

---

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

---

---

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

5.1 – O pH ótimo para a enzima  $\beta$ -galactosidase na forma livre foi 4,5, enquanto para a forma imobilizada foi 5,0;

5.2 – As temperaturas de maior atividade para as formas livre e imobilizada da enzima foram, respectivamente 55 e 60°C;

5.3 – As concentrações de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído que maximizaram a atividade de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* no processo de imobilização foram, respectivamente, 6,6% (p/v), 4,05%(p/v) e 3,64% (v/v);

5.4 – O biocatalisador imobilizado utilizando as concentrações de alginato, gelatina e glutaraldeído do item anterior alcançou a máxima atividade enzimática utilizando no meio de imobilização 10mL de solução de  $\beta$ -galactosidase, diluída a 10%, por 50mL de meio de imobilização;

5.5 – A enzima imobilizada perdeu apenas 15% de sua atividade após 16 usos;

5.6 – Na faixa de concentração de lactose estudada, de 10 a 140 g/L, não houve inibição pelo substrato para a enzima na forma imobilizada;

5.7 – O modelo cinético com inibição competitiva por galactose foi adequado para prever os perfis cinéticos de consumo de lactose e produção de glicose e galactose em um processo em batelada;

5.8 – O modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição competitiva por galactose foi o que melhor se ajustou aos resultados experimentais de velocidade de reação de hidrólise de lactose por  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada. Os valores dos parâmetros  $K_m$  e  $K_i$  para a enzima livre foram 17,61 e 1,015 g/L e para a enzima imobilizada foram 16,7 e 9,6g/L, respectivamente;

5.9 - A glicose praticamente não teve influência sobre a atividade de  $\beta$ -galactosidase;

5.10 – Os valores da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose utilizando as formas livre e imobilizada da enzima, foram 6,9 e 7,7 kcal/mol respectivamente, sugerindo uma baixa resistência à transferência de substrato através das partículas de enzima imobilizada;

5.11 - O modelo de desativação térmica de primeira ordem se ajustou melhor do que o modelo de desativação em série para descrever a cinética de desativação de  $\beta$ -galactosidase nas formas livre e imobilizada;

5.12 – As energias de ativação do processo de desativação térmica de  $\beta$ -galactosidase nas formas livre e imobilizada foram 88,141 e 72,035 kcal/mol com tempos de meia vida de 7,7 e 12,8 horas a 53°C, respectivamente;

5.13 – A cinética da reação catalisada por  $\beta$ -galactosidase imobilizada foi pouco influenciada por fenômenos de transferência de massa de lactose, fato este comprovado pelos altos valores dos fatores de efetividade.

---

---

## CAPÍTULO 6

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

---

- Estudar a cinética de hidrólise da lactose para ambas formas de enzima utilizando leite como substrato;
- Estudar o comportamento cinético do biocatalisador imobilizado em um reator de leito fixo;
- Verificar o comportamento do fenômeno de transferência de massa calculando o fator de efetividade para o modelo de inibição competitivo pela galactose;
- Estudar a estabilidade térmica da enzima para ambas as formas para temperaturas abaixo de 53°C;
- Avaliar o comportamento da enzima imobilizada utilizando outros suportes.

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- AHMAD, S.; ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase *Cajanus cajan* lectin support. Bioresource Technology, v. 79, p. 121-127, 2001.
- ALMEIDA, M.M. de; PASTORE, G.M. Galactooligossacarídeos – Produção e efeitos benéficos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, SBCTA, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.
- AKGÖL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol micropheres. Food Chemistry, v. 74, p. 281-288, 2001.
- ALBAYRAK, N. YANG, S. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase on tosylated cotton cloth. Enzyme and Microbial Technology . v 31, p. 371–383, 2002.
- ATES, S., MEHMETOGLU, Ü. A new method for immobilization of  $\beta$ -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. Process Biochemistry, v. 32 No. 5, pp. 433-436, 1997.
- AYMARD, C., BELARBI, A. Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. Enzyme and Microbial Technology v. 27. pp. 612-618, 2000.
- BAGAL, D.; KARVE, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose-guar gum biopolymer membrane. Analytica Chimica Acta, v. 555, pp.316-321, 2006.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BAJPAI, S.K., SHARMA, SHUBHRA. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with  $Ca^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  ions. Reactive & Functional Polymers. v.59, pp.129–140, 2004.
- BAO, J., FURUMOTO, K., FUKUNAGA, K., NAKAO, K. A., KOUMATSU, K., YOSHIMOTO, M. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. Biochemical Engineering Journal, v. 22, pp. 33-41, 2004.

- BAYRAMOĞLY, G.; AKGÖL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalente immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl metacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. Biochemical Engineering Journal, v. 14, pp. 117-126, 2003.
- BARET, J.L. Lactose hydrolysis by immobilized lactose. Ind. Aliment. Agri., v.97, pp.1051, 1987.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2a ed., Editora Unicamp, Campinas, 1995.
- BECERRA, M., BAROLI, B., FADDA, A.M., BLANCO MÉNDEZ, J., GONZÁLEZ SISO, M.I. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of Kluyveromyces lactis cells. Enzyme and Microbial Technology v.29, pp506- 512, 2001.
- BERGAMASCO R.; BASSETTI F.J.; MORAES F.; ZANIN G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. Brazil Journal Chemical Engineering, v.17, pp. 4-7, 2000.
- BISHOP, Y. M. M., FIENBERG, S. E., HOLLAND, P. W. Discrete multivariate analysis. Cambridge, MA: MIT Press, 1975.
- BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Principles of catalysis In: Biochemical Engineering. New York. Editora Marcel Dekker, 1997.
- BLOWEY, R. W. Factors affecting milk quality. In: ANDREWS, A. H. et al. Ed. Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle. Blackwell, Oxford. pp. 329 – 334, 1992.
- BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A.. Introdução à química de alimentos. 2a ed, São Paulo. pp. 15, 1989.
- BOBBIO, P.A.; ORSATTI, F. Química do Processamento de Alimentos. São Paulo, Livraria Varela, 1992.
- BÓDALO, A., GÓMEZ, E., GÓMEZ, J.L., BASTIDA, J., MÁXIMO, M.F., DÍAZ, F. A Comparison of Different Methods of  $\beta$ -galactosidase Immobilization. Process Biochemistry v. 26, pp349-353, 1991.
- BORA, U.; KANNAN, K.; NAHAR, P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. Journal of Membrane Science, v. 250, pp. 215-222. 2005.
- BOUVY, F.A.M. Applications of lactase treated whey and other dairy products. Whey Products Conference, Chicago, III, 1974.

- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistic for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. Nova York; Wiley, 1978.
- BRENA, B.M., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., BATISTA-VIEIRA, F. Effect of increasing co-solvent concentration on the stability of soluble and immobilized  $\beta$ -galactosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 21, pp.25-29, 2003.
- BRENA, B.M., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., BATISTA-VIEIRA, F. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized  $\beta$ -galactosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic v.11, pp 597-606, 2001.
- BURVALL, A.; ASP, N.G. and DAHLQVIST, A. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact). Part 1 – Quantitative aspects. Food Chem., v. 4, pp. 243-250, 1979.
- BULCHHOLZ K.; KASCHE V.; BORNSCHEUER U. T. Biocatalysts and Enzyme Technology. 2005.
- CABRAL J. M. S in *Basic Biotechnology*. 2 Edition. Cambridge University Press, 2001.
- CABRAL, J.M.S. Estudo cinético da Invertase Livre e Imobilizada. Dissertação de Mestrado. FEA, Unicamp, Campinas, 1989.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? Current Opinion in Chemical Biology, v.9, pp.217–226, 2005.
- CARBERRY J.J. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*. New York, Mc-Graw-Hill, 1976.
- CASABLANCA, F.G., SANTÍN, J.L. *Ingeniería Bioquímica*. 1ª edition. Editora Sintsis, 1998.
- CASTRO BRAVO, C.E.; CARVALHO, A.P.de; SCHW, R.F., CASTRO GÓMEZ, R.J.H; PILON, R. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Klyveromyces marxianus*. Revista Ciência Agrotécnica, v. 24 (Edição Especial), pp. 137-152, 2000.
- CERF, D., ROUSSEAU, I., PICTON, L. ARGILIER, J.F. MULLER, G. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. European Polymer Journal v.40, pp 2709–2715, 2004.
- CHIBATA I.; TOSA T.; SATO T.; MORI T.; MATSUO Y. Preparation and industrial application of immobilized aminoacyclases. *Fermentation Technology Today*, pp. 383-389, 1972.
- CHANG, M., JUANG, R. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. Enzyme and Microbial Technology. v.36, pp. 75–82, 2005.

- CHEN, X.D.; QUINN, Z.K.; Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. Journal of Food Engineering v. 48, pp. 69-74, 2001.
- CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. European Polymer Journal, v. 36, p. 2095-2103, 2000.
- CHEETHAM P. S. J. Principles of industrial enzymology: basis of soluble and immobilized enzymes in industrial process. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2<sup>o</sup> edition, Chichester, John Wiley & Sons, 1985.
- CHIBATA, I. Immobilized Enzymes – research and development. New York: John Wiley & Sons, 1978.
- CLAMP, J.R.; HOUGH, L.; HICKSON, J.L. and WHISTLER, R.L. Lactose, in Advances in Carbohydrate Chemistry, v.16, Academic Press, New York, pp. 159-206, 1961.
- COUGHLIN, J.R.; NICKERSON, T.A. Acid-catalysed hidrolisis of lactose in whey and aqueous solutions. Journal Dairy Science. 58(2):169-174, 1975.
- CUBAS, S.A., FORESTI, E., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M. Effects of solid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing bath reactor containing immobilized biomass. Bioresource Technology, v. 98, pp. 1411-1417. 2007.
- DALLA-VECCHIA R., NASCIMENTO M.G., SOLDI . Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. Química Nova, v. 27, 2004.
- DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous PHEMA-GMA membrane. Food Chemistry, v. 85, p. 461-466, 2004.
- DAVID A. E. Immobilizaion of enzymes on nanoporous sílica composites. Tese de doutorado. University of Maryland, College Park, 2004.
- DAVID A. E., WANG N. S., YANG V. C., YANG A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. Journal of Biotechnology, v. 125, p. 395-407, 2006.
- DASHEVSKY, A. Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads. Internationa Journal of Pharmaceutics v.161, pp 1-5, 1998.
- DI SERIO, M., MATURA, C., DE ALTERIIS, E., PARASCANDOLA, P., TESSER, R., SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase: the effect of the supports and kinetics. Catalysis Today v.79 – 80, pp 333-339, 2003.
- DIXON M. &WEBB E. C. Enzymes. 3 ed. London, Longman Group Limited, 1979.

- DONER, L.W. and HICKS, K.B. Lactose and the sugars of honey and maple: reactions, properties and analysis, in Food Carbohydrates, AVI Publishing Co., Westport, CT, pp. 74-112, 1982.
- DUAN, K.; WILL CHEN, C. ;SHEU, D.; LI, S. Production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. Biotechnology Techniques, v.. 12, No 4, pp.273-276, 1998.
- EL-MASRY, M.M., MAIO, A. D, MARTELLI, P.L., CASADIO, R., MOUSTAFA, A.B, ROSSI, S., MITA, D.G. Influence of the immobilization process on the activity of  $\beta$ -galactosidase bound to Nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate. Part 1. Isothermal behavior Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v.16 pp.175–189, 2001.
- EMREGUL, E., SUNGUR,S., AKBULUT, U. Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization. Food Chemistry v.97, pp. 591–597, 2006.
- ENGASSER, J.M.; HORVATH, C. Diffusion and Kinetics with Immobilized Enzymes – in Applied Biochemistry and Bioengineering, v.1. Edt. WINGARD Jr., L.B.; KATZIR-KATCHALSKIE., GOLDSTEIN, L.; Academic Press, New York, pp.128-221, 1976.
- ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. Reactive & Functional Polymers, v. 45, pp. 227-233, 2000.
- FERNANDES, P., ROCHA, J.R., CATANA, R., FERREIRA, B.S., CABRAL, J.M.S. Desing and characterisation of na enzyme system for inulin hidrolisis. Food Chemistry, v.95, pp.77-82, 2006.
- FERREIRA, C.L. de L.F. Intolerância à lactose. O problema e as soluções. Revista de Laticínios Cândido Tostes, v. 33 (186), pp.10-14, 1978.
- FREYER, J. Elaboration de dulce de leche. Primer curso de Capacitacion em Industria Lechera. FAO, Uruguai. pp. 27, 1972.
- FROWS, M.J.; VELLENGA, K.; WILT, H.G.J. Combined External and Internal Mass Transfer effects in Heterogeneous (Enzyme) catalysis. Biotech. Bioeng. v.18, pp.53-62, 1976.
- GALVÃO C. M. A. Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.
- GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S.K. Galacto-oligosaccharide by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. Food Chemistry, v.97, p. 426-430, 2006.
- GÉKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of lactose: A Literature Review. Process Biochemistry, v. 20, pp. 2-12, 1985.



- GOLDSTEIN, L. Kinetic Behaviour of Immobilized Enzyme System. *Meth Enzymol*, v.44, pp.397-443, 1976.
- GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, pp. 22-27, 2005.
- GREENBERG, N.A, MAHONEY, R.R. Immobilisation of lactase ( $\beta$ -galactosidase) for use in Dairy processing: A Review. *Process Biochemistry*. Fevereiro/Março, 1981.
- GREENBERG, N.A., MAHONEY, R.R. Formation of oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Food Chem.*, v.10, pp. 195-204, 1983.
- GUISÁN, J.M., ALONSO, N., L'OPEZ-GALLEGO, F., BETACOR, L., HIDALGO, A., MATEO, C., FERNADEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.35 , pp. 57-61, 2005.
- GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, Y.. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive & Functional Polymers*, v. 57, pp. 57-65, 2003.
- HAIDER, T., HUSSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*. Article in press. 2007.
- HAMERSKA-DUDRA, A. BRYJAK, J., TROCHIMCZUK, A. W. Novel method of enzymes stabilization on crosslinked thermosensitive carriers. *Enzyme and Microbial Technology*. Article in Press, 2005.
- HATZINIKOLAOU, D.G., KATSIFAS, E., MAMMA, D., KARAGOUNI, A.D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 24, pp.161-172, 2005.
- HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme Microb. Technol*, Butterworth & Co.v.7. pp. 50-59, 1985.
- HEARN E. & NEUFELD R. J. Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. *Proces Biochemistry*, v. 35, p. 1253-1260, 2000.
- HILL, C.G. An Introduction to Chemical Engineering Kinetics and Reactor Desing. New York, J.Wiley, 1977.

- HOLSINGER, V.H. Lactose. In: WONG, P.N; JENNES,R.; KEENEY,M.; MARTH,E.H. Fundamentals of Dairy Science. New York, Van Nostrand Reinhold. 3 ed. pp. 279-342, 1988.
- HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, p.1-38, 1997.
- <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acessado em 15/11/2007.
- <http://www.fapesp.br>. Acessado em 15/11/2007.
- <http://www.ibge.com.br>. acessado em 15/11/2007.
- <http://www.leitebrasil.org.br>. Acessado em 15/11/2007.
- <http://www.planeta.terra.com.br/saude/saudedofuturo/lactose.htm>. Acessado em 25/10/2005.
- <http://www.portaldofranchising.com.br>. Acessado em 25/10/2005.
- <http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm#definicao>, Acessado em 15/11/2007.
- <http://www.vitabrasilnet.com.br/lactaid.htm>. Acessado em 15/11/2007.
- HUBER, R.E.; KURZ, G. and WALLENFELS, K. A quantitation of factors which on lactose. *Biochemistry*, 15, pp. 1994-2001, 1976.
- HAIDER, T., HUSSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ - galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose *International Journal of Biological Macromolecules* . Article in press 2007.
- ILLANES, A., TOMASELLO, G., WILSON, L. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. *Enzyme and Microbial Technology* v. 27, pp. 270–278, 2000.
- Informativo HA-LA Biotec Divisão de Laticínios. Lactase na indústria de laticínios (Parte I), 28, pp. 1-3, 1995a.
- ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAĞCI, Y. Immunobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*, v.39, pp. 2375-2381, 2003.
- JEISON, D., RUIZ, G., ACEVEDO, F., ILLANES, A. Simulation of the effect of intrinsic reaction kinetics and particle size on the behaviour of immobilized enzymes under internal diffusional restrictions and steady state operation. *Process Biochemical*, v. 39, pp. 393-399. 2003.
- JENNESS, R. and PATTON, S. Principles of dairy chemistry. New York, Robert E. Krieger Publ. Co. pp. 73-100, 322-359, 1976.

- JEON, I.J. and MANTHA, V.R. High performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides formed during  $\beta$ -galactosidase action on lactose. Journal Dairy Science. 68, pp. 581-588, 1985.
- JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J.M. A new Kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology v.31, pp. 300-309, 2002.
- JURADO, E., CAMACHO, F., LUZÓN, G., VICARIA, J.M. Kinetic model of activity for proposed for  $\beta$ -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. Enzyme and Microbial Technology v. 34, pp 33-40, 2004.
- KARDEL, G.; FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. Lactase na Indústria de Laticínios (Parte 1). Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”. Juiz de Fora, v.50, n.294, p.15-17, 1995.
- KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. Enzyme immobilization. Enzyme Technology, 1987.
- KHORASHEH, F., KHEIROLOMOOM, A., MIRESHGHI, S. Application of an optimization Algorithm for estimation of intrinsic kinetic parameters of immobilized enzyme. Journal of Bioscience and Bioengineering.v. 94, 2002.
- KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A. and SURAZYNSKI, A. Utilization of the  $\beta$ -D-galactosidase in the elaboration of condensed sweetened milk. Le Lait. 527:10-15, 1973.
- KOBAYASHI, T., MOO-YOUNG, M. The Kinetic and Mass transfer Behaviour of Immobilized Invertase on Ion-Exchange Resin Beads. Biotechnology Bioengineering, v.15, pp. 47-67, 1973.
- KONSOULA, Z., KYRIAKIDES, M.L. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry – Article in Press. 2005.
- KWOK, H.S. and JEON, I.J. Effect of various conditions on the formation of oligosaccharides in milk treated with  $\beta$ -galactosidase. Journal of Food Science, v.69, pp. 2785-2790, 1986.
- LADERO, M., SANTOS, A., GARCIA, J.L., GARCÍA-OCHOA. Activity of lactose and ONPG of a genetically engineered  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modeling. Enzyme and Microbial Technology v.29 pp. 181-193, 2001.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 27, pp. 583 – 592, 2000.

- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 22, pp. 558 – 567, 1998.
- LEE, K.Y., HEO, T.R. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. Applied and Environmental Microbiology, pp. 869-873. February 2000.
- LEHNINGER, A.L. Bioquímica, 2 ed., Editora Edgard Blücher Ltda, v.I., 1995.
- LEHNINGER, A.L., Bioquímica. 2ª Edição: Edgard Blücher,. v.II, 2000.
- LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; MARCHAL, P.; STEQUERT, A.; CASTEL,.; FAVRE, DELLACHERIE, E. Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability. Journal of Colloid and Interface Science v.273, pp. 131–139, 2004.
- LEVENSPIEL, O. Chemical Reaction Engineering. New York, John Wiley, 1972.
- LÈVY, M., C., HURTEAUX,. R., LÈVY, F. E., LAURENT-MAQUIN, D. Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide. European Journal of Pharmaceutical Sciences v. 24 . 187–197, 2005.
- LOURENÇO, C.M., MAUGERI FILHO, F., Determinação das condições de Operação de Coluna de Leito Fixo com Inulinase Imobilizada. Universidade Estadual de Campinas. Depto de Engenharia de Alimentos. SINAFERM 2003.
- LOURESMA, J. Aplicaciones de lactasa para el dulce de leche. Ind. Lacteas. 27(5): 25-26, 1978.
- MAHONEY, R.R . Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, water, salts and vitamins, London, Advanced Dairy Chemistry, v.3, pp.77-125, 1997.
- MAHONEY, R.R . Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. Food Chemistry, v. 63, n. 2, pp. 147-154, 1998.
- MAHONEY, R.R. and WILDER, J. Thermostability of yeast lactase (*Kluyveromyces marxianus*) in milk. J. Dairy Res., v.55, pp. 423-433, 1988.
- MAMMARELLA, E.J., RUBIOLO, A.C., Study of Deactivation of  $\beta$ -galactosidase Entrapped in Gels. SINAFERM 2003.
- MARIOTTI, M.P. Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de  $\beta$ -galactosidase imobilizada. Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. 2000.
- MARQUEZ, L.D.S., RIBEIRO, E.J., ARAÚJO, E.H.; Estudos de Meios de cultura na síntese de  $\beta$ -Galactosidase por fermentação com *Kluyromyces marxianus*. SINAFERM, 2003.

- MARQUEZ, L.D.S. Produção De Açúcar Invertido Pelo Uso De Invertase Imobilizada Em Resinas. Dissertação de Mestrado, UFU, 2007.
- MATEO, C., MONTE, R., PESSELA, B.C.C., FUENTES, M., TORRES, R., GUISÁN, J.M., LAFUENTE, R.F. Immobilization of Lactase from *Kluyveromyces lactis* Greatly Reduces the Inhibition Promoted by Glucose. Full hydrolysis of lactose in Milk. Biotechnol. Prog., v. 20, pp. 1259-1262, 2004.
- MAUGARD, T., GAUNT, D., DOMINIQUE LEGOY, M., BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biotechnology Letters v.25, pp.623-629, 2003.
- MESSING, R. A. Carriers for immobilized biologically active systems in advances in biochemical engineering, v. 10, 1978.
- MITTAL, A., KHURANA, S., SINGH, H., KAMBOJ, R.C. Characterization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads. Enzyme and Microbial Technology, v. 37, pp. 318–323. 2005.
- MORÉ J. J. The Levenberg-Marquardt Algorithm: Implementation and Theory. In G.A. Watson, (ed.), Lecture Notes in Mathematics 630, p. 105-116. Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- NAKAJIMA, M., SUGIURA, S., ODA, T., IZUMIDA Y., AOYAGI, Y., SATAKE, M., OCHIAI, A., OHKOHCHI, N. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. Biomaterials v.26, pp. 3327–3331, 2005.
- NAKKHARAT, P., HALTRICH, D. Lactose Hydrolysis And Formation Of Galactooligosaccharides By A Novel Immobilized  $\beta$ -Galactosidase From The Thermophilic Fungus *Talaromyces Thermophilus*. Applied Biochemistry And Biotechnology pp. 129–132, 2006.
- NELSON J. M.; GRIFFIN E. G. Adsorption of invertase. Journal American Chemical, v. 38, pp. 1109-1114, 1916.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª ed. Campinas, Editora da Unicamp, 1996.
- NICKERSON, T.A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. Fundamentals of dairy chemistry. 2nd ed. Connecticut. The AVI Publishing Co. pp. 224-260, 273-324, 1974.
- NOGALES, J.M.R., LÓPEZ, A.D. A novel approach to develop  $\beta$ -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. International Dairy Journal, v.16, pp.354–360. 2006.
- NUNES, M.F.A.; MASSAUGER, S., MONTE ALEGRE, R. Produção e Propriedades de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v. 29, n. 1, p. 25-30, jan/jun. 1993.

- ÓBON, J.M., CASTELLAR, J.L., MANJÓN, A.  $\beta$ -galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modelling study of batch and continuous reactors. Biochemical Education v.28, pp. 164 –168, 2000.
- O'CONNELL, S., WALSH, G. Physicochemical characteristics of commercial lactases relevant to their application in the alleviation of lactose intolerance. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.134, pp. 179-191, 2006.
- OLIVEIRA, J.S de. Queijo Fundamentos Tecnológicos. In: Série: Tecnologia Agroindustrial. São Paulo, 1982.
- OLIVEIRA, M. dos Santos. Flotação em colunado rejeito remoído do processo de concentração da apatita (Cap. III e IV). Dissertação de Mestrado FEQUI/UFU, Uberlândia , 131p, 2004.
- OSMAN, B.; KARA, A.; UZUN, L.; BESIRLI, N.; DENIZLI, A. Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 37, pp. 88-94, 2005.
- OZDURAL, A.R., TANYOLAÇ, D., BOYACI, I.H., MUTLU, M., WEBB, C., Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. Biochemical Engineering Journal v.14, pp. 27-36, 2003.
- PAPAYANNAKOS, N., MARKAS, G., KEKOS, D. Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger* The Chemical Engineering Journal, v.52, Issue 1, pp. B1-B12, 1993.
- PARIZIA, M.W.; FOSTER, F.M. Journal of Food protection, 46 (5) 453, 1983.
- PEREIRA, E.B., ZANIN, G.M., CASTRO, H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. Brazilian Journal of Chemical Engineering. v. 20 No 04 pp. 343-355. October – December 2003.
- PIVARNIK, L. F.; SENEGAL, A.G.; RAND, A.G. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial  $\beta$ -galactosidase (lactase) in food processing. Advances in Food and Nutrition Research, New York, v. 38, pp. 33, 1995.
- PORTACCIO, M., STELLATO, S., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., ELDIN, M.S.S., GAETA, F.S., MITA, D.G. Galactose competitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. Enzyme Microbial Technology. v.23, pp.101 – 106, 1998.
- PORTO, L.M. Estudo e Determinação das Melhores Condições Operacionais do Processo de Produção da Ricota. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFMG, 2001.

- PRADELLA, G.C. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 387-418, 2001.
- PRASHANTH, S.J., MULIMANI V.H.. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry*. v 40, pp. 1199–1205, 2005.
- PRENOSIL, J.E; STUKER, E. & BOURNE, J.R Formation of Oligosaccharides during Enzymatic Lactose: Part I: State of Art. *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, pp. 1019-1025, 1987.
- REED, G; NAGODAWITHANA, T. *Enzymes in Food Processing*. New York, Academic Press. 3ª ed. 1993.
- REGAN, D.L., LILLY, M.D.; DUNNILL, P. Influence of Intraparticle Diffusional Limitation on the Observed Kinetics of Immobilized Enzyme and on catalyst Desing. *Biotech. Bioeng.* V.16, pp.1081-1093, 1974.
- RENNER, E. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Volkswirtschaftlicher Verlag. Munich, pp.1-450, 1983.
- RESHMI, R., SANJAY, G., SUGUNAN, S. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalisys Communications*, v. 8, pp. 393-399, 2007.
- REUTER, S.; NYGAARD, A.,R.; ZIMMERMANN,W..  $\beta$ -galactooligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidases from *Sulfolobus sulfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microbial Technology*, v. 25, pp. 509-516, 1999.
- RIBEIRO, E.J. Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada. Tese de Doutorado, FEA – UNICAMP, 1989.
- ROBERTS, C.H. and PETTINATI, D.J. Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, v.5, pp. 130-134, 1957.
- RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e Otimização de Processos. Casa do Pão Editora. FEA – Campinas. 2005.
- ROGALSKI, J., DAWIDOWICZ, A., LEONOWICZ, A. Lactose hydrolysis in milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Molecular Catalysis*, v.3, pp.223-245, 1994.
- ROOS, Y.; KAREL Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *J. Food Sci.*, 34, pp. 342-349, 1991.
- ROY. I., GUPTA, M.N. Lactose hydrolysis by Lactosym TM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, v. 39, pp.325-332. 2003.

- RUBIOLO, A.C., CARRARA, C.R. A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan. Chemical Engineering Journal. v.65, pp. 93-98, 1997.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. Food Chemistry, v.94, pp. 573-579, 2005.
- SCHEBOR, C., BURIN, L., BUERA, M.P., AGUILERA, J.M., CHIRIFE, J. Glassy State and Thermal Inactivation of Invertase and lactase in Dried Amorphous Matrices. Biotechnology Prop. v.13, pp.857-863, 1997.
- SCRIBAN, R. Biotecnologia. Editora Manole Ltda. 1985.
- SEGEL I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano D.M., Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos Editora, 1979.
- SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics. New York, John Wiley. 1993.
- SHELDON, R.A.; WOUDEBERG-VAN OOSTEROM, M.; VAN BELLE, H.J.A.; VAN RANTWIJK, F. Immobilized  $\beta$ -galactosidase and their use in galactoside synthesis. Journal of Molecular catalysis A: Chemical 134, pp. 269-274, 1998.
- SHEU, D., LI, S., DUAN, K., CHEN, C. W. Production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. Biotechnology Techniques, v. 12, no 4, 8, pp. 273–276, 1998.
- SHUKLA, H.C., CHAPLIN M.F. Non-competitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*A. oryzae*) by galactose. Enzyme and Microbial Technology, v.15, pp. 297-299, 1993.
- SINNOTT, M.L. Íons, íon-pairs and catalysis by the lac Z  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*. FEBS Lett. 94, pp.1-9, 1978.
- SMART, J. Transferase reactions of the  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.34, pp. 495-501, 1990.
- SPREER, E. Lactologia Industrial. Zaragoza, Espanha. Editora Acribia. 1975.
- SUGUNAN, S., RESHMIS., SANJAY, G. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. Catalysis Communications v. 8 pp. 393–399, 2007.
- SZYMANSKA K., BRYJAK J., MROWIEC-BIALON J., JARZEBSKI A. B. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. Microporous and Mesoporous Materials, v. 99, p. 167-175, 2007.



- TANRISEVEN, A.S.; DOGAN, E. A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase. Process Biochemistry v.38, pp 27-30, 2002.
- TEIXEIRA, A.M.D. Estudo do Comportamento da enzima  $\beta$ -galactosidase no processo de ultrafiltração. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2000.
- THELWALL, L.A.W. Developments in the chemistry and chemical modification of lactose, in *Developments in Dairy Chemistry – 3 – Lactose and Minor Constituents*, (P.E. Fox ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 35-67, 1985.
- TOMÁS, C.M. Estudo da Hidrólise da Lactose por  $\beta$ -galactosidase na forma livre e imobilizada. Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia Química – UFU. 1998.
- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. Process Biochemistry, v. 41, pp. 1325-1331, 2006.
- TRUBIANO, G., ERRAZU, D.B. Influence of the operating conditions and external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida Antarctica* lipase. Enzyme and Microbial Technology - Article in Press. 2006.
- TWIEG, W.C. and NICKERSON, T.A.. Kinetics of lactose crystallization. Journal Dairy Science. V.51(11), pp.1720-1724, 1968.
- UNIFESP. Pesquisa por internet: [www.unifesp.br/biblioteca/lactose](http://www.unifesp.br/biblioteca/lactose). 2002.
- VICENTE A. A. Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química . Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2000.
- VILLADSEN, J.V. & MICHELSEN, M.L. - *Solution of differential Equation Models by Polynomial Approximation* Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1978.
- VINHAL, E. F. Hidrólise da Lactose no Leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química - UFU. 2001.
- VITOLO, M. Aplicação de enzimas na Tecnologia de Alimentos, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U.de A. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 4, pp. 387-418, 2001.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y Física Lactología*, Editora Acribia, S.A., Zaragoza, 1984.
- WATANABE, H., MATSUYAMA, T., YAMAMOTO, H. Preparation of immobilized enzyme gel particles using an electrostatic atomization technique. Biochemical Engineering Journal. v.8, pp. 171-174. 2001.

- WEBB, B.H. Condensed products, in Byproducts from milk, 2nd ed. (B.H. Webb and E.O. Whittier ed.) AVI Publishing Co., Westport, Connecticut. p.83-123, 1970.
- WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. and ANFORD, J.A. Fundamentals of dairy chemistry, 2nd ed. Westport, AVI publishing, p480, 1974.
- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food Science, v.2, p17, 1972.
- WHITE, A.; HANDLER, P. & SMITH, E. Princípios de Bioquímica. Guanabara Koogan. 5 ed., 1976.
- ZADOW, J.G. Lactose: proprieties and uses. Journal of Dairy Science. Champaign, v.67, p. 2654-2679, 1984.
- ZANIN G. M. Sacarificação de Amido em reator de Leito Fluidizado com Enzima amiloglicosidase Imobilizada. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade estadual de Campinas, 1989.
- ZARATE, S. and LOPEZ-LEIVA, M.H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. J. Food Proc., 53(3), pp. 262-268, 1990.
- ZHONG-CHENG-HU, KIRUS, A.R.; STORNA, K.E. Characterization of immobilized enzyme in polyurethane foams in a dynamic bed reactor. Appl. Microbiol. Biotechnology, v.39, p.289-295, 1993.
- 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, pp. 33-40, 2001.

---

---

## ANEXO A

---

---

### TAMPÃO ACETATO

Para preparação do tampão acetato, é necessário a preparação de duas soluções “estoques”.

Uma solução ácida (A) e uma solução básica (B):

**A – solução 0,2M de ácido acético (11,55 mL em 1000 mL)**

**B – solução 0,2M de acetato de sódio (16,4 g de  $C_2H_3O_2N$  em 1000mL)**

Para obter a solução tampão com o pH desejado, deve-se obedecer a seguinte equação:

**x mL de A + y mL de B, diluída em 100 mL**

onde x e y são valores conforme a tabela abaixo:

x	y	pH
46,3	3,7	3,6
44	6,0	3,8
41,0	9,0	4,0
36,8	13,2	4,2
30,5	19,5	4,4

25,5	24,5	4,6
20,0	30,0	4,8
14,8	35,2	5,0
10,5	39,5	5,2
8,8	41,2	5,4
4,8	45,2	5,6

### TAMPÃO CITRATO FOSTAFO

Para preparação do tampão acetato, é necessário a preparação de duas soluções “estoques”.

Uma solução ácida (A) e uma solução básica (B):

**A:** 0,1M de ácido cítrico – (19,21g em 1000 ml)

**B:** 0,2M solução de fosfato de sódio di básico (53,65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 71,7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL

Para obter a solução tampão com o pH desejado, deve-se obedecer a seguinte equação:

**x mL de A + y mL de B, diluída em 100 mL**

onde x e y são valores conforme a tabela abaixo:

x	y	pH
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	23,3	4,6
25,2	24,6	4,8
24,3	25,7	5
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21	29	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4
13,6	36,4	6,6

9,1	40,9	6,8
6,5	43,6	7

---

---

## ANEXO B

---

---

### Materiais e Métodos

- Cloreto de Cálcio – Fisher Scientific Company
- D(+) Lactose monohidratada - Isofar
- Glicose Enzimática - Analisa Diagnóstica
- Alginato de sódio - Vetec
- Gelatina - PA
- Glutaraldeído - Nuclear
- Àcido Acético – Chemco
- Acetato de Sódio Anidro – CIRQ
- Àcido cítrico -
- Fosfato de sódio dibásico
- Glicose - PA
- Galactose PA

---

---

## ANEXO C

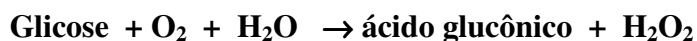
---

---

### MÉTODOS EXPERIMENTAIS

#### C.1. Determinação de glicose

A glicose, em todos experimentos, será dosada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se Kits Glicose Enzimática, conforme procedimento descrito por TOMÁS, 1998. Esse método é específico para a glicose e se baseia na oxidação da mesma, de acordo com a seguinte reação, catalisada pela glicose-oxidase (G-O):



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol presentes no meio, sob a ação da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, cuja intensidade de sua cor vermelha, é proporcional à concentração de glicose no meio. Esse composto de tonalidade vermelha apresenta máxima absorção de luz a um comprimento de onda de 505nm.

O Kit de glicose-oxidase é composto de dois frascos, sendo o número 1 a mistura de enzimas e o número 2, o tampão, que também contém os reagentes 4-aminoantipirina e fenol. O frasco 2, contendo 100 mL de solução, foi diluído a 500mL com água destilada e depois separado em dois frascos âmbar, cada um com 250mL do tampão diluído. Essa solução mantém-se estável por dois meses a uma temperatura entre 2 e 8°C. A um desses frascos foi adicionado o conteúdo do frasco 1, ao qual continha a glicose oxidase e a peroxidase, mistura essa que estava pronta para reação com amostras contendo glicose. Essa solução se mantinha estável por dois meses.

Para a determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi a determinação da curva padrão, de absorbância em função das concentrações de glicose. Para isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 2 mL da solução de glicose-oxidase preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,0 g/L, deixando reagir por 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias a 500nm para os vários tubos, em um espectrofotômetro Genesys 10 UV usando cubetas de vidro, considerando como branco a solução de glicose-oxidase. Com os valores de absorbância em função da concentração de glicose na faixa de 0,0 a 4,0 g/L, com

intervalos de 0,5 g/L, foram construídas retas e determinadas as equações das mesmas, considerando o intervalo de concentração adotado. Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o mesmo procedimento anterior, determinando-se a sua absorbância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.

## C.2 – Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína foi realizada através do Método de Lowry (1951), constituídos das soluções A, B e AB.

Reativo A: 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  seco mais 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de NaOH 0,1 M

Reativo B: 0,5 g de  $\text{CuSO}_4$  mais 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 100 mL de água destilada.

Solução AB: 50 mL de reativo A e 1 mL de reativo B, preparado imediatamente antes da dosagem.

Reativo de Folin: preparava uma solução 1 N e era armazenado ao abrigo da luz.

Solução padrão de soro de albumina bovina (BSA) 100 mg/L. Adicionava-se cuidadosamente 100 mg de BSA em 1000 mL para evitar a formação de bolhas. Esta solução era conservada sob refrigeração.

Para a dosagem de proteína fazia-se a diluição das amostras para que a absorbância situasse na faixa de 0,0 a 1,0. Amostras de 1,0 mL contendo proteína a ser dosada eram adicionadas a um frasco tipo penicilina cor âmbar no qual eram acrescentados 3 mL de solução AB, cobertos com parafilm, homogeneizados, protegidos da luz e mantidos desta forma por 10 minutos. Após este tempo adicionava-se 0,3 mL de reativo Folin 1 N e deixava por mais 30 minutos ao abrigo da luz. Ao final efetuava a medida da absorbância em espectrofotômetro Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV, utilizando cubetas de vidro, utilizando um comprimento de onda igual a  $\lambda=760$  nm.

A leitura da absorbância era convertida em concentração de proteína pela curva de calibração realizada anteriormente pelo mesmo procedimento, com medidas de absorbância em relação a concentrações de BSA na faixa de 0 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , que resultou em uma equação linear.







