

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANDERSON MASSARO TAKIHARA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS  
DE ALGINATO DE SÓDIO E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE DA  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA  
2017

ANDERSON MASSARO TAKIHARA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS  
DE ALGINATO DE SÓDIO E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE DA  
 $\beta$ -GALACTOSIDASE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno

LONDRINA  
2017

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE**

ANDERSON MASSARO TAKIHARA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 20 de Junho de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Cláudio Takeo Ueno  
Prof. Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarida Masami Yamaguchi  
Membro titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Flávia de Oliveira  
Membro titular

Dedico este trabalho a todos aqueles que  
contribuíram para sua realização, à minha  
família, colegas e professores.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me acompanhar durante os momentos de alegria e principalmente adversos, fornecendo-me força, saúde, resiliência e sabedoria necessária para a realização deste trabalho.

Aos meus pais que sempre estiveram presentes durante todos os momentos alegres e tempestuosos pelos quais passei, me guiando pelos caminhos mais enriquecedores até a chegada do presente momento.

Ao meu professor e orientador Cláudio Takeo Ueno por sua enorme paciência em responder os meus questionamentos desde os mais simples até os mais complexos, seus conselhos e sugestões sempre sabiamente colocados, além de sua total confiança conferida a mim durante a realização deste trabalho.

À Pró-Reitoria de Graduação e Educação Profissional da UTFPR pela bolsa cedida por meio do Programa de Bolsas de Fomento às Ações de Graduação que auxiliou financeiramente a realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisa e Pós-Graduação da UNOPAR, Unidade Piza, Londrina por ceder os laboratórios e equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

Aos professores Luiz Rodrigo Ito Morioka, Hélio Hiroshi Suguimoto e Raul Jorge Hernan Castro-Gómez da UNOPAR por suas explicações, sugestões e conselhos sempre muito bem apontados.

Aos meus colegas de laboratório da UNOPAR que sempre se mantiveram dispostos a me auxiliar nos momentos de dúvidas e incertezas, fornecendo apoio para que este trabalho fosse bem-sucedido.

Aos colegas de turma que me acompanham desde o início do curso de graduação. Sem eles, a caminhada até a realização deste trabalho seria mais árdua e menos completa.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade (EINSTEIN, Albert).

## RESUMO

A incapacidade de hidrolisar a lactose presente no leite, denominada intolerância à lactose, afeta aproximadamente 75% da população mundial. Essa condição tem como causa a deficiência ou ausência de produção da enzima  $\beta$ -galactosidase que provoca severos sintomas que impossibilitam a completa digestão desse carboidrato. Assim, pesquisas buscam métodos alternativos para utilizar essa enzima, responsável pela hidrólise da lactose, a fim de contornar essa deficiência. Uma dessas técnicas é o microencapsulamento, que protege e permite a reuso da  $\beta$ -galactosidase, mas que, no entanto, ainda apresenta alguns entraves como a redução da atividade enzimática. Dessa forma, o presente estudo visa determinar os melhores parâmetros de microencapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase de origem microbiana *Kluyveromyces lactis* visando a hidrólise da lactose. Para o procedimento de encapsulamento da enzima, foram analisadas a influência do cálcio na atividade de  $\beta$ -galactosidase microencapsulada, a eficácia de retenção da enzima em esferas de alginato de sódio, as melhores condições para a hidrólise da lactose a partir de um delineamento estatístico de Box e Behnken, utilizando as variáveis independentes como a concentração de cloreto de cálcio, concentração de alginato de sódio e o tempo de maturação. Nas condições testadas, a constituição das microesferas foi mais eficiente empregando alginato de sódio 1,2 % (m/v), cloreto de cálcio 0,4 % (m/v) com tempo de maturação da esfera de 6 minutos. Elevadas concentrações de cálcio podem causar a perda de atividade catalítica da  $\beta$ -galactosidase, bem como pequenas concentrações podem ter efeito negativo na produção das microcápsulas. O tempo para hidrólise total da lactose foi determinado como ideal na faixa de 120 a 180 minutos. A  $\beta$ -galactosidase imobilizada teve uma boa retenção em esferas de alginato de sódio, porém a vida útil foi relativamente curta aproximadamente dois dias.

**Palavras-chave:** *Kluyveromyces lactis*. Intolerância à lactose. Gelificação iônica. Cálcio. Alginato de sódio.

## ABSTRACT

The inability to hydrolyze lactose contained in the milk, called lactose intolerance, affects approximately 75% of the world's population. This condition is caused by the deficiency or absence of the  $\beta$ -galactosidase enzyme production, which causes severe symptoms that make it impossible to fully digest this carbohydrate. Thus, researches are aimed at alternative methods to use this enzyme, responsible for hydrolysis to lactose, in order to overcome this deficiency. One of these techniques is microencapsulation, which protects and allows the reuse of  $\beta$ -galactosidase, but which still presents some obstacles such as the reduction of enzymatic activity. Thus, the present study aims to determine the best microencapsulation parameters of the enzyme  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, microbial origin, aiming at the hydrolysis of lactose. The method involves the immobilization of the enzyme, the influence of calcium on the activity of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase, the efficacy of the enzyme retention in sodium alginate spheres and the evaluation of the best conditions for the hydrolysis of lactose from a statistical design of Box and Behnken. For the statistical design, some independent variables were used, such as calcium chloride concentration, sodium alginate concentration and maturation time. The data was analyzed with the aid of the available program "Statistica 6.0". Under the conditions tested, the formation of the microspheres was more efficient using 1.2% (m/v) sodium alginate, 0.4% (m/v) calcium chloride, with 6 minutes of sphere maturation time. High concentrations of calcium may cause loss of catalytic activity of  $\beta$ -galactosidase, as well as small concentrations may have a negative effect on the production of microcapsules. The time for total lactose hydrolysis was determined to be ideal in the 120 a 180 minute range. Immobilized  $\beta$ -galactosidase had a good retention on sodium alginate beads, however the shelf life was relatively short approximately two days.

**Keywords:** *Kluyveromyces lactis*. Lactose intolerance. Ionic gelation. Calcium. Sodium alginate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Gelificação iônica.....	11
Figura 2 – Rota enzimática de conversão da lactose por $\beta$ -galactosidase..	15
Figura 3 – Modelo caixa de ovos.....	19
Figura 4 – Equipamentos utilizados para gelificação iônica.....	22
Figura 5 – Microcápsulas de $\beta$ -galactosidase de <i>K. lactis</i> .....	22
Figura 6 – Efeitos estimados dos parâmetros de imobilização da $\beta$ -galactosidase.....	26
Figura 7 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato e concentração de $\text{CaCl}_2$ .....	27
Figura 8 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato e tempo de maturação.....	27
Figura 9 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato e concentração de $\text{CaCl}_2$ .....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Otimização das concentrações de alginato, $\text{CaCl}_2$ e tempo de maturação.....	21
Tabela 2 – Hidrólise da lactose das microcápsulas em função do tempo...	29
Tabela 3 – Reciclo da enzima $\beta$ -galactosidase imobilizada.....	30

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 REDUÇÃO DO TEOR DE LACTOSE POR ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	13
3.1 MÉTODOS PARA DESLACTOSAR LEITE.....	14
3.2 $\beta$ -GALACTOSIDASE: ORIGEM E CARACTERÍSTICAS.....	14
3.2.1 <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	15
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	16
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO.....	16
3.4.1 Gelificação iônica.....	18
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	20
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
4.2.1 Parâmetros de microencapsulação.....	20
4.2.2 Imobilização da enzima $\beta$ -galactosidase.....	21
4.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	22
4.3.1 Determinação da atividade enzimática.....	22
4.4 ANÁLISE DA RETENÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	26
5.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.....	28
5.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	29
5.4 EFICÁCIA DE RETENÇÃO DA $\beta$ -GALACTOSIDASE IMOBILIZADAS.....	30
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 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 de fornecer uma rica carga de nutrientes, principalmente proteínas de alta qualidade, vitaminas e minerais (GONSALVES, 2002).

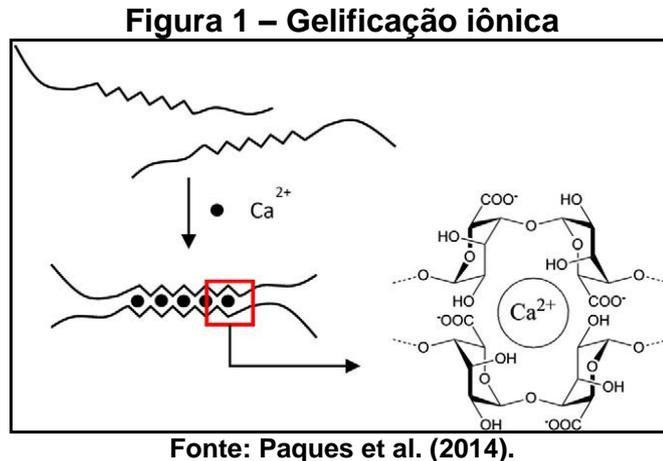
Apesar de existir uma grande variedade de animais produtores de leite ao redor do mundo, tais como cabras, ovelhas, camelos, iaques, búfalos, éguas, renas e lhamas (PARK; HAENLEIN, 2006), na maioria dos países, o leite de vaca é o mais utilizado para o consumo humano. Na composição do leite, estão presentes a proteína caseína e o carboidrato lactose (SWAISGOOD, 2010) que podem provocar reações alérgicas logo nos 3 primeiros anos de vida (HENRIKSEN et al., 2000).

Um grave problema que reflete sobre a digestão da lactose, sobretudo para as crianças na primeira infância, é a ausência ou reduzida presença da enzima lactase (OLIVEIRA; ROMAN, 2013), também chamada  $\beta$ -galactosidase, que hidrolisa a lactose em glicose e galactose (RIENZO et al., 2013). A deficiência na produção de  $\beta$ -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).



O alginato de sódio é um polissacarídeo aniônico composto por ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e o ácido  $\beta$ -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 ( $\text{CaCl}_2$ ) (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).

## 2 OBJETIVO

Determinar os melhores parâmetros de encapsulação da enzima  $\beta$ -galactosidase de origem microbiana *Kluyveromyces lactis* visando a hidrólise da lactose.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da concentração de cálcio, tempo de maturação e concentração de alginato de sódio na atividade de  $\beta$ -galactosidase microencapsulada.
- Realizar a cinética da hidrólise da lactose em função do tempo.
- Verificar a eficácia de retenção da  $\beta$ -galactosidase imobilizada em microcápsulas de alginato de sódio.

### 3 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 ( $\beta$ -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, irá aumentar 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.

### 3.1 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<sup>1</sup> 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, pode-se considerar o método enzimático 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).

### 3.2 $\beta$ -GALACTOSIDASE: ORIGEM E CARACTERÍSTICAS

Segundo Shukla e Wierzbicki (1975), a  $\beta$ -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).

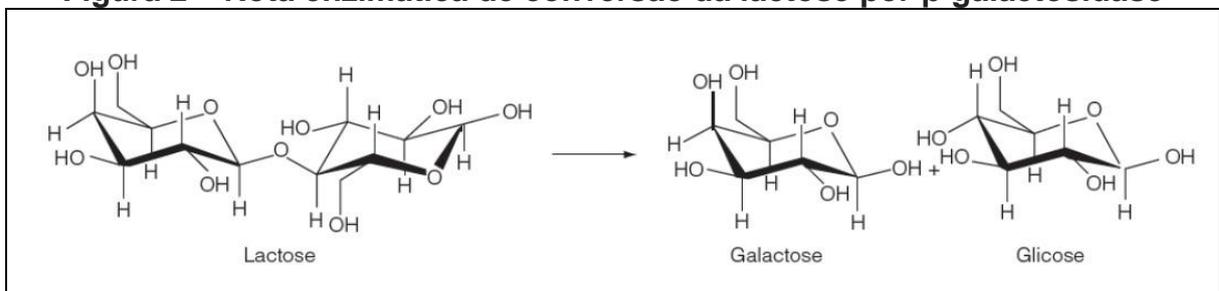
---

<sup>1</sup> GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: A literature review. **Proc. Biochem**, v. 20, p. 2-12, 1985.

Segundo Itoh, Suzuki e Adachi (1982), as  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase**



Fonte: Martins, Burkert (2009).

### 3.2.1 *Kluyveromyces lactis*

A  $\beta$ -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  $\beta$ -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 (CAVAILLE; COMBES, 1995).

### 3.3 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  $\beta$ -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 leito 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, desse modo, tornando possível 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).

### 3.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma técnica relativamente nova de imobilização de partículas sólidas, dispersão e gotas de líquido. Seu início remonta os anos da década de 30 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 considerado por pesquisadores como uma fonte de ingredientes inovadores com propriedades únicas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Existem vários métodos pelos quais pode se 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;
- é limitado para os substratos que possuem peso molecular reduzido, uma vez que esses devem transpor a membrana para alcançarem a enzima;
- há o risco do 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  $\alpha$  - 1,4 - L - ácido gulurônico (bloco - G) e  $\beta$  - 1,4 - D- ácido manurônico (bloco - M), que têm sua origem nas algas marrons como a *Laminaria hyperborea* e *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 do ambiente adversas 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

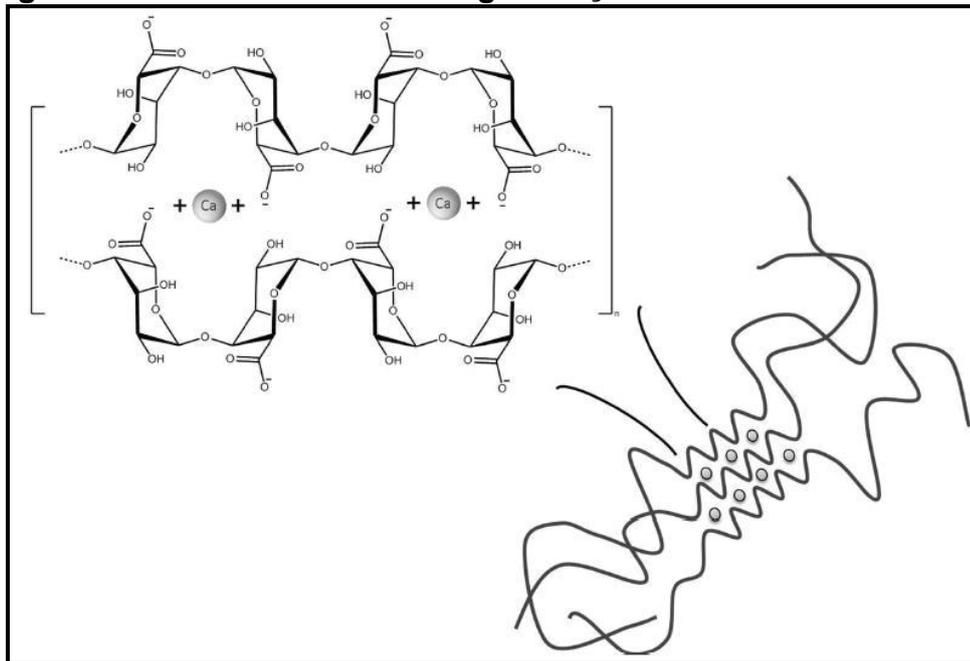
natureza física, físico-química ou química (JACKSON; LEE, 1991; JONES; McCLEMENTS, 2010).

#### 3.4.1 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 ( $\text{CaCl}_2$ ) 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. Estas 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 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 conduzido 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 como 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).

## 4 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.

### 4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

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 (Bioliquid®).

### 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

A metodologia utilizada para a imobilização da  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase comercial (MAXILACT® LX5000 – 5000 UI), Gist-Brocades, Holanda, doada pela empresa Global Food, São Paulo, Brasil.

#### 4.2.1 Parâmetros de microencapsulação

Para a avaliação das melhores condições de formulação das microesferas de  $\beta$ -galactosidase foram delimitadas 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  $\text{CaCl}_2$  (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<sub>2</sub> e tempo de maturação**

Experimento	Tempo maturação	CaCl <sub>2</sub> % (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 <sub>2</sub> (g%)	0,2	0,4	0,6
Alginato (g%)	1,2	1,5	1,8

**Fonte: Autoria própria (2017).**

#### 4.2.2 Imobilização da enzima $\beta$ -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<sup>®</sup>), 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<sup>®</sup>). Logo após três minutos de contato, as esferas constituídas com a  $\beta$ -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: Aatoria própria (2017).

**Figura 5 – Microcápsulas de  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis***



Fonte: Aatoria própria (2017).

### 4.3 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 (Bioliquid®) 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".

#### 4.3.1 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 seguido 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 a 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:

$$\text{Glicose [mg/dL]} = \frac{\text{Absorbância Teste}}{\text{Absorbância Padrão}} \times 100 \quad (1)$$

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

E para o cálculo da atividade enzimática (Bioliqid®), foi determinada por meio da equação 2:

$$\text{AE}(\mu\text{molGlicose / min}) = \frac{\text{Glicose (mg / dL)} \times 1000}{\text{PMG}} \div \text{TR} \quad (2)$$

Sendo:

AE= Atividade Enzimática.

PMG= Peso Molecular da Glicose.

TR= Tempo de Reação.

#### 4.4 ANÁLISE DE RETENÇÃO DA B-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 do que em 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  $\beta$ -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:

$$FCP1 = Q1/A1 \quad (3)$$

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:

$$Abs \times FCM \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

Abs = Absorbância medida da amostra.

FCM = Fator de calibração médio.

## 5 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 observado na figura 6. Dessa forma, pode-se dizer que os valores observados foram adequados as condições preconizadas.

**Figura 6 - Efeitos estimados dos parâmetros de imobilização da  $\beta$ -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
<b>Mean/Interc.</b>	<b>115,0150</b>	<b>19,52365</b>	<b>5,891060</b>	<b>0,027626</b>	<b>31,012</b>	<b>199,0185</b>	<b>115,0150</b>	<b>19,52365</b>	<b>31,0115</b>	<b>199,0185</b>
(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 <sub>2</sub> (%) (L)	52,9730	55,22123	0,959286	0,438642	-184,625	290,5708	26,4865	27,61062	-92,3124	145,2854
CaCl <sub>2</sub> (%) (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

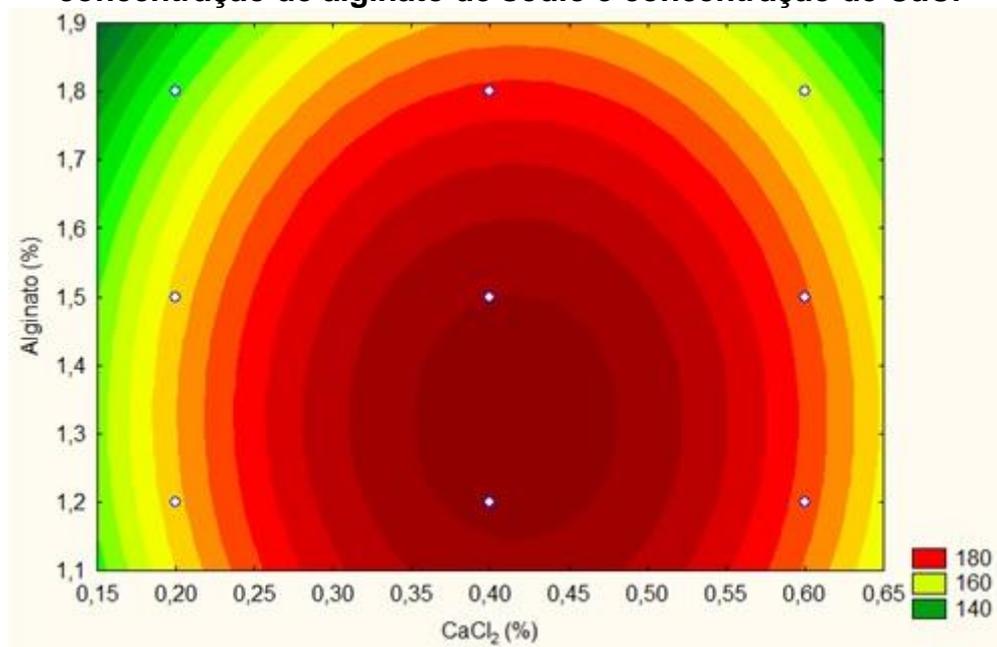
Fonte: Autoria própria (2017).

De acordo com os dados apresentados na figura 6, os efeitos lineares encontrados para maturação e CaCl<sub>2</sub> 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.

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ENCAPSULAÇÃO

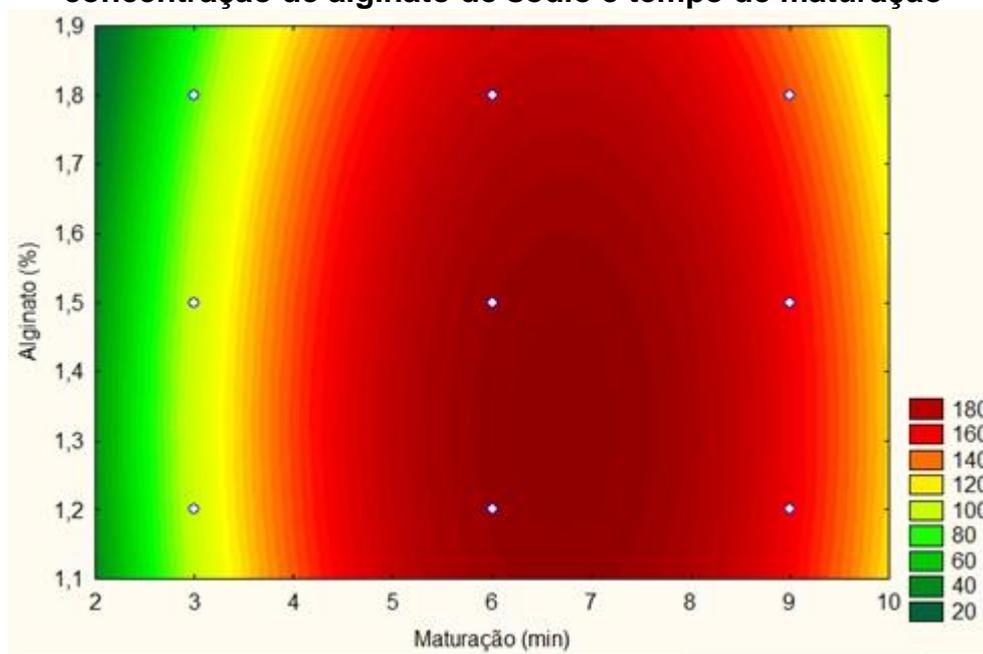
Os resultados obtidos a partir do delineamento Box-Behnken permitiram definir que as melhores concentrações de alginato de sódio, CaCl<sub>2</sub> e tempo de maturação foram: 1,2g% (m/v), 0,4g% (m/v) e 6 minutos de maturação respectivamente, conforme observado nas figuras 7, 8 e 9:

**Figura 7 – Superfície de contorno para os efeitos relacionados de concentração de alginato de sódio e concentração de CaCl<sub>2</sub>**



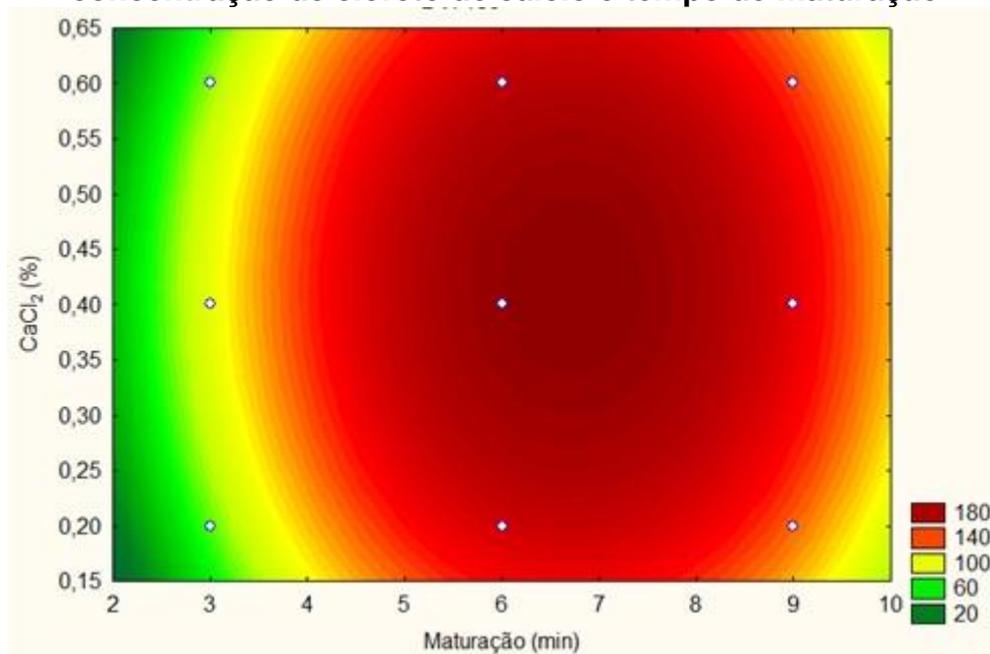
Fonte: Autoria própria (2017).

**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).

## 5.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

O cálcio se destaca por ser um dos elementos mais importantes na composição do leite. Por isso, se torna necessário esclarecer as suas possíveis influências sobre a atividade catalítica das  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase imobilizada, isso se relaciona as superfícies de contorno apresentadas nas figuras 7 e 9, em que a atividade enzimática decaía conforme as concentrações utilizadas distanciavam da região de maior intensidade.

Uma quantidade reduzida de cálcio disponível na técnica de gelificação iônica resultaria em uma fraca interação iônica entre íons de cálcio e os guluronatos, 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 verificarem os seus efeitos sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase preparada sob diferentes condições. A amostra da  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase submetidas a 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  $\beta$ -galactosidase.

### 5.3 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, cuja 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 utilizando uma proporção de 19:1 de alginato de sódio 0,8% (p/v) e enzima comercial  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym®). 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 min., 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  $\beta$ -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 as interações da carragena e quitosana e outros os 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.

#### 5.4 EFICÁCIA DE RETENÇÃO DA $\beta$ -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, 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  $\beta$ -galactosidase imobilizada**

Análises	Tempo (dia)	
	1	2
Glicose (mg/ dL)	482,66	79,05
Rendimento (%)	91,83	15,04
Atividade enzimática ( $\mu$ 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: Autoria própria (2017).

## 6 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  $\beta$ -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 cálcio da microcápsula ou desnaturação da enzima ou 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/ reduzir a concentração de cálcio ou substituí-lo por magnésio para auxiliar na estabilidade e shelf-life da enzima.

## REFERÊNCIAS

ADALBERTO, P. R. **Produção, Isolamento e Caracterização de  $\beta$ -galactosidases 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  $\beta$ -galactosidase activity produced by the thermotolerant, ethanol-producing yeast strain *Kluyveromyces marxianus* imb3. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 101-104, 1998.

CASTRO, H. F. et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 2008. p.123-152.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of  $\beta$ -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 Ca<sup>2+</sup>-gelation. **Carbohydrate Polymers** **35**, p. 1-6, 1998.
- ELNASHAR, M. M. M.; YASSIN, M. A. Lactose hydrolysis by  $\beta$ -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.-mai. 2013.
- FREITAS, F. F. **Otimização do processo de imobilização de  $\beta$ -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**. 1. ed. Porto Alegre: 2001. p. 5-22.
- HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, mai. 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  $\beta$ -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**. 1. ed. Curitiba: CRV, 2013. p. 23-34.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -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**. 1. ed. 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**. 1. ed. 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.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using na oxidase –perodixdase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. clin. Path**, v. 22, p. 158-161, 1969.

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.

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  $\alpha$ -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.