**ESTUDO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITES COM DIFERENTES TEORES DE GORDURA UTILIZANDO ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA**

*Study of lactose hydrolysis in milks with different fat contents using free and immobilized enzyme*

***Letícia KNAKIEWICZ*1*, Alexandra Fabíola BECKER,2 Isadora GAZONI*3*, Georgia Ane Raquel SEHN*4*, Elisandra RIGO*5**

**RESUMO**

A hidrólise da lactose é um processo amplamente utilizado na indústria alimentícia, tem objetivo de disponibilizar produtos zero lactose, pela presença de monossacarídeos (glicose e galactose) decorrente deste processo tecnológico. A enzima β-galactosidase, mais conhecida como lactase é responsável pela hidrólise de produtos lácteos, em sua maioria utilizada de forma livre, o que necessita por parte da empresa um valor envolvido na elaboração destes produtos. Visando atender o índice ascendente de portadores de intolerância à lactose, estimado em cerca de 70% da população adulta no mundo que manifesta alguma deficiência de lactase no organismo, além da busca por alimentos funcionais, tecnologias aliadas ao uso de enzimas e técnicas de imobilização são estudas para aprimorar a economia e a eficiência dos processos biotecnológicos. O estudo buscou avaliar a utilização da β-galactosidase para hidrólise de leites de diferentes espécies.

A hidrólise da lactose dos diferentes leites utilizando a EL não apresentou diferença significativa (p<0,05). Já a EI, o LBI e LBD apresentaram diferença, porém o LBI utilizando a EI necessitou maior tempo de hidrólise (43 h), possivelmente por ter maior teor de gordura em relação ao LBD. Os LOI e LOD não apresentaram diferença utilizando a EI, possivelmente devido este leite apresentar a gordura de forma mais dispersa no meio e com tamanhos menores dos glóbulos de gordura não interferindo no processo de hidrólise da lactose. Foi evidenciando que o teor de gordura tem influência sobre o tempo de hidrólise, visto que o LS ao menor tempo de hidrólise para a EI.

**Palavras-chave:** β-galactosidase, zero lactose, intolerantes

**ABSTRACT**

Lactose hydrolysis is a process widely used in the food industry, with the objective of providing zero lactose products, due to the presence of monosaccharides (glucose and galactose) resulting from this technological process. The enzyme β-galactosidase, better known as lactase, is responsible for the hydrolysis of dairy products, most of which are used freely, which requires a value from the company involved in the preparation of these products. Aiming to meet the rising rate of lactose intolerance sufferers, estimated at about 70% of the adult population in the world who manifest some lactase deficiency in the body, in addition to the search for functional foods, technologies combined with the use of enzymes and immobilization techniques are studies to improve the economy and efficiency of biotechnological processes. The study sought to evaluate the use of β-galactosidase for hydrolysis of milks of different species.

The lactose hydrolysis of the different milks using EL did not show any significant difference (p <0.05). The EI, LBI and LBD, on the other hand, showed a difference, but the LBI using the EI required a longer hydrolysis time (43 h), possibly because it had a higher fat content in relation to the LBD. LOI and LOD showed no difference using EI, possibly due to the fact that this milk presents the fat in a more dispersed way in the medium and with smaller sizes of fat globules, not interfering in the lactose hydrolysis process. It was evident that the fat content has an influence on the hydrolysis time, since LS at the shortest hydrolysis time for EI.

**Key words:** β-galactosidase, free lactose, intolerant

**INTRODUÇÃO**

A hidrólise enzimática da lactose é um dos processos biotecnológicos mais importantes no setor de alimentos, considerando aumento da restrição ao consumo de alimentos que possuem lactose em sua composição (LIU et al., 2019). A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir e absorver a lactose. A lactose requer hidrólise em D-glicose e D-galactose no intestino delgado, mas a atividade desta enzima é baixa em aproximadamente 70% da população adulta em todo o mundo, devido a um declínio gradual geneticamente na expressão de lactase após o desmame (WORTMANN; SIMON; DA SILVEIRA, 2013; SAQIB et al., 2017; CORGNEAU et al., 2017; SKRYPLONEK et al., 2019), por isso o mercado vem investindo em produtos deslactosados (SILVA, 2016), com intuito principal de suprir as necessidades desses indivíduos que não conseguem metabolizar completamente a lactose (MORLOCK et al., 2014; SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2016).

As β-galactosidases são amplamente utilizadas na indústria de lácteos, para a produção de lácteos zero lactose, (NATH et al., 2014), especificamente a β-galactosidase produzida a partir de Kluyveromyces lactis tem sido empregada na hidrólise de lactose produzindo glicose e galactose (KLEIN et al., 2013) e para a produção de prebióticos como os galactooligossacarídeos e a lactulose (GUERREIRO et al., 2017). O processo de hidrólise aumenta a solubilidade e digestibilidade dos produtos lácteos (RICARDI et al., 2017) como bebidas lácteas, creme, iogurte e queijo (NATH et al., 2014).

Em condições de altas concentrações de lactose, a β-galactosidase é capaz de “ativar” o seu outro mecanismo catalítico, o de transgalactosilação, sendo que González-Delgado et al. (2016) observaram a otimização da síntese de galactooligossacarídeos, analisando parâmetros como temperatura, concentração de enzima, pH e tempo de reação verificando que o pH é um parâmetro crítico que afeta a reação realizada pela enzima. Neste sentido, faz-se necessário verificar a ação das lactases em diferentes meios, buscando atender a demanda do mercado consumidor pelo desenvolvimento de novos produtos. Um desafio para a indústria láctea e ao mesmo tempo oportunidade para desenvolver ainda mais o mercado de alimentos com teor reduzido de lactose (PEREIRA et al., 2012).

Atualmente a grande maioria da hidrólise é realizada por enzimas livres, no entanto, enzimas livres aumentam o custo de produção de alimentos sem lactose / com baixo teor de lactose (FACIN et al., 2015). Portanto, sistemas de imobilização da β-D-galactosidase para a hidrólise da lactose é uma estratégia promissora para a indústria alimentícia quando o objetivo é produzir alimentos sem lactose / com baixo teor de lactose (LIU et al 2012). Principalmente com intuito de recuperação da enzima e reutilização em vários ciclos de hidrólise, o que reduz a relação custo / benefício no processo industrial (LIU et al 2012).

 Rentschler et al. (2015), realizaram conversões enzimáticas de lactose em leite bovino UHT contendo 1,5% de gordura e lactose inicial de 48,5 ± 2,1 g.L-1 com agitação a 8 ± 1 ° C por 72 h. Segundo Guetouache, Guessas e Medjekal (2014), o leite bovino é composto de 3,7% de gordura, 3,5% proteína total dessas 2,8% caseína, 4,9% de lactose, 0,72% de sais minerais e água. A presença da gordura é responsável pelo sabor específico do leite bovino, pelos glóbulos de gordura dispersos serem rodeados por uma camada fina composta de um complexo lipídico-proteico e uma pequena quantidade de carboidrato (DOUËLLOU; MONTEL; THEVENOT SERGENTET, 2017).

 Já o leite ovino, contém significativamente maior concentração de proteína, caseína, cálcio, gordura, lactose, ácido linolênico conjugado e vitaminas que o leite bovino (BALTHAZAR et al., 2017; FAO 2019), resultado este observado no maior teor total de sólidos e nas características do produto elaborado. O teor de proteína é quase duas vezes mais em comparação ao leite caprino e bovino, e fonte de minerais (BALTHAZAR et al., 2017). A forma molecular das proteínas do leite ovino e a sequências de aminoácidos tem qualidade nutricional e impacta na digestibilidade e termo estabilidade (CLAEYS et al., 2014).  Os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, zinco, manganês e cobre são maiores em leite ovino (WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013). A biodisponibilidade desses minerais faz com que seja uma fonte importante desses elementos na dieta alimentar (BALTHAZAR et al., 2017).

 Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a hidrólise da lactose em meio sintético, leite bovino e ovino com diferentes teores de gordura, pela β-Galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (EC 3.2.1.23) quanto ao tempo de atuação da enzima para hidrólise de no mínimo 95% da lactose presente nos leites.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Imobilização da enzima β-galactosidase

As esferas de quitosana foram preparadas seguindo metodologia proposta por Duarte et al. (2017), com modificações, 0,3 g de quitosana foram solubilizadas em 15 mL de solução de ácido acético 0,35 M e submetidas a sonicação em banho ultrassom SolidSteel (SKU SSBUC 6L) (40°C) por 1 hora e após gotejamento com uma seringa e agulha em solução de coagulação (hidróxido de sódio 1 M e etanol 26% v/v) à 10 °C, sob agitação (250 rpm) em um agitador magnético. As esferas permaneceram em repouso por 2 horas em geladeira (10 °C), seguida de lavagem com água destilada até sua neutralidade e posterior secagem em filtro (Whatman qualitativo n° 40) com bomba à vácuo (1 hora).

O processo de ativação foi realizado com soluções de genipina 0,5% em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 (KLEIN et al., 2016). A ativação foi realizada em 1 hora à 60 °C em shaker sem agitação (0 rpm). Posteriormente a lavagem das mesmas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0. Após adicionado 2 mL de solução enzimática com concentração de 56 U/mL durante 8 horas à 25 ° C em shaker com agitação de 200 rpm. Em seguida realizado a lavagem das esferas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e posterior tirado o excesso de reagente tamponante através de filtro (Whatmam qualitativo n° 40). A imobilização foi realizada através de ligação covalente.

ONPG foi usado como substrato para medida da atividade enzimática da β-galactosidase livre e imobilizada. Uma unidade (U) da atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 mol de ONPG por minuto nas condições reacionais (Song et al., 2013).

Hidrólise da lactose

O leite de ovino e/ou bovino foi obtido de uma fazenda localizada no interior de Lajeado Grande/SC, transportados em recipientes de 5 litros em caixa de material isotérmico contendo gelo buscando manter a temperatura de 4 °C, até a UDESC de Pinhalzinho/SC. Os leites foram submetidos ao desnate através da centrífuga (Canapatop) com objetivo de padronização da gordura do leite de 0,5 % e 3,0 %, após pasteurização lenta à 65 ºC por 30 min sob agitação (300 rpm) em panela Thermomix™ (Vorwerk, modelo Bimby ® 5 (TM5)), na sequência resfriados à 10 ºC, para realização dos experimentos de hidrólise da lactose.

O leite sintético (LS) foi elaborado a partir de 9 mL de uma solução de lactose tamponada 3,85% m/v (solução de lactose em tampão fosfato de 0,1 M pH 6,8).

A hidrólise da lactose foi avaliada nos leites bovino integral (LBI), leite bovino desnatado (LBD), leite ovino integral (LOI), leite ovino desnatado (LOD) e leite sintético (LS), adicionando 1 mL de enzima β-galactosidase diluída em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (56 U) para a enzima livre e 0,0914 g de enzima β-galactosidase imobilizada (56 U) para a enzima imobilizada.

 Para determinar o grau de hidrólise das amostras foi utilizado o Kit Glicose PP (Analisa ®). As amostras contendo enzima livre (EL) foram inativadas a 90 °C/1 min e após realizada a determinação de glicose. A absorbância foi medida em 505 nm em espectrofotômetro (Femto – Cirrus 80). As alíquotas das reações com a enzima imobilizada foram somente retiradas do meio e analisadas.A reação foi realizada até obter a hidrólise máxima (~100%).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como é possível observar na Figura 1A, a demonstração do comportamento da hidrólise de leite bovino desnatado (LBD) e do leite sintético (LS) através da utilização de enzima livre (EL) e enzima imobilizada (EI). A hidrólise da lactose utilizando da EL teve tempos inferiores de 22h com 97,43% de hidrólise para o LBD, e 99,86% de hidrólise para o LS, essa pequena diferença pode estar ligada a gordura e proteína que no LBD apresenta. O mesmo é observado para a EI, 41h e 42 h de hidrólise, para LS e LBD respectivamente.

A enzima imobilizada apresentou maior tempo de hidrólise em comparação a enzima livre. A diferença entre os tempo de hidrólise pode estar relacionada ao processo de troca difusional da enzima e mobilidade das ligações enzima-substrato, considerando que a imobilização ocorreu por ligação covalente, a enzima pode se ligar aos pequenos espaços vazios do suporte (Barbosa et al., 2015), o que dificulta a hidrólise da lactose. Já a EL é totalmente livre no meio sem ligação com suporte ou com qualquer outro material.

Figura 1A – Hidrólise da lactose em meio sintético e leite bovino desnatado, com enzima livre e enzima imobilizada.

LBD – EL: Leite Bovino Desnatado – Enzima Livre; LS – EL: Leite Sintético – Enzima Livre; LS – EI: Leite Sintético – Enzima Imobilizada; LBD – EI: Leite Bovino Desnatado – Enzima Imobilizada.

Fonte: Autor, 2019.

Durante o processo de imobilização, a β-galactosidase pode formar ligações covalentes multipontos com seu suporte de imobilização através da reação com as partes da quitosana reticulada (Rodrigues et al., 2013), diminuindo a capacidade de estabelecer um complexo enzima-substrato (Wahba, 2018) e, logo, a capacidade de hidrólise.

A hidrólise da lactose pela β-galactosidase já é uma tecnologia difundida nas indústrias de laticínios para reduzir o teor de lactose do leite e de seus derivados (KLEIN et al., 2013).

A imobilização é utilizada para melhorar as propriedades da enzima, como atividade, estabilidade, seletividade, especificidade, inibição, resistência a produtos químicos e pureza (Barbosa et al., 2015), além da possiblidade de recuperação e reutilização de catalisadores, além da melhoria de sistemas que utilizam micro-organismos ou enzimas livres (Hettiarachchy et al., 2018).

O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 1B, maior tempo necessário para a hidrólise com a EI. O LBI necessitou de um maior tempo de hidrólise possivelmente em função do diferente teor de gordura e maior teor de lactose, no qual foi evidenciado que quando é realizado o desnate do leite ocorre também uma pequena diminuição do teor de lactose, visto que ele é incorporado junto com a gordura. Esta existe como glóbulos de gordura no leite cercado por uma parte interna monocamada fosfolipídica e uma complexa bicamada lipídica, denominada membrana globular da gordura do leite (DEWETTINCK et al. 2008), que com a atuação da força centrífuga ocorre a separação da gordura do leite quando realizado a centrifugação.

Figura 1B –Hidrólise da lactose em meio sintético e leite bovino integral, com enzima livre e enzima imobilizada.

LBI – EL: Leite Bovino Integral – Enzima Livre; LS – EL: Leite Sintético – Enzima Livre; LS – EI: Leite Sintético – Enzima Imobilizada; LBI – EI: Leite Bovino Integral – Enzima Imobilizada.

Fonte: Autor, 2019.

As enzimas são catalisadores eficazes em condições de operação moderadas, usadas em reatores convencionais, com economias consideráveis ​​em termos de custos de investimento e operação, em acordo com os princípios da química sustentável (ILLANES; WILSON; VERA, 2018; SHELDON, 2011). Com isso é necessário levar em consideração que a temperatura ótima para atuação desta enzima em questão é de 37 °C, mas sua aplicação nesta temperatura correspondente no qual sua atividade é máxima alcançará o objetivo inicial no qual é hidrolisar o leite, mas para produção de um produto as características da matéria prima já estão alteradas, principalmente em parâmetros de qualidade do leite.

 O ensaio utilizando leite ovino desnatado (LOD) e leite ovino integral (LOI), Figura 1C e Figura 1D, 40 h e 43 h respectivamente, para hidrólise utilizando EI, é facilmente observado a interferência que o teor de gordura tem sobre a hidrólise ao utilizar EI. Já para a EL o tempo foi inferior, 21 e 22 h, para LOD e LOI respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para o LS, períodos mais curtos para EL e o inverso para a EI.

Figura 1C– Comportamento cinético da hidrólise da lactose em meio sintético e leite ovino desnatado, com enzima livre e enzima imobilizada.

LOD – EL: Leite Ovino Desnatado – Enzima Livre; LS – EL: Leite Sintético – Enzima Livre; LS – EI: Leite Sintético – Enzima Imobilizada; LOD – EI: Leite Ovino Desnatado – Enzima Imobilizada.

Fonte: Autor, 2019.

Figura 1D – Comportamento cinético da hidrólise da lactose em meio sintético e leite ovino integral, com enzima livre e enzima imobilizada.

LOI – EL: Leite Ovino Integral – Enzima Livre; LS – EL: Leite Sintético – Enzima Livre; LS – EI: Leite Sintético – Enzima Imobilizada; LOI – EI: Leite Ovino Integral – Enzima Imobilizada.

Fonte: Autor, 2019.

Como podemos observar a EI atuou em todos em ensaios realizados, o que leva a crer que o seu sítio ativo ainda não está sobrecarregado, possibilitando assim sua reutilização, com hidrólise possivelmente mais lenta principalmente para aquelas utilizadas em leite integral.

Os LOI e LOD não apresentaram diferença utilizando a EI, possivelmente devido este leite apresentar a gordura de forma mais dispersa no meio e com tamanhos menores dos

glóbulos de gordura (Balthazar et al., 2017a) não interferindo no processo de hidrólise.

O LOD e LBI não apresentaram diferença da hidrólise da lactose com relação ao LS, porém necessitaram de diferentes tempos para atingir os valores de hidrólise, sendo o LBI a maior demanda. Foi evidenciando que o teor de gordura tem influência sobre o tempo de hidrólise, visto que o LS é composto de uma solução de lactose tamponada e enzima β-galactosidase, necessitando de um menor tempo de hidrólise para a EI. O meio sintético foi utilizado de forma a prever o comportamento ideal com menos interferências possíveis do

meio. Os leites no geral possuem gordura, minerais, proteína e outros compostos que podem limitar a hidrólise da lactose. O tempo de hidrólise está relacionado as características de cada matriz láctea. NO leite ovino se destaca a capacidade tamponante, diferenças na solubilidade de sais e proteínas. (Tribst et al., 2019).

**CONCLUSÕES**

A aplicação da enzima β-galactosidase de Kluyveromyces lactis imobilizada para hidrólise da lactose em leite bovino e ovino mostrou-se viável, independente da matriz láctea e dos teores de gordura, o que são fatores bastante interessantes a indústria. O teor de gordura e o tipo de leite tem influência sobre o tempo de hidrólise da lactose. A composição do leite ovino tem direta atuação sobre o processo de hidrólise.

**REFERÊNCIAS**

BALTHAZAR, C.F.; PIMENTEL, T.C.; FERRÃO, L.L.; ALMADA, C.N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A.M.; NASCIMENTO, J.S.; SILVA, M.C.; FREITAS, M.Q.; SANT’ANA, A.S.; GRANATO, D.; CRUZ, A.G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food

Development. **Comprehensive Reviewsin Food Science and Food Safety**, v.16, n.2, p. 247-262, 2017.

BELLÉ, A.S.; HACKENHAAR, C.R.; SPOLIDORO, L.S.; RODRIGUES, E.; KLEIN,M.P.; HERTZ, P.F. “Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (Genipa americana L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels”. **Food Chemistry**, v. 246, p. 266–274, 2018.

CHENG, S.; HUMMEL, M.; DAHAL, B.; GU, Z.; KHAREL, P.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S.I. Um processo de duas etapas para a síntese de xarope adoçante a partir de lactose aquosa. **LWT**, v. 117, 108659,p. 1-9, 2020.

CLAEYS, W.L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188–201, 2014.

DEWETTINCK, K.; ROMBAUT, R.; THIENPONT, N.; LE, T.T.; MESSENS, K.; CAMP, J. V. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v.18, n.5, p. 436–457 2008.

DUARTE, L.S.; DA SCHÖFFER, J.; LORENZONI, A.S.G.; RODRIGUES, R.C.; RODRIGUES, E.; HERTZ, P.F. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β-galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 96–103, 2017.

DOUËLLOU T.; MONTEL, M.C.; THEVENOT SERGENTET, D. Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.5, p.3348-3359, 2017.

FACIN, B.R.; MORET, B.; BARETTA, D.; BELFIORE, L. A.; PAULINO, A.T. Immobilization and controlled release of β-galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, v.179, p. 44 – 51, 2015.

GUETOUACHE, M.;  GUESSAS, B.; MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. Issues in **Biological Sciences and Pharmaceutical Research-IBSPR**, v. 2, n. 10, p. 115 – 122, 2014.

ILLANES, A.; WILSON, L.; VERA, C. Technical Biocatalysis, In: Williams, G.; Hall, M. (Eds.), Modern Biocatalysis: Advances Towards Synthetic Biological Systems, **Royal Society of Chemistry**, p. 473–515, 2018.

KLEIN, M.P.; FALLAVENA, L.P.; SCHÖFFER, J. DA N.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C.; NINOW, J.L.; HERTZ, P.F. High stability of immobilized β-d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n.1, p.465–470, 2013.

LIU, P.; XIE, J.; LIU, J.; OUYANG, J. Uma nova β-galactosidase termoestável de Bacillus coagulans com excelente capacidade de hidrólise para lactose no soro de leite. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9740-9748, 2019*.*

LIU, H.; LIU, J.; TAN, B.; ZHOU, F.; QIN, Y.; YANG, R. Covalent immobilization of Kluyveromyces fragilis b-galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide.  **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p. 1287 – 1295, 2012.

NATH, A.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Production, purification, characterization, immobilization, and application of β-galactosidase: a review. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 9, p.330–348, 2014.

OLAOSEBIKAN, A.O.; DAVID, S.A.; ADEKUNLE, M.A. Solução numérica de modelo de fluxo de dispersão em estado estacionário para a hidrólise de lactose-lactase com diferentes cinéticas em leito fixo. **Journal of Engineering Science and Technology**, v.5, p. 190 – 212, 2010.

RICARDI; R.C.; MENEZES, E.W.; BENVENUTTI, E.V.; SCHÖFFER, J.N.; HACKENHAAR, C.R.; HERTZ, P.F.; COSTA, T.M.H. Highly stable novel silica/chitosan support for β-galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v. 246, p. 343 – 350, 2017.

SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v.15, p. 213–233, 2012.

WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B.A. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. In: Chapter 3: Milk and dairy product composition. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome, p. 41 – 90, 2013.