos conjugados. A cinética enzimática pode ser explorada determinando a atividade enzimática, as constantes de hidrólise, velocidade de reação e parâmetros ótimos para a hidrólise. Dessa forma o filme ativo pode ser ainda melhor caracterizado quanto aos seus benefícios aos produtos lácteos e aos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; HU, Y.; ABIDI, N. (2021). Cellulose dissolution ionic liquid under mild conditions: Effect of hydrolysis and temperature. **Fibers**, 9, 5. <https://doi.org/10.3390/fib9010005>
- AGGARWAL, S., CHAKRAVARTY, A., IKRAM, S. (2021). A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 167, 962–986. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.052>
- AGGARWAL, S.; FATIMA, A.; SHANDILYA, S.; MANGALA, B.; IKRAM, S. (2024) Covalent immobilization os *Aspergillus niger* lipase on epoxy-activated silver oxide nanoparticles-impergnated chitosan surfaces: Characterization, stability & kinetic studies. **Catalysis Letters**. 154, 3594-3618. <https://doi.org/10.1007/s10562-024-04578-1>
- AHMAD, M. I.; LI, Y.; PAN, J.; DAI, H.; FU, Y.; HUANG, T.; FAROOQ, S.; ZHANG, H. (2024). Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. **International Journal of Biological Macromolecules**. 254, 128037. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128037>
- AHMAD, N.; WAHAB, R.; OMAR, S. Y. (2014). Thermal decomposition kinectics of sodium caoboxymethyl cellulose: Model-free methods. **European Journal of Chemistry**. 5, 247-251. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.5.2.247-251.971>
- AKHTAR, H. M. S.; AHMED, S.; OLEWNIK-KRUSZKOWSKA, E.; GIERSEWSKA, M.; BRZEZINSKA, M. S.; DEMBINSKA, K.; KALWASINSKA, A. (2023) Carboxymethyl cellulose based films enriched with polysaccharides from mulberry leaves (*Morus alba* L.) as new biodegradable packaging material. **International Journal of Biological Macromolecules**. 253, 127633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127633>
- AKHTAR, H. M. S.; ZHAO, Y.; LI, L.; SHI, Q. (2024) Novel active composite films based on carboxymethyl cellulose and sodium alginate incorporated with phycocyanin: Physico-chemical, microstructural and antioxidante properties. **Food Hydrocolloids**. 147, 109440. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109440>
- ALGHAMDI, S. A.; REHMAN, K.; ZAMAN, U.; ALSHAREEF, S. A.; ZGHAB, I.; ALANAZI, A. N.; NASR, S.; KHAN, S. U.; ALISSA, M.; ALQASEM, A. A. (2024) β -Galactosidase isolated from *Ramunculus arvensis* seeds to synthesize trisaccharide: kinects and thermodynamic properties. **Food Bioscience**. 59, 103943. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103943>
- AL-HASSAN, A.A. (2022) Development and characterization of gelatin films derived from camel skin: effects of camel age and plasticizes. **Journal of Food Measurement Characterization**. 16, 4896–4903, <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01577-x>

- AL-HASSAN, A.A. (2024) Development and characterization of camel gelatin films: Influence of camel boné age and glycerol or sorbitol on film properties. **Heliyon**. 10, e30338. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30338>
- ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES, D.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. (2021). Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**. 362, 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.059>
- AZARIFAR, M.; GHANBARZADEH, B.; KHIABANI, M. S.; BASTI, A. A.; ABDULKHANI, A.; NOSHIRVANI, N.; HOSSEINI, M. (2019). The optimization of gelatin-CMC based active films containing chitin nanofiber and *Trachyspermum ammi* essential oil by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. 208, 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.005>
- BAI, X.; SUN, X.; YU, Y.; GUO, Y.; NIAN, L.; CAO, C.; CHENG, S. (2023). Immobilization of α -galactosidase in polyvinyl alcohol-chitosan-glycidyl metracrylate hydrogels based on directional freezing-assited salting-out strategy for hydrolysis of RFOs. **International Journal of Biological Macromolecules**. 242, 124808. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124808>
- BAKRY, N. F.; ISA, M.. I. N.; SARBON, N. M. (2017). Effect of sorbitol at different concentrations on the functional properties of gelatin/carboxymethyl cellulose (CMC)/chitosan composite films. **International Food Research Journal**. 24 (4), 1753-1762.
- BASTOS, B. M.; FARIAS, B. S.; CASATI, M. O.; ENGELMANN, J. I.; MOURA, J. M.; PINTO, L. A. A. (2021). Gelatin films from carp skin crosslinked by gallic acid and incorporated with chitosan/tuna lipid fractions. **Journal of Polymers and the Environment**. 29, 2096-2110. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01995-2>
- BAT-OZMATARA, M.; UNLU, A.; GEVREK, T. N. (2023). Preparation of isocyanate-containing hydrogel films as antibacterial enzyme immobilization matrices. **Reactive and Functional Polymers**. 192, 105695. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105695>
- BERNAL, C.; LOPEZ, B. L.; MESA, M. (2007). Immobilization of lactase in sílica with controlled porosity. **Scientia et Technica Año XIII**. 36, 0122-1701.
- BERTI, S.; JAGUS, R.J.; FLORES, S.K.; GONZALEZ-MARTÍNEZ, C. (2023) Antimicrobial Edible Starch Films Obtained By Casting and Thermo-compression Techniques, **Food Bioprocess Technology**. 17, 904–916. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03172-4>
- BORKENT, J. W., J. BEELEN, J. O. LINSCHOOTEN, A. J. C. ROODENBURG, AND M. A. E. DE VAN DER SCHUEREN. (2019). The Consumer study: a randomized trial towards the effectiveness of protein-rich ready-made meals and protein-rich dairy products in increasing protein intake of community-dwelling older adults after switching from self-prepared meals towards ready-made meals. **Journal of Nutritional Science**. 8, e30. <https://doi.org/10.1017/jns.2019.27>

BOURLIEU, C., BOUHALLAB, S., & LOPEZ, C. (2009). Biocatalyzed modifications of milk lipids: Applications and potentialities. **Trends in Food Science & Technology**. 20, 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.005>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios gerais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos**. Regulamento técnico nº 91, 11 de maio de 2001. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano**. Regulamento técnico nº 205, 17 de novembro de 2006. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano**. Regulamento técnico nº 26, 26 de maio de 2009. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. (2009) Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. 23, 729-735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.017>

CARASCHI, J. C.; FILHO, S. P. C. (1999). Influence of the degree of substitution and substituent distribution on the equilibrium properties of carboxymethylcellulose in aqueous solution. **Polímeros**. 9. <https://doi.org/10.1590/S0104-14281999000200015>

CARGNIN, M. A.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. (2020). Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in pectin-based hydrogels: Modeling and optimization by factorial design. **LWT**. 132, 109836. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109836>

CATANZARO, R., SCIUTO, M., & MAROTTA, F. (2021). Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutrition Research*, 89, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.02.003>

CHEN, H. LAN, X. ; GUAN, X. ; LUO, R. ; ZHANG, Q. REN, ; H. ; XU, Z. ; TANG, J. (2024). Comparative study on the effects of chitosan, carrageenan, and sodium alginate on the film-forming properties of fish gelatin skin. *LWT – Food Sci. Technol.* 199, 116111. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116111>

CHEN, J.; LUO, J.; FENG, J.; WANG, Y.; ZHOU, Y. (2024) Spatiotemporal controlled released hydrogels for multi-system regulated bone regeneration. **Journal of Controlled Release**, 372, 846-861. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.06.065>

CHRISTENA, S. D. L. R.; RAJARAM, Y. R. S. (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**. 3, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

COPPOLA, M. DJABOUROV, M. FERRAND, M. (2012) Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids. **Polymers**, 53, 1483-1493. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.02.016>

- COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; FREITAS, L.; CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, W. P. (2022). Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance. **Chemical ENGINEERING Research and Design**. 183, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026>
- CUI, F. ; XI, ; L.; WANG, D. ; REN, L.; TAN, X.; LI, X. ; LI, J. ; LI, T. (2023) Advanced in carbon dot-based hydrogels for antibacterial, detection and adsorption. *Coord. Chem. Rev.* 497, 215457. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215457>
- DANIELS, F.; ROMENY, BART; RUBBENS, M.P.; ASSEN, H. V. (2007). Quantification of Collagen Orientation in 3D Engineered Tissue. **Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering**, 3rd, p. 282-286. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68017-8_73.
- DANTINE, S.; BLECKER, C. (2014). Interactions of lipases with fat globule membrane monolayers using Langmuir film balance. **International Dairy Journal**. 35, 81-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.013>
- DESHMUKH, R. K.; AKHILA, K.; RAMAKANTH, D. KIRTIRAJ, K. G. (2022). Guar gum/carboxymethyl cellulose based antioxidant film incorporated with halloysite nanotubes and litchi shell waste extract for active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. 201, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.198>
- DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. (2016) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- DICKINSON, E. (2008) Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v. 4, n. 5, p. 932. <http://dx.doi.org/10.1039/b718319d>
- DONG, L., LI, Y., CHEN, Q., LIU, Y., QIAO, Z., SANG, S., ZHANG, J., ZHAN, S., WU, Z., & LIU, L. (2023). Research advances of advanced glycation end products in milk and dairy products: Formation, determination, control strategy and immunometabolism via gut microbiota. **Food Chemistry**. 417, 135861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135861>
- DONG, L.; ZHONG, Q. (2019) Dispersible biopolymer particles loaded with lactase as a potential delivery system to control lactose hydrolysis in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 67, 6559-6568. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01546>
- DUAN, F.; SUN, T.; ZHANG, J.; WANG, K. WEN, Y. LU, L. (2022). Recent innovations in immobilization of β -galactosidases for industrial and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**. 61, 108053. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108053>
- ELZOGHBY, A.O. (2013). Gelatin-Based Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems: Reviewing Three Decades of Research. **Journal of Controlled Release**. 172, 1075–1091. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>

- ESTEGHLAL, S.; NIAKOUSARI, M.; HOSSEINI, S. M. (2018). Physical and mechanical properties of gelatin-CMC composite films under the influence of electrostatic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 114, p. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.079>
- ETXABIDE, A.; MOJIO, D.; GUERRERO, P.; CABA, K.; GÓMEZ-ESTACA, J. (2024) Chitin nanowhisker-containing photo-crosslinked antimicrobial gelatin films. **Food Hydrocolloids**, vol.147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109371>
- EVANGELISTA, R. C. Tecnologia Farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas, São Paulo. **Racine Qualificação e Acessória**, p. 01-80, 1998.
- FENG, X.; MA, R.; WANG, Y.; TONG, L.; WEN, W.; UM, T.; TIAN, J.; YU, B.; ZHANG, J. (2024). Non-targeted metabolomics identifies biomarkers in milk with high and low fat percentage. **Food Research International**. 179, 113989. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.113989>
- GENNARI, A.; LEONHARDT, F.; TUPUNA-YEROVI, D. S.; BENVENUTTI, E. V.; NICOLODI, S.; RENARD, G.; CHIES, J. M.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. (2024). Promising biocatalysts for producing lactose-free food matrices: β -galactosidase immobilized on cellulose-rich agro-industrial waste supports. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 97,103803. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103803>
- GETAHUN, M. J.; KASSIE, B. B.; ALEMU, T. S. (2024) Recent advances in biopolymers synthesis, properties & commercial applications: a review. **Process Biochemistry**. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.06.034>
- GHADERMAZI, R.; HAMDIPUR, S.; SADEGHI, K.; GHADERMAZI, R.; ASL, A. K. (2019). Effect of various additives on the properties of the films and coatings derived from hydroxypropyl methylcellulose - A review. **Food Science & Nutrition**. 7, 3361-3841. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1206>
- GUAN, T.; LIU, B.; WANG, R.; HUANG Y.; LUO, J.; LI, Y. (2021). The enhanced fatty acids release for low-fat cheeses by carrier immobilized lipases on O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**. 116, 106651. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106651>
- GUERRERO, C.; VERA, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**. 70, 9-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
- GUL, B. Y.; PEKGENC, E.; VATANPOUR, V.; KOYUNCU, I. (2023). A review of cellulose-based derivatives polymers in fabrication of gas separations membranes: Recent developments and challenges. **Carbohydrate Polymers**. 321, 121296. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121296>
- GUPTA, S. Global Food Enzymes Market Overview, Market Research Future, September 2024, ID:MRFR/F-B & N/1262-HCR. [Food Enzymes Market Growth, Size, Share, Trend, Industry Report \(marketresearchfuture.com\)](https://www.marketresearchfuture.com/reports/food-enzymes-market-growth-size-share-trend-industry-report-1262)

- GUZMAN-PUYOL, S.; BENÍTEZ, J. J.; HEREDIA-GUERRERO, J. A. (2022). Transparency of polymeric food packaging materials. **Food Research International**. 161, 111792. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111792>
- HASSAN, N.; AHMAD, T.; ZAIN, N. M.; AWANG, S. R. (2021). Identification of bovine, porcine and fish gelatin signatures using chemometrics fuzzy graph method. **Scientific Reports**. 11, 9793. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89358-2>
- HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSROD, O. (2024) Physical and rheological properties os fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**. 18, 203-213. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1)
- HAZIRAH, M. A. S. P. N. ; ISA, M. I. N. ; SARBON, N. M.(2016). Effect of xanthan gum on the physics and mechanical properties of gelatin- carboxymethyl cellulose films blends. **Food Packaging and Shelf Life**. 9, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.05.008>
- HE, B.; WANG, S.; LAN, P.; WANG, W. & ZHU, J. (2022). Topography and physical properties of carboxymethyl cellose films assembled with calcium and gelatin at diferente temperature and humidiy. **Food Chemistry**, vol. 382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132391>
- HEERDEN, C.; BOSMAN, C. E.; FARZAD, S.; GORGENS, J. F. (2024). Techno-economics and environmental assessment of sorbitol and itaconic acid production from sugarcane-based feedstock. **Chemical Engineering Science**. 299, 120431. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2024.120431>
- HU, Y.; ALJUMAAH, M. R.; AZCARATE-PERIL, M. A. (2024). Galacto-Oligosaccharides and the elderly gut: Implications for immune restoration and health. **Advances in Nutrition an International Review Journal**. 15, 100263. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2024.100263>
- INANAN, T. (2022) Cryogel disks for lactase immobilization and lactose-free milk production. **LWT - Food Science and Technology**, 154, 112608. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112608>
- JOSHI, G.; NAITHANI, S. ; VARSHNEY, V.K. ; BISHT, S.S. ; RANA, V. ; GUPTA, P.K. (2015). Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from office waste paper: a greener approach towards waste management. **Waste Management**. 38, 33-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.015>
- KADHUM, A. A., & SHAMMA, M. N. (2017). Edible lipids modification processes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57 , 48–58. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848834>
- KALATHINATHAN, P.; SAIN, A.; PULICHERLA, K.; MUTHUKALIANNAN, G. K. (2023). A review on the various sources of β -Galactosidase and its lactose hydrolysis property. **Current Microbiology**. 80, 122. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03220-4>
- KAMATH. K. R.; PARK, K. (1993). Biodegradable hydrogels in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 11, 59-84. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90027-2)

- KAN, A.; RIAHI, Z.; KIM, J.T.; RHIM, J. (2024). Carboxymethyl cellulose/gelatina film incorporated with eggplant peel waste-driven carbon dots for active fruit packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. 271, 132715. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132715>
- KAREB, O.; AIDER, M. (2019). Whey and its derivatives for prebiotics, probiotics, synbiotics and functional foods: a critical review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 11, 348-369. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6>
- KASHYAP, S., N. SHIVAKUMAR, V. SEJIAN, N. E. P. DEUTZ, T. PRESTON, S. SREEMAN, S. DEVI, AND A. V. KURPAD. (2021). Goat milk protein digestibility in relation to intestinal function. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 113:845–853. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa400>
- KERWALD, J.; JUNIOR, C. F. M.; FREITAS, E. D.; SEGUNDO, J. D. P. M. (2023). Cellulose-based electrospun nanofibers: a review. **Cellulose**. 29. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04303-w>
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. (2008) Nanobiocatalysis and its potential applications. **Trends in Biotechnology**. 26, 639-646. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.009>
- KONTKANEN, H.; ROKKA, S.; KEMPPINEN, A.; MIETTINEN, H.; HELLSTROM, J.; KRUSS, K.; MARNILA, P.; ALATOSSAVA, T.; KORHONEN, H. (2011). Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. **International Dairy Journal**. 21, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.003>
- KOWALCZYK, D., PYTKA, M., SZYMANOWSKA, U., SKRZYPEK, T., ŁUPINA, K., BIENDL, M. (2020). Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. **Food Hydrocolloids**, 109, 106104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106104>
- KUAI, L.; LIU, F.; CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; McHUGH, T. H.; ZHONG, F. (2021). Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**. 120, 106992. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106992>
- KUMAR, A.; SOOD, A.; AGRAWAL, G.; THAKUR, S.; THAKUR, V. K.; TANAKA, M.; MISHRA, Y. K.; CHRISTIE, G.; MOSTAFAVI, E.; BOUKHERROUB, R.; HUTMACHER, D. W.; HAN, S. S. (2023) Polysaccharides, proteins, and synthetic polymers based multimodal hydrogels for various biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 247, 125606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125606>
- LASKAR, N.; KUMAR, U. (2019). Plastics and microplastics: A threat to environment. **Environmental Technology & Innovation**, 14, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>
- LERBRET, A.; MASON, P. E.; VENABLE, R. M.; CESARO, A.; SABOUNGI, M. L.; PASTOR, R. W.; BRADY, J. W. (2009) Molecular dynamics studies of the conformation of sorbitol. **Carbohydrate Research**. 344, 2229-2235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.003>

- LI, A., ZHENG, J., HAN, X., YANG, S., CHENG, S., ZHAO, J., & LU, Y. (2023). Advances in low-lactose/lactose-free dairy products and their production. **Foods**. 12, 2553. <https://doi.org/10.3390/foods12132553>
- LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. (2018). Advances on methods and easy separated support material for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**. 102, 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
- LOMER, M. C. E., PARKES, G. C., & SANDERSON, J. D. (2008). Review article: Lactose intolerance in clinical practice myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 27, 93–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x>
- LÓPEZ-ÂNGULO, D.; BITTANTE, A. M. Q. B.; LUCIANO, C. G.; AYALA-VALENCIA, G.; FLAKER, C. H. C.; DJABOUROV, M.; SOBRAL, P. J. A.(2020). Effect of Laponite ® on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. **Food Bioscience**. 35, 100596. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100596>
- LU, L.; GUO, L.; WANG, K.; XIAO, M. (2020). β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. **Biotechnology Advances**. 39, 107465. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465>
- LU, Z.; ZHANG, H.; TOIVAKKA, M.; XU, C. (2024) Current progress in functionalization of cellulose nanofibers (CNFs) for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. 267, 131490. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131490>
- LUPINA, K.; KOWALCZYK, D.; LIS, M.; RASZKOWSKA-KACZOR, A.; DROZLOWSKA, E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**. 123, 107179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107179>
- LV, Y.; LI, P.; CEN, L.; WEN, F.; SU, R.; CAI, J.; CHEN, J.; SU, W. (2024). Gelatin/carboxymethylcellulose composite film combined with photodynamic antibacterial: new prospect for fruit preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 257, 128643, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128643>.
- MA, C.; TAN, C.; XIE, J.; YUAN, F.; TAO, H.; GUO, L.; CUI, B.; YUAN, C.; GAO, W.; ZOU, F.; WU, Z.; LIU, P.; LU, L. (2023). Effects of different ratios of manitol to sorbitol on the functional properties of sweet potato starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**. 242, 124914. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124914>
- MAGHRABT, Y. R.; EL-SHABASY, R. M.; IBRAHIM, A. H.; AZZAZY, H. M. E. (2023) Enzyme immobilization technologies and industrial applications. **ACS Omega**. 8, 5184 – 5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- MAJID, I.; NAYIK, G. A.; DAR, S. M.; NANDA, V. (2018). Innovations and future prospective. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. 17, 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.003>

- MAYOR, S. (2018). Higher dairy intake is linked to lower risk of cardiovascular disease and death, finds study. **BMJ**.362, k3862. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3862>
- MENSINK, R. P.; SANDERS, T. A.; BAER D. J.; HAYES, K.; HOWLES, P.; MARANGONI, A. (2016) The increasing use of interesterified lipids in the food supply and their effects on health parameters. *Advances in Nutrition* 7, 719–29. <https://doi.org/10.3945/an.115.009662>
- MIETTINEN, H.; NYSSÖLA, A.; ROKKA, S.; KONTKANEN, H. KRUUS, K. (2013). Screening of microbes for lipases specific for saturated medium and long-chain fatty of milk fat. **International Dairy Journal**. 32, 61-67 <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.05.007>
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31, 426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- MIN, T.; ZHOU, L.; SUN, H.; BIAN, X.; ZHU, Z.; WEN, Y.(2022) Enzyme-responsive food packaging system based on pectin-coated poly (lactic acid) nanofiber films for controlled release of thymol. **Food Research International**. 157, 111256. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111256>
- MOHAMMADI, N. S.; KHIABANI, M. S.; GHANBARZADEH, B.; MOKARRAM, R. R. (2020). Improvement of lipase biochemical properties via a two-step immobilization method: Adsorption onto silicon dioxide nanoparticles and entrapment in a polyvinyl alcohol/alginate hydrogel. **Journal of Biotechnology**. 323, 189-202. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.002>
- MOHIDEM, N. A.; MOHAMAD, M.; RASHID, M . U.; NORIZAN, M. N.; HAMZAH, F.; MAT, H. (2023). Recent advances in enzyme immobilisation strategies: Na overview of techniques and composite carriers. **Journal of Composites Science**. 7, 488. <https://doi.org/10.3390/jcs7120488>
- MOSLEH, Y. ; VAN DIE, M.; GARD, W.; BREEBAART, I.; VAN DE KUILEN, J. W.; VAN DUIN, P.; POULIS, J. A. Hygrothermal aging of dry gelatin adhesive films: Microstructure-property relationships. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. 131 (2024) 103654. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2024.103654>
- MOZURAITYTE, R.; RODRIGUEZ-TURIENZO, L.; REQUENA, R.; SLIZYTE, R. (2024) Valorisation of salmon backbones: Extraction of gelatine and its applicability in biodegradable films. **Heliyon**. E34373. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34373>
- MUTHURAJ, R.; VALERIO, O.; T.H. MEKONNEN. (2021) Recent developments in short-and medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates: production, properties, and applications, **International Journal Biological Macromolecules**. 187, 422–440. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.143>
- NAZMIR, N. N.; ISA, M.I.N. & SARBON, N. M. (2017). Preparation and characterization of chicken skin gelatin/CMC composite film as compared to bovine gelatin film. **Food Bioscience**, vol. 19, p. 149-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.002>

- NEVES, A. M.; VISOLI, L. J.; ENZWEILER, H.; PAULINO, A. T. (2024). Lipase from *Candida rugosa* incorporated in pectin hydrogel via immobilization for hydrolysis of lipids in dairy effluents and production of fatty acids. **Journal of Water Process Engineering**. 58, 104821. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.104821>
- NGUYEN, Q.D.; TRAN, T. T. V.; NGUYEN, N. N.; NHUYEN, T.P.; LIEN, T.N. (2023). Preparation of gelatin/carboxymethyl cellulose/guar gum edibles films enriched with methanolic extracts from shaççot wastes and its application in the microbiological control of raw beef. **Food Packaging and Shelf Life**. 37, 101091. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101091>
- NOBREGA, E.; SANTOS, T.; SOUSA, C. A.; NETO, D. C. S.; GRISI, C. V. B.; FERREIRA, V. C. S.; SILVA, F. A. P. (2022) Edible active film based on gelatin and *Malpighia emarginata* waste extract to inhibit lipid and protein oxidation in beef patties, **LWT** 154. 112837. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112837>
- OCHOA-YEPES; DI GIOGIO, O. L.; GOYANES, S.; MAURI, A.; FAM' A, L. (2019) Influence of process (extrusion/thermo-compression, casting) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films. **Carbohydrate and Polymers**. 208, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.030>
- OMRANI, M.; NAIMI-JAMAL, M. R.; FAR, B. F. (2022) The design of multi-responsive nanohydrogel networks of chitosan for controlled drug delivery, **Carbohydrate Polymers**. 298, 120143. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120143>
- ONYEAKA, P.O.; DAI, H.; FENG, X.; WANG, H.; FU, Y.; YU, Y.; ZHU, H.; CHEN, H.; MA, L.; ZHANG, Y. Effect of diferente types of nanocellulose on the structure and properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. vol.144, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108972>
- OTONI, C. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; AZEREDO, H. M. C.; LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; McHUGH, T. H. (2017) Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables - A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 16, 1151 – 1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>
- OUN, A. A.; SHIN, G. H.; RHIM, J.; KIM, J. T. (2022) Recent advances in polyvinyl alcohol-based composite films and their applications in food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**. 34, 100991. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100991>
- HERMANS, P. H.; WEIDINGER, J. A. (1948) Quantitative X-Ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background Analysis. **Journal of Applied Physics**. 19: 491-506. <https://doi.org/10.1063/1.1698162>
- PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. (2018) Performance of packed bed reactor on the enzymatic interesterification of milk fat with soybean oil to yield structure lipids. **International Dairy Journal**. 86, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.014>
- PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCCI, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential

- antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**. 25, 1372-1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>
- PERERA, K. Y.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. (2023). Biopolymer-based sustainable food packaging materials: Challenges, solutions and applications. **Foods**. 12, 2422. <https://doi.org/10.3390/foods12122422>
- PINTO, P. A.; ANCONI, A. C. S. A.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, E. J.; NUNES, C. A (2021). Strategies to determine lactose in cow milk by mid infrared spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 104. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104176>
- PONNUSAMY, V.; SANKARANARAYANAN, M. (2023). Targeted gene manipulation of Leloir pathway genes for the constitutive expression of β -galactosidase and its transgalactosylation product galacto-oligosaccharides from *Kluyveromyces lactis* GG799 and knockout strains. **Enzyme and Microbial Technology**. 169, 110263. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110263>
- POURFARZAD, A.; AHMADIAN, Z.; HABIBI-NAJAFI, M. B. (2018). Interactions between polyols and wheat biopolymers in a bread model system fortified with inulin: A Fourier transform infrared study. **Heliyon**. 4, e01017. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01017>
- POURMADADI, M.; RAHMANI, E.; SHAMSABADIPOUR, A.; SAMADI, A.; ESMAELI, J.; ARSHAD, R.; RAHDAR, A.; TAVANGARIAN, F. & PANDEY, S. (2023). Novel carboxymethyl cellulose based nanocomposite: A promising biomaterial for biomedical applications. **Process Biochemistry**, vol. 130, p. 211-226. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.03.033>
- PRIYANKA, S.; NAMASIVAYAM, K. R.; BHARANI, A.; JOHN, A. (2023) Biocompatible green technology principles for the fabrication of food packaging material with noteworthy mechanical and antimicrobial properties – A sustainable developmental goal towards the effective, safe food preservation strategy. **Chemosphere**. 336, 139240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139240>
- QUEIROZ, L. H. S.; RIBEIRO, P. R. S.; PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K. G. (2023). Plasticizing effect of babassu oil (*Attalea speciosa*) on starch-based biodegradable film. *Scientia Plena*. 19, 121502. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2023.121502>
- RABEK, J. F. (1980) Experimental methods on polymer chemistry. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**. 19, 861. <https://doi.org/10.1002/pol.1981.130190109>
- RAFIEE, F.; REZAEE, M. (2021). Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. 179, 170-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198>
- REMONATTO, D.; MIOTTI FR, R. H.; MONTI, R.BASSAN, J. C. PAULA, A. V. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**. 114, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>
- REYS-JURADO, F.; SOTO-REYES, N.; DÁVILA-RODRIGUEZ, M.; LORENZO-LEAL, A. C.; JIMENEZ-MUNGUÍA, M. T.; MANI-LOPEZ, E.; LOPEZ-MALO, A.

- (2021). Plant-based milk alternatives: Types, processes, benefits, and characteristics. **Food Reviews International**. 39, 2320-2351. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421>
- RIAHI, Z.; KHAN, A.; SHIN, G. H.; RHIM, J-W.; KIM, J.T. (2024) Sustainable chitosan/polyvinyl alcohol composite film integrated with sulfur-modified montmorillonite for active food packaging applications. **Progress in Organic Coatings**. 192, 108474. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2024.108474>
- RIBEIRO, D. C. S. Z.; NETO, H. A.; LIMA, J. S.; ASSIS, D. C. S.; KELLER, K. M.; CAMPOS, S. V. A.; OLIVEIRA, D. A.; FONSECA, L. M. (2023). Determination of the lactose content in low-lactose milk using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and convolutional neural network. **Heliyon**. 9, e12898. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12898>
- RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C. S. BERENGUER-MURCIA, A. B.; ALCANTARA, A. R. BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ LAFUENTE, R. (2019). Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**. 37, 746-770. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>
- ROY, A.; MANNA, K.; PAL, S. (2022) Recent advances in various stimuli-responsive hydrogels: from synthetic designs to emerging healthcare applications, *Materials Chemistry Frontiers*. 6, 2338–2385. <https://doi.org/10.1039/d2qm00469k>
- SADI, A.; FERFERA-HARRAR, H. (2023). Cross-linked CMC/Gelatin bio-nanocomposite films with organoclay, red cabbage anthocyanins and *pistacia* leaves extract as active intelligent food packaging: colorimetric pH indication, antimicrobial/antioxidante properties, and shrimp spoilage tests, **International Journal of Biological Macromolecules**. 242, 124964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124964>
- SAMSI, M. S.; KAMARI, A.; DIN, S. M. ; LAZAR, G. (2019). Synthesis, characterization and application of gelatina- carboxymethyl cellulose blend films for preservation of cherry tomatoes and grapes. **Journal Food Science and Technology**. 56 (6), 3099-3108. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03809-3>
- SANTOS, C. S.; KANUP, R. F.; ALBURQUEQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; SOUZA, C. H. B.; GIOIELLI, L. A.; SAAD, S. M. I.; RACT, J. N. R. (2020) Effect of enzymatic interesterification on the textural and nutritional properties of a probiotic table spread containing milk fat. **LWT – Food Science and Technology**. 124, 109129. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109129>
- SANTOS, P. H. D. S.; LANNES, S. C. D. S. (2022). Application of organogel-like structured system as an alternative for reducing saturated fatty acid and replacing fat in milk ice cream. **Journal of Food Processing and Preservation**. 46. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16932>
- SCHMITT, C. et al. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 38, n. 8, p. 689–753, nov. 1998. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>

- SEGAL, L., CREELY, J.J., MARTIN JR., A.E. AND CONRAD, C.M. (1959) An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, 29, 786-794. <http://dx.doi.org/10.1177/004051755902901003>
- SEM, C.; ARORA, S.; SINGH, R.; SHARMA, V.; MEENA, G. S. SINGH, A. K. (2024). Reduction of maillard Browning in spray dried low-lactose milk powders due to protein polysaccharide interactions . **Food Research International**. 183,114175. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114175>
- SHAFI, A.; AHMED, F.; HUSAIN, Q. (2021). β -Galactosidase mediated synthesized nano support for the immobilization of same enzyme: Its stability and application in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**.184, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.034>
- SHAHBAZI, Y.; SHAVISI, N.; KARAMI, N.; LORESTANI, R.; DABIRIAN, F.(2021). Electrospun carboxymethyl cellulose- gelatin nanofibrous films encapsulated with *Mentha logifolia* L. essential oil for active packaging of peeled giant freshwater prawn. **LWT - Food Science and Technology**. 152, 112322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112322>
- SHAKUN, M.; HEINZE, T.; RADKE, W. (2013). Determination of the DS distribution of non-degraded sodium carboxymethyl cellulose by gradient chromatography. **Carbohydrate Polymers**. 98, 943-950. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.066>
- SHARMA, S. K.; MICIC, M.; LI, S.; HOAR, B.; PAUDYAL, S.; ZAHARAN, E. M.; LEBLANC, R. M. (2019). Conjugation of carbono dots with β -galactosidase enzyme: surface chemistry and use in biosensing. **Molecules**. 24, 3275. <https://doi.org/10.3390/molecules24183275>
- SHARMA, S.; GUPTA, S.; PRINCY,.; ARYA, S. K.; KAUR, A. (2022). Enzyme immobilization: Implementation of nanoparticles and na insight into polystyrene as the contemporary immobilization matrix. **Process Biochemistry**. 120, 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.022>
- SID, S.; MOR, R. S.; KISHORE, A.; SHARANAGAT, V. S. (2021). Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. **Trends in Food Science & Technology**. 115, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.026>
- SILVA, A. R. A.; SILVA, M. M. N.; RIBEIRO, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. **Food Research International**. 131,108972. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- SIVAKANTHAN, S.; MADHUIJITH, T. (2020) Current trends in applications of enzymatic interesterification of fats and oil: A review. **LWT**. 132, 109880. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109880>
- SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; SOUZA, C. S. F.; VRIESMANN, L. C.; VICENTE, J.; DE CARVALHO, M. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. (2019). Immobilization of β -galactosidase by complexation: Effect of interaction on the properties of enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**. 122, 594-602. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.007>

SOUZA, C. J. F.; GRACIA-ROJAS, E. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. (2018). Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**. 83, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.044>

Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2012 (D882-12).

Standard test methods for water vapor transmission of material. In annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2000 (E96-00)

SUMAN; AWASTHI, D.; BAJAJ, B. (2024). Influence of rice straw based nanocellulose loading in sodium carboxymethyl cellulose. **Materials Today: Proceedings**. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2024.05.084>

SUMNER, J. B.; GRAHAM, V. (1921) Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 47, p. 5-9. <https://doi.org/10.1016/S0021-9258%2818%2986093-8>

SUN, F.; SHAN, P.; LIU, B.; LI, Y.; WANG, K.; ZHUANG, Y.; NING, D.; LI, H. (2024). Gelatin-based multifunctional composite films integrated with dialdehyde carboxymethyl cellulose and coffee leaf extract for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. 263, 130302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130302>

TAMPICHAI, S.; BOONMAHITTHISUD, A.; SOYKEABKAEW, N.; LAKSIKA, O. (2022). Review of the recent developments in all-cellulose nanocomposite: Properties and applications. **Carbohydrate Polymers**. 286, 119192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119192>

TARIQUE, J.; S.M. SAPUAN, A. KHALINA, S.F.K. SHERWANI, J. YUSUF, R.A. ILYAS. (2021) Recent developments in sustainable arrowroot (*Maranta arundinacea* Linn) starch biopolymers, fibres, biopolymer composites, and their potential industrial applications: a review, **Journal of Materials Research and Technology**. 13, 1191–1219. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.047>

TARIQUE, J.; SAPUAN, S. M.; KHALINA, A. (2021). Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers. **Scientific Reports**. 11, 13900. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93094-y>

TAVARES, K. M. ; CAMPOS, A. ; LUCHESI, B. R. ; RESENDE, A. A. ; OLIVEIRA, J. E.; Marconcini, J. M. (2020). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on mechanical and water vapor barrier properties of corn starch films. **Carbohydrate and Polymers**. 246, 116521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116521>

THATIKONDA, S.; BATTULA, S. D.; SYED, V.; RASINENI, K.; NELAPATI, A.K. (2024). Molecular insights into β -Galactosidase enzyme for its potential application in food industry. **Journal of the Indian Chemical Society**. 101, 101271. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2024.101271>

TRAN, T. T. V. ; NGUYEN, N. ; NGUYEN, Q. ; NGUYEN, T. ; LIEN, T. (2023). Gelatin/edible carboxymethyl cellulose films: modification of physical properties by

different hydrocolloids and application in beef preservation in combination with shallot waste powder. **RSC Advances**. 13, 10005. <https://doi.org/10.1039/d3ra00430a>

VERA, C.; CORDOVA, A.; ABURTO, C.; GUERRERO, C.; SUAREZ, S.; ILLANES, A. (2016) Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 32, 197. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4>

VIANA, R. M.; SÁ, N. M. S. M.; BARROS, M. O.; BORGES, M. F.; AZEREDO, H. M. C. (2018). Nanofibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees. **Carbohydrate Polymers**. 196, 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.017>

WANG, F., H. SHI, S. WANG, Y. WANG, Z. CAO, AND S. LI. (2019). Amino Acid Metabolism in Dairy Cows and their Regulation in Milk Synthesis. **Current Drug Metabolism**. 20, 36–45. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200219666180611084014>

WANG, F. J.; YANG, Y.-Y.; ZHANG, X.- Z.; ZHU, X .; CHUNG, T. - S.; MOOCHHALA, S. (2002). Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base. **Material Science and Engineering C**, 20, 93 – 100. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00018-8)

WANG, J.; YUE, C.; WANG, G. (2023) . Beef quality monitoring using immobilization lipase on modified polypropylene non-woven fabric based on time-temperature indicator. **Journal of Food Engineering**. 357, 111586. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111586>

WILLIAMS, A. T.; RANGEL-BUITRAGO, N. (2022). The past, present, and future of plastic pollution. **Marine Pollution Bulletin**, 176, 113429. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113429>

WILMS, J. N.; HARE, K. S.; FISCHER-TLUSTOS, A. J.; VAHMANI, P.; DUGAN, M. E. R.; LEAL, L. N.; STEELE, M. A. (2022) Fatty acid profile characterization in colostrum, transition milk, and mature milk of primi- and multiparous cows during the first week of lactation. **Journal Dairy Science**. 105, 4692-4710. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-20880a>

WONG, L. S.; THIRLWAY, J.; MICKLEFIELD, J. (2008) Direct site-selective covalent protein immobilization catalyzed by a phosphopantetheinyltransferase. **Journal of the American Chemical Society**. 130, 12456–12464. <https://doi.org/10.1021/ja8030278>

YAASHIKAA, P. R.; KAMALESH, R.; KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; VIJAYASRI, K.; RANGASAMY, G. (2023). Recent advances in edible coatings and their application in food packaging. **Food Research International**. 173, 113366. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113366>

YARADODDI, J. S.; BANAPURMATH, N. R.; GANACHARI, S. V.; SOUDAGAR, M. E. M.; MUBARAK, N. M.; HALLAD, S.; HUGAR, S.; FAYAZ, H. (2020). Biodegradable carboxymethyl cellulose based material for sustainable packaging application. **Scientific Reports**. 15, 21960. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78912-z>

- YILDIRIM-YALCIN, M.; TOURNUK, F.; TOKER, O. S. (2022) Recent advances in the improvement of carboxymethyl cellulose-based edible films. **Trends in Food Science & Technology**. 129, 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.09.022>
- YIN, W.; QIU, C.; JI, H.; SANG, S.; McCLEMENTS, D. J.; JIAO, A.; WANG, J.; JIN, Z. (2023). Recent advances in biomolecule-based films and coatings for active and smart food packaging applications. **Food Bioscience**. 52, 102378. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102378>
- YUAN, S.; YAM, K. (2024) A mechanistic model predict headspace concentration profile of carvacrol for controlled release packaging. **Food Packaging and Shelf Life**. 43, 101292. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.101292>
- YUSWAN, M. H.; JALIL, N. H. A.; MOHAMAD, H.; KESO, S.; MOHAMAD, N. A.; YUSOFF, T. S. T.; ISMAIL, N. F.; MANAF, Y. N. A.; HASHIM, A. M.; DESA, M. N. M.; YUSOF, Y. A.; MUSTAFA, S. (2021) Hydroxyproline determinations for initial of hala-critical food ingredients (gelatin and collagen). **Food Chemistry**. 337, 127762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127762>
- ZAFAR, A.; KHOSA, M. K.; NOOR, A.; QAYYUM, S.; SAIF, M. J. (2022) Carboxymethyl cellulose/ Gelatin hydrogel films loaded with zinc oxide nanoparticles for sustainable food packaging applications. **Polymers**. 14 5201. <https://doi.org/10.3390/polym14235201>
- ZHANG, Q.; YANG, W.; ZHANG, S.; TANG, J.; SHI, X.; QIN, S.; PAN, L.; XIAO, H. (2023). Enhancing the applicability of gelatina-carboxymethyl cellulose films by cold plasma modification for the preservation of fruits. **LWT**. 178, 114612. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114612>
- ZHAO, Y., KHALESİ, H., HE, J., & FANG, Y. (2023). Application of different hydrocolloids as fat replacer in low-fat dairy products: Ice cream, yogurt and cheese. **Food Hydrocolloids**, 138, 108493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108493>
- ZHENG, T.; TANG, P.; YANG, C.; RAN, R.; LI, G. (2023). Development of active packaging films based on collagen/gallic acid-grafted chitosan incorporating with ϵ -polylysine for pork preservation. **Food Hydrocolloids**. 140, 108590. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108590>
- ZHENG, T.; WU, G.; CHEN, L.M.; ZHANG, Y.; LUO, Y.; ZHENG, Y.; HU, F.; FOROUZANFAR, T.; LIN, H.; LIU, B. (2021) , Neuro-regenerative imidazole functionalized GelMA hydrogel loaded with hAMSC and SDF-1 α promote stem cell differentiation and repair focal brain injury. **Bioactive Materials**. 6, 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.026>
- ZHONG, L.; FENG, Y.; WANG, G.; BILAL, M.; LV, H.; JIA, S.; CUI, J. (2020) Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**. 152, 207-222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>