

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE DA B-GALACTOSIDASE

*Anderson Massaro Takihara
Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez
Luiz Rodrigo Ito Morioka
Cláudio Takeo Ueno*

1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto de origem animal de grande importância na alimentação humana (GONZÁLEZ, 2001). Sua introdução na dieta acontece desde o início do desenvolvimento do indivíduo, pois busca substituir o leite de sua progenitora. Além disso, ele fornece uma rica carga de nutrientes, principalmente proteínas de alta qualidade, vitaminas e minerais (GONSALVES, 2002).

Apesar de existir uma grande variedade de animais produtores de leite ao redor do mundo, tais como cabras, ovelhas, camelos, iaques, búfalos, éguas, renas e lhamas (PARK; HAENLEIN, 2006), na maioria dos países, o leite de vaca é o mais utilizado para o consumo humano. Na composição do leite, estão presentes a proteína caseína e o carboidrato lactose (SWAISGOOD, 2010), que podem provocar reações alérgicas logo nos três primeiros anos de vida (HENRIKSEN et al., 2000).

Um grave problema no que tange à digestão do leite, sobretudo para as crianças na primeira infância, é a ausência ou reduzida presença da enzima lactase (OLIVEIRA; ROMAN, 2013), também denominada β -galactosidase, que hidrolisa a lactose em glicose e galactose (RIENZO et al., 2013). A deficiência na

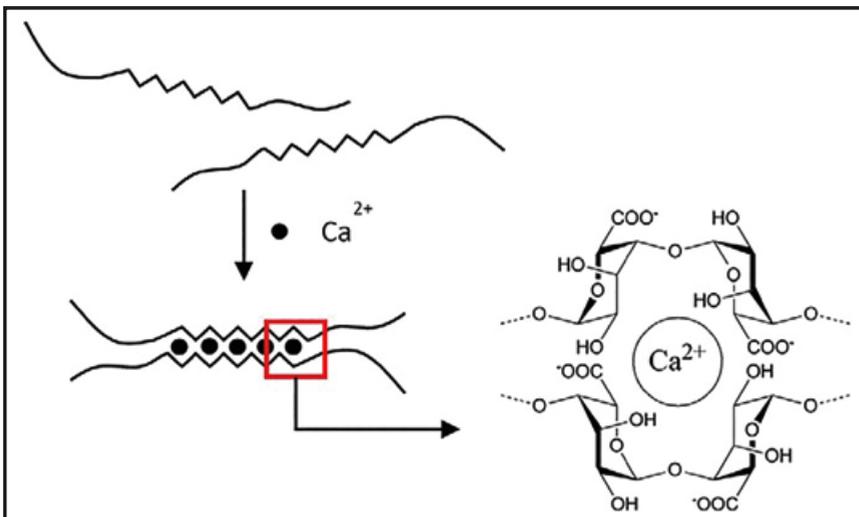
produção de β -galactosidase pode causar diarreia, inchaço e cólicas abdominais. Dada essa situação, as empresas desenvolveram tecnologias para a hidrólise do dissacarídeo em um momento anterior ao consumo, utilizando a lactase microbiana em solução ou imobilizada, de modo a beneficiar aqueles que sofrem dessa deficiência do organismo (SWAISGOOD, 2010).

A aplicação de enzimas nos processos da indústria de alimentos, no entanto, é dispendiosa. Estudos procuram melhorar e potencializar as técnicas de imobilização enzimática a fim de reduzir esse custo e viabilizar o emprego da tecnologia de enzimas (CASTRO et al., 2008).

Os principais modos para imobilizar enzimas são: imobilizar no interior do suporte e encapsular por meio de membrana ou imobilizar no lado externo do suporte, por meio de ligação covalente ou não covalente ou por adsorção. Para obter êxito, seja em qual método for, o seu armazenamento e a sua operação devem ser estáveis. Além disso, é preciso considerar custo do suporte, temperatura favorável à enzima, custo de imobilização, faixa de pH para que a enzima se mantenha estável, manutenção da atividade enzimática e quantidade de ciclos da enzima (CASTRO et al., 2008).

Entre os processos de produção de microcápsulas de alginato (esferas), destaca-se processo de gelificação iônica, cujo princípio é baseado na capacidade gelificante do polissacarídeo alginato de sódio ao entrar em contato com cálcio solúvel, complexando-se (Figura 1) (YANG; XIE; HE, 2011).

Figura 1 – Gelificação iônica



O alginato de sódio é um polissacarídeo aniônico composto por ácido α -L-gulurônico e o ácido β -D-manurônico, unidos por ligações glicosídicas 1-4 (YANG; XIE; HE, 2011). O processo de gelificação iônica mais conhecido é o externo, cujo procedimento baseia-se no gotejamento ou atomização de uma solução de alginato de sódio sobre uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) (RIBEIRO et al., 2005).

Além dessa característica gelificante, o alginato é praticamente atóxico e possibilita a incorporação de diversos compostos, permitindo aplicações em diversas áreas da indústria, desde alimentos, fármacos, entre outros, porém, é importante analisar a influência dos componentes sobre o composto incorporado à partícula (PAQUES et al., 2014).

O objetivo desta pesquisa foi determinar os melhores parâmetros de encapsulação da enzima β -galactosidase de origem microbiana *Kluyveromyces lactis* visando hidrolisar a lactose.

2 REDUÇÃO DO TEOR DE LACTOSE POR ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A lactose é uma grande molécula de açúcar presente no leite de mamíferos (RIENZO et al., 2013). É também um dissacarídeo composto por glicose, que tem papel fundamental na constituição de outras macromoléculas, e galactose (RIENZO et al., 2013; REMIÃO; SIQUEIRA; AZEVEDO, 2003).

Para que a lactose seja absorvida no intestino delgado e aproveitada pelo organismo humano é necessário que ocorra sua hidrólise nesses compostos monossacarídeos, pois somente assim é possível sua absorção. Essa quebra se dá por meio de ação de uma enzima, denominada lactase (β -galactosidase), presente em células de microvilosidades do epitélio do intestino delgado (BeMILLER; HUBER, 2010).

Segundo Parker e Pace (2016), a má digestão da lactose decorrente de uma deficiência dessa enzima, que pode ser encontrada em baixa quantidade ou mesmo estar ausente no organismo, leva a um estado sintomático de diarreias, inchaço e formação de gases após ingerir leite ou derivados. Tal condição é chamada de intolerância à lactose.

De acordo com BeMiller e Huber (2010), a lactose permanecerá no lúmen do intestino delgado, atraindo fluidos por meio de osmose, que provocarão distensão abdominal e cólicas. Posteriormente, irá para o intestino grosso, onde será fermentada por bactérias, gerando ácido láctico e outros ácidos de cadeia curta. O acúmulo dessas substâncias, por conseguinte, aumentará a retenção

de líquidos. Além do mais, como resultado da fermentação, o pH irá reduzir e irritar a superfície do colo, gerando aumento de movimentação do material intestinal. Os gases provenientes da fermentação promovem inchaço e cólicas. Como tentativa de suprir a deficiência de lactase, são descritas três alternativas. A primeira é a fermentação do produto, reduzindo a concentração de lactose. Outra é a ingestão da enzima pelo indivíduo antes do consumo de produtos lácteos. E por fim, produzir leite com reduzido teor de lactose por meio de adição da lactase.

2.1 MÉTODOS PARA DESLACTOSAR LEITE

Os dois métodos utilizados para hidrolisar a lactose mais conhecidos são: o método ácido e o método enzimático (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985 apud LADERO; SANTOS; GARCIA-OCHOA, 2000). Apesar de ser muito mais rápido quando são utilizados ácidos como catalisadores do processo, o método ácido utiliza temperatura muito superior ao do método enzimático (150 °C e 30-40 °C, respectivamente), alterando a cor e odor dos catalisadores e, portanto, impedindo-os de serem aplicados diretamente nos alimentos. Por outro lado, o tratamento com enzima pode ser aplicado em leite ou soro sem necessitar de um tratamento prévio e se diferencia por conservar as propriedades dos alimentos, podendo aumentar sua capacidade adoçante. Considerando esses fatores, o método enzimático pode ser o mais adequado para a indústria alimentícia (LADERO; SANTOS; GARCIA-OCHOA, 2000).

Esse método é considerado complexo, que envolve várias reações em cadeia, gerando sacarídeos como produtos intermediários. Durante esse processo, outros carboidratos são formados, conforme a origem da enzima utilizada (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987).

2.2 β -GALACTOSIDASE: ORIGEM E CARACTERÍSTICAS

Segundo Shukla e Wierzbicki (1975), a β -galactosidase pode ser extraída de plantas (ex.: pêssego, damasco e amêndoa), órgãos de animais (ex.: intestino, cérebro e pele), bactérias (ex.: *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis* e *Lactobacillus bulgaricus*), fungos (ex.: *Aspergillus niger*, *Aspergillus orizae* e *Mucor pucillus*) e leveduras (ex.: *Saccharomyces lactis* ou *Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis* e *Saccharomyces fragilis* ou *Kluyveromyces fragilis*).

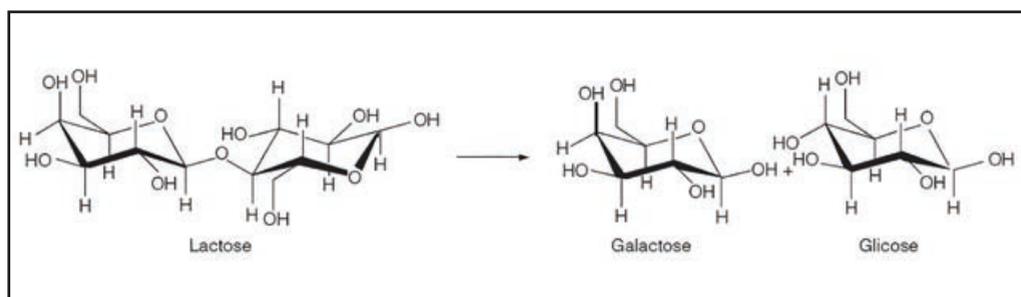
As enzimas obtidas a partir de fonte microbiana apresentam várias vantagens em relação às demais fontes, como rendimentos elevados, facilidade de manuseio e alta taxa de multiplicação (PANESAR; KUMARI; PANESAR,

2010). As principais enzimas utilizadas para hidrolisar a lactose são aquelas provenientes das leveduras como a *Kluyveromyces fragilis* ou a *Kluyveromyces lactis* (ZADOW, 1984).

Segundo Itoh, Suzuki e Adachi (1982), as β -galactosidases de leveduras têm condições ideais de pH entre 6,0 e 7,5 e de temperatura entre 30 a 40 °C. Considerando que a atividade enzimática ótima ocorre em pH próximo ao neutro, as aplicações para a hidrólise da lactose no leite e em produtos derivados são mais facilmente empregadas, obtendo ampla aceitação no uso em alimentos (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Atribui-se à enzima β -galactosidase a propriedade de catalisar a reação de hidrólise da lactose em glicose e galactose (RIENZO et al., 2013). A rota enzimática de hidrólise é representada na Figura 2.

Figura 2 – Rota enzimática de conversão da lactose por β -galactosidase



Fonte: Martins, Burkert (2009).

2.2.1 KLUYVEROMYCES LACTIS

A β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces lactis* é uma das enzimas mais amplamente utilizadas e possui uma massa molecular de 118 kDa (ZHOU; CHEN, 2001), por isso, é considerada uma proteína de elevada massa molecular. Devido à sua função hidrolítica, essa enzima tem sido aplicada na produção de alimentos deslactosados (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008).

Contudo, uma das desvantagens da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* é a forte inibição causada por uma elevada concentração de cálcio no leite (TOSTES, 2006). Além de apresentar inibição competitiva pelos produtos formados, como a galactose, que pode causar uma progressiva inibição da enzima e, conseqüentemente, uma autolimitação da sua eficiência catalítica (HU et al., 2010) e a glicose, que apesar de também possuir ação inibitória, não é

competitiva, ou seja, provoca uma inibição muito inferior em comparação com a galactose (CAVILLE; COMBES, 1995).

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A partir do avanço da indústria no desenvolvimento de lactases comerciais, criou-se a necessidade de se desenvolver outras técnicas de hidrólise enzimática. O método tradicionalmente utilizado pela indústria, que ocorre por meio da adição da β -galactosidase diretamente no leite fluido, é limitado, pois não há a possibilidade de reutilização da enzima, uma vez que ela é adicionada no início da hidrólise e perdida quando o hidrolisado sofre pasteurização (FODA; LOPEZ-LEIVA, 2000).

Com isso, a imobilização da enzima ganha espaço, visto que possui a vantagem de poder ser utilizada em vários tipos de reatores, como colunas de enchimento, tanques agitados e reatores de leite fluidizado, além da disponibilidade para reuso, dependendo das condições de lavagem (TURECEK; PITTNER; BIRKNER, 1990).

A imobilização tem semelhança com o processo de insolubilização, pois impede que o catalisador passe por livre difusão para o meio externo, tornando possível, desse modo, a separação e recuperação do imobilizado por meio de decantação (PEREDA et al., 2005). Além disso, visa proteger as enzimas de condições ambientais adversas, tais como pH, solventes, sais, inibidores, temperatura, entre outros presentes no meio (PARK; HOFFMAN, 1990).

2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma técnica relativamente nova de imobilização de partículas sólidas, dispersão e gotas de líquido. Teve início na década de 30 e é utilizada até hoje, momento em que se encontra em evidência devido às suas várias opções de uso, como por exemplo, diminuição da volatilidade e reatividade dos ingredientes. Já é considerada por pesquisadores como uma fonte de ingredientes inovadores com propriedades únicas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Existem vários métodos pelos quais se pode fazer uso da microencapsulação; a escolha mais adequada se baseia na finalidade da microcápsula, no diâmetro desejado, no modo como será liberado o material microencapsulado e nas propriedades físico-químicas dos dois principais envolvidos, o agente encapsulante e o material encapsulado (JACKSON; LEE, 1991).

Segundo Freitas (2007), para as enzimas, especificamente, deve-se considerar que:

- são presas em membranas semipermeáveis poliméricas, com grande área de contato por unidade de volume;
- são limitadas para os substratos que possuem peso molecular reduzido, uma vez que estes devem transpor a membrana para alcançar as enzimas;
- há o risco de o catalisador ser inativado enquanto ocorre a imobilização;
- é possível que a enzima se incorpore na parede da membrana.

A escolha do agente encapsulante a ser utilizado depende das características físico-químicas do material encapsulado, da técnica de microencapsulação e do meio de inserção das cápsulas. É necessário que haja a formação de uma camada coesa entre o material de parede e o material de recheio; também devem ser compatíveis, ainda que, imiscíveis. Além disso, o material de parede deve apresentar estabilidade, impermeabilidade, flexibilidade e resistência, conferindo o revestimento desejado ao material de recheio (ANAL; SINGH, 2007).

Dentre os materiais utilizados como agentes encapsulantes, o alginato vêm sendo aplicado devido aos seus efeitos benéficos para o consumo humano e à sua versatilidade na indústria (HELGERUD et al., 2010). O alginato, um polissacarídeo aniônico linear, é constituído por α - 1,4 - L - ácido gulurônico (bloco - G) e β - 1,4 - D - ácido manurônico (bloco - M), que têm sua origem nas algas marrons como a *Laminaria hyperborea* e a *Laminaria digitata* (YOO et al., 2006). Sua ação gelificante surge da ligação cooperativa de cátions divalentes que ocorre entre os blocos - G (VOS et al., 2009; FUNDUEANU et al., 1999).

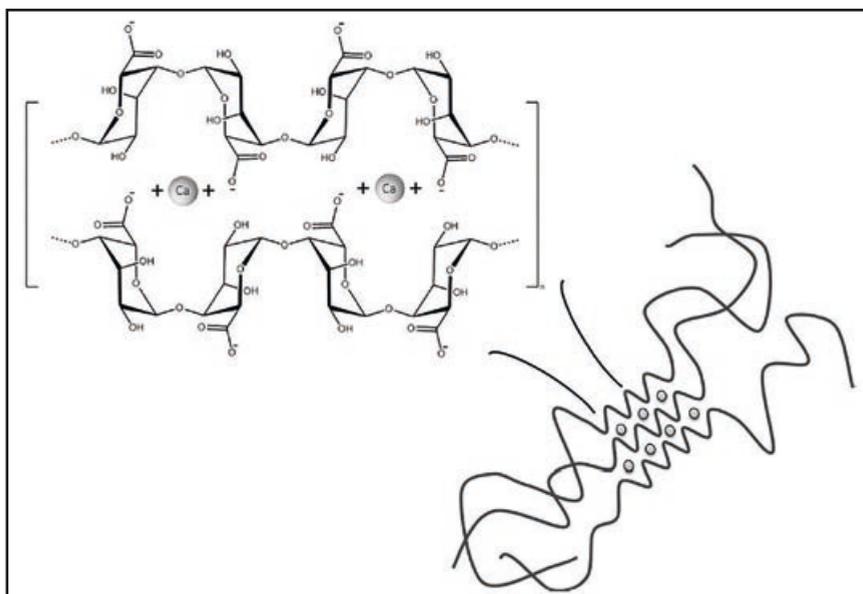
Os benefícios do alginato associados a novas tecnologias permitiram que o material tivesse êxito. Desse modo, a microcápsula de alginato é capaz de proteger os materiais ativos encapsulados de condições adversas do ambiente como por exemplo, o calor e a umidade, garantindo maior estabilidade e biodisponibilidade aos compostos (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

As principais técnicas utilizadas para a microencapsulação são: gelificação iônica, coacervação simples e complexa, *spray frying*, *spray cooling*, liofilização, leito fluidizado, co-cristalização e a produção de lipossomas. O método a ser escolhido depende de alguns fatores, como o mecanismo de liberação desejado, o tipo de material de recheio e a sua aplicação. Os métodos se diferenciam quanto a sua natureza física, físico-química ou química (JACKSON; LEE, 1991; JONES; McCLEMENTS, 2010).

2.4.1 GELIFICAÇÃO IÔNICA

Dentre as diversas técnicas de microencapsulamento, o método de gelificação iônica se destaca por ser de baixo custo e simples (MUKAI-CORREA et al., 2005). Esse método pode ser de dois tipos: a gelificação iônica interna e a externa. No primeiro, são produzidas partículas por meio de uma solução polimérica, que contém o material de recheio, adicionada de sais de cálcio insolúveis. Essa solução sofre emulsão em fase oleosa, que contém um agente surfactante. Então, é adicionado um meio ácido a fim de reduzir o pH para que haja a liberação dos íons cálcio, possibilitando a complexação dos grupos carboxílicos com o cálcio (CHAN; LEE; HENG, 2006; REIS et al., 2006; SILVA et al., 2006; SCHOUBBEN et al., 2010). Já no segundo tipo de gelificação iônica, a externa, ocorre a incorporação do material de recheio a uma solução de alginato de sódio, que será gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) por meio de uma seringa ou pipeta de calibre reduzido (SMRDEL et al., 2008). A gelificação iônica externa apresenta determinadas vantagens em relação à interna: é simples, branda e dispensa o uso de solventes orgânicos. Essas características tornam a técnica promissora e crescente, atraindo as indústrias, principalmente as de fármacos e alimentos (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; PATIL et al., 2010).

A gelificação iônica torna possível a formação instantânea de microcápsulas que englobam no interior de uma rede tridimensional células, fármacos, entre outros (VOS et al., 2009; DRAGET et al., 1998). Os íons de cálcio se encontram no interior de cavidades eletronegativas, de forma semelhante a ovos dentro de uma caixa de ovos, e por este motivo, existe o termo “caixa de ovo” (Figura 3). Quando os íons de cálcio e o guluronato se interagem ionicamemente, é conduzida a elaboração de um gel termoestável forte que apresenta propriedades altamente dependentes da forma de preparação e das características do polímero (VOS et al., 2009; FUNDUEANU et al. 1999).

Figura 3 - Modelo da técnica de gelificação iônica “caixa de ovos”

Fonte: Corona-Hernandez et al. (2013).

As micropartículas produzidas por meio da gelificação iônica apresentam poros de tamanho inferior aos das produzidas por outras técnicas, pois, possuem elevada concentração de solução polimérica. Assim, têm como característica a superfície uniforme, uma vez que as condições de preparo são brandas (VOS et al., 2009; SILVA et al., 2003; HILDEBRAND; TACK, 2000; FUNDUEANU et al., 1999).

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados em parceria com a Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, durante o período de 20 de maio de 2016 até 31 de maio de 2017, nos laboratórios do programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Foram utilizadas a lactose P.A. (Anidrol[®]), alginato de sódio Amostra Protanal RF 6650 (FMC[®]) doado pela empresa Química do Brasil Ltda, cloreto de cálcio (Anidrol[®]) e kit para teste enzimático-colorimétrico de glicose (Bioliq[®]).

A metodologia utilizada para a imobilização da β -galactosidase foi realizada com base nos procedimentos empregados por Escobar, Souza e Lehn (2014), com modificações relacionadas aos parâmetros de imobilização. A enzima utilizada em todo o experimento foi a β -galactosidase comercial

(MAXILACT[®] LX5000 – 5000 UI), Gist-Brocades, Holanda, doada pela empresa Global Food, São Paulo, Brasil.

3.1 PARÂMETROS DE MICROENCAPSULAÇÃO

Para a avaliação das melhores condições de formulação das microesferas de β -galactosidase foram realizados ensaios delimitados por meio de um delineamento estatístico, do modelo de Box e Behnken (DBB) com três variáveis independentes em três níveis (-1, 0, 1). Conforme demonstrado na tabela 1, foram testadas as seguintes variáveis: tempo de maturação (3, 6 e 9 minutos), concentração de CaCl_2 (0,2; 0,4 e 0,6 %) e concentração de alginato de sódio (1,2; 1,5 e 1,8 %).

Tabela 1 - Otimização das concentrações de alginato, CaCl_2 e tempo de maturação

Experimento	Tempo maturação	CaCl_2 % (p/v)	Alginato % (p/v)
1	-1 (3)	-1 (0,2)	-1 (1,2)
2	-1 (3)	0 (0,4)	1 (1,8)
3	-1 (3)	1 (0,6)	0 (1,5)
4	0 (6)	-1 (0,2)	1 (1,8)
5	0 (6)	0 (0,4)	0 (1,5)
6	0 (6)	1 (0,6)	-1 (1,2)
7	1 (9)	-1 (0,2)	0 (1,5)
8	1 (9)	0 (0,4)	-1 (1,2)
9	1 (9)	1 (0,6)	1 (1,8)

Níveis			
Fatores:	-1	0	1
Tempo (min.)	3	6	9
CaCl_2 (g%)	0,2	0,4	0,6
Alginato (g%)	1,2	1,5	1,8

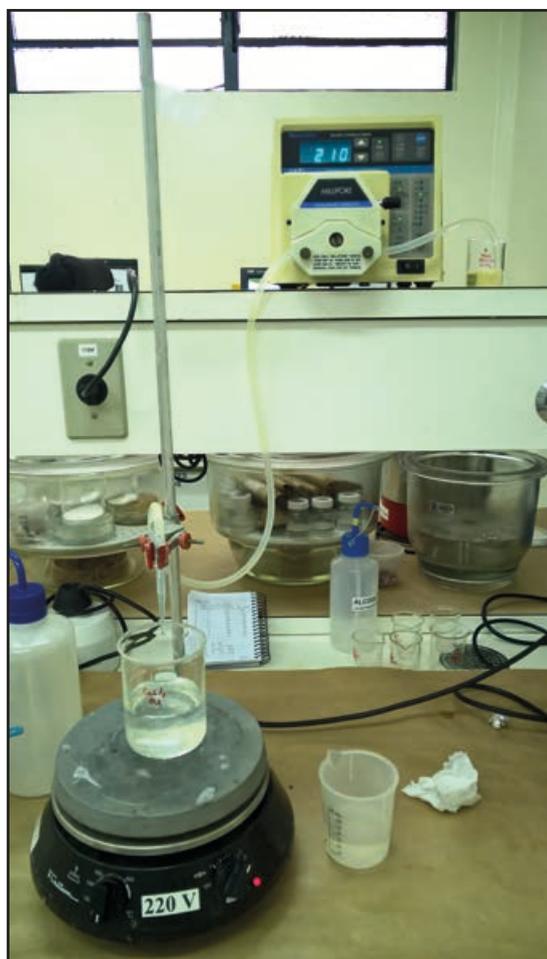
Fonte: Autoria própria (2017).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

Considerando que o procedimento de imobilização se repetiu para todas as corridas, alterando apenas as condições das variáveis, esta etapa iniciou-se com o preparo de 30 ml de uma solução de alginato de sódio a 1,2% (m/v) com solução

tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,8, na qual foi adicionada um volume de 10 ml de enzima, estabelecendo uma proporção de 3:1. Conforme demonstrado na figura 4, para a formação das cápsulas, utilizou-se de uma bomba peristáltica (MILLIPORE®), suporte universal acoplada a garra metálica, mangueira, e ponteira com abertura de 2 mm de diâmetro para o gotejamento da enzima com alginato em uma solução de cloreto de cálcio 0,2% (m/v), a 7 cm de altura, que foi mantida sob agitação, utilizando um agitador magnético (FISATOM®). Logo após três minutos de contato, as esferas constituídas com a β -galactosidase foram separadas por peneira e lavadas com água destilada, sendo, posteriormente, utilizadas para a hidrólise da lactose a fim de verificar a sua atividade enzimática (Figura 5).

Figura 4 – Equipamentos utilizados para gelificação iônica



Fonte: Autoria própria (2017).

Figura 5 – Microcápsulas de β -galactosidase de *K. lactis*



Fonte: Autoria própria (2017).

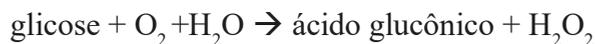
3.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO

Para a hidrólise da lactose, foi preparada uma solução de lactose anidro 1% em água destilada, onde foram adicionadas as esferas a 10% (m/v). A reação de hidrólise foi realizada em pH 6,8, na temperatura de 37 °C, sob agitação de 120 rpm em incubadora com agitação orbital TE-420 (TECNAL[®]). As amostras foram coletadas nos tempos de 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos de hidrólise. Então, as enzimas foram inativadas em banho-maria sob 100 °C por 5 minutos, seguido pela análise de glicose, utilizando o kit glicose-oxidase enzimático colorimétrico (Bioliq[®]), e a leitura da absorbância a 505 nm foi realizada em espectrofotômetro 600 Plus (FEMTO[®]). Os dados foram analisados com o auxílio do programa disponível “Statistica 6.0”.

3.3.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O método de glicose-oxidase enzimático-colorimétrico se baseia na quantificação de glicose produzida decorrente da digestão da lactose. Essa quantificação nas amostras é avaliada pelo kit enzimático-colorimétrico (glicose-oxidase/peroxidase), de acordo com Trinder (1969). A reação envolve a oxidação

da glicose seguida de um composto colorido que surge por meio da ação de peroxidases. O reagente formado tem seu máximo de absorção em espectrofotômetro (600 Plus FEMTO®) na faixa de 505 nm. A glicose tem a sua oxidação catalisada pela glicose-oxidase de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da enzima peroxidase, formando o complexo corado vermelho cuja intensidade da coloração é proporcional à quantidade de glicose encontrada na amostra (ADALBERTO, 2005).

De acordo com o fabricante do kit enzimático-colorimétrico (Bioliqid®), o cálculo utilizado para determinar a glicose (mg/dL) foi conforme a equação 1:

(1)

$$\text{Glicose [mg/dL]} = \frac{\text{Absorbância Teste}}{\text{Absorbância Padrão}} \times 100$$

Para o cálculo do rendimento da hidrólise, foi considerado o peso molecular da solução de lactose 1% (0,0292 mol).

O cálculo da atividade enzimática (Bioliqid®) foi determinado por meio da equação 2:

(2)

$$\text{AE}(\mu\text{molGlicose / min}) = \frac{\text{Glicose (mg / dL)} \times 1000}{\text{PMG} \times \text{TR}}$$

Sendo:

AE= Atividade Enzimática.

PMG= Peso Molecular da Glicose.

TR= Tempo de Reação.

3.4 ANÁLISE DE RETENÇÃO DA β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA

Após determinar as melhores condições para a hidrólise de lactose pela enzima microencapsulada, foram realizados testes de determinação de proteína pelo método de Lowry et al. (1951). O seu princípio se baseia na complexação do cobre quando em contato com meio alcalino, produzindo uma cuproproteína

de coloração azul, que pode ser detectada por meio da faixa de absorção em espectrofotômetro. Em meio alcalino, ocorre uma reação entre os íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas, de forma que a cor púrpura complexada é proporcional à quantidade de proteínas concentradas na amostra (LOWRY et al., 1951). O método de Lowry apresenta como principal vantagem a sua maior sensibilidade em relação a outros métodos, assim como possui melhor exatidão, maior economia de amostra e é menos vulnerável a alguns tipos de interferentes (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Para a análise de liberação de proteínas, foi realizada a adição das microcápsulas (10% m/v) em solução aquosa, utilizando agitador orbital TE-420 (TECNAL®), a 120 RPM, na temperatura de 30 °C, pH 7,0. Alíquotas de 1 ml foram coletadas nos tempos de 0 e 180 minutos. A determinação da liberação das proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry et al. (1951). Em paralelo, fez-se análise de atividade enzimática pela β -galactosidase nas mesmas condições, somente diferenciando pela solução de lactose utilizada.

Para o cálculo da determinação de proteínas, foi calculado inicialmente o fator de calibração parcial conforme a equação 3:

$$(3) \quad \text{FCP1} = \text{Q1/A1}$$

Sendo:

FCP= Fator de Calibração Parcial.

Q = Quantidade de proteína adicionada.

A = Absorbância.

A partir da média dos FCP's obtém-se o fator de calibração médio (FCM). Em seguida, calcula-se a proteína (mg/ml) das amostras, utilizando a equação 4:

$$(4) \quad \text{Abs} \times \text{FCM} \times 100$$

Sendo:

Abs = Absorbância medida da amostra.

FCM = Fator de calibração médio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram analisados com o auxílio do programa disponível “Statistica Versão 6.0”. Os resultados demonstram que o R-quadrado (R-sqr) foi positivo, ao nível de 86,88 %, conforme pode ser analisado na figura 6. Dessa forma, pode-se dizer que os valores observados foram adequados às condições preconizadas.

Figura 6 - Efeitos estimados dos parâmetros de imobilização da β -galactosidase

Effect Estimates; Var.:180; R-sqr=,86884; Adj.:47538 (Experimento - microcápsula 2) 3 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=1143,519 DV: 180											
Factor	Effect	Std.Err.	t(2)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	
Mean/Interc.	115,0150	19,52365	5,891060	0,027626	-31,012	199,0185	115,0150	19,52365	31,0115	199,0185	
(1)Maturação (min)(L)	61,0811	27,61062	2,212232	0,157449	-57,718	179,8800	30,5405	13,80531	-28,8589	89,9400	
Maturação (min)(Q)	63,0631	23,91150	2,637353	0,118707	-39,820	165,9459	31,5315	11,95575	-19,9099	82,9730	
(2)CaCl ₂ (%) (L)	52,9730	55,22123	0,959286	0,438642	-184,625	290,5708	26,4865	27,61062	-92,3124	145,2854	
CaCl ₂ (%) (Q)	45,5856	47,82299	0,953215	0,441083	-160,180	251,3513	22,7928	23,91150	-80,0901	125,6757	
(3)Alginato (%) (L)	-16,0360	27,61062	-0,580792	0,620107	-134,835	102,7629	-8,0180	13,80531	-67,4175	51,3814	
Alginato (%) (Q)	6,8468	23,91150	0,286341	0,801553	-96,036	109,7297	3,4234	11,95575	-48,0180	54,8649	

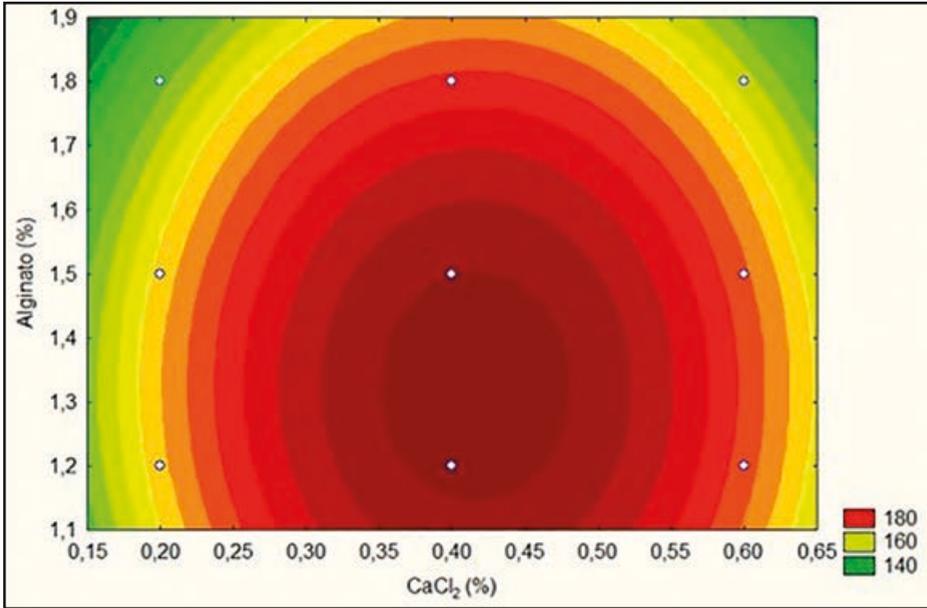
Fonte: Autoria própria (2017).

De acordo com os dados apresentados na figura 6, os efeitos lineares encontrados para maturação e CaCl₂ foram não significativos, positivos, indicando que não influenciaram negativamente para o resultado do experimento. Enquanto o efeito linear para a concentração de alginato também foi não significativo, mas negativo, indicando que quanto menor a concentração de alginato, mais alta seria a atividade enzimática; porém, ao relacionar com a consistência das microcápsulas, verificou-se que, ao diminuir essa concentração, a formação das microcápsulas seria prejudicada.

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ENCAPSULAÇÃO

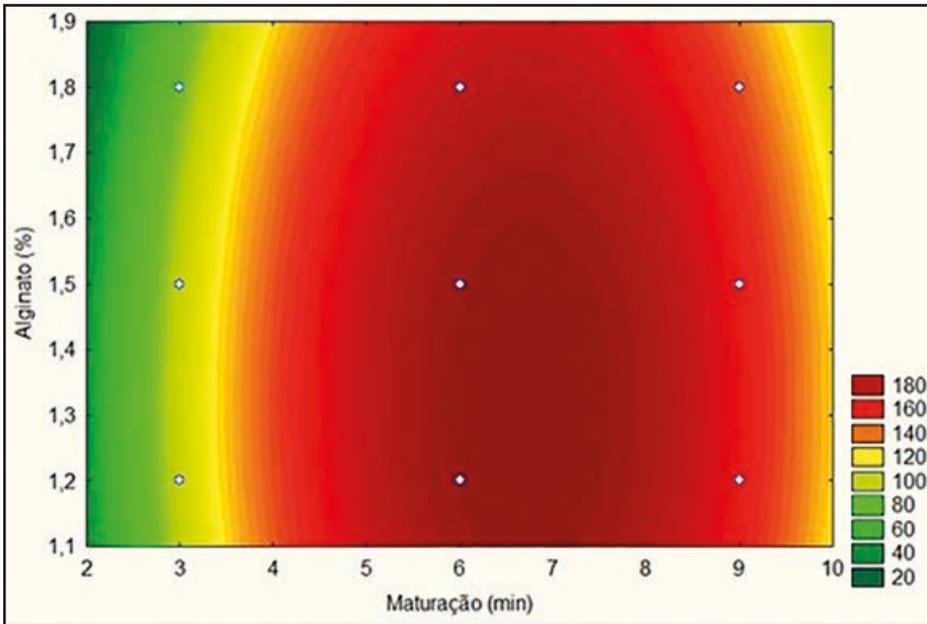
Os resultados obtidos a partir do delineamento Box-Behnken permitiram definir que as melhores concentrações de alginato de sódio, CaCl₂ e tempo de maturação foram: 1,2g% (m/v), 0,4g% (m/v) e 6 minutos de maturação respectivamente, conforme observado nas figuras 7, 8 e 9:

Figura 7 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato de sódio e concentração de CaCl



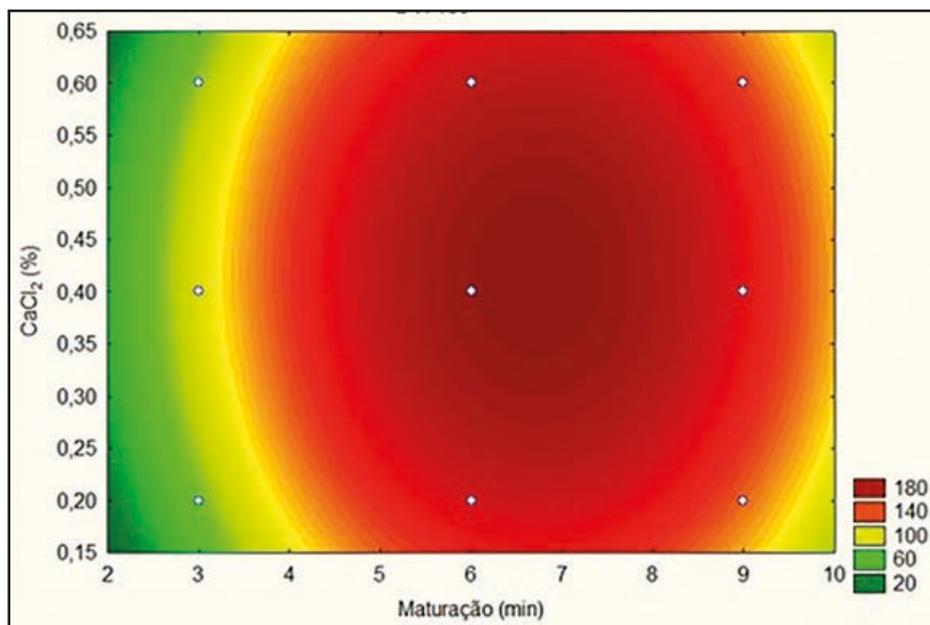
Fonte: Autoria própria (2017).

Figura 8 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato de sódio e tempo de maturação



Fonte: Autoria própria (2017).

Figura 9 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação



Fonte: Autoria própria (2017).

4.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

O cálcio se destaca por ser um dos elementos mais importantes na composição do leite. Por isso, torna-se necessário esclarecer as suas possíveis influências sobre a atividade catalítica das β -galactosidase (HAIDER; HUSAIN, 2007). De acordo com Vos et al. (2009) e Fundueanu et al. (1999), as concentrações de cálcio muito baixas e muito elevadas têm efeito negativo na atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada e isso se relaciona às superfícies de contorno apresentadas nas figuras 7 e 9, em que a atividade enzimática decaía conforme as concentrações utilizadas se distanciavam da região de maior intensidade.

Uma quantidade reduzida de cálcio disponível na técnica de gelificação iônica resultaria em uma fraca interação iônica entre os íons de cálcio e os gulonatos, impossibilitando a formação de um gel termoestável forte, e, portanto, formando microcápsulas inconsistentes (VOS et al., 2009; FUNDUEANU et al., 1999). Por outro lado, elevadas concentrações de cálcio podem causar a perda de atividade enzimática. Haider e Husain (2007) realizaram testes com várias concentrações de cloreto de cálcio com o objetivo de verificar os seus efeitos sobre a atividade da β -galactosidase preparada sob diferentes condições. A amostra da

β -galactosidase na forma imobilizada apresentou uma redução próxima de 40% quando permanecida em contato com uma solução de cloreto de cálcio a 5% durante 1h a 37 °C. Em outro estudo, Brady, Logan e McHale (1998) compararam duas amostras da enzima β -galactosidase submetidas à presença de dois diferentes cátions, Mn^{2+} e Ca^{2+} , durante 4h. Na condição com o Mn^{2+} , a enzima manteve 25% de sua atividade enzimática, enquanto que, na condição com o Ca^{2+} , houve a inativação da enzima β -galactosidase.

4.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO

O tempo de hidrólise da lactose pela enzima microencapsulada nos experimentos, em geral, foi crescente ao longo dos 240 minutos totais: a hidrólise total da lactose ocorreu a partir de 60 minutos de incubação (Tabela 2), ocorrendo hidrólise total para a maioria dos experimentos a partir de 120-180 minutos.

O percentual de hidrólise superior a 100% pode ser devido a reações do kit enzimático com parte do produto, devido à grande semelhança existente com a glicose, sendo necessário analisar a reação desse kit frente a substratos de galactose e lactose puros.

Tabela 2 – Hidrólise da lactose das microcápsulas em função do tempo (%)

Experimento	Tempo (min)						
	0	15	30	60	120	180	240
1	6,14	44,99	55,53	63,76	80,22	49,62	62,28
2	18,16	51,4	53,22	79,45	63,51	82,53	104,13
3	14,89	43,13	67,36	77,9	134,47	92,3	103,1
4	0,93	16,69	52,71	86,39	89,73	160,18	91,79
5	8,14	28,44	45,25	85,62	86,39	162,75	86,64
6	10,15	34,11	51	69,42	128,3	168,66	101,3
7	4,21	46,53	51,68	111,84	123,67	129,58	80,22
8	3,54	25,77	50,34	65,31	95,13	169,69	86,39
9	7,28	19,83	48,08	73,53	129,32	99,5	76,87

Fonte: Autoria própria (2017).

Escobar, Souza e Lehn (2014) imobilizaram 0,75 ml da enzima comercial β galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym® 3000L) em 14,25 ml de alginato de sódio 0,8% (p/v), em uma proporção de 1:19. O tempo de contato na solução de $CaCl_2$ 0,3% (p/v) na qual foram gotejadas, foi de 10 minutos. A

análise do tempo de hidrólise ocorreu ao longo de 6 horas, sob pH 7,0, sendo retiradas amostras a cada 30 minutos até o tempo de 180 minutos, após isso, amostras foram retiradas nos tempos de 240 e 360 minutos. Nessas condições, a máxima hidrólise ocorreu no tempo de 360 minutos, apresentando uma taxa de conversão da lactose de aproximadamente 40%. Supõe-se que a diferença observada com o presente estudo, no qual a total conversão ocorreu primeiramente a 60 minutos, se deva às diferentes proporções utilizadas de alginato de sódio e enzima comercial *K. lactis*.

Elnashar e Yassin (2009) realizaram experimentos a partir da enzima β -galactosidase, obtida de *Aspergillus oryzae* imobilizada em carragena com quitosana. Os resultados indicam uma taxa de conversão da lactose de 70% em sete horas de hidrólise. Esse valor inferior pode ser relacionado às interações da carragena e quitosana e outros compostos que constituem o suporte de imobilização, além da faixa de pH testada, que variou de 4,5 a 5,5, e a faixa de temperatura, de 50 °C a 55 °C.

4.4 EFICÁCIA DE RETENÇÃO DA β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA

As concentrações dos reagentes utilizados nesse experimento foram definidas a partir da análise de otimização dos parâmetros de encapsulação.

A capacidade de retenção da enzima determinada por este trabalho foi relativamente satisfatória, e a determinação de proteína na solução de lactose utilizada para medir a glicose e na solução aquosa foram bem baixas nos dois dias de experimento (Tabela 3), entretanto, a atividade enzimática e o rendimento de hidrólise da lactose sofreram uma queda brusca do primeiro para o segundo dia.

Tabela 3 - Reciclo da enzima β -galactosidase imobilizada

Análises	Tempo (dia)	
	1	2
Glicose (mg/ dL)	482,66	79,05
Rendimento (%)	91,83	15,04
Atividade enzimática (μ mol glicose/min)	14,89	2,44
Proteína na lactose (mg/ ml)	0,74	0,00
Proteína na solução aquosa (mg/ ml)	1,00	0,19

Fonte: A autoria própria (2017).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os melhores parâmetros para a imobilização da enzima beta galactosidase foram: concentração de cloreto de cálcio a 0,4%, concentração de alginato de sódio a 1,2% e tempo de maturação 6 minutos; e o melhor tempo para hidrólise da lactose foi determinado em 180 minutos (ou 3 horas).

O microencapsulamento da β -galactosidase comercial permitiu o reuso da enzima por tempo limitado, mesmo não ocorrendo o seu desprendimento da microcápsula. A análise da atividade da enzima microencapsulada decaiu ao longo de 48 horas, após isso, as microcápsulas perderam atividade, provavelmente devido a interações com o cálcio da microcápsula ou desnaturação da enzima ou, ainda, a presença de produtos que possam ocasionar inibição competitiva.

A possibilidade de compartimentalizar as microcápsulas no interior de reatores abre possibilidades da utilização dessa enzima em escala industrial, sem que haja a perda em processos de pasteurização. A redução do diâmetro das partículas é possível por meio de um atomizador como equipamento para gerar gotículas minúsculas que permitirá formar microcápsulas de tamanho menor, e que, possivelmente, poderá influir no rendimento da hidrólise, pois aumentará a superfície de contato.

Estudos em processos de fluxo contínuo (coluna) de substrato podem reduzir os efeitos de inibição por produtos (galactose e glicose), visto que estes serão removidos pelo fluxo. Estudos envolvendo outros polissacarídeos existentes para microencapsulação da enzima podem auxiliar na melhoria do seu tempo de vida, bem como substituir e/ou reduzir a concentração de cálcio ou mesmo substituí-lo por magnésio para auxiliar na estabilidade e *shelf-life* da enzima.

REFERÊNCIAS

ADALBERTO, P. R. *Produção, isolamento e caracterização de β -galactosidasas de Trichoderma reesei: interação de íons metálicos na atividade enzimática*. 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent Advances on Chitosan-based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.

BeMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 76-129.

BRADY, D.; LOGAN, S. R.; McHALE; A. P. The Effect of Soluble Alginate and Calcium on B-Galactosidase Activity Produced by the Thermotolerant, Ethanol-Producing Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* imb3. *Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 101-104, 1998.

CASTRO, H.F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA P. Imobilização e Estabilização de Enzimas. In: BON, P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.L.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

CAVILLE, D.; COMBES, D. Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 22, p. 55-64, 1995.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of External and Internal Gelation and their Impact on the Functions of Alginate as A Coat and Delivery System. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, n. 2, p. 176-187, 2006.

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, p. 614-628, 2013. il.

DRAGET, K. I. et al. Na- e K- alginate; effect on Ca²⁺-gelation. *Carbohydrate Polymers* 35, p. 1-6, 1998.

ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Lactose Hydrolysis by β -galactosidase Covalently Immobilized to Thermally Stable Biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 159, p. 426-437, 2009.

ESCOBAR, G. P.; SOUZA, C. F. V. de; LEHN, D. N. Avaliação de beta-galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo. *Caderno Pedagógico*, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 117-129, 2014.

FODA, M. I.; LOPEZ-LEIVA, M. Continuous Production of Oligosaccharides from Whey Using a Membrane Reactor. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 581-587, 2000.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. *Food Ingredients Brasil*, Barueri, v. 15, n. 25, p. 30-36, mar./maio 2013.

FREITAS, F. F. *Otimização do processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído*. 2007. 224 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

FUNDUEANU, G. et al. Physico-chemical Characterization of Ca-alginate Microparticles Produced with Different Methods. *Biomaterials*, v. 20, p. 1427-1435, 1999.

GONSALVES, P. E. Alimentos de origem animal. In: _____. *Livro dos alimentos*. 2. ed. São Paulo: MG editores, 2002. p. 113-152.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios de hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo das vacas leiteiras*. Porto Alegre: 2001. p. 5-22.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae* β Galactosidase: Its Stability and Applications in The Hydrolysis of Lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, p. 72-80, 2007.

HELGERUD, T. et al. Alginates. In: IMESON, A. *Food Stabilisers Thickeners and Gelling Agents*. Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 50-72.

HENRIKSEN, C. et al. Nutrient Intake Among Two-year-old Children on Cows' Milk-restricted Diets. *Acta Paediatr.*, v. 89, p. 272-278, mar. 2000.

HILDEBRAND, G. E.; TACK, J. W. Microencapsulation of Peptides and Proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 196, p. 173-176, 2000.

HU, X. et al. Engineering of a Fungal β -galactosidase to Remove Product Inhibition by Galactose. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p. 1772-1782, 2010.

ITOH, T.; SUZUKI, M.; ADACHI, S. Production and Characterization of β -galactosidase from Lactose-fermenting Yeasts. *Agricultural and biological chemistry*, v. 46, n. 4, p. 899-904, 1982.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. *LWT – Food Science and Technology*, Londres, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer Nanoparticles from Heat-Treated Electrostatic Protein–Polysaccharide Complexes: Factors Affecting Particle Characteristics. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 2, p. 36-43, 2010.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis with an Immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 583-592, maio 2000.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. et al. Optimization of Conditions for Galactooligosaccharide Synthesis During Lactose Hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, v. 107, p. 258-264, 2008.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 1, p. 73-80, jan./mar., 2005.

OLIVEIRA, A. F.; ROMAN, J. A. Carboidratos. In: _____. *Nutrição para Tecnologia e Engenharia de Alimentos*. Curitiba: CRV, 2013. p. 23-34.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, p. 1-16, 2010.

PAQUES, J. P. et al. Preparation Methods of Alginate Nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 209, p. 163-171, mar. 2014.

PARK, T. G.; HOFFMAN, A. S. Immobilization of *Arthrobacter Simplex* in a Thermally Reversible Hydrogel: Effect of Temperature Cycling on Steroid Conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 152-159, 1990.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. Overview of Milk of Non-bovine Mammals. In: _____. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 3-10.

PARKER, R.; PACE, M. Food and Health. In: _____. *Introduction to food science and food systems*. 2. ed. Canada: Cengage Learning, 2016.

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, v. 3, n. 1, p. 130-151, jan./jun. 2012.

PATIL, J. S. et al. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: A Review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PEREDA, J. A. O. et al. Vitaminas, minerais e enzimas. In: _____. *Tecnologia de alimentos – volume 1: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 81-100.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Lactose: Part I: State of Art. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 1019-1025, dez. 1987.

REIS, C. P. et al. Review and Current Status of Emulsion/Dispersion Technology Using An Internal Gelation Process for The Design of Alginate Particles. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 3, p. 245-257, 2006.

REMIÃO, J. O. R.; SIQUEIRA, A. J. S.; AZEVEDO, A. M. P. Utilização de glicose pelos tecidos. In : _____. *Bioquímica: guia de aulas práticas*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 164-167.

RIBEIRO, A. J. et al. Chitosan-reinforced Alginate Microspheres Obtained Through the Emulsification/Internal Gelation Technique. *Eur. J. Pharm Sci.*, v. 25, p. 31-40, 2005.

RIENZO, T. et al. Lactose Intolerance: from Diagnosis to Correct Management. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Roma, v. 17, n. 2, p. 18-25, 2013.

SCHOUBBEN, A. et al. Development of a Scalable Procedure for Fine Calcium Alginate Particle Preparation. *Chemical Engineering Journal*, v. 160, n. 1, p. 363-369, 2010.

SHUKLA, T. P.; WIERZBICKI, L. E. Beta-galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, v. 5, n. 3, p. 325-396, jan. 1975.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, jan./mar., 2003.

SILVA, C. M. et al. Alginate Microspheres Prepared by Internal Gelation: Development and Effect on Insulin Stability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

SMRDEL, P. Shape Optimization and Characterization of Polysaccharide Beads Prepared by Ionotropic Gelation. *Journal of Microencapsulation*, v. 25, n. 2, p. 90-105, 2008.

SWAISGOOD, H. E. Características do leite. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 689-757.

TOSTES, A. A. M. *Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Prozyn® e Lactozym®*. 2006, 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

TRINDER, P. Determination of Blood Glucose Using an Oxidase-peroxidase System with a Non-carcinogenic Chromogen. *J. Clin. Path*, v. 22, p. 158-161, 1969.

TURECEK, P. L.; PITTNER, F.; BIRKNER, F. Degradation of Polysaccharides by Immobilized Depolymerizing Enzymes. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 25, p. 1-8, 1990.

VOS, P. et al. Multiscale Requirements for Biencapsulation in Medicine and Biotechnology, *Biomaterials*, v. 30, p. 2559-2570, 2009.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research Progress on Chemical Modification of Alginate: A Review. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 33–39, 2011.

YOO, S. H. et al. Microencapsulation of α -tocopherol Using Sodium Alginate and Its Controlled Release Properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 25-30, 2006.

ZADOW, J. G. Lactose - Properties and Uses. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2654-2679. 1984

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of Temperature and pH on the Catalytic Activity of the Immobilized Beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 9, n. 1, p. 33-40, nov. 2001.

