

**UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP**

**OBTENÇÃO DE LEITE COM BAIXO TEOR DE LACTOSE UTILIZANDO**  
**MATRIZES HIDROFÓBICAS**

Autor(a): Acenini Lima Balieiro

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cleide Mara Faria Soares

Prof<sup>o</sup>. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof<sup>a</sup>. Dra. Odélsia Leonor Sanchez de Alsina

ARACAJU, SE - BRASIL  
ABRIL DE 2015

OBTENÇÃO DE LEITE COM BAIXO TEOR DE LACTOSE UTILIZANDO MATRIZES  
HIDROFÓBICAS

Acenini Lima Balieiro

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE  
PROCESSOS

Aprovada por:

---

Dra. Cleide Mara Faria Soares  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Dr. Álvaro Silva Lima  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Dra. Odélsia Leonor Sanchez de Alsina  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Dr. Cesar Costapinto Santana  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Dra. Rebeca Yndira Cabrera Padilla  
Universidade Tiradentes (UNIT)

---

Dra. Lisiane dos Santos Freitas  
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

---

Dra. Rita de Cássia Bergamasco  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

ARACAJU, SE-BRASIL  
ABRIL DE 2015

---

B186o Balieiro, Acenini Lima

Obtenção de leite com baixo teor de lactose utilizando matrizes hidrofóbicas. / Acenini Lima Balieiro. orientação [de] Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cleide Mara Faria Soares, Prof. Dr. Álvaro Silva Lima, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Odélsia Leonor Sanchez de Alsina. – Aracaju: UNIT, 2014.

165 il.: 23cm

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Engenharia de processos)

1.Lactose-intolerância. 2. Leite fresco-PIM/MP. 3. Capacidade de adsorção. I. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.) II. Lima, Álvaro Silva. (orient.) III. Alsina, Odélsia Leonor Sanchez de. (orient.) IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

---

CDU:66.098

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à Deus, pela fé que me mantém  
viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo.

À meus pais Ana Lúcia e Ilson, pelo apoio,  
encorajamento, amor e  
pelos ensinamentos que formaram os  
alicerces de minha história e que entenderam  
minha ausência nos muitos momentos de  
confraternização e alegria .

Aos meus irmãos Chara e Salmus e o mais novo  
membro da família, meu sobrinho Ravi, titia te  
ama.

Ao meu namorado Rayneldes, por todo  
apoio, amor, compreensão e pela  
companhia ao longo da trajetória que me  
levou à concretização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, Ana Lúcia e Ison, aos Meus Irmãos, Chara e Salmus e sobrinho, Ravi, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Meu agradecimento mais especial e profundo ao meu namorado Rayneldes, por estar o tempo todo ao meu lado, incondicionalmente, nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos.

Aos meus orientadores e amigos, Prof<sup>a</sup> Cleide Mara Faria Soares, Prof<sup>o</sup> Álvaro Silva Lima e a Prof<sup>o</sup> Odélsia Leonor Sanches de Alsina, Prof<sup>a</sup> Lisiane Santos, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Pesquisa e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositaram, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases desse trabalho.

Não posso deixar de agradecer a Profa. Dra. Suzana Ferreira-Dias por ter me recebido e auxiliado durante o período do doutorado sanduíche no Instituto Superior de Agronomia na Universidade de Lisboa; e aos meus companheiros que me apoiaram durante esse mesmo período em Portugal.

Aos meus amigos de Laboratório (Rafaela, Dheine, Vanessa, Taynara, Nayara, Anderson, Jaci, Kenia, Acácia, Roneval, Poliane), o obrigado pela amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

O presente trabalho foi realizado como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES- Brasil. Agradeço esta instituição pelo apoio financeiro e, principalmente pelo interesse nesse estudo.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos.

## OBTENÇÃO DE LEITE COM BAIXO TEOR DE LACTOSE UTILIZANDO MATRIZES HIDROFÓBICAS

Acenini Lima Balieiro

No Brasil, cerca de 25-30% da população tem algum grau de intolerância à lactose, esse distúrbio está relacionado com a incapacidade do organismo para digerir a lactose, devido a deficiência ou ausência da enzima lactase. O objetivo deste estudo é avaliar o desempenho de adsorção de lactose do leite fresco, utilizando uma coluna de leito fixo recheada com partículas compostas por polímeros impressos molecularmente (PIM) e matriz pura (MP), afim de utilizar este leite para a elaboração de bebida láctea com baixo teor de lactose saborizada com polpa de mangaba. As partículas composta por MP e PIMs utilizadas no recheio da coluna de adsorção, foram caracterizadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica (calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica), Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), distribuição do tamanho dos poros pelo método Brunauer, Emmet e Teller (BET). A dinâmica da coluna de adsorção e desempenho foram estudados através das curvas de ruptura mediante um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , cuja variável dependente foi a capacidade de adsorção e as variáveis independentes foram a vazão, altura do leito, temperatura e granulometria. A vazão foi a variável significativa ao nível de 95% na capacidade de adsorção de lactose em colunas recheadas por MP e PIM enquanto que a temperatura, altura do leito e o tamanho das partículas, não foram significativas. A maior capacidade de adsorção foi de 62,21 mg/g com o PIM, obtido a temperatura de 34 °C e altura do leito de 12,5 cm, seguido pelas condições do ponto central (47 °C, 9 mL/min, 10 cm de altura do leito e cerca de de 60 mesh granulometria) com o valor médio de  $50,9 \pm 1,5$  mg/g. Os produtos obtidos foram analisados sensorialmente. O que apresentou melhor resultado sensorial foi à bebida láctea saborizada com mangaba com leite percolado em coluna de leito fixo recheada com partículas MP, na qual cerca de 84% dos provadores indicaram que comprariam o novo produto. A bebida láctea utilizando o leite percolado na coluna recheada com os polímeros impressos molecularmente (PIM) em processo contínuo apresentou uma maior redução de lactose no produto final, atingindo cerca de 99,04% para a bebida sem adição de polpa de fruta e, 98,96 % para a bebida com 15% de polpa de mangaba.

**Palavras chave:** capacidade de adsorção, lactose, polímero impresso molecularmente.

Abstract of Thesis presented to the Process Engineering Graduate Program at the University Tiradentes as part of the requirements for the degree of Doctor in Process Engineering

## OBTENTION MILK WITH LOW LACTOSE CONTENT USING HYDROPHOBIC MATRIX

Acenini Lima Balieiro

In Brazil, about 25-30% of the population has some degree of lactose intolerance, this disorder is related to the body's inability to digest lactose due to deficiency or absence of the enzyme lactase. The aim of this study is to evaluate the lactose adsorption performance of fresh milk, using a fixed-bed column packed with particles composed of molecularly imprinted polymers (MIP) and pure matrix (MP) in order to use this milk to elaborate dairy beverage low in lactose flavored with mangaba pulp. The particles composed of MP and PIMs for the packed bed of the adsorption column were characterized using scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis (differential scanning calorimetry and thermal gravimetric analysis), Fourier Transform Infrared (FTIR), pore size distribution by Brunauer, Emmett and Teller (BET) method. The dynamics and performance of the adsorption column was studied by means of the breakthrough curves through a fractional factorial design 2<sup>4</sup>-1. The adsorption capacity was the dependent variable whereas the independent variables were the flow rate, bed height, temperature and particle size. The flow rate was a significant variable at a 95% level in lactose adsorption capacity in packed columns by MP and MIP whereas the temperature, bed height and particle size were not significant. The highest adsorption capacity was 62.21 mg/g obtained at a temperature of 34 °C and the MIP height with of 12.5 cm, followed by the results at the center point (47 °C, 9 mL/min, 10 cm bed height and about 60 mesh particle size) with the mean value of 50.9±1.5 mg/g. The products obtained were analyzed sensory. The dairy beverage flavored with mangaba, obtained by percolating milk through the fixed bed column with MP particles, presented the best sensory result: about 84% of the panelists indicated they would buy the new product. The dairy beverage obtained by percolating milk in column packed with molecularly imprinted polymers (MIP) in a continuous process showed a greater reduction of lactose in the end product: 99.04% with no addition of fruit pulp, and 98.96% with addition of 15% mangaba pulp.

**Keywords:** adsorption capacity, lactose, molecularly imprinted polymer.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. Produção de leite</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. Propriedades físico-químicas da lactose.....	22
3.2.2. Intolerância à lactose .....	24
3.2.3. Produtos com baixo teor de lactose .....	25
<b>3.3. Tecnologias aplicadas para obtenção de produtos lácteos sem lactose</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4. Adsorção</b> .....	<b>36</b>
3.4.1. Adsorção em coluna de leito fixo.....	37
<b>3.5. Tecnologia de Polímeros de Impressão Molecular (PIM)</b> .....	<b>39</b>
3.5.1 Caracterização do adsorvente .....	47
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1. Material</b> .....	<b>50</b>
4.1.1. Reagentes analíticos .....	50
4.1.2. Leite.....	50
4.1.3. Polpa de fruta.....	50
4.1.4. Grãos de kefir .....	50
4.2.2. Preparação dos adsorventes.....	51
4.2.3. Avaliação da remoção de lactose em coluna de leito fixo no processo em batelada (Ensaio Preliminares) .....	52
4.2.4. Avaliação da remoção de lactose em coluna de leito fixo em fluxo contínuo (ensaio preliminar).....	53
4.2.5. Adsorção em coluna de leito fixo.....	54
4.2.6 Modelagem da dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo.....	55
4.2.6.1 Modelo de Força Motriz Linear com Isoterma de Equilíbrio Linear .....	56
4.2.6.2 Modelo de Bohart e Adams.....	57
4.2.7 Processo fermentativo para elaboração da bebida láctea .....	58
<b>4.3. Métodos analíticos e análise sensorial</b> .....	<b>59</b>
4.3.1. Determinação da concentração de lactose.....	59
4.3.2. Caracterização físico-química do leite tipo C, leite com baixo teor de lactose e das bebidas lácteas fermentadas .....	59



<b>4.3.2.1. Determinação de cinzas.....</b>	<b>60</b>
4.3.2.2. Determinação de umidade .....	60
4.3.2.3. Determinação da acidez total titulável.....	60
4.3.2.4. Determinação de proteínas pelo método de Micro-Kjeldahl.....	60
4.3.2.5. Determinação de lipídeos .....	60
4.3.2.6. Determinação do pH.....	61
4.3.2.7. Determinação da concentração de carboidrato .....	61
4.3.2.8. Determinação de energia .....	61
4.3.2.9. Determinação de açúcares redutores.....	61
4.3.2.10. Determinação de açúcares redutores totais.....	62
4.3.2.11. Viscosidade.....	62
4.3.3. Análise microbiológica.....	62
4.3.3.1. Contagem de Coliformes Totais e Termo Tolerante .....	62
4.3.3.2. Detecção de <i>Salmonella</i> .....	63
4.3.4. Análise sensorial.....	63
4.3.5. Análise Estatística .....	64
<b>4.4. Métodos de caracterização morfológica e físico-química do leite .....</b>	<b>64</b>
4.4.1. Caracterização físico-química das matrizes (PIM e MP).....	65
4.4.2. Caracterização morfológica das matrizes.....	65
4.4.2.1. Determinação de densidade e porosidade do leite .....	66
4.4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
4.4.2.3. Caracterização Física em B.E.T. (BRUNAUER-EMMETT-TELLER) .....	67
<b>4.5. Produção de Lipídios Estruturados (LE).....</b>	<b>67</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1. Estudo da Solubilidade da Lactose.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2. Estudo da remoção de lactose em sistema batelada.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3. Remoção de Lactose em Fluxo Contínuo.....</b>	<b>72</b>
<b>5.4. Análise morfológica e físico-química dos polímeros.....</b>	<b>74</b>
5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	74
5.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) .....	76
5.4.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	79
5.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	81
5.4.5. Análise morfológica dos polímeros por B.E.T.....	82
<b>5.5. Adsorção de lactose do leite em coluna de leite fixo .....</b>	<b>84</b>

<b>5.6. Modelagem da dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo.....</b>	<b>89</b>
<b>5.6.1. Modelo de Força Motriz Linear com isoterma de Equilíbrio Linear.....</b>	<b>89</b>
5.6.2. Modelo de Bohart-Adams .....	92
<b>5.7. Caracterização do leite sem e com remoção de lactose do leite.....</b>	<b>95</b>
<b>5.7.1. Análises da composição centesimal do leite com baixo teor de lactose.....</b>	<b>95</b>
5.7.2. Caracterização microbiológica do leite sem e com remoção de lactose .....	97
5.7.3. Análise sensorial do leite com baixo teor de lactose.....	98
<b>5.8. Caracterização da bebida láctea utilizando leite com baixo teor de lactose com e sem adição de polpa de fruta .....</b>	<b>101</b>
5.8.1. Composição centesimal da bebida láctea sem polpa de mangaba.....	102
5.8.2. Caracterização microbiológica das bebidas lácteas sem e com polpa de mangaba.....	105
5.8.3. Viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir .....	106
5.8.4. Análise sensorial de aceitação e intenção de compra para as bebidas lácteas.....	108
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>118</b>
<b>8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO 4.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO 5.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO 6.....</b>	<b>149</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Localização do território do Alto Sertão Sergipano. ....	21
Figura 3.2: Estrutura da lactose (4-O-( $\beta$ -D-galactopiranozil)-D-glicose).....	23
Figura 3.3: Aplicação do Processo de Separação por Membranas (PSM) para separação dos componentes do leite em função do seu tamanho. ....	30
Figura 3.4: Esquema ilustrativo da curva de ruptura (Breakthroughs) em coluna de leite fixo. ....	37
Figura 3.5: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular. ....	40
Figura 4.1: Unidade experimental de adsorção de lactose: (1) Reservatório de alimentação; (2) Bomba peristáltica; (3) Coluna de vidro encamisada contendo o adsorvente; (4) Reservatório para coleta do efluente (leite com baixo teor de lactose). ....	52
Figura 4.2: Unidade experimental de adsorção de lactose em ampliação de escala. (1) Reservatório de alimentação (Leite Tipo C); (2) Bomba dosadora peristáltica; (3) Coluna de vidro contendo o adsorvente; (4) Reservatório para coleta do efluente (leite com baixo teor de lactose).....	55
Figura 5.1: Curvas de remoção de lactose da solução sintética comparado com ensaio em coluna recheada de MP e PIM nas diferentes alturas do leite. ....	71
Figura 5.2: Curvas de remoção de lactose do leite comparado com ensaio em coluna recheada de MP e PIM nas diferentes alturas do leite. ....	71
Figura 5.3: Curva de ruptura na adsorção de lactose do leite em coluna de leite fixo, utilizando como adsorvente Matriz Pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM). 73	
Figura 5.4: Espectros de FTIR do padrão de lactose (LAC), matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM), polímero impresso molecularmente sem remoção de lactose (PIM-LAC). ....	75
Figura 5.5: Curvas TG e DTA do padrão de lactose, analisadas em atmosferas de N <sub>2</sub> .....	77
Figura 5.6: Curvas de TGA em atmosferas de N <sub>2</sub> de matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM), polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC).....	78
Figura 5.7: Curvas de DSC em atmosfera inerte de N <sub>2</sub> para o padrão de lactose (LAC), matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC), polímero impresso molecularmente (PIM).....	80
Figura 5.8: Micrografias das seguintes amostras: (a) Lactose-LAC; (b) Matriz Pura-MP; (c) Polímero Impresso Molecularmente com Lactose-PIM-LAC; (d) Polímero Impresso Molecularmente- PIM. Aumento x 5000.....	82
Figura 5.9: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a adsorção de lactose em coluna de leite fixo utilizando MP. ....	86
Figura 5.10: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a adsorção de lactose em coluna de leite fixo utilizando PIM.....	86
Figura 5.11: Superfície de resposta mostrando a capacidade máxima de adsorção em relação a vazão utilizando: (a) matriz pura (MP) e (b) polímero impresso molecularmente (PIM). ....	87
Figura 5.12: Curva de ruptura para a adsorção de lactose em coluna de leite fixo utilizando MP (a) e PIM (b) nos ensaios E5 (T= 34 °C;G= 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min); E7 (T=	

34 °C, G= 500 um; h= 12,5 cm; Q= 3 mL/min e E10 (T= 47 °C; G= 355 um; h= 10 cm; Q= 6 mL/min).....	88
Figura 5.13: Curvas de ruptura obtidas experimentalmente e ajustadas pelo modelo de Força Motriz Linear (FIL), para as condições experimentais do (a) E1 (T= 34°C; 250 um; h= 7,5 cm; Q= 3 mL/min), (b) E2 (T= 60°C; 250 um; h= 7,5 cm; Q= 9 mL/min), (c) E5 (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) (d) E6 (T = 60°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 3 mL/min) utilizando o adsorvente PIM e (e) E5* MP (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) utilizando o adsorvente MP. ....	91
Figura 5.14: Curvas de ruptura obtidas experimentalmente e ajustadas pelo modelo B-A, para as condições experimentais do (a) E1 (T= 34°C; 250 um; h= 7,5 cm; Q= 3 mL/min), (b) E2 (T= 60°C; 250 um; h=7,5 cm; Q= 9 mL/min), (c) E5 (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) (d) E6 (T = 60°C; 250 um; h=12,5 cm; Q =3 mL/min) utilizando o adsorvente PIM e (e) E5* MP (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) utilizando o adsorvente MP. ....	94
Figura 5.15: Percentual de intenção de compra para o leite padrão integral e os leites com ..... remoção parcial de lactose.....	100
Figura 5.16: Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas sem polpa de mangaba. ....	112
Figura 5.17: Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas com polpa de mangaba. ....	113

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Propriedades físicas e químicas da $\alpha$ - e $\beta$ -lactose. ....	22
Tabela 3.2: Tipos de monômeros funcionais usados para preparação dos moldes utilizados na impressão molecular da molécula alvo. ....	42
Tabela 3.3: Exemplos de analitos estudados por impressão molecular presentes no leite. ....	44
Tabela 4.1: Matriz codificada e decodificada de planejamento fatorial incompleto $2^{4-1}$ para estudar a capacidade de adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo utilizando MP e PIM. ....	54
Tabela 4.2: Variáveis de operação para avaliar a dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo. ....	56
Tabela 5.1: Solubilidade da lactose a diferentes temperaturas. ....	69
Tabela 5.2: Propriedades da coluna de leito fixo com Matriz Pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM) em coluna ampliada. ....	72
Tabela 5.3: Avaliação dos parâmetros estruturais de adsorção-dessorção de nitrogênio para matriz pura (MP) e os polímeros impressos molecularmente PIM e PIM-LAC. ....	83
Tabela 5.4: Matriz decodificada de planejamento fatorial incompleto $2^{4-1}$ para estudar a capacidade de adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo utilizando MP e PIM. ....	84
Tabela 5.5: Valores da capacidade de adsorção e dos parâmetros do ajuste do modelo de Força Motriz Linear com Isoterma de Equilíbrio Linear. ....	90
Tabela 5.6: Parâmetros do modelo de Bohart-Adams ajustados aos dados experimentais. ....	93
Tabela 5.7: Composição centesimal do leite tipo C, com remoção de lactose utilizando MP e PIM. ....	95
Tabela 5.8: Resultado microbiológico do leite e com baixo teor de lactose. ....	98
Tabela 5.9: Média das notas do teste de diferença do padrão para o leite integral e com remoção de lactose MP e PIM. ....	98
Tabela 5.10: Notas para os atributos avaliados pelo teste de aceitação dos leites padrão integral e com remoção parcial de lactose. ....	99
Tabela 5.11: Composição físico-química das bebidas lácteas sem polpa de mangaba. ....	102
Tabela 5.12: Composição físico-química das bebidas lácteas com polpa de mangaba. ....	102
Tabela 5.13: Resultado microbiológico das bebidas lácteas sem e com polpa de mangaba. .	106
Tabela 5.14: Avaliação da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir. .	106
Tabela 5.15: Médias das notas seguidas do desvio padrão para os atributos avaliados pelo teste de aceitação para as bebidas lácteas fermentadas sem adição de polpa. ....	108
Tabela 5.16: Médias das notas seguidas do desvio padrão para os atributos avaliados pelo teste de aceitação para as bebidas lácteas fermentadas saborizadas com mangaba. ....	108
Tabela 5.17: Resultados do grau de aceitação das bebidas lácteas sem polpa da mangaba. .	111
Tabela 5.18: Resultados do grau de aceitação das bebidas lácteas com adição de polpa de mangaba. ....	111

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g/L}$  - Micrograma/litro  
 $\mu\text{g/mL}$  - Micrograma/mililitro  
 $\mu\text{m}$  - Micrômetro  
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
AC - Cromatografia de afinidade  
 $\text{Al}^{+3}$  - Alumínio  
ANOVA - Análise de Variância  
BET - Brunauer-Emmett-Teller  
BS - Bismuto Sulfito  
 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  - Fórmula molecular da lactose  
 $C_a$  - Concentração final  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
cm - Centímetros  
 $C_o$  - Concentração inicial  
Da - Daltons  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura  
EC - *Escherichia coli*  
EGDMA - Dimetilcrilato Etilenoglicol  
ELSD - *Evaporative Light Scattering Detector* ou Deterctor por Espalhamento de luz Evaporativo  
FRP - *Free Radical Polymerization* ou Polimerização por Radicais Livres  
FTIR - Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier  
GSCR/MIP - *Graphene sheets/Congo red-molecular imprinted polymers* ou Folhas de Grafeno e Polímeros Impressos Moleculares com Vermelho de Congo  
HCl - Ácido clorídrico  
HE - Enterico de Hectoem  
HIC - Cromatografia de Interação Hidrofóbica  
ITP - Instituto de Tecnologia e Pesquisa  
KBr - Brometo de Potássio  
KOH - Hidróxido de Potássio  
LAC - Lactose  
LIA - Agar Lisina Ferro  
LPA - Laboratório de Tecnologia e Pesquisa  
LST - Lauril Sulfato Triptose  
LTDA - Limitada  
 $\text{m}^2/\text{g}$  - Metro ao quadrado/grama  
MAA - Ácido Metacrílico  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
MISPE - Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa ou *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*  
 $\text{mL/g}$  - Mililitro/grama  
MP - Matriz Pura  
N - Normalidade  
NF - Nanofiltração  
NIP - *Non imprinted polymer* ou Polímero não-impresso  
nm - Nanômetros  
NMP - Número Mais Provavel

pH - Potencial Hidrogeniônico  
PIM - Polímero Impresso Molecularmente  
PIM/LAC - Polímero Impresso Molecularmente com lactose  
PSM - Processo de Separação por Membranas  
Q - Vazão  
 $q_0$  - Capacidade de adsorção  
rpm - Rotação por minuto  
Si - Silício  
SPE - Extração em Fase Sólida  
T (°C) - Temperatura  
TEOS - Tetraetilortossilicato  
TGA - Análise termogravimétrica  
TSI - Tríplíce Açúcar Ferro  
UFC - Unidades Formadoras de Colônias  
UHT - *Ultra High Temperature* ou Ultra Alta Temperatura  
VB - Verde Brilhante  
XLD - Xilose Lisina Desoxicolato

## 1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados exerce um importante papel para a economia brasileira, segundo dados do IBGE, encerrado o ano de 2013 com uma produção total de aproximadamente 36,75 bilhões de litros de leite. Para 2014, o volume deve subir para 38,59 bilhões de litros, um avanço de 5% (AGRODEBATE, 2013). No Estado de Sergipe a produção de leite tem crescido nos últimos anos significativamente, e como consequência, aumenta sua participação na produção de leite nacional de 0,52% para 0,96% (SÁ, 2012). As indústrias e cooperativas de Sergipe estão concentrando sua produção em queijos, manteiga, requeijão e bebidas lácteas.

O setor agroalimentar está em constante necessidade de aperfeiçoamento e obtenção de novas tecnologias que pode ser usadas para a obtenção de alimentos diferenciados a fim de atender o perfil de consumidores que possuem algum tipo de restrição, como por exemplo, intolerância à lactose. Recentemente, a indústria de laticínios tem dado especial atenção ao desenvolvimento destes novos produtos, dentre os quais se pode incluir produtos lácteos livres de lactose ou com lactose reduzida. Esses novos derivados lácteos são de interesse comercial especial, já que mais de 50% da população mundial apresenta condição de intolerância à lactose. (DURING *et al.*, 1998). No Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino. A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir lactose (principal carboidrato do leite), resultado da deficiência ou ausência da enzima intestinal chamada  $\beta$ -galactosidase ou, simplesmente, lactase. Existem no mercado produtos alternativos, com reduzidos teores de lactose, capazes de suprir as necessidades nutricionais desses pacientes (MATTAR; MAZO, 2010). Entre esses produtos podemos destacar os iogurtes, queijos duros e leites processados com baixos teores de lactose. Entretanto, as tecnologias de obtenção de leite e derivados com baixo teor de lactose baseiam-se em tratamento do leite com  $\beta$ -galactosidase, aplicação de tecnologia de membrana e redução da lactose do leite por meio de métodos cromatográficos (HARJU *et al.*, 2012).

A literatura relata a associação da nanotecnologia para remover uma série de substâncias como metais, hormônios, pesticidas, antibióticos e drogas do leite utilizando a técnica de impressão molecular. Dentro desse contexto, percebeu-se a possibilidade do uso da nanotecnologia por meio de técnica denominada “impressão molecular” para a obtenção de leite com baixo teor de lactose.



A impressão molecular é uma tecnologia emergente que permite sintetizar os materiais com receptores altamente específicos com as moléculas-alvo. É uma rede polimérica reticulada que pode se ligar a uma determinada molécula alvo com alta especificidade. Os polímeros são preparados na presença da molécula alvo utilizada como o modelo e posterior remoção do molde a partir da técnica sol-gel, obtendo assim um material polimérico com “sítios memoriais”. Sendo assim, metodologia similar pode ser aplicada na remoção de lactose do leite utilizando a técnica de impressão molecular, onde os polímeros impressos molecularmente (PIM) serão a nanopartícula como meio de retenção especificamente da molécula de lactose. Na literatura utiliza-se o processo de adsorção para a retenção de inúmeras moléculas, neste método a mistura líquida ou gasosa entra em contato com um sólido (adsorvente) e um dos componentes da mistura (adsorbato) adere à superfície do sólido. Portanto, para um leito de partículas (recheio), um dos principais objetivos é promover o contato íntimo entre as fases envolvidas no processo (fase fluida líquida ou gasosa com a fase estacionária/partículas) (FELDER e ROUSSEAU, 2000).

Com o intuito de satisfazer as necessidades do consumidor, a indústria agro alimentar tem se preocupado em desenvolver produtos alimentares cada vez mais saudáveis e naturais, recorrendo a tecnologias limpas, como a fermentação, aliadas a nanotecnologia por exemplo. Por isso é importante ver a nanotecnologia como uma tecnologia que pode complementar as tecnologias convencionais e biotecnologia (SASTRY *et al.*, 2010). Neste enfoque, o grande interesse do consumidor por alimento saudável e pela busca da qualidade de vida, é realizado estudos para o desenvolvimento de diversos tipos de leites fermentados. Dentre as culturas iniciadoras utilizadas para a produção de leite fermentado, os grãos de kefir, ainda não são industrializados no Brasil. A definição do leite fermentado chamado kefir, é um produto resultante da fermentação do leite pelos grãos de kefir (GLIBOWSKI e KOWALSKA, 2012). Com base nos benefícios à saúde, no potencial de mercado de produtos obtidos utilizando grãos de kefir, e associado à produção anual de aproximadamente de 260 milhões de litros de leite no Estado de Sergipe em 2008 (IBGE, 2010), propõe-se neste trabalho o desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de lactose reduzido.

A adição de frutas regionais do Brasil na fabricação de iogurtes é uma fatia do mercado significativa para o comércio interno e externo. Afinal, a comercialização dessas frutas, anteriormente restrita a áreas locais, tem se expandido para centros metropolitanos, devido ao sabor exótico que contribui para o aumento de seu consumo. Dentre as diversas frutas produzidas no Brasil, especial atenção é dada às encontradas na região nordeste devido

às suas características exóticas. Pode-se citar mais especificamente no estado de Sergipe a mangaba (cuja árvore é o símbolo do estado), devido seu elevado potencial industrial para a produção de sucos, sorvetes e doces, e também é usada no preparo de bebidas fermentadas e bebidas geladas, além de geleias e sorvetes, ainda é muito pouco explorada, embora seus produtos elaborados artesanalmente tenham grande aceitação do consumidor na Região Nordeste do Brasil.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar na primeira etapa a adsorção de lactose do leite em leite fixo recheado por partículas compostas por polímeros impressos molecularmente (PIMs), utilizando um planejamento fatorial fracionário ( $2^{4-1}$ ) com o intuito de verificar a influência das variáveis operacionais (temperatura, vazão, tamanho de partícula e da altura do leite). Na segunda etapa foi estudar o comportamento morfológico e físico-químico destas partículas utilizando a análise de afinidade e especificidade de polímero impresso pela lactose antes e após o processo de adsorção. E na terceira etapa, foi desenvolver uma bebida láctea fermentada com adição de polpa de mangaba e com baixo teor de lactose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a técnica de impressão molecular em coluna de adsorção para obtenção de leite com baixo teor de lactose e seu emprego no desenvolvimento da bebida láctea fermentada por grãos de kefir.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Neste trabalho os objetivos específicos são:

1. Avaliar a capacidade de adsorção dos polímeros, matriz pura (MP) e polímeros impressos molecularmente (PIM), utilizando como ferramenta o planejamento de experimentos;
2. Estudar o comportamento morfológico e físico-químico das partículas dos polímeros, MP e PIM, pela análise da afinidade e especificidade do sistema;
3. Avaliar a modelagem matemática da coluna de adsorção com o intuito de representar a dinâmica de adsorção de lactose em coluna de leito fixo com matriz pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM);
4. Obter o leite com baixo teor de lactose utilizando o método de adsorção por meio de coluna de leito fixo recheado com matriz pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM);
5. Produzir uma bebida láctea fermentada utilizando o leite com baixo teor de lactose e empregando grãos de kefir como cultura iniciadora;
6. Determinar a composição físico-química, microbiológica e sensorial do leite com baixo teor de lactose e da bebida láctea fermentada;

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Produção de leite**

O leite, obtido em circunstâncias naturais, é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto ligeiramente adocicado. É um produto secretado pelas glândulas mamárias e é um alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir outras substâncias necessárias a sua subsistência (BEHMER, 1979). A legislação brasileira denomina leite, sem outra especificação, como sendo o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2001).

Sabendo-se que os principais países produtores de leite do mundo, de acordo com FAO (2010), são os Estados Unidos, Índia, China, Rússia e Brasil. A mesma fonte indica, que a produção mundial chegou a 599.438.003 toneladas de leite de vaca fresco, para um total de 264.470.504 cabeças, com uma produção de 2.266,6 kg por animal por ano. Os Estados Unidos, maior produtor mundial, produziram em 2010, 87.461.300 toneladas de leite, representando 14,6% da produção mundial, seguidos pela Índia com 8,4%, China com 6,0%, Rússia com 5,3% e pelo Brasil com uma produção de 31.667.600 toneladas de leite, representando 5,3% da produção mundial.

A pecuária de leite no Brasil, além de ter contribuído com R\$ 34,3 bilhões do PIB da Pecuária, tem apresentado crescimento médio de 5% ao ano, chegando a 32 bilhões em 2011 e estimativa de 33,7 bilhões de litros de leite para 2012. Esse percentual é maior que a média do aumento da produção mundial, o que mantém o Brasil em quinto lugar no ranking mundial de produção de leite, com grandes chances de superar a Rússia (4ª posição). O valor bruto da produção de leite em 2013, por exemplo, foi de R\$ 22,9 bilhões contribuindo para movimentar principalmente a economia das pequenas e médias cidades brasileiras (BRASIL, 2014). Conforme as estimativas para 2012 e 2013, esse valor deve superar 33 bilhões de litros e, em 10 anos, exceder a 38,18 bilhões de litros. Apesar deste aumento significativo, o Brasil não atingiu a expressividade de países como os Estados Unidos e Canadá, que têm produtividade de 8.226 e 7.472 litros/vaca/ano, respectivamente. No entanto, apresenta um grande potencial de crescimento de produção e produtividade de leite (IBGE, 2013).

O leite é produzido em todas as regiões do país, com crescente produção, exceto a região Norte que se mantém com a mesma produção, 1,7 bilhões de litros. A região Sudeste é a maior produtora, com 10,9 bilhões, seguida da região Sul com 9,6 bilhões de litros/ano. O

Centro Oeste responde por 14,5% do leite produzido com 4,4 bilhões de litros/ano e o Nordeste com 4,0 bilhões, representando 13% da produção nacional (ZOCCAL *et al.* 2012).

Nos estados nordestinos as bacias leiteiras deslocaram-se para as regiões semiáridas, sertão e agreste, sendo que estas têm como principal característica a forte presença da agricultura familiar. No Nordeste, o maior destaque foi o estado de Sergipe, pois, nesta unidade federativa o crescimento foi de 116,3%. Em Sergipe a produção de leite é oriunda, principalmente, da agricultura familiar e a produção está estimada em 231 milhões de litros por ano (IBGE, 2013). Os Estados de Pernambuco e Alagoas possuem o maior volume de leite produzido por área. Em todo Brasil estes estados só perdem para o Paraná e Santa Catarina (VILELA, 2011). Em Sergipe, especificamente, a atividade leiteira se desenvolveu principalmente no Sertão. O Alto Sertão Sergipano é composto por sete municípios sendo que todos estão incorporados ao Arranjo Produtivo Local (APL), são eles: Nossa Senhora da Glória, Monte Alegre, Canindé do São Francisco, Poço Redondo, Porto da Folha, Gararu e Nossa Senhora de Lourdes (ANDRADE, 2013). A Figura 3.1 apresenta a Localização do Território do Alto Sertão Sergipano no Estado de Sergipe.



**Figura 3.1:** Localização do território do Alto Sertão Sergipano.

### 3.2. Lactose

A lactose é o açúcar característico do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da matéria seca do leite. É quantitativamente o mais importante dos sólidos não graxos. A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical  $\beta$ -D-galactose e um radical D-

glicose sendo considerado um açúcar redutor, porque o carbono no grupo anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica. A fórmula molecular da lactose é  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , cuja a massa molar é de 342,29 g/mol. O nome sistemático da lactose é 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glicopiranosose (CAMPBELL, 2000).

O leite de vaca possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água. A concentração de lactose em bovinos, búfalos, ovinos e caprinos é cerca de 4,8; 4,7; 4,6 e 4,1%, respectivamente. A lactose serve para duas funções importantes: é uma fonte pronta de energia para o recém-nascido (que proporciona 30% do valor calórico de leite de bovino) e é responsável por cerca de 50% da pressão osmótica de leite, pois tem a característica de ser isotônica com o sangue. Para o leite com um baixo nível de lactose, a concentração de sais inorgânicos é elevada para manter a pressão osmótica no nível desejado (URASHIMA e SATO, 2004).

### 3.2.1. Propriedades físico-químicas da lactose

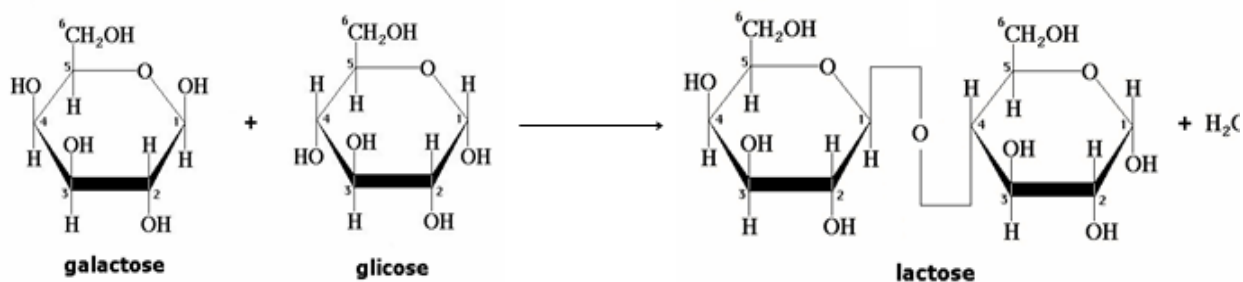
O sabor adocicado da lactose é baixo comparado com a sacarose (6 vezes menor que o da sacarose). Mantendo a comparação com outros açúcares a lactose possui uma solubilidade menor. A falta de domínio sobre técnicas de manipulação pode levar à cristalização da lactose proporcionando aspecto de arenosidade ao produto (ORDÓÑEZ, 2005). Comparando as propriedades das formas isoméricas  $\alpha$  e  $\beta$  da lactose observa-se a presença de átomos de carbono assimétricos opticamente ativos, portanto, quando em soluções desviam o plano vibracional da luz polarizada que os atravessa. A  $\alpha$  lactose e a  $\beta$  lactose diferem em sua rotação específica (FOX, 1997; ORDÓÑEZ, 2005; WALSTRA; JENNESS, 1984). A Tabela 3.1 relaciona as propriedades físicas e químicas das formas  $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose.

**Tabela 3.1:** Propriedades físicas e químicas da  $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose.

<b>Propriedades</b>	<b><math>\alpha</math>-lactose</b>	<b><math>\beta</math>-lactose</b>
Ponto de Fusão (°C)	201-202	253
Densidade (293 K), g/cm <sup>3</sup>	1,54	1,59
Forma cristalina	monoclínica esfenoidal	monoclínica
Entalpia de dissolução, J/g	-50,24	-9,62
Entalpia de combustão, J/g	-16,1	-16,5
pKa, a 3-5°C	13,8	13,5
Aparência	Pó branco	Pó branco
Odor	Inodoro	Inodoro

Fonte: (BRITO, 2007).

Do ponto de vista físico-químico, a lactose está presente no leite em estado molecular em solução verdadeira, com partículas de diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$  (LONGO, 2005). A lactose é composta por D-glicose e D-galactose, estando o grupo aldeído da galactose unido ao grupo C-4 da glicose mediante um enlace  $\beta$ -1-4-glicosídico (WALSTRA *et al.*, 2001). Na Figura 3.2 está apresentada a estrutura química da lactose.



**Figura 3.2:** Estrutura da lactose (4-O-( $\beta$ -D-galactopiranozil)-D-glicose).

A  $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose são solúveis em água na proporção de 70 e 500 g/L, respectivamente, à 20 °C; em equilíbrio, a proporção de  $\alpha$ : $\beta$  é cerca de 37:63, dando uma solubilidade total de cerca de 180 g/L a 20 °C. A solubilidade de  $\alpha$ -lactose é mais dependente da temperatura do que o anômero  $\beta$ -lactose e é mais solúvel a temperaturas acima de 93,5 °C. Assim,  $\alpha$ -lactose é a forma de lactose que cristaliza com temperaturas abaixo de 93,5 °C, além de ser a forma comercial usual de lactose; a  $\beta$ -lactose pode ser preparada por cristalização com temperaturas acima de 93,5°C (HOLSINGER, 1997). A lactose tem um nível de doçura de cerca de 20% da sacarose (JELEN e TOSSAVAINEN, 2008), destacando-se como um dos excipientes mais utilizados nos produtos alimentares, devido as seguintes características: rápida dissolução, boa compressibilidade, baixa reatividade química e não ser higroscópica. Ainda deve-se salientar que a utilização de lactose aumenta o volume do produto, mas não é verificado o aumento da doçura, podendo assim ser umas das alternativas para substituir parcialmente a sacarose (CURY *et al.*, 2007). A lactose apresenta capacidade de absorver aromas, isso faz com que ela acentue aromas naturais sem os tornar excessivamente doces, por exemplo. O fato de sofrer reação de *Maillard* confere a cor acastanhada, quando utilizada em produtos de panificação (THOMSEN *et al.*, 2005).

A lactose pode ocorrer em duas formas cristalinas nos produtos lácteos,  $\alpha$ -hidratada e  $\beta$ -anidra, ou como uma mistura vítrea amorfa de  $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose. A fórmula estrutural da  $\alpha$ -lactose pode ser convertida na forma estrutural  $\beta$ - por meio da mudança na posição da

hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor. A mudança rotacional e a transformação em solução de uma forma na outra é denominada mutarrotação. A ligação da glicose com a galactose pode ser rompida pela ação enzimática da  $\beta$ -galactosidase, que hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. A conversão é de considerável interesse, do ponto de vista tecnológico, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (PEREIRA *et al.* 2011).

A lactose é uma importante fonte de energia na dieta e pode facilitar a absorção do cálcio. Porém, o uso de lactose como fonte de energia está limitado pela porcentagem relativamente alta de pessoas intolerantes a lactose (VARNAM e SUTHERLAND, 1995). Observando o argumento descrito anteriormente, faz-se a necessidade de elaborar novos produtos lácteos sem lactose para atender o mercado constituído de indivíduos que sofrem com a intolerância à lactose.

### 3.2.2. Intolerância à lactose

A lactose é um dissacarídeo presente no leite de mamíferos. Na espécie humana, o processo de digestão da lactose é realizado pela  $\beta$ -galactosidase, comumente chamada de lactase (1). Esta enzima hidrolisa a molécula de lactose em dois monossacarídeos: a galactose e a glicose. A lactase encontra-se presente na extremidade das vilosidades da mucosa do intestino delgado e possui fundamental importância no metabolismo da lactose, uma vez que as moléculas de lactose intactas não são absorvidas pelas células intestinais (BRANNON *et al.*, 2010). A lactase é responsável pela hidrólise enzimática da ligação glicosídica  $\beta$ -1,4, originando como produto os monossacarídeos glicose e galactose, os quais são transportados do intestino delgado para corrente sanguínea (RANCIARO e TISHKOFF, 2010).

De acordo com a Resolução nº 205, de 17/11/2006 complementada pela resolução RDC nº 26, de 26/05/2009, a enzima lactase utilizada pela indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos fungos: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.*, geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Recognized as Safe*). A lactase produzida por fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) possui pH ótimo na faixa ácida de 2,5 a 4,5, enquanto a produzida por leveduras (*Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces sp.*) possui pH ótimo próximo à neutralidade (6,5 e 7,5). Essa característica é importante para os processos industriais, pois a escolha da fonte



da lactase deve estar de acordo com as necessidades impostas pela natureza do substrato e do produto (MORIWAC e MATIOLI, 2000).

Essa característica peculiar da enzima lactase possibilita seu uso na fermentação industrial da lactose por ação dos micro-organismos que a transforma em ácido láctico ocupando lugar de grande destaque, sendo utilizada para obtenção de vários derivados lácteos como iogurte, leite acidófilo, queijos, requeijões, ácidos lácticos e outros (ALBUQUERQUE, 1997).

A má digestão da lactose é evidenciada quando a quantidade de lactose ingerida não é totalmente digerida e absorvida, devido ao declínio na expressão da atividade da lactase na idade adulta (lactase não persistente ou deficiente). Quando a quantidade de lactose ingerida é maior do que a quantidade suportada pelo organismo, são evidenciados os sintomas de intolerância à lactose (IL) e o indivíduo passa a manifestar desconfortos gastrointestinais (WORTMANN *et al.*, 213).

A intolerância a lactose pode ser classificada como congênita, primária ou genética e secundária ou adquirida. A intolerância congênita acomete mais bebês por apresentarem deficiência de lactase jejunal tendo quadro de diarreia, quando amamentados ou quando consomem alimentos com lactose. A deficiência primária pode se desenvolver em qualquer idade e com diferentes grupos raciais, sendo a deficiência de lactase. A intolerância primária é, portanto, a deficiência de lactase que pode também ser chamada de hipolactasia tipo adulto ou deficiência hereditária de lactase. A deficiência secundária ou adquirida é resultado de lesões intestinais ou devido a alguma doença intestinal (BARBOSA, 2011).

Atualmente existem medicamentos (comprimidos, tabletes) contendo a enzima lactase que favorece o consumo do leite na população com intolerância à lactose. Além da parte farmacológica, há também a venda de leite e derivados lácteos com baixo teor ou sem lactose para esse público (MATTAR e MAZO, 2010).

### 3.2.3. Produtos com baixo teor de lactose

No mercado encontram-se produtos lácteos com baixo teor de lactose que são alternativas para o público que apresenta má digestão da mesma. Dentre eles se destacam os lácteos fermentados, os queijos duros, o doce de leite sem lactase e os leites com reduzido teor de lactose. Estes produtos possibilitam ao consumidor a ingestão adequada de nutrientes, minimizando os riscos de comprometimento da saúde (NATIONAL DAIRY COUNCIL; 2010).

Muitos indivíduos com intolerância à lactose confirmada toleram a ingestão de diferentes quantidades de leite/derivados, sem apresentarem manifestações clínicas, na maioria dos casos, essa quantidade tolerada pode chegar até um a dois copos de leite durante o dia (sendo que um copo de 240 mL contém 11 g de lactose). Em contraste, há pessoas que apresentam sintomas com a ingestão de apenas 2-3 g de lactose, como, por exemplo, a quantidade correspondente a uma barra de chocolate (SUCHY *et al.*, 2010).

Os produtos lácteos fermentados são recomendados para pessoas com má digestão da lactose porque a lactase presente nos micro-organismos utilizados na fabricação desses leites fermentados como iogurte e coalhada possibilita a hidrólise de parte da lactose presente nesses produtos (MORIWAC e MATIOLI, 2000). Entre os produtos fermentados, o iogurte é o que apresenta melhor tolerância. Essa melhor tolerabilidade tem sido atribuída à alta atividade da lactase presente nos micro-organismos usados na produção do iogurte (normalmente *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) comparados com outras bactérias produtoras de ácido láctico (PEREIRA *et al.*, 2012).

Os queijos duros são os mais indicados para o consumo por portadores da má digestão de lactose, visto que no processo de fabricação grande parte da lactose fica no soro, concentram-se os sólidos e parte da lactose que fica presente na massa é transformada em ácido láctico (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2008).

Os leites com redução de até 90% de lactose, também chamados de leites de alta digestibilidade ou deslactosado, são alternativas disponíveis no mercado. A digestão é facilitada devido à quebra da lactose em glicose e galactose melhorando a digestibilidade sem perda da qualidade nutricional do leite. Entretanto, atualmente ainda não se encontra oferta de leite desnatado com reduzido teor de lactose, apenas leites com baixo teor de lactose do tipo longa-vida integrais ou semi-desnatados (PEREIRA *et al.*, 2012). O que se observa atualmente no comércio é uma gama considerável de produtos de soja como alternativa de substituição dos produtos lácteos. Entretanto, esses produtos não possuem a mesma concentração de vitaminas e cálcio biodisponível, sendo necessária complementar a dieta com vitaminas e minerais (CASE *et al.*, 2005).

No Brasil, existem legislações para rotulagem que obrigam que os alimentos comercializados informem no rótulo e na embalagem a presença ou ausência de determinados componentes. Essas informações são direcionadas a alguns grupos específicos, como medida preventiva e de controle, como por exemplo, aos portadores de doença celíaca e aos fenilcetonúricos (BRASIL, 1998; 2003). Entretanto, para portadores de má digestão da lactose

ainda não existe a obrigatoriedade legal de informar na rotulagem a presença ou ausência, ou ainda a quantidade de lactose presente no alimento. Os portadores da má digestão da lactose devem atentar-se às informações contidas nas bulas de medicamentos, bem como aos rótulos dos alimentos, procurando leite, lactose, soro de leite, coalhadas, derivados de leites, sólidos do leite e leite em pó entre os ingredientes descritos na rotulagem (VENUTO, 1995).

Alternativas tecnológicas para a remoção de lactose do leite e derivados são utilizadas com o objetivo de disponibilizar ao mercado consumidor produtos com reduzido teor lactose, a fim de atender uma crescente massa de consumidores portadores de má digestão da lactose.

### **3.3. Tecnologias aplicadas para obtenção de produtos lácteos sem lactose**

A intolerância à lactose é uma das desordens genéticas mais comuns, atingindo mais de 65% da população mundial. No Brasil, 88 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digeri-la, pela deficiência da enzima lactase no intestino (FAEDO *et al.*, 2013). A maioria da população mundial perde parte da atividade de lactases no intestino delgado após a infância (MATTAR e MAZO, 2010). Hoje, muitos países possuem uma gama de produtos com baixo teor de lactose, porém, no Brasil, esse mercado ainda tem sido pouco explorado. Com exceção do leite Ultra High Temperature (UHT), disposto nas versões integrais e semidesnatado com 90% menos lactose, não há versões de leite desnatado e/ou pasteurizado desses produtos. Contudo, o leite desnatado contém menor teor calórico que o integral ou semidesnatado, sendo bom aliado para a saúde cardiovascular (SPADOTI, 2010). Os leites com lactose reduzida podem ser encontrados em alguns supermercados do país e quando comparados ao leite comum, os preços são bem elevados, custando aproximadamente 70% do valor de custo.

Hoje muitos países possuem uma gama de produtos com baixo teor de lactose, mas o mercado é difícil de ser dimensionado, uma vez que a intolerância à lactose é uma disfunção pouco conhecida e confundida com alergia ao leite. Sua confirmação só pode ser feita pelos médicos e a quantidade de lactose que pode ser ingerida varia muito de pessoa para pessoa (MATTAR e MAZO, 2010). De acordo com HARJU *et al.* (2012), a empresa finlandesa Valio Ltda. desenvolveu e patenteou diversas técnicas para leites e derivados com baixo teor de lactose, contando, hoje, com mais de 200 produtos diferentes no seu *mix* com a marca HYLA, utilizando a maior parte desses produtos processos de combinações físicas e enzimáticas.

Alternativas alimentares são importantes, pois para pessoas com má absorção de lactose, normalmente, a única alternativa é abster-se dela para evitar os sintomas. Diante

desse quadro, normalmente, recomenda-se para essas pessoas evitar o consumo de leite e seus derivados. No entanto, esses indivíduos estariam deixando de usufruir dos benefícios do alimento à saúde humana. Torna-se necessário, então, o desenvolvimento de métodos para a preparação de leite livre da lactose. E para isso existem dois métodos utilizados para a redução de lactose do leite: o método ácido e método enzimático. Na hidrólise ácida, a reação é muito rápida, mas envolve soluções diluídas de ácido fortes como o sulfúrico e clorídrico, e condições severas de pH e temperatura ( $1,0 < \text{pH} < 2,0$ ;  $100 < \text{temperatura} < 150$  °C), e por isto tem sua aplicação comercial na indústria restrita, pois acarreta alterações no sabor e cor do leite. Já a hidrólise enzimática pode ser realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas ( $3,5 < \text{pH} < 8,0$ ;  $5 < \text{temperatura} < 60$  °C), essas condições reduzem a formação de subprodutos indesejáveis e a possibilidade de alterações dos compostos sensíveis ao calor (LADERO *et al.*, 2000).

O leite com baixo teor de lactose pode ser preparado por meio de sua hidrólise enzimática utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase, pela liberação dos seus correspondentes monossacarídeos, glicose e galactose ou de sua remoção física aplicando tecnologia por membranas e separações cromatográficas (CUNHA *et al.*, 2007, ).

As técnicas utilizadas para hidrolisar a lactose, empregando a enzima lactase permitem disponibilizar produtos com reduzido teor de lactose, bem como melhorias no processamento como, por exemplo, fabricação de leite com sabor adocicado que poderá ser consumido por indivíduos portadores dos sintomas de intolerância à lactose (MARIOTTI *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial no qual, a enzima  $\beta$ -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação  $\beta(1-4)$  da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose de grande interesse para a indústria de laticínios (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Entretanto, segundo Silva e Cardoso (2007), o processo de hidrólise, na maioria das vezes, é realizado utilizando enzimas livres e estas deixam o reator juntamente com o produto, não sendo possível sua reutilização, transformando o processo mais oneroso.

Estudos realizados por HAIDER e HUSAIN, (2009), utilizaram a  $\beta$ -galactosidase a partir de *Aspergillus oryzae* e foi observado que 77% de lactose presente no leite foi hidrolisada depois 3h. ANSARI e HUSAIN (2012) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase em Celite A 545 em reator de fluxo contínuo e obtiveram cerca de 92% de conversão da lactose em seus monossacarídeos após 9 h de operação.

A hidrólise enzimática ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, pois aumentam seu dulçor, diminui a viscosidade dos produtos, alterações do sabor e cor. Além disso, nem todas as fontes da enzima lactase são reconhecidamente seguras (SILVA e CARDOSO 2007).

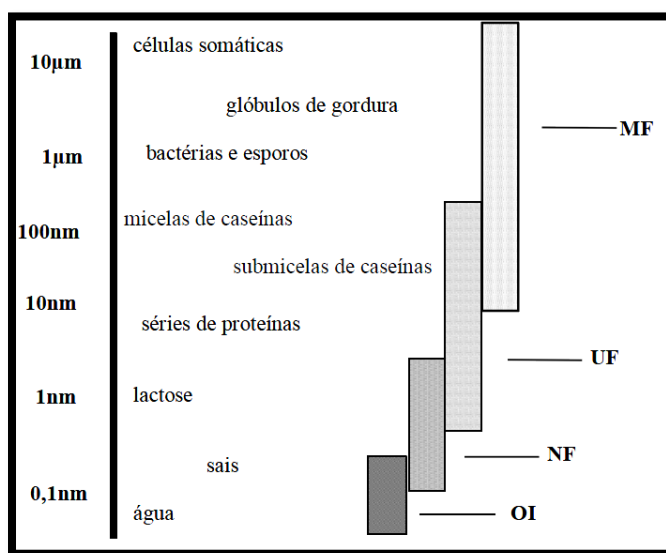
Uma nova alternativa para redução do teor de lactose é o método da ultrafiltração (UF) que utiliza tecnologia de membranas para separação da lactose (peso molecular de corte 1000 a 500000 Daltons), enquanto gorduras e proteínas ficam retidas, entretanto, a UF pode acarretar perdas de minerais tais como o cálcio, que podem passar pelos poros da membrana assim como a lactose. Técnicas de membrana, tais como a microfiltração e ultrafiltração (UF) são utilizadas comercialmente para modificar a proporção de lactose no leite e produtos lácteos. Estes processos originaram cremes modificados sem lactose, leite em pó desnatado, bebidas lácteas e entre outros produtos lácteos. O uso de membranas é a mais utilizada comercialmente para modificar a proporção de lactose em leite e produtos lácteos (FAEDO *et al.*, 2013). Segundo BRANS *et al.*, (2004), a tecnologia de separação por membranas é uma escolha adequada para o fracionamento do leite, pois muitos dos seus componentes podem ser separados por diferença de tamanho.

Muitos trabalhos foram realizados para avaliar o processo de filtração na remoção de lactose do leite. CHOLLANGI *et al.* (2007) estudaram a técnica de ultrafiltração por membrana para a separação de lactose em efluentes de laticínios e verificaram que as membranas com 3, 5 e 10 kDa, recuperaram 70-80%, 90-95% e 100% de lactose, respectivamente. Enquanto que ATRA *et al.* (2005), estudaram a nanofiltração para a concentração de lactose no soro de queijo e obtiveram uma concentração de 25% de lactose removida. Em relação ao processo de nanofiltração, MINHALMA *et al.* (2005), estudaram o processo de nanofiltração (NF), a fim de obter uma fração rica em lactose a partir de soro de queijo utilizando duas membranas (NFT50 e HR95 PP), além disso, foram testados duas condições de operação: recirculação total e concentração. Os melhores resultados foram obtidos com a membrana comercial denominada NFT50 a 3 MPa permitindo uma recuperação de lactose de 80%.

A Figura 3.3 apresenta o tamanho dos componentes do leite e o respectivo Processo de Separação por Membranas (PSM) que poderia ser empregado na separação destes.

A separação da lactose no leite por métodos cromatográficos é baseada nas diferenças de velocidades de fluxo de diferentes componentes do líquido a ser tratado quando passado através de uma coluna de resina. O leito de resina é composto de partículas porosas de resina tendo grupos funcionais com o qual os componentes a serem separados interagem de forma

diferente. O eluato é dividido em frações com a composição desejada, para separar componentes um do outro, eles devem apresentar afinidades diferentes para a resina. Portanto, a cromatografia é baseada na interação diferencial de componentes de uma solução mista com uma resina que pode ser classificada como cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de afinidade (AC) (HARJU *et al.* 2012).



**Figura 3.3:** Aplicação do Processo de Separação por Membranas (PSM) para separação dos componentes do leite em função do seu tamanho; microfiltração (MF); ultrafiltração (UF); nanofiltração (NF); osmose inversa (OI)

Fonte: BRANS *et al.*, (2004).

A cromatografia usando resinas carregadas é uma técnica largamente utilizada para separar as proteínas e outros íons carregados no leite da lactose. As proteínas e os íons carregados se ligam a resina com carga oposta, enquanto não se liga a lactose e passa diretamente através do sistema. A resina de permuta catiônica é equilibrada de modo a que um equilíbrio iônico é obtido com leite. Depois de equilibrar a resina, o leite desnatado ou leite concentrado é passada através do leite. A fração de lactose é eluída no fundo do leite, enquanto que a proteína e a fração mineral é fluidizada com a ajuda de água, em um outro fluxo (MCSWEENEY e FOX, 2009).

A lactose pode ser separada com elevada eficiência a partir do leite e soro de leite por resinas de troca catiônica (HARJU *et al.*, 2012). A separação é baseada nos diferentes tamanhos de íons e de efeitos de exclusão de tamanho de minerais e proteínas, e provavelmente também na capacidade de lactose em formar complexos com os cátions ligados a resinas de troca catiônica. A formação de complexos lactose-cátion retarda o fluxo de lactose através da coluna de resina permitindo a determinação deste componente. De

acordo com HARJU *et al.*, (2012), é importante que a resina de troca catiônica esteja em equilíbrio com o leite. Quando a resina é na forma de sódio, a lactose é separada dos outros componentes do leite. No entanto, íons de cálcio do leite são ligados à resina, o que leva à destruição das micelas de caseína, e desaparecimento da cor branca de leite. Se a resina está sob a forma de cálcio, a separação é insatisfeita e pode precipitar a proteína na coluna. As temperaturas utilizadas são acima de 65 °C com objetivo de um maior controle do crescimento microbiano e uma melhor separação (HARJU, *et al.*, 2012). A aplicação de um processo de concentração do leite antes da separação cromatográfica reduz a quantidade de água necessária para a eluição. Usando este método é possível separar a lactose muito especificamente a partir dos outros componentes do leite (MCSWEENEY e FOX, 2009).

Muitos trabalhos na área de leite livre de lactose foram desenvolvidos e patenteados. A companhia Finladesa VALIO LTDA lançou em 2001 o leite livre de lactose, contendo 0,01% lactose. Baseando-se em um processo de separação cromatográfica, o que permite a separação específica de lactose do leite (HARJU, 2004, 1987b; JELEN e TOSSAVAINEN, 2003). A separação cromatográfica torna possível reter os minerais de leite com proteínas, ao contrário de outras técnicas de separação (HARJU, 1987b, 2004). Esse mesmo método foi patenteadado para a separação de lactose a partir de soro de leite (US 4955363) (HARJU & HEIKKILÄ, 1990) e no leite (EP 0226035) (HARJU, 1990). Portanto, a partir desta técnica foi possível atender o limite do teor de lactose residual para menos de 10 mg/100g de produto (<0,01%) determinado pelos países Escandinavos.

No documento US 2005/0170044 está descrito um processo para obtenção de leite livre de lactose sem doçura adicional. O processo incluía como primeiro passo a ultrafiltração, em que parte da lactose foi removida, e o retentado foi diluído para uma concentração de proteína de 4% e a concentração de lactose de 3%. Depois disto, a lactose residual foi hidrolisada enzimaticamente. A doçura do leite foi semelhante ao do leite normal, o leite teve um nível mineral de apenas 0,47%. No leite normal, o conteúdo mineral é de cerca de 0,75%. Isto pode causar uma diferença no sabor. Mais tarde, em vários novos processos para a produção de leite livre de lactose foi desenvolvido. Foram utilizadas várias combinações de filtração por membrana e hidrólise enzimática (WO 2009/043356, US 2010/0055289).

A redução de lactose por tecnologias de membrana ou processos cromatográficos resultou em problemas com as autoridades reguladoras. O leite em que a lactose é reduzida por tecnologia de filtração para menos de 2,0% resulta em um valor mais baixo do que o crioscópico do leite integral comum, mesmo depois da hidrólise da lactose, o valor crioscópico é menor do que o leite de vaca integral. De acordo com a Instrução Normativa nº

51/2002 (BRASIL, 2002), o índice crioscópico máximo permitido é  $-0,530\text{ }^{\circ}\text{H}$  ( $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). As autoridades de saúde consideram a redução dos valores crioscópicos como adulteração no leite. Na Europa, a empresa VALIO LTDA desenvolveu uma gama de bebidas lácteas sem lactose usando tecnologias de membrana (MCSWEENEY e FOX, 2009).

Atualmente na Europa discute-se, como será denominado nos rótulos o teor de lactose em alimentos livre de lactose. Por exemplo, o trabalho de *Issues of Nutrition* da Sociedade Alemã de Química dos Alimentos recomendou três categorias de declaração nos alimentos (SAQA, 2014), ou seja, produtos contendo ( $\leq 1\%$ ) de lactose deve ser designado baixo teor de lactose, com ( $\leq 0,1\%$ ), denominado como muito baixo teor de lactose e produtos com ( $\leq 0,01\%$  de lactose e seus produtos de degradação) devem ser classificados como livre de lactose. Este último é o nível mais rigoroso a ser discutido, o que permite que estes produtos alimentares pode ser utilizada com segurança na alimentação dietética de pacientes com galactosemia, como tais produtos alimentares também são indicados para ser "livre" de galactose (MORLOCK *et al.*, 2014). No Brasil, a legislação não dispõe de um regulamento específico para leite com baixo teor de lactose; contudo, segundo a legislação aplicada para esse tipo de produto, a Portaria nº 29 de 1998 do Ministério da Saúde, alimentos especialmente formulados para atender portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos como a lactose podem conter no máximo 0,5 g do nutriente por 100 g ou 100 mL do produto final.

O índice da lactose pode ser igualmente reduzido em derivados lácteos pela fermentação láctica. O soro de leite, a coalhada, o kefir e o iogurte, podem ser produzidos e consumidos por pessoas com intolerância à lactose, pois nestes produtos, aproximadamente 30% da lactose é convertida em glucose ou galactose, de mais fácil digestão, já que os monossacarídeos resultantes de sua hidrólise, galactose e glicose, são absorvidos pelas células epiteliais por transporte ativo, evitando os inconvenientes e desconfortos causados pela má absorção da lactose (HARJU *et al.*, 2012 ). A intolerância à lactose é definida como o conjunto de sintomas como dores abdominais, diarreia, flatulência, náuseas e vômitos após a ingestão da lactose. A lactose que não é hidrolisada pela enzima lactase, em glicose e galactose, permanece no intestino e atua osmoticamente atraindo água para este órgão. As bactérias que colonizam o intestino fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio. A ação osmótica pode provocar diarreias e a ação bacteriana pode provocar desconforto, distensão e dores abdominais, além de náuseas e flatulência. Também prolonga a ação da vitamina D, em caso de redução da



radiação solar e ajuda na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (Kociàn *apud* LONGO, 2006).

A hidrólise enzimática de lactose é um dos processos biotecnológicos mais importantes na indústria de alimentos por causa dos efeitos potencialmente benéficos sobre a assimilação de alimentos que contêm lactose, bem como as vantagens tecnológicas e ambientais possíveis de aplicação industrial, incluindo: utilização de lactose como fonte de energia, bem como cálcio e assimilação de magnésio a partir do leite, formação de galacto-oligossacarídeos durante a hidrólise de lactose para favorecer o crescimento da microflora bacteriana intestinal, elaboração de leite com sabor adocicado de boa aceitação que pode ser consumido por pessoas com intolerância a este açúcar (JURADO *et al.*, 2002; JELEN e TOSSAVAINEM, 2003; PLAYNE *et al.*, 2003).

O leite e seus derivados com reduzido teor de lactose estiveram sob o desenvolvimento desde os anos 70, quando as primeiras  $\beta$ -D-galactosidase se tornaram disponíveis no comércio. Atualmente, a lactase é uma das enzimas mais importantes usadas na transformação de produtos alimentares (PANESAR *et al.*, 2006).

QUINN *et al.* (2001), avaliaram a imobilização da  $\beta$ -D-galactosidase a partir do fungo *Kluyveromyces lactis* em superfícies de grafite através de um método de ligação covalente usando glutaraldeído, com o objetivo de reduzir a lactose em leite desnatado, o estudo foi realizado num reator contínuo e obtiveram uma conversão de 90% de lactose dentro de um tempo de residência de 15 min. Enquanto que LI *et al.*, (2007), avaliaram a  $\beta$ -galactosidase a partir de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em tecido de algodão utilizando glutaraldeído como o reagente de reticulação em um modelo de escala piloto com um reator de leito fixo com capacidade de 10 L, foi usado e aplicado para hidrolisar a lactose no leite integral com uma conversão de 95% de lactose após 2h de operação em batelada. NOVALIN *et al.* (2005), avaliaram, o estabelecimento de um processo em reator de membrana de fibra para a hidrólise enzimática de lactose em leite desnatado utilizando  $\beta$ -galactosidase. Obtiveram uma conversão de lactose no leite desnatado em torno de 81% após 2h.

Inicialmente se recomenda evitar temporariamente leite e produtos lácteos da dieta para se obter remissão dos sintomas. Entretanto, a exclusão do leite da dieta de pacientes portadores de má digestão da lactose pode acarretar prejuízos nutricionais e consequentes danos à saúde. Em vista disso, existem no mercado produtos alternativos tradicionais derivados do leite (queijos curados, bebidas lácteas fermentadas) em que apresentam naturalmente teor reduzido de lactose em sua composição. Em produtos lácteos, como iogurte e queijo, a lactose é convertida em ácido láctico por ação bacteriana e em queijos em torno de

98% da lactose é arrastada no soro por lixiviação (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Sendo assim, nas últimas décadas novas tecnologias foram desenvolvidas para o desenvolvimento de produtos lácteos com baixo teor de lactose para satisfazer a necessidade de pessoas que sofrem de intolerância à lactose.

No mercado encontram-se produtos lácteos com baixo teor de lactose que são alternativas para o público que apresenta má digestão da mesma. Dentre eles se destacam os lácteos fermentados probióticos com características funcionais. Os produtos lácteos fermentados probióticos funcionais são recomendados para pessoas com má digestão da lactose porque a lactase presente nos micro-organismos utilizados na fabricação desses leites fermentados como iogurte e coalhada possibilita a hidrólise de parte da lactose presente nesses produtos. Estes produtos possibilitam ao consumidor a ingestão adequada de nutrientes, minimizando os riscos de comprometimento da saúde (MORIWAC e MATIOLI, 2000).

Os alimentos probióticos são aqueles que possuem microrganismos vivos que beneficiam o organismo, melhorando a microflora intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano (MAGALHÃES *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012). OLIVEIRA (2011) menciona que as bactérias cientificamente comprovadas como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1478), *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus* GG (ATCC 53103), *Bifidobacterium animalis* Bb 12, *Lactobacillus johnsonii* Lj 1 e *Lactobacillus reuteri*. Dessa forma, o leite fermentado probiótico nada mais é que um leite fermentado inoculado com bactérias probióticas, possuindo, no entanto, características de um alimento funcional. A fermentação láctica pode produzir uma série de produtos comerciais a partir do leite, fornecendo, além do ácido láctico, sabores e aromas característicos dos laticínios fermentados durante o processo de maturação pela produção de aldeídos e cetonas, como o diacetil e o acetaldeído (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os produtos lácteos fermentados são recomendados para pessoas com má digestão da lactose, pois a lactose é hidrolisada pelos microrganismos na fabricação desses leites fermentados como, iogurte, coalhada e bebida kefir (MORIWAC e MATIOLI, 2000). As culturas probióticas têm sido bastante exploradas pelas indústrias de laticínios como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos funcionais (DONKORA *et al.*, 2007; BALDISSERA *et al.*, 2011). Estes microrganismos probióticos apresentam diversas características, dentre elas, a de serem seguros, capazes de aderir à mucosa intestinal e tolerante aos ácidos e a bile (DEL PIANO *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2009).

Diferentes estirpes de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* têm sido tradicionalmente usadas em produtos lácteos fermentados. A atual tendência é usar culturas lácteas chamadas ABT (acidophilus bifidus-thermophilus), que contém *L. acidophilus*, *Bifidobactérias* e *S. thermophilus*, cujas culturas devem suportar o processo de elaboração do bioproduto, bem como, manter a viabilidade celular das cepas durante o armazenamento (ZACARCHENCO e MASSAGUERROIG, 2004; RAMOS *et al.*, 2013). Todavia, é notável também a pesquisa com a utilização de outras culturas probióticas para o desenvolvimento de bebidas lácteas de elevado valor nutritivo e funcional. Por esta razão, uma opção seria o uso de diferentes cultivos bacterianos iniciadores como os grãos de kefir.

No Brasil, conforme a Legislação vigente para o Padrão de Identidade Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura, kefir é o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado por cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. No entanto, FAO/OMS (2001) define a bebida kefir baseada na composição microbiana dos grãos de kefir (o arranque da cultura utilizada para produzir kefir): cultura iniciadora (*starter*) preparada de grãos de kefir, *Lactobacillus kefir* e espécies do gênero *Leuconostoc*, *Lacococcus* e *Acetobacter* crescendo em um forte relacionamento específico. O grão de kefir constitui de ambas as leveduras, as que fermentam a lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e as que não fermentam (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces exiguus*). A bebida kefir possui uma consistência cremosa espessa uniforme, a bebida gerada pela fermentação do leite pelos microrganismos associados aos grãos de kefir, possui um leve gosto ácido que refresca e um aroma moderado de levedura fresca, que se assemelha às bebidas alcoólicas muito “leves”. Associado à efervescência do gás produzido (CO<sub>2</sub>), é um produto lácteo diferente dos comercializados e possui cerca de 40 combinações aromáticas, podendo ser consumido fresco ou refrigerado (ORDÓÑEZ, 2005). Os grãos são envoltos por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, de aspecto gelatinoso, apresentando tamanhos variados entre (0,3-3,5 cm de diâmetro), com volume de 0,5-20,0 mL/grão, forma irregular, cor amarelo ou esbranquiçada (DUARTE *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011).

A simbiose da composição variável e complexa de microrganismos do kefir nos produtos lácticos fermentados tem demonstrado benefícios para a saúde humana, com células apresentando-se viáveis ao atingirem o trato gastrointestinal, que além de reduzirem a

concentração da lactose nestes alimentos fermentados, atuam no intestino auxiliando na hidrólise de parte da lactose ainda restante no produto final. Sendo, pois, motivo de estudos como alimento láctico alternativo para indivíduos com intolerância à lactose (LABAYEN *et al.*, 2001; MATER *et al.*, 2005). HERTZLER e CLANCY (2003) realizaram um estudo em humanos para determinar o efeito da bebida Kefir sobre a intolerância a lactose em adultos com má digestão da lactose, e foi concluído que o consumo de Kefir reduziu a severidade da flatulência em 71% dos pacientes do estudo. Estudando o metabolismo de indivíduos intolerantes à lactose, foi observada a redução de 30% no teor de lactose, presente em kefir fermentado por 11 dias e foi recomendado o seu consumo por aqueles pacientes (ALM, 1982).

### 3.4. Adsorção

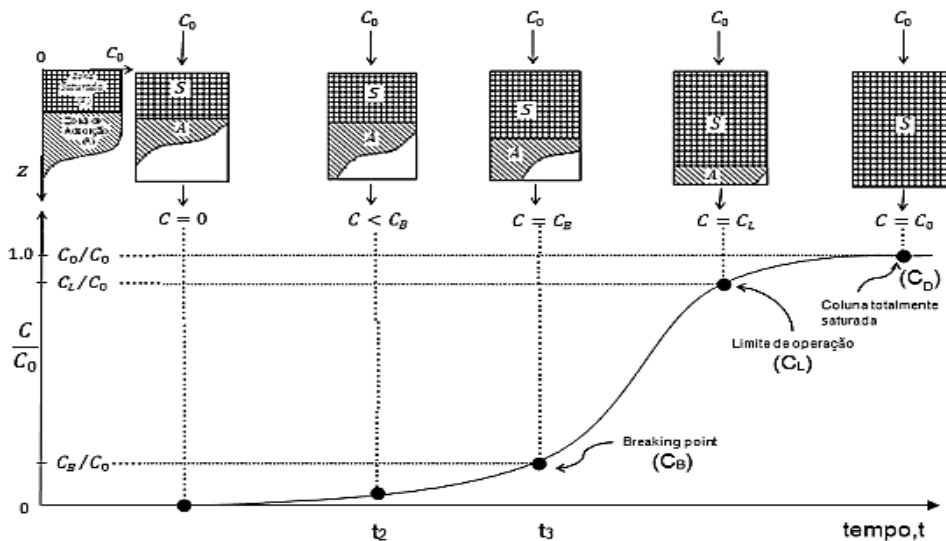
A adsorção é um fenômeno físico-químico de transferência no qual um ou mais constituintes uma fase gasosa ou líquida são transferidos para a superfície de uma fase sólida. Os componentes que se ligam a superfície são chamados de *adsorvatos*, e a fase sólida que retém o adsorvato é chamado *adsorvente*. A remoção das moléculas a partir da superfície é chamada dessorção. A migração destes componentes de uma fase para outra tem como força motriz a diferença de concentrações entre o seio do fluido e a superfície do adsorvente. Devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente, as moléculas da fase fluida são atraídas para a zona interfacial (RUTHVEN, 1984).

O processo de adsorção depende de alguns fatores, tais como: natureza do adsorvente, do adsorvato e das condições operacionais. As características do adsorvente incluem área superficial, tamanho do poro, densidade e grupos funcionais presentes na superfície. Por outro lado, a natureza do adsorvato, depende da polaridade e solubilidade. Para as condições operacionais influem a temperatura, pH, tempo de contato e agitação e a vazão utilizada (processo contínuo). Um fator importante é a presença de outras espécies diferentes do adsorbato, que podem provocar competição pelo sítio de sorção (MOURA *et al.*, 2011).

A temperatura é a variável que afeta a extensão da adsorção, que, em geral, é um processo exotérmico onde as altas temperaturas diminuem proporcionalmente a quantidade de soluto adsorvido. As temperaturas baixas são favoráveis à adsorção embora a velocidade e a extensão da adsorção sejam afetadas por outros fatores. A velocidade de agitação tem forte influencia sobre o processo de adsorção, quando a agitação se faz presente, esta faz com que espessura da camada limite diminua, aumentando assim o coeficiente de transferência de massa (RUTHVEN, 1984).

### 3.4.1. Adsorção em coluna de leito fixo

As colunas de adsorção são exemplos de equipamentos utilizados para transferência de massa. Em geral consistem de partículas sólidas imobilizadas dentro de um tubo, onde um líquido escoava entre os espaços vazios das partículas. Uma ou mais substâncias presentes no líquido são transferidas para a fase sólida, sendo essa substância retida na fase sólida por adsorção (MCCABE *et al.*, 2001).



**Figura 3.4:** Esquema ilustrativo da curva de ruptura (Breakthroughs) em coluna de leito fixo. Fonte: adaptado de WEBBER e SMITH (1986).

As colunas de leito fixo podem ser operadas isoladamente, em série ou em paralelo. Existem dois tipos de modos de influentes para colunas de leito fixo, de fluxo descendente e fluxo ascendente. A vantagem do fluxo descendente é que a adsorção de compostos orgânicos e filtração de sólidos suspensos podem ser realizadas em uma única etapa. Embora o fluxo ascendente de coluna de leito fixo tem sido utilizado, leitos de fluxo descendente são utilizados mais frequentemente para diminuir a possibilidade de acumulação de material em partículas na parte inferior do leito, onde o material em partículas pode ser difícil de remoção por lavagem do leito (METCALF e EDDY, 2003). A Figura 3.4 ilustra uma curva de ruptura típica de adsorção em uma coluna de leito fixo.

As operações onde a mistura fluida a ser tratada passa através de um leito estacionário de adsorvente são mais econômicas do que aquelas em estado não estacionário onde o transporte contínuo das partículas sólidas requer um alto custo (TREYBAL, 1984). No leito fixo, o adsorvente deve ser substituído ou regenerado, periodicamente, à medida que este for

saturando. A capacidade de adsorção do leito é estimada através de curvas denominadas *curvas de ruptura* (Breakthrough) (ECKENFELDER, 2000).

Considere uma solução binária (gasosa ou líquida) que contém um soluto a uma concentração  $C_0$ . O fluido passará continuamente no sentido descendente através de um leito de adsorvente relativamente profundo, inicialmente livre do adsorvato. A camada superior da coluna, em contato com a solução concentrada, primeiramente adsorve soluto de maneira rápida e efetiva, e a pequena quantidade de soluto que permanece na solução é totalmente removida pelas camadas inferiores do leito. O efluente no final do leito é praticamente livre de soluto, e apresenta uma concentração  $C_a$  (Figura 3.4). A distribuição do adsorvato no leito sólido é indicada na parte superior da Figura 3.4, em  $a$ , onde a densidade relativa, de linhas horizontais no leito, significa a indicação da concentração relativa do adsorvato (ZHOU *et al.*, 2004).

A camada superior do leito é praticamente saturada, e a maior parte da adsorção ocorre sobre uma zona de adsorção relativamente estreita, na qual a concentração muda rapidamente. Se a solução continua a fluir, a zona de adsorção se move para baixo como uma onda, a uma taxa mais baixa do que a velocidade linear do fluido através do leito. Posteriormente, como indicado em  $b$ , aproximadamente metade do leito é saturada com soluto, mas a concentração do efluente é ainda substancialmente nula, ou seja,  $C_b = 0$ . Em  $c$ , a parte mais baixa da zona de adsorção acaba de alcançar o fundo do leito, e a concentração de soluto no efluente pela primeira vez eleva-se rapidamente para um valor apreciável  $C_c$ . Diz-se que o sistema atingiu o *ponto de ruptura*. A concentração do soluto no efluente sobe rapidamente se a zona de adsorção passar no final do leito e, em  $d$ , atingiu substancialmente o valor inicial  $C_0$ . A parte da curva de concentração do efluente entre as posições  $c$  e  $d$  é denominada *curva de abertura*. A região onde grande parte das mudanças na concentração ocorre é chamada de zona de transferência de massa (ZTM), e os limites são frequentemente tomados como valores de  $C/C_0$  de 0,05 até 0,95. Se a solução continua a fluir, pequena adsorção adicional ocorre, já que o leito está praticamente em total equilíbrio com a solução de alimentação (ZHOU *et al.*, 2004).

As curvas de ruptura representam o comportamento da adsorção sobre o adsorvente em coluna de leito fixo ao longo do tempo, considerando-se os efeitos de dispersão e transferência de massa, até sua total saturação (equilíbrio) (ZHOU *et al.*, 2004).

Um dos principais objetivos de um leito fixo ou de partículas (recheio) é promover o contato íntimo entre as fases envolvidas no processo (fase fluida gasosa e/ou líquida com a fase estacionária/partículas ou entre diferentes fases fluidas). O leito fixo ocorre quando um

fluido passa através de um leito de partículas finas, em baixas velocidades, apenas percolando através dos espaços vazios existentes entre as partículas estacionárias. As colunas de recheio são muito usadas para provocar o contato íntimo entre dois fluidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, podendo ser um gás e um líquido, ou dois líquidos. Portanto, nos escoamentos em meios porosos as fases que estão em contato podem ser: gás-sólido, gás-líquido, líquido-sólido, líquido-líquido (MAcCABE e SMITH, 2000). O escoamento de fluidos (líquidos ou gases) através de leitos de partículas (leito fixo) pode ser aplicado em diversos processos, tais como: filtração, torres de recheio, leito fixo, leito fluidizado, leitos de jorro, transportadores pneumáticos/ hidráulico, sedimentação (RUTVHEN, 1984).

Para que se obtenha uma boa velocidade de transferência por unidade de volume da coluna, deve-se escolher um recheio que promova uma elevada área interfacial entre as duas fases e um alto grau de turbulência nos fluidos, com uma menor queda de pressão. As características necessárias ao recheio são adequadas à aplicação, isto é, nesta etapa do projeto a remoção de biomoléculas. O recheio deve ser resistente e ter baixa massa específica e proporcionar uma passagem adequada do fluido sem implicar em grande perda de carga; oferecer um contato sólido-fluido efetivo (molhabilidade) custo razoável. Parâmetros como a velocidade de escoamento do líquido pela coluna, zona de transferência de massa, capacidade de adsorção e o tempo de residência são avaliados, a fim de se determinar as melhores condições operacionais de modo a garantir a máxima eficiência do processo de separação (TREYBAL, 1980).

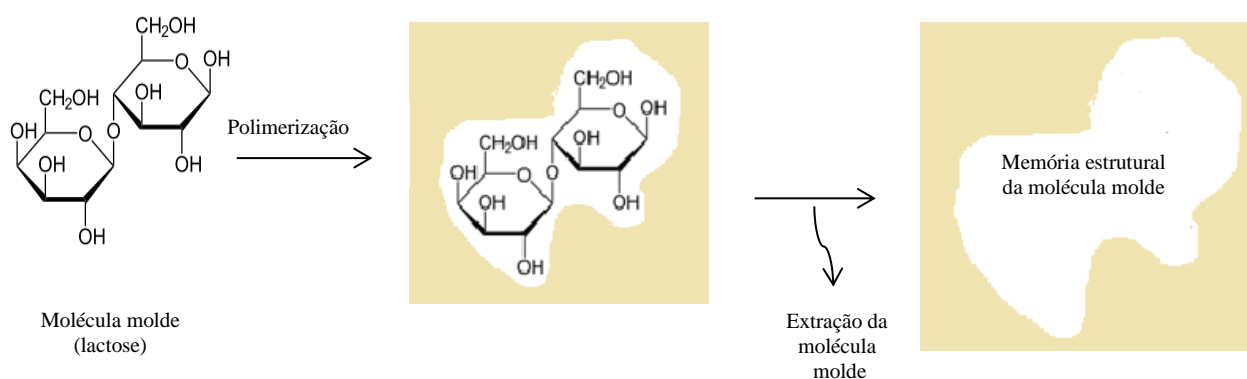
Alguns trabalhos relatam o uso de coluna em leito fixo utilizando diversos adsorventes para a remoção de biomoléculas derivadas do leite. FERREIRA (2007) usou argila bentonítica sódica para a adsorção de lactose no tratamento terciário do efluentes da indústria de laticínios e verificou-se a capacidade de adsorção da argila de 50% para a adsorção de lactose. CONRADO *et al.* (2005), descrevem os parâmetros de operação relacionados com o uso de uma resina hidrofóbica (Streamline<sup>®</sup> Phenyl) de alta densidade, para a recuperação de  $\alpha$ -lactalbumina a partir de soro de leite de vaca, em um modo de adsorção de leito expandido de operação e o eluído mostrou que uma pureza de 79% foi obtida por  $\alpha$ -lactalbumina.

### **3.5. Tecnologia de Polímeros de Impressão Molecular (PIM)**

O uso de polímeros impressos molecularmente em colunas de leito fixo é relatado na literatura para diferentes moléculas alvos, entretanto se faz necessário a definição dos conceitos fundamentais relacionados com a tecnologia de impressão molecular.

Consistem em matrizes macromoleculares sintéticas, obtidas por métodos de moldagem molecular, que apresentam a capacidade de reconhecer seletivamente moléculas importantes do ponto de vista biológico, como fármacos, proteínas e biomoléculas. As tecnologias baseadas na moldagem molecular permitem disponibilizar sistemas poliméricos eficientes, com capacidade para reconhecer moléculas bioativas específicas, em que a interação depende das propriedades e da concentração da molécula-molde presente no meio circundante (SOUSA e BARBOSA, 2009).

A maioria dos PIMs apresentados na literatura são polímeros altamente reticulados, consistindo numa estrutura matricial, com locais de ligação formados por uma molécula molde, a qual está presente no meio durante o processo de obtenção do polímero (SOUSA e BARBOSA, 2009). A Figura 3.5 representa o processo de obtenção de um polímero impresso molecularmente.



**Figura 3.5:** Ilustração esquemática do processo de impressão molecular.

Adaptado de MUJAHID *et al.* (2010).

Os PIMs são resistentes a elevadas temperaturas e pressões e inerte a ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos (XIONG *et al.*, 2006). São utilizados com sucesso em vários campos incluindo receptores artificiais, imitadores de anticorpos e enzimas, eletroforese capilar, e cromatografia líquida com sensores biomiméticos, e extração em fase sólida (HAUPT *et al.*, 2000).

Em todas as metodologias de impressão molecular a molécula molde assume uma importância fundamental, já que é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais dos monômeros. Por vários motivos, nem todas as moléculas molde se apresentam adequadas para utilização direta na preparação de polímeros. As moléculas moldes ideais devem ser quimicamente inertes para serem compatíveis com processos de



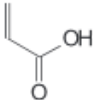
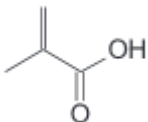
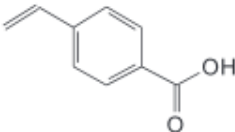
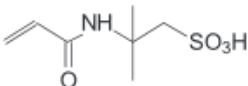
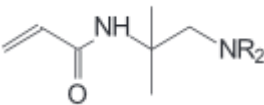
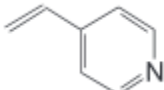
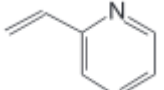
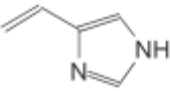
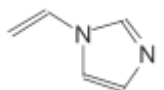
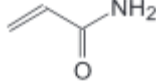
polimerização por radicais livres. Nos casos em que a molécula molde for instável nas condições de polimerização deve-se procurar uma estratégia alternativa para a realização da impressão molecular. Por outro lado, os monômeros funcionais são responsáveis pelas interações que se estabelecem nos locais de reconhecimento. Nos protocolos de impressão molecular não-covalente, normalmente é usado um excesso de monômeros funcionais em relação ao número de moles de molécula molde, de modo a favorecer a agregação entre a molécula e o monômero funcional (SOUSA e BARBOSA, 2009). A técnica “Impressão molecular” é baseada na polimerização de monômeros funcionais na presença da molécula alvo como modelo. Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, foi pela técnica impressão molecular. Uma combinação típica da técnica “molecular imprinting ou impressão molecular” envolve o monômero funcional, a molécula alvo e o agente bifuncional. Entre os agentes bifuncionais, os melhores resultados são obtidos, usando: etilenoglicol dimetacrilato, trimetilpropano trimetacrilato, penta eritritol triacrilato, divinil-benzeno, metileno-bisacrilamida e bisacrilamidopiridina (KOMIYAMA *et al.*, 2003).

Estudos têm apresentado resultados promissores, quanto à encapsulação de esteroides em polímeros impressos molecularmente. Os monômeros funcionais mais adequados utilizados para a preparação dos moldes das moléculas alvos estão listados na Tabela 3.2 (SOUSA e BARBOSA, 2009). Apesar de esses métodos possuírem diferentes mecanismos, geralmente uma combinação de diversas técnicas é empregada para a obtenção de uma determinada impressão molecular.

Esta técnica provou ser particularmente eficaz para as moléculas de baixa massa molecular (<1500 Da), e durante os últimos cinco anos, o número de artigos de pesquisa sobre a impressão de biomoléculas maiores está aumentando consideravelmente. No entanto, a expansão da metodologia para os materiais impressos para o reconhecimento seletivo de proteínas, DNA, vírus, bactérias e carboidratos parece ser extremamente desafiador (VERHEYEN *et al.*, 2011).

Alguns estudos relatam o uso de polímeros impressos molecularmente como leito fixo. LIU *et al.* (2012) empregaram o método da polimerização da precipitação da destilação no preparado do polímero impresso molecularmente tendo como molécula molde a uridina, com isto investigaram o comportamento e o equilíbrio cinético da adsorção para o uridina. AN *et al.* (2012) utilizaram a técnica de impressão de superfície contendo  $Al^{3+}$  como molécula molde. Observaram que os polímeros possuíam uma elevada afinidade e seletividade, os quais foram utilizados para remover as impurezas da terra rara.

**Tabela 3.2:** Tipos de monômeros funcionais usados para preparação dos moldes utilizados na impressão molecular da molécula alvo.

Monômero funcional	Estrutura química	Tipo de ligação como analito
Ácido acrílico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido metacrílico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido p-vinilbenzóico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido acrilamidossulfônico		Iônica
Amino metacrilamida		Iônica
4-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de cargas
2-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de cargas
4-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
1-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
Acrilamida		Ligação de hidrogênio

Fonte: SOUSA e BARBOSA, 2009.

De acordo com TOMINAGA *et al.* (2012), a técnica de impressão molecular foi também utilizada para a adsorção seletiva de compostos gasosos. E neste estudo foi analisado o efeito molecular da impressão molecular para piridina gasosa usando uma molécula molde e o ácido metacrílico (MAA) com monômero funcional. Entretanto, existem outras vantagens dos materiais impressos molecularmente em relação aos receptores biológicos, como o fácil

preparo, o baixo custo, a estabilidade mecânica e a química, e ampla faixa das condições de operação, possibilidade de síntese em situação onde nenhuma molécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço, e resistência a ambientes adversos (presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão). E deve se considerar que os “PIMs” podem ser armazenados a seco em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem perda do desempenho inicial. Os PIMs são uma categoria que apresentam inúmeras vantagens em processos de remoção de moléculas alvo, em função de sua grande afinidade tanto de substâncias hidrofílicas (afinidade à água) quanto lipofílicas (afinidade a solventes não aquosos) (ALVAREZ-LORENZO e CONCHEIRO, 2004; CHEN *et al.*, 2011).

Apesar de estes métodos possuírem diferentes mecanismos, geralmente uma combinação de diversas técnicas é empregada para a obtenção da impressão molecular. Uma das combinações é a técnica de impressão molecular com a de ligação covalente, envolvendo o monômero funcional, a molécula alvo e o agente bifuncional. A primeira etapa da síntese consiste em misturar o monômero contendo grupos funcionais complementares aqueles da molécula molde, o que permite formar em solução o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Estudos realizados por nosso grupo (SOARES *et al.*, 2007), abriram novas perspectivas para a técnica de impressão molecular para remoção de colesterol. Neste estudo avaliou-se a aplicação da técnica de impressão molecular para a remoção de colesterol em produtos lácteos em regime de batelada. A técnica “Impressão molecular” foi dividida em duas etapas, a primeira avaliou-se diferentes métodos de inclusão de colesterol em  $\beta$ -CD (co-precipitação, amassamento e mistura física). Os resultados indicaram que o melhor método de inclusão foi a co-precipitação. Na segunda etapa foi referente ao uso do precursor TEOS (tetraetilortossilicato) para preparo do PIM e sua utilização em reatores em batelada em diferentes razões molares e temperaturas. A obtenção do molde da molécula alvo (colesterol) foi realizada utilizando a técnica sol-gel a partir do precursor TEOS na presença de PIM/ $\beta$ -CD: colesterol e  $\beta$ -ciclodextrina ou somente a partícula de sílica (MP). A máxima capacidade de adsorção do colesterol em regime em batelada neste trabalho foi de 251 mg/g de matriz pura e 76,5 mg/g de PIM/ $\beta$ -CD:colesterol. Neste estudo, foi identificado o potencial de aplicação da matriz pura (MP), contudo não foram realizados estudos utilizando a impressão

molecular sem a presença de  $\beta$ -CD e em outros regimes, como por exemplo, o processo de adsorção de colesterol em colunas de leito fixo.

Um dos atrativos da impressão molecular é que ela pode ser aplicada a uma enorme variedade de moléculas-alvo derivadas do leite (Tabela 3.3) a partir de protocolos de impressão molecular. Vários estudos foram realizados nos últimos anos comprovando a utilidade do método em Extração em Fase Sólida com Impressão Molecular (MISPE) na extração de compostos em amostras biológicas, biofluidos, misturas complexas. Na Tabela 3.3 estão descritos alguns exemplos de aplicações de MISPE em amostras de leite.

**Tabela 3.3:** Exemplos de analitos estudados por impressão molecular presentes no leite.

<b>Analito de estudo</b>	<b>Monômero funcional</b>	<b>Referências</b>
Cloranfenicol	Dietilamino etil metacrilato	BOYD <i>et al.</i> , (2007)
Antibióticos $\beta$ -lactam	Ácido metacrílico	ZHANG <i>et al.</i> , (2010)
Fluoroquinolonas	Ácido metacrílico	ZHENG <i>et al.</i> , (2010)
Cefalosporinas	Etilenoglicol dimetacrilato	MOLINA <i>et al.</i> , (2012)
Estrogênio natural	Ácido $\alpha$ -metacrilato	RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , (2013)
Nafcilina	Fluoreto de tetrabutílamônio	GUARDIA <i>et al.</i> , (2006)
Colesterol	Ácido metacrílico	SHI <i>et al.</i> , (2006);
Esteróis	Trimetacrilato trimetilolpropano	QIUJIN <i>et al.</i> , (2009)
Melanina	Ácido metacrílico	YANG <i>et al.</i> , (2009)
Sulfametazina	Ácido metacrílico	PRADA <i>et al.</i> , (2006)
Melamina	Dimetacrilato	LI <i>et al.</i> , (2010)
Fluoroquinolonas	Ácido metacrílico	AGUI <i>et al.</i> , (2010)
Estrogênios	Ácido metacrílico	YUAN <i>et al.</i> , (2012)
Albumina bovina	2-vinilpiridina	SOLEIMANI <i>et al.</i> , (2012)

PRADA *et al.*, (2006), estudaram a quantificação de baixa concentração de sulfametazina em amostras de leite utilizando o PIM e conseguiram uma recuperação média de  $(100 \pm 3)\%$ , ou seja, 25  $\mu\text{g/l}$ . Enquanto que BOYD *et al.*, (2007), avaliaram um método de confirmação para a determinação do antibiótico cloranfenicol ilegal usando um polímero impresso molecularmente (PIM) especialmente desenvolvida como uma técnica de limpeza de amostra de diversas matrizes (urina, leite, plasma sanguíneo). A seletividade do PIM permite a obtenção de extratos limpos que possivelmente facilita melhorar os limites de detecção e reduzir drasticamente os efeitos de matriz. ZHANG *et al.*, (2010), avaliaram um método

rápido e seletivo utilizando PIM para a remoção de antibióticos  $\beta$ -lactam em amostras de leite. Os resultados mostraram que o PIM extraiu cerca de 90% do antibiótico nas amostras de leite analisadas. MOLINA *et al.*, (2012), estudaram a extração de cefalosporina em amostras de leite fortificado e conseguiram uma recuperação em torno de 60% para o analito alvo no leite. ZHENG *et al.*, (2010), estudaram a remoção de fluoroquinonas por PIM em amostras de leite e obtiveram uma recuperação em torno de 95 a 98% da biomolécula analisada.

Na literatura foram descritos alguns estudos sobre a síntese de polímeros impressos molecularmente (PIMs) utilizando a técnica sol-gel. WANG *et al.*, (2013) utilizaram a técnica para a impressão molecular para três pesticidas (diazinon, isocarbofos e nonanoato de etila) em cinco amostras de vegetais e conseguiram uma recuperação de 85%. LI *et al.*, (2013) utilizaram óxido de titânio como molde no polímero impresso molecularmente (PIM) sintetizado através do processo sol-gel para determinar a presença desse *template* em bebidas e obtiveram uma capacidade de adsorção de 485,9 mg/g. LI *et al.*, (2012) sintetizaram polímeros impressos molecularmente (PIMs) utilizando o tetraetilortossilicato (TEOS) empregando o processo sol-gel, com a finalidade de reconhecer creatinina em um receptor artificial. LEE *et al.*, (2010), sintetizaram polímeros impressos molecularmente (PIMs) utilizando o tetraetilortossilicato (TEOS) empregando o processo sol-gel, com a finalidade de reconhecer sulfonamidas em amostras de carnes, esses polímeros com impressão molecular proporcionaram uma adsorção de 2,13  $\mu\text{mol/g}$ , os quais possuem uma seletividade aproximadamente sete vezes maior quando comparado com os polímeros sem impressão molecular. A técnica sol-gel também foi descrita por JIN *et al.*, (2011) os quais utilizaram essa metodologia para a inclusão do molde de uma matriz contendo triazolam ou halcion. Os PIMs apresentaram uma capacidade de adsorção do triazolam de 130  $\mu\text{g/g}$  de sílica.

A seletividade dos PIM foi explorada em algumas aplicações tais como sensores, eletrocromatografia capilar, separações enantiométricas, catálise e extração em fase sólida (TARLEY *et al.*, 2005; YAN e RAMSTRÖM, 2005). Contudo, o uso dos PIM em extração em fase sólida (SPE), através de um método conhecido como Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE), é o principal campo de aplicação desses materiais (CARO *et al.*, 2006; TAMAYO *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, a extração em fase sólida (SPE) tem sido empregada em laboratórios analíticos como um recurso excelente para a extração de diversos compostos em diferentes matrizes, porém os adsorventes típicos de SPE possui, em algumas situações, baixa seletividade o que se torna um grande empecilho quando uma extração seletiva precisa ser realizada em uma matriz complexa, pois neste caso, substâncias interferentes de polaridade

similar ao analito podem ser retidas e concentradas (YANG *et al.*, 2009; BAGGIANI *et al.*, 2001). No entanto, esta dificuldade pode ser contornada através da utilização dos PIM como fases estacionárias para SPE (ZHU *et al.*, 2005; PRADA *et al.*, 2005; SAN VICENTE *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que a capacidade de reconhecimento molecular do PIM deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP), do inglês *Non Imprinted Polymer*. Este material é sintetizado da mesma forma que o PIM, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional. Desta forma, o NIP funciona como um polímero de controle uma vez que não apresenta sítios específicos de ligação (YAN e RAMSTRÖM, 2005). Assim, todas as condições otimizadas devem ser aplicadas igualmente a ambos os materiais para que seja feita a verificação da seletividade do polímero impresso. Deste modo, espera-se que a etapa de lavagem seja eficiente para a remoção de todos os compostos retidos no NIP, mantendo somente a molécula de interesse nos sítios específicos de ligação do polímero impresso.

Vários estudos foram realizados nos últimos anos quanto ao emprego da MISPE em extração de analitos, fármacos, material biológico, matrizes ambientais ou clínicas, em amostras de alimentos, que envolve uma variedade muito grande de matrizes, variando a partir de vegetais e frutas (maçã, cenoura, uva, limão, laranja, ervilha, batata, morango), cereais (milho, arroz, centeio, trigo), leite, manteiga, peixes, mexilhões, camarões, carne (bovina, pato, coelho, músculo de peru, fígado bovino, porco, rins), bebidas (vinho, café, suco de uva e maçã), mas também incomum como pimenta vermelha. Essa técnica é interessante quando usada para extrair antibióticos (clorafenicol e sulfametazina) em amostras de leite desnatado, creme de leite e manteiga; análise de pesticidas e herbicidas; resíduos de medicamentos veterinários de alimentos (BAGGIANI *et al.*, 2007). Tetraciclina e oxitetraciclina foram extraídos a partir de carne de porco usando a oxitetraciclina no polímero molecular (CARO *et al.*, 2005).

Atualmente tem-se utilizado PIMs em investigações de vários compostos na química de alimentos e área agrícola. De interesse especial nesta área são os antibióticos (RAMSTROM, 2001). Vários adoçantes naturais, inclusive glicose, galatose, frutose e manose tem sido utilizado em varias analises utilizando impressão molecular. Esses estudos mostraram claramente que regiões de alta enantioseletividades podem de fato ser alcançados com PIM. Um largo número de estudos tem sido dirigido para o estudo de componentes típicos de alimentos, tais como, aminoácidos, peptídeos, vitamina, nucleotídeos, açúcares e gorduras. Dentre estes, aminoácidos e açúcares têm sido os mais atraentes. Características tais como alta disponibilidade, diversidade estrutural e baixo custo tem contribuído par a sua

ampla utilização, e vários estudos de reconhecimento básico foram desenvolvidos utilizando esses compostos (TARLEY, 2005). Toxinas patogênicas microbianas são geralmente reconhecidas como o maior problema na indústria de alimentos, em conjunto com outros métodos o PIM tem o potencial reconhecimento para se tornar um elemento eficiente na detecção de contaminantes alimentares (TAMAYO, 2007).

SHI *et al.*, (2006) utilizaram o MISPE para extrair colesterol de leite bovino e obtiveram uma concentração de 10–80 µg/mL. QIUJIN *et al.* (2009) para remover esteróis (17β-estradiol) de uma solução de leite em pó em uma coluna de MISPE, os autores recuperaram cerca de 85% de estradiol. Segundo os autores, o MISPE é de potencial aplicação como adsorvente para enriquecer e purificar pequenos análogos 17β-estradiol e da sua estrutura nos géneros alimentícios. YANG *et al.*, (2009) utilizaram um processo de limpeza de amostra altamente seletiva combinando impressão molecular e extração fase sólida (MISPE) que foi desenvolvido para o isolamento de melamina nos produtos lácteos. As recuperações médias de melamina em leite *Ultra High Temperature* (UHT) e leite em pó foram 92,9-98,0% e 91,6-102,8%, respectivamente. Foi demonstrado que o método de MISPE proposto pode ser aplicado para a determinação direta de melamina em produtos lácteos. LI *et al.* (2006), desenvolveram um método de preparação de microesferas impressas molecularmente para determinar a melamina no leite. A recuperação da melamina variou nas amostras com valores de 93,1-101,3%. Enquanto que AGUI *et al.*, (2010) estudaram um método para determinação simultânea de quatro fluoroquinolonas de uso veterinário (ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina and sarafloxacina) em duas matrizes complexas, leite cru bovino e rim de porco, utilizando a técnica de MISPE.

Dentro dessa técnica de impressão molecular, este trabalho avalia a utilização dos polímeros impressos molecularmente para remoção de lactose do leite por adsorção utilizando como *template* a molécula de lactose.

### 3.5.1 Caracterização do adsorvente

Polímeros de redes macroscópicas são notoriamente difíceis de caracterizar, em grande parte por conta de sua insolúvel e intratável natureza. A exceção a regra não é observada para os polímeros impressos molecularmente, contudo possui vantagens que justifique o seu uso como por exemplo a reutilização no processo de extração após tratamento de sanitização, entre outros. A caracterização do PIM para informações complementares das propriedades do sistema além da eficiência da extração são: caracterização físico-química (análise

termogravimétrica-TGA, Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier -FTIR) e morfológica (microscopia eletrônica de varredura -MEV, Brunauer-Emmett-Teller -BET) (CORMACK *et al.*, 2010) . Os espectros FTIR de polímeros impressos podem ser analisados, por exemplo, com um disco de brometo de potássio (KBr) ou com um único grânulo ou partícula e em seguida, aplicado de um modo semelhante ao de micro-análise elementar para extrair a informação quantitativa sobre a composição do polímero. É também possível utilizar FTIR para sondar as interações não covalentes, por exemplo, ligações de hidrogênio (SOARES *et al.*, 2004).

É possível investigar a morfologia dos polímeros impressos da mesma que na maioria dos sólidos porosos. Dependendo do método de análise, a informação útil pode ser recolhida sobre os volumes de poros específicos, tamanhos de poro, distribuição e tamanho de poro e área específicos da superfície dos materiais. Entre esses métodos analíticos adequados incluem: a adsorção de nitrogênio e microscopia eletrônica de varredura (SOUZA *et al.*, 2013).

A adsorção de nitrogênio envolve uma determinada massa de polímero seco, sendo exposta a um gás (geralmente azoto), a uma série de pressões fixas. Ao medir a quantidade de gás absorvida como uma função da pressão pode ser construída isotermas de sorção. Após a aplicação da teoria (BET) e em modelos matemáticos, a informação sobre a área superficial específica ( $m^2/g$ ), volume específico de poros ( $mL/g$ ), diâmetro médio do poro e distribuição de tamanho de poro, pode ser obtido. O método é particularmente útil para analisar com detalhe médio poro (meso-) e pequenos poros (micro-). As definições de tamanho aos poros de acordo com a IUPAC são os seguintes: microporos,  $<2$  nm;  $2$  nm  $<$  mesoporos,  $<50$  nm; macroporos  $>50$  nm (LOWELL *et al.*, 2004). HOLLAND *et al.* (2010) examinou a morfologia do polímero impresso utilizando como *template* a 2-aminopiridina variando a quantidade de monómero de reticulação (EGDMA). Técnicas típicas de caracterização de polímeros incluem microscopia óptica (por exemplo, Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV). A microscopia pode ser usada em uma variedade de formas diferentes e em diferentes escalas.

Os polímeros impressos, por exemplo, na microscopia de luz pode ser utilizado para verificar a integridade estrutural dos poros do polímero, enquanto que a microscopia eletrônica de varredura (MEV), muitas vezes pode ser usado para obter a imagem de macroporos (CRISTALLINI *et al.*, 2003). Outros métodos de análise dos polímeros de impressão molecular são as análises térmicas (por exemplo, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) (VARGHESE *et al.*, 2001). A



caracterização físico-química dos polímeros impressos molecularmente e dos eluentes após a extração da molécula alvo permite a análise global do sistema e assim a possível aplicação do produto obtido em outros processos industriais. Na literatura ainda não existem relatos da aplicação de leite com baixo teor de lactose obtidos pela extração utilizando a tecnologia de impressão molecular para a aplicação de novos produtos como, por exemplo, leite e bebidas lácteas funcionais.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesta seção são apresentados os principais materiais e a metodologia utilizada neste trabalho para a remoção de lactose do leite, avaliação da capacidade de adsorção do adsorvente, caracterização físico-química do adsorvente, avaliação da composição centesimal, microbiológica e sensorial do leite e bebidas lácteas com baixo teor de lactose.

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Reagentes analíticos**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: o Tetraetilortossilicato-TEOS (98%) adquirido da Sigma Aldrich Co (Milwaukee, WI, EUA); lactose (pureza > 99%) adquirido da Sigma Aldrich; acetonitrila (99,9%), hexano (65%); peróxido de hidrogênio (32%); hidróxido de sódio (97%); ácido clorídrico (37%); hidróxido de amônia (30%); clorofórmio (99,8%) e etanol (99,8%) adquiridos da Vetec. Os demais reagentes utilizados foram P.A. de grau analítico.

#### **4.1.2. Leite**

Amostras de leite bovino tipo C, foram provenientes dos produtores de leite na bacia leiteira de Nossa Senhora da Glória, localizada no nordeste do Brasil, no oeste do Estado de Sergipe, na micro-região do sertão do rio São Francisco. As amostras, embaladas em sacos plásticos, foram acondicionadas sob refrigeração em caixas térmicas, e transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), distante 112 km do ponto de coleta e onde ficaram sob congelamento (-20°C) até o uso.

#### **4.1.3. Polpa de fruta**

As polpas de mangaba congelada e sem conservantes, foram obtidas no supermercado da cidade de Aracaju, acondicionadas e transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), onde foram congeladas a (-20 °C).

#### **4.1.4. Grãos de kefir**

Os grãos de kefir utilizados neste estudo foram obtidos junto à Pastoral do Menor e preservados no Laboratório de Pesquisa em Alimentos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

Os grãos de kefir foram cultivados à temperatura ambiente (25 °C) em solução de açúcar mascavo a 10% (p/v).

## **4.2. Metodologia experimental**

Os procedimentos experimentais foram: a preparação dos sólidos adsorventes obtidos pela técnica sol-gel, as colunas de leito fixo para a adsorção da lactose do leite ou solução sintética; a obtenção da bebida láctea com polpa de mangaba.

### **4.2.1. Estudo da solubilidade da lactose**

A solubilidade da lactose foi determinada conforme descrito por BRITO (2007). O procedimento foi conduzido em reatores cilíndricos de vidro encamisado, com capacidade de 25 mL nas seguintes condições: 28,8 e 48,8 g de lactose, 100 mL de água destilada, variando a temperatura entre de 30 a 70 °C, sob agitação (350 rpm) e sem agitação. A partir da condição de solubilidade selecionada, foi preparado o polímero impresso molecularmente (PIM).

### **4.2.2. Preparação dos adsorventes**

Neste trabalho foram preparados dois tipos de adsorventes utilizando a técnica sol-gel, e como precursor dos grupos silanóis, o Tetraetilortossilicato – TEOS: o adsorvente impresso molecularmente com a solução de lactose (Polímero Impresso Molecularmente/PIM) e o adsorvente sem adição de lactose (Matriz pura/MP). O TEOS, por ser altamente higroscópico foi manipulado, durante a pesagem e preparação das soluções, em ambiente de atmosfera controlada, ou seja, em atmosfera inerte, utilizando gás nitrogênio. A metodologia de preparo do adsorvente puro e do adsorvente impresso molecularmente fundamentou-se no procedimento descrito por SOARES *et al.* (2007).

No preparo do adsorvente MP, 30 mL de TEOS foi dissolvido em 36 mL de etanol, absoluto sob atmosfera inerte de nitrogênio. Foi adicionado 0,11 mL de ácido clorídrico diluído em 5 mL de água ultra pura (solução pré-hidrolisante); a mistura foi agitada (20 rpm) durante 90 min a 35 °C. Posteriormente adicionou-se 1 mL de hidróxido de amônia diluído em 6 mL de etanol (96%) (solução de hidrólise), a mistura foi mantida estática a 4 °C durante 18 horas para efetuar a poli-condensação. O gel obtido foi lavado com água a 60 °C e seco à vácuo e temperatura ambiente por 24 h.

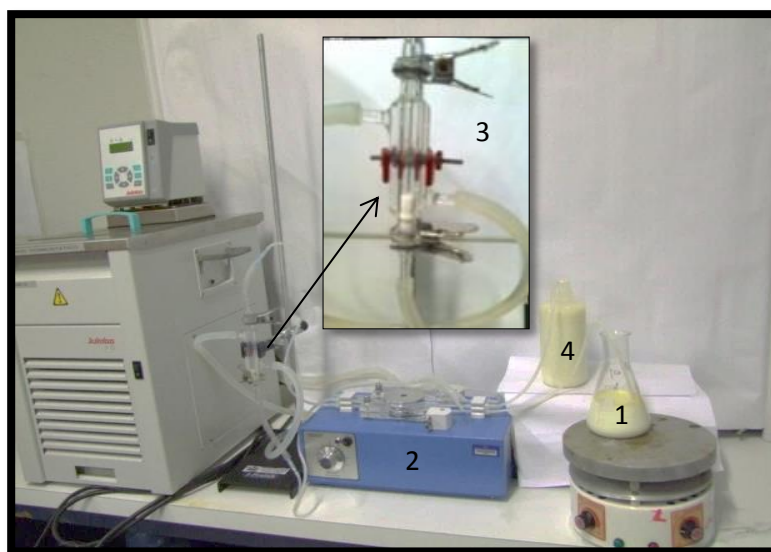
Para a síntese do adsorvente PIM, o procedimento foi análogo ao descrito para o MP exceto a etapa de adição da solução de lactose (3 g de lactose/10 mL de água) antes da adição

do hidróxido de amônia. A distribuição granulométrica do gel seco de MP e PIM foram determinadas por meio de separação utilizando conjunto de peneiras da série ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de forma manual obtendo partículas de tamanho entre 48 e 65 mesh.

#### 4.2.3. Avaliação da remoção de lactose em coluna de leito fixo no processo em batelada (Ensaio Preliminares)

Foram conduzidos experimentos preliminares com o objetivo de avaliar a melhor altura de leito para a adsorção de lactose presente em solução sintética de lactose ou leite.

A solução sintética era composta de lactose diluída em água ultrapura com uma concentração de 40 g/L, normalmente encontrados no leite. Os experimentos foram conduzidos em testes bateladas, por meio da percolação de 10 mL da solução sintética de lactose ou do leite pela coluna recheada com MP ou PIM, em diferentes alturas do leito (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 cm). Os fluidos foram alimentados por meio de uma bomba dosadora peristáltica (Modelo BP-60) no sentido descendente na vazão de 3 mL/min. O banho termostático foi utilizado a 60 °C. A temperatura de 60 °C foi selecionada nesta etapa devido a maior solubilidade da lactose encontrada em água a essa temperatura. Nesse experimento, foi utilizada uma coluna de vidro, com diâmetro de 1 cm e altura de 10 cm, na base da coluna foi utilizada lã de vidro sinterizada para impedir que as pequenas partículas de adsorvente passassem para o restante da unidade experimental. A Figura 4.1 apresenta a unidade experimental de adsorção de lactose.



**Figura 4.1:** Unidade experimental de adsorção de lactose: (1) Reservatório de alimentação; (2) Bomba peristáltica; (3) Coluna de vidro encamisada contendo o adsorvente; (4) Reservatório para coleta do efluente (leite com baixo teor de lactose).

O acompanhamento do desempenho dos sistemas utilizados foi feito pela análise de lactose que foi retida pelos materiais adsorventes. As amostras foram coletadas em vidro âmbar de 20 mL e analisadas posteriormente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi calculada a concentração média por meio da média aritmética dos valores de todas as amostras retiradas durante cada experimento, obtendo-se, dessa forma a concentração média e a porcentagem de remoção de lactose (%) para cada ensaio. Para cada experimento foram coletas cerca de 20 amostras, os quais foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4. Avaliação da remoção de lactose em coluna de leito fixo em fluxo contínuo (ensaio preliminares)

Nessa fase, foi avaliada a adsorção da lactose em sistema contínuo nas proporções de altura do leito escolhida de acordo com o desempenho apresentado nos experimentos em batelada (5 cm). O sistema contínuo foi ampliado para averiguar o tempo de quebra ou de “breakthrough” (de saturação do leito), pois o processo batelada em coluna, não foi suficientemente conclusivo sobre esse parâmetro, com isso, foi necessário empregar o aumento de escala da coluna para obtenção de parâmetros de capacidade de adsorção ( $q_0$ ) do leito e outros parâmetros cinéticos.

O sistema contínuo foi constituído de uma coluna de vidro encamisada, com diâmetro interno de 2,5 cm e 20 cm de altura. A altura do leito constituído com recheio MP e PIM foi de 7,5 cm. Ao longo dos ensaios experimentais, amostras foram coletadas na base da coluna em intervalos variados de modo a se ter um bom estudo do processo. Na corrente de eluente (leite), as amostras foram coletadas em vidro âmbar de 50 mL no tempo 0 e nos intervalos de 1 em 1 minuto até 5 minutos, 5 em 5 minutos até 30 minutos, 30 em 30 minutos até 3 horas e posteriormente de hora em hora até 6 horas. Em seguida, as amostras foram congeladas a -10 °C para posteriores análises cromatográficas.

Após a confirmação do tempo de saturação dos adsorventes, foi avaliado o efeito das variáveis operacionais sobre a adsorção de lactose na coluna empacotada por um planejamento fatorial fracionado ( $2^{4-1}$ ), com quatro variáveis independentes (vazão, temperatura, tamanho de partícula e altura do leito) e capacidade de adsorção ( $q_0$ ) como variável dependente. Três repetições no ponto central foram incluídos de acordo com a Tabela 4.1.

Os materiais adsorventes foram separados em peneiras vibratórias da Série Tyler utilizando peneiras adequadas (padrão ABNT) em diferentes frações com granulometria na faixa de 48 e 65 mesh, 35 e 48 mesh e 28 e 35 mesh. O tamanho da partícula que corresponde

a 0,161 mm (42-60 mesh) foi usado devido a limitação das peneiras, por isso o valor não corresponde à metade do valor no ponto central e no valor mínimo do planejamento de experimentos.

**Tabela 4.1:** Matriz codificada e decodificada de planejamento fatorial incompleto  $2^{4+1}$  para estudar a capacidade de adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo utilizando MP e PIM.

Ensaio	Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			
	T (°C)	G (µm)	h (cm)	Q (mL/min)	T (°C)	G (µm)	h (cm)	Q (mL/min)
1	-	-	-	-	34	250	7,5	3
2	+	-	-	+	60	250	7,5	9
3	-	+	-	+	34	500	7,5	9
4	+	+	-	-	60	500	7,5	3
5	-	-	+	+	34	250	12,5	9
6	+	-	+	-	60	250	12,5	3
7	-	+	+	-	34	500	12,5	3
8	+	+	+	+	60	500	12,5	9
9	0	0	0	0	47	355	10,0	6
10	0	0	0	0	47	355	10,0	6
11	0	0	0	0	47	355	10,0	6

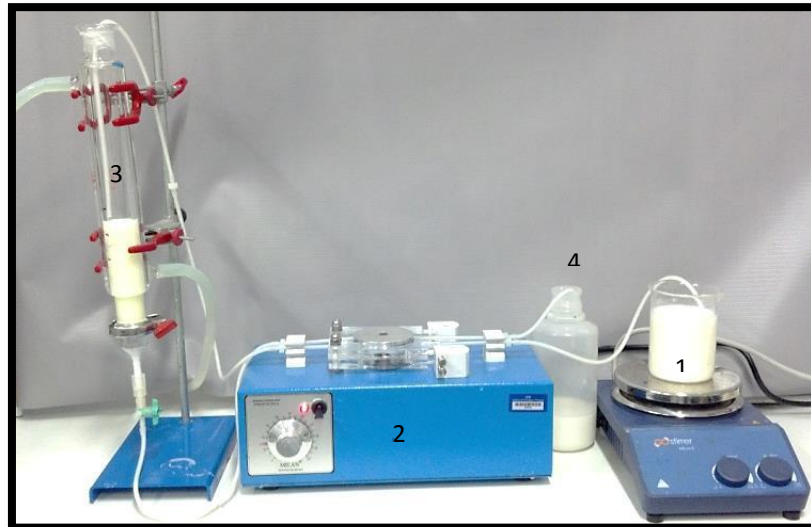
A capacidade de adsorção ( $q_0$ ), expressa em mg de lactose por g de adsorvente (mg/g), foi obtida para cada ensaio através do Balanço de Massas que corresponde a equação 1.

$$\int_0^t \frac{\dot{Q}C_0 - \dot{Q}C}{C_0} dt = \frac{q_0 m}{C_0} + \frac{\epsilon \pi D^2}{4} H \frac{C}{C_0} \quad (1)$$

Onde,  $Q'$  representa a vazão,  $\epsilon$  porosidade do leito,  $q_0$  capacidade de adsorção,  $C_0$  (concentração inicial),  $C$  concentração na saída do leito ao longo do tempo,  $H$  altura do leito,  $m$  massa do adsorvente e  $t$  tempo.

#### 4.2.5. Adsorção em coluna de leito fixo

A avaliação da capacidade de adsorção das matrizes hidrofóbicas (MP e PIM) foi realizada em sistema contínuo com ampliação de escala em uma coluna de leito fixo. A representação do módulo experimental está ilustrada na Figura 4.2.



**Figura 4.2:** Unidade experimental de adsorção de lactose em ampliação de escala. (1) Reservatório de alimentação (Leite Tipo C); (2) Bomba dosadora peristáltica; (3) Coluna de vidro contendo o adsorvente; (4) Reservatório para coleta do efluente (leite com baixo teor de lactose).

Inicialmente, a coluna foi carregada com o adsorvente (MP ou PIM), posteriormente, adicionou-se cerca de 100 mL de água deionizada na coluna a fim de hidratar o recheio. Após 30 min, a água de hidratação foi escoada, e a altura do leito foi trabalhada de acordo com o planejamento experimental (Tabela 4.1) para a execução dos ensaios experimentais. Em seguida, o leite foi alimentado de forma descendente à coluna previamente inundada com água, por meio de uma bomba peristáltica nas vazões correspondentes ao planejamento experimental avaliado. O banho termostático empregado garantiu as temperaturas estudadas e manteve a temperatura constante na coluna, em virtude da recirculação de água no sistema. Ao longo dos ensaios experimentais realizados em triplicata, amostras foram coletadas na base da coluna em intervalos de tempo pré-estabelecidos, para obtenção dos dados para a construção das curvas de ruptura ( $C_0/C_F$  versus  $t$ ). As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em relação às concentrações de lactose. A coleta de amostras foi realizada até que o equilíbrio fosse alcançado no sistema, ou seja, até que a concentração de lactose na fase fluida se mantivesse constante ao longo da coluna e igual à concentração de alimentação.

#### 4.2.6 Modelagem da dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo

Para o estudo da modelagem fenomenológica e averiguar a aplicabilidade dos modelos selecionados (Força Motriz Linear e Bohart-Adams), foram escolhidos alguns ensaios do

planejamento de experimentos com PIM (ensaios E1, E2, E5, E6). Esses experimentos foram escolhidos com base nos pontos extremos das variáveis, temperatura, vazão e altura do leito, como representativos para testar a validade dos modelos. Para efeito comparativo com o E5 realizado com PIM foram aplicados os modelos ao experimento E5\*, realizado com MP nas mesmas condições operacionais, como mostrado na Tabela 4.2.

No tendo informação acerca da forma das isotermas de equilíbrio da lactose do leite na adsorção em PIM, onde pode haver interferência de vários outros componentes, dois modelos simples foram escolhidos para o ajuste das curvas de ruptura de alguns dos ensaios realizados. Os modelos escolhidos correspondem a dois casos ideais e limites de relações de equilíbrio: isoterma linear com o modelo de Força Motriz Linear e isoterma irreversível utilizando o modelo de Bohart e Adams, que considera uma cinética quase-química..

#### 4.2.6.1 Modelo de Força Motriz Linear com Isoterma de Equilíbrio Linear

Na construção do modelo matemático foram realizadas as seguintes considerações: processo isotérmico e isobárico, porosidade do leito e propriedades físicas da fase líquida constantes, resistência à transferência de massa radial negligenciável, equilíbrio na interface sólido líquido. As variáveis de operação para avaliar a dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo estão descritas na Tabela 4.2.

**Tabela 4. 2:** Variáveis de operação para avaliar a dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Vazão (mL/min)</b>	<b>Altura do leito (cm)</b>
<b>E1</b>	34	3	7,5
<b>E2</b>	60	9	7,5
<b>E5</b>	34	9	12,5
<b>E6</b>	60	3	12,5
<b>E5*</b>	34	9	12,5

\* MP - adsorvente sem a impressão molecular de lactose.

Como o modelo leva em conta a resistência à transferência de massa na fase sólida (modelo Força Motriz Linear), a força motriz para esta transferência é representada por uma função linear em relação à concentração do adsorvato no adsorvente. Foi feito o ajuste das curvas de ruptura empregando o Excel com a ferramenta Solver. A equação utilizada foi o modelo da Força Motriz Linear, destacada por RUTHVEN (1984). Com a utilização dessa ferramenta computacional, foram estimados o coeficiente global de transferência de massa (k)



e a constante de equilíbrio (K). O modelo da Força Motriz Linear com isoterma de equilíbrio linear, dado pela seguinte equação (2):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k(q - q^*) = kK(C - C^*) \quad (2)$$

Fornece a seguinte solução assintótica para  $\xi$  suficientemente grande:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}(\sqrt{\xi} - \sqrt{\tau}) \quad (3)$$

$$\tau = k\left(t - \frac{z}{v}\right) \quad (4)$$

$$\xi = \frac{kKz}{v} \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (5)$$

Onde  $q$  representa a concentração do sorvato na fase sólida,  $C$  a concentração do sorvato na fase líquida,  $C_0$  concentração do sorvato na entrada do leite,  $q^*$  e  $C^*$  concentrações em equilíbrio,  $t$  o tempo,  $z$  coordenada axial,  $\xi$  coordenada axial adimensional e  $\tau$  tempo adimensional.

#### 4.2.6.2 Modelo de Bohart e Adams

As equações fundamentais que descrevem a relação entre a concentração normalizada,  $C/C_0$ , e o tempo, para um sistema com fluxo contínuo, foram estabelecidos por Bohart e Adams (1920) como descrito por RUTHVEN (1984), para isoterma de equilíbrio irreversível (retangular), com expressão da taxa cinética quase-química (equação 6). Este modelo assume que os efeitos de transferência de massa devido à dispersão axial e radial são negligenciáveis e que a taxa de adsorção é proporcional à capacidade residual do adsorvente e a concentração das espécies adsorvidas. No modelo ainda é considerado que a velocidade do fluido e a capacidade de retenção do leite são constantes ao longo da coluna. Não leva em conta as resistências de transferência externa e interna, e despreza o efeito da dispersão axial e supõe que o adsorvato se adsorve diretamente na superfície do sólido. As curvas de ruptura

obtidas através deste modelo são simétricas e não consideram a difusão no interior das partículas do sólido (RUTHVEN *et al.*,1984).

$$\frac{\partial q}{\partial t} = kC(q_s - q) \quad (6)$$

A solução analítica obtida por Bohart e Adams (RUTHVEN, 1984), para representar as curvas de ruptura pode ser representado pela Equação 7 :

$$\frac{C}{C_0} = \frac{\exp\left(kC_0\left(t - \frac{Z}{v}\right)\right)}{\exp\left(kC_0\left(t - \frac{Z}{v}\right)\right) + \exp\left(\frac{kq_s Z}{v}\left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)\right) - 1} \quad (7)$$

Sendo  $u = \varepsilon v$  e  $N_0 = q_s (1 - \varepsilon)$

Onde:  $C_0$  a concentração inicial da lactose na solução afluyente à coluna (mg/L),  $C$  é a concentração de lactose (mg/L) no tempo  $t$  (min), na solução efluyente à coluna,  $k$  é a constante da velocidade de adsorção linear (L/mg.min),  $z$  é a altura do leito (cm),  $v$  é a velocidade intersticial (cm/min),  $\mu$  é a velocidade superficial (cm/min),  $q_0$  capacidade de adsorção do adsorvente (mg/g),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $N_0$  é a capacidade de adsorção do adsorvente por unidade de volume de leito (mg/mL).

Na resolução deste modelo, os valores dos parâmetros constante de adsorção ( $k$ ) e constante de equilíbrio ( $N_0$ ) foram ajustados a partir de dados experimentais da curva de ruptura da lactose em coluna de leito fixo, utilizando-se de método de otimização não-linear, método do gradiente reduzido generalizado.

#### 4.2.7 Processo fermentativo para elaboração da bebida láctea

Foi adotada a melhor condição de fermentação de acordo com o trabalho de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (Estudo da Obtenção e Ação de Produtos Lácteos Funcionais e Probióticos). A condição previamente estabelecida foi: leite bovino sem ou com remoção lactose obtido a partir do E5 do planejamento de experimentos, 15% de leite em pó e 10% de grãos de kefir a temperatura de 45 °C durante 24 h (GAMA, 2010). A fermentação ocorreu de forma estática em frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo

700 mL do meio (leite bovino e 15% de leite em pó). O meio foi pasteurizado a 80 °C por 10 minutos e resfriado rapidamente em banho de gelo e em seguida adicionado os grãos de kefir. Após o período de fermentação (24 h), a bebida láctea foi filtrada para retirada dos grãos de kefir e posteriormente foram saborizadas com 15% de polpa de mangaba.

### **4.3. Métodos analíticos e análise sensorial**

#### **4.3.1. Determinação da concentração de lactose**

A dosagem de lactose nos experimentos com PIM e MP, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na determinação de concentração de lactose nos experimentos com PIM, foi empregado o cromatógrafo Shimadzu, detector *Evaporative Light Scattering Detection* (ELSD) (ELSD-LT II) e *software* (LC Solution). A coluna analítica utilizada para todos os ensaios foi a Luna NH<sub>2</sub> (150 x 4,6 mm) (Phenomenex) com grupos amina ligados quimicamente à sílica. A fase-móvel utilizada era constituída de 50% de acetonitrila e 50 % de água Milli-Q, fluxo de 1,5 mL/min, volume de injeção da amostra de 10 µl, sendo o tempo total de análise de 10 minutos (BUHRING *et al.*, 2011).

Nos experimentos utilizando MP foi utilizado, um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Shimadzu Co (modelo LC-10), equipado com forno (45 °C), injetor automático de amostras, detector de Índice de Refração (IR), marca Shimadzu Co (modelo RID 6 A), com fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila:água (60:40 v/v) com vazão de 1,5 mL/min. Foi preparada a curva de calibração para a dosagem de lactose nos experimentos usando MP e PIM e apresentadas no ANEXO 1. As amostras foram diluídas em água ultrapura, filtradas e injetadas no equipamento.

Para a quantificação de lactose nos experimentos utilizando PIM, foi usado o cromatógrafo líquido com detector ELSD, pois era o equipamento disponível e encontrava-se no Departamento de Química na Universidade Federal de Sergipe, entretanto o uso desse equipamento tornou-se oneroso devido ao elevado consumo de nitrogênio. Enquanto que os experimentos utilizando o adsorvente MP, foram realizados no cromatógrafo líquido com detector de Índice de Refração no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia no Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

#### **4.3.2. Caracterização físico-química do leite tipo C, leite com baixo teor de lactose e das bebidas lácteas fermentadas**

A determinação de cinzas, umidade, acidez total titulável, e açúcares foram feitas de acordo com os métodos descritos nas “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008)”.

Enquanto que a dosagem de lipídeos foi determinada de acordo com (BLIGH & DYER, 1959). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.2.1. Determinação de cinzas

Foi feita por meio de calcinação de 3 g de amostra em uma mufla a 550°C. O material foi deixado na mufla até que o resíduo apresentasse uma coloração branca ou cinza claro.

#### 4.3.2.2. Determinação de umidade

Baseou na determinação da perda de massa fresca de uma amostra de 2g de produto lácteo, em estufa a 105°C, até peso constante.

#### 4.3.2.3. Determinação da acidez total titulável

Pesou-se 10 g da amostra em um béquer, adicionou-se 10 mL de água isenta de gás carbono e misturou-se com bastão de vidro. Adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 M, até o aparecimento de uma coloração rósea.

#### 4.3.2.4. Determinação de proteínas pelo método de Micro-Kjeldahl

A proteína foi quantificada pelo método de Kjeldahl, o qual está baseado na determinação do teor de nitrogênio da amostra. Esse método compreende três etapas: digestão da amostra, destilação e titulação. No primeiro momento, foi feita a digestão de 0,2 g de amostra, a qual foi pesada, digerida com ácido sulfúrico concentrado na presença de 1,5 g de catalisador (96%  $K_2SO_4$  + 4%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Em seguida, ocorreu a reação do bissulfato de amônio formado com hidróxido de sódio para a liberação de amônia, dentro de um volume conhecido de ácido bórico. O borato de amônio formado foi dosado com uma solução padronizada de ácido clorídrico para obtenção do teor de nitrogênio. A conversão do teor de nitrogênio em proteína foi feita através do fator de conversão 6,38, utilizado para leite e derivados.

#### 4.3.2.5. Determinação de lipídeos

A determinação de lipídios foi de acordo com a metodologia descrito por BLIGH e DYER (1959). Pesou-se 2 g da amostra que foi transferida para um tubo de 70 mL. Em seguida, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada, agitou-se por 3 min, adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%, agitou-se vigorosamente por 2 min. Deixou-se separar as camadas

naturalmente por 2 minutos, succionou-se a camada metanólica superior e descartou-se. Em seguida, filtrou-se a camada inferior em papel de filtro quantitativo, mediu-se exatamente 5 mL do filtrado e transferiu-se para um béquer de 50 mL, previamente tarado, que foi colocado em estufa a 100 °C para evaporar o solvente. Esfriou-se em dessecador e pesou-se.

#### 4.3.2.6. Determinação do pH

Transferiu-se uma alíquota de 10 g da amostra para um béquer e diluiu-se com 100 mL de água destilada. Utilizou-se um pHmetro da Digimed DM-20, previamente calibrado para medida do pH.

#### 4.3.2.7. Determinação da concentração de carboidrato

O carboidrato da amostra foi determinado pelo método da diferença, no qual o teor foi obtido pela equação 8.

$$\text{Carboidrato} = 100 - \text{umidade} - \text{cinzas} - \text{proteínas} - \text{lipídios} \quad (8)$$

#### 4.3.2.8. Determinação de energia

Foi calculado com base na suposição de que o teor de carboidrato, lipídios e proteína contribuem com 4, 9 e 4 vezes respectivamente, no cálculo da energia contida em 100 g de amostra, como indicado na equação 9.

$$\text{Energia} = 4 \times \text{carboidrato} + 9 \times \text{lipídios} + 4 \times \text{proteínas} \quad (9)$$

#### 4.3.2.9. Determinação de açúcares redutores

Pesou-se aproximadamente 2 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de água. Completou-se o balão com água destilada e em seguida, filtrou-se, em papel de filtro, para um Erlenmeyer de 300 mL, até que o filtrado ficasse límpido. Em um balão de 300 mL, adicionou-se 10 mL de cada solução de Fehling A e B, adicionando-se 40 mL de água. Aqueceu-se a solução até a ebulição, adicionando-se, às gotas e agitando sempre, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição até que esta última passasse de azul para incolor e ficasse, no fundo do balão, um resíduo vermelho tijolo.

#### 4.3.2.10. Determinação de açúcares redutores totais

Pesou-se, aproximadamente, 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transferiu-se para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água. Acidificou com 2 mL de ácido clorídrico, aqueceu-se em banho-maria por 15 min e resfriou-se. Neutralizou-se com hidróxido de sódio a 30%, verificou-se o pH (0-14) utilizando-se fita indicadora. Transferiu-se para um balão de 250 mL, adicionou-se 5 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, completou-se o balão com água. Filtrou-se para um Erlenmeyer de 300 mL e o filtrado deverá estar límpido. Em um balão de 300 mL, adicionou-se 10 mL de cada solução de Fehling, 40 mL de água e aqueceu-se até a ebulição. Transferiu-se o filtrado para uma bureta e adicionou-se, gota a gota, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até a solução passar de azul para incolor e ficasse, no fundo do frasco, um resíduo vermelho tijolo.

#### 4.3.2.11. Viscosidade

A viscosidade foi determinada em viscosímetro Visco Star-r, Modelo v10002, com adaptador para amostras de pequeno volume (200 mL). Utilizou-se *spindle* número R2 e velocidade angular de 50 rpm permanecendo em torno de 2 minutos sem controle de temperatura. A temperatura inicial das amostras foi de 10°C.

#### 4.3.3. Análise microbiológica

As análises microbiológicas do leite foram realizadas segundo a metodologia do Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA *et al.*, 2001).

##### 4.3.3.1. Contagem de Coliformes Totais e Termo Tolerante

Uma alíquota de 25 g foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de solução diluente (solução salina peptonada). As alíquotas foram homogeneizadas, com finalidade de se obter a diluição inicial ( $10^{-1}$ ). A mesma foi homogeneizada e, em seguida, foi transferida 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada (SSP), 0,1% obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . O mesmo procedimento foi repetido para as demais diluições.

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termo tolerante, utilizaram-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  do alimento em estudo. Foram tomados três tubos contendo 8 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo um tubo de Durham

invertido. Foram incubados em estufa a temperatura de 35-37 °C, por 24-48 h. Os positivos foram semeados em tubos contendo 8 mL de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB), com tubo de Durham invertido, incubando-os a 35 °C, durante 24-48 h. A prova foi considerada positiva somente quando se verificou turvação do meio e produção de gás nos tubos de Durham, dentro de um período de incubação máximo de 48 h. A determinação quantitativa foi realizada de acordo com a técnica do NMP, recomendada pela *American Public Health Association*. Para a etapa confirmativa de coliformes fecais tolerantes, uma alçada de cada cultura foi tomada dos tubos positivos de LST e transferida para tubos de Caldo *E. coli* (EC), contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 45,5 °C, em banho-maria, para determinação de coliformes termo tolerantes. Após a incubação por 24-48 horas foi realizada leitura, e os tubos que apresentavam turvação do meio e produção de gás foram considerados positivos para bactérias do grupo coliformes termo tolerantes. Para cada diluição, o número de tubos positivos foi anotado e quantificado por meio da tabela de NMP, determinando, assim, o NMP de bactérias coliformes termo tolerantes por grama de leite analisado.

#### 4.3.3.2. Detecção de *Salmonella*

Uma alíquota de 25 g de amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de caldo Lactosado. As alíquotas foram homogeneizadas, e incubadas em estufa a 35°C por 18-20 h (pré-enriquecimento). Posteriormente, volumes de 1 mL foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina e caldo Tetrionato, respectivamente, e incubados a 41±1°C (enriquecimento seletivo). Após 24 h foram realizados repiques em placas de Agar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Agar Xilose Lisina Desoxicicolato (XLD), e incubados a 36°C por 18-24 h. Colônias típicas foram re-isoladas em tubos inclinados de Agar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) que foram incubados a 36°C por 18-24 h. As amostras foram submetidas aos testes de identificação bioquímica (teste de urease; teste de indol; teste de fermentação da lactose e sacarose; teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer; teste de citrato e teste de descarboxilação da lisina em caldo).

#### 4.3.4. Análise sensorial

O procedimento de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Tiradentes, parecer 991.947/15. Os leites e bebidas lácteas obtidos foram avaliados quanto à proximidade dos parâmetros sensoriais em relação à amostra padrão para o teste sensorial da “diferença do padrão” por meio da ficha de avaliação de acordo com

o ANEXO 2. Em seguida foram realizados os testes de aceitação empregando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos (ANEXO 3) ancorada com termos verbais nos extremos “desgostei muitíssimo” (1) e gostei muitíssimo (9) (STONE e SIDEL, 2004) e indicarão a intenção de compra.

Os leites e as bebidas lácteas com baixo teor de lactose utilizando PIM ou MP e leite integral foram avaliados quanto aos parâmetros sensoriais aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. A aceitabilidade das amostras foi avaliada com a participação de no mínimo 30 provadores não treinados, recrutados levando-se em conta sua disponibilidade, interesse e frequência de consumo de leite. Antes da realização do teste, os consumidores eram advertidos sobre a presença de possíveis reações alérgicas devido à ingestão do produto, sendo possível a sua desistência em participar da análise. O teste foi realizado em laboratório, sob condições controladas. Cada provador recebeu aproximadamente 30 mL da amostra, de forma monádica, sendo servida em copo descartável codificado com números de três dígitos aleatórios, sendo-lhe solicitado provar o produto e avaliar a amostra de uma forma global (modo geral), e quanto ao sabor, utilizando uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos. Junto com as amostras foi fornecida água à temperatura ambiente e biscoito tipo água e sal a fim de neutralizar a interferência de sabor residual na avaliação entre as amostras. Os testes sensoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Alimentos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa na Universidade Tiradentes (LPA/UNIT), cujas instalações incluem cabinas individuais e controle de iluminação e temperatura ambiente.

#### 4.3.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o software Assistat - Statistical Assistance versão 7.6. A análise de variância (ANOVA) foi usada para detectar a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras. Foi utilizado o teste de Tukey para determinar os valores médios significativos.

#### **4.4. Métodos de caracterização morfológica e físico-química do leite**

A caracterização dos adsorventes (MP, PIM, PIM-LAC) e do padrão de lactose (LAC), foi realizada pelos seguintes ensaios: análise estrutural por Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), análise térmica com o objetivo de identificar as transições térmicas ocorridas durante a queima das amostras, por meio da interpretação das curvas de DSC, obtidas pelo método acoplado das técnicas de TGA e DSC. Os termogramas de DSC e TGA foram obtidos para o levantamento da temperatura de



transição vítrea e da estabilidade térmica dos polímeros. Obtenção de imagens digitais por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), adsorção Brunauer-Emmett-Teller (BET) para determinar a área superficial específica, volume específico de poros, porosidade, e distribuição de tamanhos de poros.

#### 4.4.1. Caracterização físico-química das matrizes (PIM e MP)

As matrizes hidrofóbicas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

##### 4.4.1.1. Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR das amostras sólidas foi realizada em um Espectrofotômetro FTIR INTERSPEC 2020 modelo MB-3000. Cada amostra foi misturada com KBr 100x vezes para preparar as pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , para avaliação da impressão da biomolécula (lactose).

##### 4.4.1.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA foram obtidas no equipamento DTG-60H simultâneo com o DTA-TG Shimadzu e analisadas no software Thermogravimetric Analyser, tomando por base a perda da massa em função da temperatura. As seguintes condições operacionais foram utilizadas: razão de aquecimento de 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , na faixa de temperatura ambiente a 1000 $^{\circ}\text{C}$ , com variação de massa de 2 a 6 mg e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

##### 4.4.1.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras foram submetidas à análise de calorimetria (Equipamento DSC-Q20 TA), tomando por base a perda de calor em função da temperatura. Empregando as seguintes condições operacionais: razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , na faixa de temperatura ambiente a 400 $^{\circ}\text{C}$ ; vazão de nitrogênio de 50 mL/min e com variação de massa de 2 a 6 mg e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

#### 4.4.2. Caracterização morfológica das matrizes

A caracterização morfológica dos polímeros foi realizada pelas determinações da área superficial, diâmetro e volume de poro e também a densidade aparente e porosidade.

#### 4.4.2.1. Determinação de densidade e porosidade do leito

A porosidade do leito estático foi determinada experimentalmente pelo método anteriormente citado obtendo-se o valor de  $0,52 \pm 0,03$ . Entretanto, foi observado que nas condições de operação com percolação, ocorria compactação logo no início do processo. Em vista disto, optou-se por determinar a porosidade dinâmica mediante medição direta do volume de leite retido nos interstícios para diversas condições de operação, obtendo-se uma porosidade igual a  $0,095 \pm 0,005$ . Por melhor representar o comportamento real do sistema o valor de porosidade utilizado nos cálculos foi de 0,095.

O leito fixo foi caracterizado por meio de determinação da densidade e porosidade. A determinação da densidade e da porosidade do leito foi calculada inicialmente através da área e do volume da coluna vazia, utilizando os valores das suas dimensões (comprimento, L e diâmetro, D). Em seguida obtém-se a densidade aparente, que corresponde à relação de peso por unidade de volume do sorvente no leito. A determinação que nos mostra a relação massa/volume, ou seja, a densidade aparente ( $\rho_A$ ) é dada pelo método ASTM (*American Society for Testing and Materials*) no qual se completa uma proveta graduada de 100 mL com o material sorvente, e pesa-se o volume conhecido. A partir da densidade aparente é possível calcular o volume aparente ( $V_{ap}$ ) para uma determinada massa.

Posteriormente determina-se a densidade de empacotamento do leito ( $\rho_E$ ), representada por:

$$\rho_E = \frac{M_L}{V_L} \quad (10)$$

Logo:  $M_L$  representa a massa total do leito de partículas dentro da coluna e  $V_L$  é o volume total (interno) da coluna vazia.

A partir do valor de  $\rho_E$  determina-se a porosidade do leito ( $\varepsilon$ ), que representa a fração de vazios dentro da coluna preenchida com o sorvente, e pode ser expresso por:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_E}{\rho_A} \quad (11)$$

Sendo:  $\rho_E$  densidade de empacotamento e  $\rho_A$  densidade aparente.

#### 4.4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi investigada usando a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM; Hitachi S4100, Zeiss, Germany). Antes das análises, as amostras foram recobertas com filme de ouro, de espessura média de 12 nm. As micrografias foram obtidas utilizando-se voltagem de 10 kV e corrente entre 60 e 80  $\mu$ A.

#### 4.4.2.3. Caracterização Física em B.E.T. (BRUNAUER-EMMETT-TELLER)

As áreas de superfície das amostras: sílica pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM) e polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC), foram calculadas a partir da isoterma de adsorção pela teoria de BET (BRUNAUER, *et al.*, 1938). Os volumes dos poros e seus diâmetros foram calculados com base no modelo desenvolvido por Barret, Joyner e Halenda (BJH). As áreas superficiais foram avaliadas de acordo com a adsorção de nitrogênio usando o aparelho BET (Modelo NOVA 1200e). Antes da análise, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento a 120 °C por 48 horas, para eliminar a água existente nos poros das amostras.

### 4.5. Produção de Lipídios Estruturados (LE)

Tendo em conta as necessidades e exigências dos consumidores, a indústria alimentar tem procurado evoluir na fabricação de produtos de qualidade, naturais e saudáveis. Nesse sentido, a descoberta de que determinadas substâncias (presentes, concentradas, desenvolvidas ou adicionadas nos alimentos) podem modular algumas funções no organismo, garantido diversos benefícios e até mesmo prevenindo certas doenças. Esses alimentos são denominados alimentos funcionais que além de contribuir com a nutrição, contêm substâncias biologicamente ativas que produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde. Esses alimentos constituem hoje a prioridade de pesquisa na área de nutrição e tecnologia de alimentos, levando-se em conta o interesse do consumidor em alimentos mais saudáveis, que além de nutrir possam modelar o sistema fisiológico do organismo.

Estudos possibilitaram o reconhecimento de numerosos compostos presentes em alimentos que apresentam potencial para ajudar na manutenção da saúde e/ou na prevenção de doenças. Dentre os diversos segmentos da área de alimentos funcionais encontram-se os lipídios estruturados, os quais podem ser comercializados como triglicerídeos dietéticos (MLM) e sucedâneos de gordura de leite materno (SGLM) (TECELÃO *et al.*, 2012).

Esses compostos podem afetar os principais sistemas corpóreos - cardiovascular, digestivo, imune e nervoso. A produção de triacilgliceróis (TAGs) com cadeias média de ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e ácidos graxos de cadeia longa (L), na posição interna, do tipo MLM, tem aumentado interesse recentemente devido ao seu alto valor nutritivo. Estes lipídios estruturados dietéticos são de baixa caloria adequados para controlar a obesidade em pessoas com má absorção gordura e outros problemas do metabolismo (NUNES *et al.*, 2012).

A compreensão das propriedades nutricionais e funcionais dos lipídios tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias de modificação dos óleos e gorduras, com vista a melhorar os benefícios de saúde resultantes da ingestão destes compostos. É neste contexto que surge o interesse pela produção de lipídios estruturados (SL, “Structured lipids”) (SILVA, 2009).

Nesse contexto, este tema de doutorado foi avaliado a produção de lipídios estruturados tipo MLM utilizando lipases imobilizadas em diferentes suportes, contudo, verificou-se a possibilidade de uma futura aplicação desses lipídios estruturados e do produto obtido nesta tese, o leite com baixo teor de lactose, para preparar um molho branco, tipo “béchamel”, pobre em calorias e conseqüentemente em lactose, que poderá ser utilizado em muitas preparações como uma base para outros molhos mais complexos. Baseando-se no potencial deste novo produto, foi realizado o Doutorado Sanduiche no Instituto Superior de Agronomia na Universidade de Lisboa/Portugal no período de 09/2013 a 05/2014, cujos resultados foram discutidos em forma de artigo no ANEXO 6.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados, analisados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. Na primeira etapa, foi avaliada a solubilidade da lactose com o intuito de se obter as condições da solução da molécula molde para a impressão molecular. Após a determinação da solubilidade, foi preparado o polímero impresso molecular (PIM) e a matriz pura (MP) em coluna de adsorção no processo em batelada e contínuo, para avaliar a extração da lactose. Na segunda etapa foram realizadas, as caracterizações físico-química e morfológica do adsorvente obtido pela técnica de impressão molecular e matriz pura. Na terceira etapa serão apresentados os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do leite e das bebidas lácteas com baixo teor de lactose.

### 5.1. Estudo da Solubilidade da Lactose

A Tabela 5.1 apresenta os resultados experimentais de solubilidade da lactose em água, variando a temperatura e agitação, a fim de se obter a maior solubilidade de lactose em água para posterior inclusão da solução de lactose na síntese do polímero.

**Tabela 5.1:** Solubilidade da lactose a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Solubilidade (g/100g)	
	(Com agitação/350 rpm)	Sem agitação
30	29,2	28,2
40	30,4	30,0
50	40,4	40,0
60	42,4	40,0
70	47,6	48,8

As curvas de solubilidade da lactose estão sobrepostas e descritas a partir da Tabela 5.1, podem ser observadas no ANEXO 4. Este estudo foi realizado adicionando um solvente miscível, a água, e observou-se na Tabela 5.1, que com o aumento da temperatura, a solubilidade da lactose variou de 29,2 g/100g, a 30 °C, para 47,6 g/100g a 70 °C com agitação, além disso, a agitação não teve influência na solubilidade da lactose. E a maior solubilidade da lactose atingida foi de 48,8 g/100g em água sem agitação. BRITO (2007) avaliou a solubilidade da lactose em água a 33 °C e obteve 25,9 g/100g de lactose, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho, e para a temperatura de 60 °C encontrou cerca de 57,0 g/100g. Enquanto SANTOS (2012) encontrou uma solubilidade de 11,9 g/100g a 15 °C. De acordo

com FU *et al.*, (2012), a solubilidade das formas anoméricas da lactose ( $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose) está em função da temperatura. Segundo HOLSINGER (1997), as frações de  $\alpha$  e  $\beta$  lactose possuem solubilidades distintas, e a mutarrotação torna-se um fator importante na cristalização. Segundo WHITTIER (1944), quando a  $\alpha$ -lactose é colocada em água à temperatura de 15 °C, uma quantidade definida, de aproximadamente 7 g/100g, é dissolvida, sendo determinada como a solubilidade verdadeira da forma  $\alpha$ . O aumento da solubilidade, com o passar do tempo e aumento da temperatura, deve-se a mutarrotação, pois a forma  $\alpha$  é convertida em  $\beta$ , tornando a solução insaturada em relação à  $\alpha$ -lactose. Desta forma maior quantidade de alfa lactose pode ser dissolvida. O processo continua até que o ponto final de equilíbrio seja alcançado, aproximadamente 17 g/100g a 15 °C, entretanto neste estudo na temperatura de 70 °C foi observado uma solubilidade máxima de 48,8 g/100g (sem agitação) antes de atingir a saturação da solução, isso pode ocorrer pelo fato de lactose utilizada neste trabalho ser composta por 90% da forma  $\beta$ - e 30% da forma  $\alpha$ -, ou seja, para a solubilidade completa seria temperatura de 70 °C.

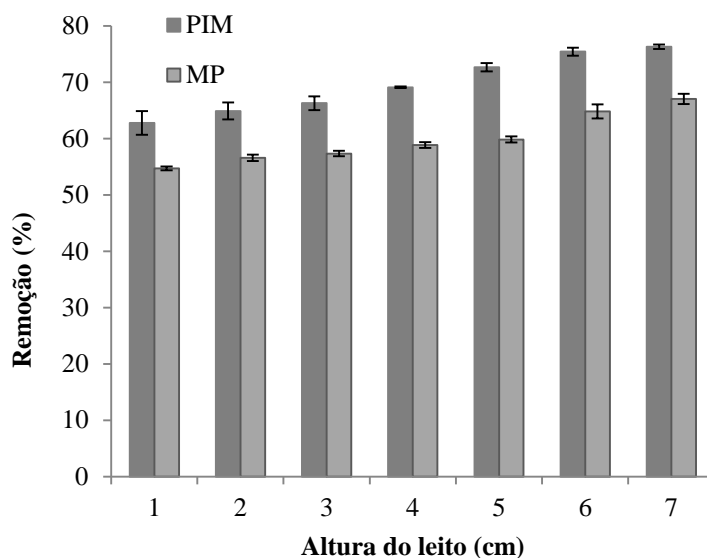
## **5.2. Estudo da remoção de lactose em sistema batelada**

Os ensaios foram realizados com a finalidade de saber qual dos adsorventes trabalhados removeria mais a lactose da solução sintética e do leite.

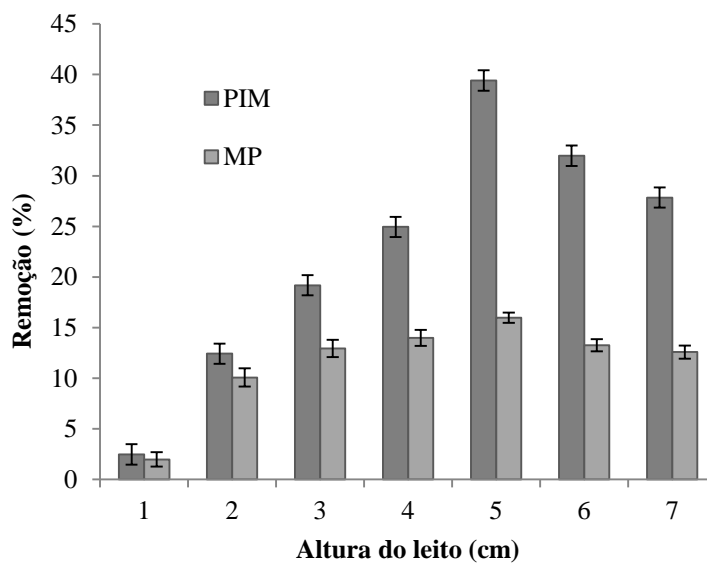
O estudo da remoção de lactose foi realizado utilizando coluna de adsorção recheada com adsorventes PIM ou MP, com a granulometria ideal entre 48 e 65 mesh utilizando-se peneiras adequadas (padrão ABNT) em diferentes alturas de leito (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 cm). Inicialmente foram realizados estudos com solução sintética de lactose e em seguida com leite tipo C. As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam os dados referentes à remoção de lactose em coluna de leito fixo recheada por MP ou PIM utilizando solução sintética e leite, respectivamente.

A eficiência da remoção de lactose para a solução sintética ou para o leite depende de alguns fatores, tais como: altura do leito e tipo de fluido (solução sintética ou leite). Com base nos resultados apresentados na Figura 5.1, pode-se afirmar que o aumento da altura do leito eleva a remoção de lactose quer para PIM ou MP. Valores maiores de remoção foram encontrados para PIM (62,8 a 76,3%) que em MP (54,7 a 67,06%), ambos em leito de 7 cm. O aumento da remoção da lactose na solução sintética está associado a maior quantidade de recheio, o PIM é mais seletivo por isso adsorve mais lactose. Verifica-se, nestes casos, que quanto maior a altura do leito, para uma mesma vazão, maior é o tempo para atingir a saturação do leito, conforme o esperado.

Na substituição do fluido para o leite tipo C (Figura 5.2), observou-se que a maior remoção de lactose ocorreu para PIM com 39,4% e 15,9% para MP, no leito de 5 cm de altura. Para alturas maiores que 5 cm foi observado diminuição da remoção, provavelmente devido a ocorrência do processo de dessorção confirmado através de análises cromatográficas, que a concentração final de lactose do leite estava maior que a inicial. Com isso, a altura de 5 cm foi selecionada para realizar os estudos de remoção de lactose.



**Figura 5.1:** Curvas de remoção de lactose da solução sintética comparado com ensaio em coluna recheada de MP e PIM nas diferentes alturas do leito.



**Figura 5.2:** Curvas de remoção de lactose do leite comparado com ensaio em coluna recheada de MP e PIM nas diferentes alturas do leito.

Com base nesta avaliação prévia, foram determinadas as condições de aplicação do leite fixo para adsorção de lactose em fluxo contínuo. Assim, foi considerado que a melhor condição para a adsorção de lactose do leite foi de 5 cm de altura.

### 5.3. Remoção de Lactose em Fluxo Contínuo

Após a seleção da melhor altura do recheio da coluna para a remoção de lactose do leite, foi estudada a remoção de lactose com ampliação da escala, com o intuito de descobrir o tempo final de ruptura dos adsorventes em coluna de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, entretanto a altura do leito foi acrescida para 7,5 cm, sendo este o valor mínimo no intervalo das variáveis estatísticas consideradas no item 4.2.4.

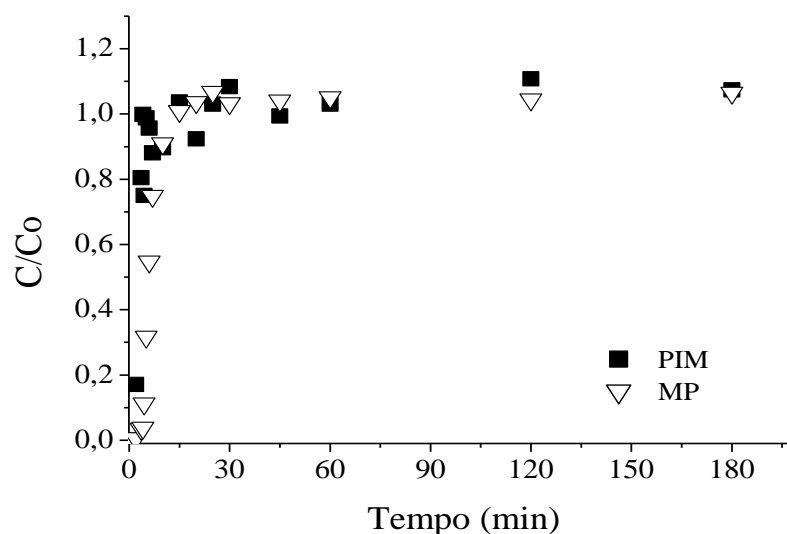
Na Tabela 5.2 são apresentadas as características da coluna utilizada nos ensaios de adsorção, em sistema contínuo, utilizando como partículas de recheio, ou adsorvente, a matriz pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM) nas mesmas condições.

**Tabela 5.2:** Propriedades da coluna de leite fixo com Matriz Pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM) em coluna ampliada.

<b>Parâmetros</b>	<b>Adsorvente</b>
Nome do adsorvato	Lactose
Adsorvente	MP ou PIM
Altura do leito (cm)	7,5
Massa do adsorvente (g)	24,39
Porosidade do leito ( $\epsilon$ )	0,095 $\pm$ 0,005
Diâmetro interno da coluna (cm)	2,5
Área do cilindro ( $\pi R^2$ ) (cm <sup>2</sup> )	4,9
Volume do cilindro ( $Axh$ ) ( $V_L$ ) (cm <sup>3</sup> )	98,1
Comprimento da coluna (cm)	20
Temperatura de operação (°C)	60
Vazão de operação (cm <sup>3</sup> /min)	3
Concentração inicial (mg/L)	20.513,37
Granulometria (mesh)	60 (48-65)

A Figura 5.3 apresenta a curva de ruptura de lactose do leite utilizando como adsorvente Matriz Pura (MP) e Polímero Impresso Molecularmente (PIM).





**Figura 5.3:** Curva de ruptura na adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo, utilizando como adsorvente Matriz Pura (MP) e polímero impresso molecularmente (PIM).

Na Figura 5.3, pode-se observar que ocorreu a saturação do adsorvente no tempo de aproximadamente 30 minutos. Com concentração inicial de lactose presente no leite de aproximadamente 20.513,3 mg/L. Uma razão para que o ponto de ruptura seja alcançado rapidamente, pode ser devido aos sítios livres de adsorção não se mostrarem tão disponíveis, podendo ser pelo fato de ter ocorrido à formação de caminhos preferenciais, o que dificultaria o processo de adsorção. De um modo geral, o leito adsortivo deve ser poroso para permitir que o líquido o atravesse com um mínimo de resistência, mas permitindo a máxima transferência de massa por entre as partículas, através do leito (VOLESKY *et al.*, 2003). E também deve se salientar que na literatura alguns autores relatam que as rápidas cinéticas de adsorção do adsorvente impresso é uma vantagem óbvia para a sua aplicação na extração em fase sólida de dispersão como, por exemplo, na preparação e aplicação da técnica de impressão molecular em colunas de HPLC para a determinação do olaquinox em frangos (ZHANG *et al.*, 2012).

O processo de adsorção depende de alguns fatores, tais como: natureza do adsorvente, do adsorbato e das condições operacionais. As características do adsorvente incluem área superficial, tamanho do poro, densidade e grupos funcionais presentes na superfície. Por outro lado, a natureza do adsorbato, depende da polaridade e solubilidade. Para as condições operacionais influem a temperatura, pH, e a vazão utilizada (processo contínuo) (MCCABE *et al.*, 2001). Baseando-se nestas características dos adsorventes, foram realizadas as

caracterizações físico-químicas e morfológicas destes recheios, MP ou PIM, com o intuito de se comprovar a impressão molecular de lactose.

#### **5.4. Análise morfológica e físico-química dos polímeros**

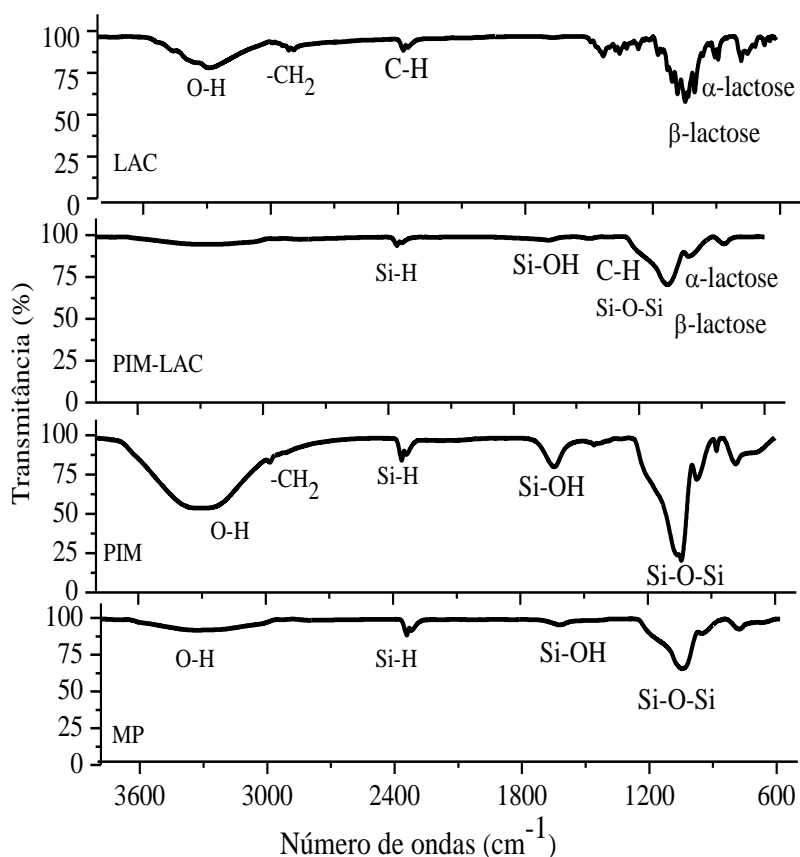
Neste item as análises morfológicas e físico-químicas dos adsorventes (MP ou PIM) utilizados na remoção de lactose permitirão uma melhor avaliação das características dos adsorventes que incluem grupos funcionais presentes na superfície da partícula, na perda de massa das partículas, a polimerização das matrizes, a área superficial, tamanho do poro, densidade, entre outros.

##### **5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)**

Os espectros de FTIR do padrão de lactose e do recheio da coluna de adsorção estudados neste trabalho são apresentados na Figura 5.4. A banda característica para  $\alpha$ -lactose foi localizada em  $920\text{ cm}^{-1}$  e a banda de  $\beta$ -lactose está entre  $950\text{ cm}^{-1}$  e  $833\text{ cm}^{-1}$  da Figura 5.4 (KIRK *et al.*, 2007; LISTIOHADI *et al.*, 2009). O aparecimento de todos os picos característicos de  $\alpha$  e  $\beta$ -lactose nos espectros de FTIR descritos na Figura 5.4, indica que este método é capaz de solucionar picos característicos responsáveis por cada forma de lactose, permitindo que as amostras sejam identificadas e analisadas em uma mistura (KIRK *et al.*, 2007). Segundo LEI *et al.*, (2010) as bandas  $2925\text{-}2927\text{ cm}^{-1}$  presentes no espectro correspondem a compostos aromáticos, com grupo funcional etileno ( $-\text{CH}_2$ ); as bandas intermoleculares  $1150\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento dos carboidratos; as bandas  $800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  são características de carboidratos e as bandas  $3200\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento dos hidratos de carbono (ISLAM *et al.*, 2010), neste estudo foram localizadas estas bandas (Figura 5.4). Pode-se também ser observada que as características de alongamento e estiramento da ligação glicosídica C-O-C (ligação entre dois açúcares) estão presentes, como observado pelas bandas  $\sim 1100$  e  $\sim 800\text{ cm}^{-1}$  na Figura 5.4 (CRISP *et al.*, 2010).

Na Figura 5.4, o espectro registrado para matriz pura (MP) apresentam bandas típicas de grupos presentes na superfície de todas as matrizes poliméricas. Na região de banda  $3400\text{ cm}^{-1}$ , situam-se alongamentos dos grupos hidroxila e silanóis, e também de moléculas adsorvidas sobre a superfície do óxido por meio de ligações de hidrogênio. Uma banda larga e intensa, entre  $3300$  e  $3700\text{ cm}^{-1}$ , está associada com os grupos Si-OH, que pode levar à adsorção de moléculas de água na superfície dos canais de poros (HU *et al.*, 2005). A presença de água pode ser confirmada pela banda na região de  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Nota-se uma banda

larga a  $3435\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída à vibração de alongamento dos grupos Si-OH; a banda forte  $1100\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída às vibrações de alongamento Si-O-Si; enquanto que as bandas de  $1628, 970, 804$  e  $460\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídos a SiO-H, Si-OH, estiramento simétrico de SiO-H e Si-O, respectivamente (WANYIKA *et al.*, de 2011).



**Figura 5.4:** Espectros de FTIR do padrão de lactose (LAC), matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM), polímero impresso molecularmente sem remoção de lactose (PIM-LAC).

Após a impressão molecular da lactose na matriz polimérica das partículas utilizadas como recheio na coluna de adsorção, novas bandas foram detectadas. Portanto, podemos observar na Figura 5.4 a presença da banda larga na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$ , que caracteriza os grupos Si-OH e  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvido sobre os grupos Si-OH. A confirmação da presença de  $\text{H}_2\text{O}$  é determinada pela observação de bandas na região de  $1630\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à deformação de grupos hidroxilas, enquanto que as bandas a  $1494, 1439$  e  $1402\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à deformação C-H no grupo- $\text{CH}_2$ , pertencente ao grupo metoxil (IBRAHIM *et al.*, 2009). Do mesmo modo, estas bandas também estão presentes no polímero de PIM-LAC, confirmando a presença de lactose.

O pico encontrado a  $960\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da banda Si-O-H, sendo muito pronunciada nas amostras de PIM; e isto pode ser explicado pela existência de uma maior quantidade desse grupo na superfície O-(H...H<sub>2</sub>O) e grupos delimitados de Si (NIKOLIC *et al.*, 2010). As vibrações de O-CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> podem ser observadas a  $1464\text{ cm}^{-1}$ , e a banda  $1260\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações assimétricas de C-O-C. O resultado de FTIR confirma a formação de sílica mesoporosa orgânica modificada (SINGHO e JOHAN, 2012). A presença destes alongamentos nos espectros de FTIR, para as partículas constituídas por PIM indica que a reação de impressão molecular foi efetivamente realizada.

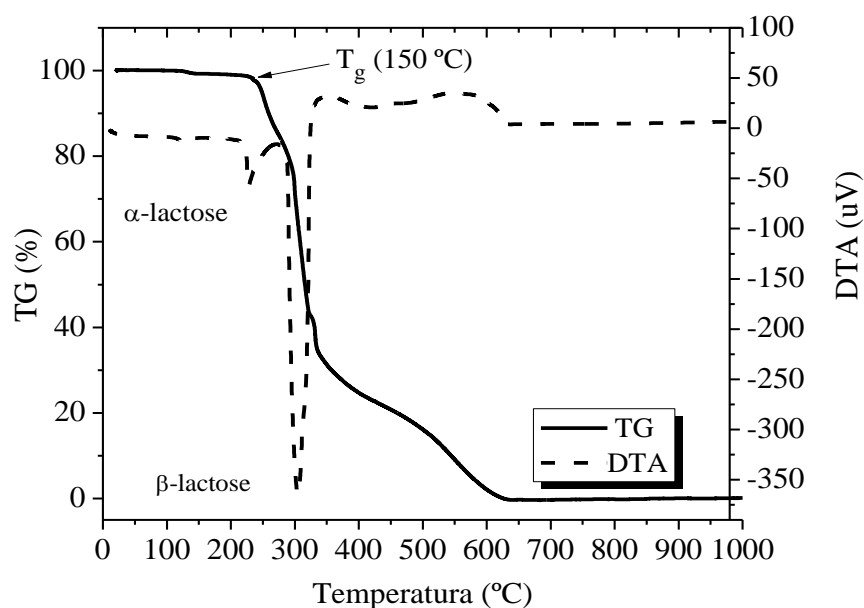
De acordo com o espectro de PIM-LAC, verificou-se que houve mudança significativa na intensidade da banda na região de  $3700$  a  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Essas bandas são características do estiramento dos grupos Si-OH e as bandas na região de  $1630$ - $1110\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas com as conexões dos grupos de siloxanos. As diferenças observadas na região de maior número de onda no espectro de PIM e PIM-LAC são atribuídas à presença de lactose nas amostras de impressão. As diferenças observadas na região de maior número de onda no espectro de PIM e PIM-LAC são atribuídas à presença de lactose impressa nas matrizes, conforme observado na Figura 5.4.

#### 5.4.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Os materiais à base de sílica são extremamente rígidos, devido ao elevado grau de ligação encontrada na rede de dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>). Esta propriedade é muito importante na concepção e síntese de PIM, tanto que o tamanho e forma dos poros criados pela molécula molde deve ser mantida após a remoção do molde. A alta estabilidade térmica do material derivado de sol-gel proporciona uma maneira fácil de remover a molécula molde utilizando o método de calcinação de alta temperatura (LEE *et al.*, 2010).

A estabilidade térmica das amostras foi investigada por análise de TG, cujos resultados estão representados nas Figuras 5.5 e 5.6 em uma função da temperatura no eixo dos x e a percentagem de perda de peso no eixo y.

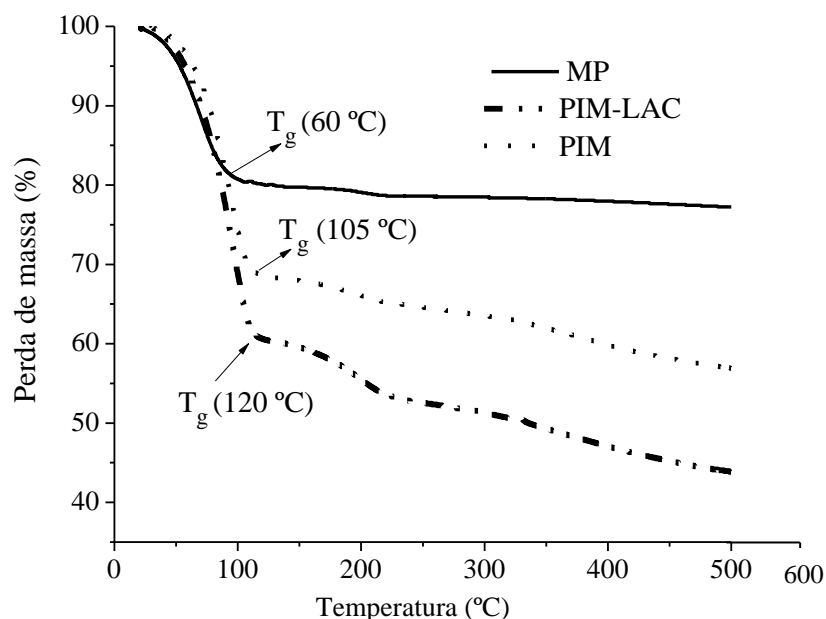
A Figura 5.5 apresenta as curvas TG e DTA do padrão de lactose, analisadas em atmosferas de N<sub>2</sub>.



**Figura 5.5:** Curvas TG e DTA do padrão de lactose, analisadas em atmosferas de N<sub>2</sub>.

Ao observar as curvas TG e DTA realizadas em atmosferas de nitrogênio para a lactose, percebeu-se que ocorreu uma desidratação em 150 °C, também observado por PITCHAYAJITTIPONG *et al.*, (2010), supostamente pela perda de água da superfície; a fusão em 213 °C, temperatura esta, próxima da indicada na literatura por SUTEEWONG *et al.*, 2012); e uma sequência de 2 etapas consecutivas de decomposição térmica do padrão de lactose. Depois da transição vítrea, um pico foi observado e pode ser associado à recristalização exotérmica, seguido por dois eventos de fusão. Os dois picos estão associados com as duas formas de lactose que o material recristalizar a partir da temperatura vítrea (T<sub>g</sub>). O primeiro pico representa a fusão do α-lactose anidra, e o segundo pico está associado com a β-lactose. Nota-se que a recristalização da amostra ainda ocorre mesmo a 600 °C/min, e não há nenhuma perda de definição da fusão das duas formas de lactose cristalina (HOGAN e BUCKTON, 2000).

As perdas de massa de amostras da matriz pura (MP), polímero impresso molecular (PIM), polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC), foram determinados por análise termogravimétrica (TGA), de acordo com a Figura 5.6.



**Figura 5.6:** Curvas de TGA em atmosferas de N<sub>2</sub> de matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM), polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC).

Pode-se observar que a amostra MP mostrou uma perda de massa de 22% entre as temperaturas de 90 a 125 °C, segundo o termograma da Figura 5.6. Esta perda de peso pode ser atribuída à presença de grupos silanóis que não reagiram com o tetraetilortosilicato utilizado na síntese da matriz polimérica que estão presentes na sílica devido às reações de sol-gel incompletas (MUKHERJEE *et al.*, 2009). Uma parte desta perda de peso é também devido à remoção de moléculas de água, que foram fortemente ligadas à matriz de sílica (WEI *et al.*, 1999). WANYIKA *et al.*, (2011) avaliaram as propriedades da sílica mesoporosa e obtiveram curvas de TGA semelhantes, apresentando perda de massa a baixas temperaturas que, segundo os autores, isso foi atribuído à perda de água adsorvida. Da mesma forma observaram picos endotérmicos a <100 °C nas curvas de TGA, sendo essa perda de massa relacionada também a perdas de grupos silanóis na superfície. Quanto ao PIM, observou-se uma perda de massa entre 105 °C e 135 °C, o que pode corresponder à degradação das ligações de carbono, maior conforme observado no termograma da Figura 5.6.

Observa-se que as amostras de PIM-LAC e PIM são similares por terem a mesma tendência de perda de massa, com o aumento da temperatura, e tornou-se estável acima de 150 °C, com 58% de perda de massa total. Resultados similares foram encontrados por MAO *et al.* (2011), que avaliaram um composto formado por folhas de grafeno e polímeros impressos moleculares com vermelho de congo (GSCR-PIMs), sintetizado por meio da

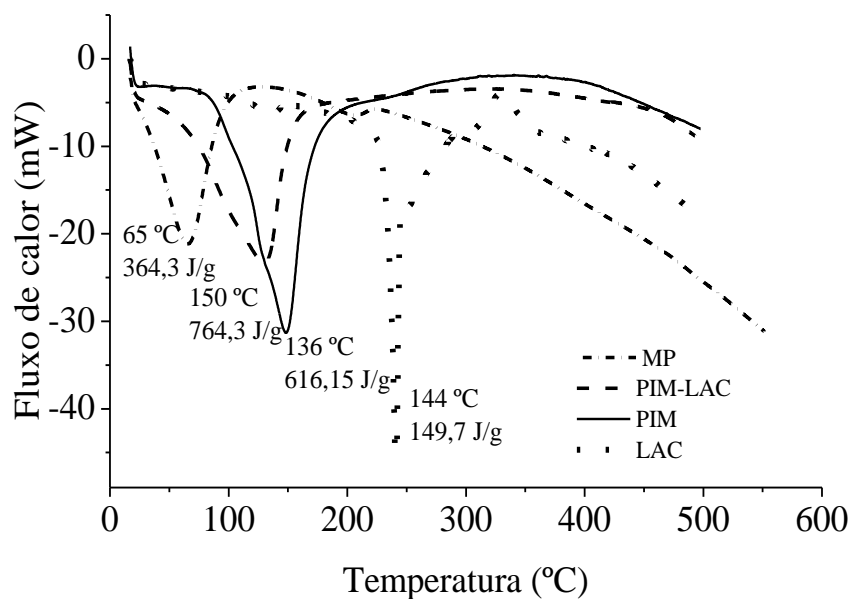
polimerização por radicais livres (FRP) e aplicado como um elemento de reconhecimento molecular para a construção de sensor eletroquímico de dopamina (DA).

As amostras de PIM-LAC apresentaram uma perda de massa de 58% a temperaturas de 125 a 150 °C, provavelmente atribuída à perda de grandes quantidades de lactose residual adsorvido sobre a superfície dos materiais estudados. As temperaturas ainda mais elevadas, em torno de 400-500 °C ocorreu outra perda de massa de 0,25%, o que provavelmente pode ser devido a uma poli condensação da matriz de sílica. Após a remoção da lactose, o perfil do termograma de PIM apresentou-se similar a de PIM-LAC, entretanto com significativa perda de massa (46%) a temperatura de 125 °C, como se esperava depois da remoção do molde. A diferença na perda de peso entre PIM-LAC e PIM (58% e 46%, respectivamente), foi possivelmente causada pela remoção da molécula alvo (lactose), confirmando o sucesso da impressão molecular. Um fato relevante é que o intervalo de temperatura de decomposição dos polímeros é semelhante, em torno de 100 a 150 °C com perda de massa de 46% e 58% para a PIM-LAC e PIM, respectivamente. Em geral, os três regiões de perda de massa observados nos perfis de TGA provavelmente originam (i) perda de lactose (100 a 200 °C) e umidade (20-80 °C), (ii) decomposição seguida de desidratação dos grupos hidroxilas presentes na superfície (>250 °C) (GUO *et al.*, 2003, SUTTEEWONG *et al.*, 2012).

#### 5.4.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A medida mais comum da estrutura amorfa envolve a análise de transição vítrea por DSC. O tamanho da transição fornece informação quantitativa sobre a quantidade de estrutura amorfa presente na amostra, e a temperatura identifica o ponto onde existe uma mudança drástica nas propriedades físicas do material. A Figura 5.7 apresenta uma sobreposição das curvas de DSC das amostras de LAC, MP, PIM-LAC e PIM, com temperaturas que variaram de 25 a 500 °C. A taxa de fluxo de calor é uma excelente detecção para a obtenção da transição vítrea de amostra.

Na curva de DSC da lactose (Figura 5.7), mostrou dois picos endotérmicos em diferentes temperaturas, cerca de 150 °C e 218 °C, o que corresponde à desidratação da água e a fusão de  $\alpha$ -lactose, respectivamente (GOMBAS *et al.*, 2003). A presença de dois picos endotérmicos a 218 e cerca de 240 °C indica que as amostras cristalizadas devem compreender uma mistura de  $\alpha$ -lactose monohidratada e  $\beta$ -lactose (KAIALY *et al.*, 2011).



**Figura 5.7:** Curvas de DSC em atmosfera inerte de N<sub>2</sub> para o padrão de lactose (LAC), matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC), polímero impresso molecularmente (PIM).

A fusão caracteriza-se por ser um fenômeno físico, o qual pode ser detectado através das curvas DSC ou DTA, apresentando-se como um evento endotérmico (WENDLANDT, 1986; CLAS *et al.*, 1999). A fusão da lactose mostrou um pequeno pico exotérmico a aproximadamente 340 °C atribuído à decomposição. ALVES (2007) estudou o comportamento térmico da lactose e por meio das curvas DSC observou um evento endotérmico na região de 90,0 a 160,0 °C e atribuído à etapa de desidratação.

Na matriz pura, verificou-se que a temperatura de 65,6 °C ocorreu uma perda de massa devido a água fracamente ligadas à superfície de sílica por ligações de hidrogénio. Com o aumento da temperatura, o material apresentou uma segunda perda de massa atribuído a condensação de grupos silanóis a temperaturas de 206 °C. As temperaturas acima de 200 °C ocorre a perda de água devido à condensação de grupos silanol e siloxanos. As amostras de matriz pura (MP) apresentaram apenas uma transição endotérmica com um pico de temperatura de 65 °C, com entalpia de 364,3 J/g. As amostras contendo lactose (PIM-LAC) apresentaram o primeiro pico endotérmico na temperatura de 150 °C, e entalpia de 764,38 J/g, associado com a decomposição de matéria orgânica e água.

No entanto, a principal alteração causada pela presença de lactose na matriz está relacionada com o aumento do pico endotérmico, aumentando a entalpia destes picos (764,38 J/g a 150 °C). Este comportamento pode ser associado com a perda de água ainda presente na amostra, por meio da chamada "água de hidratação", e fortemente presente na rede de sílica. É



possível que a água possa ser mantida sobre a superfície sílica gel por diferentes forças de interação: "forças dispersivas" (por exemplo, a água fisicamente ligada), "as forças polares" (por exemplo, de íons de hidrogênio da água), ou por "forças químicas" (por exemplo, os grupos silanol que condensam títulos siloxano com a liberação de água) (SOARES *et al.*, 2004).

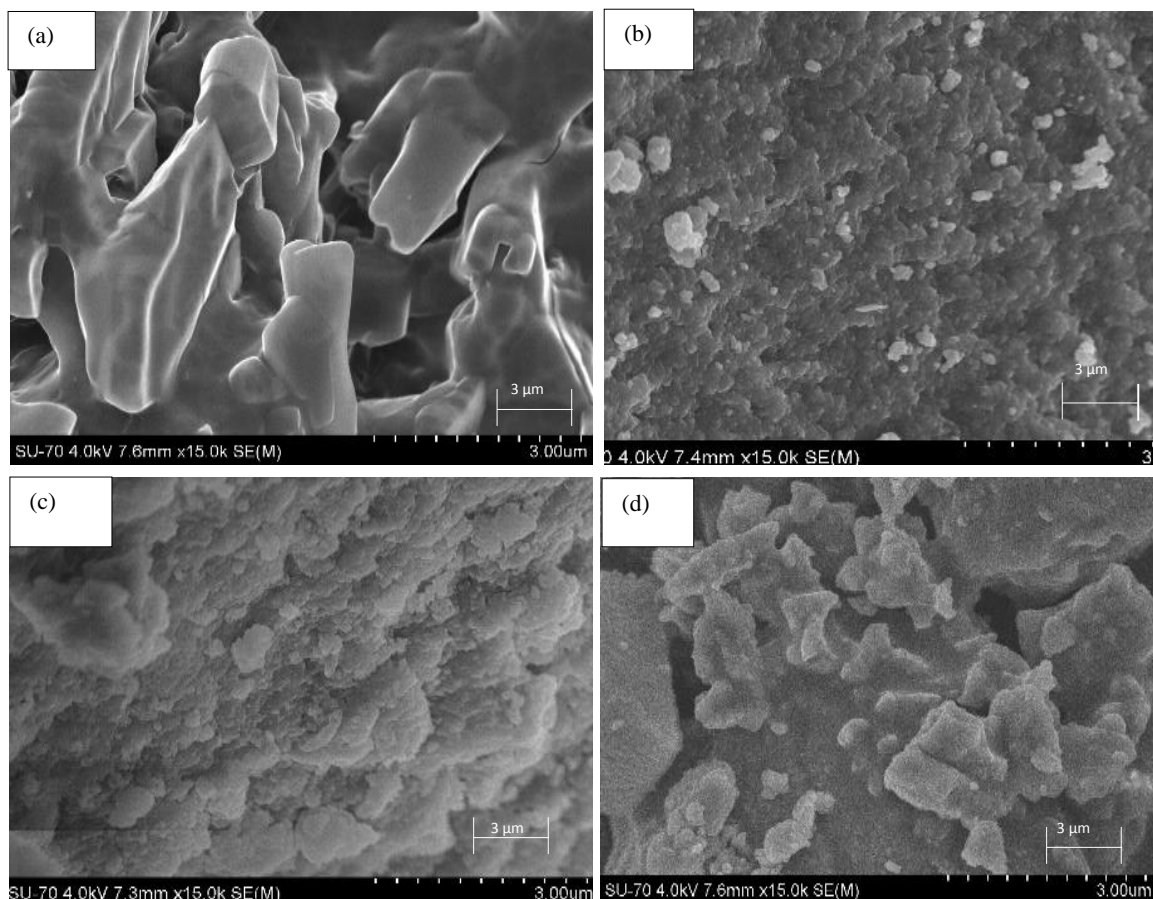
Através da Figura 5.7 observam-se as curvas de análises térmicas para os polímeros e o padrão de lactose. Nota-se um pico endotérmico, que pode ser atribuído à evaporação de água adsorvida sobre a superfície molecular dos polímeros; a intensidade do pico endotérmico é maior para a curva de PIM-LAC. A informação obtida com as análises térmicas de DSC foi confirmada pelos resultados obtidos pelo TGA.

#### 5.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A obtenção das micrografias obtidas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras permite conhecer a polimerização da matriz de sílica e também comparar as imagens do padrão de lactose LAC (Figura 5.8a), matriz pura MP (Figura 5.8b), polímero impresso molecularmente com lactose PIM-LAC (Figura 5.8c) e polímero impresso molecularmente PIM (Figura 5.8d). A Figura 5.8 mostra as morfologias das sílicas mesoporosas, matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM) e polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC). Pode ser observada a partir das micrografias, a ocorrência de grãos não esféricos de tamanho não uniforme com estrutura porosa, característica da sílica-gel (LÓPEZ *et al.*, 2012).

Observa-se na Figura 5.8 b (MP), que há a presença de agregados de vários tamanhos, sugerindo que não existe uniformidade no tamanho dos poros. É interessante notar que este tipo de característica pode ser associado ao processo de síntese, principalmente devido à agitação mecânica, ou seja, durante a síntese dos polímeros não houve seleção ou controle mecânico do tamanho da partícula.

Na Figura 5.8 d (PIM), observou-se a presença de poros na superfície dos polímeros provavelmente os locais do molde, que é a molécula de impressão (HUA *et al.*, 2011). A micrografia do PIM e de MP são completamente diferentes; essas diferenças são, provavelmente, devido à impressão de lactose existente no PIM (5.8 d), uma vez que na MP não foi aplicado o molde (5.8 b).



**Figura 5.8:** Micrografias das seguintes amostras: (a) Lactose-LAC; (b) Matriz Pura-MP; (c) Polímero Impresso Molecularmente com Lactose-PIM-LAC; (d) Polímero Impresso Molecularmente - PIM. Aumento x 5000.

Note-se que a incorporação de lactose na matriz polimérica diminuiu a magnitude dos espaços vazios entre as partículas, antes da incorporação observada apenas na Figura 5.8C (PIM-LAC), o que pode ser devido à impressão da lactose no polímero (PRADHAN *et al.*, 2009).

#### 5.4.5. Análise morfológica dos polímeros por B.E.T.

O estudo das propriedades morfológicas de materiais sólidos porosos é mais conveniente em métodos baseados na adsorção de nitrogênio no estado gasoso, utilizando medições volumétricas da quantidade de gás adsorvido. A área superficial, volume e tamanho médio de poros correspondentes a matriz pura (MP), polímero impresso molecularmente (PIM) e polímero impresso molecularmente com lactose (PIM-LAC) estão resumidos na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3:** Avaliação dos parâmetros estruturais de adsorção-dessorção de nitrogênio para matriz pura (MP) e os polímeros impressos molecularmente PIM e PIM-LAC.

<b>Amostra</b>	<b>Área superficial m<sup>2</sup>/g</b>	<b><sup>a</sup>Volume do poro (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>Diâmetro do poro (Å)</b>
MP	301,8	0,8	109,5
PIM	464,1	1,8	150,0
PIM-LAC	437,8	0,5	50,0

<sup>a</sup> Volume do poro calculado a partir da dessorção de nitrogênio (N<sub>2</sub>).

Todas as amostras analisadas apresentaram isotermas do tipo IV (ANEXO 5), característico de materiais mesoporos. Esse tipo de isoterma na maioria dos casos exibe uma proeminente região na qual a pressão relativa varia pouco e o volume adsorvido aumenta bruscamente. Além disso, as histereses são do tipo H1, evidenciando que em todas as matrizes possuem estruturas mesoporosas, ou seja, apresentam poros que variam de 2 a 50 nm (20 Å e 500 Å) (LEOFANTI *et al.*, 2008).

A matriz pura com ausência de lactose apresentou uma área superficial externa e volume de poros reduzidos, 301,8 m<sup>2</sup>/g e 0,8 cm<sup>3</sup>/g, respectivamente (Tabela 5.3). Após a obtenção do molde da lactose no PIM, pode-se verificar o aumento da área superficial de 301,8 para 464,1 m<sup>2</sup>/g do MP para o PIM, enquanto que o PIM-LAC apresentou 437,8 m<sup>2</sup>/g, além disso, verificou-se a redução da área superficial do PIM em relação ao PIM-LAC, de 464,1 para 437,8 m<sup>2</sup>/g, provavelmente devido à ocupação da lactose nos poros. O diâmetro médio dos poros de PIM foi de 150 Å, valor superior ao obtido para o MP e PIM-LAC. Portanto, pode-se afirmar que o aumento do tamanho médio dos poros é possivelmente devido ao molde da molécula da lactose na matriz polimérica. Os valores superiores descritos por TOMINAGA *et al.*, (2005), onde os autores sintetizaram sílica mesoporosa (MPSi) com um novo tipo de material inorgânico (poliéster) e obtiveram área superficial de 829 m<sup>2</sup>/g. Enquanto que, resultados inferiores para distribuição de poros foram obtidos por QU *et al.* (2006), cujo o tamanho médio dos poros em PIM utilizando moléculas de drogas foi em torno de 2,79 nm que corresponde a 27,9 Å. A área superficial de PIM obtido a partir de BET (464,17 m<sup>2</sup>/g) foi inferior ao encontrado por TOMINAGA *et al.*, (2005) que encontraram 829,0 m<sup>2</sup>/g a partir de sílica mesoporosa sintetizada (MPSi) pelo método sol-gel, usando simples surfactante não iônico, utilizando o TEOS como precursor de sílica.

Na análise morfológica dos polímeros deste estudo, observou-se que a área superficial, volume e distribuição de poros aumentaram significativamente (Tabela 5.3), indicando assim

a impressão da molécula de lactose na estrutura do polímero, que está diretamente relacionada à porosidade das partículas do adsorvente.

### 5.5. Adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo

A remoção da lactose do leite em colunas de adsorção, recheadas de partículas ou adsorventes do tipo MP e PIM, foram determinadas utilizando a planejamento experimental com o intuito de minimizar a quantidade de experimentos. Na Tabela 5.4 pode ser observada a matriz experimental codificada e decodificada nas condições pré-estabelecidas com as seguintes variáveis independentes: altura do leito (7,5 a 12,5 cm), vazão (3 a 9 mL/min) e tamanho da partícula (250 a 500  $\mu\text{m}$ ) e temperatura (34 a 60  $^{\circ}\text{C}$ ) e variável dependente a capacidade de adsorção ( $q_0$ ). Os valores de capacidade de adsorção obtidos mediante a aplicação da equação (1) às respectivas curvas de ruptura para várias condições operacionais encontram-se na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4:** Matriz decodificada de planejamento fatorial incompleto  $2^{4+1}$  para estudar a capacidade de adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo utilizando MP e PIM.

Ensaio	Variáveis				Concentração inicial de lactose (mg/L)		Capacidade de adsorção (mg/g)	
	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	G ( $\mu\text{m}$ )	h (cm)	Q (mL/min)	MP	PIM	MP	PIM
1	34	250	7,5	3	21778,9	21548,9	6,0	28,0
2	60	250	7,5	9	21744,7	22544,7	13,0	37,6
3	34	500	7,5	9	25185,4	20765,4	20,8	47,5
4	60	500	7,5	3	23802,4	19382,4	10,9	26,4
5	34	250	12,5	9	23962,8	19517,6	38,5	62,2
6	60	250	12,5	3	25543,6	12771,8	12,7	9,5
7	34	500	12,5	3	27812,9	13906,4	7,5	7,2
8	60	500	12,5	9	28033,9	19517,6	19,8	24,3
9	47	355	10,0	6	26268,1	21806,1	16,8	52,4
10	47	355	10,0	6	24279,1	32453,8	16,4	50,6
11	47	355	10,0	6	24180,7	21749,7	16,6	50,8

De acordo com a Tabela 5.4 nos ensaios utilizando o PIM, observa-se que a maior capacidade de adsorção foi de 62,2 mg/g de lactose utilizando adsorvente PIM obtido no experimento 5 nas seguintes condições: 12,5 cm de altura de leito, 9 mL/min de vazão, 34  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura e 250 mm tamanho da partícula, seguido dos ensaios do ponto central da matriz do delineamento experimental com um valor médio de capacidade de adsorção de 50,9 mg/g nas seguintes condições: 10 cm altura do leito, 6 mL/min de vazão, 47  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura e 355 mm de tamanho da partícula. Nota-se que os valores dos pontos centrais

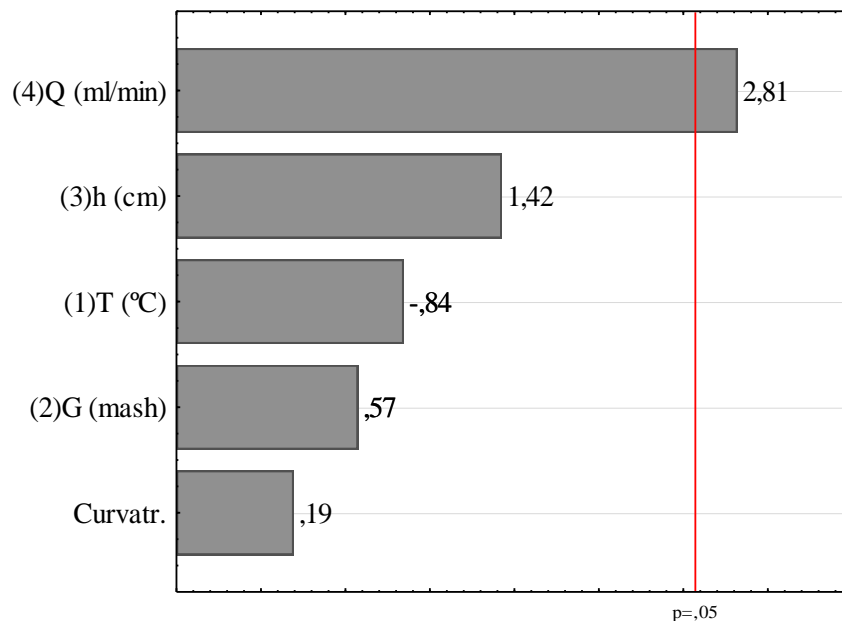
apresentaram boa reprodutibilidade. As menores capacidades de adsorção foram encontradas nos ensaios 6 e 7, com 9,53 e 7,23 mg/g, respectivamente, ambos com altura do leito de 12,5 cm e vazão de 3 mL/min, temperatura de 60 e 30 °C e granulometria de 250 e 500 µm, respectivamente.

A partir dos resultados de capacidade de adsorção da lactose em MP (Tabela 5.4), foi possível indicar que o ensaio 5, apresentou o melhor potencial para adsorção quando comparado com os outros ensaios, obtendo capacidade de adsorção de 38,5 mg/g de adsorvente nas mesmas condições dos ensaios utilizando o PIM.

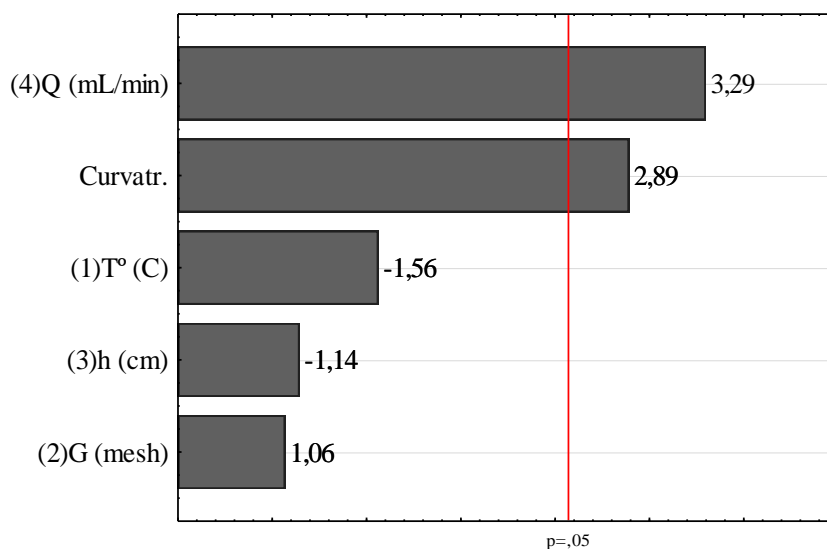
Observa-se que em todos os casos a capacidade de adsorção do PIM foi maior que na MP, salvo nos ensaios 6 e 7. Note-se que nestes experimentos realizados com PIM, a concentração inicial de lactose no leite foi bem menor, praticamente a metade do que nos outros ensaios. É evidente que a concentração de equilíbrio deve também ser menor, justificando a menor capacidade. A maior capacidade do PIM em relação a MP era esperada, porque a presença de locais de reconhecimento específicos melhora a seletividade do adsorvente.

O leite utilizado nos experimentos apresentou concentrações iniciais distintas, por isso a concentração inicial de lactose tornou-se uma variável não controlada, lembrando que devido à sazonalidade, a composição da matéria-prima é influenciada. Os resultados na Tabela 5.4 podem sugerir que a concentração inicial de lactose influencia diretamente na capacidade de adsorção e nos coeficientes de transferência de massa.

Além disso, é evidente que a partir dos resultados da Tabela 5.4, que as condições operacionais têm um grande efeito sobre o desempenho na coluna em leito fixo. A fim de avaliar a extensão e significado destes fatores, foi aplicada a estratégia experimental denominado pelo planejamento fatorial incompleto utilizada para determinar o efeito de cada variável, bem como a interação dos efeitos destas variáveis e a variável-resposta (capacidade de adsorção). Os efeitos significativos podem ser observados na Figura 5.9 e 5.10, por meio do gráfico de Pareto, a fim de verificar a melhor condição da capacidade de adsorção do MP e PIM.



**Figura 5.9:** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a adsorção de lactose em coluna de leito fixo utilizando MP.

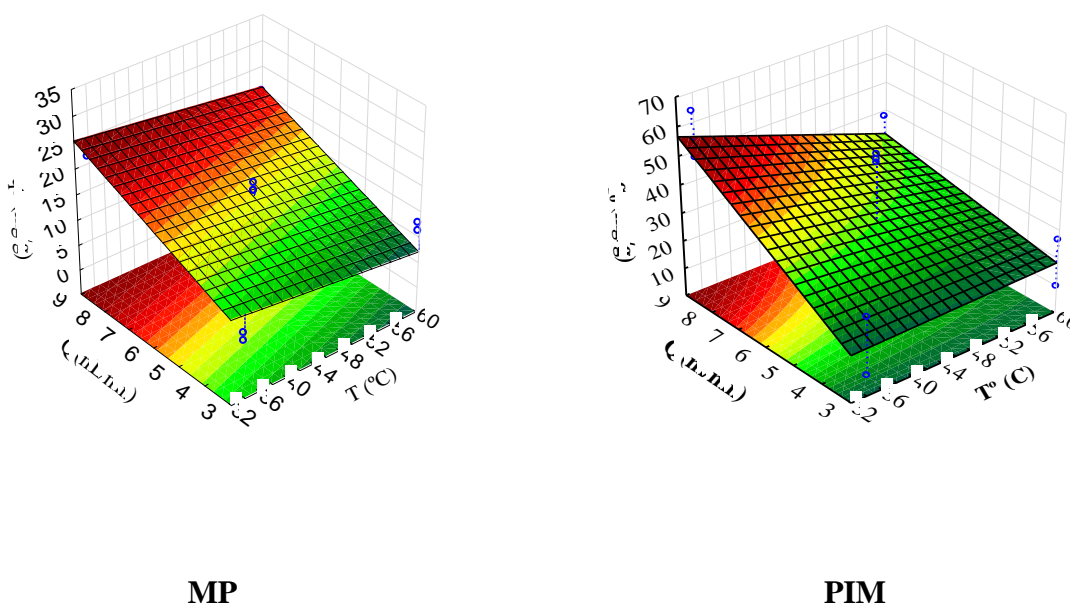


**Figura 5.10:** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a adsorção de lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM.

Pode-se observar a partir dos gráficos de Pareto (Figuras 5.9 e 5.10) que a altura do leito (h), tamanho das partículas (G) e temperatura (T), foram as variáveis não significativas para a capacidade de adsorção em leito fixo a um nível de confiança de 95%. Apenas a variável vazão (Q) foi significativa e de maior influência. O sinal positivo na variável significa que a passagem da vazão do nível -1 (3 mL/min) para o maior nível +1 (9 mL/min) aumenta o fator resposta, isto é, a capacidade de adsorção aumenta com a taxa de fluxo.

Pôde-se observar que a altura, granulometria e temperatura não exercem efeitos significativos na capacidade de adsorção. Estes resultados não eram esperados, uma vez que a capacidade de adsorção não deveria depender das condições de operação, salvo a temperatura. Com relação à altura, deve interferir na zona de transferência de massa e não na capacidade de adsorção. Desta forma, foram analisadas as tendências dos efeitos da vazão sobre os parâmetros fenomenológicos desconsiderando as variações de altura e tamanho de partícula nos diversos ensaios.

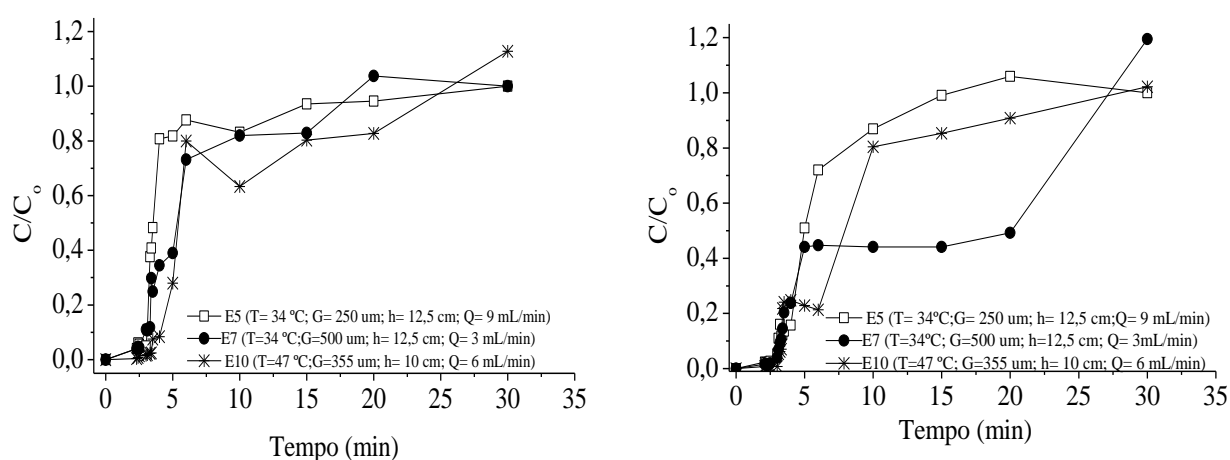
Efeitos combinados de eluição pelo solvente e tempos de residência diferentes dos outros constituintes do leite podem estar associados a este comportamento inesperado (RUTHVEN, 1984). Esta suposição foi confirmada nas curvas de ruptura (ANEXO 3) nos experimentos realizados com tempos longos de operação, nos quais foram encontradas concentrações de lactose na saída do leite maior que a alimentada, indicando claramente a dessorção parcial de lactose retida pelo adsorvente. Os efeitos combinados de temperatura (T) e vazão (Q), podem ser melhor observados na Figura 5.11 (a e b). Apesar da não significância estatística da temperatura (T) a um nível de 95%, analisando em termos de tendência, se observa na figura 5.11 que essas variáveis combinadas apresentam influência na adsorção de lactose, com a presença de um máximo em torno de  $T=32\text{ °C}$  e  $Q=9\text{ mL/min}$ .



**Figura 5.11:** Superfície de resposta mostrando a capacidade máxima de adsorção em relação à vazão utilizando: (a) matriz pura (MP) e (b) polímero impresso molecularmente (PIM).

Após a realização da análise dos resultados experimentais obtidos com a avaliação das superfícies de resposta (Figura 5.11), pode ser observado que à medida que a taxa de fluxo

aumenta, a capacidade de adsorção aumenta igualmente, o que justifica que essa variável teve influência significativa na capacidade de adsorção de lactose. Para uma melhor compreensão do comportamento da dinâmica da coluna de adsorção com a utilização da MP, a Figura 5.12 (a), ilustra as curvas de ruptura dos ensaios com a matriz pura na melhor condição com a melhor capacidade de adsorção (E5), condição com a menor capacidade de adsorção (E7) e a corrida no ponto central (E10) do planejamento experimental. Para os experimentos com PIM (Figura 5.12-b), foram selecionados os ensaios E5, E7 e E10, na melhor e pior condição, e ponto central, respectivamente.



**Figura 5.12:** Curva de ruptura para a adsorção de lactose em coluna de leito fixo utilizando MP (a) e PIM (b) nos ensaios E5 ( $T=34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $G=250\text{ }\mu\text{m}$ ;  $h=12,5\text{ cm}$ ;  $Q=9\text{ mL/min}$ ); E7 ( $T=34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $G=500\text{ }\mu\text{m}$ ;  $h=12,5\text{ cm}$ ;  $Q=3\text{ mL/min}$ ) e E10 ( $T=47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $G=355\text{ }\mu\text{m}$ ;  $h=10\text{ cm}$ ;  $Q=6\text{ mL/min}$ ).

Na Figura 5.12 (b), pode-se observar que as curvas de PIM apresentaram uma região constante de concentração de saída, com  $C/C_0 = 0,22$  em  $t = 3\text{ min}$  (E5) e  $C/C_0 = 0,45$  em  $t = 6\text{ min}$  (E10), respectivamente, seguido por  $C/C_0$  crescendo até a região de saturação do leito. Este comportamento também foi observado nas outras corridas realizadas com o adsorvente PIM (ANEXO 3), ao contrário dos experimentos realizados com o polímero não impresso de acordo com a Figura 5.12 (a), que não apresentou um *plateau* de concentração de saída constante. A diferença entre as curvas de PIM e MP pode ser devido a uma distribuição preferencial de sítios de reconhecimento específico nas posições mais acessíveis dentro da partícula, efeito que poderia ser responsável pela presença de região *plateau*, além disso, é possível existir uma competição entre os sítios ativos do adsorvente entre alguns



monossacarídeos, incluindo glicose e galactose, oligossacarídeos neutros e ácidos e carboidratos ligados a peptídeos e proteínas (ROBINSON, 1981), o que poderia explicar a forma não usual das curvas de ruptura obtidas.

A partir destes estudos, é possível operar a coluna, escolhendo as condições operacionais apropriadas de temperatura e taxa de fluxo, para sistemas de adsorção em leito fixo, dependendo do nível de concentração final de lactose requerido. Os resultados obtidos para a curva de eluição mostraram que o aumento na taxa de fluxo, ou seja, a vazão, implica um maior volume de solução por unidade e tempo através da coluna, assim uma operação em menor tempo irá saturar a coluna de forma mais rápida, com o aumento da vazão o adsorvente irá saturar mais rápido como pode ser observado na Figura 5.12. Estas considerações em escala laboratorial sugerem que seria vantajoso executar o processo de adsorção de lactose em coluna de leito fixo em grande escala.

Como pode ser observado na Figura 5.12 (a e b), as curvas de ruptura tanto para MP como para PIM, tiveram uma característica atípica da descrita na literatura (MCCABE *et al.*, 2001), pois ultrapassou o ponto de ruptura (*breakpoint*), estabelecido quando  $C/C_0$  for igual a 1,0. Este comportamento pode estar relacionado ao fato do leite ser uma mistura multicomponente, e segundo SUBRA *et al.*, (1998), para misturas líquidas multicomponentes, a relação  $C/C_0$  pode extrapolar o limite da unidade, pois considera-se as diferentes afinidades de adsorção dos vários solutos. De acordo com ARROYO *et al.*, (2000), curvas deste tipo refletem o fenômeno da troca sequencial, na qual um soluto, mais seletivo, consegue remover do sítio um outro soluto anteriormente trocado, que é liberado ao meio líquido.

Não existem trabalhos na literatura que estudaram os mecanismos de adsorção da lactose por polímeros impresso molecularmente proveniente de leite. Porém, ao comparar os valores da capacidade máxima de adsorção dos adsorventes estudados é possível notar a viabilidade do emprego dos polímeros impressos em processos que visam à remoção da lactose em leite.

## **5.6. Modelagem da dinâmica de adsorção em coluna de leito fixo**

### **5.6.1. Modelo de Força Motriz Linear com isoterma de Equilíbrio Linear**

Nesta seção são apresentados os resultados da modelagem da dinâmica da coluna de adsorção de lactose em leito fixo de adsorvente PIM e matriz pura PM. Na Tabela 5.5, são apresentados os resultados obtidos para cinco ensaios realizados com condições operacionais diferentes.

**Tabela 5.5:** Valores da capacidade de adsorção e dos parâmetros do ajuste do modelo de Força Motriz Linear com Isoterma de Equilíbrio Linear.

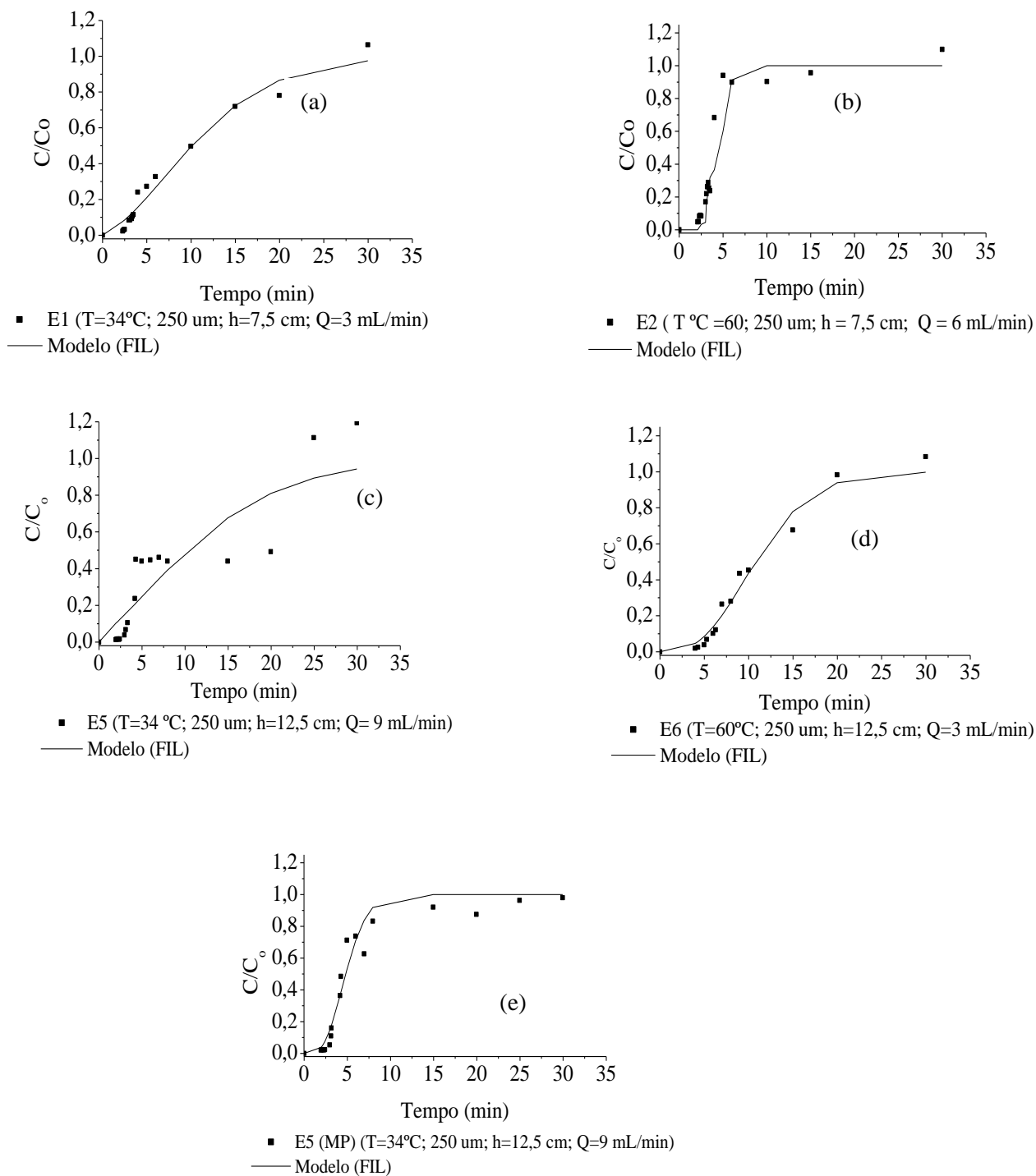
Ensaio	Temperatura (°C)	Vazão (mL/min)	C <sub>0</sub> (mg/L)	Altura do leito (cm)	q <sub>0</sub> (mg/g)	K	k	R <sup>2</sup>	Erro
E1	34	3	21744,7	7,5	37,6	10,7	39,7	0,98	0,07
E2	60	9	12771,8	7,5	9,5	0,8	22,8	0,99	0,03
E5	34	9	19517,6	12,5	62,1	0,2	110,7	0,89	0,4
E6	60	3	21778,9	12,5	28,1	0,37	35,0	0,98	0,04
E5*	34	9	12771,8	12,5	31,7	2,4	50,7	0,97	0,1

(\*) Experimento com polímero não impresso (MP); C<sub>0</sub> – concentração inicial de lactose no leite

Os valores dos parâmetros de ajuste do modelo diferencial (Equação 1) aos dados experimentais, que são o coeficiente de transferência de massa (k) e a constante de equilíbrio (K), assim como os valores dos erros calculados por meio do ajuste da equação aos dados, coeficiente de determinação ajustado (R<sup>2</sup>), foram obtidos utilizando a solução computacional a análise gráfica dos experimentos. A partir dos dados experimentais da curva de ruptura obteve-se o parâmetro de transferência de massa na fase sólida (K).

Os dados de adsorção obtidos do modelo utilizado neste trabalho, mostram que os valores de k foram semelhantes, exceto para o ensaio 5 (E5), com valor de 110,7 utilizando o PIM e para o ensaio (E5\*) utilizando o adsorvente MP cujo valor foi de 50,7. Uma possível explicação para estas discrepâncias pode ser devido a variação de temperatura de 60 para 34 °C nos ensaios com PIM ou ainda, devido a uma distribuição preferencial de sítios de reconhecimento específico nas posições mais acessíveis dentro da partícula. Além disso, os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) estão acima de 0,97 com exceção do ensaio E5. Sendo assim, este modelo foi utilizado para a elaboração das curvas de ajuste aos pontos experimentais, apresentados nos ensaios, de acordo com a Figura 5.13. As curvas simuladas apresentaram uma excelente concordância entre o modelo teórico e os dados experimentais com exceção do ensaio 5, onde o modelo não apresentou um ajuste adequado provavelmente devido a região de *plateau* observada nos dados experimentais.

Com os dados da Tabela 5.5, pode-se verificar que houve variação do coeficiente de transferência de massa no sólido (k). O resultado da modelagem pode ser visualizado na Figura 5.13. O coeficiente de transferência de massa k manteve-se dentro da mesma ordem de magnitude exceto para o ensaio 1 e 5 utilizando a matriz pura com vazão de 9 mL/min, em geral, o aumento da vazão, indica efeitos importantes da resistência no filme externo.



**Figura 5.13:** Curvas de ruptura obtidas experimentalmente e ajustadas pelo modelo de Força Motriz Linear (FIL), para as condições experimentais do (a) E1 (T= 34°C; 250  $\mu$ m; h= 7,5 cm; Q= 3 mL/min), (b) E2 (T= 60°C; 250  $\mu$ m; h= 7,5 cm; Q= 9 mL/min), (c) E5 (T= 34°C; 250  $\mu$ m; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) (d) E6 (T = 60°C; 250  $\mu$ m; h= 12,5 cm; Q= 3 mL/min) utilizando o adsorvente PIM e (e) E5\* MP (T= 34°C; 250  $\mu$ m; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) utilizando o adsorvente MP.

KO *et al.* (2001), destacaram que, macroscopicamente, o aumento da vazão volumétrica resulta em uma diminuição do tempo de residência do fluido no leito, e

consequentemente em uma baixa utilização da capacidade de adsorção do leite. Microscopicamente, é esperado que o aumento da vazão diminuísse a resistência à difusão no filme, sem alterar a difusão do contaminante no interior da partícula. Os referidos autores concluíram que elevadas vazões resultam em pequenas resistências no filme líquido e elevados valores de coeficiente de transferência de massa.

#### 5.6.2. Modelo de Bohart-Adams

Na Tabela 5.6 são apresentados os valores das constantes cinéticas de adsorção e constante de equilíbrio, os coeficientes de correlação do modelo de Bohart-Adams aos ensaios experimentais e os desvios quadráticos médios obtidos para cada ensaio realizado. O ajuste entre os dados experimentais e teóricos foi encontrado através da determinação do coeficiente de correlação  $R^2$ . De acordo com os parâmetros obtidos pode-se observar que, se mantendo a vazão constante, há um aumento da constante de adsorção ( $k$ ) propiciado pelo aumento da temperatura, favorecido pelo aumento do coeficiente de difusão de adsorvato e pela redução da viscosidade do meio facilitando o transporte de massa. Operando com vazões mais elevadas, o efeito da temperatura no coeficiente de transferência de massa é mais significativo, provavelmente devido a uma menor contribuição da resistência do filme sobre o coeficiente global, com predomínio da difusão interna.

Observa-se que com o aumento da temperatura a capacidade de adsorção do adsorvente ( $N_0$ ) é reduzida. Este comportamento é esperado para o equilíbrio em sistemas com adsorção exotérmica. Ainda com base nos resultados apresentados na Tabela 5.6, analisando-se o efeito da vazão sobre o processo, pode-se perceber que a altas temperaturas o aumento da vazão proporciona aumento na constante de adsorção ( $k$ ). Este comportamento pode estar associado à transferência de massa no filme externo devido a que o número de  $Sh$  aumenta com o aumento do  $Re$ . Além disso, o aumento da vazão promove o alcance mais rápido do ponto de ruptura, bem como a saturação do leite. Este efeito parece ser pouco significativo nas temperaturas menores, nas quais a capacidade de adsorção é maior.

Observa-se ainda que o aumento da vazão propicia um aumento na capacidade de adsorção do adsorvente ( $N_0$ ). Este comportamento não era esperado uma vez que a capacidade de adsorção deveria ser apenas função da temperatura. Entretanto e, apesar de se tratar de um adsorvente altamente específico devido à impressão molecular, não está excluída a possibilidade de co-adsorção de outros componentes do leite, que estariam competindo com a

lactose por alguns dos sítios ativos e cuja mobilidade poderia estar sendo influenciada pelas condições externas.

**Tabela 5.6:** Parâmetros do modelo de Bohart-Adams ajustados aos dados experimentais.

Ensaio	Temperatura (°C)	Vazão (mL/min)	$q_s$ (mg/g)	$N_0$ (mg/mL)	$k$ (ml/min.mg)	$R^2$	Desvio
E1	34	3	21,0	19,0	0,01	0,98	0,07
E2	60	9	22,1	20,0	0,09	0,99	0,04
E5	34	9	37,4	33,8	0,001	0,88	0,34
E6	60	3	7,5	6,8	0,02	0,98	0,06
E5*	34	9	3,2	2,9	0,07	0,97	0,11

(\*) Experimento com polímero não impresso (MP);  $C_0$  - concentração inicial de lactose no leite

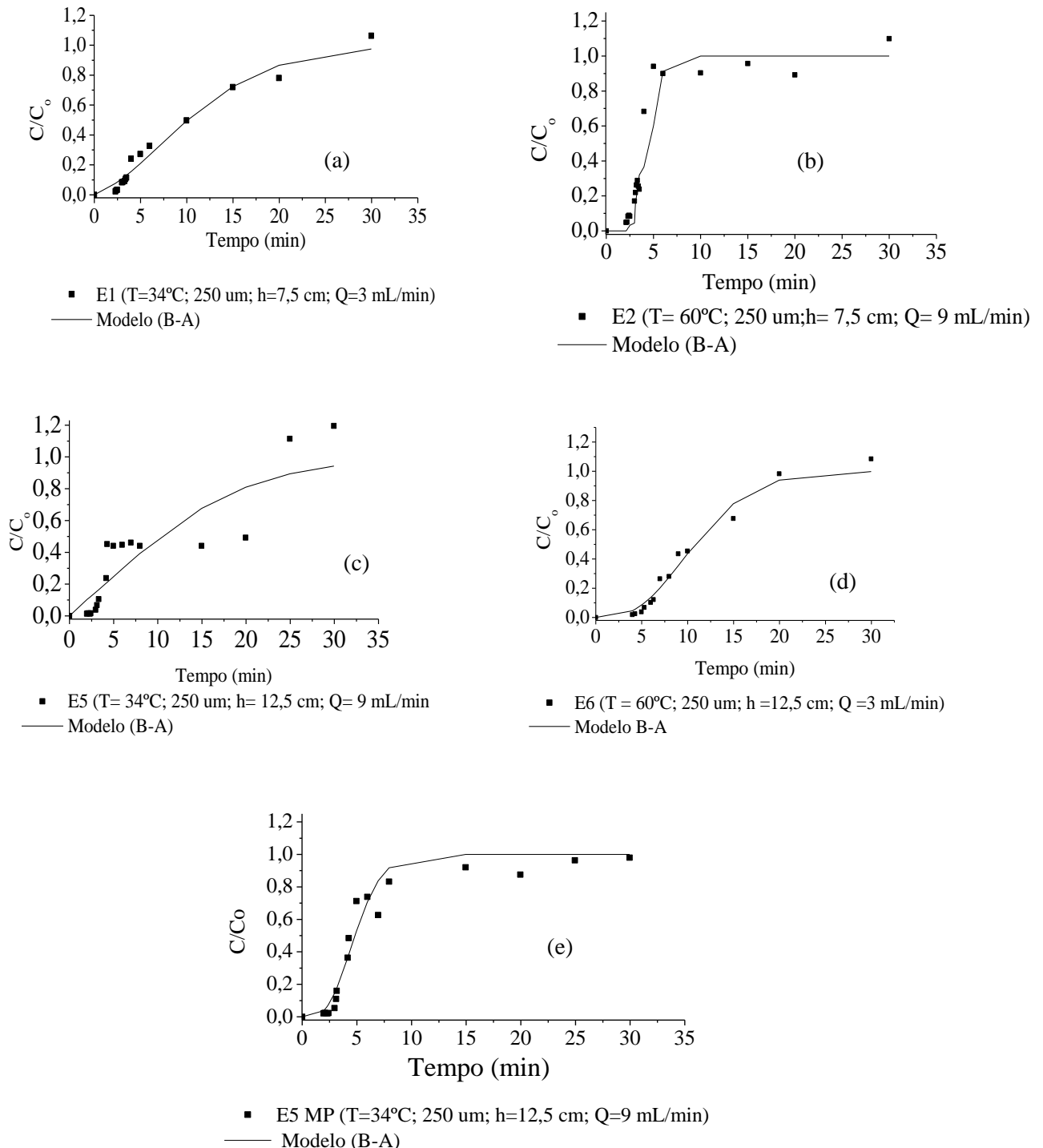
Com base nos fenômenos anteriormente explicados, e na análise dos parâmetros do modelo, é possível verificar que a maior capacidade de adsorção de lactose ( $q_s=37,43$  mg/mg) ocorre quando se utiliza o adsorvente PIM obtido no experimento 3, sob maiores vazões e menores temperaturas (9 mL/min, 34 °C).

Comparando os experimentos realizados sob as mesmas condições operacionais, ensaios 3 e 5 (Tabela 5.6), utilizando-se como adsorvente o PIM e a MP respectivamente, verificou-se que a técnica de impressão molecular proporciona um efeito bastante favorável na capacidade de remoção da lactose (de 3,2 para 37,4 mg/mg). Este fato é esperado devido à presença de locais de reconhecimento específico o que melhora a seletividade do adsorvente. Na Figura 5.14 (a,b,c,d,e) são representadas as curvas de ruptura e as condições pelas quais foram obtidas, pelos ajustes do modelo de Bohart-Adams (BA) aos dados experimentais de todos os ensaios efetuados em leito fixo sob diferentes condições operacionais.

Pode-se verificar que para diferentes condições experimentais o modelo de Bohart-Adams ajustou-se satisfatoriamente aos dados experimentais, com exceção do ensaio 3, analogamente ao observado na aplicação do modelo de Força Motriz Linear com isoterma linear. Este fato pode ser explicado devido a que o experimento 5 (PIM) apresenta um comportamento de curva de ruptura não usual, com a presença de um *plateau* indicando um período com remoção de lactose constante. Este comportamento incomum, não é previsto pelo modelo simples de Bohart-Adams e será objeto de futuros trabalhos.

Apesar das simplificações inerentes ao modelo de Bohart-Adams, as curvas de ruptura da adsorção de lactose no leito fixo de polímero impresso molecularmente, podem ser

representadas com boa precisão por esse modelo na maioria das condições operacionais aqui apresentadas, constituindo assim uma ferramenta útil para o propósito de simulação, otimização e scale up do processo.



**Figura 5.14:** Curvas de ruptura obtidas experimentalmente e ajustadas pelo modelo B-A, para as condições experimentais do (a) E1 (T= 34°C; 250 um; h= 7,5 cm; Q= 3 mL/min), (b) E2 (T= 60°C; 250 um; h=7,5 cm; Q= 9 mL/min), (c) E5 (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) (d) E6 (T = 60°C; 250 um; h=12,5 cm; Q =3 mL/min) utilizando o adsorvente PIM e (e) E5\* MP (T= 34°C; 250 um; h= 12,5 cm; Q= 9 mL/min) utilizando o adsorvente MP.

## 5.7. Caracterização do leite sem e com remoção de lactose do leite

### 5.7.1. Análises da composição centesimal do leite com baixo teor de lactose

A Tabela 5.7 apresenta a composição físico-química média, assim como os respectivos desvios padrões do leite tipo C, leite com remoção de lactose utilizando a matriz pura e o polímero impresso molecularmente na melhor condição encontrada a partir do planejamento de experimentos com 12,5 cm de altura do leito, 9 mL/min de vazão do eluente, temperatura de 60°C e tamanho da partícula de 250 µm. Os resultados foram comparados com os padrões estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite pasteurizado tipo C.

Todos os parâmetros avaliados apresentaram valores médios de acordo com o exigido pela legislação. No entanto, variáveis como proteína, gordura, carboidratos e cinzas apresentaram altos coeficientes de variação, ou seja, maior variação entre as médias. Quanto ao teor de gordura, as amostras fora dos padrões apresentaram-se com valores percentuais superiores ao estabelecido pela legislação (3%), exceto o leite PIM.

**Tabela 5.7:** Composição centesimal do leite tipo C, com remoção de lactose utilizando MP e PIM.

Análises	Leite Integral	Leite (MP)	Leite (PIM)	Legislação (BRASIL, 2002)
pH	6,25 <sup>c</sup> ±0,0	6,06 <sup>b</sup> ±0,1	6,55 <sup>a</sup> ±0,0	6,5 a 6,8
Acidez T.T. (g de ácido láctico/100g)	0,23 <sup>a</sup> ± 0,1	0,38 <sup>b</sup> ±0,0	0,29 <sup>c</sup> ±0,0	0,14 a 0,18
Umidade (%)	89,64 <sup>a</sup> ±0,0	91,4 <sup>a</sup> ±0,9	90,65 <sup>a</sup> ±0,4	87,5%
Cinzas (%)	0,72 <sup>a</sup> ±0,0	0,69 <sup>a</sup> ±0,0	0,58 <sup>a</sup> ±0,0	0,80
Proteína (%)	3,40 <sup>a</sup> ±0,4	3,31 <sup>a</sup> ±0,1	3,04 <sup>a</sup> ±0,1	2,9 g/100mL
Lipídios (%)	3,81 <sup>a</sup> ±0,0	3,53 <sup>ab</sup> ±0,0	2,67 <sup>b</sup> ±0,0	3,0 g/100ml
Açúcares Redutores (%)	4,17 <sup>a</sup> ±0,1	3,40 <sup>b</sup> ±0,0	2,50 <sup>c</sup> ±0,0	-
Açúcares Totais (%)	3,59 <sup>a</sup> ± 0,1	2,40 <sup>c</sup> ±0,1	2,83 <sup>b</sup> ±0,1	-
Carboidrato (%)	5,83 <sup>a</sup> ±0,3	3,63 <sup>b</sup> ±0,9	2,59 <sup>b</sup> ±0,6	5,17%
Lactose (%)	4,7 <sup>a</sup> ±0,1	2,82 <sup>b</sup> ±0,1	1,88 <sup>c</sup> ±0,6	-
Energia (Kcal/ 100g)	71,21 <sup>a</sup> ±1,2	59,53 <sup>b</sup> ±1,9	46,55 <sup>c</sup> ±0,9	-

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indica diferenças significativas na mesma linha quando comparado ao controle (leite integral) (p <0,05).

Os dados mostraram que, após a percolação do leite na coluna recheada com partículas MP ou PIM, houve uma redução significativa da acidez quando comparado ao leite integral,

com valores variando de 0,38 a 0,29 g de ácido láctico/100g, respectivamente, inferiores aos encontrados por GOMES *et al.*, (2009), que encontraram acidez entre 0,5 e 0,7% de ácido láctico.

Os resultados referentes aos valores de umidade e cinzas não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si ( $p > 0,05$ ), indicando médias acima dos padrões exigidos na legislação brasileira.

Os valores proteicos entre os leites com baixo teor de lactose, não diferiram estatisticamente do controle (leite integral). Os valores proteicos encontrados neste trabalho são inferiores que os encontrados por LEONARDI *et al.*, (2011), que obtiveram 4,1% em leites quando submetidos a radiação gama proveniente do  $^{60}\text{Co}$  (Cobalto 60). FAEDO *et al.* (2013) obtiveram valores inferiores, cerca de 1,0% de proteínas no permeado do leite quando comparado ao nosso estudo, os baixos valores de proteínas foram obtidos em um processo híbrido combinando ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e hidrólise enzimática para obtenção de leite pasteurizado com reduzido teor de lactose.

Na avaliação lipídica, os resultados variaram entre 3,8 a 2,6%, entretanto apenas o leite obtido após a utilização do PIM diferiu estatisticamente do leite integral. Observa-se uma redução lipídica significativa do leite integral para os leites sem lactose, possivelmente, o processo de adsorção de lactose em matriz hidrofóbica promoveu a remoção física da gordura do leite, com esse resultado, o produto fica dentro da faixa de leite semi ou parcialmente desnatado (BRASIL, 1996). LEONARDI *et al.*, (2011) obteve cerca de 3,4% de lipídios em leites submetidos a radiação gama proveniente do  $^{60}\text{Co}$  (Cobalto 60).

Dentre os constituintes dos leites avaliados, os açúcares redutores e totais, carboidratos, lactose e energia diferiram estatisticamente do controle e entre si.

De acordo com a legislação vigente (BRASIL 1996), o valor energético ideal para o leite integral é cerca de 60 kcal/100g, valores inferiores foram encontrados neste trabalho para os leites com baixo teor de lactose após a percolação na coluna usando partículas MP e PIM, os valores variaram entre 59,53 e 46,55 kcal/100g, respectivamente.

No conteúdo mineral, a porcentagem de cinzas do leite sem e com remoção de lactose foram menores (0,6 e 0,5%) quando comparado ao leite integral encontrado por CUNHA *et al.*, (2007) que foi de 0,80%.

O leite integral utilizado nesta pesquisa apresentou um teor inicial de lactose de 4,7%, sugerindo um possível desconforto para pessoas com intolerância à lactose, uma vez que HOLSINGER e KLIGERMAN (1997) comprovaram sintomas de intolerância a este açúcar após ingestão de leite pasteurizado com teor de 4,11% de lactose.



Após a percolação do leite na coluna utilizando as partículas PIM e MP, os leites apresentaram teor de lactose em torno de 1,8 e 2,8 % de lactose, respectivamente; com uma redução de 60 e 40% em relação à lactose inicial. Porém, este nível ainda pode causar desconforto para consumidores intolerantes à lactose. Atualmente, a legislação brasileira não dispõe de um regulamento específico para produtos lácteos com baixo teor de lactose; contudo, a legislação (Portaria nº 29 de 1998 do Ministério da Saúde) aplicado para esse tipo de produto, preconiza que alimentos especialmente formulados para atender portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos, como a lactose, podem conter no máximo 0,5 g do nutriente por 100g ou 100 mL do produto final. De acordo com a caracterização realizada, os produtos obtidos neste trabalho podem ser considerados um produto *light*, além do baixo teor de lactose, de acordo com a Portaria nº 29 de 1998 do Ministério da Saúde.

Atualmente na Europa, discute-se como o teor de lactose dos produtos alimentares sem lactose será definido. Por exemplo, as questões do grupo de trabalho de Nutrição da Sociedade Alemã de Química dos Alimentos recomendam três categorias de declaração nesses tipos de alimentos (WIN, 2005), ou seja, considera-se de baixo nível de lactose produtos alimentares com teores que corresponde a  $\leq 1\%$  de lactose, nível muito baixo de lactose com teor de  $\leq 0,1\%$  e nível sem lactose com valores médios de  $\leq 0,01\%$  de lactose. O último é o nível mais rigoroso a ser discutido, o que permite que estes produtos alimentares possam ser utilizados com segurança na administração de dietas de pacientes com galactosemia, uma vez que tais produtos alimentares são também indicados por serem "livre" de galactose.

#### 5.7.2. Caracterização microbiológica do leite sem e com remoção de lactose

A avaliação microbiológica demonstrou que o uso de polímero impresso molecularmente e matriz pura para obtenção de um leite com baixo teor de lactose, atende aos parâmetros preconizados pela legislação, resultando em um produto com boa qualidade higiênico-sanitária, conforme está apresentado na Tabela 5.8 em que os resultados obtidos no leite com e sem remoção de lactose para coliformes termo tolerante, coliformes totais e *Salmonella sp.*, encontram-se dentro dos parâmetros propostos pela legislação brasileira vigente, que são 10 NMP/g,  $10^2$  NMP/g e Ausente, respectivamente (BRASIL, 2001). Atendendo assim aos requisitos mínimos de qualidade para o consumo humano.

**Tabela 5.8:** Resultado microbiológico do leite e com baixo teor de lactose.

<b>Amostras</b>	<b>Coliforme total (NMP/g)</b>	<b>Coliforme termotolerante (NMP/g)</b>	<b><i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)</b>
<b>Leite Integral</b>	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
<b>Leite MP</b>	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
<b>Leite PIM</b>	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente

### 5.7.3. Análise sensorial do leite com baixo teor de lactose

A Tabela 5.9 ilustra os resultados da análise sensorial de diferença do padrão para o leite integral e os leites sem lactose obtidos a partir da percolação na coluna recheada com partículas MP ou PIM.

**Tabela 5.9:** Média das notas do teste de diferença do padrão para o leite integral e com remoção de lactose MP e PIM.

<b>Leite</b>	<b>Nota sensorial</b>
<b>Integral (Controle)</b>	2,43 <sup>a</sup> ±0,96
<b>Com remoção (MP)</b>	3,46 <sup>b</sup> ±0,10
<b>Com remoção (PIM)</b>	1,43 <sup>c</sup> ±0,21

De acordo com a Tabela 5.9, o leite obtido após a percolação na coluna utilizando o adsorvente PIM, apresentou nota sensorial significativamente maior quando comparado aos outros leites, integral e MP. Na escala do método de diferença do padrão, a nota sensorial mais próxima de zero significa que o produto é semelhante ao padrão, portanto a nota sensorial 1,43 indica que o leite com remoção PIM foi o produto que mais se assemelha com o leite integral (controle) (Tabela 5.9).

A Tabela 5.10 mostra os valores médios para os atributos na avaliação sensorial, na qual pode perceber uma significativa variabilidade nas notas dos diferentes leites avaliados. Na análise de variância, procurou-se saber quais as características sensoriais dos leites investigados que podem estar associados à remoção de lactose. A análise estatística mostrou que as amostras não apresentaram diferenças significativas entre si com relação aos atributos aroma, textura e impressão global. De acordo com a Tabela 5.10, todos os leites foram bem aceitos, essa boa aceitação pelos consumidores do leite com remoção de lactose utilizando partículas MP e PIM, evidencia que a remoção de lactose não afetou as características

sensoriais originais do leite, que se caracteriza como sabor agradável, levemente adocicado e aroma suave.

**Tabela 5.10:** Notas para os atributos avaliados pelo teste de aceitação dos leites padrão integral e com remoção parcial de lactose.

Atributos	Leite Tipo C	Leite com remoção (MP)	Leite com remoção (PIM)
<b>Aparência</b>	6,51 <sup>a</sup> ±2,1	7,07 <sup>b</sup> ±1,4	6,14 <sup>ab</sup> ±2,3
<b>Aroma</b>	6,00 <sup>a</sup> ±1,6	6,55 <sup>a</sup> ±1,3	5,92 <sup>a</sup> ±1,8
<b>Textura</b>	5,85 <sup>a</sup> ±1,8	6,66 <sup>a</sup> ±1,4	5,70 <sup>a</sup> ±2,0
<b>Sabor</b>	5,81 <sup>ab</sup> ±2,1	5,92 <sup>a</sup> ±1,9	4,48 <sup>b</sup> ±2,3
<b>Impressão global</b>	6,00 <sup>a</sup> ±1,8	6,33 <sup>a</sup> ±2,0	5,25 <sup>a</sup> ±2,4

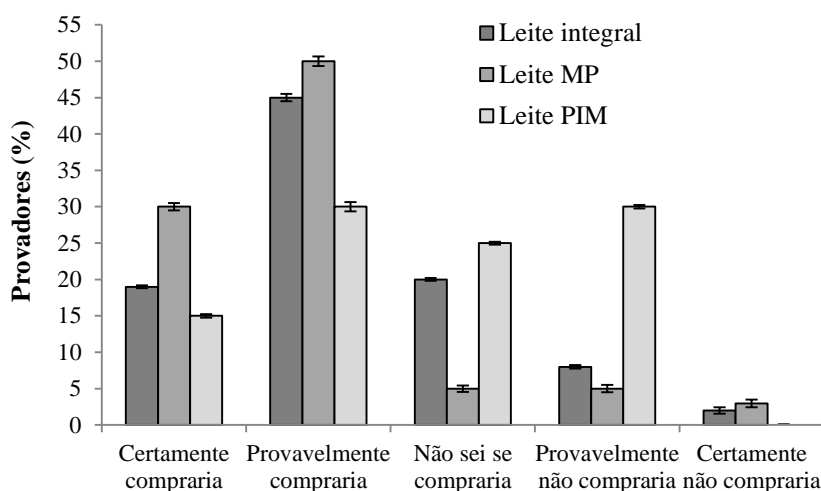
<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indica diferenças significativas na mesma linha quando comparado ao controle (leite integral) (p <0,05).

O resultado pela análise de variância (ANOVA) na Tabela 5.10, indicou que houve diferença significativa ao nível de 0,5% para o leite integral e os leites com remoção de lactose, MP e PIM. No entanto, o leite obtido após a percolação na coluna utilizando o adsorvente PIM, apresentou nota sensorial significativamente menor em relação ao sabor quando comparado aos outros leites, segundo a equipe de julgadores, essa menor nota pode estar relacionado com os comentários dos julgadores sobre consistência “mais rala”, sabor “menos adocicado” e “corpo fraco”, são características que podem levar à rejeição por parte dos consumidores, por isso realizou-se uma análise de aceitação sensorial. Alguns tratamentos de remoção de lactose do leite podem favorecer a alteração de algumas propriedades sensoriais características do leite. LONGO e WASZCZYNSKYJ (2005) verificaram diferenças na comparação sensorial de leites UHT (*Ultra-High Temperature*), na qual o leite com baixo teor de lactose, devido à hidrólise da lactose pela enzima lactase, apresentou sabor doce mais intenso que o leite com teor de lactose normal.

Segundo ANDRADE *et al.*, (2004), a reação de hidrólise de fato ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, e entre elas pode-se citar o aumento da solubilidade, do poder adoçante e da digestibilidade dos açúcares, da viscosidade, do corpo, da textura e do paladar dos produtos. O leite, por ser um produto biológico, tem o sabor influenciado tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Esse fato justifica os cuidados que se deve tomar para evitar alterações de sabor no leite, que são decisivos para a manutenção da preferência do consumidor ou para ampliar o mercado existente. Segundo PEREIRA *et al.*, (2012), sabores estranhos ao leite podem ocorrer devido a vários fatores, a lactose por ser um açúcar redutor, possui um grupo aldeído livre que reage com aminas de proteínas, peptídeos e aminoácidos dos produtos lácteos ocasionando a Reação de *Maillard*

(reação de escurecimento não enzimático), responsável pela formação de compostos escuros denominados melanoidinas. Além da redução dos valores nutritivos, a Reação de *Maillard* também proporciona alterações de sabor e aroma do leite e derivados. Portanto, o uso do processo de adsorção usando o PIM ou MP para remoção de lactose do leite não apresentou alteração nas características sensoriais do leite, indicando assim que esta tecnologia é uma alternativa a ser considerada pela indústria de leite e derivados.

De acordo com a Figura 5.15, o leite obtido após a percolação pela coluna recheada com MP, foi o que mais se aproximou do leite integral, apresentando 80% dos provadores com intenção de comprar o produto, enquanto que, 64% comprariam o leite integral e 45% o leite obtido após percolação na coluna utilizando o adsorvente PIM. A menor nota do leite PIM foi atribuída, de acordo com os comentários dos provadores, ao sabor de leite desnatado, com odor e sabor pouco intenso. Entretanto, de acordo com os dados estatísticos, a maioria dos consumidores compraria o novo produto.



**Figura 5.15:** Percentual de intenção de compra para o leite padrão integral e os leites com remoção parcial de lactose.

TORRES *et al.*, (2000) realizaram um estudo que compararam as características sensoriais do leite integral e leite sem lactose ultrapasteurizado (UP) com diferentes teores de gordura. O leite com maior aceitação sensorial foi o desnatado livre de lactose, entretanto foi relatado pelos provadores sabores cozidos e processados em relação ao leite integral. ADHIKARI *et al.*, (2010) desenvolveram leite hidrolisado sem lactose utilizando nanofiltração e compararam com leite sem lactose hidrolisado comercial, mas a diferenças não foi estatisticamente significativa ao nível de 0,05 de acordo com os provadores. CHOI *et al.*, (2007) avaliaram características sensoriais de produtos lácteos disponíveis

comercialmente através de instrumentação sensorimétrica e a sensação de dulçor avaliada pelo equipamento esta diretamente associada com a lactose presente nas amostras seguido da proteína.

No trabalho de OCHI *et al.*, (2010), foi usada a análise descritiva quantitativa para descrever os principais atributos de nove produtos lácteos ultrapasteurizados (UP) e de vários níveis de gordura, incluindo dois produtos com lactose reduzida. Os autores concluíram que o aumento aparente na percepção da viscosidade do leite com 100% de lactose reduzida pode estar relacionado com o aumento da percepção da doçura nestes produtos. Para CHAPMAN *et al.*, (2001), leite com lactose reduzida é entendido como mais doce que o leite cru, como consequência da conversão de lactose em glicose e galactose. TORRES *et al.*, (2000) avaliaram amostras de leite ultrapasteurizados sem lactose e foram observados atributos negativos: textura de giz, a falta de frescura, sabor oxidado e processados. Essas diferenças podem ser causadas por processos térmicos para os leites sem lactose, pelas reações enzimáticas que resultam no leite isento de lactose ou uma combinação destes fatores. Tais atributos não foram observados pelos provadores nos leites obtidos neste trabalho, pois o processo utilizado para remoção de lactose não alterou as características sensoriais do leite, devido à baixa temperatura (34 °C) utilizada e a técnica de adsorção proposta.

Além disso, de acordo com os provadores, não foram notados sabor castanho e aromático associados com o leite aquecido, características encontradas em leites submetidos a elevadas temperaturas, ou seja, o produto final apresentou as mesmas características organolépticas com leite padrão e totalmente em conformidade com as expectativas dos consumidores, o que era de se esperar, pois a tecnologia utilizada foi a remoção de lactose por adsorção física e com temperatura à 34 °C. É importante compreender as características sensoriais leites livres de lactose em comparação com o leite normal, pois existe uma grande população de intolerantes à lactose que necessitam de alternativas por produtos lácteos sem lactose.

### **5.8. Caracterização da bebida láctea utilizando leite com baixo teor de lactose com e sem adição de polpa de fruta**

Neste tópico, serão apresentados, analisados e discutidos os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento das bebidas lácteas utilizando leite com baixo teor de lactose, obtido após a percolação em coluna de leito fixo recheada com os adsorventes MP ou PIM.

### 5.8.1. Composição centesimal da bebida láctea sem polpa de mangaba

Nas Tabelas 5.11 e 5.12, estão os resultados das análises físico-químicas realizados nas bebidas lácteas fermentadas sem e com adição de polpa de mangaba com o objetivo de avaliar a sua qualidade, integridade ou estado de conservação.

**Tabela 5.11:** Composição físico-química das bebidas lácteas sem polpa de mangaba.

Constituintes	Bebida Láctea Integral	Bebida Láctea (MP)	Bebida Láctea (PIM)
pH	5,90 <sup>b</sup> ±0,1	6,28 <sup>a</sup> ±0,04	5,80 <sup>b</sup> ±0,0
acidez T,T (g de ácido láctico/100g)	0,9 <sup>a</sup> ± 0,1	0,7 <sup>b</sup> ±0,01	0,8 <sup>b</sup> ±0,0
Umidade (%)	79,62 <sup>a</sup> ±0,8	80,52 <sup>a</sup> ±1,3	79,69 <sup>a</sup> ±2,0
Cinzas (%)	1,25 <sup>a</sup> ±0,0	1,17 <sup>a</sup> ±0,0	1,04 <sup>b</sup> ±0,0
Proteína (%)	3,07 <sup>a</sup> ±0,1	2,28 <sup>b</sup> ±0,30	1,39 <sup>c</sup> ±0,1
Lipídios (%)	3,52 <sup>a</sup> ±0,0	2,18 <sup>b</sup> ±0,0	2,07 <sup>b</sup> ±0,1
Açúcares Redutores (%)	1,36 <sup>a</sup> ±0,0	1,36 <sup>a</sup> ±0,0	1,31 <sup>b</sup> ±0,0
Açúcares Totais (%)	3,74 <sup>a</sup> ±0,0	2,68 <sup>b</sup> ±0,0	2,49 <sup>c</sup> ±0,0
Carboidrato (%)	12,38 <sup>a</sup> ±0,9	10,41 <sup>a</sup> ±1,0	9,87 <sup>a</sup> ±2,06
Lactose (%)	3,2 <sup>a</sup> ±0,3	1,92 <sup>b</sup> ±0,0	0,96 <sup>c</sup> ±0,1
Energia (Kcal/ 100g)	93,48 <sup>a</sup> ±3,1	71,28 <sup>a</sup> ±4,9	63,67 <sup>a</sup> ±9,7

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indica diferenças significativas na mesma linha quando comparado ao controle (leite integral) (p <0,05).

**Tabela 5.12:** Composição físico-química das bebidas lácteas com polpa de mangaba.

Constituintes	Bebida Láctea Integral	Bebida Láctea (MP)	Bebida Láctea (PIM)
pH	4,54 <sup>b</sup> ±0,14	4,28 <sup>a</sup> ±0,04	4,80 <sup>b</sup> ±0,05
acidez T,T (g de ácido láctico/100g)	0,91 <sup>b</sup> ± 0,15	0,89 <sup>b</sup> ±0,01	0,80 <sup>b</sup> ±0,01
Umidade (%)	78,8 <sup>a</sup> ±1,6	81,10 <sup>a</sup> ±0,31	79,83 <sup>a</sup> ±2,16
Cinzas (%)	1,23 <sup>a</sup> ±0,06	1,41 <sup>a</sup> ±0,41	1,01 <sup>a</sup> ±0,05
Proteína (%)	1,45 <sup>ab</sup> ± 0,23	1,81 <sup>a</sup> ±0,06	1,32 <sup>b</sup> ±0,10
Lipídios (%)	4,02 <sup>a</sup> ±1,65	2,08 <sup>a</sup> ±0,86	2,51 <sup>a</sup> ±0,59
Açúcares Redutores (%)	1,36 <sup>a</sup> ±0,0	1,37 <sup>a</sup> ±0,02	1,40 <sup>a</sup> ±0,05
Açúcares Totais (%)	1,55 <sup>a</sup> ±0,1	1,38 <sup>b</sup> ±0,12	1,38 <sup>b</sup> ±0,13
Carboidrato (%)	11,40 <sup>a</sup> ±0,52	10,58 <sup>a</sup> ±0,77	12,30 <sup>a</sup> ±1,65
Lactose (%)	3,05 <sup>a</sup> ±0,1	1,56 <sup>a</sup> ±0,12	1,04 <sup>a</sup> ±0,05
Energia (Kcal/ 100g)	87,58 <sup>a</sup> ±14,88	68,28 <sup>a</sup> ± 4,70	77,07 <sup>a</sup> ±11,31

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indica diferenças significativas na mesma linha quando comparado ao controle (leite integral) (p <0,05).

Observam-se na Tabela 5.11, que somente umidade, carboidrato e energia não são estatisticamente diferentes para as três bebidas lácteas em estudo. Os valores de pH para as

bebidas sem polpa de mangaba foram superiores ao descrito por COSTA *et al.*, (2013), que desenvolveram uma bebida láctea sabor juçai encontrando valores de pH em torno de 4,6, enquanto que neste estudo obteve-se valores entre 5,8 a 6,2.

Na Tabela 5.12, observou-se que os valores médios de pH, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), para a bebida láctea com polpa de mangaba. Pelos resultados obtidos verificou-se que os valores do pH da bebida integral e das bebidas com remoção de lactose, estão superiores aos encontrados para bebida láctea kefir saborizadas com morango e ameixa encontrado por SANTA *et al.* (2008) onde os valores do pH estão em torno de 4,5. De acordo com esses autores, este aumento observado da acidez na bebida láctea em geral, deve-se provavelmente a presença de alguns tipos de ácidos, como o ácido cítrico, na polpa de mangaba conforme citado por SILVA *et al.*, (2012).

Normalmente, a fermentação utilizando grãos de kefir é realizada até atingir pH de 4,4-4,6 sendo que na maioria das vezes, leva em torno de 16-24 h. As bebidas lácteas, com polpa de mangaba, apresentaram valores de pH semelhantes a bebida kefir produzidas em laticínios, com outros tipos de frutas, e os valores medidos neste estudo foram entre 4,2 e 4,8, são geralmente de acordo com os registrados por BONOMO *et al.*, (2006), que adicionaram polpa de frutas em bebidas lácteas com outras culturas *starter*.

Com relação à acidez dos produtos elaborados descritos na Tabela 5.11, foram: 0,9 (g de ácido láctico/100g) para a bebida integral, 0,7 (g de ácido láctico/100 g) para o leite fermentado com remoção de lactose após adsorção utilizando MP e 0,8 (g de ácido láctico/100 g) para o leite fermentado com remoção de lactose após adsorção utilizando PIM, ambos sem adição de polpa de mangaba. De acordo com os valores médios de acidez total titulável apresentados pelas bebidas com adição de polpa de mangaba (Tabela 5.12), os resultados indicaram que houve diferença significativa da bebida integral e as bebidas com remoção de lactose do leite depois de percoladas a coluna recheada com MP e PIM.

Na Tabela 5.11, a bebida com remoção de lactose após a percolação através das partículas MP diferiu de todas e apresentou médias de acidez inferiores (1,0 g de ácido láctico/100g), enquanto a bebida integral também diferiu das demais e seus valores médios de acidez foram superiores (0,9 g de ácido láctico/100g).

Segundo o Regulamento Técnico que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2005), o teor de acidez para o produto denominado kefir deve estar entre 0,5 a 1,5 g de ácido láctico/100 g, no produto final, resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho para as formulações de kefir utilizando a polpa de mangaba com

valores entre 0,89 e 0,80 g de ácido láctico/100g, com exceção da bebida láctea integral, que apresentou 0,91 de acidez, conforme apresentado na Tabela 5.12.

Com relação à proteína analisada de todas as bebidas lácteas (Tabelas 5.11 e 5.12), indicaram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), todos os valores encontrados estão dentro ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor, onde o conteúdo de proteína deve ser superior a 1,0 g/100g para bebida láctea fermentada com ou sem adição de produtos ou substância (s) alimentícia (s) (BRASIL, 2005).

Na Tabela 5.11, os resultados de proteínas na bebida láctea com leite após a percolação na coluna utilizando partículas MP, mostrou valores inferiores (2,28%) aos encontrados por THAMER e PENNA *et al.*, (2006), que desenvolveram bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e encontraram teores de proteínas em torno de 2,18 e 2,16%.

Quanto aos teores de umidade de todos os produtos obtidos neste estudo, os valores variaram de 78,8% a 81,1% (Tabelas 5.12 e 5.13). Com relação ao percentual de umidade encontrado nas bebidas com 15% de polpa de mangaba (Tabela 5.13), os valores de umidade variaram entre 78,8 a 81,1%, e foram inferiores aos descritos por SILVA *et al.* (2010) que verificaram na bebida láctea com sabor bacuri enriquecida com pólen, umidades que variaram entre 82,3 a 84,7%, possivelmente esta pequena diferença deve-se ao tipo de fruta utilizada e composição dos constituintes que variam entre 8 e 10%.

Os valores de umidade observados neste trabalho foram superiores aos obtidos por SANTOS *et al.*, (2012) desenvolveram uma bebida láctea com sabor manga que variou entre 75,8 e 77,6%, confirmando assim que o tipo de fruta pode influenciar fortemente na umidade da bebida láctea, além de outras propriedades, como por exemplo, a porcentagem de polpa oferecida que em ambos os casos foi cerca de 15%.

Os resultados obtidos de lipídios nas bebidas sem adição de polpa com remoção de lactose após a percolação do leite através da coluna recheada com PIM ou MP foram entre 2,0 e 2,2 % e para a bebida láctea integral foi de 3,5% (Tabela 5.12), as bebidas lácteas com baixo teor de lactose apresentaram valores inferiores aos encontrados para a bebida láctea fermentada com kefir com leite de vaca e ovelha da região leste da Europa, onde os valores dos lipídios foram em torno de 3,2% (TRATNIK *et al.*, 2006).

Os teores de lipídios encontrados neste estudo para bebidas com polpa de mangaba (Tabela 5.13) foram de 4,0, 2,0 e 2,5% para as formulações com leite integral e com remoção de lactose após percolação na coluna utilizando os suportes MP e PIM, respectivamente. De maneira geral, a variação que ocorrem nos constituintes do leite (principalmente proteínas,



gorduras e vitaminas) durante a fermentação, e esta exerce influência nas propriedades sensoriais e dietéticas do produto final de acordo com a literatura (JARDIM *et al.*, 2012).

Na literatura foi observado por THAMER e PENNA (2006) cerca de 2% de lipídeos na bebida láctea fermentada acrescida com 15% de polpa de umbu e COSTA *et al.* (2012) obtiveram cerca de 3,74 a 4,61% de lipídeos para a mesma bebida saborizado com juçuí.

Quanto ao teor de lactose na bebida láctea PIM sem polpa de mangaba, apresentou valor de 0,96%, redução de 70% em relação a bebida integral (3,2%), o que não é notado na bebida láctea com polpa de mangaba (Tabela 5.11). Segundo HOLSINGER e KLIGERMAN (1997), os sintomas da intolerância podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%, na prática isto pode ser obtido reduzindo aproximadamente 1,2% de lactose em 220 mL de produto lácteo.

De maneira geral, a variação que ocorrem nos constituintes do leite (principalmente proteínas, gorduras e vitaminas) durante a fermentação, e esta exerce influência nas propriedades sensoriais e dietéticas do produto final de acordo com a literatura (JARDIM *et al.*, 2012).

#### 5.8.2. Caracterização microbiológica das bebidas lácteas sem e com polpa de mangaba

Pode-se observar na Tabela 5.14 que os resultados obtidos nos produtos avaliados para coliformes termo tolerante, coliformes totais e *Salmonella* sp., encontram-se dentro dos parâmetros propostos pela legislação brasileira vigente, que são 10 NMP/g,  $10^2$  NMP/g e Ausente, respectivamente (BRASIL, 2001), atendendo assim aos requisitos mínimos de qualidade para o consumo humano.

Segundo a Instrução Normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005 (BRASIL, 2005), nas bebidas lácteas fermentadas os cultivos de micro-organismos dos cultivos utilizados devem ser viáveis, ativos e estar superiores a  $10^6$  UFC/ml no produto final e durante seu prazo de validade. Com relação às bactérias lácteas os valores encontrados apresentaram uma grandeza entre  $2,35 \times 10^8$  e  $3,75 \times 10^9$  UFC (Tabela 5.14).

A literatura relata que os probióticos devem ser ingeridos diariamente para que seu efeito seja contínuo, a dosagem recomendada para adulto é de 5 bilhões de unidades formadoras de colônias (UFC)/dia/g ou mL de produto (ou seja,  $5 \times 10^9$  UFC/dia/g ou mL). E ainda recomenda-se que para ocorrer os efeitos terapêuticos os probiótico possuam doses com grandezas variando de  $10^6$  a  $10^9$  UFC (BRASIL, 2005).

**Tabela 5.13:** Resultado microbiológico das bebidas lácteas sem e com polpa de mangaba.

<b>Amostras</b>	<b>Cel. viáveis (UFC/mL)</b>	<b>Coliforme total (NMP/g)</b>	<b>Coliforme termotolerante (NMP/g)</b>	<b>Salmonella sp. (UFC/g)</b>
Bebida Láctea Integral	$3,75 \times 10^9$	< 1(NMP/100mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
Bebida Láctea (MP) sem polpa	$3,05 \times 10^9$	< 1(NMP/100mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
Bebida Láctea (PIM) sem polpa	$2,97 \times 10^9$	< 1(NMP/100mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
Bebida Láctea (MP) com polpa	$2,35 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
Bebida Láctea (PIM) com polpa	$2,59 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente

### 5.8.3. Viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir

A Tabela 5.14 apresenta os resultados da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir utilizando leite sem e com remoção parcial de lactose obtidos no ensaio 5 (E5), com e sem adição de polpa de mangaba.

**Tabela 5.14:** Avaliação da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.

<b>Amostras</b>	<b>Viscosidade (cP)</b>
B. láctea Integral sem remoção sem polpa de mangaba	$2636^a \pm 1,98$
B. láctea com remoção (PIM) sem polpa de mangaba	$1065^a \pm 2,54$
B. láctea com remoção (MP) sem polpa de mangaba	$1252^a \pm 0,98$
B. láctea Integral sem remoção com polpa de mangaba	$1320^a \pm 2,16$
B. láctea com remoção (PIM) com polpa de mangaba	$993^b \pm 1,83$
B. láctea com remoção (MP) com polpa de mangaba	$1260^a \pm 0,87$

Quanto à viscosidade dos produtos, todas as amostras obtidas, exceto a bebida com remoção PIM e adição de polpa de mangaba, não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p \leq 0,05$ ). A bebida láctea integral sem remoção e sem polpa de mangaba apresentou uma viscosidade superior quando comparado a todas as outras bebidas elaboradas neste estudo.

Observou-se que a bebida láctea com remoção PIM com adição de polpa de mangaba apresentou médias de viscosidade significativamente menores em relação às outras bebidas.

Pode-se observar que a remoção de lactose do leite está associada à diminuição da viscosidade nas bebidas lácteas, pois os menores valores foram encontrados nas bebidas com a remoção, possivelmente devido à redução de algum constituinte que está presente na composição do leite, como por exemplo, o teor de lipídios, que variou de 4,02 para 2,51% (Tabela 5.12). Segundo MONTANUCI, *et al.*, (2010), o teor de gordura presente no leite pode afetar diretamente na viscosidade da bebida láctea, quanto maior a quantidade de gordura maior a viscosidade, justificando a baixa viscosidade das amostras analisadas.

A variação do teor de proteínas observado na Tabela 5.11 indica que o uso dos adsorventes para remoção de lactose do leite na preparação da bebida láctea variou de 3,07 para 1,39, respectivamente, para a bebida láctea integral e com remoção PIM. Estes valores indicam uma possível relação aos dados obtidos para viscosidade com resultados que variaram entre 2636 a 993 cP. Foi observado por ALMEIDA, BONASSI e ROÇA, (2001), que a diminuição da viscosidade das bebidas lácteas pode ser decorrente da redução de sólidos totais (proteínas/lipídios) disponíveis para o processo fermentativo.

Observou-se visualmente e através dos valores de viscosidade que as bebidas remoção de lactose, principalmente a bebida PIM, apresentou consistência menos firme em relação às outras bebidas elaboradas. Nota-se que a utilização do polímero com impressão molecular reduz essa diferença. Esse comportamento permanece quando é adicionada polpa de mangaba nas bebidas lácteas produzidas com leite sem e com remoção parcial de lactose, possivelmente pelo maior teor de água presente na polpa de mangaba. Estudos anteriores realizados por GAMA *et al.*, (2010) indicam que os leites fermentados com maiores viscosidade, apresentaram maior nível de aceitação por parte dos consumidores, e mostraram um potencial probiótico satisfatório.

As proteínas do leite influenciam diretamente a viscosidade que está diretamente relacionada com o tipo de leite usado na preparação de produtos lácteos (JUMAH *et al.*, 2001). De acordo com KOKSOY e KILIC (2004), a viscosidade sofre a influência do teor de sólidos secos, possivelmente pela compactação da caseína. De acordo com CALDEIRA *et al.*, (2010) altos valores de viscosidade indicam atributo positivo devido a consistência semelhante ao iogurte, pois parte dos provadores neste trabalho destacaram esta característica indicada na ficha de avaliação no atributo textura.

#### 5.8.4. Análise sensorial de aceitação e intenção de compra para as bebidas lácteas

Os resultados dos testes de aceitação realizados com as bebidas lácteas com e sem polpa de mangaba estão descritos nas Tabelas 5.15 e 5.16.

**Tabela 5.15:** Médias das notas seguidas do desvio padrão para os atributos avaliados pelo teste de aceitação para as bebidas lácteas fermentadas sem adição de polpa.

<b>Atributos</b>	<b>Bebida Láctea Integral</b>	<b>Bebida Láctea (MP)</b>	<b>Bebida Láctea (PIM)</b>
<b>Aparência</b>	7,5 <sup>a</sup> ±2,1	6,9 <sup>a</sup> ±1,4	6,5 <sup>a</sup> ±2,3
<b>Aroma</b>	7,4 <sup>a</sup> ±1,6	7,1 <sup>a</sup> ±1,4	6,6 <sup>a</sup> ±1,8
<b>Textura</b>	7,1 <sup>a</sup> ±1,8	6,7 <sup>a</sup> ±1,4	4,8 <sup>b</sup> ±2,0
<b>Sabor</b>	6,4 <sup>ab</sup> ±2,1	5,2 <sup>a</sup> ±1,9	4,3 <sup>a</sup> ±2,3
<b>Impressão global</b>	6,2 <sup>a</sup> ±2,0	6,6 <sup>a</sup> ±1,8	5,3 <sup>a</sup> ±2,4

**Tabela 5.16:** Médias das notas seguidas do desvio padrão para os atributos avaliados pelo teste de aceitação para as bebidas lácteas fermentadas saborizadas com mangaba.

<b>Atributos</b>	<b>Bebida Láctea Integral</b>	<b>Bebida Láctea (MP)</b>	<b>Bebida Láctea (PIM)</b>
<b>Aparência</b>	7,0 <sup>a</sup> ±1,2	6,9 <sup>a</sup> ±1,8	6,5 <sup>a</sup> ±1,8
<b>Aroma</b>	7,2 <sup>a</sup> ±1,7	7,0 <sup>a</sup> ±1,7	6,6 <sup>a</sup> ±1,8
<b>Sabor</b>	7,1 <sup>a</sup> ±1,4	6,7 <sup>a</sup> ±1,8	6,8 <sup>b</sup> ±1,9
<b>Textura</b>	5,4 <sup>a</sup> ±2,2	6,3 <sup>a</sup> ±2,1	6,2 <sup>a</sup> ±2,3
<b>Impressão global</b>	6,2 <sup>a</sup> ±2,1	6,4 <sup>a</sup> ±1,4	5,0 <sup>b</sup> ±1,9

De acordo com as Tabelas 5.15 e 5.16, todas as bebidas lácteas elaboradas neste estudo não tiveram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ), ou seja, foram bem aceitas pelos provadores para todos os atributos avaliados. As notas variaram de sete que corresponde a “gostei moderadamente” até nota 6 que corresponde “gostei ligeiramente” na escala hedônica proposta por INSTITUTO ADOLF LUTZ (2008). Entretanto, a bebida láctea PIM apresentou nota 6 que corresponde ao “gostei ligeiramente” na escala hedônica. Nas bebidas sem polpa, este fato pode ter ocorrido em função de não ser utilizado nenhum tipo de aromatizante, corante ou agente adoçante, buscando-se aproximar ao máximo da bebida láctea comercializada pelos laticínios no mercado. Entretanto, nas bebidas com adição de polpa de mangaba, o sabor acentuado pode ter favorecido devido às combinações aromáticas da fruta e do kefir.

Na avaliação da textura, foi obtido o maior percentual de notas para as amostras de bebida láctea integral e bebida obtida com leite com baixo teor de lactose após percolação na coluna com MP, (Tabela 5.16) que variaram entre notas de 4,8 a 7,1. O aumento do teor de sólidos totais pelo uso do leite em pó pode ter contribuído de forma expressiva para respostas

positivas em relação à textura para essas formulações analisadas. Entretanto, nas bebidas lácteas com adição de polpa, os valores para o atributo textura foram inferiores aos das bebidas sem polpa de mangaba em que variaram de 4,3 a 5,4, entretanto não houve diferença significativa entre as bebidas com polpa.

Na avaliação da textura deve-se levar em conta o corpo do produto quando consumido. O menor teor de lactose nas bebidas lácteas com remoção utilizando leite após percolação em coluna recheada com partículas PIM influenciou as notas de viscosidade (Tabela 5.15) e estão relacionados com os comentários sobre consistência “mais rala” e “menos cremosa”. Características denominadas “corpo fraco” e problemas com a viscosidade, são defeitos que podem levar à rejeição por parte dos consumidores (GOMES *et al.*, 2009).

BORTOLOZO *et al.*, (2007) avaliaram as propriedades reológicas e sensoriais de kefir enriquecido com inulina e os resultados não mostraram diferenças significativas no aroma e textura. A partir de alguns estudos de aceitação de bebida láctea observou-se por COSTA *et al.*, (2012) resultados similares para a aparência, aroma, cor e textura para a bebida láctea utilizando diferentes estabilizantes.

As médias das notas obtidas por JARDIM *et al.*, (2012) utilizando fermento lácteo comercial composto das culturas lácticas probióticas para o desenvolvimento de bebidas carbonatadas foi significativo para textura, sabor e acidez. Portanto, pode-se observar que todos os produtos avaliados caracterizaram-se por textura homogênea, suave e consistente conforme aos descritos neste trabalho.

Nos valores das notas obtidas para as bebidas lácteas com baixo teor de lactose, verificou-se que a viscosidade dos produtos elaborados exerceu grande influência na aceitabilidade da textura, sendo esta nota menor nas bebidas lácteas utilizando leite com remoção de lactose PIM sem e com adição de polpa (4,8 e 4,3).

Nas bebidas produzidas a partir do leite com remoção de lactose pós PIM, apresentaram problemas tecnológicos associados ao coágulo pouco firme o que dificultou sua aceitação por parte dos provadores. Foram observados alguns comentários sobre a consistência de todos os produtos, onde os provadores preferiam a bebida láctea mais viscosa (bebida láctea integral e MP), enquanto outros, menos viscoso, concluindo-se ser uma preferência particular de cada provador.

Quanto ao atributo aparência avaliado em todas as bebidas (Tabelas 5.15 e 5.16), os valores médios variaram de 6,5 a 7,5, resultados semelhantes aos referenciados por ZUBIOLLO *et al.*, (2012) em amostras de bebida láctea funcional. Todas as bebidas

apresentaram aspecto homogêneo, sem a presença de grumos, gás e cor e aroma característica de bebidas lácteas fermentadas.

Com relação ao sabor, todas as bebidas elaboradas (Tabelas 5.15 e 5.16), apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), onde as bebidas obtidas com leite integral, sem remoção de lactose, apresentaram as maiores médias (6,4 e 7,1) diferindo das amostras com remoção de lactose do leite após percolação na coluna utilizando partículas MP e PIM. Entretanto, nas bebidas lácteas com adição de 15% de polpa, fez com que os valores médios encontrados no atributo sabor fosse maior que na bebida sem polpa, o sabor característico da mangaba e do kefir possuem várias combinações aromáticas que poderiam ter contribuído ao seu flavor e odor agradável.

ROCHA *et al.*, (2008) desenvolveram uma bebida láctea fermentada à base de soro de queijo mussarela e polpa de manga e os resultados obtidos, demonstraram que a formulação em que ocorreu a substituição de 40% do leite por soro de queijo foi a mais aceita, situando-se próximo do termo hedônico “gostei muito”, enquanto que THAMER e PENNA (2006) avaliaram a aceitabilidade de quatro formulações de bebida láctea fermentada adicionada de polpa de umbu, um fruto característico da região Nordeste do Brasil, selecionando a bebida que continha 60% de soro e 40% de leite como a melhor aceita pelos provadores avaliados. Segundo ROCHA *et al.*, (2008), altos índices também foram alcançados para sobremesas lácteas sabor manga, cajá e mangaba e para leite fermentado adicionado de jenipapo corroborando a boa aceitação por produtos lácteos oriundos de frutos tropicais.

Quanto ao atributo impressão global avaliado pelos provadores para as bebidas lácteas obtidas, o produto elaborado com remoção de lactose após a percolação do leite na coluna contendo MP sem e com polpa de mangaba, foram aquelas que apresentaram a maior média (6,6 e 6,45), demonstrando que o processo aplicado na redução de lactose do leite sem e com adição de polpa de mangaba, não altera a aceitação das bebidas lácteas fermentadas. MARINHO *et al.*, (2012) desenvolveram formulações de bebidas lácteas fermentadas sabor cajá com diferentes culturas starters, e obtiveram média de 7,3 para textura, valor superior ao encontrado para todas as formulações neste estudo, resultados semelhantes foram encontrados por RAMOS *et al.*, (2013).

ZUBIOLLO *et al.*, (2012) avaliando sensorialmente bebidas lácteas funcionais utilizando kefir com adição de polpa de mamão e aveia, não demonstraram diferença significativa para aparência e aroma. A aceitação pelos consumidores de produtos alimentares saudáveis é fortemente dependente das características sensoriais dos produtos (ARES *et al.*, 2011).

As Tabelas 5.17 e 5.18 apresentam os resultados de aceitação das bebidas lácteas sem e com polpa de mangaba.

**Tabela 5.17:** Resultados do grau de aceitação das bebidas lácteas sem polpa da mangaba.

<b>Escala Hedônica</b>	<b>Bebida Láctea Integral (%)</b>	<b>Bebida Láctea (MP) (%)</b>	<b>Bebida Láctea (PIM) (%)</b>
(9) Gostei extremamente	58	65	30
(8) Gostei muito	19	25	10
(7) Gostei moderadamente	13	5	18
(2) Desgostei muito	8	3	20
(1) Desgostei muitíssimo	2	2	25

**Tabela 5.18:** Resultados do grau de aceitação das bebidas lácteas com adição de polpa de mangaba.

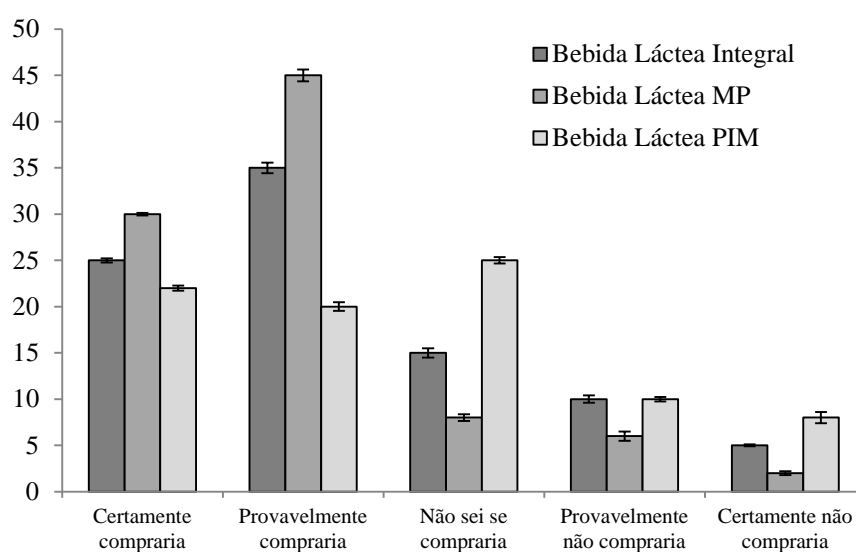
<b>Escala Hedônica</b>	<b>Bebida Láctea Integral (%)</b>	<b>Bebida Láctea (MP) (%)</b>	<b>Bebida Láctea (PIM) (%)</b>
(9) Gostei extremamente	48	67	28
(8) Gostei muito	25	26	25
(7) Gostei moderadamente	15	4	10
(2) Desgostei muito	9	2	8
(1) Desgostei muitíssimo	3	1	29

Observando a Tabela 5.17, verifica-se que a bebida elaborada com leite com baixo teor de lactose a partir da percolação no leite recheado por MP sem adição de polpa de mangaba, situou-se entre os termos hedônicos “gostei extremamente” e “gostei muito”, com 65% e 25% (~90%) de aceitação pelos provadores respectivamente, 58% e 19% (~77%) apontaram a bebida láctea integral e 30 e 10% (~40%) para a bebida láctea com baixo teor de lactose obtido através da percolação do leite no leite recheado com PIM. Dentre o grupo de provadores, somente 3% apontaram para o grau “desgostei muito” para a bebida de maior aceitação (MP), portanto houve boa aceitação das bebidas lácteas saborizadas sem polpa de mangaba.

Os escores referentes à aceitação para a bebida láctea com polpa de mangaba (Tabela 5.18) com baixo teor de lactose a partir da percolação no leite recheado por MP ficaram entre os termos hedônicos “gostei extremamente” e “gostei muito”, com valores referentes a 67 e 26% (~93%) de aceitação pelos provadores, respectivamente. No que diz respeito às outras bebidas obtidas, integral e PIM, estas receberam notas inferiores entre 48 e 25% (~73%) a 8 e 29% (~37%), respectivamente. Estudos realizados por SANTA *et al.*, (2008) mostram uma

aceitação sensorial de 64% dos provadores para a bebida láctea kefir saborizadas com ameixa e morango, valores inferiores aos encontrados neste estudo para a bebida MP.

SANTOS *et al.*, (2012) estudaram a avaliação sensorial com variação de concentração de jenipapo em leite fermentado desnatado, e verificaram que o aumento na concentração do fruto jenipapo, interferiu positivamente para a aceitação global do produto. CRUZ *et al.*, (2011) em estudo com iogurte probiótico com adição de glicose oxidase em teste de aceitação avaliando o grau de aceitação de todos os produtos no 15º dia de armazenamento tendo as médias de aceitação variada entre os termos hedônicos “não gostou/nem desgostou” a “gostou moderadamente”. SANTOS *et al.*, (2012) também verificaram que o aumento na concentração do fruto jenipapo, interferiu positivamente para a aceitação global do produto, resultando em respostas acima do *escore* 6. Nas Figuras 5.16 e 5.17 são apresentados os resultados dos testes de intenção de compra das bebidas lácteas formuladas sem e com polpa de mangaba.

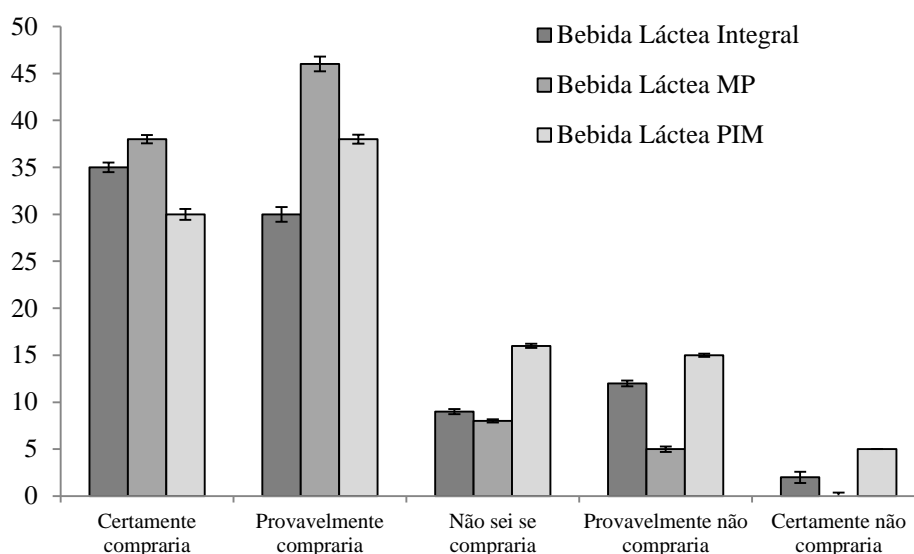


**Figura 5.16:** Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas sem polpa de mangaba.

Em relação à intenção de compra (Figura 5.16), a amostra da bebida láctea com remoção de lactose utilizando a sílica MP e sem polpa de mangaba, apresentou positiva atitude de compra, com 45% dos provadores afirmando que “provavelmente compraria”, seguido de 30% que responderam que “certamente compraria” contra 8% dos provadores que responderam “não sei se compraria” esse produto. Este resultado representa que houve uma boa aceitação dos produtos pelos provadores, indicando que 75% dos provadores comprariam



a bebida láctea sem adição de polpa, se os mesmos fossem colocados à venda, possivelmente teriam uma demanda satisfatória.



**Figura 5.17:** Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas com polpa de mangaba.

A intenção de compra mostra através da Figura 5.17, que 84% dos provadores comprariam a bebida láctea kefir saborizadas com mangaba com remoção de lactose após percolação na coluna utilizando partículas MP. Esses dados demonstram uma maior aceitabilidade dessa bebida provavelmente em função desta formulação apresentar uma melhor consistência se comparado à formulação com leite integral e com remoção de lactose pós PIM. Entretanto, as bebidas lácteas PIM apresentaram maior rejeição, onde apenas 38% dos provadores “provavelmente compraria” o produto. Essa elevada rejeição (Tabela 5.18) pode estar associada às características da amostra como uma baixa viscosidade.

JARDIM *et al.*, (2012) desenvolveram uma bebida láctea potencialmente probiótica e os resultados do teste de intenção de compra indicaram valores superiores para bebida láctea fermentada nos tempos 7 e 21 dias, respectivamente 76% e 74% de intenção positiva. O percentual de indecisos, que assinalaram o quesito “tenho dúvidas se compraria o produto” foi baixo, cujos percentuais foram bem superiores nos quesitos “eu provavelmente compraria o produto” e “eu certamente compraria o produto”.

A adição da polpa de mangaba, na opinião dos provadores, é tradicionalmente conhecida, o que não provocou estranheza por parte dos mesmos, demonstrando que apesar da fruta não ser convencionalmente utilizada no processamento de bebidas lácteas fermentadas, a mangaba possui potencial para utilização na elaboração desses produtos. Isso confirma o valor

obtido por. MACEDO *et al.*, (2014) onde obtiveram 75% de percentual de intenção de compra dos provadores para iogurte com polpa de caju.

De um modo geral, as notas individuais dos atributos sensoriais das bebidas lácteas apresentaram uma variação muito grande, ou seja, alguns “gostaram muito” e outros “desgostaram muito”, com médias variando na faixa de 4,4 a 7,5.

## 6. CONCLUSÕES

Os produtos funcionais e probióticos se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas. As principais conclusões obtidas, com a realização deste trabalho foram:

1 - As análises de caracterização físico-química e morfológica confirmaram a impressão molecular da molécula alvo (lactose) nas partículas compostas por polímeros impressos molecularmente (PIMs);

2 - No estudo de adsorção de lactose do leite em coluna de leito fixo foram observadas a saturação dos adsorventes MP e PIM em 30 min. O tempo de saturação do leito é relativamente rápido provavelmente devido a elevada concentração inicial de lactose no leite, uma vez que foi utilizado leite Tipo C não alterando a composição inicial da lactose;

3 - A adsorção de lactose pelo PIM é um processo favorável, pois neste trabalho obteve-se uma capacidade de adsorção de lactose de 62,1 mg/g de adsorvente nas seguintes condições: 34 °C, 9 mL/min, 250 µm, 12,5 cm de altura;

4 - A partir do planejamento fatorial incompleto ( $2^{4-1}$ ), a variável significativa para os adsorventes MP e PIM foi a vazão de alimentação do leito de adsorção;

5 - Todas as curvas de ruptura da adsorção de lactose no leito fixo de polímero impresso molecularmente e matriz pura, exceto o ensaio 5 com o adsorvente PIM, podem ser representadas com boa precisão pelos modelos propostos na maioria das condições operacionais aqui apresentadas, constituindo assim uma ferramenta útil para o propósito de simulação, otimização e *scale up* do processo;

6 - A bebida láctea utilizando o leite percolado na coluna recheada com os polímeros impressos molecularmente (PIM) em processo contínuo apresentou uma maior redução de lactose no produto final, atingindo cerca de 99,04% para a bebida sem adição de polpa de fruta e , 98,96 para a bebida com 15 de polpa de mangaba;

7 - As bebidas lácteas desenvolvidas neste estudo apresentaram valores com grandeza variando entre  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL, e que de acordo com a Legislação Brasileira é caracterizado produto probiótico, isto poderá futuramente auxiliar na nutrição diária requerida em uma dieta humana, podendo contribuir diretamente com a saúde da população;

8 - As análises sensoriais mostram que o leite obtido após a percolação pela coluna recheada com MP apresentou cerca de 80% de intenção de compra dos provadores;

9 - Na análise sensorial, a bebida láctea com baixo teor de lactose obtido a partir da coluna com recheio MP e sem adição de polpa de mangaba, atingiu valor de 90% de aceitação pelos provadores e 93% de aceitação para a bebida láctea saborizada com polpa de mangaba.

10 – Não houve alteração na composição físico-química que acarretasse algum prejuízo ao produto final, ou seja, os leites obtidos com baixo teor de lactose e as bebidas lácteas elaboradas encontram-se dentro da legislação vigente (BRASIL, 1999).

11 - A taxa positiva da intenção de compra das bebidas lácteas com remoção parcial de lactose após percolação na coluna recheada com MP sem polpa, representa que houve uma boa aceitação dos produtos pelos provadores, indicando que 74% dos provadores comprariam a bebida láctea sem adição de polpa, se os mesmos fossem colocados à venda, possivelmente teriam uma demanda satisfatória. Enquanto que para a bebida com adição de 15% de polpa de mangaba, os provadores indicaram sua preferência de intenção de compra em 84%.

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos para esta etapa foram alcançados, ou seja, o desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com baixo teor de lactose e saborizadas com mangaba por uma nova metodologia, ainda não tão difundida na literatura. Os estudos abriram perspectivas para a introdução de novos produtos com elevados valores nutricionais, no mercado. A tecnologia proposta como o uso de polímero impresso molecularmente, é significativa para a remoção de lactose do leite. Nesse aspecto, a preocupação com o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem matérias-primas do estado de Sergipe de modo a agregar valor ao agronegócio principalmente na bacia leiteira do norte do estado com os Arranjos Produtivos Locais (APL) foi atingido cuja a finalidade foi o desenvolvimento da bebida láctea com teor de lactose reduzido e saborizadas com frutas regionais.

A principal grande contribuição deste trabalho foi avaliação da adsorção de lactose de leite em leito fixo recheado por partículas compostas por polímeros impressos molecularmente (PIMs) com o intuito de avaliar a influência das variáveis operacionais: (temperatura, vazão, tamanho de partícula e altura do leito sobre o desempenho da capacidade de adsorção dos adsorventes). E ainda especialmente, analisar a capacidade de adsorção e o estudo do comportamento morfológico e físico-químico destas partículas através de análise de afinidade e especificidade de polímero impresso pela lactose.

## **SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Os trabalhos realizados e expostos neste contexto sugerem futuras investigações que constituiriam uma sequência natural de trabalhos apresentados.

1 – Estudar as propriedades terapêuticas do kefir e suas propriedades nutricionais para futura aplicação industrial, proporcionando ao mercado uma transformação de idéias em produtos tecnologicamente novos que poderiam proporcionar melhorias à saúde da comunidade;

2 – Avaliar o adsorvente quanto à dessorção de lactose e os ciclos de reutilização verificando se apresentaram diminuição significativa em suas respectivas capacidades de adsorção, sem afetar a qualidade do produto final ou aumentar excessivamente o custo do processo;

3 – Estudar a cinética e o equilíbrio de adsorção nos adsorventes utilizados neste trabalho.

4 – Fazer simulação e otimização da adsorção em coluna de leito fixo visando o aumento de escala.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADHIKARI, O. K.; DOOLEY, L.M.; CHAMBERS, O.E.; BHUMIRATANA, E. Sensory characteristics of commercial lactose free milks manufactured in the United States. *LWT. Food Science and Technology*, 43, 113-118, 2010.

AGRODEBATE: Produção de leite no Brasil deve ser de 37 bilhões de litros em 2014. Disponível em: <http://g1.globo.com/mato-grosso/agrodebate/noticia/2013/12/producao-de-leite-no-brasil-deve-ser-de-37-bilhoes-de-litros-em-2014.html>. Acesso em: 17/12/2014.

AGUI, M. L.; CAMPANA, A.M.G.; GRACIA, L.G., BLANCO, C.C. Laser induced fluorescence coupled to capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolones in foods of animal origin using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2237-2242, 2010.

ALBUQUERQUE, L. C. O leite em suas mãos. Juiz de Fora: Concorde. 1997. 3 v. 150p.

ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of Dairy Science*, 65, 346-352, 1982.

ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, M.A. Molecular imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B*, 804, 231-245, 2004.

ALMEIDA, K.E, BONASSI, I.A, ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 2, Campinas, 2001.

ALMEIDA, F.A.; ÂNGELO, F.F.; SILVA, S.L.; SILVA, S.L. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. *Revista Instituto Laticínio "Cândido Tostes"*, 378, 66, 51-56, 2011.

AN, F.; GAO, B.; HUANG, X.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XU, Y.; ZHANG, Z.; GAO, J.; CHEN, Z. Selectively removal of Al(III) from Pr(III) and Nd(III) rare earth solution using surface imprinted polymer, *Reactive & Functional Polymers*, 32, 145-150, 2012.

ANDRADE, V.T.; BRANDÃO, S.C.C.; ALVIM, T.C. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI Congresso Nacional de Laticínios, 2004, Juiz de Fora. Anais, *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 59, 339, 126-130, 2004.

ANDRADE, M.B. Os conflitos socioambientais em assentamentos rurais em Sergipe: o caso da Barra da Onça em Poço Redondo. *GEONORDESTE*, Ano XXIV, n.1, 2013.

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous Processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. *Food and bioproducts processing*, 90, 351-359, 2012.

ANTUNES, A.E.C.; LISERREA, M.; FARIA, E.V.; YOTSUYANAGI, K.; LERAYER, A.L.S. Análise descritiva quantitativa de buttermilk probiótico. *Alimentos e Nutrição*, 23, 619-629, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA\\_29\\_1998.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA_29_1998.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em 04/10/2014.

ARROYO, P. A.; BARROS, M. A. S. D.; QUERINO, M. V.; FERREIRA JR., I. A.; SOUSA AGUIAR, E. F. “Troca multicomponente dinâmica em sistemas zeolíticos”, *Revista Tecnológica*, Ed. Especial, 31-38, 2000.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67, 325-332, 2005.

BAGGIANI, C.; BARAVALLE, P.; GIRAUDE, G.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high- performance liquid chromatographic analysis fungicide pyrimethanil in wine. *Journal of Chromatography*, 158-164, 1141, 2007.

BALDISSERA, A. C.; BETTA, F. D.; PENNA, A. L. B.; LINDNER, J. D. D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas a base de soro de leite. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 32, 4, 1497-1512, 2011.

BARBOSA, C.R.; ANDREAZZI, M. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. *Revista Saúde e Pesquisa*, 4, 1, 81-86, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology*, 37, 911-917, 1959.

BONOMO, P. Elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 8, 111-116, 2006.

BORTOLOZO, E.Q.; QUADROS, M.H.R. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte. *Revista Brasileira de Tecnologia Agropecuária*, 2007, 37-47.

BOYD, B; BJORK, H.; BILLING, J.; SHIMELIS, O.; AXELSSON, S.; LEONORA, M.; YILMAZ, E. Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1174 63-71, 2007.

BRANNON, P.M.; CARPENTER, T.O.; FERNANDEZ, J.R. NIH consensus development conference statement: lactose intolerance and health. *NIH Consensus State Science Statements*, 27, 1-27, 2010.

BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P. H.; VAN DER SMAN R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*. 243, 263-272, 2004.

BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite. Ministério da Agricultura Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 51, 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite tipo A, leite tipo B, leite tipo C, leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2002. 13.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA\\_29\\_1998.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA_29_1998.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em 20 de março de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamentos Técnicos de Produção, identidade e qualidade do leite**. Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002. Brasília: Ministério da Agricultura, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de Consulta à Legislação. Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida látea. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 ago. 2005, seção 1, p. 7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em 26 de abril de 2013.

BEHMER, M. L. A. Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise, 9 ed. São Paulo: Nobel, 322, 1979.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TAYLOR, E. Adsorption of gases in imolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 60, 309-319, 1938.

BRITO, A. B. N., GIULIETTI, M. Study of lactose crystallization in water-acetone 574 solutions. *Crystal Research & Technology*, 42, 583-588, 2007.

BUHRING, R.S.W.; MICHEL, R.; HINRICHS, J. A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. *Dairy Science & Technology*, 91, 27-37, 2011.

CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B.; FERNANDES, S.A.A.; MAGNAVITA, A.P.A.; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida látea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência Rural, Santa Maria*, 40, 2193-2198, 2010.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre, ARTMED Editora, 3ª Ed., 751p, 2000.

CARO, E.; MARCÉ, R.M.; BORRUL, F.; CORNACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 143-153, 2006.



CASE, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de “leite” de soja enriquecido com cálcio. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 86-91, 2005.

CHAPMAN, K.W.; LAWLESS, H.T.; BOOR, K. J. Quantitative Descriptive Analysis and Principal Component Analysis for Sensory Characterization of Ultrapasteurized Milk. *Journal of Dairy Science*, 84, 12-20, 2001.

CHEN, L.; XU, S.; LI, J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40, 2922-2942, 2011.

CHOI, S.H.; LEE, S.B.; WON, H.R. Development of Lactose-hydrolyzed Milk with Low Sweetness Using Nanofiltration. *Asian-Australian Journal Animal Science*, 20, 989-993, 2007.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M.D.M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 398-404, 2007.

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2, 311-320, 1999.

CONRADO, L. S., VEREDAS, V., NÓBREGA, E. S., SANTANA, C. C.: Concentration of a-lactalbumin from cow milk whey through expanded bed adsorption using a hydrophobic resin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 501-509, 2005.

COSTA, G.N.S.; MENDES, M.F.; ARAUJO, I.O.; PEREIRA, C.S.S. Desenvolvimento de um Iogurte Sabor Juçai (Euterpe edulis Martius): Avaliação Físico-química e Sensorial. *Revista Eletrônica TECCEN*, Vassouras, 5, 43-58, 2012.

CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, 2004.

CRISP, J.L., DANN, S.E., EDGAR, M., BLATCHFORD, C.G. The effect of particle size on the dehydration/rehydration behaviour of lactose. *International Journal of Pharmacology*, 391, 38-47, 2010.

CRISTALLINI, C.; CIARDELLI, G.; BARBINI N.; GIUSTI, P. Acrylonitrile-Acrylic Acid Copolymer Membrane Imprinted with Uric Acid for Clinical Uses. *Macromol Bioscience*, 4, 31-8, 2004.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; FARIA, J.A.F., OLIVEIRA, C.A.F.; CAVALCANTI, R.N.; BONA, E.; BOLINI, H.M.A.; SILVA, M.A.A.P. Consumer acceptability and purchase intent of probiotic yoghurt with added glucose oxidase using sensometrics, artificial neural networks and logistic regression. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 4, 549-556, 2011.

CUNHA, L. R. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27, 23-26, 2007.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 12, 1, 23-33, 2009.

CURY, B. S. F.; BUENO, J. H. F.; SILVA JÚNIOR, N. P.; CASTRO, A. D.; GREMIÃO, M. P. D. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28, 85-92, 2007.

DUARTE, W. F., DIAS, D. R., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., DE ALMEIDA E SILVA, J. B., & SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *Food Science and Technology*, 43, 1564-1572, 2010.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease, Louvain*, 38, 248-255, 2006.

DONKORA, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Dairy Science and Technology*, 86, 21-38, 2007.

DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nature Medicine*, 4, 1131-1135, 1998.

ECKENFELDER, W.W. Industrial Water Pollution Control; McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering; 3 ed.; *McGraw-Hill Higher Education*, 2000.

FAO/OMS, Food Standards, Codex Alimentarius, Disponível na internet via [www.url: http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=em](http://www.url: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=em), Codex Standard 243, 2003, Acessado em 14/07/2014.

FAEDO, R.; BRIÃO, V.B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtaining of milk with low lactose process for separation membranes by associated with enzymatic hydrolysis. *Revista CIATEC – UPF*, 3, 44-54, 2013.

FELDER, R.M.; ROUSSEAU, R.W. **Princípios Elementares dos Processos Químicos**. 2ed, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2000.

FERREIRA, I. C. S. **Tratamento terciário da indústria de laticínios através da adsorção de lactose em argila esmectítica**. 2007, 94f. Dissertação (Mestrado Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FIGUEIREDO, E.C.; DIAS, A.C.B.; ARRUDA, M.A.Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 3, 2008.

FINZER, J.R.D.; MARTINS, J.R. **Cristalização de lactose**. FAZU em Revista, Uberaba, n. 8, p. 83-88, 2011.

FU, N.; WOO, M.W.; MOO, F.T., CHEN, X.D. Microcrystallization of lactose during droplet drying and its effect on the property of the dried particle. *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 138-149, 2012.

GAMA, J.A. Desenvolvimento de Produto Lácteo Probiótico a Base de Kefir. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2010.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, 20, 2-12, 1985.

GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. *Journal of Food Engineering*, 111, 299-304, 2012.

GOMBAS, A.; ANTAL, I. ; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; MARTON, S.; ERŐS, I. Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by near infrared spectroscopy (NIRS). *International Journal of Pharmaceutics*, 256, 25-32, 2003.

GOMES, R.G.; PENNA, A.L.B. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. *Semina: Ciências Agrárias*, 30, 3, 629-646, 2009.

GUARDIA, L.; BADIA, R.; DIAZ-GARCIA, M.E. Molecular imprinted ormosils for nafcillin recognition by room temperature phosphorescence optosensing. *Biosensory Bioelectronic*, 21, 1822-1829, 2006.

GUO, W., PARK, J., OH, M., JEONG H.W., CHO, W., KIM, I., HA, C. Triblock Copolymer Synthesis of Highly Ordered Large-Pore Periodic Mesoporous Organosilicas with the Aid of Inorganic Salts. *Chemical Materials*, 15, 2295-2298, 2003.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$ -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical Engineering and Processing*, 48, 576-580, 2009.

HARJU, M., & HEIKKILÄ, H. Process for recovering lactose from whey. Patent US 4955363, 1990.

HARJU, M. A process for the specific separation of lactose from milk. Patent EP 0226035. (1990).

HARJU, M. Chromatographic and enzymatic removal of lactose from milk. *International Dairy Federation*, 389, 4-8, 2004.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22, 104-109, 2012.

- HAUPT, K. e MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, 100, 2495-2504, 2000.
- HERTZLER, S.R. and CLANCY, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 582-587, 2003.
- HOGAN, S.E.; BUCKTON, G. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides. *Journal Polymers Research*, 17, 737-744, 2010.
- HOLLAND, N.; FRISBY, J.; OWENS, E.; HUGHES, H.; DUGGAN, P., MCLOUGHLIN, P. The influence of polymer morphology on the performance of molecularly imprinted polymers. *Polymer*, 51, 1578-1584, 2010.
- HOLSINGER, V.H. Physicol and chemical porperties of lactose. In : FOX, P.F. Advanced dairy chemistry. 2. Ed. London: Chapman & Hall, 3, 1-38, 1997.
- HOLST, H. H., & LAURITZEN, K. Process for producing lactose-free milk. PCT Patent Application WO 2009/043356, 2009.
- HU, Q., HAMPSEY, J.E., JIANG, N., LI, C., LU, Y. Surfactant-templated organic functionalized mesoporous silica with phosphino ligands. *Chemical Materials*, 17, 1561-1569, 2005.
- HUA, K., ZHANG, L., ZHANG, Z., GUO, Y., GUO, T. Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in sérum. *Acta Biomaterials*. 7, 3086-3093, 2011.
- IBRAHIM, M.N.M., SIPAUT, C.S., YUSOF, N.N. M. Purification of vanillin by a molecular imprinting polymer technique. *Separation Purification Technology* 66, 450-456, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE (2010). Disponível na internet em: <http://cenariosdesenvolvimento.blogspot.com/2010/08/expansao-da-pecuaria-de-leite-em.html>. Acesso em 06/08/2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE (2013). Estatística da Produção Pecuária, Março de 2014. Disponível na internet em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=42](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=42). Acesso: 15/01/2015.
- ISLAM, M.I.U., LANGRISH, T.A.G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. *Food Research International*, 43, 46-56, 2010.
- JARDIM, F.B.B.; SANTOS, E.N.F.; ROSSI, D.A.; MELO, R.T.; MIGUEL, D.P.; ROSSI, E.A.; SYLOS, C.M. Desenvolvimento de bebida láctea carbonatada. *Alimentos e Nutrição*, 23, 275-286, 2012.

- JELLEN, P.; TOSSAVAINEN, O. Low lactose and lactose-free milk and dairy products prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 161-165, 2003.
- JIN, G.; ZHANGA, B.; TANGA, Y.; ZUOA, X.; WANGC, S.; TANGA, J. Imprinted functionalized sílica sol-gel for solid-phase extraction of triazolamin. *Talanta*, 84, 644-650, 2011.
- JUMAH, R.Y.; SHAKER, R,R.; ABU-JDAYIL, B. Effect of milk source on the rheological properties of yogurt during the gelation process. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 89-93, 2001.
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 300-309, 2002.
- KAIALY, W.; MARTIN, G. P.; TICEHURST, M. D.; ROYALL, P.; MOHAMMAD, M. A.; MURPHY, J.; NOKHODCHI, A. Characterization and Deposition Studies of Recrystallized Lactose from Binary Mixtures of Ethanol/Butanol for Improved Drug Delivery from Dry Powder Inhalers. *AAPS Journal*, 13, 1, 2011.
- KAIALY, W., LARHRIB, H., MARTIN, G. P., NOKHODCHI, A. The Effect of Engineered Mannitol-Lactose Mixture on Dry Powder Inhaler Performance. *Pharmaceutical Research*. 29, 2139-215, 2012.
- KALLIOINEN, H., &TIKANMÄKI, R. Low-lactose and lactose-free milk product and process for production thereof. Patent application US 2010/0055289, 2010.
- KIRK, J.H., DANN, S.E., BLATCHFORD, C.G. Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 334, 103-114, 2007.
- KO, D. C. K.; PORTER, J. F.; MACKAY, G. Film-pore diffusion of cooper and cadmium ions onto bone. *Water Research*, 35, 3876-3886, 2001.
- KOKSOY, A.; KILIC, M. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18, 593-600, 2004.
- KOMIYAMA, M.; TAKEUCHI, T.; MUKAWA, T.; ASANUMA, H. **Molecular Imprinting From Fundamentals to Applications**. Copyright , Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- LABAYEN, I.; FORGA, L.; GONZALEZ, A.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; MARTINEZ, J. A. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacology*, 3, 543-549, 2001.
- LADERO, M; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromices fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 583-592, 2000.

LANGE, M. Process for making a lactose-free milk and milk so processed. Patent CA 2360837, 2000.

LANGE, M. Lactose-free milk and process for making same. Patent US 2005/ 0170044, 2005.

LEE, S.C.; CHUANG, F.L.; TSAI, Y.L.; CHEN, H. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides. *Journal of Polymer Research*, 17, 737-744, 2010.

LEI, Y., ZHOU, Q., ZHANG, Y., CHEN, J., SUN, S., NODA, I. Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 974, 88-93, 2010.

LEITE, A. M. O.; MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; PEIXOTO, R. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*, 31, 215-221, 2012.

LEOFANTI, G. Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41, 207-219, 1998.

LEONARDI, A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 31-40, 2011.

LI, X.; ZHOU, Q.Z.K.; CHEN, X.D. Pilot-scale lactose hydrolysis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chemical Engineering Principles in Food Industry*, 46, 497-500, 2007.

LI, M.; ZHANG, L.; MENG, Z.; WANG, Z.; WU, H. Molecularly-imprinted microspheres for selective extraction and determination of melamine in milk and feed using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 2333-2338, 2010.

LI, T.J.; CHEN, P.Y.; NIEN, P.C.; LIN, C.Y.; VITTAL, R.; LING, T.R.; HO, K.C. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine. *Analytica Chimica Acta*, 711, 83-90, 2012.

LI, G. Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 1180-1186, 2012.

LI, M.; LI, R.; TAN, J.; JIANG, Z.T. Titania-based molecularly imprinted polymer for sulfonic acid dyes prepared by sol-gel method. *Talanta*, 107, 203-210, 2013.

LIMSAWAT, P.; PRUKSASRI, S. Separation of lactose from milk by ultrafiltration. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3, 236-243, 2010.

LISTIOHADI, Y., HOURIGAN, J.A., SLEIGH, R.W., STEELE, R.J. Thermal analysis of amorphous lactose and  $\alpha$ -lactose monohydrate. *Dairy Science & Technology*, 89, 43-67, 2009.

LIU, Y.; WU, L.; ZHAO, X.; LUO, A. Synthesis and Adsorption Property of Hydrophilic Uridine Molecularly Imprinted Polymers. *International Journal of Polymer Analytical Characteristic*, 17, 38-47, 2012.

LONGO, G.; WASZCZYNSKYJ, N. Avaliação sensorial de leite UHT com baixo teor de lactose. In: XXII Congresso Nacional de Laticínios, 2005, Juiz de Fora. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 60, 345, 77-80, 2005.

LÓPEZ, M.M.C.; PÉREZ, M.C.C.; GARCÍA, M.S.D.; VILARIÑO J.M.L.; RODRÍGUEZ, M.V.G.; LOSADA, L.F.B. Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica Chimica Acta*, 721 68- 78, 2012.

LOWELL, S.; SHIELDS, M.; THOMAS, M.; THOMMES, M. Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size and density. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 16, 2004.

LV, Y.K.; WANG, L.M.; YANG, L.; ZHAO, C.X.; SUN, H.W. Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)-silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. *Journal of Chromatography A*, 1227, 48- 53, 2012.

MACEDO, M.A.; MENEZES, C.C.; PORTELA, J.V.F.; ARCANJO, S.R.S.; MOURA, M.R.; OLIVEIRA, A.M.C. Efeito da adição de polpa de caju sobre as qualidades sensoriais de iogurte integral adoçado com mel de abelha. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 69, 7-16, 2014.

MAHONY, J.; MOLONEY, M.; MCCORMACK, M.; NICHOLLS, I.A.; MIZAIKOFF, B.; DANAHER, M. Design and implementation of an imprinted material for the extraction of the endocrine disruptor bisphenol A from milk. *Journal of Chromatography B*, 931, 164-169, 2013.

MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, M. A., NICOLAU, A., DRAGONE, G., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A., Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101, 22, 8843-8850, 2010.

MAGALHÃES, K.T.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G.V.M.; OLIVEIRA, J.M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, 126, 249-253, 2011.

MAO, Y.; BAO, Y.; GAN, S.; LI, F.; NIU, L. Electrochemical sensor for dopamine based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite recognition element. *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 291-297, 2011.

MARINHO, M.V.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; SANTIAGO, V.M.S.; GOMES, J.P. Análise sensorial e físico-química de iogurte de leite de cabra com polpa de umbu. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 14, 497-510, 2012.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A.R.; TREVISAN, H.C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 51, 1233-1240, 2008.

MATER, D. D. G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M. J.; MOGENET, A.; BRESSON, J. L.; CORTIER, G. S. Streptococcus thermophiles and Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 250, 185-187, 2005.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 230-236, 2010.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOT, P. UNIT OPERATIONS OF CHEMICAL ENGINEERING, **McGraw-Hill International**, Ed. 6th ed., 2001.

MCSWEENEY, P. L. H., FOX P. F. **Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. University College, Cork, Ireland. 3 edição

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 56, 230-236, 2010.

METCALF e EDDY, INC. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, McGraw Hill series in civil and environmental engineering; 4 th edn; McGraw-Hill; New York; 1819, 2003.

MINHALMA, M.; MAGUEIJO, V.; QUEIROZ, D.P.; DE PINHO, M.N., Reduction of wastewaters and valorisation of by-products from “Serpa” cheese manufacture using nanofiltration, *Water Science and Technology*, 52, 393-399, 2005.

MONTANUCI, F. D.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Caracterização sensorial e aceitação de Kefir adoçado integral e desnatado com inulina. *Brazilian Journal Food Technology*, 6, 79-90, 19-21, 2010.

MORIWAC, C.; MATIOLI, G. Influência da  $\beta$ -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. *Arquivo de Ciências da Saúde Unipar, Umuarama*, 4, 283-290, 2000.

MORLOCK, G.E.; MORLOCK, L.P.; LEMO, C. Streamlined analysis of lactose-free dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1324, 215- 223, 2014.

MOURA, C.P., VIDAL, C.B., BARROS, A.L., COSTA, L.S., VASCONCELLOS, L.C.G., DIAS, F.S., NASCIMENTO, R.F. Adsorption of BTX (benzene, toluene, o-xylene, and p-xylene) from aqueous solutions by modified periodic mesoporous organosilica. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363, 626-634, 2011.

MOLINA, C. Q.; CLAUDE, B.; GARCIA-CAMPANA, A.M.; OLMO-IRUELA, M.; MORIN, P. Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, 135, 775-779, 2012.

MUJAHID, A.; LIEBERZEIT, P.A.; DICKERT, F.L. Chemical sensors based on molecularly imprinted sol-gel materials. *Materials*, 3, 2196-2217, 2010.



MUKHERJEE, I., MYLONAKIS, A., GUO, Y., SAMUEL, S.P., LI, S., WEI, R.Y.: Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, 122,168-74, 2009.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. Cow's Milk Allergy versus Lactose Intolerance. Dairy Council Digest, Rosemont, 77, 3, 13-18, 2008.

NIKOLIC, M.; GIANNAKOPOULOS, K.P.; SRDIĆ, V. V. Synthesis and characterization of mesoporous silica core-shell Particles. *Processing and Application of Ceramics*, 4, 81-85, 2010.

NOVALIN, S.; NEUHAUS, W.; KULBE, K.D. A new innovative process to produce lactose reduced skim milk. *Journal of Biotechnology*, 119, 212-218, 2005.

NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, 89, 1287-1295, 2012.

OCHI, H.; SUMI, M.; NAKATA, I.; SAITO, H.; UOZUMI, M.; IWATSUKI, K. Sensometric calibration of sensory characteristics of commercially available milk products with instrumental data. *Journal Dairy Science*. 93, 1794-1806, 2010.

OLIVEIRA, C.P. Fermented probiotic milk and its implications in the health. *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)*, 6, 3, 25-31, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSTROSKI, I.C., DANTAS, J.H., SEHN CANAVESI, R.L., SILVA, E.A., ARROYO, P.A., BARROS M.A.S. D. Estudo da remoção do íon Fe (II) em colunas de leito fixo, utilizando-se a Zeólita NaY. *Acta Scientiarum Technology Maringá*, 33, 305-312, 2011.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of b-D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530-543, 2006.

PARMPI, P.; BOLISAY, L. D.V.; KOFINAS, P. Isomeric glucose recognition using molecularly imprinted polymer hydrogels. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 787, 2004.

PEREIRA, M.C.S.; BRUMANO, L.P.; KAMIYAMA, C.M.; PEREIRA, J.P.F.; RODARTE, M.P.; PINTO, M.A.O. Low-lactose dairy: a necessity for people with lactose maldigestion and a niche market. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 389, 67, 57-65, 2012.

PITCHAYAJITTIPONG, C., PRICE, R.; SHUR, J.; KAERGER, J.S; EDGE, S. Characterisation and functionality of inhalation anhydrous lactose. *International Journal of Pharmaceutics*, 390, 134-141, 2010.

PLAYNE, M. J.; BENNETT, L. E.; SMITHERS, G. W. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 242-264, 2003.

PRADA, A.G.V.; MARTINEZ-RUIZ, P.; RIVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M. Solid phase molecularly imprinted on-line pre-concentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk. *Analytica Chimica Acta*, 539, 125-132, 2005.

PRADA, A. G.V.; REVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M. A method for the quantification of low concentration sulfamethazine residues in milk based on molecularly imprinted clean-up and surface preconcentration at a Nafion-modified glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 281-286, 2006.

PRADHAN, S., BOOPATHI, M., KUMAR, O., BAGHEL, A., PANDEY, P., MAHATO, T.H., SINGH, B., VIJAYARAGHAVAN, R. Molecularly imprinted nanopatterns for the recognition of biological warfare agent ricin. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 592-598, 2009.

QIUJIN, Z.; LIPING, W.; SHENGFANG, W.; WASSWA, J.; XIAOHONG, G.; JIAN, T. Selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction for sterol compounds. *Food Chemistry*, 113, 608-615, 2009.

QU, F., ZHU, G., HUANG, S., LI, S., SUN, J., ZHANG, D., QIU, S. Controlled release of Captopril by regulating the pore size and morphology of ordered mesoporous sílica. *Microporous Mesoporous Materials*, 92, 1-9, 2006.

QUINN, N Z.K.; ZHOU, X.D.C., Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33-40, 2001.

ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. 258p.

RAMOS, A.C.S.M.; STAMFORD, T.L.M.; MACHADO, E.C.L.; LIMA, F.R.B.; GARCIA, E.F.; ANDRADE, S.A.C.; SILVA, C.G.M. Elaboration of fermented dairy beverages: acceptability and viability of probiotic cultures. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 2817-2828, 2013.

ROCHA, C.; COBUCCI, R. M. A.; MAITAN, V. R.; SILVA, O. C. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. *Boletim CEPPA*, 26, 255-266, 2008.

RUTHVEN, D. M., **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 433.

SÁ, J.L.; SÁ, C.O.; MOTA, D.M. A bacia leiteira de Nossa Senhora da Glória, SE: compreendendo sua dinâmica para fortalecer os sistemas de produção de base família. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012.

SANTA, O.R.D.; CARDOSO, F.; MOTA, G.; BASTOS, R.G.; RIGO, M.; SANTA, H.S.D. Avaliação sensorial de kefir sabor ameixa e morango. *Revista Brasileira de Agrociência*, 14, 4-4, 77-85, 2008.

SANTOS, G. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do leite fermentado probiótico desnatado adicionado de Jenipapo desidratado osmoticamente. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67, 61-67, 2012.

SAN-VICENTE, B.; VILLOSLADA, F.N.; MORENO-BONDI, M.C. Continuous solid-phase extraction and preconcentration of biosphenol A in aqueous sample using molecularly imprinted columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 115-122, 2005.

SASTRY, R. K.; RASHMI, H.B.; RAO, N.H. Nanotechnology for enhancing food security in India. *Food Policy*, 36, 391-400, 2011.

SINGHO, N.D.; JOHAN, M.R. Complex Impedance Spectroscopy Study of Silica Nanoparticles Via Sol-Gel Method. *International Journal Electrochemical Science*, 7, 5604-5615, 2012.

SHI, Y.; ZHANG, J.H.; SHI, D.; JIANG, M.; ZHU, Y.X., MEI, S.R.; ZHOU, Y.K.; DAI, K.; LU, B. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 549-555, 2006.

VENUTO, P. R. M. Intolerância à Lactose. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 296, 50, 27-32, 1995.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 536, 2001.

SILVA, E.V.C.; MEDEIROS, L.F.P.S.; MONTEIRO, D.B.; SILVA, G.F. Elaboração de bebida láctea pasteurizada sabor bacuri Enriquecida com pólen. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 30, 54-68, 2010.

SILVA, A.V.C. Qualidade da polpa congelada de mangaba comercializada em Aracaju, Sergipe. *Boletim de Pesquisa / Embrapa Tabuleiros Costeiros*, ISSN 1678-1961, 70, 2012.

SIRISINHA, K.; CHIMDIST, S. Measurement of thermal conductivity of hollow glass-bead-filled polypropylene composites. *Polymer Testing*, 25, 518-26, 2006.

SOARES, C.M. F., SANTOS, O. A., CASTRO, H.F., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. Studies on Immobilized Lipase in Hydrophobic Sol-Gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 2004.

SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SANTOS, O. A. A.; CASTRO, H. F. Molecular imprinting of B-cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 79-82, 2007.

SOLEIMANI, M.; GHADERI, S.; AFSHAR, M. G.; SOLEIMANI, S. Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of bovine albumin from whey, milk, urine and sérum. *Microchemical Journal*, 100, 1-7, 2012.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos parte 1: Síntese e caracterização, *Química Nova*, 32, 1609-1619, 2009.

SOUZA, R.L.; PACHE E.L.F.; FIGUEIREDO, R.T.; FREITAS, L.S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G.M.; SANTOS, O.A.A.; COUTINHO, J.A.P.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 141-150, 2013.

SPADOTI, L. M. Vida útil de leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado. *UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, 12, 61-65, 2010.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices. New York: Academic Press, Inc., 1993.

SUBRA, P.; VEGA-BANCEL, A.; REVERCHON, E. Breakthrough curves and adsorption isotherms of terpene mixtures in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 12, 43-57, 1998.

SUCHY, F.J.; BRANNON, P.M.; CARPENTER, T.O.; FERNANDEZ, J.R.; GILSANZ, V.; GOULD, J.B. National Institutes of Health Consensus Development Conference: lactose intolerance and health. *Annals of Internal Medicine*, 52, 12, 792-62010.

SUTTEWONG, T., SAI, H., BRADBURY, M., ESTROFF, L. A., GRUNER, S. M., WIESNER, U. Synthesis and Formation Mechanism of Aminated Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 24, 3895-3905, 2012.

TAMAYO, F.G.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid phase microextraction: Recent development and future trends. *Journal of Chromatography A*, 32-40, 1152, 2007.

TARLEY, C.R.T.; LAURO, M.P.T.S.; T. KUBOTA. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) no desenvolvimento de sensores químicos. *Química Nova*, 28, 6, 1087-1101, 2005.

TECELÃO, C., GUILLÉN, M., VALERO, F., & FERREIRA-DIAS, S. Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 104-110. 2012.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26, 3, 589-595, 2006.

THOMSEN, M.K., LAURIDSEN, L., SKIBSTED, L.H., RISBO, J. Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 7082-7090, 2005.

RANCIARO, A.; TISHKOFF, S. A. Population Genetics: Evolutionary History of Lactose Tolerance in África. In: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Lactose Intolerance and Health. *National Institutes of Health*, 1, 43-47, 2010.

- TOMINAGA, Y.; IGAWA, S.; ASAI, S.; SUMITA, M. Ion-conductive properties of mesoporous silica-filled composite polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 50, 3949-3954, 2005.
- TOMINAGA, Y.; KUBO, T.; YASUDA, K.; KATO, K.; HOSOYA, K. Development of molecularly imprinted porous polymers for selective adsorption of gaseous compounds, *Microporous and Mesoporous Materials*, 156, 161-165, 2012.
- TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M. L.; PHILIPPI, S. T.; RODRIGUES, R. S. M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, 145-150, 2000.
- TOSSAVAINEN, O., SAHLSTEN, J. Process for producing a lactose-free milk product. US published patent WO 03/094623 A1, 2003.
- TRATNIK, L.; BOZANIC, R.; HERCEG, Z.; DRGLIC, I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology* 59, 40-46, 2006.
- TREYBAL, R. E. **Mass-Transfer Operations**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1980.
- URASHIMA, T., SATO T. Why is lactose the dominant saccharide in milk? *Journal of Applied Glycoscience*, 52, 65-70, 2004.
- VARGHESE, H.; BHAGAWAN, S.S.; THOMAS, S. Thermogravimetric Analysis and Thermal Ageing of Crosslinked Nitrile Rubber/Poly(ethylene-co-vinyl Acetate) Blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 63, 749-763, 2001.
- VARNAM, A. R.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 476, 1995.
- VERHEYEN, E.; SCHILLEMANS, J.P.; WIJK, M.; DEMENIEX, M.; HENNINK, W.E.; NOSTRUM, C.F. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 5, 1-13, 2011.
- VOLESKY, B., WEBER, J., PARK, J. M. "Continuous – flow metal biosorption in a regenerable *Sargassum* column." *Water Research*, 37, 297-306, 2003.
- LI, XUEMEI; ZHOU, Q.Z.K.; CHEN, X.D. Pilot-scale lactose hidrolisis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 497-500, 2007.
- WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 729, 2001.
- WANG, J. Lactose-removed milk product and process for the preparation thereof. Patent application US 2005/0196508. 2005.

WANG, Y.L.; GAO, Y.L.; WANG, P.P., SHANG, H.; PAN, S.Y.; LI, X.J. Sol-gel molecularly imprinted polymer for selective solid phase microextraction of organophosphorous pesticides. *Talanta*, 15, 920-927 2013 .

WANYIKA, H., GATEBE, E.; KIONI, P., TANG, Z., GAO, Y. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica nanoparticles with tunable physical properties by varying molar composition of reagentes. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 2402-2410, 2011.

WEBBER, W. J.; SMITH, E. H. Activated Carbon Adsorption: The State of the Art. *Studies in Environmental Science*, 29, 455-492, 1986.

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 814, 1986.

WEI, Y., XU, J., DONG, H., DONG, J.H., QIU, K. Preparation and physisorption characterization of d-glucose-templated mesoporous silica materials via base-catalyzed sol-gel process. *Chemistry of Materials*, 11, 2023-2029, 1999.

WORKING GROUP ISSUES OF NUTRITION, *Lebensmittelchemie*, 59, 45, 2005.

WORTMANN, A.C.; SIMON, D.; SILVEIRA, T.R. Molecular analysis of adult-type hypolactasia: a new view into the diagnosis of an old frequent condition. *Revista da AMRIGS*, 57, 335-343, 2013.

WHITTIER, E. O. Lactose and its utilization: a review. *Journal of Dairy Science*, Champain, 27, 505-528, 1944.

XIONG, Y.; ZHOU, H. J.; ZHANG, Z. J.; HE, D. Y.; HE, C. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow injection chemiluminescence for the determination of tetracycline. *Analyst*, 131, 829-834, 2006.

YANG, H.H.; ZHOU, W.H.; GUO, X.C.; CHEN, F.R.; ZHAO, H.Q.; LIN, L.M.; WANG, X.R. Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products. *Talanta*, 80, 821-825, 2009.

YUAN, L.; MA, J.; DING, M.; WANG, S.; WU, X.; LI, Y.; MA, K.; ZHOU, X.; LI, F. Preparation of estriol-molecularly imprinted silica nanoparticles for determining oestrogens in milk tablets. *Food Chemistry*, 131, 1063-1068, 2012.

YAN, M.; RAMSTROM, O. *Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, EUA, 2005.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pósacidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 674-679, 2004.

ZHANG, X.; CHEN, L.; XU, Y.; WANG, H.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; REN, N.; DING, L. Determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted

polymer extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 3421-3426, 2010.

ZHANG, H.; WEI, Y.; ZHOU, J.; XU, Z.; TIAN, S.; HUANG, H.; HE, J. Preparation and Application of a Molecular Imprinting Matrix Solid Phase Dispersion Extraction for the Determination of Olaquinox in Chicken by High Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods*, DOI: 10.1007/s12161-012-9502-7, 2012.

ZHENG, M.M.; GONG, R.; ZHAO, X.; FENG, Y.Q. Selective sample pretreatment by molecularly imprinted polymer monolith for the analysis of fluoroquinolones from milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2075-2081, 2010.

ZHOU, J.H.; CUI, Y.D.; LI, B.N.; YANG, H.R. Food Additives. *Chinese Chemical Industrial Press*, Beijing, 2001a.

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*, 9, 33-40, 2001b.

ZHOU, D.; ZHANG, L.; ZHOU, J.; GUO, S. Development of a Fixed-Bed Column with Cellulose/Chitin Beads to Remove Heavy-Metal Ions. Received 30 January 2004; accepted 27 April 2004 DOI 10.1002/app.20946. Published online in *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com), 2004.

ZHU, X.; YANG, J.; SU, Q.; CAI, J.; GAO, Y. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1092, 161-169, 2005.

ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. Diagnóstico da Pecuária de Leite Nacional: Estudos Preliminares, Contribuição para o Plano Pecuário 2012. Juiz de Fora, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. 2011. Disponível em: <[http://www.cnpqg.embrapa.br/nova/Plano\\_Pecuario\\_2012.pdf](http://www.cnpqg.embrapa.br/nova/Plano_Pecuario_2012.pdf)>. Acesso em: 10/01/2015.

ZUBIOLLO, C.; RODRIGUES, M.A.S.; OLIVEIRA, M.C.; AQUINO, L.C.L.; NUNES, M.L.; CASTRO, A.A. Estudo do desenvolvimento de bebida láctea funcional com adição de polpa de mamão e aveia. *Scientia Plena*, 8, 3, 1-7, 2012.

## 8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Esta tese de doutorado foi realizada ao longo de 48 meses de estudo, durante os quais até o momento, publicou-se o seguinte resultado nos meios de divulgação, como segue listado:

-Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. BALIEIRO, A. L., SILVEIRA, D. S., FREITAS, L. S., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. REMOÇÃO DE LACTOSE DE LEITE MEDIANTE ADSORÇÃO EM POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS In: XXXVI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, ENEMP 2013, 2013, Alagoas. XXXVI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, ENEMP, 2013.

2. A. L. BALIEIRO, G. R. OLIVEIRA, M. LEITE, L. S. FREITAS, O. L. S. DE ALSINA, A. S. LIMA, C. M. F. SOARES. MODELAGEM MATEMÁTICA DA REMOÇÃO DA LACTOSE EM COLUNA DE ADSORÇÃO DE LEITO FIXO. X ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, EBA, 2014.

-Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

3. BALIEIRO, A. L., SILVEIRA, D. S., SANTOS, R.A., FREITAS, L. S., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. DEVELOPMENT OF MILK PRODUCTS LEAVEND BY KEFIR GRAINS WITH REDUCED LACTOSE AND FLAVOREDWITH TROPICAL FRUIT IN: WORLD ACADEMY OF SCIENCE, ENGINEERING OF SCIENCE (WASET), 2014, LONDRES, REINO UNIDO. WORLD ACADEMY OF SCIENCE, ENGINEERING OF SCIENCE. , 2014.

2. BALIEIRO, A. L., OSORIO, N. M., CANET, A., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S., VALERO, F., FERREIRA-DIAS, S. HETEROLOGUS NON-COMERCIAL RHIZOPUS ORYZAE LIPASE: BIOCATALYST FOR THE PRODUCTION OF LOW CALORIC TRIACYLGLYCEROLS IN: 12TH EURO FED LIPID CONGRESS, 2014, MONTPELLIER. OILS, FATS, AND LIPIDS: FROM LIPIDOMICS TO INDUSTRIAL INNOVATION, 2014.



3. BALIEIRO, A. L., SANTOS, R.A., FIGUEIREDO, R.T., FREITAS, L. S., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ADSORPTION STUDY OF LACTOSE IN HYDROPHOBIC MATRIX IN: 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE FUNDAMENTALS OF ADSORPTION (FOA), 2013, BALTIMORE, ESTADOS UNIDOS. ANAIS FOA 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE FUNDAMENTALS OF ADSORPTION, 2013.
4. SANTOS, R.A., BALIEIRO, A. L., PEREIRA, M. M., FIGUEIREDO, R.T., FREITAS, L. S., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ESTUDO DE ADSORÇÃO DE LACTOSE EM MATRIZES HIDROFÓBICAS In: 15 Semana de Pesquisa - SEMPESQ, 2013, ARACAJU. 15 Semana de Pesquisa - SEMPESQ. , 2013.
5. SANTOS, R.A., BALIEIRO, A. L., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA DE MATRIZ HIDROFÓBICA NA ADSORÇÃO DE LACTOSE In: 14° SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 2012, ARACAJU. Anais dos Seminarios de Iniciação Científica da UNIT-14ª SEMPESq - SEMANA DE PESQUISA. , 2012.
6. SANTOS, R.A., BALIEIRO, A. L., ALSINA, O. L. S., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA DE MATRIZ HIDROFÓBICA NA ADSORÇÃO DE LACTOSE In: 14° SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 2012, ARACAJU. Anais dos Seminarios de Iniciação Científica da UNIT-14ª SEMPESq - SEMANA DE PESQUISA. , 2012.
7. BALIEIRO, A. L., SANTOS, R.A., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE LACTOSE EM MATRIZES HIDROFÓBICAS In: 14° SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 2012, ARACAJU. Anais dos Seminários de Iniciação Científica da UNIT. , 2012.

-Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. BALIEIRO, A. L., SANTOS, R.A., SANTOS, A.V., FREITAS, L. S., FIGUEIREDO, R.T., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE LACTOSE EM MATRIZES HIDROFÓBICAS In: 9º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO E 1º SIMPOSIO IBERO-AMERICANOSOBRE ADSORÇÃO, 2012, RECIFE. Anais do 9º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 2012.

2. BALIEIRO, A. L., SANTOS, R.A., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE LACTOSE EM MATRIZES HIDROFÓBICAS In: 14ª SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 2012, ARACAJU. Anais dos seminários de iniciação científica da UNIT, 2012.

-Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. BALIEIRO, A. L., SANTOS, R.A., SANTOS, A.V., FREITAS, L. S., FIGUEIREDO, R.T., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F. ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE LACTOSE EM MATRIZES HIDROFÓBICAS In: 9º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO E 1º SIMPOSIO IBERO-AMERICANOSOBRE ADSORÇÃO, 2012, RECIFE. Anais do 9º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO. , 2012.

-Artigos completos publicados em periódicos

A.L. BALIEIRO, R.A. SANTOS, M.M. PEREIRA, R. T. FIGUEIREDO, L.S. FREITAS, O.L.S. DE ALSINA, A.S. LIMA, C.M. F. SOARES. Adsorption process of molecularly imprinted silica for extraction of lactose from milk. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **In Press**.

## ANEXO 1

### 1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE LACTOSE

A dosagem de lactose foi determinada a partir da curva de calibração, onde foi obtida pela equação (A.1). As curvas de calibração normalmente são plotadas utilizando de 4 a 5 pontos ao longo da faixa de trabalho desejada, com algumas repetições em cada ponto, sendo que a incerteza pontual é dada pelo intervalo de confiança da média, estabelecido pelo grau de confiança desejado. A dosagem de lactose nos experimentos utilizando PIM foi determinada a partir da curva de calibração (Tabela A.1 e Figura A.1), conforme descrito na equação abaixo (equação A.1). Enquanto que para a determinação de lactose nos experimentos utilizando MP, foi feita a curva de calibração conforme Figura A.2.

$$C_{lactose} = \frac{(Área-4968,2)}{150,83}$$

A.1

$$R^2=0,9923$$

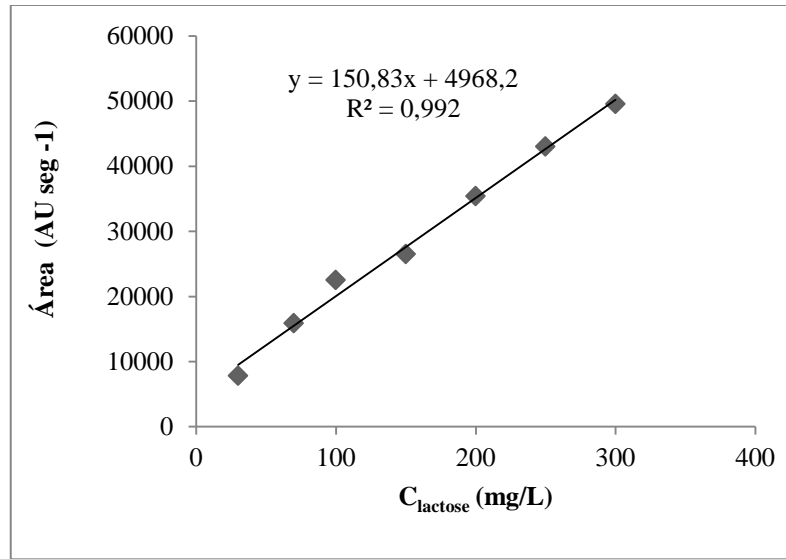
em que:

$C_{lactose}$  = concentração de lactose, expressa em mg/L

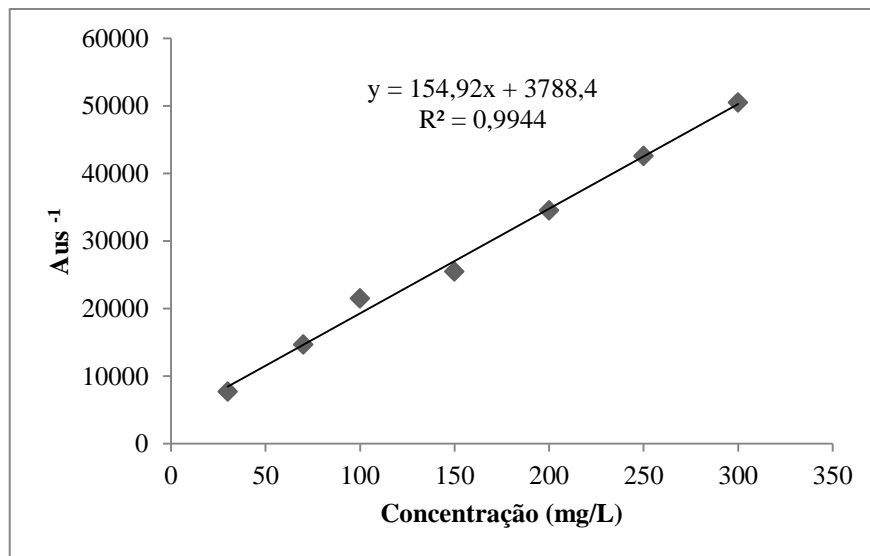
Área = área obtida pelo método da cromatografia líquida expressa ( $AU \text{ seg}^{-1}$ )

**Tabela A.1:** Dados para a obtenção da curva de calibração para a dosagem de lactose: área em função da concentração de lactose.

$C_{lactose}$ (mg/L)	Detector (ELDS) Área média ( $Aus^{-1}$ )	Detector (RID) Área média ( $Aus^{-1}$ )
30	7832	7721
70	15853	14657
100	22501	21484
150	26515	25478
200	35407	34527
250	43036	42581
300	49549	50478



**Figura A1.1:** Curva de calibração de lactose.



**Figura A1.2:** Curva de calibração de lactose.

## ANEXO 2

### 1 Ficha de avaliação sensorial de diferença do padrão.

Nome: _____											
Data: ____/____/____											
Prove primeiramente a amostra padrão e posteriormente prove as amostras codificadas da esquerda para a direita. Em seguida as compare com o padrão utilizando os valores ao lado.											
Amostra _____:	_____										
Amostra _____:	_____										
Amostra _____:	_____										
Amostra _____:	_____										
<table border="1"><tr><td>9- Extremamente diferente do padrão</td></tr><tr><td>8-</td></tr><tr><td>7-</td></tr><tr><td>6-</td></tr><tr><td>5-</td></tr><tr><td>4-</td></tr><tr><td>3-</td></tr><tr><td>2-</td></tr><tr><td>1-</td></tr><tr><td>0- Igual ao padrão</td></tr></table>		9- Extremamente diferente do padrão	8-	7-	6-	5-	4-	3-	2-	1-	0- Igual ao padrão
9- Extremamente diferente do padrão											
8-											
7-											
6-											
5-											
4-											
3-											
2-											
1-											
0- Igual ao padrão											

**Figura A2.1:** Ficha de avaliação sensorial pelo método da diferença do padrão.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prove e avalie a amostra conforme a escala a seguir:

ESCALA	
VALOR	CARACTERÍSTICA
1	Desgostei muitíssimo
2	Desgostei muito
3	Desgostei moderadamente
4	Desgostei ligeiramente
5	Nem gostei/ Nem desgostei
6	Gostei ligeiramente
7	Gostei moderadamente
8	Gostei muito
9	Gostei muitíssimo

Em relação à intenção de compra:

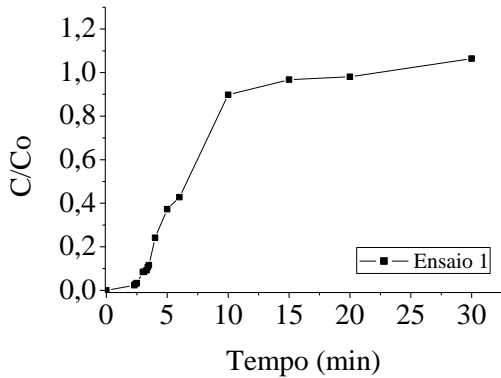
- Eu certamente compraria este produto
- Eu provavelmente compraria
- Não sei se compraria este produto
- Eu provavelmente não compraria este produto
- Eu certamente não compraria este produto

Observação: \_\_\_\_\_

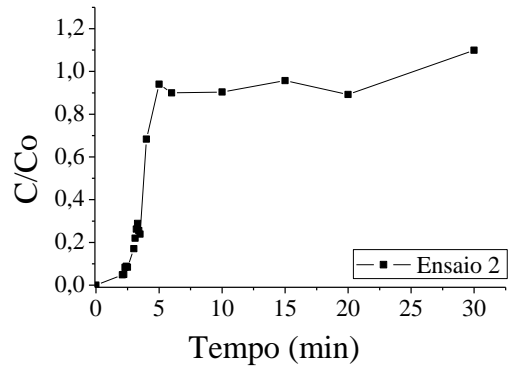
**Figura A2.2:** Ficha de avaliação sensorial pelo método da aceitação.

### ANEXO 3

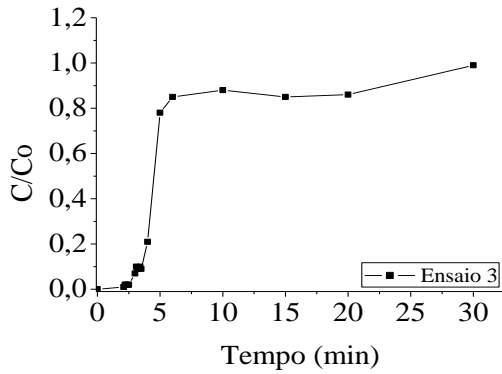
#### 1 Curvas de ruptura dos ensaios do planejamento de experimentos utilizando polímero impresso molecularmente (PIM).



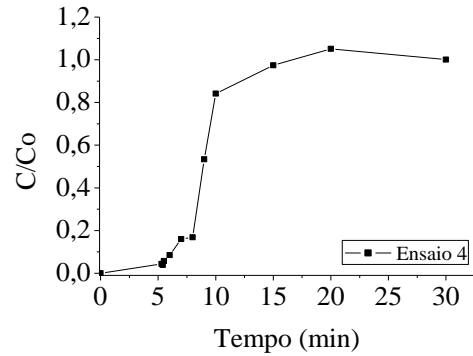
**Figura A3.1:** 34 °C; 60 mesh; 7,5 cm; 3 mL/min.



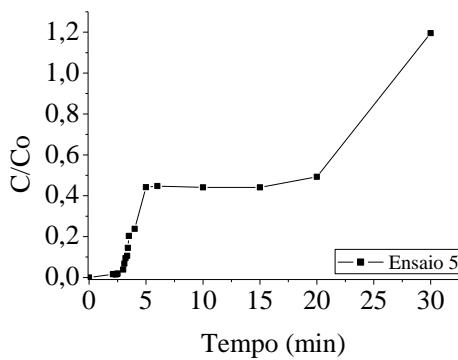
**Figura A3.2:** 60 °C; 60 mesh; 7,5 cm; 9 mL/min.



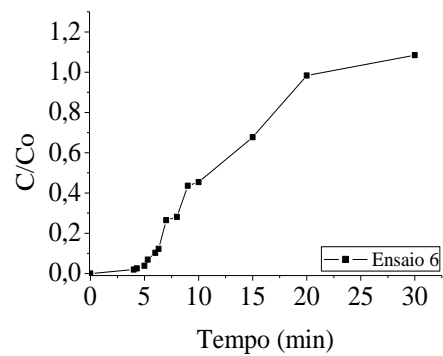
**Figura A3.3:** 34 °C; 32 mesh; 7,5 cm; 9 mL/min.



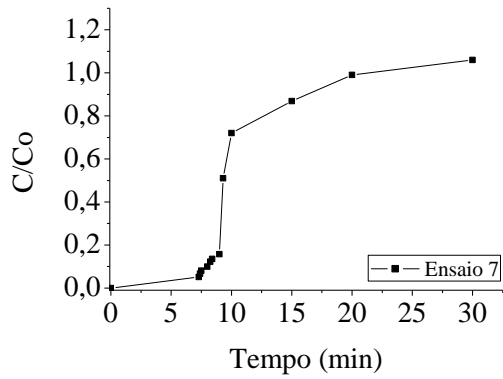
**Figura A3.4:** 60 °C; 32 mesh; 7,5 cm; 3 mL/min.



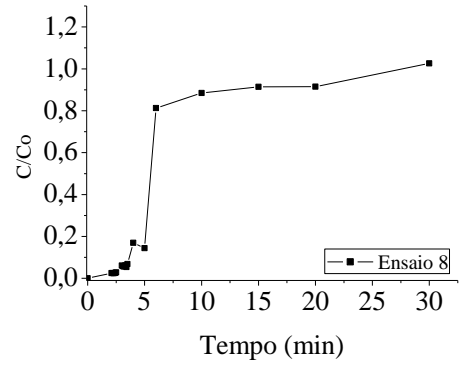
**Figura A3.5:** 34 °C; 60 mesh; 12,5 cm; 9 mL/min.



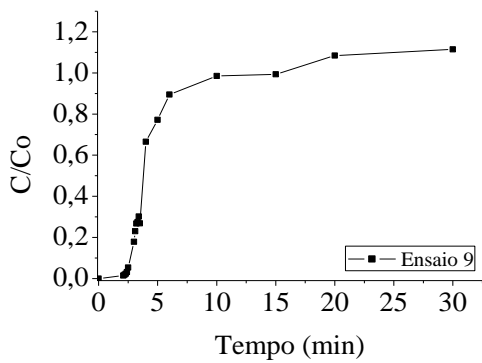
**Figura A3.6:** 60 °C; 60 mesh; 12,5 cm; 3 mL/min.



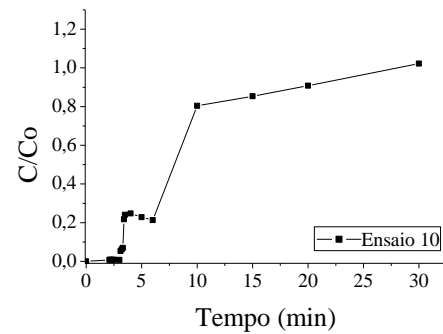
**Figura A3.7:** 34 °C; 32 mesh; 12,5 cm; 3 mL/min.



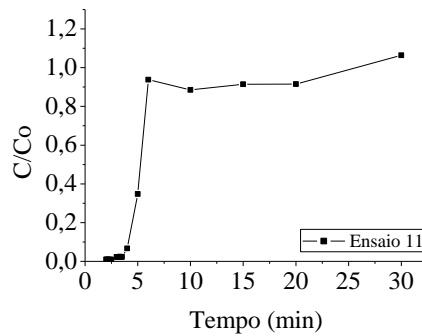
**Figura A3.8:** 60 °C; 32 mesh; 12,5 cm; 9 mL/min.



**Figura A3.9:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.



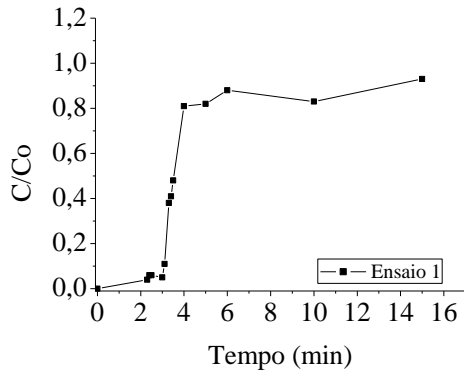
**Figura A3.10:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.



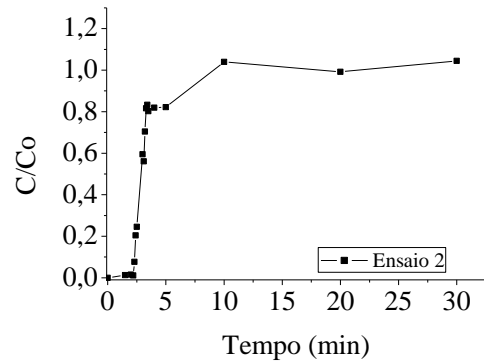
**Figura A3.11:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.



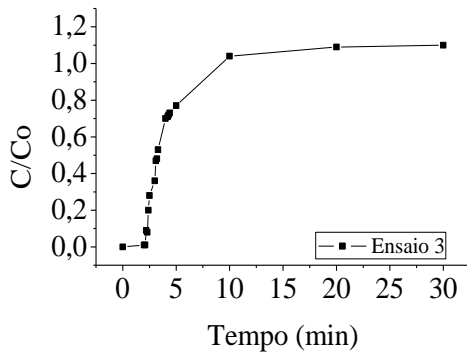
**2 Curvas de ruptura dos ensaios do planejamento de experimentos utilizando matriz pura (MP).**



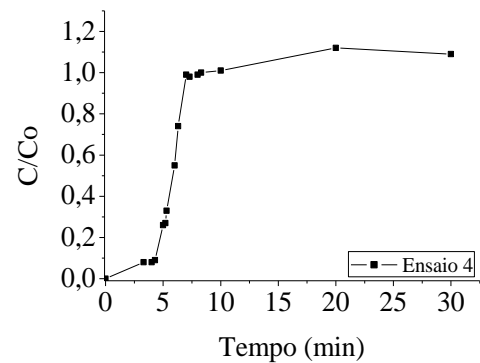
**Figura A3.1:** 34 °C; 60 mesh; 7,5 cm; 3 mL/min.



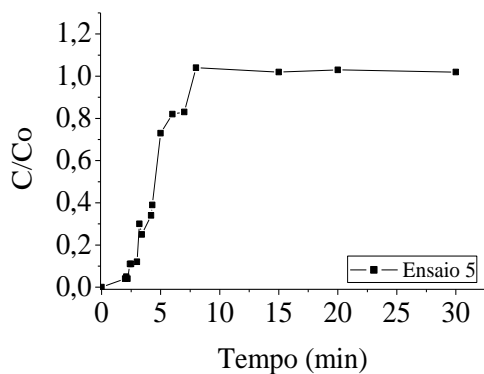
**Figura A3.2:** 60 °C; 60 mesh; 7,5 cm; 9 mL/min.



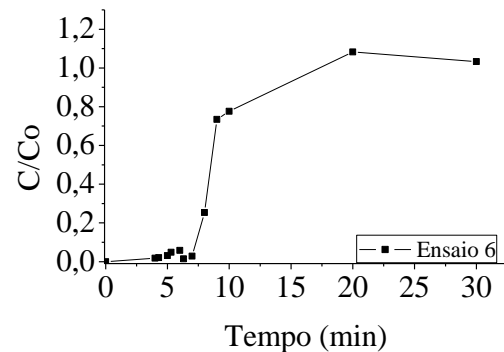
**Figura A3.3:** 34 °C; 32 mesh; 7,5 cm; 9 mL/min.



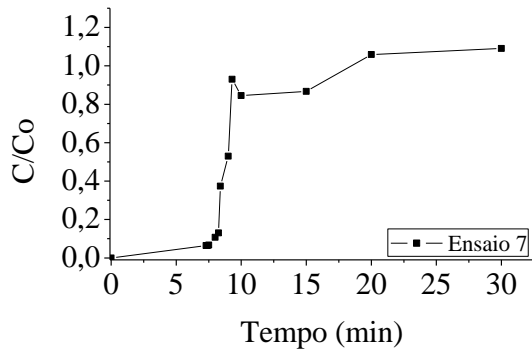
**Figura A3.4:** 60 °C; 32 mesh; 7,5 cm; 3 mL/min.



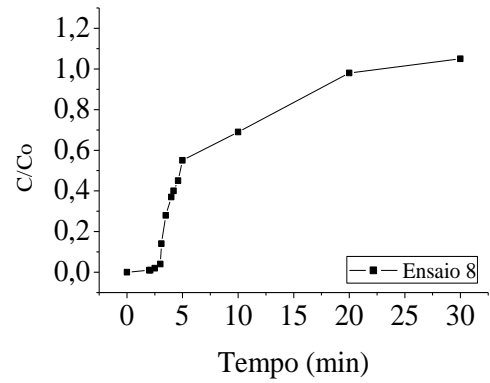
**Figura A3.5:** 34 °C; 60 mesh; 12,5 cm; 9 mL/min.



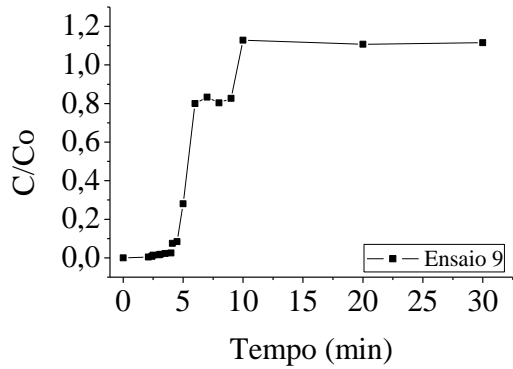
**Figura A3.6:** 60 °C; 60 mesh; 12,5 cm; 3 mL/min.



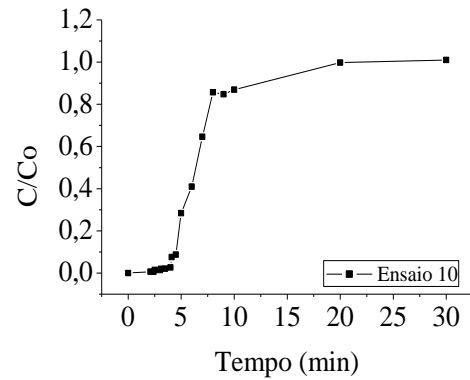
**Figura A3.7:** 34 °C; 32 mesh; 12,5 cm; 3 mL/min.



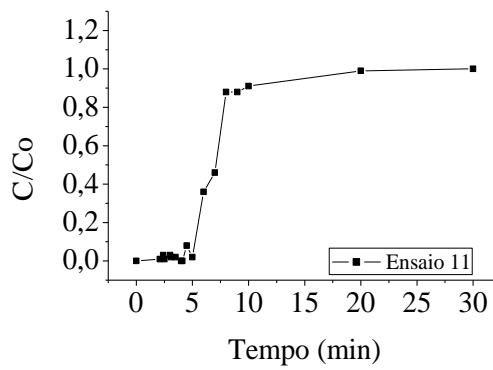
**Figura A3.8:** 60 °C; 32 mesh; 12,5 cm; 9 mL/min.



**Figura A3.9:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.

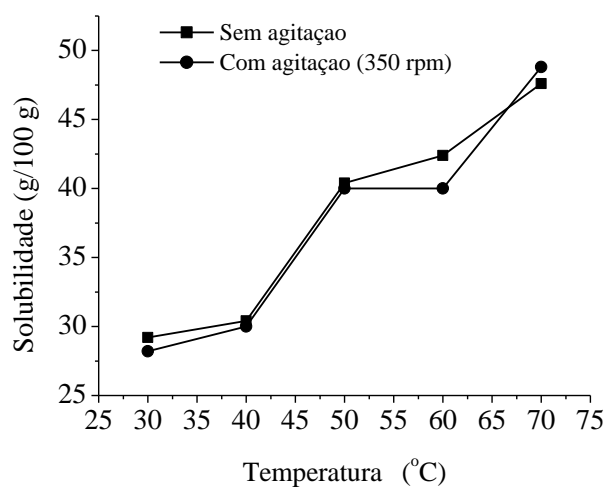


**Figura A3.10:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.



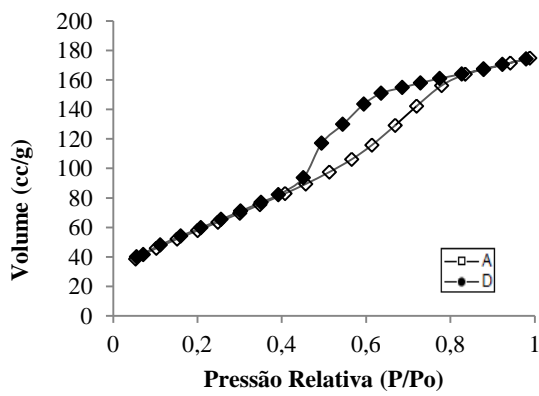
**Figura A3.11:** 47 °C; 42 mesh; 10 cm; 6 mL/min.

## ANEXO 4

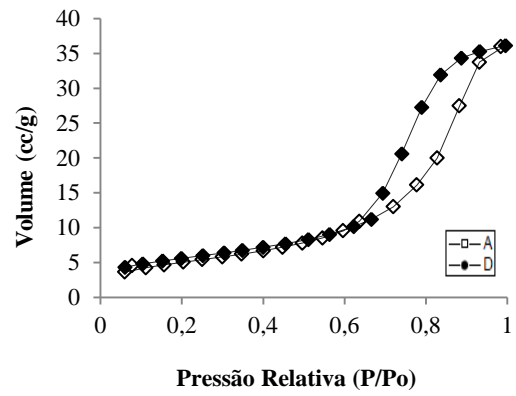


**Figura A4.1:** Curva de solubilidade da lactose em água em função da temperatura.

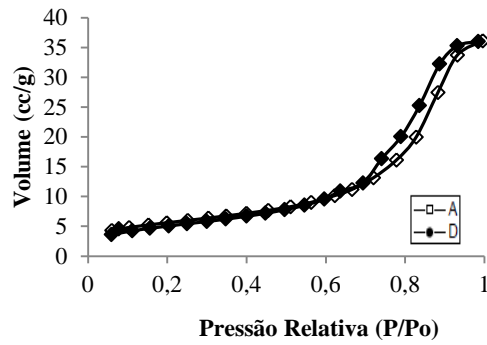
## ANEXO 5



(A)



(B)



(C)

**Figura 5.1:** Isothermas de adsorção-desorção em Nitrogênio de: (A) Matriz Pura (MP); (B) Polímero Impresso Molecularmente (PIM); (C) Polímero Impresso Molecularmente com Lactose (PIM-LAC).

## ANEXO 6

### PRODUCTION OF STRUCTURED LIPIDS OF LOW CALORIE CATALYZED BY IMMOBILIZED LIPASE

Acenini L. Balieiro<sup>(1)</sup>, Natália M. Osório<sup>(2)</sup>, Álvaro Silva Lima<sup>(1)</sup>, Francisco Valero<sup>(3)</sup>, Cleide M. Faria Soares<sup>(1)</sup>, Suzana Ferreira-Dias<sup>(2)</sup>

Email: suzanafdias@mail.telepac.pt

<sup>(1)</sup>Universidade Tiradentes, ITP, Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju-SE, Brazil;

<sup>(2)</sup>Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, CEER, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal;

<sup>(3)</sup> Departament d'Enginyeria Química (EE), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

#### ABSTRACT

This work aims to produce triacylglycerols (TAG) containing a medium-chain fatty acid (M) at positions *sn-1,3* and a long-chain fatty acid (L) at *sn-2* position, i.e. TAG of MLM type, by acidolysis of virgin olive oil with caprylic or capric acid, at a molar ratio of olive oil:fatty acid of 1:2, at 30 °C for 24 h, in solvent-free, catalyzed by heterologous *Rhizopus oryzae* lipase (rROL) immobilized in different supports (silica support modified with ionic liquid, Amberlite IRA 96, Lewatit® VP OC 1600). Reactions were performed at 40 °C for 48 h, either in solvent-free media, at a molar ratio 1:2 (olive oil:free fatty acid). The biocatalysts rROL IRA was these with higher yield the new TAGs from using C10:0 after 24 h of reaction (79.05 %), respectively; in the presence of C8:0, the system catalyzed by the biocatalyst rROL SIL, was obtained in yield 66.13% (w/w) of the new TAG at 48 h. During acidolysis with both acids and after 5 repeated uses, rROL IRA ( $t_{1/2}$ ) = 261.2 h, for caprylic,  $t_{1/2}$  = 261.9 h) presented first-order deactivation.

**Keywords:** Acidolysis, Capric acid, Caprylic acid, Olive oil, lipases, Structured lipids

## 1. Introduction

Structured lipids (SL) are defined as triacylglycerols (TAG) which have been chemically or enzymatically modified to change the fatty acids composition and/or positional distribution in the glycerol backbone. The production of SL with medium chain (6–12 carbon atoms) and saturated fatty acids (M) in the *sn-1* and *sn-3* positions and with long-chain (14–24 carbon atoms) saturated or unsaturated fatty acids (L) in the *sn-2* position (“MLM-type” SL) has sharply increased due to their unique nutritional properties [1].

Lipase-catalyzed acidolysis, in which the medium chain fatty acids (MCFAs) and vegetable oils are used as the sources of acyl donors and essential long chain fatty acids (LCFAs), respectively, is one of the most common approaches for the synthesis of MLM-SLs [2-5]. Lipases offers high catalytic efficiency, specificity, and selectivity by incorporation of the required acyl-group into a specific position of native TAG. In addition, the process takes place in very mild conditions that maintain the structure of the functional fatty acid unaltered. Enzymatic catalysis has been the main process used to obtain SL because of the advantages over the chemical process. In nature, lipases catalyze the hydrolysis of triacylglycerols into diacylglycerols (DAG), monoacylglycerols (MAG), free fatty acids (FFA) and glycerol. However, when in non-aqueous media, they can also catalyze esterification, alcoholysis and trans-esterification reactions [6].

Enzymatic acidolysis would be a preferable alternative for SL production due to the advantageous of selectivity, mild reaction conditions, less by products and easy recovery of catalysts. However, the enzyme-catalyzed process is expensive for industrial production. One way to lower the production cost is using lipase immobilized. The use of stable and active immobilized lipases is a way to make enzymatic process competitive [7].

Several hydrophobic supports have been described as suitable for lipase immobilization and used for production of structured lipids, such as Amberlite IRA are polystyrene polymers whose matrix structures can be altered with the cross-linking agent divinylbenzene. One way to overcome these drawbacks could be the use of additives to stabilize enzymes and assist in gel formation within arrays. Recently the use of aprotic ionic liquids as additives in the immobilization process has been reported, which could increase the activity and stability of immobilized enzymes by altering the hydration shell of the enzyme and reducing shrinkage of the gel. They can also affect the physical properties of the gel by participating in condensation reactions with free silanol groups [7]. Studies of various additives such as ionic liquids (ILs) have recently been suggested as agents that can stabilize enzymes, protecting the hydration shell around the enzyme and/or causing conformational changes leading to permanent activation of the enzyme [8]. Based on this analysis, use additive in the enzyme immobilization is good strategy for to stabilize enzyme or/and modified support. However, in the literature yet not found use these immobilized lipase for production of structured lipids of low calorie.

This work aims to produce TAG of MLM type by acidolysis of extra virgin olive oil with caprylic (C8:0) or capric (C10:0) acid in solvent-free media, catalyzed by heterologous *Rhizopus oryzae* lipase (rROL) expressed in *Pichia pastoris* immobilized in silica modified with ionic liquid obtained by a sol-gel or in resins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Extra virgin olive oil (acidity of 0.7% expressed as free oleic acid) was purchased from a local supermarket. Caprylic acid (C8:0, octanoic acid) and capric acid (C10:0, n-decanoic acid) were purchased from

TCI Europe N.V. (Belgium), Amberlite IRA 96<sup>®</sup> resins was obtained from Bengbu Co. (Anhui, China), Lewatit<sup>®</sup> VP OC 1600 was obtained from Lanxess, Leverkusen, Germany. The standard of monononadecanoic acid (minimum 99% pure) were from Larodan AB, N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) (minimum 90% pure) were from TCI Europe N.V. The silane precursor tetraethoxysilane (TEOS) was supplied by Across Organic (NJ, USA), ethanol (minimum 99% pure), ammonia (minimum 28% pure), hydrochloric acid (minimum 36% pure), pyridine (minimum 98% pure), *n*-Heptano (minimum 99% pure), glutaraldehyde were purchased from (Merck) and aprotic ionic liquid methy-3-propyl imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [C<sub>4</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N] as additive. All solvents and reagents for analyses were chromatographic or analytical grade and obtained from different sources. Lipases from rROL (produced by the Bioprocess Engineering and Applied Biocatalysis group of University Autònoma de Barcelona-UAB) were used. The rROL lipase was obtained by a fed-batch cultivation of a recombinant *Pichia pastoris* strain using methanol as inductor [9]. The biomass was separated from the culture broth by centrifugation and microfiltration. The supernatant was concentrated by ultrafiltration with a Centrasette<sup>®</sup> Pall Filtron system equipped with an Omega membrane of 10 kDa cut-off, and subsequently dialyzed against 10mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and finally lyophilized [10].

## 2.2. Silica support preparation by the sol-gel technique

The methodology used was as previously established by Souza *et al.* [11] with some modifications. For the mesoporous silica with protic ionic liquid 1% (v/v) of N-methylmonoethanolamine pentanoate was added, for the silica without ionic liquid this step was excluded (control). Two supports, a control silica support produced without ionic liquid (SC) and a silica support produced using ionic liquid (SIL), were obtained.

## 2.3. Water affinity support

The support materials were characterized by measuring their ability to absorb water from water-saturated diisopropyl ether. For the quotient: (amount of water on the support)/(amount of water in the solvent) in the model system the term aquaphilicity was proposed by Reslow *et al.*, [12]. Measurements of water absorption by support materials to 50 mg dry support, 250 mg water-saturated diisopropyl ether was added. After 16 h the water content in the solvent ( $\mu\text{L H}_2\text{O}$ , solvent) was measured by gas chromatography. The amount of adsorbed water was calculated ( $\mu\text{L H}_2\text{O}$ , support). The aquaphilicity of the support material,  $A_q$ , was defined as ( $\mu\text{L H}_2\text{O}$ , support)/(  $\mu\text{L H}_2\text{O}$ , solvent).

## 2.4. Immobilization by covalent binding

Heterologous lipase of *Rhizopus oryzae* (rROL) was immobilized in different supports (silica or anion resin) as follows.

The rROL was immobilized by covalent binding on the silica support (SC or SIL) using as glutaraldehyde bifunctional agent. For covalent binding with glutaraldehyde the silica support (SC or SIL) were silanized with aminopropyltriethoxysilane ( $\gamma$ -APTS) followed by a reaction with glutaraldehyde solution, then the lipase was immobilized according to the procedure described by Soares *et al.* [13] with modifications. The two preparations of the immobilized enzyme system on silica without (SC) or with (SIL) ionic liquid were

denominated rROL SC and rROL-SIL, respectively. The silica support (SC or SIL) (1 g dry wt) was previously soaked in hexane under agitation (100 rpm) for 15 min. 0.3 g of powdered lipase dissolved in 10 mL of distilled water. The fixation of lipase onto the support was performed under agitation for 3 h at room temperature followed by an additional period of 18 h under static condition at 4 °C.

For Amberlite IRA 96, anion resin was firstly treated with distilled water at 50 °C, for 30 min, under gentle magnetic stirring and after filtration under vacuum. Treatment with 1 M NaOH and 1 M HCl alternately (3 times using 20 mL of each solution). Between each treatment, the solution was removed from the support by vacuum filtration. The pre-equilibrium of the support with sodium phosphate buffer for 10 min (0.2 M, pH 7.4), again with vacuum filtration and drying for 24 h in a desiccator with silica-gel. 1 g of dried IRA-93 in 10 mL of sodium phosphate buffer containing the lipase powder (0.5 g) during 4 h at 30 °C, under gentle magnetic stirring and vacuum filtration. After the preliminary adsorption, these particles were mixed 25 mL solution of glutaraldehyde aqueous solution (0.5 %, v/v) during 20 min. The immobilized rROL was rinsed three times with buffer solution (15 mL each wash) and were filtered under reduced pressure, then the lipase was immobilized according to the procedure described by Wang *et al.* [14] with modifications. Preparation of the immobilized rROL on Amberlite IRA 96 was denominated rROL IRA 96.

The immobilization procedure of lipase on Lewatit® VP OC 1600 was as previously described by Tecelão *et al.* [15]. 1 g of Lewatit was added to 50 mL of phosphate buffer solution (0.1M, pH 7.0) containing 0.5 g of lipase powder during 4 h at 30 °C. The immobilization was carried out at room temperature, overnight, under gentle stirring. After that, the beads were recovered by vacuum filtration and incubated with 25 mL of phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde aqueous solution for 2 h, under slow mixing. The beads were, once again, recovered by vacuum filtration and washed twice with 50 mL of phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0) in order to remove the free enzyme. The immobilized lipase was dried under vacuum for approximately 10 min and stored at 4 °C until.

## 2.5. Activity of lipase in hydrolysis of emulsified olive oil

The hydrolytic activities of free and immobilized lipase were assayed by the olive oil–water emulsion method, according to the modification proposed by Soares *et al.*, [16]. The substrate was prepared by mixing 50 mL of olive oil with 50 mL of gum arabic solution (7% w/v). The assay mixture, consisting of 5 mL of the substrate, 2 mL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and either free (1.0 mL, 0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) or immobilized (≈100 mg) lipase, was incubated in a thermostatic batch reactor for either 5 min (free lipase) or 10 min (immobilized lipase) at 37°C, with stirring at 80 rpm. A blank titration was done with a sample in which the enzyme was replaced with distilled water. The reaction was terminated by the addition of 2 mL of acetone:ethanol:water (1:1:1) in approximately 0.3 µL of reaction mixture. The liberated fatty acids were titrated with potassium hydroxide solution (0.04 M) in the presence of phenolphthalein as an indicator. All enzymatic activity determinations were replicated at least three times. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 µmol of free fatty acid per min (µmol.min<sup>-1</sup>). Analyses of hydrolytic activities were carried out on the lipase loading solution and immobilized preparations to determine the yield immobilization, Y<sub>a</sub> (%), according to Equation 1:



$$\eta (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

in which  $U_s$  corresponds to the total enzymatic activity recovered on the support and  $U_0$  represents the enzyme units offered for immobilization.

## 2.6. Acidolysis Reaction

The acidolysis reactions were carried out in solvent-free media at 40 °C, in thermostatic-capped cylindrical glass vessels under magnetic stirring at 400 rpm. The mixture consisting of 3.0 g of extra virgin olive oil and 0.98 g of caprylic (C8:0) or 1.17 g of capric acid (C10:0), corresponding to a molar ratio of 1:2 olive oil to free fatty acid in . The molar ratio used corresponds to the stoichiometric value needed for the esterification of the free fatty acids at the *sn-1* and *sn-3* positions. In each experiment, 0.15 g of immobilized enzyme, corresponding to 5% (w/w) of the reaction medium, were added to the reaction medium, after complete melting. After 48 h of reaction (the time needed to attain equilibrium), 0.5 mL of the reaction medium was withdrawn and the reaction medium was stored at -20 °C until analysis. The modification of triacylglycerols (TAGs) was determined by the yield on new TAGs (new TAGs/initial TAGs), formed by addition of C8:0 and C10:0 Nunes *et al.*, [17].

## 2.7. Batch operational stability tests

The methodology used was that previously established by Nunes *et al.*, [17] with some modifications. The operational stability of the immobilized lipases was assayed in successive batches carried in solvent-free media, with an time of 48 h for every batches, out at 30 °C in a batch reactor consisting of a thermostatic cylindrical glass vessel (20 mL) closed with rubber stopper under magnetic stirring. The acidolysis reaction was assayed of 3 g extra virgin olive oil and 0.98 g of caprylic (C8:0) or 1.17 g of capric acid (C10:0). After each batch, the biocatalyst was removed from the reaction medium by paper filtration and reused in the next batch with fresh medium, under the same reaction conditions. A total of up to 5 batches were performed using the same biocatalyst sample. The activities of the biocatalyst were estimated at the end of each batch as conversion into news TAGs from the molar incorporation ratio of caprylic or capric acid in TAG extra virgin olive oil. The first batch was used as the reference (100% activity). The residual activity (in percentage) of the biocatalyst at the end of each batch  $n$  was thus estimated as the ratio between the activity observed at the end of batch  $n$  and the activity observed at the end of batch 1. To describe the deactivation kinetics, the following first-order model (equation 2) was tested:

$$A_n = A e^{-k_d n} \quad (2)$$

where  $A_n$  is the biocatalyst residual activity at batch  $n$  (%),  $A$  is a constant (%),  $k_d$  is the deactivation rate constant in (batch number)<sup>-1</sup> and  $n$  is the 5 batches number.

The fit of the models to experimental data (time, residual activity) was carried out using “Solver” add-in from Excel for Windows, version 8.1, by minimizing the residual sum-of-squares between the experimental data

points and those estimated by the respective model. The kinetic constants were obtained by this nonlinear regression analysis for the above mentioned model.

Half-life of the biocatalyst, i.e. the time required for half the enzyme activity to be lost as a result of deactivation ( $t_{1/2}$ ), was calculated by the following expression 3:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{-k_d} \quad (3)$$

where  $k_d$  (batch<sup>-2</sup>) is the deactivation coefficient.

### 1.1. Quantification and analysis of reaction products

To determine the reaction products (triacylglycerols, free fatty acids, diacylglycerols and monoacylglycerols), the procedure was followed according to the European Standard [18]. The various groups of compounds were quantified by comparison with nonadecanoic acid (C19:0) in tetrahydrofuran, as an internal standard. To identify the compounds of the reaction and their respective retention times were used reference standards as triolein, capric acid and caprylic acid. The quantification of substrates and products through the reaction capillary was achieved by high temperature gas chromatography after silylation of samples with pyridine and N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA). For each sample: 0.15 g of the reaction medium was dissolved in 10 ml of hexane, this mixture was transferred into a 0.5 ml glass flask of 10 mL for solvent evaporation in a rotary evaporator at a temperature of 40 °C and a pressure of 78 mbar. Then the dry residue obtained was added 400 µl of internal standard (C19:0), 200 µl of pyridine and 200 µl of MSTFA. After 15 minutes past, was added 4 ml of n-heptane on mixture, and subsequently analyzed by gas chromatography. The mixture was analyzed by GC Ultra gas chromatograph (Agilent Technologies 7820A) equipped with a flame ionization detector (FID) and capillary column DB5-HT (15 m x 0.32 mm ID x 0.10 µm film), an auto sampler Agilent Technologies 7820. Injector (on-column mode), detector temperatures were set at 50 °C and 370 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 25 mL.min<sup>-1</sup>. Air and hydrogen were supplied to the detector at flow rates of 300 mL.min<sup>-1</sup> and 30 mL.min<sup>-1</sup>, respectively. The oven temperature program was as follows: 50 °C for 1 min, a temperature increase to 180 °C at 15 °C.min<sup>-1</sup>, increased to maintaining the temperature at 180 °C for 10 min; 230 °C at a rate of 7 °C.min<sup>-1</sup>; increased to 370 °C at a rate of 10 °C.min<sup>-1</sup>; the end plateau at 370 °C for 43 min. Overall running time was 43 min.

The yield ( $\eta$ ) of new TAGs, was calculated assuming that the biocatalysts tested are 1,3-specific. Therefore, a yield of 100% corresponds to a total substitution of fatty acids inserted at positions *sn-1* and *sn-3* of TAG, being replaced by fatty acids caprylic or capric acid. The yield (% w/w), is the ratio of mass of product formed (mass produced TAGs) to the mass of consumed TAGs (mass produced TAGs). Quantitation of new TAG, was expressed in mass yield (% w/w) according to the equation (4) defining yield:

$$\eta = \frac{\text{product}_{\text{formed}}}{\text{substrate}_{\text{consumed}}} \times 100 \quad (4)$$

Applying the equation, we have:

$$\eta_{\text{TAG}_{\text{news}}} (\%) = \frac{\text{TAG}_{\text{produced}}}{\text{TAG}_{\text{consumed}}} \times 100 \quad (5)$$

To calculate the mass of TAG produced, we used the standard curve of triolein.

In order to investigate possible differences between the yields for the different new TAG biocatalysts and their respective systems used the software “Statistica”<sup>TM</sup>, version 5, from Stat soft, Tulsa. Tests were performed multiple comparisons using LSD Fisher with p-value  $\leq 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Water-adsorbing capacity different support

In order to measure the water-adsorbing capacity of different support materials these were dried and then mixed with water-saturated diisopropyl ether.

The partition of water between the support material and the solvent was measured. For the quotient: (amount of water on the support)/(amount of water in the solvent) in the model system, we propose the term aquaphilicity. The aquaphilicity as defined here is not a true partition constant. It will depend on the relative amounts of support material and solvent. However, the authors suggested one practical way to quantify the water adsorbing capacity of a support material. The aquaphilicities of all support materials used in this study are listed on Table 1 and was measured as described in Materials and Methods.

**Table 1:** Aquaphilicity ( $A_q$ ) of support materials used in this study.

Supports	%H <sub>2</sub> O	Aquaphilicity	P <sub>sup/solv</sub>
SC	4.29±0.02	1.12±0.23	4.70±0.42
SIL	19.30±2.82	1.02±0.16	4.50±0.51
Amberlite IRA 96	62.30±0.35	1.21±0.05	6.00±0.27
Lewatit® VP OC 1600	51.70±4.32	0.75±0.05	3.82±0.23

Highly hydrophilic gels, such as Sephadex G-25 and Bio-Gel have, as expected, high aquaphilicity. Low aquaphilicity was found for supports like Bonopore and Celite. Derivatization of glass with dimethyldichlorosilane is thought to make the glass highly hydrophobic. The preparation was hydrophobic in the sense that it was hardly wetted by water. It was thus somewhat surprising that the aquaphilicity of dimethyldichlorosilane-CPG was as high as 0.539. However, it has been shown by term that silica treated with dimethyldichlorosilane contains measurable amounts of surface water even after drying [12]. The hexyl-CPG preparation was water-repellant, but the aquaphilicity did not decrease using this derivatization procedure. For silica modified with ionic liquid verified that water may be either fixed to the support occupying positions in the lattice of the sol-gel matrix due in presence of the aprotic ionic liquid methy-3-propyl imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide Souza *et al.*, [11], confirming the variation in this studied that was 4.29 to 19.3 %H<sub>2</sub>O, SC to SIL, respectively.

The estimated  $A_q$  values were 62.30 and 51.70 %H<sub>2</sub>O, respectively, for Amberlite IRA 96 and Lewatit® VP OC 1600, suggesting a higher hydrophilicity of the immobilization support used in Amberlite IRA 96. These results indicate that the water present in the biocatalyst is less available for hydrolysis reactions in the case of Amberlite IRA 96 as compared to Lewatit® VP OC 1600. The affinity support by water can influence the catalytic activity of the immobilized enzyme.

Generally, hydrophobic materials are better supports for enzyme immobilization. The amount of enzyme adsorbed on such supports are usually larger and higher enzyme activities are obtained [19]. However, Villeneuve *et al.*, [20], suggests that increasing the water concentration in the microenvironment of the enzyme in hydrophilic media favors hydrolysis reactions.

A few examples of lipases immobilized on hydrophilic supports can be found in the literature. Muñio *et al.*, [21], studies the synthesis of structured triacylglycerols (STAGs) rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) using immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* on Accurel MP 1000. Tecelão *et al.*, [22] studied at the production of HMF substitutes by enzyme-catalyzed interesterification of tripalmitin with (i) oleic acid (system I) or (ii) omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA) (system II) in solvent-free media using commercial immobilized lipases from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) and *Candida antarctica* (Novozym 435) from Novozymes, DK, and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase immobilized on Accurel MP1000. Meunier *et al.*, [23] immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* through Celite in order to produce a mechanically stable and active biocatalyst thus improving mass transfer and increasing the enzymatic activity.

### 3.2. Hydrolytic activity of the lipase immobilized

The immobilization yield of the preparations of immobilized lipase on silica and resin were investigated using an olive oil hydrolysis reaction as a model [16]. In Table 2 we can observe the values of the hydrolytic activity and yield of all the immobilized biocatalysts.

**Table 2:** Hydrolytic activity after immobilization on the supports tested: rROL SC, rROL SIL, rROL IRA, rROL LW.

Biocatalyst	Immobilized	
	lipase activity (U.g <sup>-1</sup> )	Yield (%)
rROL SC	430.3	32.6
rROL SIL	585.9	49.7
rROL IRA	497.0	35.5
rROL LW	319.2	23.8

According to Table 2, among the biocatalysts prepared with lipase rROL the biocatalyst supports with hydrophobic modified with ionic liquid (rROL SIL) showed highest hydrolytic activity, on the order of 585.9 Ug<sup>-1</sup>, corresponding to 49.7% immobilization of yield, followed by the biocatalyst rROL IRA valued at 497.0 Ug<sup>-1</sup> support presenting approximately 35.5% yield. In according %H<sub>2</sub>O (Table 1), can be observed that the support with highest values, 19.3 and 62.3%H<sub>2</sub>O, obtained too the immobilization of yield for substrate. In this case, immobilized enzyme could be explained by the hydrophobic microenvironment of the immobilized enzyme attracting the substrate that is also hydrophobic [14].

The biocatalyst rROL LW, showed the lowest value in the determination of hydrolytic activity (319.2 U.g<sup>-1</sup>) and yield immobilization was of the 23.8%. Probably, this value suggests that the enzyme may have

undergone a negative conformational change during immobilization, which affected the immobilization of yield, and could have influenced the diffusional mass transfer of substrate to the immobilized enzyme [24].

Comparing experiments and the different types of supports for immobilization processes in this work, the hydrolytic activity immobilized lipase silica employing ionic liquids as additives generally resulted in higher values compared with the sample absent the protic ionic liquids. In this case, the use of a support coated with the ionic liquid may allow penetration of the enzyme inside the bed (because the pores increase), while increasing the number of coupled enzymes and consequently increasing the yield of immobilization [25].

Immobilization experiments performed demonstrated that the supports used, have the potential immobilization compared with enzyme activity in its free and immobilized form, can then be potentially used as biocatalysts to obtain structured lipids MLM type.

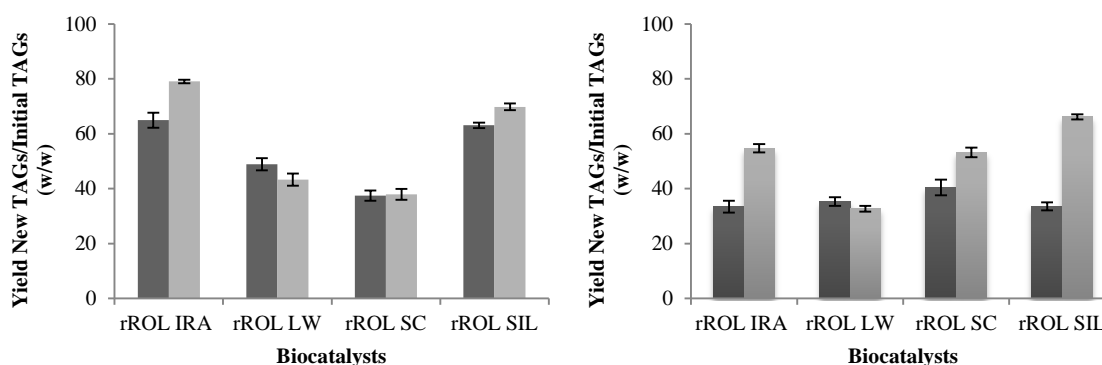
### 3.3. Screening of lipase and MLM Production

The production of dietary MLM type triglyceride was evaluated using the yield on new TAG. In this work rROL was immobilized in silica control (rROL SC), silica support modified with ionic liquid (rROL SIL), Amberlite IRA 96 (rROL IRA) and Lewatit® VP OC 1600 (rROL LW).

All biocatalysts were used for the acidolysis reaction between oleic acid and capric acid or caprylic acid in the absence of a solvent after 48 h of reaction.

The selection of the immobilization support was carried out taking into account (i) the hydrolytic activity of the immobilized lipase in each support (cf. Section 2.5) and (ii) the yield production TAG of MLM type (cf. Section 2.6).

Immobilization is a suitable approach to expose the enzyme more efficiently to the substrate, being specially indicated for processes in non-aqueous solvents. Several parameters of immobilized lipases are important to consider for industrial application: mechanical strength, chemical and physical stability, hydrophobic/hydrophilic character, enzyme loading capacity and cost, surface area, the number of sites accessible for binding, the porosity and the pore size [15].



**Figure 1.** Yield of New TAGs obtained by acidolysis between extra virgin olive oil and capric (C10:0) (A) and caprylic acid (C8:0) (B), catalyzed by rROL IRA, rROL LW, rROL SC and rROL SIL.

Comparing the yields obtained on new TAG by Figure 1A, the biocatalysts rROL IRA were those with higher yields the new TAGs from using C10:0 after 24h and 48 of reaction (65.0 and 79.0%, w/w), respectively; for (C8:0) were biocatalysts rROL SIL (54.7% w/w) and rROL SIL (66.1% w/w) after of the 48 of reaction, respectively.

Besides that, the various functional groups on the surface of ionic exchange resins may make it possible to immobilize enzymes on to resins firmly by covalent attachment technique. It was also found that resins had an accelerating action on the acyl migration in the transesterification. Therefore, resin may become a proper support for the immobilization of *R. oryzae* lipase in food industry. The results of the production of new TGAs by biocatalyst rROL IRA, showed that it was effective in producing structured lipids MLM type. It is probable that immobilization on hydrophobic supports can favor the acidolysis between extra virgin olive oil and C10:0, because the interactions between the substrate and the enzyme that keep open the "lid" hydrophobic located between catalytic site the lipases, facilitating access of the substrate to the catalytic site [26].

### 3.4. Operational stability of immobilized lipase in batch reaction

In the point of view industrial applications, the possibility of the reusable catalyst in reactions is an important aspect that should be taken into account in the design of new supports for enzyme immobilization. One advantage of immobilized enzyme over its free form is the reusability, so a successful immobilized enzyme system should be reusable with both good stability and high activity. The operational stability of immobilized enzymes system is very important for industrial applications.

In order to select the best immobilized biocatalyst for new TAGs, batch operational stability tests were performed for rROL immobilized in Amberlite IRA 96 and in silica modified with ionic liquid (rROL SIL). The rROL immobilized in Amberlite IRA 96, was biocatalyst selected for studies of operational stability in successive reuses and has a very high production of new TAGs. And others immobilized biocatalyst, it only showed activity in the first cycle. Selection took into account the fact that non-commercial rROL be a biocatalyst, lower cost, less studied in the synthesis of structured lipids.

The immobilized lipase after each batch was washed with phosphate buffer and used in the next batch with fresh substrate. Since the four biocatalysts presented important acidolysis activity for the yield new TAGS of caprylic and capric acids, their operational stability was evaluated in repeated use during 5 consecutive batches (1 batch = 48 h) at 30 °C. Reactions were carried out in solvent-free media, at 45 °C. The residual activity data and the deactivation models fitted to these data points and as well as the respective estimated half-life times are presented in Figure 4 and Table 3.

The inactivation model fitted to the experimental data (Table 3) is given by respective equations on the new TAG production by acidolysis from caprylic acid or capric acid (Table 3) with the TAG extra virgin olive oil, catalyzed by rROL. The deactivation of rROL IRA was observed during the incorporation of capric acid and caprylic in extra virgin olive oil in 5 consecutive batch reactions (Figure 3). The biocatalyst showed a time delay ( $t_d$ ) where the enzyme maintains its activity, decreasing thereafter, according [3].

**Table 3:** Deactivation models and respective half-life times estimated for the biocatalysts used in 5 consecutive 48 h batches of acidolysis of extra virgin olive oil with caprylic or capric acids in solvent-free medium.

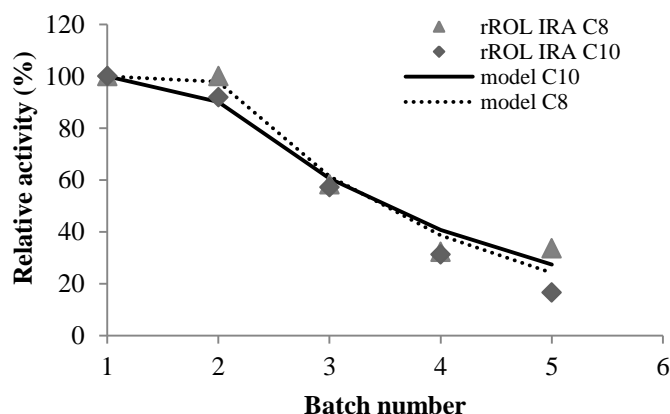
Biocatalyst	Deactivation	Equation	Batch	Determination	Half-life
-------------	--------------	----------	-------	---------------	-----------

	model	Model	n°.	coeficiente (R <sup>2</sup> )	time (h)
rROL IRA C8:0	First-order	$A_n = 3.91e^{-0.46n}$	5.44	0.95	261.20
rROL IRA C10:0	First-order	$A_n = 3.91e^{-0.40n}$	5.46	0.97	261.95

The estimated half-lives for rROL-SIL and LBC MS was e 1 batch in the presence of caprylic or capric acids, respectively (Table 3). This biocatalyst we're not able to catalyze the formation of new TAGs after the first 48 h use.

It was found that the immobilized lipase onto anion resin Amberlite IRA-96, almost maintained its full activity during 5 consecutive batch reactions, each lasting for 48 h. The residual acidolysis activities at the end of each of the repeated 48-h batches are presented in Figure 3. The deactivation models and equations fitted to these results, as well as the respective estimated half-life times, are shown in Table3.

A half-life time of 5.44 batches (261 h) was estimated for this biocatalyst. The inactivation profile was similar to that observed for rROL-IRA in both systems (Table 3).



**Figure 3:** Residual activity (ratio of activities at batch n:batch 1) of rROL at the end of each consecutive 48 h batch, when acidolysis of olive oil with caprylic acid (C8:0) or capric acid (C10:0) was performed in solvent-free media.

Both biocatalysts used showed an exponential inactivation first order model described by equation (5):

$$A_n = A e^{-k_d n} \quad (5)$$

Where  $A_n$  is the biocatalyst residual activity at batch n (%),  $A$  is a constant (%),  $k_d$  is the deactivation rate constant in (batch number)<sup>-1</sup> and n is the 5h batches number.

A time delay ( $t_d$ ) model for enzyme inactivation can be formulated as:

$$A = 1 \text{ for } t \leq t_d$$

The half-life time of the biocatalyst was higher in the presence of caprylic (261.2 h) than in the presence of capric acid (261.95 h), there was no difference in terms of operational stability of biocatalysts for the masters acids. The immobilized lipase on Amberlite IRA 96, showed an excellent operational stability, maintaining a

constant level yield of new TAGs after 5 cycles. The results imply that the operational stability of immobilized rROL was greatly improved by covalent bonding technique using glutaraldehyde on a hydrophobic ionic exchange resins support. As it was mentioned elsewhere, when adsorbed on a hydrophobic surface, the active conformation of enzymes might be more stable due to the strongly hydrophobic interaction between lipase and solid support. In addition, a relatively hydrophobic matrix could also provide a proper microenvironment for the enzyme by preventing an excess of water accumulating during the long-term reuse.

Nunes *et al.* [27] investigated the operational stability of rROL the acidolysis reaction between the extra virgin olive and caprylic acid (C8:0) and capric acid (C10:0) in successive batches of 24 hours each. The lipase rROL have revealed greater operational stability with caprylic acid, with  $t_{1/2}$  of 159 hours, in contrast to the 261.95 hours obtained with capric acid. In a similar study, we used an extracted from *R. oryzae* lipase was immobilized on Accurel® MP showed a stability for 190 hours operating for the successive "batch" for 19 hours.

#### 4. Conclusions

In the MLM type of dietary triacylglycerols production tests, the biocatalyst that had higher incomes in new tags were to rROL IRA (79.0 and 54.3% w/w), respectively for the C10:0 and C8:0 after 48 h of reaction. These results showed the preference of lipase for capric acid (C10:0). Among the biocatalysts prepared with lipase rROL the biocatalyst supports with hydrophobic modified with ionic liquid (rROL SIL) showed highest hydrolytic activity. In conclusion, the present investigation clearly demonstrates the fact that aquaphilicity (the tendency to bind water) of the support is extremely important when evaluating and optimizing systems for bioorganic catalysis. Lipase from *R. oryzae* immobilized in Amberlite IRA 96 was the biocatalyst selected, due high stability in the optimal operational conditions attained in this work (30 °C, in absence of solvent). The half-life time of the biocatalyst was in the presence of caprylic 261.2 h and 261.95 h in the presence of capric acid. This study shows the potentialities of the recombinant *R. oryzae* lipase as biocatalyst immobilized in Amberlite IRA 96 for the synthesis of lipids type MLM with acidolysis of extra virgin oil and capric acid or caprylic. The biocatalysts rROL IRA were the biocatalyst that presented the highest operational stability, together with high incorporation levels and for the production of structured lipids by acidolysis of caprylic or capric acid with virgin olive oil, in batch mode. Therefore, these biocatalysts seem to be the most adequate for process implementation aimed at the production of MLM rich in caprylic and capric acid.

#### 5. References

1. Bolivar JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Mateo C (2007) Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Enzyme Microb Tech* 40, 540-546
2. Khodadadi M, Aziz S, St-Louis R, Kermasha S (2013) Lipase-catalyzed synthesis and characterization of flaxseed oil-based structured lipids. *J Funct Food* 5, 424-433
3. Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S (2011) Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chem* 127, 993-998
4. Foresti ML, Ferreira ML (2010) Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses. *Enzyme Microb Tech* 46, 419-429



5. Hita E, Robles A, Camacho B, González PA, Esteban L, Jiménez MJ, Muñoz MM, Molina E (2009). Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. *Biochem Eng J* 46, 257-264
6. Sharma M, Rastogi NK, Lokesh BR (2009) Synthesis of structured lipid with balanced omega-3: Omega-6 ratio by lipase-catalyzed acidolysis reaction: Optimization of reaction using response surface methodology. *Process Biochem* 44, 1284-1288
7. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40, 1451-1463
8. Hara P, Mikkola JP, Murzin DY, Kanerva LT (2010) Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. *J Mol Catal B Enzym*, 67,129-134
9. Arnau C, Ramon R, Casas C, Valero F (2010) Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme Microb Tech* 46, 494-500
10. Tecelão C, Guillén M, Rivera I, Sandoval G, Valero F, Ferreira-Dias S (2009) Screening of noncommercial biocatalysts for the production of human milk fat substitutes. *New Biotech* 25, S120.
11. Souza RL, Faria ELP, Figueiredo RT, Freitas LS, Iglesias M, Mattedi S, Zanin GM, Santos OAA, Coutinho JAP, Lima AS, Soares CMF (2013) Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives. *Enzy Microb Technol* 52, 141–50
12. Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B. (1988) On the importance of the support material for bioorganic synthesis influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *Eur J Biochem* 172, 573-578
13. Soares CF, Castro H, Moraes F, Zanin G (1999) Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl Biochem Biotechnol* 79, 745-757
14. Wang Y, Xia L, Xu X, Xie L, Duan, Z (2012) Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food Bioprod Process* 90, 707-712
15. Tecelão C, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S (2012) Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochem Eng J* 67, 104-110
16. Soares CMF, Santos OA, Olivo JE, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM (2004) Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. *J Mol Catal B-Enzym*, 29(1–6): 69-79
17. Nunes P, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S (2009) Production of low caloric structured lipids containing medium chain fatty acids, catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *New Biotech* 25, S111
18. EN 14105:2011 (E), Fat and oil derivatives-Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents, European Committee for Standardization, Brussels, pp.21
19. Kumar D, Nagar S, Bhushan I, Kumar L, Parshad R, Gupt V (2013). Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *J Mol Catal B: Enzym* 87, 51-61
20. Villeneuve P, Muderhwa J M, Graille J, Haas MJ (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym* 113-148.
21. Muñoz MM, Robles A, Esteban L, Gonzalez PA, Molina E (2009) Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochem* 44, 723-730
22. Tecelão C, Silva J, Dubreuc E, Ribeiro MH, Dias SF (2010) Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *J Mol Catal B: Enzym* 65, 122-127
23. Meunier SM, Rajabzadeh AR, Legge RL (2014) Kinetic modelling of the production of methyl oleate by Celite® supported lipase sol-gels. *Biochem Eng J* 85, 63-70
24. Cabrera-Padilla RY, Albuquerque M, Figueiredo RT, Fricks AT, Franchesci E, Álvaro SL, Onélia AAS, Silva DP, Soares CMF (2013) Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001. *Bioprocess Biosyst Eng* 1:2-15

25. Fernandez-Lafuente R (2009) Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol*, 5, 405-18
26. Xu X (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur J Lipid Sci Technol* 102, 287-303
27. Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S (2011) Production of MLM-Type Structured Lipids Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. *J A Oil Chem Soc* 88(4): 473-480





