

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**ESTUDO INTEGRADO PARA A RECUPERAÇÃO DE LACTOSE DO
LEITE COMPOSTO POR ADSORÇÃO E CRISTALIZAÇÃO**

Autor: Gilderlan Rodrigues Oliveira

Orientadores: Prof^ª. Dra. Cleide Mara Faria Soares

Prof^ª. Dra. Odélsia Leonor Sanchez de Alsina

Prof^º. Dr. Álvaro Silva Lima

ARACAJU, SE – BRASIL

MARÇO DE 2018

ESTUDO INTEGRADO PARA A RECUPERAÇÃO DE LACTOSE DO LEITE
COMPOSTO POR ADSORÇÃO E CRISTALIZAÇÃO

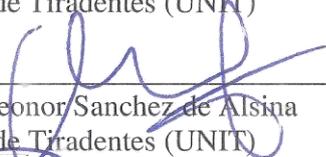
Gilderlan Rodrigues Oliveira

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

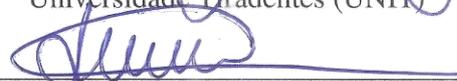
Aprovada por:



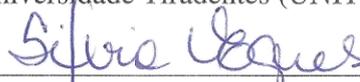
Dra. Cleide Mara Faria Soares
Universidade Tiradentes (UNTT)



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



Dr. Álvaro Silva Lima
Universidade Tiradentes (UNIT)



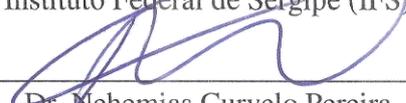
Dra. Sílvia Maria da Silva Egues
Universidade Tiradentes (UNIT)



Dra. Manuela Souza Leite
Universidade Tiradentes (UNIT)



Dr. João Batista Barbosa.
Instituto Federal de Sergipe (IFS)



Dr. Nehemias Curvelo Pereira
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

ARACAJU, SE - BRASIL

MARÇO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

O48e Oliveira, Gilderlan Rodrigues
Estudo integrado para recuperação de lactose do leite composto por adsorção e cristalização / Gilderlan Rodrigues Oliveira; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Cleide Mara Faria Soares, Prof.^a Dr.^a Odélsia Leonor Sanchez de Alsina, Prof.^o Dr.^o Álvaro Silva Lima – Aracaju: UNIT, 2018.

167 f. il ; 30 cm

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Polímero impresso. 2. Dessorção. 3. Anti-solvente. 4. Cristais. I. Oliveira, Gilderlan Rodrigues. II. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.). III. Alsina, Odélsia Leonor Sanchez de. (orient.) IV. Lima, Álvaro Silva. (orient.). V. Universidade Tiradentes. VI. Título.

CDU: 637.345

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre foi o senhor do meu destino, sempre guiando os meus passos e me fortalecendo nos momentos mais difíceis.

A minha família, em especial aos meus pais Geraldo e Dorivan, que sempre foram inspiração e o meu porto seguro.

Meu agradecimento em especial a minha esposa Janielly que acompanhou de perto essa jornada, estando sempre ao meu lado, incansavelmente, com toda paciência do mundo e me dando força para continuar, obrigado meu amor.

A minha filha Maria Júlia que é um presente de Deus. Obrigado por ter dado outro significado a minha vida, você é a luz dos meus olhos e a minha força maior.

Aos meus professores e orientadores Cleide, Odélsia e Álvaro a quem expressei o meu profundo agradecimento pela orientação, apoio e transferência de conhecimento. Foram anos de muito aprendizado e amadurecimento profissional.

A Acenini pelo apoio e incentivo, cujo trabalho foi essencial para o desenvolvimento dessa Tese.

As alunas de iniciação científica, Cinthia, Thaize e Emília, pela participação efetiva nesse trabalho.

A todos os meus amigos que compreendem a família LPA e LEB. Obrigado pelo apoio, pela troca de experiência profissional e pelas amizades que levarei para a vida.

Ao Instituto Federal de Sergipe pelo apoio e o incentivo para que esse trabalho fosse realizado.

Obrigado!!!

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.

ESTUDO INTEGRADO PARA A RECUPERAÇÃO DE LACTOSE DO LEITE COMPOSTO POR ADSORÇÃO E CRISTALIZAÇÃO

Gilderlan Rodrigues Oliveira

A lactose tem se destacado como um produto de grande interesse comercial, em virtude de suas aplicações na indústria de alimentos; fabricação de diversos produtos: pães e sorvetes, na indústria farmacêutica; como excipientes ou diluentes de medicamentos e na indústria de cosméticos; como emoliente na fabricação de batons e cremes. Dentre as tecnologias utilizadas para a obtenção de lactose, a técnica de impressão molecular é apontada como uma interessante para a recuperação de lactose mais pura em comparação com outras técnicas devido a sua especificidade molecular. O objetivo desse trabalho foi estudar a recuperação de lactose do leite por meio de uma coluna de leito fixo de adsorção/dessorção, preenchida com polímero impresso molecularmente e integrada com o processo de cristalização. A dinâmica de dessorção da lactose e o desempenho foram estudados mediante um planejamento composto central rotacional, cuja variável dependente foi o rendimento durante a dessorção e as variáveis independentes foram a temperatura e vazão. Após as eluições, durante a etapa de dessorção, a lactose foi obtida por meio da cristalização com adição do etanol. Em seguida, foi caracterizada em relação ao seu pH, acidez titulável, umidade, cinzas e teor de proteínas. Estudos de reuso do adsorvente foram realizados após ciclos contínuos adsorção-dessorção. Os resultados demonstraram que a vazão foi a variável significativa, apresentando um efeito negativo no processo de dessorção da lactose, cujo maior rendimento obtido foi de 58,30 % para vazão de 3 mL/min e temperatura de 34 °C. As análises físico-químicas demonstraram que a lactose recuperada apresenta características próximas das exigidas pela Farmacopéia Brasileira e com boas condições higiênicas-sanitárias. Estudos de reuso mostraram que o adsorvente possui uma estabilidade ao longo de quatro ciclos, permitindo que o sistema integrado proposto possa operar em ciclos contínuos ao longo do processo de obtenção de lactose. Os cristais de lactoses obtidos apresentaram diâmetros médios na faixa de 50 a 94 μm , correspondentes aos principais tamanhos encontrados em aplicações farmacêuticas.

Palavras-chave: Polímero impresso, dessorção, anti-solvente, cristais.

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.

INTEGRATED STUDY FOR THE RECOVERY OF LACTOSE OF MILK COMPOSED BY ADSORPTION AND CRYSTALLIZATION

Gilderlan Rodrigues Oliveira

Lactose has stood out as a product of great commercial interest because of its applications in the food industry; fabrication of various products: breads and sorbets in the pharmaceutical industry; as excipients or diluents of drugs and in the cosmetics industry; as emollient in the fabrication of lipsticks and creams. Currently, the molecular imprinting technology has shown to be very promising in the process of removal and recovery of biomolecules due to their selectivity. The objective of this work was to study the recovery of milk lactose through a fixed bed column adsorption/desorption, filled with molecularly imprinted polymer and integrated with the crystallization process. The desorption dynamics of lactose and performance were studied through a Central Composite Rotational Design, whose dependent variable was the yield during desorption and the independent variables were temperature and flow. After the elution, during the desorption step, the lactose was obtained by means of crystallization with the addition of ethanol. It was then characterized in terms of its pH, titratable acidity, humidity, ash and protein content. Adsorption regeneration studies were performed after continuous adsorption-desorption cycles. The results showed that the flow rate was the significant variable, with a negative effect on the lactose desorption process. The highest yield was 58.30 % for a flow rate of 3 mL min⁻¹ and a temperature of 34 ° C. The physical-chemical analysis showed that the recovered lactose presents characteristics close to those required by the Brazilian Pharmacopoeia and with good hygienic-sanitary conditions. Regeneration studies have shown that the adsorbent has a good stability over four cycles, allowing the proposed integrated system to operate in continuous cycles throughout the process of lactose production. The obtained lactose crystals presented average diameters in the range of 50 to 94 µm, corresponding to the main sizes found in pharmaceutical applications.

Keywords: imprinted polymer, desorption, anti-solvent, crystals.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 4 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 LEITE | 5 |
| 3.2 LACTOSE..... | 6 |
| 3.3 IMPRESSÃO MOLECULAR | 9 |
| 3.4 TÉCNICAS DE REMOÇÃO DA LACTOSE | 10 |
| 3.5 SISTEMA INTEGRADO | 14 |
| 3.5.1 Adsorção | 15 |
| <i>Fatores que influenciam adsorção</i> | 16 |
| <i>Cinética de adsorção</i> | 17 |
| <i>Isotermas de adsorção</i> | 18 |
| <i>Modelagem de curvas de rupturas</i> | 20 |
| 3.5.2 Dessorção..... | 21 |
| 3.5.3 Cristalização | 22 |
| 3.6 BUSCA DE ANTERIORIDADE..... | 24 |
| 3.6.1 Patentes..... | 24 |
| 3.6.2 Técnicas de recuperação | 25 |
| 3.6.3 Sistemas de produção de lactose..... | 26 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS | 28 |
| 4.1 MATERIAL | 28 |
| 4.1.1 Reagentes analíticos | 28 |
| 4.1.2 Leite | 29 |
| 4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL..... | 29 |
| 4.2.1 Preparação do adsorvente | 29 |
| 4.2.2 Avaliação da remoção da lactose do leite no processo em batelada do adsorvente PIM..... | 30 |
| 4.3 ESTUDO DO SISTEMA INTEGRADO DE RECUPERAÇÃO DE LACTOSE DO LEITE | 30 |
| 4.3.1 Adsorção e dessorção da lactose em coluna de leito fixo | 30 |
| 4.3.2 Reuso do adsorvente | 32 |
| 4.3.3 Avaliação da recuperação da lactose em solução sintética e da lactose recuperada do leite através do processo de cristalização | 32 |
| 4.3.4 Sistema integrado para obtenção da lactose do leite..... | 33 |
| 4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS | 33 |
| 4.4.1 Determinação da concentração de lactose..... | 33 |
| 4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)..... | 34 |
| 4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 34 |
| 4.4.4 Caracterização Física em B.E.T. (BRUNAUER-EMMETT-TELLER)..... | 34 |
| 4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE E DA LACTOSE RECUPERADA | 35 |
| 4.5.1 Determinação de cinzas..... | 35 |
| 4.5.2 Determinação de umidade | 35 |
| 4.5.3 Determinação da acidez total titulável..... | 35 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.4 | <i>Determinação de proteínas</i> | 35 |
| 4.5.5 | <i>Determinação de lipídeos</i> | 36 |
| 4.5.6 | <i>Determinação de pH</i> | 36 |
| 4.6 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA | 36 |
| 4.6.1 | <i>Contagem de Coliformes Totais e Termo Tolerante</i> | 36 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 38 |
| 5.1 | ESTUDO DA REMOÇÃO DA LACTOSE EM SISTEMA BATELADA | 38 |
| 5.2 | ESTUDO DE ADSORÇÃO DA LACTOSE EM COLUNA DE LEITO FIXO | 40 |
| 5.3 | ESTUDO DE DESSORÇÃO DA LACTOSE EM COLUNA DE LEITO FIXO | 42 |
| 5.3.1 | <i>Modelagem da dinâmica de dessorção em coluna de leite fixo</i> | 45 |
| 5.4 | ESTUDO DO REUSO DO ADSORVENTE | 47 |
| 5.5 | DETERMINAÇÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE E DA LACTOSE RECUPERADA | 51 |
| 5.6 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR) DA CASEÍNA E DOS CRISTAIS DE LACTOSE RECUPERADOS | 52 |
| 5.7 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA | 55 |
| 5.8 | CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE RECUPERADA DE SOLUÇÃO SINTÉTICA | 55 |
| 5.8.1 | <i>Análise termogravimétrica (TGA)</i> | 58 |
| 5.8.2 | <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> | 60 |
| 5.9 | ANÁLISE DOS CRISTAIS DE LACTOSE | 62 |
| 5.10 | PROCESSO INTEGRADO | 65 |
| 6. | CONCLUSÕES | 68 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA | 71 |
| 8. | LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS | 84 |
| | ANEXO 1 A | 86 |
| | ANEXO 2 A | 88 |
| | ANEXO 3 A | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Estrutura química da lactose..... | 6 |
| Figura 2: Formas isômeras da lactose..... | 7 |
| Figura 3: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular..... | 10 |
| Figura 4: Representação esquemática do processo da adsorção e dessorção, onde (A) representa o adsorvato e [M(sup.)] representa o adsorvente. | 15 |
| Figura 5: Isoterma de adsorção | 18 |
| Figura 6: Esquema das etapas do estudo integrado para obtenção da lactose..... | 28 |
| Figura 7: Unidade experimental utilizada no processo de adsorção/dessorção da lactose em coluna de leito fixo recheada com partículas adsorventes impressas molecularmente (PIM), seguida da etapa de cristalização. | 31 |
| Figura 8: Curva de remoção da lactose do leite no adsorvente impresso molecularmente em sistema batelada, ($m = 4$ g de PIM; $C_0 = 22$ mg/L; $t = 35$ °C e 200 rpm)..... | 38 |
| Figura 9: Capacidade de adsorção do adsorvente PIM em reator agitado..... | 39 |
| Figura 10: Curva de ruptura e ajuste dos modelos para a adsorção de lactose no PIM em coluna de leito fixo, para as condições de 9 mL/min; 12,5 cm e 34 °C..... | 40 |
| Figura 11: Cinética de dessorção da lactose em coluna de leito fixo recheada com polímero impresso molecularmente (PIM) para as vazões de 3, 6 e 9 mL/min. | 42 |
| Figura 12: Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM..... | 44 |
| Figura 13: Superfície de resposta do rendimento (%) da lactose no processo de dessorção em leito fixo utilizando PIM. | 44 |
| Figura 14: Curvas de rupturas de dessorção da lactose do leite obtidas experimentalmente e ajustadas para os modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan, para as condições de (a) 12,5 cm; 3 mL/min; 34 °C, (b) 12,5 cm; 6 mL/min 34 °C e (c) 12,5 cm; 9 mL/min e 34 °C. | 46 |
| Figura 15: Estudo de reuso do adsorvente PIM para diferentes ciclos de adsorção (12,5 cm, 9 mL/min e 34 °C) e dessorção (12,5 cm, 3 mL/min e 34 °C)..... | 48 |
| Figura 16: Isotermas de nitrogênio adsorção/dessorção a) PIM-C1; b) PIM-C5..... | 49 |
| Figura 17: Gráficos de distribuição do diâmetro dos poros de acordo com BJH análise dessorção da lactose do leite a) PIM-C1; b) PIM-C5. | 51 |
| Figura 18: Espectros do FTIR do padrão da caseína e da caseína do material eluído da coluna de dessorção após a precipitação ácida. | 53 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19: Espectros de FTIR do padrão de α -lactose e da lactose recuperada durante o ensaios 1 no processo de dessorção, nas condições 34 °C-3 mL/min..... | 54 |
| Figura 20: Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a recuperação da lactose em solução sintética por cristalização..... | 57 |
| Figura 21: Superfície de resposta em função do volume de etanol e do tempo de agitação para a recuperação da lactose. | 58 |
| Figura 22: Curvas TG e DTA a) padrão da lactose e b) lactose recuperada durante o ensaio 1 de dessorção para 34 °C-3 mL/min, obtidas em N ₂ | 59 |
| Figura 23: Efeito do volume de etanol e do tempo de agitação nos cristais da lactose: a) lactose padrão b) lactose recuperada com adição de 60 mL de etanol e tempo de agitação de 60 min c) lactose recuperada com adição de 40 mL de etanol e tempo de agitação de 10 min d) lactose recuperada com adição de 50 mL de etanol e tempo de agitação de 60 min sem agitação..... | 61 |
| Figura 24: Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio dos cristais da lactose em solução sintética durante a cristalização. | 62 |
| Figura 25: a) Imagem microscópica dos cristais de lactose com morfologia tomahawk obtida para 60 mL - 60 min b) esquemático da morfologia tomahawk (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2013) c) imagem microscópica dos cristais de lactose com morfologia semelhante a agulhas curtas e alongadas obtida para 40 mL - 10 min d) esquemático da morfologia de agulhas curtas e alongadas (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2013)..... | 65 |
| Figura 26: Diagrama esquemático do processo integrado de recuperação da lactose do leite. 67 | |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Concentração média de lactose em diferentes mamíferos. | 6 |
| Tabela 2: Propriedades físicas da lactose..... | 7 |
| Tabela 3: Quantidade de lactose (kg) importada no período de 2011 a 2016. | 9 |
| Tabela 4: Principais características adsorção física e adsorção química. | 16 |
| Tabela 5: Solventes utilizados na dessorção em pims de contaminantes do leite. | 22 |
| Tabela 6: Efeito dos parâmetros no processo de cristalização da lactose. | 23 |
| Tabela 7: Matriz codificada e decodificada do planejamento composto central rotacional para estudar a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM..... | 32 |
| Tabela 8: Matriz codificada e descodificada de planejamento fatorial completo 2^2 para estudar a capacidade de recuperação da lactose em solução sintética por cristalização..... | 33 |
| Tabela 9: Parâmetros ajustados pelos modelos de Adams-bohart, Thomas e Yan para a adsorção de lactose em coluna de leito fixo, para as condições de 9 mL/min; 12,5 cm e 34 °C. | 41 |
| Tabela 10: Matriz codificada e descodificada do planejamento composto central rotacional para estudar a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM..... | 43 |
| Tabela 11: Parâmetros ajustados pelos modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan para a dessorção de lactose do leite em coluna de leito fixo, para as condições de 9, 3 e 6 mL/min; 12,5 cm, $C_0 = 22249$ mg/l e 34 °C. | 47 |
| Tabela 12: Resultados das análises físico-químicas do leite e da lactose..... | 52 |
| Tabela 13: Principais grupos funcionais e comprimentos de ondas encontrados para a caseína e a lactose recuperada..... | 54 |
| Tabela 14: Avaliação microbiológica do leite e da lactose recuperada. | 55 |
| Tabela 15: matriz decodificada de planejamento experimental 2^2 para estudar a recuperação de lactose em solução sintética através do processo de cristalização..... | 56 |
| Tabela 16: Análise da variância para o ajuste do modelo linear de recuperação da lactose. | 57 |
| Tabela 17: Influência do volume de etanol e tempo de agitação no diâmetro dos cristais da lactose recuperada..... | 62 |
| Tabela 18: Influência do volume de etanol e tempo de agitação no diâmetro dos cristais da lactose recuperada em solução sintética e no leite..... | 63 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 19: Aplicação dos cristais de lactose na indústria farmacêutica em função do diâmetro médio..... | 64 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g/L}$ - Micrograma/litro
 $\mu\text{g/mL}$ - Micrograma/mililitro
 μm - Micrômetro
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA - Análise de Variância
BET - Brunauer-Emmett-Teller
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm - Centímetros
 C_0 - Concentração inicial
DTA - Análise térmica diferencial
FDA - *Food and Drug Administration*
FOB - *Free On Board*
FTIR - Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
HCl - Ácido clorídrico
ITP - Instituto de Tecnologia e Pesquisa
KBr - Brometo de Potássio
KOH - Hidróxido de Potássio
LPA - Laboratório de Tecnologia e Pesquisa
LST - Lauril Sulfato Triptose
 m^2/g - Metro ao quadrado/grama
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
 mL/g - Mililitro/grama
MP - Matriz Pura
NF - Nanofiltração
nm - Nanômetros
NMP - Número Mais Provável
pH - Potencial Hidrogeniônico
PIM - Polímero Impresso Molecularmente
PIM - Controle- Polímero impresso molecularmente não utilizado em ciclos de adsorção/dessorção
PIM-C1- Polímero impresso molecularmente utilizado durante um ciclo adsorção/dessorção
PIM-C5- Polímero impresso molecularmente utilizado durante cinco ciclos adsorção/dessorção
Q - Vazão
 q_0 - Capacidade de adsorção
rpm - Rotação por minuto
Si - Silício
SISCOMEX- Sistema Integrado de Comércio Exterior
T (°C) - Temperatura
TEOS - Tetraetilortossilicato
TGA - Análise termogravimétrica

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um grande potencial na produção de leite bovino, a qual está presente em todas as regiões, estados e municípios do país, tornando-se uma das principais características que o diferencia de outros países (GABBI *et al.*, 2013; IBGE, 2017). Esse potencial pode ser justificado, pelo fato do leite e seus derivados apresentarem um alto valor nutricional, tornando-se alimentos recomendados habitualmente, devido aos benefícios causados no organismo (PEREIRA, 2014).

O leite pode ser caracterizado como um fluido viscoso, cor branca, odor suave e sabor levemente adocicado, oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias (FOX *et al.*, 2015a; BRASIL, 2017). Seus principais constituintes são: a água, a lactose, gordura, proteínas e minerais (MATIGNON *et al.*, 2015).

Dentre estes constituintes, a lactose tem se destacado como um produto de grande interesse comercial, em virtude de suas aplicações na indústria de alimentos; fabricação de diversos produtos: pães, sorvetes e farinha, na indústria farmacêutica; como excipientes ou diluentes de medicamentos e na indústria de cosméticos; como emoliente na fabricação de batons e cremes (PATEL e MURTHY, 2012; KNÖÖS *et al.*, 2014; FOX *et al.*, 2015b).

Atualmente o sistema de produção de lactose no Brasil, consta apenas de uma única fábrica, Nutrifont do grupo Lactalis, instalada na cidade de Três de Maio no Rio Grande do Sul. A lactose produzida pela Nutrifont, possui grau alimentício e é obtida do permeado do soro do leite através de tecnologias de cristalização e *spray dryer*. Apesar disso, boa parte da lactose utilizada no país é importada, proveniente de outros países como a Alemanha, China, Estados Unidos e Holanda. De acordo com os dados do Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX), o Brasil importou no período de 2011 a 2016 aproximadamente 113.000 toneladas de lactose, em sua forma pura ou em outras formas, como por exemplo, a de xarope, o que corresponde a um montante de 207.407.221 (U\$\$-FOB).

A outra configuração utilizada para a produção da lactose é a tecnologia de separação por membranas. Esta técnica consiste na separação dos constituintes presentes no soro do leite ou no retentado, com base em tamanhos moleculares e depende das características de retenção de cada membrana. Embora o processo de separação de membrana produza alta recuperação de lactose, esses processos tornam-se na maioria das vezes não econômicos e viáveis, devido aos elevados custos com as membranas e as altas pressões de operação (SOUZA *et al.*, 2010; PATEL e MURTHY, 2012).

Uma técnica que tem se apresentado como uma alternativa é a técnica de separação por adsorção, pelo fato de ser bastante eficaz na remoção de espécies em soluções líquidas, por apresentar baixo custo e pouca quantidade de energia empregada no processo (ZHANG *et al.*, 2012). A eficiência desta técnica está associada a vários fatores, dentre eles a natureza do adsorvente, este por sua vez pode ter sua seletividade pré-determinada a partir do uso de técnicas específicas, por exemplo, a técnica por impressão molecular (FERRARO *et al.*, 2013).

A técnica de impressão molecular é uma aproximação sintética entre a natureza do adsorvato e do adsorvente a fim de realizar o reconhecimento da molécula de interesse. A obtenção do polímero impresso molecularmente (PIM) ocorre por meio da polimerização da molécula molde que é retirada da matriz deixando na sua estrutura informações a respeito da forma e tamanho para a molécula-alvo. O polímero impresso molecularmente (PIM) pode ser usado como adsorvente, com seletividade pré-determinada para uma dada substância ou grupo de análogos estruturais, utilizados em extração de fase sólida para a separação ou limpeza do composto alvo em baixas concentrações ou em matrizes complexas (SOARES *et al.*, 2007; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A principal vantagem que os PIMs possuem sobre materiais convencionais de extração em fase sólida é a sua especificidade em nível molecular. Os mecanismos de retenção de muitos dos materiais comumente empregados na extração da fase sólida são baseados em interações hidrofóbicas.

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo avaliaram a cinética de adsorção do PIM e da matriz pura (MP) no processo de remoção da lactose do leite em fluxo contínuo, com a adsorção máxima de 62 mg de lactose do leite por grama de adsorvente PIM, mantendo as principais propriedades do leite (BALIEIRO *et al.*, 2016). Contudo, na literatura ainda não foi avaliada a integração dos processos de adsorção, dessorção e cristalização da lactose do leite. Por meio do estudo integrado utilizando a técnica de impressão molecular, cuja sua principal característica é a especificidade da biomolécula.

Portanto, a técnica de impressão molecular utilizada na etapa de extração da lactose, proporciona um ambiente mais amigável com temperatura próxima á do ambiente local, de uma forma que possa minimizar a desnaturação das proteínas e a mudança das propriedades sensoriais dos produtos.

Os adsorventes obtidos a partir da técnica de impressão molécula são bastante seletivos quando comparados com outros adsorventes. Além da seletividade, os PIMs possuem muitas

características e propriedades promissoras, baixo custo, síntese fácil, alta estabilidade para condições químicas e físicas severas, e excelente reutilização (NEZHADALI *et al.*, 2017).

Com o intuito de satisfazer a demanda criada por parte da população intolerante a lactose e através da possibilidade de utilização dessa biomolécula em várias aplicações industriais, o uso de um sistema integrado de recuperação de lactose do leite baseado nos processos de adsorção (etapa de remoção da lactose), dessorção e cristalização (etapas de recuperação da lactose), tem se mostrado promissor, em virtude da facilidade de implementação, baixa quantidade de energia empregada e a possibilidade de ampliação de escala.

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a recuperação e cristalização de lactose de partículas adsorventes obtidas pela técnica de impressão molecular utilizada como recheio de colunas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo recuperar e cristalizar a lactose de partículas adsorventes obtidas pela a técnica de impressão molecular aplicadas em recheios de colunas.

2.2 Objetivos Específicos

De forma geral os objetivos específicos serão:

- Obter as curvas de ruptura, o tempo de equilíbrio e ajuste matemático dos modelos de adsorção e dessorção da lactose do leite em coluna de leito fixo;
- Avaliar as condições de recuperação da lactose após a eluição da lactose da solução multicomponente do leito adsorvente;
- Avaliar o tipo de técnica de precipitação da lactose para solução sintética e para solução multicomponente do leito adsorvente;
- Estudar o comportamento morfológico e físico-químico da lactose precipitada;
- Determinar a composição físico-química e as análises microbiológicas do leite e da lactose obtidos;
- Avaliar o potencial de reuso do adsorvente em diversos ciclos de adsorção/dessorção em sistema contínuo.
- Propor um sistema integrado para a obtenção de lactose do leite a partir das técnicas de adsorção e cristalização.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo foi dividido em tópicos. Nos primeiros tópicos, apresenta-se uma revisão sobre leite e lactose. Os demais tópicos abordam impressão molecular, as técnicas de remoção da lactose, sistema integrado e por fim a busca de anterioridade abordando as principais patentes relacionadas á recuperação de lactose.

3.1 Leite

O Brasil possui uma grande capacidade de produção de leite bovino, a qual está presente em todas as regiões do país, tornando-se uma das principais características que o diferencia de outros países (GABBI *et al.*, 2013; IBGE, 2017). Esse potencial pode ser justificado, pelo fato do leite e seus derivados apresentarem um alto valor nutricional, tornando-se alimentos recomendados habitualmente devido aos benefícios originados no organismo (PEREIRA, 2014).

O leite pode ser definido como um fluido viscoso, cor branca, odor suave e sabor levemente adocicado, oriundo da secreção de glândulas mamárias das fêmeas, a partir da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias (FOX *et al.*, 2015a; BRASIL, 2017). Seus principais constituintes são: a água, a lactose, gordura, proteínas e minerais (MATIGNON *et al.*, 2015). Sua composição pode variar consideravelmente dada a influência de fatores genéticos (e não apenas em espécie, mas também de raça), fatores fisiológicos (estágio de lactação, intervalo de ordenha), fatores nutricionais (composição da alimentação) e das condições ambientais (local e época do ano) (CLAEYS *et al.*, 2014).

Apesar da possibilidade de exploração de várias espécies de animais destinadas a produção leiteira, o leite bovino é o tipo mais consumido no Brasil, dominando também o consumo global (CLAEYS *et al.*, 2014). Essa produção tem se estendido a todas regiões brasileiras em virtude das condições territoriais e climáticas propícias, destacando-se como uma importante atividade econômica e social, no Nordeste e em Sergipe.

Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o setor lácteo exerce um importante papel para a economia brasileira. Analisando o crescimento da produção de leite no período de 2016 a 2017 no Brasil, é possível verificar de acordo com os dados do IBGE que este vem se intensificando nos últimos anos. Nesse período, a produção cresceu 4,1 % passando de 23,17 bilhões, em 2016, para 24,12 bilhões de litros de leite em 2017. Em Sergipe a produção de leite é oriunda, principalmente da agricultura familiar e a produção está estimada em 157

milhões de litros por ano, colocando o estado na quarta posição entre os maiores produtores do Nordeste (IBGE, 2017).

Mesmo com todos os benefícios causados pelos nutrientes presentes no leite e do potencial da sua produção, o Brasil ocupa a posição de quinto lugar em termos de produção no ranking mundial segundo a *USDA, 2016 (United States Department of Agriculture)* com um consumo médio anual por habitante de 170 litros (IBGE, 2015). O motivo para o não consumo do leite por muitos indivíduos decorre muitas vezes de restrições ao consumo de lactose e proteínas (SANTONOCITO *et al.*, 2015).

3.2 Lactose

A lactose pode ser definida como um dissacarídeo encontrado no leite e produtos lácteos, constituindo-se como a principal fonte de carboidrato sintetizada nas células das glândulas mamárias (CAMPOS *et al.*, 2014). A concentração desta biomolécula pode variar de acordo com as características de cada mamífero, apresentando maior valor para o leite humano, de égua e de mula e menor para vaca e outros ruminantes, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Concentração média de lactose em diferentes mamíferos.

| | Humano | Égua | Mula | Vaca | Ovelha | Cabra | Búfala |
|---------------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|
| Lactose (g/L) | 63-70 | 56-72 | 58-64 | 44-56 | 41-59 | 32-50 | 32-49 |

Fonte: Adaptado de (CLAEYS *et al.*, 2014)

Conforme mostra a Figura 1, a lactose apresenta estrutura química composta de uma molécula de glicose e galactose unidas por uma ligação glicosídica (TOMAR, 2014). Essa estrutura possui duas formas isômeras: α e β lactose, as quais diferenciam com base na Figura 2, em relação à posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2014).

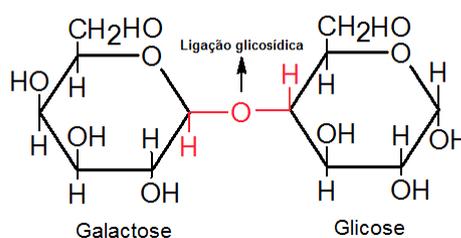


Figura 1: Estrutura química da lactose.

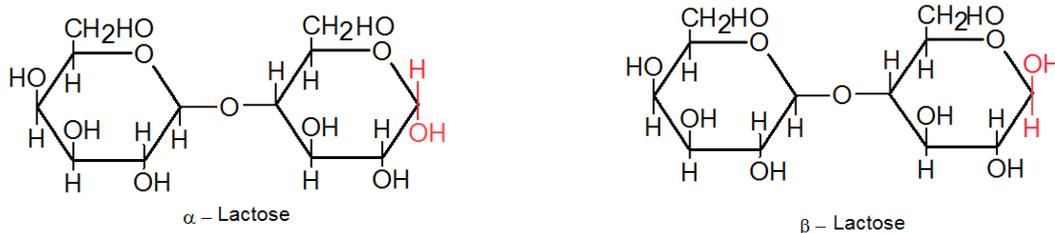


Figura 2: Formas isômeras da lactose.

Uma propriedade importante da lactose é a mudança rotacional e a transformação em solução de uma forma na outra (α em β e vice-versa) denominada mutarotação (HUPPERTZ e GAZI, 2016). A mutarotação está diretamente relacionada às propriedades distintas dos isômeros α e β lactose descritas na Tabela 2 e possui uma taxa de transformação influenciada pela temperatura e pH (HUPPERTZ e GAZI, 2016).

Tabela 2: Propriedades físicas da lactose

| | Isômeros | |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|
| | α lactose | β lactose |
| Rotação específica | + 89° | + 35° |
| Temperatura de fusão | 202 °C | 252 °C |
| Composição de equilíbrio | 37 % | 63 % |
| Cristalização em soluções saturadas | | |
| Acima de 93 °C | - | β anidra |
| Abaixo de 93 °C | α hidratada | - |

Fonte: (FOX *et al.*, 2015b)

Outro aspecto que é fortemente afetado pelos diferentes isômeros da lactose é a solubilidade. A α e β -lactose são solúveis em água na proporção de 70 e 500 g/L, respectivamente, a uma temperatura de 20 °C. Em equilíbrio, a proporção de α : β é cerca de 37:63, resultando numa solubilidade total de cerca de 180 g/L a 20 °C (FOX *et al.*, 2015b).

A solubilidade da α -lactose sofre mais influência da temperatura do que o anômero β -lactose e é mais solúvel a temperaturas acima de 93,5 °C. Assim, α -lactose é a forma de lactose que cristaliza com temperaturas abaixo de 93,5 °C, além de ser a forma comercial usual de lactose; já β -lactose pode ser preparada por cristalização com temperaturas acima de 93,5 °C (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2014).

A lactose é um ingrediente amplamente utilizado na fabricação de diversos produtos, como: pães e recheios, sorvetes, farinhas, alimentos enlatados e produtos lácteos (queijo, iogurte). Devido suas propriedades físico-químicas, influi na textura, na cor e na quantidade de água ligada desses produtos. Em produtos lácteos, a lactose é um componente essencial na fabricação de produtos fermentados, influenciando na textura de certos produtos concentrados e congelados (FOX *et al.*, 2015b).

Na indústria farmacêutica a lactose pode ser utilizada como excipiente, por apresentar características específicas de compatibilidade físico-química, fluidez e a habilidade de gerar misturas uniformes (HUANG *et al.*, 2013). Estudos realizados por HUANG *et al.* (2013) avaliaram diferentes marcas de lactose mono-hidratada atuando como excipientes na formulação do antipsicótico paliperidona. Os resultados obtidos mostraram que as diferentes marcas de lactose apresentaram resultados semelhantes quanto à fluidez e que ao serem utilizadas através do método de compressão direta não houve a necessidade de adicionar outros excipientes.

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 2017), a Agência Norte Americana Regulamentadora de Alimentos e Medicamentos, a lactose é único produto autorizado na composição de carreador de pó seco na inalação por possuir uma baixa toxicidade (PILCE *et al.*, 2012). WU *et al.* (2014) avaliaram a eficiência da técnica de secagem por *spray* na lactose utilizada como carreador de pó seco na inalação. Os resultados permitiram observar que o uso da lactose permitiu o aumento da estabilidade dos fármacos e sugerem que a técnica de secagem possa ser utilizada na preparação do carreador, desde que exista um controle de umidade abaixo de 30 % no medicamento.

Nos últimos seis anos, estudos vêm sendo desenvolvidos em relação a aplicação da lactose na produção do ácido lactobiônico que por sua vez possui várias aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e química (PEDRUZZI *et al.*, 2011; KIRYU *et al.*, 2012; GUTIÉRREZ *et al.*, 2012). O ácido lactobiônico pode ser produzido através do processo de oxidação da lactose e tem despertado interesse devido a sua capacidade antioxidante, quelante, umectante e propriedades emulsificantes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2012).

Além dessas aplicações a lactose tem se mostrado como um importante substrato no processo de fermentação para a produção de etanol (TOMASZEWSKA e BIAŁOŃCZYK, 2013). Todas essas aplicações têm contribuído para o interesse na recuperação desta biomolécula.

Atualmente o mercado brasileiro possui apenas uma única fábrica (Nutrifont) voltada para a produção de lactose com grau alimentício. Segundo o Sistema Integrado do Comércio

Exterior (SISCOMEX) essa produção não tem sido suficiente para atender a demanda existente, em virtude de que grande parte da lactose utilizada no país é importada, proveniente de outros países como a Alemanha, China, Estados Unidos e Holanda.

De acordo com os dados da Tabela 3, obtidos através do SISCOMEX, o Brasil importou no período de 2011 a 2016 aproximadamente 113.000 toneladas de lactose, em sua forma pura ou em outras formas, como por exemplo, a de xarope, o que corresponde a um montante de 207.407.221 (US\$-FOB).

Tabela 3: Quantidade de lactose (Kg) importada no período de 2011 a 2016.

| | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lactose pura | 7.123 | 6.299 | 6.920 | 6.744 | 6.322 | 6.589 |
| Outras formas | 13.997 | 21.107 | 14.868 | 8.446 | 7.479 | 7.455 |
| Total | 21.120 | 27.406 | 21.788 | 15.190 | 13.801 | 14.044 |

Fonte: (SISCOMEX, 2017).

A literatura relata diferentes técnicas de remoção e recuperação de biomoléculas, dentre essas tecnologia, a técnicas de impressão molecular tem se mostrado promissora em relação a remoção e o reaproveitamento dessas biomoléculas em diferentes aplicações.

3.3 Impressão Molecular

A impressão molecular é uma técnica que prepara os polímeros sintéticos com sítios de reconhecimento específicos para a molécula alvo. Esta técnica utiliza moléculas molde (o analíto de interesse) para montar seus próprios locais de reconhecimento interagindo com os grupos funcionais complementares de monômeros apropriados (CHENG *et al.*, 2014; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A capacidade desses polímeros de reconhecer seletivamente moléculas do ponto de vista biológico tem despertado o interesse de aplicação em várias áreas, como a separação cromatográfica, extração de fase sólida, diagnósticos médicos e biosensores (KIRA KOTOVA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014a).

Durante a impressão molecular, as moléculas selecionadas dos moldes estabelecem interações obrigatórias com monômeros funcionais em um solvente. O polímero impresso molecularmente (PIM) pode ser usado como adsorvente com seletividade pré-determinada para uma dada substância, ou grupo de análogos estruturais, utilizados em extração de fase

sólida para a separação ou limpeza do composto alvo em baixas concentrações ou em matrizes complexas (CLAUSEN *et al.*, 2014; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A obtenção dos PIMs ou polímeros impresso molecularmente ocorre por meio da polimerização de uma molécula molde a ser impressa (o analíto de interesse). Na impressão molecular não covalente, o molde interage com um monômero funcional por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas ou interações hidrofóbicas (SONG *et al.*, 2014; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A Figura 3 representa o processo de obtenção de um polímero impresso molecularmente descrito por (BALIEIRO *et al.*, 2016) para retenção da molécula molde lactose e a remoção desta para a produção do molde e subsequente utilização.

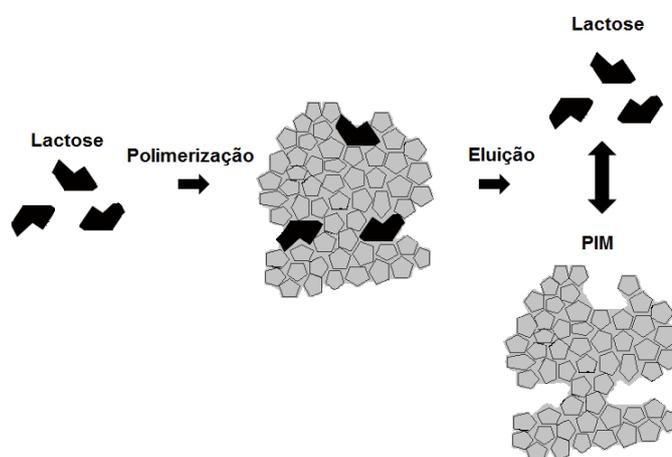


Figura 3: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular.

Além da sua especificidade em nível molecular, os PIMs possuem outras vantagens como a relativa facilidade e baixo custo de preparação, alta estabilidade física, robustez e resistência a níveis elevados de temperatura e pressão e aplicação potencial para uma vasta gama de moléculas alvo (SONG *et al.*, 2014). Essas vantagens abriram as perspectivas para que (BALIEIRO *et al.*, 2016), estudassem o uso da técnica de impressão molecular para remoção de lactose no leite.

3.4 Técnicas de remoção da lactose

As novas tecnologias voltadas para o desenvolvimento de produtos lácteos com baixo teor de lactose tem impulsionado a indústria. Dentre elas destacam-se o métodos de separação por hidrólise, separação por membrana, cromatografia e adsorção (HARJU *et al.*, 2012; BALIEIRO *et al.*, 2016).

Dois métodos podem ser citados como principais na hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático. Na hidrólise ácida, a reação é muito rápida, em que o ajuste de acidez é feito através da adição de ácidos fortes como o sulfúrico e clorídrico, e condições severas de pH e temperatura ($1,0 < \text{pH} < 2,0$; $100 < \text{temperatura} < 150$ °C). Essas condições restringem sua aplicação comercial na indústria, pois acarreta alterações no sabor, na cor e toxicidade do leite (HARJU *et al.*, 2012).

Já o método enzimático, a hidrólise é catalisada pela β galactosidase e se processa em condições operacionais 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 (FAEDO *et al.*, 2013). Nele a enzima β galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação β (1-4) da lactose, dando origem aos seus monômeros glicose e galactose (MORLOCK *et al.*, 2014).

Estudos realizados por ANSARI e HUSAIN, (2012) imobilizaram a β -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. FISCHER *et al.* (2013) avaliaram a hidrólise da lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em resina de troca iônica Duolite A 568 usando dois reatores de leito fixo em série e obtiveram uma conversão de 82 %.

Apesar da hidrólise enzimática se apresentar como um método mais vantajoso em relação à hidrólise ácida para a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados, seu emprego pode ocasionar modificações nas propriedades reológicas dos produtos, pois aumentam sua doçura, diminui a viscosidade, e provocam alterações do sabor e cor (ABBASI e SAEEDABADIAN, 2013).

Uma nova alternativa para redução do teor de lactose é a filtração por membranas, rotineiramente utilizada para inúmeras aplicações na indústria de laticínios. Dentre as alternativas da filtração por membranas, destaca-se a nanofiltração, que é um processo de filtração entre ultrafiltração e a osmose reversa que proporciona separações altamente específicas de componentes com baixo peso molecular (FAEDO *et al.*, 2013).

Um dos fatores que diferenciam os tipos de membranas mais comuns nos processos de separação é a aplicação da pressão hidráulica como a força motriz para transporte de massa. No entanto, a natureza da membrana controla quais os elementos que permeiam e quais serão mantidos, uma vez que eles são seletivamente separados de acordo com a massa molar ou tamanho de partículas. A microfiltração utiliza pressões inferiores a 2 bar e separa as moléculas com tamanhos entre 0,025 e 10 μm , já a ultrafiltração utiliza pressões superiores a

1 bar e separa as partículas com massa molar entre 1 e 300 kDa, e a nanofiltração usa pressões entre 1 e 4 bar e separa as partículas com massa molar entre 350 e 1000 Da, enquanto osmose reversa utiliza pressões entre 4 e 10 bar e concentra-se partículas com massas molares inferiores a 350 Da (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Quando comparados aos diversos processos de separação convencionais usados industrialmente, os processos de separação por membranas (PSM) se destacam devido à operação ocorrer à temperatura ambiente, podendo ser aplicados no fracionamento de substâncias termolábeis, além da facilidade de ampliação de escala e a possibilidade de interagir com outros processos clássicos de separação (SANTOS *et al.*, 2014).

Estudos realizados no processo de remoção da lactose tem avaliado a eficiência da técnica de separação por membranas integrada com outras técnicas de separação. SOUZA *et al.* (2010) investigaram quatro processos integrados, incorporando microfiltração, ultrafiltração, troca iônica, osmose reversa, para a separação e purificação de lactose de soro do queijo. Os resultados obtidos demonstraram que o processo de microfiltração (tamanho nominal do poro 0,2 μm), ultrafiltração (UF) (peso molecular 5 kDa), troca iônica e osmose reversa, resultou numa lactose com um grau de pureza de 99,8 % e uma recuperação de 74 %. FAEDO *et al.* (2013) avaliaram um processo híbrido combinando ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e hidrólise enzimática usando a β -galactosidase para a obtenção de leite pasteurizado com reduzido teor de lactose. O produto final obtido apresentou uma redução de lactose de 93 % em relação ao teor inicial.

Nestes estudos, apesar da preservação das propriedades reológicas do leite durante o processo de remoção da lactose, a técnica de separação por membrana tem apresentado alguns problemas em relação a sua seletividade, devido ao fato de acabar retendo biomoléculas menores que a lactose, como o caso das proteínas e glóbulos de gorduras, ocasionando perdas nutricionais no leite (HARJU *et al.*, 2012).

Uma técnica que tem se apresentado como uma opção a essa falta de seletividade é a técnica de separação por cromatografia. Esse método além de apresentar uma alta seletividade, possui como vantagens a reprodutibilidade, facilidade de ampliação de escala e condições de operações brandas (SANTOS *et al.*, 2012).

A separação cromatográfica de misturas de diferentes compostos é baseada na sua distribuição entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A tecnologia baseia-se no fato que moléculas com características físicas e químicas diferentes interagem de forma distinta com a fase estacionária (coluna) quando são dissolvidas em uma fase móvel (geralmente um

solvente ou de um gás). Essas interações resultaram em uma retenção diferencial na fase estacionária e, por conseguinte, conduzem à separação (WOONTON *et al.*, 2013).

O processo de separação da lactose no leite por métodos cromatográficos ocorre com base nas diferenças de velocidades de fluxo de diferentes componentes do líquido a ser tratado ao fluir através de uma coluna geralmente de resina. O leito preenchido de resina é composto de partículas porosas de resina que apresentam grupos funcionais com os quais os componentes a serem separados interagem de forma distinta. Essas interações se devem ao fato desses grupos apresentarem afinidades diferentes em relação à resina, permitindo que o eluato seja dividido em frações com a composição desejada, acarretando assim a separação dos componentes um do outro (HARJU *et al.*, 2012).

A resina mais utilizada para separar a lactose com elevada eficiência a partir do leite e soro de leite é resina baseada no princípio de troca catiônica (HARJU *et al.*, 2012). Neste processo a separação é baseada nos diferentes tamanhos de íons e nos 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. No entanto, íons de cálcio do leite podem se ligar à resina, o que acarreta à destruição das micelas de caseína, e desaparecimento da cor branca de leite. Além disso, se a resina estiver sob a forma de cálcio, a separação é insatisfatória e pode ocasionar a precipitação da proteína na coluna (HARJU, *et al.*, 2012).

Além dos problemas citados anteriormente, a redução do teor lactose por tecnologias de membrana ou processos cromatográficos têm enfrentado 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 após a hidrólise da lactose, o valor crioscópico continua menor. De acordo com a Instrução Normativa nº 62/2011 (BRASIL, 2011), o índice crioscópico máximo permitido é $-0,530\text{ }^{\circ}\text{H}$ ($-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esse problema tem levado as autoridades de saúde a considerarem a redução dos valores crioscópicos como adulteração no leite.

Estudos recentes têm demonstrado a viabilidade de capacidade de reconhecimento molecular de polímeros impressos molecularmente (PIMs) no processo, tais como a adsorção de biomoléculas (LI *et al.*, 2014b; ESCOBAR e SANTOS, 2014; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A técnica de impressão molecular é uma aproximação sintética entre a natureza do adsorvato e do adsorvente a fim de realizar o reconhecimento da molécula de interesse. A obtenção do polímero impresso molecularmente (PIM) ocorre por meio da polimerização da molécula molde que é retirada da matriz deixando na sua estrutura informações a respeito da

forma e tamanho para a molécula-alvo. Isso resulta na formação de sítios capazes de reconhecer e religar com a molécula-alvo com alta especificidade (CLAUSEN *et al.*, 2014).

A habilidade de reconhecimento molecular geralmente é avaliada em relação aos polímeros não-imprensos. BALIEIRO *et al.* (2016) verificaram a capacidade de adsorção do PIM em relação ao adsorvente MP (matriz pura) no processo de remoção da lactose do leite, obtendo uma remoção de 62 mg de lactose por g de adsorvente para o PIM e de 32 mg por g de lactose para a matriz pura MP. A influência das variáveis: granulometria, temperatura, vazão e altura do leito foram estudadas. Resultados mostraram que as variáveis altura do leito e granulometria não foram significativamente estatísticas, já as variáveis temperatura e vazão apresentaram uma relevância maior, sendo que a maior capacidade de adsorção de 62 mg de lactose por g de adsorvente ocorreu para maior altura (12,5 cm) e maior vazão (9 mL/min).

A partir desta perspectiva obtida através da técnica de impressão molecular no processo de remoção da lactose do leite, esse trabalho se propôs avaliar a combinação dessa técnica com outras técnicas de separação com o intuito de recuperar a lactose adsorvida para futuras aplicações industriais.

3.5 Sistema integrado

Nos últimos anos, as indústrias de laticínios e a literatura relatam a recuperação de lactose e proteínas do soro do leite a partir do uso da tecnologia de membranas ou da técnica cristalização (CHOLLANGI e HOSSAIN, 2007; CUARTAS-URIBE *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010). A tecnologia de membranas quando aplicada diretamente ao leite, reduz já seus índices crioscópicos, já a cristalização apresenta um baixo rendimento na recuperação, pelo fato de outros constituintes presentes no leite, impedirem a formação dos cristais (WONG e HARTEL, 2014).

Estudos realizados por BALIEIRO *et al.* (2016), abriram as perspectivas para que esse trabalho propusesse a integração das técnicas de adsorção e cristalização no processo de recuperação da lactose. O processo integrado de recuperação da lactose será abordado inicialmente através de suas etapas individuais sob o ponto de vista teórico, distribuído nos subtópicos (adsorção, dessorção e cristalização) e depois de maneira integrada sob a ótica experimental, tendo como caráter inovador a possibilidade de se obter dois subprodutos de interesse comercial, o leite de baixo teor de lactose e a biomolécula lactose.

3.5.1 Adsorção

A adsorção é um processo de separação no qual certos componentes de uma fase fluida (adsorvatos) migram seletivamente para a superfície de um sólido (adsorvente) (YAGUB *et al.*, 2014).

De acordo com EL-BINDARY *et al.* (2014), quando as moléculas de um fluido (adsorbato) entram em contato com um sólido (adsorvente), uma força de atração entre o sólido e as moléculas do fluido pode provocar sua fixação na superfície do sólido conforme Figura 4.

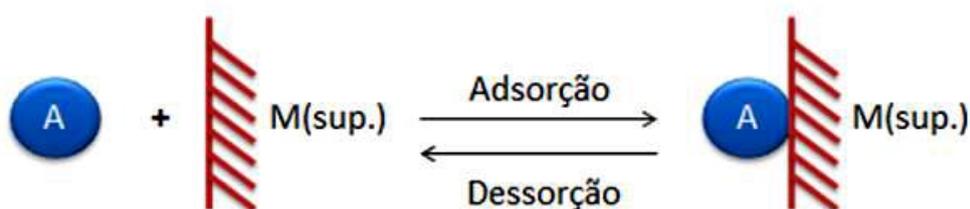


Figura 4: Representação esquemática do processo da adsorção e dessorção, onde (A) representa o adsorvato e [M(SUP.)] representa o adsorvente. (CHAVES, 2009).

A intensidade dessas forças depende da natureza do sólido, do tipo das moléculas adsorvidas e do tipo de interação (química ou física) entre adsorvente e adsorvato que classifica o processo de adsorção em dois tipos: adsorção química (quimissorção) e adsorção física (fisissorção) (LI *et al.*, 2013). Segundo RUTHVEN (1984), as principais diferenças entre os processos de quimissorção e fisissorção podem ser listadas conforme a Tabela 4

A fisissorção é um processo que pode ser caracterizado pela fraca interação das moléculas adsorvidas com a superfície do adsorvente, envolvendo principalmente interações intermoleculares, conhecidas como forças de Van der Waals. É um processo reversível, que ocorre na maioria das vezes em multicamadas (ABDOLALI *et al.*, 2014).

Na quimissorção ocorre uma interação química entre o sólido adsorvente e o soluto a ser adsorvido, o adsorvato, ou seja, ocorre transferência de elétrons entre as espécies. Esta ligação química gera a formação de uma monocamada sobre a superfície do adsorvente. A quimissorção é um processo irreversível, já que altera a natureza química do adsorvato (YAGUB *et al.*, 2014).

Tabela 4: Principais características adsorção física e adsorção química.

| Adsorção Física | Adsorção Química |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Baixo calor de adsorção | Calor de adsorção da ordem de entalpias da reação |
| Não específica | Altamente específica |
| Mono ou multicamadas | Somente multicamadas |
| As moléculas adsorvidas não sofrem dissociação | Pode ocorrer dissociação das moléculas |
| Ocorre a baixas temperaturas | Ocorre a altas temperaturas |
| Não precisa de ativação, é rápida e reversível | Precisa de ativação e pode ser irreversível |
| Não há transferência de elétrons, mas pode ocorrer a polarização do adsorvato. | Há a transferência de elétrons, levando a formação de ligação química. |

Fonte: Adaptado (RUTHVEN, 1984).

Fatores que influenciam adsorção

De acordo com FERRARO *et al.* (2013) o processo de adsorção depende de vários fatores, tais como:

- Estrutura molecular ou natureza do adsorvente (área superficial, distribuição dos poros, densidade, grupos funcionais presentes na superfície e hidrofobicidade do material).
- Natureza e a concentração do adsorvato (da polaridade, tamanho da molécula, solubilidade, acidez ou basicidade).
- Condições de adsorção (temperatura, pH, velocidade de agitação).

O estudo da natureza do adsorvente possui diversas alternativas como, por exemplo, o uso da técnica de impressão molecular para a modificação da superfície da sílica (SOARES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015; BALIEIRO *et al.*, 2016).

A técnica de impressão molecular é uma aproximação sintética entre a natureza do adsorvato e do adsorvente a fim de realizar o reconhecimento da molécula de interesse. A obtenção do polímero impresso molecularmente (PIM) ocorre por meio da polimerização da molécula molde que é retirada da matriz deixando na sua estrutura informações a respeito da

forma e tamanho para a molécula-alvo. Isso resulta na formação de sítios capazes de reconhecer e religar com a molécula-alvo com alta especificidade (CLAUSEN *et al.*, 2014).

Baseando-se na influência da natureza do adsorvato, deve-se considerar que para adsorver solutos específicos e assegurar uma separação satisfatória é necessário considerar a natureza química do adsorvente e do adsorvato.

A influência das condições operacionais nos estudos de adsorção utilizando soluções sintéticas e adsorventes obtidos pela técnica de impressão molecular foram realizados por (SOARES *et al.*, 2007) e (SANTOS, 2012) em regime em batelada. Estudos realizados pelo grupo (SOARES *et al.*, 2007), indicaram que a técnica de impressão molecular para o preparo do PIM obtido pela técnica sol-gel com a finalidade de remover colesterol de uma solução sintética em regime batelada atingiu o máximo de capacidade de adsorção no valor de 76,5 mg de colesterol por g de PIM.

SANTOS (2012) empregou a técnica de impressão molecular para avaliar a eficiência do PIM em relação à matriz pura (MP) no processo de remoção do colesterol de uma solução sintética, no tempo de 1 h, na temperatura de 25 °C em batelada. Os resultados obtidos mostraram que a capacidade de adsorção do adsorvente PIM foi de 238 mg de colesterol por g de adsorvente quando comparado com o MP que apresentou uma remoção menor de 227 mg de colesterol por g de adsorvente. Segundo o autor os PIMs obtidos apresentaram tamanho dos poros maiores neste adsorvente, possibilitando uma maior remoção de colesterol.

A partir desta perspectiva obtida pelo grupo, estudos recentes de (BALIEIRO *et al.*, 2016) avaliaram a cinética de adsorção do PIM e da matriz pura (MP) no processo de remoção da lactose do leite em fluxo contínuo, cujas condições operacionais mais eficientes foram 12,5 cm de altura do recheio do leito do adsorvente PIM e vazão 9 mL/min do leite percolado na coluna de adsorção. A adsorção máxima foi cerca de 62 mg de lactose por g de adsorvente PIM.

Cinética de adsorção

Estudos cinéticos de adsorção são realizados com o intuito de elucidar a interação adsorvente/adsorvato e de determinar parâmetros de equilíbrio. Esses estudos são necessários para o perfeito planejamento do emprego do adsorvente e para determinar as condições ótimas de operação, com o intuito de garantir a eficiência e minimizar o custo do processo (ANASTOPOULOS e KYZAS, 2014).

Durante o estudo a concentração do adsorvato que permanece na solução decresce ao longo do tempo até atingir um valor constante, momento em que não ocorre mais a remoção

do mesmo da solução. A partir desse ponto a quantidade adsorvida pelo adsorvente está em equilíbrio dinâmico com a quantidade que está desorvendo. O tempo necessário para atingir esta condição é chamado de tempo de equilíbrio (EL-SHEIKH *et al.*, 2013).

Uma maneira comumente utilizada para representar esse fenômeno é a construção gráfica da isoterma de equilíbrio conforme Figura 5, que consiste numa curva que relaciona a quantidade de adsorvato por unidade de adsorvente versus a concentração de equilíbrio do adsorvato na solução, a uma temperatura constante (KILIÇ *et al.*, 2013).

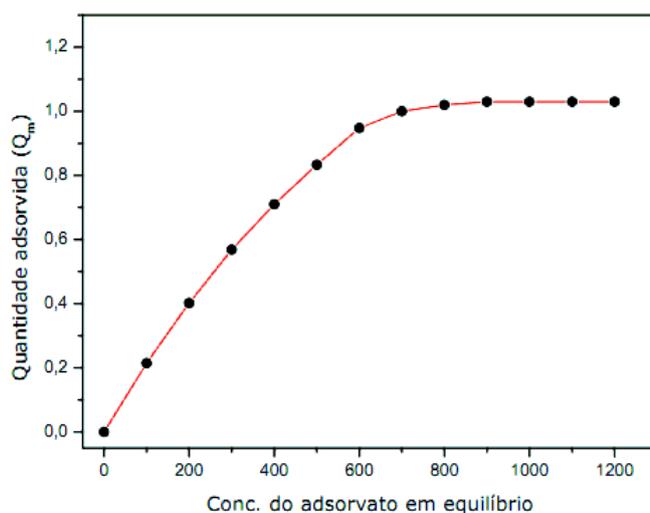


Figura 5: Isotherma de adsorção (CHAVES, 2009).

Isothermas de adsorção

Segundo ZHANG *et al.* (2012), isothermas de adsorção são muito importante para a otimização do sistema de adsorção e podem ser utilizadas para calcular a capacidade máxima de adsorção. Essas informações complementam os estudos cinéticos do processo, auxiliando a interpretação do mecanismo de interação entre adsorvente e adsorvato.

Muitas equações teóricas ou semi-empíricas foram desenvolvidas para interpretar ou prever as isothermas. Algumas formas mais comuns de isothermas serão apresentadas através dos modelos de Langmuir e Freundlich.

O modelo de adsorção proposto por Langmuir apesar de ser considerado um modelo ideal, pode ser usado para descrever vários processos. Ele considera o fenômeno de adsorção em superfície homogênea, com um número fixo de sítios livres disponíveis na superfície, e com a formação de uma camada superficial monomolecular. O modelo também considera que

as moléculas adsorvidas não sofrem interação como o meio e nem entre si (HADI *et al.*, 2015).

As curvas das isotermas de Langmuir são obtidas de acordo com as equações (1a) e (1b), nas formas normal e linearizada, respectivamente.

$$Q_e = \frac{Q_{\max} K_{\text{ads}} C_e}{1 + K_{\text{ads}} C_e} \quad (1a)$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{\max} K_{\text{ads}}} + \frac{C_e}{Q_{\max}} \quad (1b)$$

Em que:

Q_e = quantidade adsorvida no equilíbrio;

C_e = é a concentração em solução no equilíbrio;

Q_{\max} = quantidade máxima adsorvida;

K_{ads} = constante de adsorção;

Em alguns casos curvas referentes a esse modelo (C_e/Q_e versus C_e) apresentam o comportamento de uma equação de reta que será utilizada nos cálculos para obtenção dos valores de Q_{\max} e K_{ads} , a partir dos coeficientes linear e angular que estas retas apresentam.

O modelo de adsorção proposto por Freundlich foi um dos primeiros a equacionar a relação entre a quantidade de material adsorvido e a concentração do material na solução. Este considera adsorção em superfície heterogênea, com sítios com diferentes energias de adsorção e distribuição não uniforme (NJOKU *et al.*, 2014).

As equações (2a) e (2b) representam a forma linearizada e não linearizada deste modelo, respectivamente.

$$\log Q_e = \log K_{\text{ads}} + \frac{1}{n} \log C_e \quad (2a)$$

$$Q_e = K_{\text{ads}} C_e^{1/n} \quad (2b)$$

Em que:

n = representa a constante de adsorção determinada experimentalmente.

Modelagem de curvas de rupturas

O desempenho de uma coluna de leito fixo pode ser previsto através da abordagem de modelagem matemática das curvas de ruptura. A modelagem de dados disponíveis a partir de estudos de coluna facilita o potencial de ampliação de escala (SONG *et al.*, 2015).

Para o estudo da modelagem fenomenológica, muitas equações analíticas são usadas para descrever as curvas de ruptura em coluna de leito fixo. Entre os modelos usados, os modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan foram selecionados neste trabalho conforme as equações 3, 4 e 5.

Modelo Adams-Bohart

O modelo de Adams-Bohart descrito na equação 3, assume que a taxa de adsorção é proporcional à capacidade residual do adsorvente e a concentração das espécies adsorventes. No modelo ainda é considerado que a velocidade do fluido e a capacidade de retenção do leito são constantes ao longo da coluna (CRUZ-OLIVARES *et al.*, 2013).

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{N_0 \cdot K_{AB} \cdot Z}{v} - K_{AB} \cdot C_0 \cdot t\right)} \quad (3)$$

Onde: C é a concentração de lactose do leite (mg/L) no tempo t, C₀ é a concentração inicial (mg/L) de lactose no leite, N₀ é a capacidade de adsorção do leito (mg/L), K_{AB} é constante de Adams-Bohart (L/min.mg), Z é a altura do leito (cm), v é a taxa de fluxo linear (cm/min) e t é o tempo (min).

Modelo de Thomas

O modelo Thomas é um dos modelos amplamente utilizado para avaliar o desempenho de colunas de leito fixo. Esse modelo leva em consideração as seguintes aproximações: dispersão axial e radial desprezíveis na coluna e assume a cinética de Langmuir para adsorção (JANG *et al.*, 2016). A equação do modelo pode ser expressa pela equação 4.

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{K_{th} \cdot q_r \cdot m}{Q} - \frac{K_{th} \cdot C_0 \cdot V_r}{Q}\right)} \quad (4)$$

Onde: C é a concentração de lactose no leite (mg/L) no tempo t, C₀ é a concentração inicial de lactose no leite (mg/L), K_{th} é a constante de Thomas, (L/min.mg), q_t é a capacidade máxima de adsorção (mg/g), m é a massa do adsorvente (g), V_t é o volume de leite (L) no tempo t e Q é a vazão (L/min).

Modelo de Yan

O modelo desenvolvido por Yan minimiza o erro do modelo de Thomas, especialmente para tempos de operação curtos e longos (CHIAVOLA *et. al.*, 2012). O modelo de Yan é descrito pela equação 5.

$$\frac{C}{C_0} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{Q \cdot t}{b}\right)^a} \quad (5)$$

Onde: Q é a vazão mL/min, t é o tempo de operação da coluna (min), a é o parâmetro do modelo de Yan e b é definido pela equação 6.

$$b = \frac{q_{yan} \cdot m}{C_0} \quad (6)$$

3.5.2 Dessorção

Para que o processo de adsorção se torne cíclico, são necessárias no mínimo duas etapas: A adsorção e a dessorção (BILAL *et al.*, 2013). A dessorção tem como objetivos restaurar a capacidade de adsorção do adsorvente, assim como recuperar componentes retidos na fase adsorvida (DEVI e SAROHA, 2016).

Dentre os mecanismos utilizados nesta etapa destacam-se: dessorção térmica, química, física, microbiológica e extração por solventes (ROMÁN *et al.*, 2013). A eficiência e a escolha do mecanismo no processo de dessorção estão associadas ao tipo de interação entre adsorvente e adsorvato e as características do sistema (pH, temperatura e vazão) (ROMÁN *et al.*, 2013).

A literatura relata estudos de dessorção em polímeros impressos molecularmente (PIMs) de componentes interferentes no leite, oriundos do processo de contaminação durante o uso de embalagens ou resultante do uso de antibióticos em animais. Em todos os casos, o

mecanismo utilizado durante a dessorção é a extração com solventes, cujas variáveis analisadas e tipos de solventes são descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Solventes utilizados na dessorção em PIMs de contaminantes do leite.

| Contaminantes | Solventes | Variáveis | Referências |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Bisfenol A | Metanol | pH e Volume | XU <i>et al.</i> , 2011. |
| Estrogênio | Acetona | pH e tempo | DING <i>et al.</i> , 2011. |
| Cefalosporina | Metanol | Volume | QUESADA <i>et al.</i> , 2012. |
| Enrofloxacino | Acetonitrila e água | Volume | SUN <i>et al.</i> , 2012. |
| Oxitetraciclina | Metanol e água | Volume e concentração | LV <i>et al.</i> , 2012. |

Segundo SALVADOR *et al.* (2015), existem várias razões para utilizar o método de reuso por lavagem com solventes. É um método fácil e prático de implementar em um processo produtivo, não proporciona perda de massa e não causa danos a estrutura porosa e a natureza química do adsorvente, como ocorre nos métodos térmicos e químicos, respectivamente. Além disso, os solventes orgânicos podem ser recuperados, portanto foi a metodologia de reuso adotada no presente estudo.

3.5.3 Cristalização

A cristalização é a principal técnica de separação e purificação utilizada na indústria de laticínios para recuperar a lactose do soro do queijo (WONG e HARTEL, 2014). O processo de separação com base na formação dos cristais permite obter produtos com elevado grau de pureza, empregando baixa quantidade de energia no processo (CHABANON *et al.*, 2016).

De acordo com MEHTA e BATSTONE, (2013) a cristalização envolve duas fases: nucleação e crescimento dos cristais, ambas são impulsionadas pela supersaturação da solução e podem influenciar diretamente as características do produto, como tamanho, formato, rendimento e pureza dos cristais.

A primeira fase, comumente denominada nucleação, é responsável pelo surgimento dos cristais de tamanho-zero (núcleos) que aparecem como resultado da agregação de moléculas ou íons em uma solução supersaturada (WONG e HARTEL, 2014). Esta fase ainda pode ser subdividida em nucleação primária, iniciada em presença ou ausência de partículas em suspensão e nucleação secundária, que requer a iniciação da cristalização por intermédio de cristais de semente (LENKA e SARKAR, 2014).

A segunda fase é o crescimento de núcleos onde os grupos de moléculas ou íons são estáveis que crescem até atingir o tamanho e se tornam visíveis em tamanhos. O núcleo cresce até atingir o tamanho macro que é o cristal propriamente dito (CHANDRAPALA; WIJAYASINGHE; VASILJEVIC, 2016).

O crescimento de cristais é afetado por alguns parâmetros do processo e características da solução, incluindo supersaturação, temperatura, pH, agitação e número de cristais presentes na solução, conforme descrito na Tabela 6.

DINCER *et al.* (2014), avaliaram o efeito da supersaturação no processo de recuperação da lactose em solução aquosa, e observaram que o tempo de indução na formação dos cristais, diminuiu significativamente de (1800 para 100 min) com o aumento da concentração da lactose de (5 para 15 g por 100 g de água). Essa redução do tempo de indução está associada ao fato da supersaturação influenciar diretamente a nucleação homogênea (DINCER *et al.*, 2014).

Tabela 6: Efeito dos parâmetros no processo de cristalização da lactose.

| Parâmetros do Processo | Efeito |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Supersaturação | Aumento da taxa de crescimento com aumento da supersaturação. |
| Temperatura | Aumento da taxa de mutarotação com o aumento da temperatura. |
| pH | Alteração do equilíbrio durante a mutarotação devido as diferentes taxas de crescimento da α lactose. |
| Agitação | Distribuição da temperatura, transferência de calor e massa. |
| Número de cristais em solução | Aumenta o crescimento da taxa de dispersão, influenciando o crescimento de cristais pequenos. |

Fonte: (WONG e HARTEL, 2014).

A influência da temperatura no processo de mutarotação da lactose em solução aquosa foi estudado por JAWAD *et al.* (2014) que obtiveram diferentes tempos para obtenção do equilíbrio final (37 % α -lactose - 63% β -lactose), 26 h a 0 °C; 3 h a 25 °C; e 1 h e 22 min a 60 °C e concluíram que quanto maior a temperatura, mais rapidamente o equilíbrio final é estabelecido.

PATEL e MURTHY, (2011) investigaram a importância do pH e da agitação no processo de recuperação da lactose no soro do leite por cristalização. Resultados mostraram que houve um aumento de aproximadamente 3 % na recuperação da lactose com a redução do

pH de 5,5 para 2,5, provavelmente associado ao efeito de mutarotação que se mantém mínimo e constante entre pH 3 e 7. O mesmo efeito foi observado com o aumento da velocidade de agitação de 500 para 1000 rpm, em virtude que o aumento na agitação provoca o aumento da área de superfície onde a cristalização pode ocorrer.

3.6 Busca de anterioridade

Nesta seção são apresentadas a partir da busca de anterioridade, as principais patentes relacionadas a recuperação da lactose, as técnicas utilizadas ao longo do processo e o processo integrado proposto.

3.6.1 Patentes

A descrição técnica com busca de anterioridade de patentes relacionada ao processo de recuperação da lactose foi realizada. Nesta pesquisa foi observado que as patentes encontradas mencionam apenas o uso da tecnologia de membranas durante a etapa de remoção e a técnica de cristalização durante o processo de recuperação da lactose.

A patente WO 2014/ 14 1164 A1 utiliza o processo de remoção da lactose do leite e de derivados baseado nos processos de filtração, ultrafiltração e nanofiltração. Após a remoção de lipídios, proteínas e sais, utiliza-se o processo de cristalização baseado no arrefecimento (resfriamento) para a formação dos cristais.

A outra patente EP 2 617 727 A1 utiliza o processo de desmineralização do soro do leite e em seguida usa o processo de cristalização por arrefecimento para recuperar a lactose do soro desmineralizado.

Alternativamente, a patente GB200185 (A) descreve o processo de recuperação da lactose no soro usando a precipitação ácida da caseína antes do processo de cristalização por arrefecimento.

De acordo com as publicações, observa-se que o processo de remoção da lactose quando aplicado ao leite e seus derivados ocorre através da técnica de separação por membranas, ocasionando a retenção de outros constituintes do leite, resultando em perdas das propriedades sensoriais. Enquanto que a etapa de recuperação da lactose ocorre por intermédio do processo de cristalização por arrefecimento, após a precipitação na maioria das vezes de proteínas e sais. Essa técnica não é aplicada diretamente no leite pelo fato de que a presença de outros constituintes como proteínas e sais, que interferem no processo de cristalização da lactose.

Portanto, seria de grande utilidade e interesse industrial um processo que consiste em utilizar a técnica de adsorção baseada na impressão molecular para remover a lactose do leite e a cristalização a partir da adição de etanol para recuperar a lactose após a sua eluição das partículas adsorvente, de modo que a biomolécula de lactose obtida apresente poucas impurezas e que as propriedades sensoriais do leite estejam dentro os parâmetros exigidos pelos órgãos regulamentadores ou pela legislação vigente.

3.6.2 Técnicas de recuperação

BUND e PANDIT (2007a) estudaram a recuperação da lactose do soro do leite de búfala desproteinado através da técnica de cristalização. Neste estudo o etanol foi utilizado como anti-solvente sob agitação em solução para induzir o crescimento dos cristais, proporcionando uma recuperação de mais 90 % da lactose com grau de pureza entre 97 - 99 % para um tempo de agitação de uma hora e uma concentração de etanol de 85 % v/v. BUND e PANDIT (2007b) avaliaram o efeito do ultrassom em relação a agitação no processo de recuperação da lactose de uma solução sintética durante a fase nucleação. Nesse estudo foi utilizado o etanol como anti-solvente e as amostras sonicadas foram comparadas com as não sonicadas. Os resultados mostraram que foi possível obter uma maior recuperação cerca de 91,48% da lactose durante 5 min de sonicação, quando comparada com os 14,63 % da amostra que foi apenas agitada.

CUARTAS-URIBE *et al.* (2009) utilizaram a técnica de separação por membrana no processo de recuperação da lactose do soro obtido da produção de queijo, a partir da utilização de membranas de nanofiltração (NF) logo após as de ultrafiltração (UF). Essa configuração proporcionou uma recuperação de 80 % da lactose para uma pressão de 2,5 MPa.

A possibilidade de integração de mais de um tipo de membrana também foi analisada por SOUZA *et al.* (2010) que investigaram a eficiência de quatro processos integrados, incorporando microfiltração, ultrafiltração, troca iônica, osmose reversa, no processo de recuperação e purificação de lactose de soro do queijo. Os resultados obtidos demonstraram que o processo de microfiltração (tamanho nominal do poro 0,2 μm), ultrafiltração UF (peso molecular 5 kDa), troca iônica e osmose reversa, resultou numa lactose com um grau de pureza de 99,8 % e uma recuperação de 74 %.

PATEL e MURTHY (2011) usaram a acetona como anti-solvente no processo de recuperação de lactose por cristalização no soro parcialmente desproteinado. Os resultados mostraram que foi possível recuperar 90 % de lactose do soro depois de 1 h de agitação com

uma concentração de 85 % v/v de acetona e que o tamanho dos cristais foi afetado pelo tempo de cristalização.

O estudo da influência da proteína no processo de cristalização da lactose foi investigado por DAS e LANGRISH (2012) através de soluções sintéticas de lactose e caseínas nas proporções de 99,5:0,5 e 98:2 respectivamente. Nesta análise a presença da proteína com lactose aumentou o tempo de latência para nucleação por duas vezes o seu valor original em relação à lactose pura. Percebeu-se ainda que a solução com maior teor de proteína apresentou uma maior barreira de energia a ser superada para a formação dos cristais, sugerindo assim que a presença da proteína afeta o estágio de nucleação.

ZISU *et al.* (2014) verificaram a influência do ultrassom no processo de recuperação da lactose no soro concentrado em relação à cristalização e o tamanho dos cristais. Os resultados mostraram que a sonicação de soro iniciou a rápida formação de um grande número de cristais de lactose pelo fato da cavitação acústica aumentar a taxa de cristalização. Resultando em cristais menores do que agitação convencional proporcionando um maior controle da distribuição do tamanho do cristal. Resultados semelhantes foram encontrados por DINCER *et al.* (2014) que avaliaram o efeito da sonocristalização da lactose uma solução aquosa. De acordo com o que foi observado, apesar da sonicação influenciar a taxa de cristalização durante a etapa de nucleação, não ocorre nenhuma alteração na morfologia dos cristais.

Com base nos trabalhos publicados nos últimos 10 anos em relação à recuperação da lactose, foi observado que a técnica de recuperação da lactose por cristalização tem se mostrado bastante promissora. Apesar de alguns trabalhos utilizarem a técnica de separação por membranas no processo de recuperação da lactose, esse método tem enfrentado problemas em relação às perdas nutricionais do leite devido à falta de seletividade, o que acaba exigindo maior número de membranas. Baseando-se na revisão da literatura e na pesquisa de anterioridade que ainda não foram encontrados trabalhos que integrem a técnica de adsorção e cristalização no processo de remoção e recuperação da lactose, respectivamente.

3.6.3 Sistemas de produção de lactose

A produção industrial da lactose envolve essencialmente o soro do leite concentrado ou permeado proveniente da separação de membranas, cristalização da lactose do concentrado, recuperação dos cristais da lactose por centrifugação e secagem dos cristais (FOX *et al.*, 2015b). Essa biomolécula além de estar facilmente disponível como subproduto na indústria de laticínios, tem despertado o interesse comercial devido as suas propriedades específicas, tais como estabilidade física e química e baixa toxicidade (PILCER *et al.*, 2012).

O meio para obtenção da lactose a partir do soro do leite em sua maioria possui a etapa de precipitação da caseína por meio ácido, seguido das etapas de cristalização, centrifugação e secagem dos cristais. Neste método a precipitação do conteúdo proteico do soro ocorre em função da interferência das proteínas na formação dos cristais (WONG e HARTEL, 2014).

O processo de formação dos cristais, ocorre em função do estado de supersaturação da solução, que por sua vez depende das condições de temperatura, pH e da presença ou não de interferentes na solução. Esses interferentes dificultam a formação dos cristais e torna a cristalização um processo lento (WONG e HARTEL, 2014).

A outra configuração utilizada para a produção da lactose é a tecnologia de separação de membranas, combinadas com as etapas de centrifugação e secagem. Esta técnica consiste na separação dos constituintes presentes nos soro do leite ou no retentado, com base em tamanhos moleculares e depende das características de retenção de cada membrana. Neste contexto, os quatro principais processos de separação de membrana utilizados na indústria de laticínios são: microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR) (SOUZA *et al.*, 2010).

Embora o processo de separação de membrana produza alta recuperação de lactose, esses processos tornam-se não econômicos, uma vez que os processos de membrana envolvem capital elevado e recorrentes custos, devido à vida útil limitada da membrana e a altas pressões de operação (PATEL e MURTHY, 2012).

Os problemas apresentados por essas tecnologias, no que se refere a limitação da cristalização aplicada somente ao soro e aos altos custos provenientes dos vários tipos de membranas, contribuíram para a busca por novas tecnologias no processo de fabricação de lactose.

Essas perspectivas permitiram nosso grupo, avaliar a integração da técnica de impressão molecular no processo de remoção da lactose, seguida pelo o processo de cristalização usado para recuperar a biomolécula. A técnica de impressão molecular além da sua seletividade apresenta como principais vantagens: a pouca energia empregada no processo, as condições brandas de operação em relação a pressão e temperatura e a possibilidade de reutilização do adsorvente impresso molecularmente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção são apresentados os principais materiais e a metodologia utilizada neste trabalho durante a preparação de partículas adsorventes impressas molecularmente (PIM), adsorção da lactose do leite em regime batelada, adsorção e dessorção da lactose do leite em coluna de leito fixo com fluxo contínuo, estudo de reuso do adsorvente, a recuperação da lactose por cristalização em solução sintética e no leite, análise físico química e análise microbiológica do leite e da lactose recuperada e sistema integrado. Para uma melhor visualização na Figura 6 tem-se o esquema apresentando as etapas realizadas.

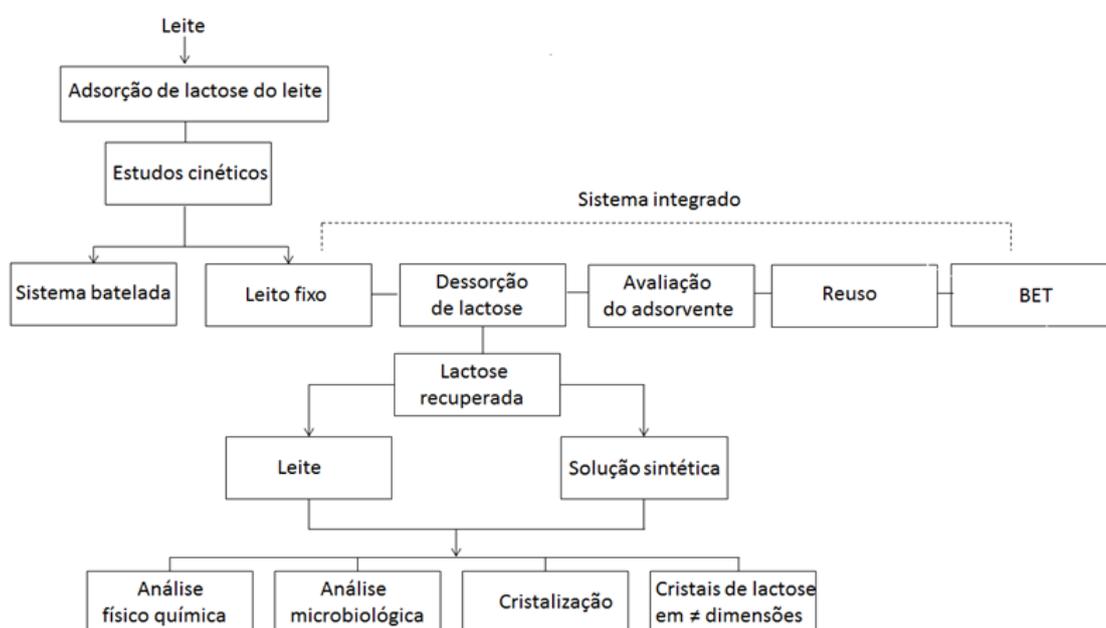


Figura 6: Esquema das etapas do estudo integrado para obtenção da lactose.

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%); ácido acético glacial (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 cru refrigerado bovino, 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 microrregião 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), onde ficaram sob congelamento (-20 °C) até o uso.

4.2 Metodologia experimental

Os procedimentos experimentais foram: a preparação dos sólidos adsorventes obtidos pela técnica sol-gel, teste em batelada para adsorção da lactose do leite; adsorção e dessorção da lactose do leite em coluna de leito fixo com fluxo contínuo, reuso do adsorvente e estudo de recuperação da lactose em solução sintética e no leite por cristalização.

4.2.1 Preparação do adsorvente

Neste trabalho o adsorvente impresso molecularmente com a solução de lactose (Polímero Impresso Molecularmente/PIM) foi preparado utilizando a técnica sol-gel, e com o precursor dos grupos silanóis, o Tetraetilortossilicato – TEOS. 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 impresso molecularmente fundamentou-se de acordo com o procedimento descrito por BALIEIRO *et al.*, (2016).

No preparo do adsorvente PIM, 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. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 1,0 g de lactose PA diluída em 10 ml de água ultrapura, seguida de 1 mL de hidróxido de amônia diluído em 6 mL de etanol (96%) (solução de hidrólise), a mistura foi mantida em repouso a 4 °C durante 18 horas para efetuar a policondensação. O gel obtido foi lavado com água ultrapura a 60 °C e seco à vácuo e temperatura ambiente por 24 h. A distribuição granulométrica do gel seco de PIM foi determinada por meio de separação utilizando conjunto de peneiras da série ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de forma manual obtendo partículas de tamanho de 60 mesh.

4.2.2 Avaliação da remoção da lactose do leite no processo em batelada do adsorvente PIM

Foram conduzidos experimentos preliminares com o objetivo de avaliar a influência da massa do adsorvente e o tempo de equilíbrio no processo de adsorção de lactose do leite.

Neste ensaio, foram transferidas 25 mL de leite volumetricamente para “erlenmeyers” de 125 mL contendo massas de 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 e 5,0 g do adsorvente PIM (polímero impresso molecularmente). A mistura foi então agitada através de um “shaker” (Tecnal) em velocidade constante de cerca de 200 rpm, durante 150 min a 35 °C. Transcorrido o tempo de contato do leite com adsorvente, alíquotas do sobrenadante foram retiradas e filtradas através de filtros Millipore com diâmetros de 0,45µm e o teor de lactose foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a construção das cinéticas, adicionou-se 2 e 4 g de adsorvente à 25mL de leite em “erlenmeyers” de 125 mL, estes foram agitados em “shaker” (Tecnal) a temperatura de 35 °C sob agitação de 200 rpm. Em intervalos regulares de tempo (5, 10, 15 e 30 min; 1, 2 e 3h), foram coletadas alíquotas para análise, até que o equilíbrio fosse atingido e a concentração da solução remanescente foi determinada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta eficiência.

4.3 Estudo do sistema integrado de recuperação de lactose do leite

Nesta fase, para a implementação do sistema integrado de recuperação de lactose, foram realizados ensaios de adsorção/dessorção em coluna de leito fixo e de cristalização em solução sintética, com o intuito de determinar as melhores condições experimentais para o processo integrado.

4.3.1 Adsorção e dessorção da lactose em coluna de leito fixo

A Figura 7 representa o diagrama da unidade experimental usada para estudar o processo de adsorção e dessorção da lactose em coluna de leito fixo recheada com partículas adsorventes impressas molecularmente. O sistema em fluxo contínuo foi constituído de uma coluna de vidro encamisada com diâmetro de 2,5 cm interno e 30 cm de altura e uma bomba peristáltica (Modelo BP-60) utilizada no controle da vazão.

Inicialmente a coluna foi preenchida manualmente com o polímero impresso molecularmente (PIM) com granulometria 60 mesh, até que a quantidade de adsorvente atingisse a altura de 12,5 cm (quantidade que representa a maior capacidade de adsorção da lactose determinada por BALIEIRO *et al.* (2016). Após o preenchimento, a etapa de adsorção foi iniciada com a abertura das válvulas 1 e 2. Durante essa fase, o leite foi percolado com fluxo de 9 mL/min durante 30 min, através da coluna encamisada a uma temperatura de 34

°C. Transcorrido o tempo de saturação do adsorvente, as válvulas 1 e 2 foram fechadas e as válvulas 3 e 4 abertas, iniciando o processo de dessorção da lactose do adsorvente. Ao longo da dessorção, foi avaliado o efeito das variáveis operacionais sobre a recuperação da lactose na coluna empacotada por um planejamento composto central rotacional, com duas variáveis independentes (vazão e temperatura), e rendimento em relação a lactose dessorvida como variável dependente. Três repetições no ponto central foram incluídos de acordo com a Tabela 7. O percentual de lactose adsorvida e dessorvida a partir do adsorvente impresso molecularmente foi determinado com base na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme os cromatogramas em Anexo 2 A. Após a eluição, a lactose foi recuperada através do processo de cristalização por adição do anti-solvente etanol.

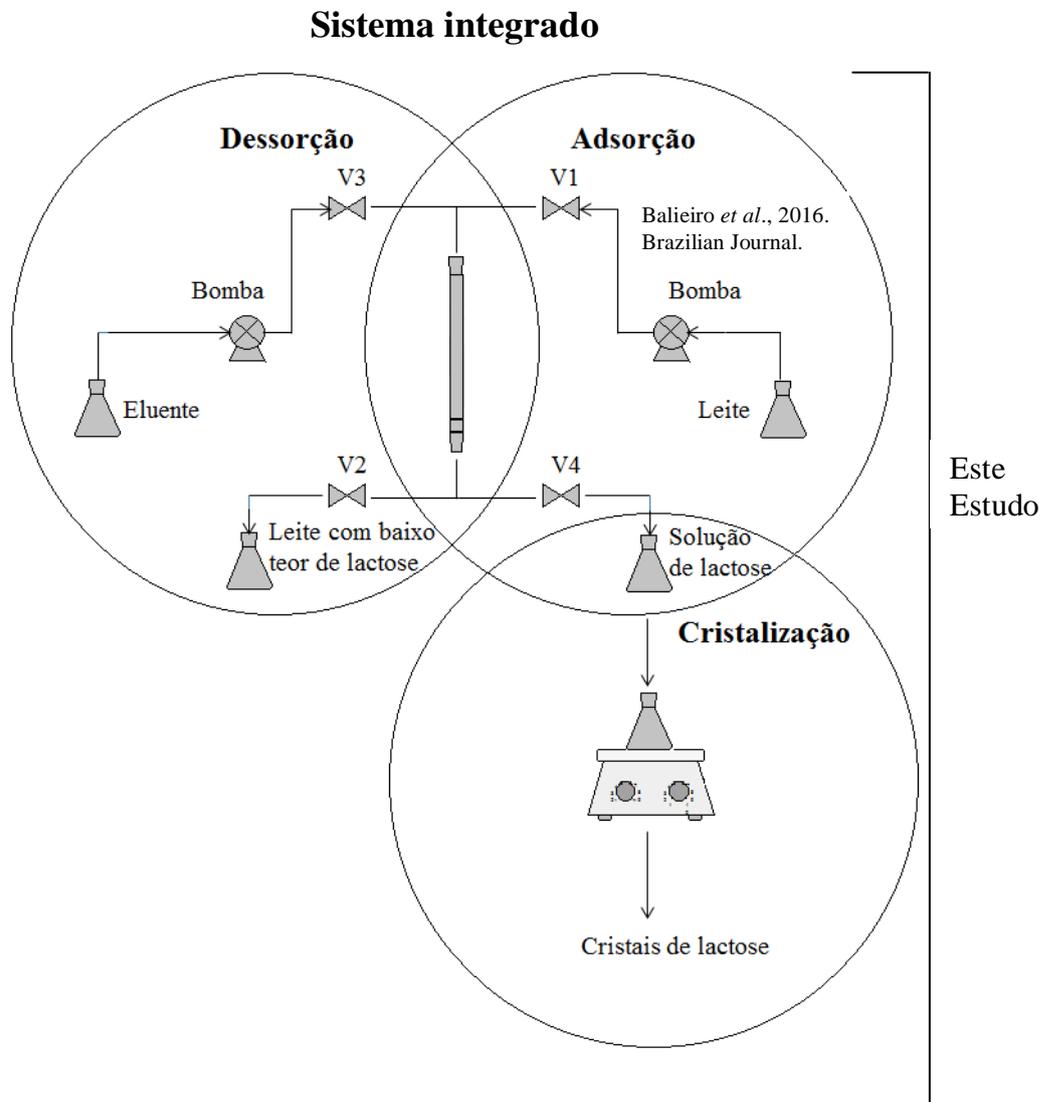


Figura 7: Unidade experimental utilizada no processo de adsorção/dessorção da lactose em coluna de leito fixo recheada com partículas adsorventes impressas molecularmente (PIM), seguida da etapa de cristalização.

Tabela 7: Matriz codificada e decodificada do planejamento composto central rotacional para estudar a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM.

| Ensaio | Temperatura | Vazão | Temperatura | Vazão |
|--------|-----------------------|----------|--------------------------|----------|
| | (°C) | (mL/min) | (°C) | (mL/min) |
| | Variáveis Codificadas | | Variáveis Descodificadas | |
| 1 | -1 | -1 | 34 | 3 |
| 2 | 1 | -1 | 60 | 3 |
| 3 | -1 | 1 | 34 | 9 |
| 4 | 1 | 1 | 60 | 9 |
| 5 | -1,41 | 0 | 29 | 6 |
| 6 | 1,41 | 0 | 65 | 6 |
| 7 | 0 | -1,41 | 47 | 2 |
| 8 | 0 | 1,41 | 47 | 10 |
| 9 | 0 | 0 | 47 | 6 |
| 10 | 0 | 0 | 47 | 6 |
| 11 | 0 | 0 | 47 | 6 |

4.3.2 Reuso do adsorvente

Com o intuito de estudar a eficiência do material adsorvente, em relação à recuperação e o reuso, foram realizados ciclos de adsorção-dessorção. Durante a adsorção, o leite foi percolado com um fluxo 9 mL/min através da coluna de leito fixo encamisada a temperatura 34 °C. Transcorrido o tempo de 30 min necessários para saturação do adsorvente, o fluxo foi interrompido e iniciou-se o processo de dessorção. Na dessorção, a lactose retida no adsorvente, foi recuperada utilizando como eluente água ultrapura, nas condições experimentais (3 mL/min e 34 °C) de maior rendimento no processo de recuperação de lactose, obtidas anteriormente. Após a eluição, o leito foi lavado com etanol PA nas mesmas condições usadas durante o processo de dessorção, antes de iniciar o novo ciclo. As amostras coletadas durante as etapas de adsorção e dessorção foram analisadas através da técnica CLAE.

4.3.3 Avaliação da recuperação da lactose em solução sintética e da lactose recuperada do leite através do processo de cristalização

Durante esta etapa foram conduzidos experimentos preliminares com o objetivo de estudar a recuperação da lactose em solução sintética por meio do processo de cristalização, utilizando um planejamento estatístico como ferramenta para análise da influência das variáveis independente: volume de etanol e tempo de agitação.

O processo de recuperação da lactose por meio da cristalização foi realizado a partir da diluição de 6 g do padrão de α lactose em 20 mL de água ultrapura, mantida sob agitação

constante de 735 rpm no agitador magnético. A solução foi inicialmente aquecida a 60 °C para garantir a completa dissolução e em seguida resfriada a temperatura de 25 °C antes da adição do etanol. Após a adição, a solução foi filtrada utilizando Kitassato de borossilicato, funil de Buchner e papel filtro quantitativo porosidade 0,8 µm, ligados a uma bomba de vácuo, separada e secada num dessecador por um período de 24 horas antes do processo de pesagem (KOUGOULOS *et al.*, 2010).

Para avaliar a influência das variáveis no processo de recuperação da lactose, utilizou-se um planejamento experimental 2^2 com 3 pontos centrais, cujos níveis são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Matriz codificada e decodificada de planejamento fatorial completo 2^2 para estudar a capacidade de recuperação da lactose em solução sintética por cristalização.

| Ensaio | Variáveis codificadas | | Variáveis decodificadas | |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) | Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) |
| 1 | -1 | -1 | 40 | 10 |
| 2 | +1 | -1 | 60 | 10 |
| 3 | -1 | +1 | 40 | 60 |
| 4 | +1 | +1 | 60 | 60 |
| 5 | 0 | 0 | 50 | 35 |
| 6 | 0 | 0 | 50 | 35 |
| 7 | 0 | 0 | 50 | 35 |
| Controle | 0 | 0 | 50 | 60 |

* Controle (Sem Agitação)

4.3.4 Sistema integrado para obtenção da lactose do leite

Após o uso do planejamento experimental nos processos de dessorção e cristalização em solução sintética, realizou-se o estudo integrado do processo, com o intuito de obter os cristais de lactose do leite e comparar com os cristais da solução sintética. Durante essa etapa foram realizados alguns ensaios com o intuito de observar a influência do volume do solvente e o tempo de agitação no tamanho e morfologia dos cristais de lactose obtidos.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação da concentração de lactose

A dosagem de lactose nos experimentos com o adsorvente PIM foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na determinação de concentração de

lactose nos experimentos, foi empregado um cromatógrafo 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 10 A). A coluna analítica utilizada para todos os ensaios foi a Luna NH2 (150 x 4,6 mm) (Phenomenex) com grupos amina ligados quimicamente à sílica. A fase-móvel utilizada era constituída de 60 % de acetonitrila e 40 % 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 (BALIEIRO *et al.*, 2016). Foi preparada a curva de calibração para a dosagem de lactose no experimento usando o PIM e apresentada no ANEXO 1 A. As amostras foram filtradas e injetadas no equipamento.

4.4.2 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 °C/min, na faixa de temperatura ambiente a 1000°C, com variação de massa de 2 a 6 mg e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

4.4.3 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 µA.

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

As áreas de superfície das amostras: sílica controle (PIM-controle), sílica após o primeiro ciclo (PIM-C1) e sílica após o quinto ciclo (PIM-C5), 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 Caracterização físico-química do leite e da lactose recuperada

Durante essa etapa determinação de cinzas, umidade e acidez total titulável foram realizadas de acordo com os métodos descritos nas “(Normas Analíticas do Instituto Lutz, (2008)”. Enquanto que a dosagem de lipídios foi determinada de acordo com (BLIGH e DYER, 1959).

4.5.1 Determinação de cinzas

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

4.5.2 Determinação de umidade

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

4.5.3 Determinação da acidez total titulável

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

4.5.4 Determinação de proteínas

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 derivado.

4.5.5 Determinação de lipídeos

A determinação de lipídios foi realizada de acordo com a metodologia descrita 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%, agitando vigorosamente por 2 min. Após a separação das camadas naturalmente em 2 minutos, a camada metanólica superior foi succionada e descartada. Em seguida, a camada inferior foi filtrada em papel de filtro quantitativo, e 5 mL do filtrado foram transferidos para um béquer de 50 mL, previamente tarado. Por fim a amostra foi colocada em estufa a 100 °C para evaporação do solvente. Depois da evaporação a amostra foi esfriada em um dessecador e pesada.

4.5.6 Determinação de 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.

4.6 Análise microbiológica

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

4.6.1 Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes

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}). Após homogeneização, 1 mL da amostra foi transferida 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 termotolerantes, foram utilizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} das amostras em estudo. Em seguida foram tomados três tubos contendo 8 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo um tubo de Durham 63 invertido, que 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 %. tubo de Durham invertido, incubando-os a 35 °C, durante 24-48 h.

A prova foi considerada positiva somente quando foi verificado 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 termotolerantes, 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 termotolerantes.

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 termotolerantes. 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 termotolerantes por grama de amostra analisada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico serão apresentados, analisados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. Na primeira etapa, foi avaliada adsorção da lactose no processo em batelada com o intuito de se obter o tempo de equilíbrio e estudar a influência da massa do adsorvente. Na segunda etapa foram realizados, estudos de adsorção e dessorção da lactose em coluna de leito fixo preenchida com o adsorvente impresso molecularmente. Na terceira etapa o estudo de reuso do adsorvente. Na terceira etapa serão apresentados os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas do leite e da lactose recuperada. Por fim, serão apresentados os resultados do processo de recuperação da lactose em solução sintética e do leite por cristalização e o sistema integrado.

5.1 Estudo da remoção da lactose em sistema batelada

Inicialmente um ensaio foi realizado com o intuito de avaliar o tempo de equilíbrio, a partir da interação da solução de leite contendo lactose com 4 g do adsorvente PIM, definido anteriormente por BALIEIRO *et al.* 2016 no estudo de adsorção em coluna de leito fixo. Os resultados obtidos foram descritos através da Figura 8.

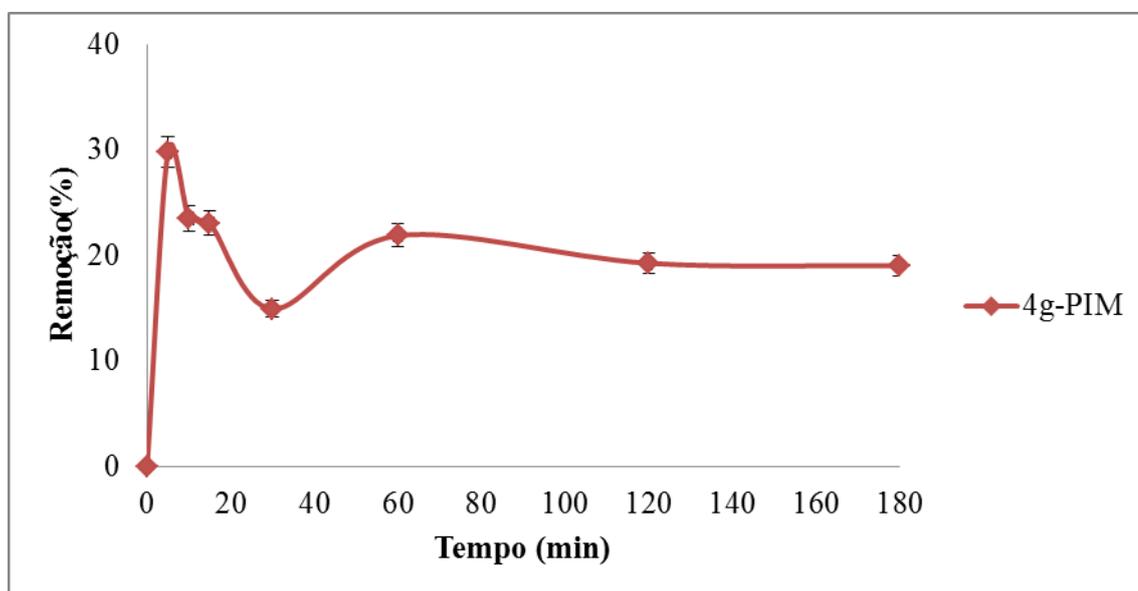


Figura 8: Curva de remoção da lactose do leite no adsorvente impresso molecularmente em sistema batelada, ($m = 4$ g de PIM; $C_0 = 22$ mg/L; $T = 35$ °C e 200 rpm).

De acordo com o perfil da curva de remoção foi possível observar que a máxima remoção 30 % foi obtida no instante de tempo de 5 min, o que caracteriza o adsorvente como

uma cinética rápida. Resultados semelhantes foram encontrados por GHASEMI *et al.* (2014) que atribuíram a rápida adsorção em fases iniciais, em função da disponibilidade de sítios ativos na superfície do adsorvente. No período de 5 a 30 min aconteceu um declive no perfil de remoção da lactose, possivelmente devido à formação de camadas compostas de sólidos solúveis no leite, dificultando o acesso aos sítios ativos do adsorvente (OLIVEIRA *et al.*, 2015). No período entre 120 e 180 min a remoção da lactose é praticamente constante, momento em que o adsorvente satura, sendo assim adotou-se o tempo médio de 150 min como tempo de equilíbrio.

Após o estudo da cinética de remoção da lactose no adsorvente (PIM) em processo batelada, avaliou-se a eficiência do processo de remoção em relação a diferentes quantidades de adsorvente (1, 2, 3, 4 e 5 g) para um tempo de equilíbrio de 150 min. Os resultados obtidos na Figura 9 descrevem a capacidade de adsorção (q) do PIM para as diferentes massas.

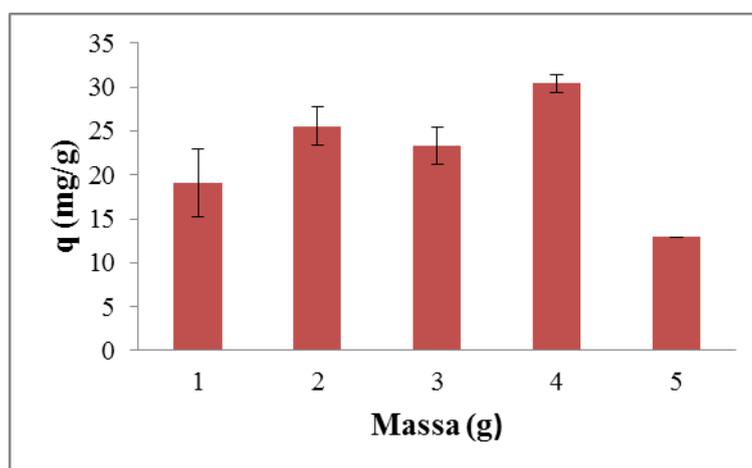


Figura 9: Capacidade de Adsorção do adsorvente PIM em reator agitado.

De acordo com os resultados da Figura 9, o ensaio com 4 g apresentou a maior capacidade de adsorção, que corresponde a 30,41 mg de lactose por grama de adsorvente. Enquanto que para os ensaios com massas inferiores a 4 gramas, apresentaram capacidade de adsorção menores. Provavelmente os ensaios com menor massa possuem uma menor quantidade de sítios para a adsorção e, conseqüentemente, uma maior competição das moléculas de lactose por grama de adsorvente (YAGUB *et al.*, 2014). Entretanto, para a condição de 5 gramas verificou-se uma redução da capacidade de adsorção, que pode ser atribuída a superposição dos sítios de adsorção devido ao aumento da quantidade de adsorvente, dificultando o acesso da lactose ao molde molecular no polímero (MAHMOODIAN *et al.*, 2015).

5.2 Estudo de adsorção da lactose em coluna de leito fixo

Após os estudos em batelada, realizou-se um ensaio de adsorção da lactose do leite em coluna de leito fixo com o intuito de elucidar a capacidade de adsorção do adsorvente PIM, bem como obter os ajustes dos modelos da curva de ruptura.

Na Figura 10, pode-se observar através da curva de ruptura que o adsorvente PIM, uma região favorável ao processo de transferência de massa, correspondente aos primeiros dez minutos, na qual o adsorvente atingi aproximadamente 60 % da sua capacidade de adsorção. Transcorrido esse tempo, a curva de ruptura da remoção da lactose do leite, apresentou um comportamento não usual, com a presença de um *plateau* indicando um período de remoção da lactose constante. Esse comportamento pode estar associado à distribuição preferencial de sítios de reconhecimento específico ou devido a uma competição entre os sítios ativos do adsorvente entre outros constituintes presentes na solução multicomponente do leite (BALIEIRO *et al.*, 2016).

A curva de ruptura obtida experimentalmente foi ajustada com modelos descritos na literatura. Para realizar a modelagem foram utilizados os modelos de Adams-Bohart, Yan e Thomas, cujos parâmetros foram ajustados por uma regressão não linear utilizando o software livre SciDAVis. A Figura 10 apresenta os dados experimentais e os preditos pelos modelos.

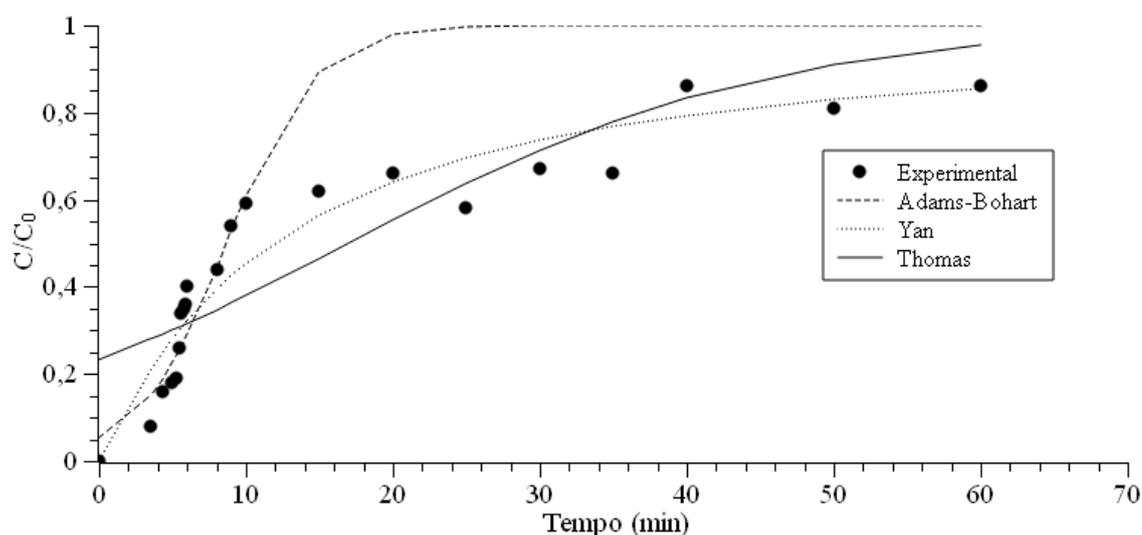


Figura 10: Curva de ruptura e ajuste dos modelos para a adsorção de lactose no PIM em coluna de leito fixo, para as condições de 9 mL/min; 12,5 cm e 34 °C.

Observa-se na Tabela 9 os parâmetros dos modelos ajustados a partir da regressão, bem como os parâmetros de desempenho, o coeficiente de correlação (R^2) e o chi-quadrado (χ^2).

De acordo com os resultados obtidos, o modelo de Adams-Bohart apresentou o menor coeficiente de correlação e o maior chi-quadrado, 0,47 e 0,69, respectivamente.

Tabela 9: Parâmetros ajustados pelos modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan para a adsorção de lactose em coluna de leito fixo, para as condições de 9 mL/min; 12,5cm e 34 °C.

| C ₀ mg/L | Q mL/min | Z cm | Adams-Bohart | Thomas | Yan |
|------------------------|-------------|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | | | N ₀ (mg/L) K _{AB} (L/min.mg) | K _{th} (L/min.mg) q _t (mg/g) | a q _{yan} (mg/g) |
| 22249 | 9 | 12,5 | 13,18 0,015 | 0,003 84 | 59 1,10 |
| Ajuste | | | R ² =0,47 χ ² =0,69 | R ² =0,76 χ ² =0,31 | R ² =0,90 χ ² =0,13 |

O baixo desempenho do modelo de Adam-Bohart pode ser atribuído ao fato deste modelo considerar que a taxa de adsorção é proporcional à capacidade residual do adsorvente e que o equilíbrio não ocorre instantaneamente (SONG, *et al.*, 2015 e WANG *et al.*, 2015). Apesar do baixo desempenho, o modelo apresentou um bom ajuste para a região $C/C_0 < 0,6$, comportamento semelhante ao obtido pelos autores, que sugerem que o modelo é mais indicado para descrever apenas a parte inicial da curva de ruptura, geralmente $C/C_0 < 0,5$.

Os valores do coeficiente de correlação e chi quadrado obtidos para modelo de Thomas indicam um melhor desempenho deste modelo em relação ao modelo de Adam-Bohart. Esse desempenho pode ser comprovado pelo aumento do coeficiente de correlação de 0,47 para 0,76 e pela redução do chi-quadrado de 0,69 para 0,31. Resultados semelhantes foram encontrados por JANG *et al.* (2016) que atribuíram o melhor desempenho do modelo ao fato do mesmo desprezar a existência de dispersão axial na coluna, considerando que a adsorção é a força motriz, através de uma cinética de segunda ordem.

O modelo de Yan foi o que apresentou o melhor ajuste em relação aos dados experimentais, com o maior coeficiente de correlação de 0,90 e menor chi quadrado de 0,13. Esse desempenho em relação aos outros modelos também foi verificado por CHIAVOLA *et al.* (2012) que justificaram o melhor ajuste, em virtude do modelo de Yan (equação 5), além de fazer as mesmas considerações, minimiza os erros de predição que o modelo de Thomas (equação 4) pode apresentar nos pontos iniciais e finais das curvas de ruptura, principalmente em tempos muito pequenos ou muito grandes de operação.

5.3 Estudo de dessorção da lactose em coluna de leito fixo

A partir dos resultados obtidos por BALIEIRO *et al.* (2016) para a adsorção da lactose do leite, repetiu-se o ensaio para se ter a coluna recheada e assim iniciar os estudos de dessorção.

A viabilidade da dessorção da lactose em coluna de leito fixo preenchida com o adsorvente impresso molecularmente, foi determinada através da cinética de dessorção (Figura 11), onde se verificou a influência das vazões (3,6 e 9 mL/min) durante a recuperação da lactose do adsorvente (PIM). De acordo com a Figura 11, como já era esperado, o aumento da vazão diminui o tempo necessário para percolação do solvente pela coluna, sendo que o menor tempo (15 min) e maior (20 min) ocorreram para as vazões de 9 e 3 mL/min, respectivamente. De acordo com SOTELO *et al.* (2013), o aumento da vazão, acarreta o surgimento de caminhos preferenciais, reduzindo o tempo necessário de percolação do solvente, impossibilitando uma eficiente interação entre as fases.

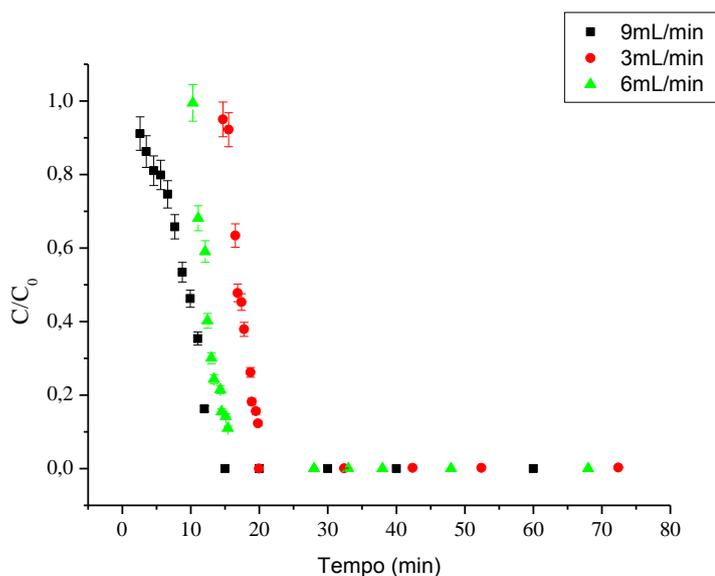


Figura 11: Cinética de dessorção da lactose em coluna de leito fixo recheada com polímero impresso molecularmente (PIM) para as vazões de 3, 6 e 9 mL/min.

Através das curvas descritas na Figura 11, foi possível observar que os tempos obtidos durante o processo de dessorção (15, 17,5 e 20 min), foram inferiores ao tempo de exaustão de 30 min utilizado durante a etapa de adsorção. Essa característica demonstra que o processo possui uma cinética rápida, acarretando o uso de uma menor quantidade de reagente e energia, o que torna o processo economicamente viável (CECHINEL *et al.*, 2014). Além disso, as

cinéticas demonstram que o teor de lactose desorvida do adsorvente reduz gradativamente com o tempo, sem nenhum platô, indicando que a biomolécula é facilmente recuperada ao longo do processo (HUSSEIN e AHMED, 2016).

Após o estudo da cinética de dessorção, realizou-se um planejamento experimental do tipo composto central rotacional descrito na Tabela 10 para analisar a influência das variáveis vazão e temperatura na eficiência do processo de recuperação da lactose.

Tabela 10: Matriz codificada e decodificada do planejamento composto central rotacional para estudar a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM.

| Ensaio | Temperatura | Vazão | Temperatura | Vazão | Rendimento (%) |
|-----------------------|-------------|----------|--------------------------|----------|----------------|
| | (°C) | (mL/min) | (°C) | (mL/min) | |
| Variáveis Codificadas | | | Variáveis Descodificadas | | |
| 1 | -1 | -1 | 34 | 3 | 58,3 |
| 2 | 1 | -1 | 60 | 3 | 42,0 |
| 3 | -1 | 1 | 34 | 9 | 30,1 |
| 4 | 1 | 1 | 60 | 9 | 22,8 |
| 5 | -1,41 | 0 | 29 | 6 | 34,4 |
| 6 | 1,41 | 0 | 65 | 6 | 25,2 |
| 7 | 0 | -1,41 | 47 | 2 | 38,5 |
| 8 | 0 | 1,41 | 47 | 10 | 23,5 |
| 9 | 0 | 0 | 47 | 6 | 31,4 |
| 10 | 0 | 0 | 47 | 6 | 36,8 |
| 11 | 0 | 0 | 47 | 6 | 35,6 |

Os resultados obtidos com base no planejamento experimental, mostram que o maior rendimento de 58,3 % ocorreu para o ensaio 1 (34 °C - 3 mL/min), enquanto que o menor de 22,8 % foi obtido no ensaio 4 (60 °C - 9 mL/min).

A partir do gráfico de Pareto (Figura 12), foi possível avaliar a variável que exerceu maior influência no processo de recuperação da lactose. Conforme descrito na Figura 12, a vazão (L) se mostrou estatisticamente significativa com efeito negativo no processo de recuperação da lactose. De acordo com CHENQ *et al.* (2014) a redução da recuperação com o aumento da vazão, pode estar associado ao fato de que o aumento da vazão pode ocasionar o surgimento de caminhos preferenciais. Resultados semelhantes foram observados por SOLEIMANI *et al.* (2012), no processo de recuperação da albumina bovina pelo adsorvente MIP que apresentou uma redução de aproximadamente 50 % na quando o fluxo variou de 0,5 mL/min para 2 mL/min. Os efeitos combinados de temperatura e vazão forma avaliados através da superfície de resposta é apresentada na Figura 13

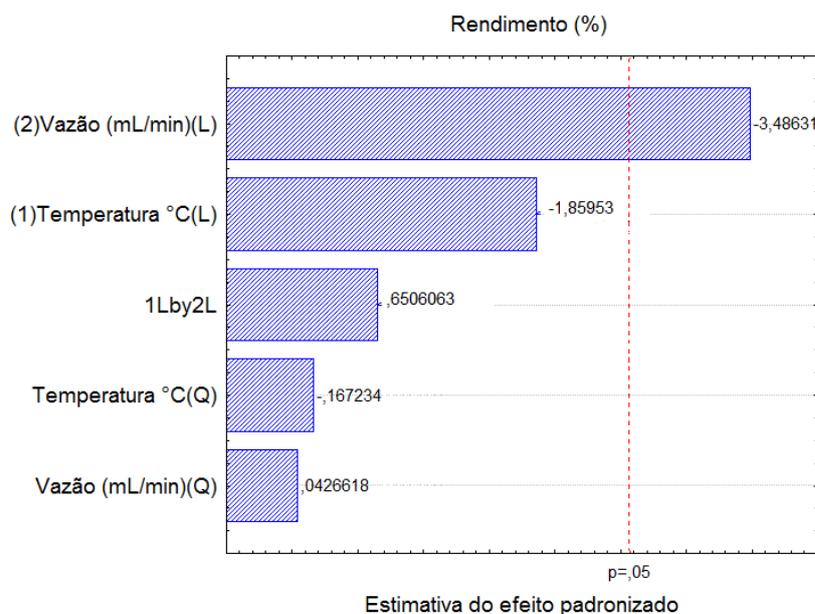


Figura 12: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a dessorção da lactose em coluna de leito fixo utilizando PIM.

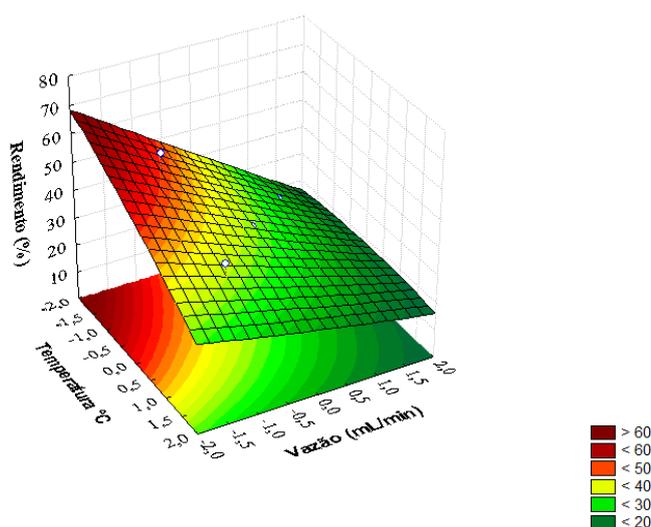


Figura 13: Superfície de resposta do rendimento (%) da lactose no processo de dessorção em leito fixo utilizando PIM.

Através da superfície de resposta da Figura 13 foi possível observar uma tendência de aumento no rendimento da recuperação da lactose com a redução da vazão e da temperatura. Em relação ao efeito da temperatura, esse comportamento pode estar associado ao fato de que o processo de mutarotação (mudança nas frações de α e β lactose na solução) é diretamente proporcional ao aumento de temperatura, que por sua vez pode alterar a solubilidade da lactose (JAWAD *et al.*, 2014). Além disso, esse comportamento em relação a temperatura foi um resultado esperado, pelo fato de possuir efeito inverso durante a etapa de adsorção.

5.3.1 Modelagem da dinâmica de dessorção em coluna de leito fixo

Após a determinação das cinéticas de dessorção e dos tempos de equilíbrio, os modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan, usados na adsorção, foram ajustados aos dados experimentais durante a etapa de dessorção. Para realizar a modelagem, foi feita uma regressão não linear utilizando o software livre SciDAVis, a partir do rebatimento das curvas de rupturas através da plotagem de $(1 - C/C_0)$ em função do tempo.

Como pode ser observado na Figura 14, o formato e a posição da zona de transferência de massa das curvas se alteram em relação ao encontrado para a curva de adsorção obtida no item 5.2. De acordo com os perfis, é possível observar um perfil mais inclinado que o da curva de adsorção para todas as vazões. Esse comportamento indica um favorecimento da transferência de massa que pode estar associado ao fato da água usada como eluente apresentar uma viscosidade menor que a viscosidade do leite.

Observa-se na Figura 14, que os modelos utilizados apresentaram um bom ajuste em relação aos dados experimentais. A Tabela 11 expressa os parâmetros obtidos para os modelos, bem como os parâmetros de desempenho.

Na Tabela 11, é possível observar que os ajustes obtidos para os modelos de Adams-Bohart e Thomas apresentaram desempenhos semelhantes, com os coeficientes de correlação (R_2) e chi-quadrado (χ^2) variando de 0,96 para 0,99 e de 0,021 para 0,046, respectivamente. Além disso, verificou-se que à medida que a vazão diminuiu, o coeficiente de correlação reduziu de 0,99 para 0,96 e o chi-quadrado aumentou de 0,021 para 0,46. Essa redução no desempenho pode estar associada ao fato que vazões menores, acarretam em tempos de residência maiores, que por sua vez, torna o processo de transferência de massa mais lento. De acordo com LI *et al.* (2016b) apesar desses modelos serem mais indicados para descrever a região inicial da curva de ruptura, não levam em consideração a dispersão axial, característicos de processos lentos.

O modelo de Yan apresentou uma variação menor em relação ao coeficiente de correlação do que os outros modelos, variando entre 0,97 e 0,98. Apesar de apresentar o maior chi-quadrado de 0,063 para a vazão de 9 mL/min, esse modelo apresentou um erro menor de 0,036 quando comparado com o erro de 0,046 dos outros modelos para a condição de menor vazão. Essa melhoria de desempenho para pequenas vazões pode ser associada ao fato que o modelo de Yan, minimiza os erros matemáticos de predição do modelo de Thomas, em relação à concentração de lactose na saída da coluna no tempo zero e para tempos muito longos de operação (CHIAVOLA *et al.*, 2012).

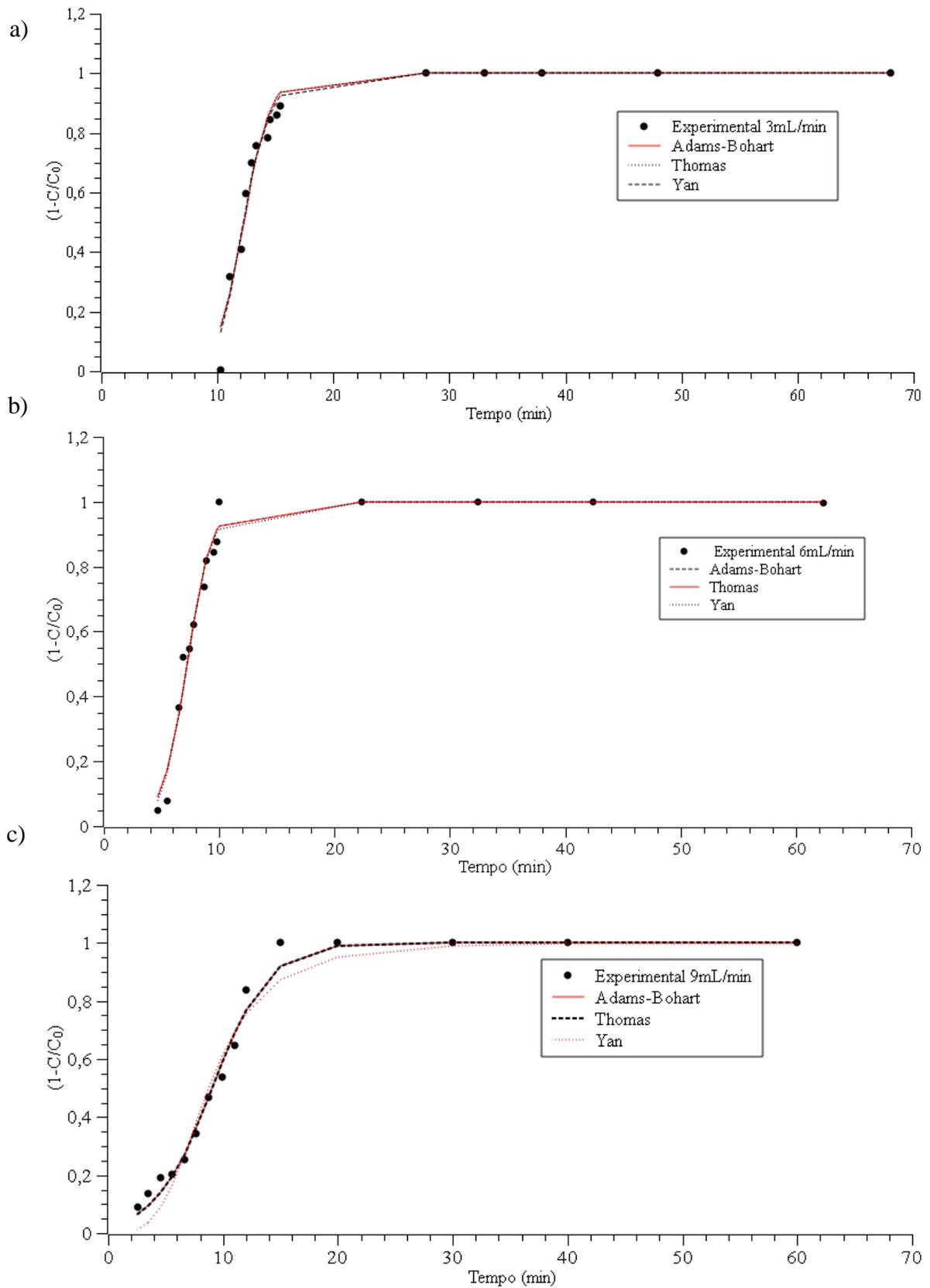


Figura 14: Curvas de rupturas de desorção da lactose do leite obtidas experimentalmente e ajustadas para os modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan, para as condições de (a) 12,5 cm; 3 mL/min; 34 °C, (b) 12,5 cm; 6 mL/min 34 °C e (c) 12,5 cm; 9 mL/min e 34 °C.

Tabela 11: Parâmetros ajustados pelos modelos de Adams-Bohart, Thomas e Yan para a dessorção de lactose do leite em coluna de leito fixo, para as condições de 9, 3 e 6 mL/min; 12,5 cm, $C_0 = 22249$ mg/L e 34 °C.

| Q mL/min | Adams-Bohart | Thomas | Yan |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | K_{AB} (L/min.mg) | K_{th} (L/min.mg) | a |
| | N_0 (mg/L) | q_t (mg/g) | q_{yan} (mg/g) |
| 9 | 0,018 | 0,018 | 3,59 |
| | 13,77 | 44,75 | 43,27 |
| | $R^2=0,99$ $\chi^2=0,021$ | $R^2=0,99$ $\chi^2=0,021$ | $R^2=0,97$ $\chi^2=0,063$ |
| 6 | 0,041 | 0,041 | 15,92 |
| | 17,46 | 56,71 | 56,59 |
| | $R^2=0,98$ $\chi^2=0,034$ | $R^2=0,98$ $\chi^2=0,034$ | $R^2=0,98$ $\chi^2=0,031$ |
| 3 | 0,039 | 0,039 | 10,88 |
| | 6,51 | 20,28 | 20,20 |
| | $R^2=0,96$ $\chi^2=0,046$ | $R^2=0,96$ $\chi^2=0,046$ | $R^2=0,97$ $\chi^2=0,036$ |

5.4 Estudo do reuso do adsorvente

O potencial de reutilização do adsorvente PIM é um parâmetro importante para verificar a viabilidade econômica no processo de adsorção. Neste estudo, a capacidade de reutilização do adsorvente PIM foi investigada por processos consecutivos de adsorção-dessorção com operação contínua durante cinco ciclos conforme Figura 15.

Os resultados mostraram que durante a etapa de adsorção, a eficiência no primeiro ciclo foi de 74 %; considerando que, ao longo dos três ciclos subsequentes de adsorção, essa eficiência se manteve praticamente constante, sugerindo que o adsorvente PIM possui uma excelente capacidade de reutilização e estabilidade no processo de remoção da lactose do leite (LALCHHINGPUII *et al.*, 2017). No quarto ciclo, houve uma pequena variação na capacidade da remoção, esse fato pode estar associado ao efeito do desbloqueio e maior acessibilidade aos sítios de adsorção, ocasionado pela redução de outros constituintes presentes no leite, durante a limpeza do adsorvente com etanol (DA'NA, 2017).

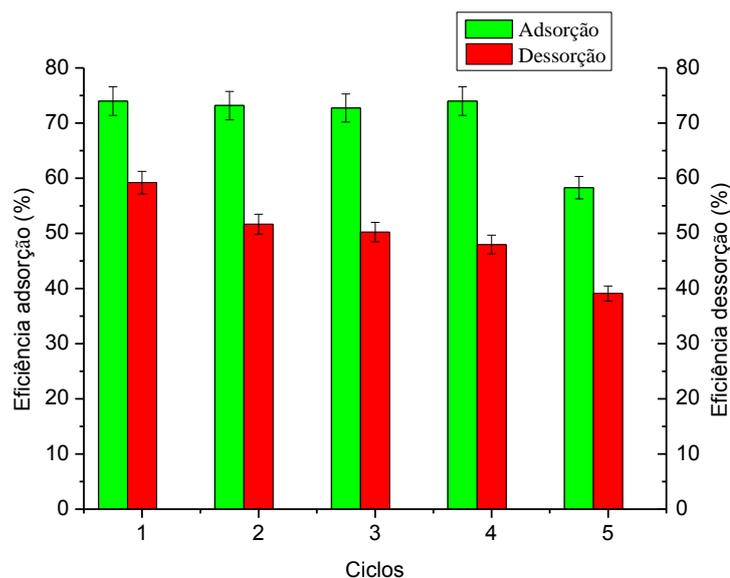


Figura 15: Estudo de reuso do adsorvente PIM para diferentes ciclos de adsorção (12,5 cm, 9 mL/min e 34 °C) e dessorção (12,5 cm, 3 mL/min e 34 °C).

Após cada ciclo de adsorção-dessorção, o conteúdo de outros constituintes do leite (proteínas e lipídios) presentes no adsorvente, podem diminuir, em virtude do processo de limpeza com etanol, entre os ciclos. Segundo ZHANG *et al.* (2018), os sítios de adsorção se tornam mais acessíveis e a capacidade de adsorção aumenta. Contudo neste estudo de reuso, identificou-se que a eficiência na adsorção diminuiu para 58% após cinco ciclos consecutivos. A diminuição da eficiência pode ser causada pela saturação do adsorvente em função do preenchimento e bloqueio dos sítios ativos, em função da permanência parcial dos constituintes do leite (lactose, proteínas e lipídios) na superfície do adsorvente (JASNIN, *et al.*, 2017 e LIU, *et al.*, 2017).

No caso do estudo de dessorção, 58,3 % de eficiência na recuperação foram observados no primeiro ciclo. Após cada ciclo a recuperação diminuiu gradativamente até chegar a 39 % no quinto ciclo. Essa redução durante os ciclos pode estar associada ao mecanismo de bloqueio e distribuição dos poros, que foram investigados através do estudo das isotermas adsorção-dessorção de N₂ do adsorvente PIM descritas na Figura 16, após o primeiro e quinto ciclo de reuso do adsorvente (PIM-C1 e PIM-C5, respectivamente), em relação ao adsorvente puro (PIM-CONTROLE) determinado por BALIEIRO *et al.*, (2016).

As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio dos materiais PIM-C1 e PIM-C5 são apresentadas na Figura 16. Todas as curvas são isotermas típicas do tipo IV, características de materiais mesoporosos (AHMED *et al.*, 2018). Adicionalmente, todas as curvas de dessorção mostram histerese em pressões relativamente altas ($P/P_0 > 0,6$).

Histereses são muito comuns em materiais mesoporosos e podem ser atribuídas a fatores como condensação capilar de nitrogênio e geometria do poro (ZELENKA, 2016). As isotermas obtidas apresentaram perfis semelhantes às encontradas por SEPEHRI *et al.* 2016, que as classificam como do tipo H₂, formada por poros do tipo garrafa, em virtude da sua estrangulação na entrada e do alongamento na outra extremidade (BRUSCHI *et al.*, 2015). A área da superfície específica, o diâmetro médio e a distribuição dos poros dos adsorventes mesoporosos, foram indicados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

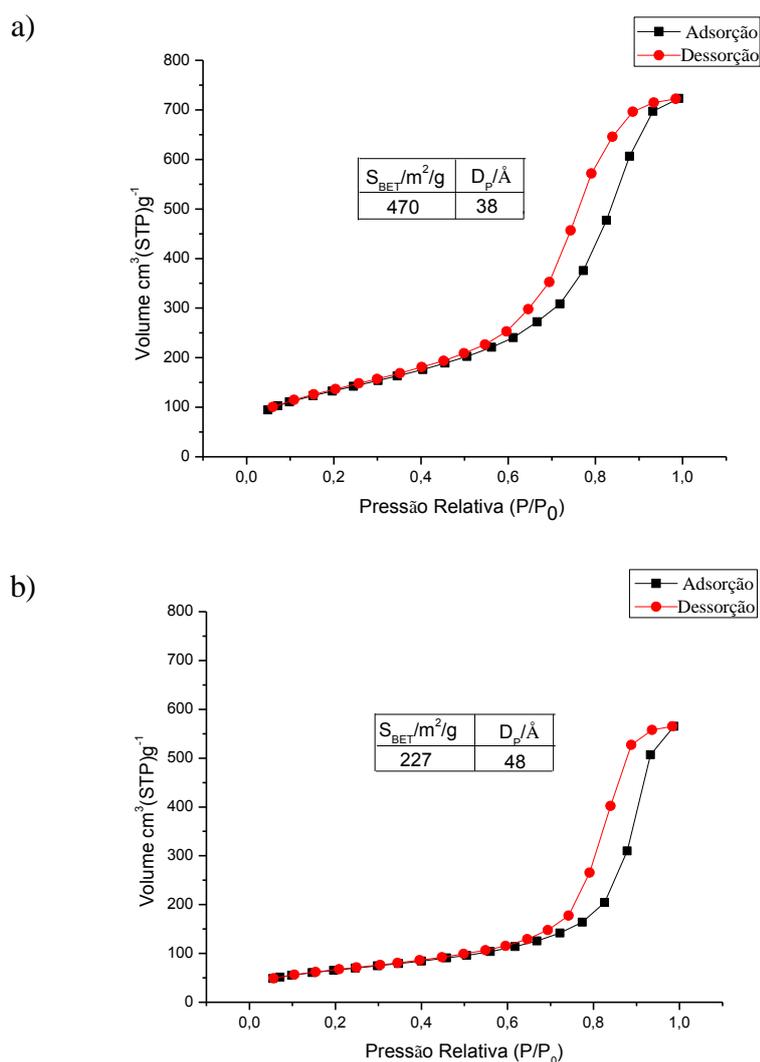


Figura 16: Isotermas de Nitrogênio adsorção/dessorção a) PIM-C1; b) PIM-C5.

Estudos recentes realizados por BALIEIRO *et al.* (2016), determinaram a partir de BET que o adsorvente puro (PIM-CONTROLE) apresentou uma área superficial de 464,2 m²/g e um diâmetro médio dos poros de 150 Å. Após o primeiro ciclo de adsorção-dessorção, foi possível observar uma pequena variação na área superficial de 464,2 para 470 m²/g e uma

redução significativa do diâmetro médio de 150 para 38 Å, do adsorvente PIM-CONTROLE em relação PIM-C1, Figura 16 a). A redução do diâmetro pode ser explicada devido a presença e ao preenchimento dos poros com o adsorvato não retirado que bloqueia parcialmente a adsorção das moléculas de nitrogênio (AWUAL, 2013).

Esse bloqueio ocorre provavelmente na superfície do poro e não no seu interior, acarretando uma maior quantidade de poros menores e ocasionado um aumento na área superficial do PIM-C1. Resultados semelhantes foram encontrados por LI *et al.* (2016a) que avaliaram o potencial de reuso da sílica mesoporosa esférica ao longo de cinco ciclos, após o tratamento de reciclagem hidrotérmico. Com base nos resultados obtidos pelos autores, observou-se um aumento da área superficial e volume dos poros após o terceiro ciclo, atribuído a formação de mistelas na superfície dos poros. No quinto ciclo conforme a Figura 16, houve um aumento do diâmetro médio de 38 para 48 do PIM-C5 em relação ao PIM-C1, que pode estar associado ao desbloqueio do poro, durante os ciclos reuso com solvente, provocando o deslocamento do adsorvato da superfície para o interior do poro. Esse deslocamento provoca o preenchimento parcial no interior dos poros, e conseqüentemente reduz a área superficial para 235 m²/g.

O preenchimento dos poros foi avaliado através dos gráficos de distribuição do tamanho dos diâmetros dos poros da sílica, descritos na Figura 17. De acordo com os gráficos na Figura 17 a) e 17 b) foi possível observar que todos os materiais apresentaram uma distribuição uniforme, com diâmetro médio maior que 20 Å, característico de materiais mesoporosos (OKOLO *et al.*, 2015).

Através dos gráficos de distribuição do PIM-C1 (Figura 17), é possível observar que o adsorvente possui uma faixa de distribuição mais estreita, com um diâmetro médio de 38 Å. Logo após o quinto ciclo o adsorvente PIM-C5 passa a ter uma faixa mais abrangente, em virtude do preenchimento de boa parte dos poros pequenos. Já em relação ao diâmetro médio, houve um acréscimo para 48 Å em relação ao PIM-C1. Apesar do acréscimo, a quantidade de poros foi inferior ao primeiro ciclo, resultando em uma área superficial menor. É possível ainda observar que o gráfico do PIM-C1 apresenta um pico bem maior do que o do PIM-C5, o que indica que o mesmo possui um volume bem maior de poros menores em relação ao volume de poros do material após o quinto ciclo.

Desta forma o mecanismo de bloqueio dos poros, através do qual as moléculas de lactoses adsorvidas inicialmente nos sítios próximos à superfície externa do PIM, promovem o bloqueio dos poros, tornando inacessíveis os sítios de adsorção mais internos dificultando a eficiência do processo de dessorção.

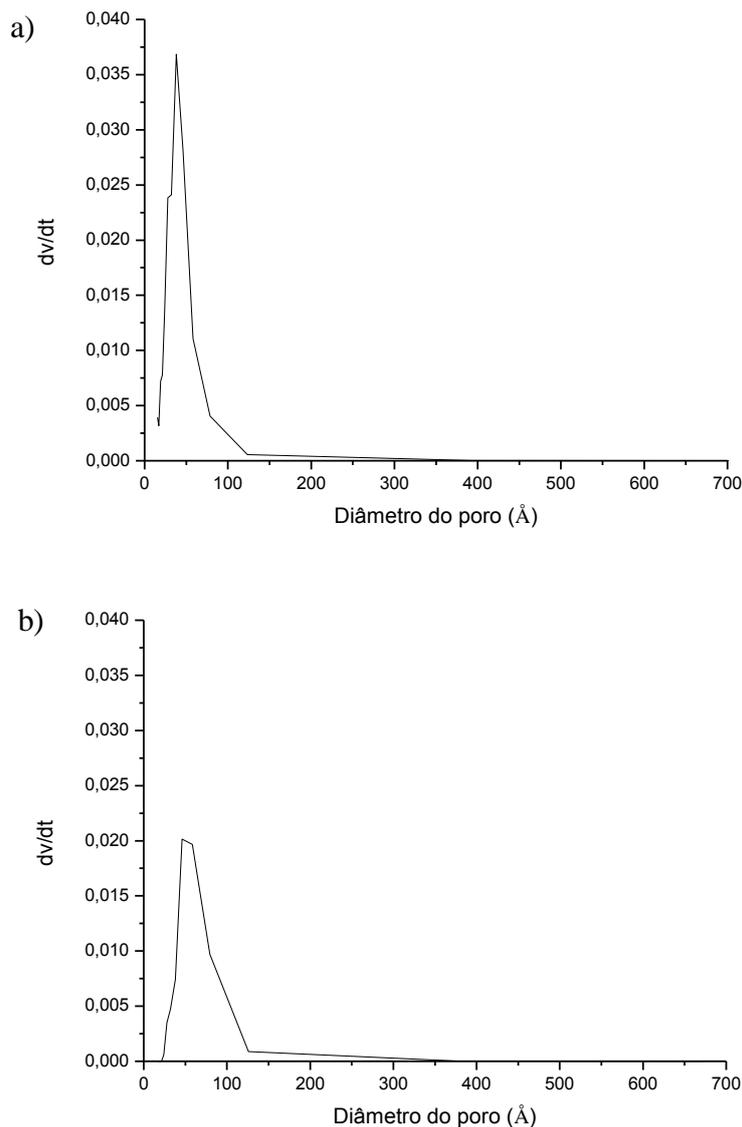


Figura 17: Gráficos de distribuição do diâmetro dos poros de acordo com BJH análise dessorção da lactose do leite a) PIM-C1; b) PIM-C5.

5.5 Determinação das análises físico-químicas do leite e da lactose recuperada

Os resultados obtidos da análise físico-química do leite utilizado foram comparados com os valores exigidos pela legislação Brasileira. Conforme observado na Tabela 12 o leite cru refrigerado apresentou características de pH, ácido lático, umidade e cinzas bem próximas das exigidas pela legislação. Apenas a quantidade de lipídios e proteínas apresentaram uma maior variação em relação aos percentuais exigidos pela legislação. Evidências têm constatado que fatores sazonais (RIBAS *et al.*, 2004), raciais (VERNEQUE *et al.*, 2005) e

nutricionais (BOTARO *et al.*, 2008) influenciam os teores de proteína bruta do leite bovino em amostras individuais ou de tanques. Já a lactose recuperada foi avaliada com base nas características exigidas pela Farmacopeia. De acordo com os resultados obtidos, a lactose recuperada possui características muito próximas das exigidas pela Farmacopéia brasileira (Farmacopéia, 2010). Apenas o teor de cinzas apresentou uma maior variação em relação aos 0,1 % exigidos, esse fato pode estar associado à presença de outros constituintes presentes no leite ou ao fato da precipitação de sais durante a desproteinação do soro (BUND e PANDIT, 2007a).

Tabela 12: Resultados das análises físico-químicas do leite e da lactose.

| Análises | Leite Integral | Legislação (Brasil, 2011) | Lactose | Farmacopéia (2010) |
|----------------------------------|----------------|---------------------------|---------|--------------------|
| pH | 6,78 | 6,50 a 6,80 | 6,25 | 4 a 6,5 |
| Acidez T.T.(g ácido Lático/100g) | 0,17 | 0,14 a 0,18 | - | - |
| Umidade (%) | 87,72 | 87,50 | 4,36 | 5,5 |
| Cinzas (%) | 0,68 | 0,80 | 0,15 | 0,1 |
| Proteínas (%) | 3,98 | 2,90/100mL | 0,22 | 0,25 |
| Lipídios (%) | 3,57 | 3,00/100mL | - | - |
| Lactose (%) | 4,60 | - | - | - |

5.6 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) da caseína e dos cristais de lactose recuperados

A fim de determinar a presença de caseína durante o processo de dessorção foi realizada a análise da amostra por FTIR conforme os espectros da Figura 18. Os espectros de FTIR da caseína obtida após a precipitação ácida do material eluído da coluna de dessorção, foram comparados com os resultados obtidos por SUN *et al.* (2016) para o padrão de caseína (Figura 18).

A partir dos espectros, foi possível observar bandas características de grupos funcionais amina I (C=O, estiramento) localizada entre 1600 e 1700 cm^{-1} e amina II (C-N, estiramento e N-H deformação) entre 1530 e 1540 cm^{-1} , presentes na estrutura da caseína (SUN *et al.*, 20016; ASHRAF *et al.*, 2013). Segundo XU *et al.* (2013) é possível observar na Figura 18 picos característicos a cerca da região de comprimento de onda de 3200 cm^{-1} , correspondente ao grupo (N-H, estiramento e fora do plano) e deformação (-NH-C=O, deformação de grupos aminas) presentes na estrutura da caseína.

Os espectros de FTIR do padrão de α -lactose e dos cristais de lactose LAC recuperada-E1 (lactose recuperada ensaio 1/34 °C-3 mL/min) são apresentados na Figura 19. Essas curvas mostram que a amostra recuperada apresenta perfil similar a amostra padrão de α -lactose, indicando semelhanças na composição dos materiais e a não interferência do solvente no processo de recuperação.

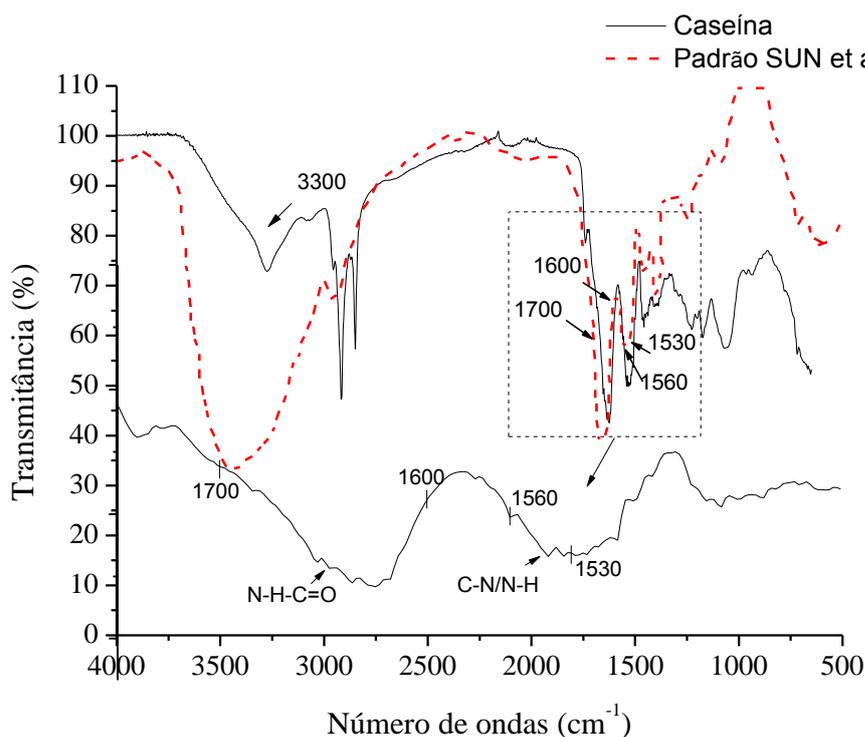


Figura 18: Espectros do FTIR do padrão da Caseína e da Caseína do material eluido da coluna de dessorção após a precipitação ácida.

A partir dos espectros da Figura 19, é possível observar que a banda característica para α -lactose foi localizada em 920 cm^{-1} e a banda de β -lactose está entre 950 cm^{-1} e 833 cm^{-1} (KIRK *et al.*, 2007; LISTIOHADI *et al.*, 2009). O aparecimento de todos os picos característicos de α e β -lactose nos espectros de FTIR, provavelmente estão associados à mutarrotação da lactose em solução aquosa.

Além disso, a Figura 19 mostra que todos os espectros obtidos possuem bandas características de grupos funcionais presentes na lactose, destacando-se as bandas a $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ associadas à frequência de vibração do alongamento do grupo OH, e as bandas fracas em 1656 cm^{-1} e entre 1200 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} , que correspondem respectivamente, à

deformação angular dos grupos OH da água, e ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C (ISLAM *et al.*, 2010).

A Tabela 13 descreve o resumo dos principais grupos e comprimentos de ondas encontrados para a caseína precipitada e a lactose recuperada. De acordo com os resultados da Tabela 13, foi possível observar que as bandas características encontradas para as amostras refletem os principais grupos presentes nas suas estruturas, bem como suas deformações e estiramentos.

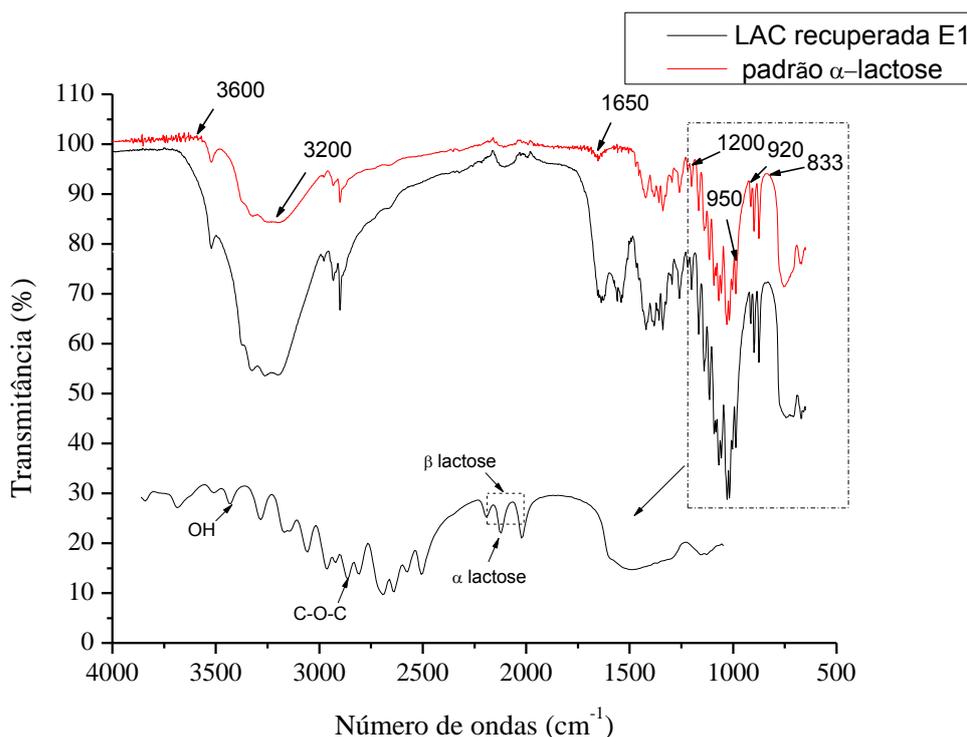


Figura 19: Espectros de FTIR do padrão de α -lactose e da lactose recuperada durante o ensaios 1 no processo de dessorção, nas condições 34 °C-3 mL/min.

Tabela 13: Principais grupos funcionais e comprimentos de ondas encontrados para a caseína e a lactose recuperada.

| Amostra | Comprimento de onda (cm ⁻¹) | Grupo funcional |
|----------|-----------------------------------------|-----------------------|
| Caseína | | |
| Região 1 | 1600 a 1700 | Amina I (C=O) |
| Região 2 | 1530 a 1540 | Amina II (C-N e N-H) |
| Região 3 | 3300 | N-H e NH-C=O |
| Lactose | | |
| Região 1 | 920 | α lactose |
| Região 2 | 833 a 950 | β lactose |
| Região 3 | 3200 a 3600 | OH alongamento |
| Região 4 | 1656 | OH deformação angular |
| Região 3 | 1070 a 1200 | C-O-C |

5.7 Análise microbiológica

A avaliação microbiológica demonstrou que o leite utilizado e a lactose recuperada, atende aos parâmetros preconizados pela legislação, resultando em um produto com boa qualidade higiênico-sanitária, conforme está apresentado na Tabela 14.

Tabela 14: Avaliação microbiológica do leite e da lactose recuperada.

| Amostras | Coliformes total (NMP/mL) | Coliformes termotolerantes (NMP/mL) | (IN 62, 2016) (NMP/mL) |
|----------|------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|
| Leite | <1(NPM/100mL) | <1(NPM/100mL) | 2 e 4 |
| Lactose | <1(NPM/100mL) | <1(NPM/100mL) | - |

Os resultados das análises no leite e na lactose para coliformes totais e coliformes termotolerantes (Tabela 14), indicam que os valores obtidos, encontram-se dentro dos parâmetros propostos pela legislação brasileira vigente, que são 2 NMP/mL, 4 NMP/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por MAGALHÃES *et al.* (2015) que avaliaram microbiologicamente leites pasteurizados comercializados em Aracaju, constatando que 66 % das amostras possuíam boas condições higiênico-sanitária, apresentando um número de coliformes totais inferior a 4 NPM/mL. Os valores encontrados para lactose também estão dentro dos parâmetros exigidos pela Farmacopéia Americana que exige um limite $<1,0 \times 10^2$ UFC/g.

5.8 Cristalização da lactose recuperada de solução sintética

A fim de avaliar a influência da recuperação da lactose pela técnica de cristalização, neste estudo realizou-se um delineamento fatorial completo com duas variáveis e dois níveis (2^2) com três pontos centrais, gerando uma matriz com sete ensaios, conforme Tabela 15. A matriz experimental foi utilizada com o intuito de se determinar a melhor condição experimental para a recuperação da biomolécula de lactose em solução sintética, através do processo de cristalização. Ao delineamento foi acrescentado um ponto de controle para estudar a influência da agitação no processo.

A recuperação da lactose em solução sintética foi avaliada por meio do processo de cristalização usando como anti-solvente o etanol no qual a lactose é pouco solúvel. As variáveis independentes foram o volume de etanol e o tempo de agitação para se obter a

variável dependente identificada como a recuperação da lactose por cristalização. Com base nos dados da Tabela 15, a recuperação da lactose no processo de cristalização, variou entre 43,50 % a 91,83 %. Embora o ensaio 4 tenha apresentado um rendimento de 90,67 % muito próximo do máximo obtido e com um tempo inferior, foi necessário investigar a influência dessas variáveis em relação ao diâmetro médio dos cristais, afim de se escolher a melhor condição com base no tipo de aplicação para a lactose recuperada.

Tabela 15: Matriz decodificada de planejamento experimental 2² para estudar a recuperação de lactose em solução sintética através do processo de cristalização.

| Ensaio | Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) | Recuperação (%) |
|-----------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| 1 | 40 | 10 | 52,70 |
| 2 | 60 | 10 | 90,67 |
| 3 | 40 | 60 | 86,67 |
| 4 | 60 | 60 | 91,83 |
| 5 | 50 | 35 | 89,73 |
| 6 | 50 | 35 | 89,13 |
| 7 | 50 | 35 | 89,20 |
| *Controle | 50 | 60 | 43,50 |

*Controle (Sem agitação)

A partir dos resultados experimentais, foi possível realizar a análise estatística por meio do software STATISTICA versão 7.0. Através do gráfico de Pareto como mostra a Figura 20 foi possível avaliar a variável que exerceu maior significância no processo de recuperação da lactose.

De acordo com o gráfico da Figura 20, observou-se que apesar das variáveis estudadas influenciarem o processo de recuperação da lactose, o volume de etanol se mostrou mais significativo ao nível de confiança de 95 %. Esse comportamento pode ser justificado, pelo fato que o aumento no volume de etanol reduz a solubilidade da lactose em água, provocando o estado de saturação e conseqüentemente a precipitação dos cristais (KOUGOULOS *et al.*, 2010; BUND e PANDIT, 2007b).

Após esta análise, foi obtido o modelo estatístico, baseado no método de regressão dos mínimos quadrados para a estimação dos parâmetros, conforme a Equação 7.

$$R(\%) = -39,24 + 2,23V + 1,99T - 0,03VT \quad (7)$$

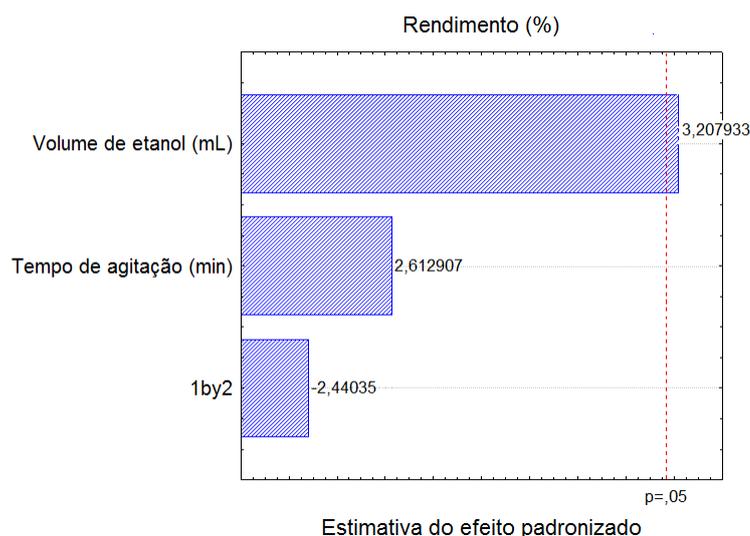


Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a recuperação da lactose em solução sintética por cristalização.

Devido a grande variabilidade inerente a biomolécula foi significativo o volume de etanol (V) no processo de recuperação da lactose (Figura 20) com p-valores menores que 5 % ($p < 0,05$). Assim, não foram significativos o tempo de agitação (T) e a interação volume e tempo (VT), tendo sido incorporados aos resíduos para cálculo da ANOVA apresentado na Tabela 16.

Tabela 16: Análise da variância para o ajuste do modelo linear de recuperação da lactose.

| Forma de Variação | Soma dos quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado médio | $F_{\text{calculado}}$ |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|------------------------|
| Regressão | 50759,47 | 4 | 12689,87 | 280,80 |
| Resíduos | 135,57 | 3 | 45,19 | |
| Total | 50895,05 | | | |

* $R^2=95\%$ * $F_{\text{tabelado}}=9,12$

Observando os valores encontrados na Tabela 16 verificou-se com base teste F, o que o modelo é altamente preditivo, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi bem maior que o F_{tabelado} . Desta forma, conclui-se que o modelo da Equação 7 se ajusta bem aos dados experimentais cuja porcentagem de validação (R^2) foi muito boa cerca de 95 %.

A superfície de resposta do planejamento fatorial experimental 2^2 é apresentada na Figura 21, na qual se observa que a maior quantidade de lactose recuperada (91,83 %) se encontra na região onde o volume de etanol foi 60 mL e o tempo de agitação foi igual a 60 min. Resultados semelhantes foram encontrados por BUND e PANDIT (2007a) no processo

de recuperação da lactose do soro do leite por adição de etanol, obtendo uma recuperação de 90 % para o maior volume de etanol, durante uma hora de cristalização. De acordo com DINCER *et al.* (2014), o aumento da quantidade de anti-solvente e do tempo de agitação provoca um aumento na taxa de nucleação.

Considerando o ponto de controle inserido no planejamento observou-se a importância da agitação, em virtude que a menor recuperação (43,50 %) ocorreu justamente quando a solução não foi agitada. Segundo WONG e HARTEL (2014), a agitação diminui o tempo de indução durante o processo de formação dos cristais, evitando ao longo do processo o fenômeno de aglomeração.

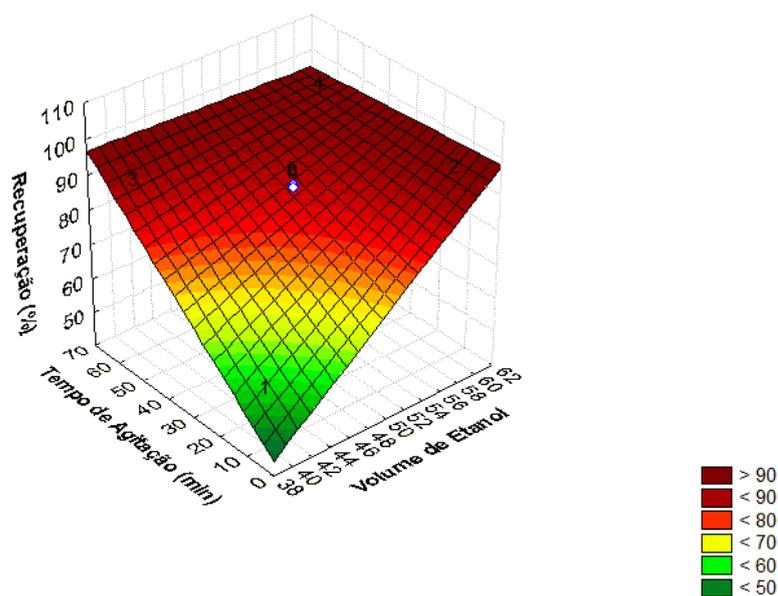


Figura 21: Superfície de resposta em função do volume de etanol e do tempo de agitação para a recuperação da lactose.

5.8.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do padrão de lactose foi investigada através das análises de TGA e DTA, cujos resultados foram comparados com as propriedades térmicas dos cristais de lactose recuperados durante o ensaio 4 (Tabela 15) que representou a maior rendimento na recuperação (91,83 %). As curvas TGA e DTA são apresentadas na Figura 22 e mostram dados simultâneos sobre a mudança em peso e perfil térmico das amostras, respectivamente.

A estabilidade térmica do padrão de lactose foi investigada através das análises de TGA e DTA, cujos resultados foram comparados com as propriedades térmicas dos cristais de lactose recuperados durante o ensaio 4 (Tabela 15) que representou a maior rendimento na recuperação (91,83 %). As curvas TGA e DTA são apresentadas na Figura 22 a) e 22 b) e

mostram dados simultâneos sobre a mudança em peso e perfil térmico das amostras, respectivamente.

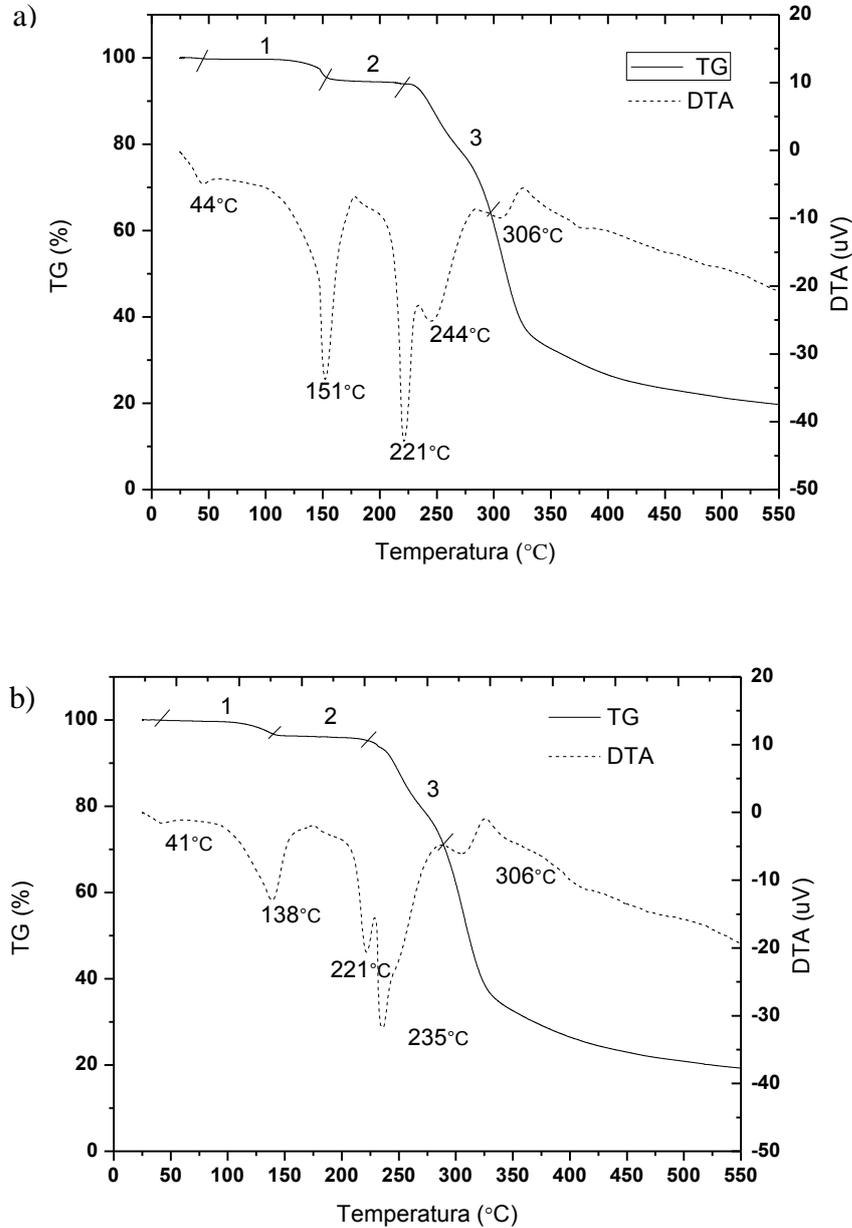


Figura 22: Curvas TG e DTA a) padrão da lactose e b) lactose recuperada durante o ensaio 1 de dessorção para 34 °C-3 mL/min, obtidas em N₂.

A curva TGA do padrão de α -lactose monohidratada mostra três distintivos patamares de perdas de peso Figura 22 a). O primeiro (identificado na região 1 na curva TGA) ocorreu entre 44 e 151 °C, com o pico em 151 °C (DTA termograma), que pode ser justificado pela a etapa de desidratação associada à perda de água da lactose na superfície.

A segunda perda de peso (marcada na região 2 na curva TGA) ocorreu entre as temperaturas de 151 e 221 °C e atingiu o pico em 221 °C (DTA termograma). Resultados semelhantes foram encontrados por WU *et al.* (2014) que obtiveram um pico endotérmico em 220 °C, cuja temperatura atribuiu-se ao ponto de fusão da α lactose monohidratada. Antes da etapa de decomposição ocorreu outro pico endotérmico a uma temperatura de 244 °C (região 3). A presença de dois picos durante a fusão da lactose, foi evidenciada por PATIL *et al.* (2015) que justificaram o segundo pico endotérmico a presença do isômero β lactose que possui a temperatura de fusão em torno de 235 °C. Por fim, a maior perda de massa ocorre após a temperatura de 306 °C, a partir da qual ocorre a decomposição do material.

A Figura 22 b) mostra as as curvas de TGA e DTA dos cristais de lactose recuperados. Com base nos resultados obtidos, os termogramas dos cristais de lactose recuperados apresentaram perfis similares aos encontrados para o padrão de α -lactose monohidratada. No entanto, houve uma menor perda de massa durante o primeiro patamar entre as temperaturas 41 e 138 °C, indicando que os cristais de lactose recuperados apresentaram inicialmente menos água na superfície. As curvas da Figura 22 b) também mostram que a amostra dos cristais recuperados continha uma pequena quantidade de α lactose indica pela pequena perda de peso entre as temperaturas de 138 a 221 °C. Foram encontrados também a presença de dois pontos de fusão, constatando a presença dos dois isômeros presentes nos cristais recuperados, com temperaturas de 221 e 235 °C, para a forma α e β respectivamente. Essa diferença de temperatura de fusão para o isômero β em relação às duas amostras pode ser justificada pela quantidade de água presente na superfície e na amostra como todo. Após as temperaturas de fusão, a maior perda de massa ocorreu de modo semelhante α lactose monohidratada, para uma temperatura a partir de 306 °C.

5.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A obtenção das micrografias obtidas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura permite conhecer a morfologia das amostras de lactose recuperadas e também comparar as imagens do padrão de lactose.

De acordo com a Figura 23 (a) foi observado que a lactose pura apresentou um formato tipo cunha frequentemente encontrado em padrões comerciais (KOUGOULOS *et al.*, 2010). Em relação aos demais casos Figura 23 (b), (c) e (d) os cristais referentes à lactose recuperada tiveram sua morfologia alterada durante o processo de cristalização. Foi observado na Figura 23 (d) que o processo de recuperação sem agitação resultou em um conglomerado de cristais

que pode ser explicado pela dificuldade de nucleação proveniente da ausência da agitação (WONG e HARTEL, 2014).

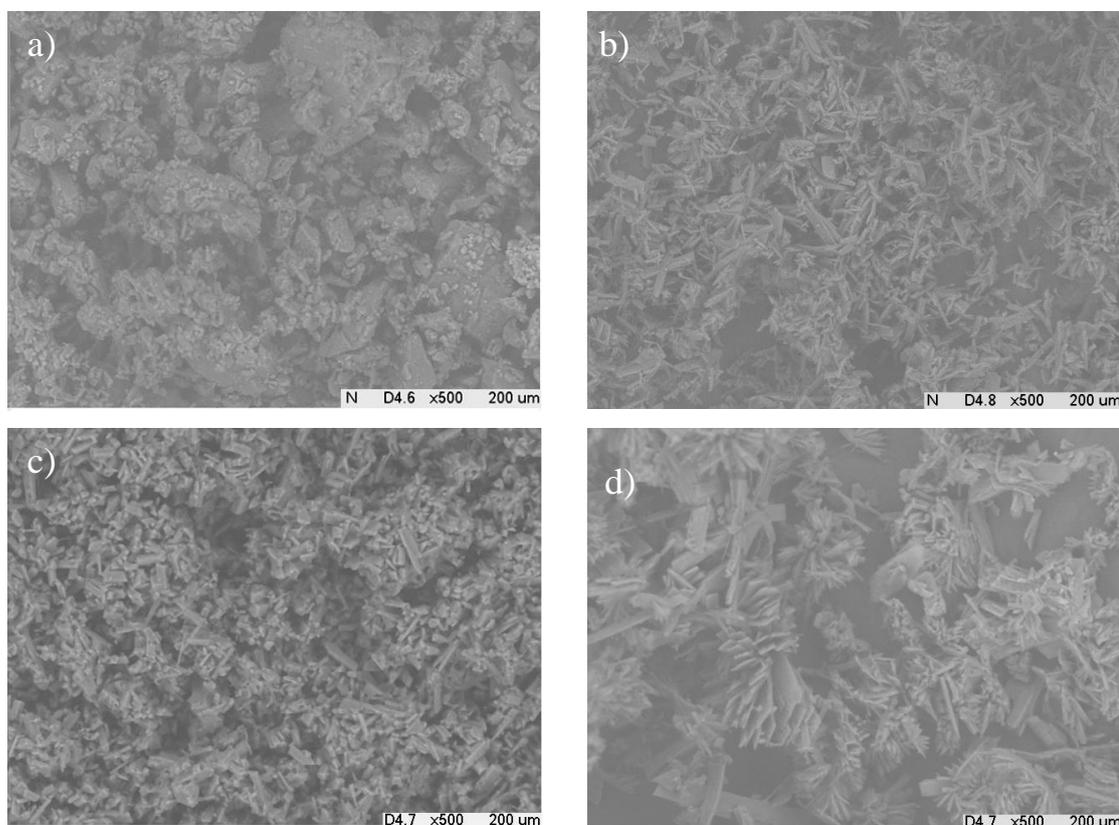


Figura 23: Efeito do volume de etanol e do tempo de agitação nos cristais da lactose: a) Lactose padrão. b) Lactose recuperada com adição de 60 mL de etanol e tempo de agitação de 60 min. c) Lactose recuperada com adição de 40 mL de etanol e tempo de agitação de 10 min. d) Lactose recuperada com adição de 50 mL de etanol e tempo de agitação de 60 min sem agitação.

A partir das imagens do MEV foi possível através do Software Livre ImageJ calcular o diâmetro médio dos cristais. Os cálculos obtidos se basearam no diâmetro médio de Ferret que mede distância média entre pares de retas paralelas tangentes ao contorno projetado da partícula (MATHAES *et al.*, 2013). Os resultados encontrados foram descritos através da Tabela 17. Com base nesses resultados e por meio do gráfico de Pareto, foi possível avaliar a variável que exerceu maior influência no tamanho médio do diâmetro dos cristais de lactose no processo de recuperação.

Através do gráfico de Pareto descrito na Figura 24, observou-se que o tempo de agitação foi estatisticamente mais significativo do que o volume de etanol. O fato do volume de etanol ser menos significativo foi explicado por KOUGOULOS *et al.* 2010 que sugerem que o anti-solvente é responsável pela formação dos cristais apenas na etapa de nucleação,

prevalecendo depois a nucleação secundária cujo mecanismo de surgimento dos cristais é baseado nos cristais existentes. Já o tamanho dos cristais diminuiu ao longo do tempo o que pode ser atribuído aos choques mecânicos durante o processo de cristalização.

Tabela 17: Influência do volume de etanol e tempo de agitação no diâmetro dos cristais da lactose recuperada.

| Ensaio | Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) | Diâmetro médio (μm) |
|------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | 40 | 10 | 100 |
| 2 | 60 | 10 | 95 |
| 3 | 40 | 60 | 47 |
| 4 | 60 | 60 | 58 |
| 5 | 50 | 35 | 87 |
| 6 | 50 | 35 | 86 |
| 7 | 50 | 35 | 89 |
| * Controle | 50 | 60 | 139 |

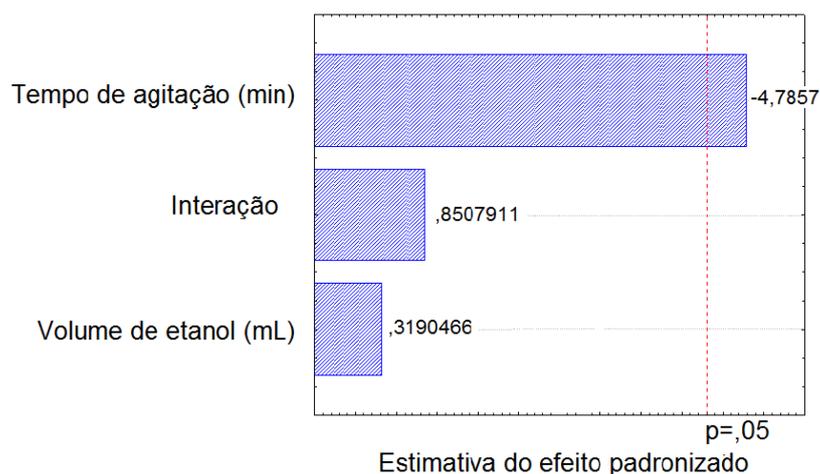


Figura 24: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio dos cristais da lactose em solução sintética durante a cristalização.

5.9 Análise dos cristais de lactose

As amostras dos cristais de lactose recuperados em solução sintética e obtidas da recuperação do eluente percolado do adsorvente, após a remoção da lactose do leite, foram analisadas em microscópio óptico (40 x ampliação) e as imagens foram tratadas através do software livre *ImageJ* para evidenciar o diâmetro médio dos cristais conforme Figura 25. Com a ferramenta análise de partículas do *ImageJ* obteve-se o Diâmetro de Ferreti que permite

obter a maior distância entre quaisquer dos pontos ao longo do objeto em estudo, conforme os dados da Tabela 18.

Tabela 18: Influência do volume de etanol e tempo de agitação no diâmetro dos cristais da lactose recuperada em solução sintética e no leite.

| Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) | Cristais de lactose de solução sintética Diâmetro médio (μm) | Cristais de lactose do leite após a recuperação do eluente Diâmetro médio (μm) |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 40 | 10 | 100 | 94 |
| 50 | 35 | 87 | 81 |
| 60 | 60 | 58 | 50 |

Com base nos resultados obtidos, observou-se que o diâmetro médio dos cristais de lactose recuperados da solução padrão e do leite apresentaram valores muito próximos, considerando um erro médio de 3 %. Em relação à influência das variáveis, conforme discutido anteriormente item 5.8, o volume de etanol se mostrou significativo apenas para na eficiência na recuperação dos cristais, exercendo um menor efeito em relação aos tamanhos das partículas. Esse efeito foi justificado pelo fato do volume está diretamente relacionado ao estado inicial da formação dos cristais, sendo responsável por proporcionar a condição de supersaturação da solução (BUND e PANDIT, 2007b).

Esses resultados mostraram que a variável tempo de agitação exerce um efeito maior no diâmetro médio das partículas de lactose recuperada. Essa característica foi evidenciada por BUND e PANDIT, (2007b) que atribuíram o choque mecânico entre os cristais, como o responsável pela interrupção do ponto de rupturas das partículas. O aumento de tamanho das partículas com a redução do tempo de agitação se deve ao fenômeno indesejado de aglomeração, causado pelas taxas de nucleação rápidas durante a cristalização (BUND e PANDIT, 2007b).

Através da variação no diâmetro médio dos cristais de lactose, é possível direcionar de acordo com a Farmacopéia americana (USP, 2009) qual a aplicação mais adequada em função do tamanho médio das partículas obtidas. Os resultados da Tabela de 19 mostraram que com exceção dos cristais de diâmetros de 100 e 90 μm , todos os outros cristais possuem diâmetros dentro da faixa das principais aplicações na indústria farmacêutica. Resultados semelhantes foram encontrados por PARIMALADEVI e SRINIVASAN (2014) que estudaram a influência no tamanho dos cristais para diferentes taxas de supersaturação e obtiveram cristais com uma faixa de 60 a 80 μm para um processo de supersaturação lenta.

De acordo com THOORENS *et al.* (2014) a escolha adequada do tamanho médio das partículas é uma característica determinante na eficiência do uso da lactose como fármaco, afetando as propriedades de dispersão de fluxo, compressibilidade, dissolução e estabilidade.

Em alguns casos, o material sofre muitos eventos de impacto antes de uma quantidade significativa da fração de tamanho de partícula ser alcançada e separada das partículas maiores. A moagem intensa, por exemplo, pode causar indesejadas mudanças nas propriedades físico-químicas do material, criando regiões amorfas na superfície, que podem afetar a higroscopicidade e a sua estabilidade (PILCER *et al.*, 2012).

Neste contexto, observou-se que através dos parâmetros operacionais utilizados durante a cristalização, é possível definir a faixa de tamanho médios das partículas, com base na aplicação de interesse.

Tabela 19: Aplicação dos cristais de lactose na indústria farmacêutica em função do diâmetro médio.

| Aplicações da lactose Indústria farmacêutica | Farmacopéia Americana Faixa de diâmetro (µm) | Cristais de lactose em solução sintética Diâmetro médio (µm) | Cristais de lactose após a recuperação do eluente Diâmetro médio (µm) |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Excipiente | $45 \leq d \leq 150$ | 100 | 94 |
| Carreador de pó (inalação) | $10 \leq d \leq 90$ | 87 | 81 |
| Aglutinante e diluente | $45 \leq d \leq 250$ | 58 | 50 |

Além disso, foi possível observar através da Figura 25 que o tempo de agitação influencia a morfologias dos cristais. De acordo com as Figuras 25 a) e 25 c) foi possível observar que os cristais obtidos para os diferentes tempos de agitação possuem geometria distinta, sendo classificada de acordo com PARIMALADEVI e SRINIVASAN (2014) como tomahawk (devido ao formato se assemelhar com o machado utilizado pelos índios) e needle (agulhas devido ao formato mais alongado). Resultados semelhantes foram encontrados por KOUGOULOS *et al.* (2010) que observaram que menores tempo de agitação proporcionam a formação de Needle (agulhas), enquanto que tempos maiores acarretam em cristais do tipo (Tomahawk). Para KOUGOULOS *et al.* (2010), a mudança na geometria do cristais está diretamente relacionada a taxas de supersaturação, taxas rápidas proporcionam cristais do tipo Tomahawk, enquanto que taxas lentas acarretam a formação de cristais do tipo Needle.

A morfologia dos cristais de lactose obtidos também deve ser levada em consideração nas aplicações da lactose na indústria farmacêutica, principalmente na sua utilização como carreador de pó seco. A adesão de partículas do fármaco ao transportador é uma interação de superfície em que o desempenho do carreador depende da área de contato, da energia superficial e da geometria de suas partículas.

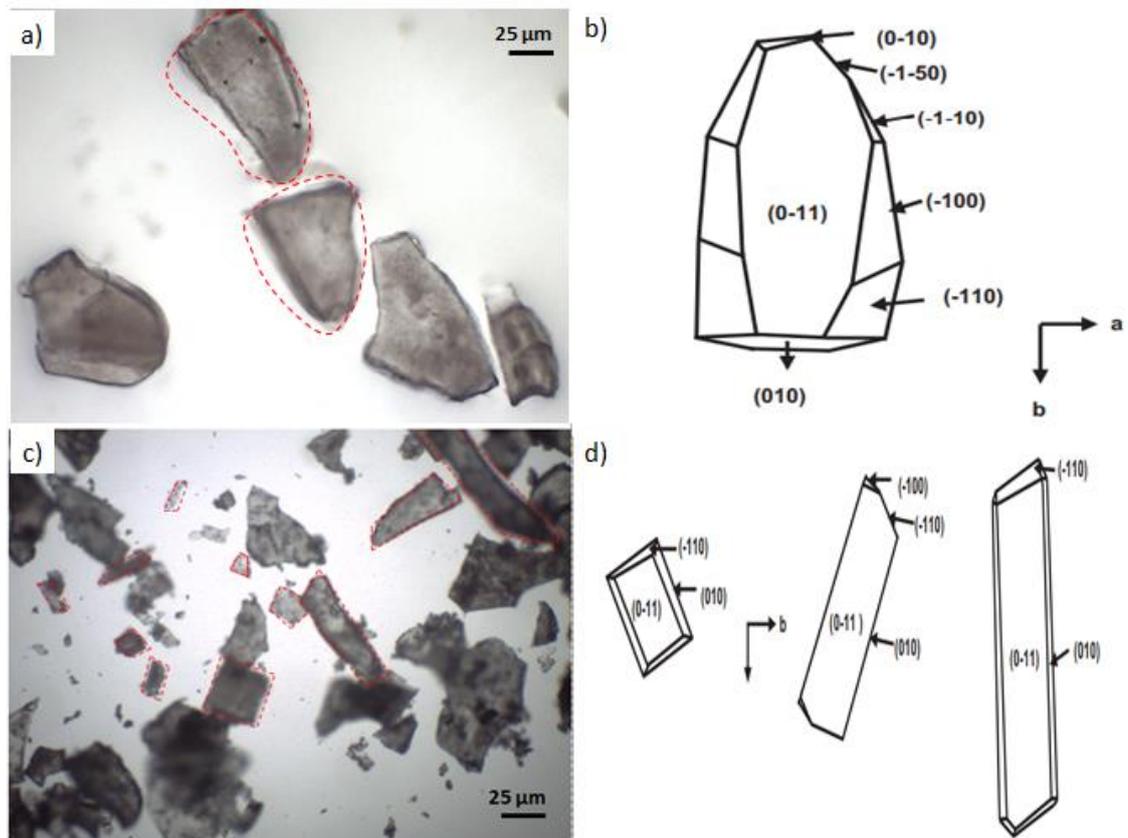


Figura 25: a) Imagem microscópica dos cristais de lactose com morfologia tomahawk obtida para 60 mL - 60 min b) esquemático da morfologia tomahawk (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2013) c) Imagem microscópica dos cristais de lactose com morfologia semelhante a agulhas curtas e alongadas obtida para 40 mL - 10 min d) esquemático da morfologia de agulhas curtas e alongadas (PARIMALADEVI e SRINIVASAN, 2013).

A partir deste estudo, foi possível verificar através do processo de cristalização da lactose, que é possível definir a partir das condições operacionais, o tamanho médio e a geometria dos cristais baseados nos tipos de aplicações farmacêuticas.

5.10 Processo integrado

O processo integrado de recuperação da lactose do leite é uma invenção na área de transformação de produtos lácteos que visa atender mercados potenciais a partir da produção

de dois subprodutos (leite com baixo teor de lactose e lactose) com alto valor agregado. Essa demanda surgiu a partir da necessidade do uso de produtos com baixo teor de lactose, gerada por uma parcela da população intolerante e devido aos gastos com a importação de lactose, presente em várias aplicações industriais.

Esse processo consiste na integração das etapas de remoção, recuperação e purificação conforme o diagrama da Figura 26. A etapa de remoção se dá através da adsorção da lactose do leite através de uma coluna de leito fixo, recheada com o adsorvente impresso molecularmente PIM.

Através dessa etapa de adsorção, foi possível produzir a partir de um adsorvente de alta estabilidade, síntese fácil e alta capacidade de reutilização, um leite com baixo teor de lactose que atenda as características exigidas por órgãos regulamentadores. Além disso, o uso do adsorvente quando comparado com outros métodos, permite que o processo opere em condições mais amenas de pressão e temperatura.

Após a primeira etapa, a lactose retida na coluna é recuperada por meio do processo de dessorção, utilizando como solvente a água ultrapura. Essa recuperação ocorre sem degradação do adsorvente, em virtude das biomoléculas de lactose serem retidas na superfície do adsorvente por meio de adsorção física.

A adsorção física que ocorre durante o processo de adsorção é um fenômeno reversível, apresentando como vantagem a possibilidade de reuso do adsorvente, permitindo a sua utilização em vários ciclos, acarretando a redução do tempo e do número de síntese necessários para a obtenção do polímero impresso molecularmente.

Por fim, a última etapa consiste na purificação da lactose recuperada através da cristalização por adição do anti-solvente etanol. Antes da cristalização, a caseína responsável pela inibição do processo de formação dos cristais, foi precipitada, permitindo a possibilidade de utilização em outras aplicações.

A cristalização por adição de etanol, ocorre em virtude da baixa solubilidade da lactose nesse solvente. A utilização desse solvente, permite uma formação rápida dos cristais de lactose, tornando-se uma solução atrativa em virtude do seu baixo custo e da sua baixa toxicidade.

Desta forma, o processo integrado proposto apresenta como principais características potenciais, a facilidade de implementação, operação em condições brandas de pressão e temperatura, possibilidade de reuso e operação em sistemas contínuos que permite a ampliação de escala.

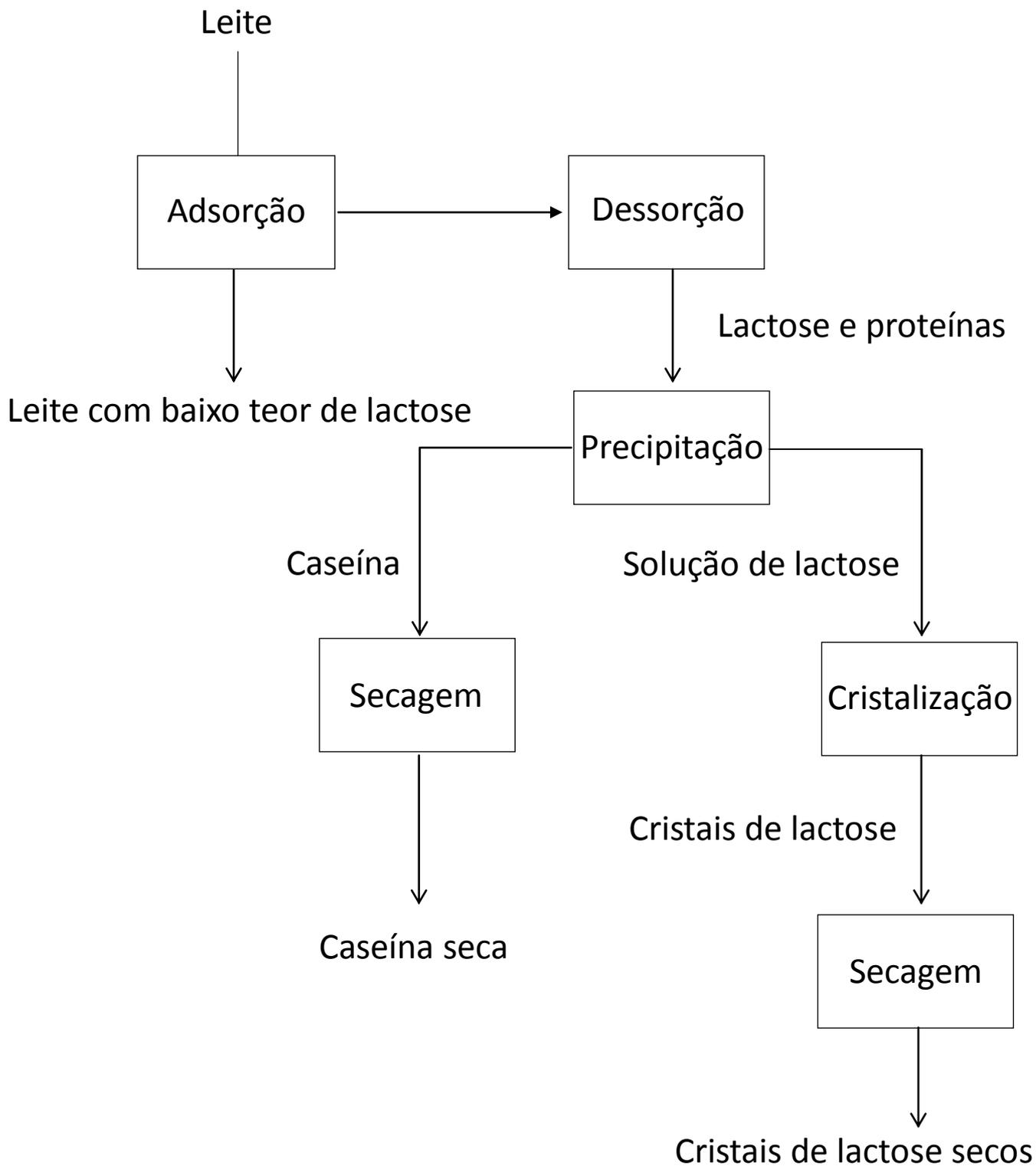


Figura 26: Diagrama esquemático do processo integrado de recuperação da lactose do leite.

6. CONCLUSÕES

A partir do estudo da adsorção da lactose em processo batelada, foi possível determinar o tempo de equilíbrio e a quantidade de adsorvente PIM necessária para obter a máxima capacidade de adsorção. Esses parâmetros são fundamentais para o desenvolvimento de estudos cinéticos e para construção das isotermas, permitindo a maior compreensão das interações entre o adsorvente e a biomolécula de lactose.

Os estudos de dessorção demonstraram a viabilidade da recuperação da lactose de partículas adsorventes (PIM). De acordo com os resultados obtidos, mostraram que a vazão exerceu maior influência no processo de recuperação, apresentando um efeito negativo em relação ao rendimento da lactose recuperada. Essa viabilidade foi elucidada por meio das cinéticas de dessorção, que por sua vez se mostraram rápidas com tempos inferiores ao tempo de saturação de 30 min.

A integração dos processos de adsorção/dessorção seguido do processo de cristalização mostrou-se viável tecnologicamente, para o estudo de obtenção da lactose do leite. Além deste trabalho ter como objetivo a recuperação da lactose, foi possível obter como subproduto o leite com baixo teor de lactose.

O estudo de reuso do adsorvente PIM mostrou que o adsorvente mantém a sua capacidade de adsorção praticamente estável. Após os cinco ciclos de adsorção e dessorção, o adsorvente mantém sua estrutura mesoporosa estável, podendo ser reutilizado.

A técnica de cristalização permitiu a obtenção de cristais dentro de uma faixa de tamanho compatível com as principais aplicações farmacêuticas, permitindo a modificação dessa faixa e da morfologia dos cristais a partir das condições operacionais.

A lactose recuperada apresentou parâmetros físico-químicos próximos dos parâmetros exigidos pela Farmacopéia brasileira. Os testes microbiológicos realizados no leite e na lactose recuperada indicaram que não houve nenhuma contaminação ao longo do processo, o que potencializa o uso da lactose obtida para diferentes aplicações.

O sistema integrado proposto permitiu a obtenção da lactose do leite, operando em um sistema contínuo permitira a ampliação de escala do sistema. A tecnologia utilizada nesse sistema se mostrou como uma alternativa a tecnologias existentes, apresentando como principais vantagens a facilidade de implementação e a baixa energia empregada.

A principal contribuição deste trabalho foi o estudo de um novo sistema integrado de recuperação de lactose, capaz de extrair essa biomolécula diretamente do leite em condições

brandas de temperatura e pressão, sem acarretar danos as propriedades sensoriais da sua matriz.

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

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

1- Estudar o processo de recuperação da lactose através de sistema com múltiplas colunas, com ciclos contínuos de adsorção e dessorção.

2- Avaliar a eficiência do adsorvente PIM a partir de um outro tipo de regeneração, como por exemplo a térmica.

3- Estudar a cinética de formação dos cristais de lactose durante o processo de cristalização, avaliando o efeito na morfologia e distribuição dos cristais.

4- Fazer simulação e otimização do sistema integrado de recuperação de lactose, visando o aumento de escala (*Scale-up*).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABBASI, S.; SAEEDABADIAN, A. Influences of lactose hydrolysis of milk and sugar reduction on some physical properties of ice cream, *Journal of Food Science and Technology*, 2003, p. 1–8, 2013.
- ABDOLALI, A.; GUO, W. S.; NGO, H. H.; CHEN, S. S.; NGUYEN, N. C.; TUNG, K. L. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review, *Bioresource Technology*, 160, p. 57–66, 2014.
- AHMED, M. A.; ABDELBAR, N. M.; MOHAMED, A. A. Molecular imprinted chitosan-TiO₂nanocomposite for the selective removal of Rose Bengal from wastewater. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, p. 1046–1053, 2018.
- ANASTOPOULOS, I.; KYZAS, G. Z. Agricultural peels for dye adsorption: A review of recent literature, *Journal of Molecular Liquids*, 200, p. 381–389, 2014.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase, *Food and Bioproducts Processing*, 90, p. 351–359, 2012.
- ASHRAF, S.; ABBASI, A. Z.; PFEIFFER, C.; HUSSAIN, S. Z.; KHALID, Z. M.; GIL, P. R.; PARAK, W. J.; HUSSAIN, I. Protein-mediated synthesis, pH-induced reversible agglomeration, toxicity and cellular interaction of silver nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, p. 511–518, 2013.
- AWUAL, M. R.; YAITA, T.; EL-SAFETY, S. A.; SHIWAKU, H.; OKAMOTO, Y.; SUZUKI, S. Investigation of palladium(II) detection and recovery using ligand modified conjugate adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, 222, p. 172–179, 2013.
- BALIEIRO, A. L.; SANTOS, R. A.; PEREIRA, M. M.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; ALSINA, O. L. S. De; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Adsorption process of molecularly imprinted silica for extraction of lactose from milk, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33, p. 361–372, 2016.
- BILAL, M.; SHAH, J. A.; ASHFAQ, T.; GARDAZI, S. M. H.; TAHIR, A. A.; PERVEZ, A.; HAROON, H.; MAHMOOD, Q. Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater-A review, *Journal of Hazardous Materials*, 263, p. 322–333, 2013.

- 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.
- BOTARO B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Effect of beta-lactoglobulin polymorphism and seasonality on bovine milk composition. *Journal Dairy Research*, 75, p.176-81, 2008.
- BUND, R. K.; PANDIT, Rapid lactose recovery from buffalo whey by use of “anti-solvent, ethanol”, *Journal of Food Engineering*, 82, p. 333–341, 2007a.
- BUND, R. K.; PANDIT, Sonocrystallization: Effect on lactose recovery and crystal habit, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, p. 143–152, 2007b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 dez. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, Brasília, DF, 2017.
- BRUSCHI, L.; MISTURA, G.; PHADUNGBUT, P.; DO, D. D.; NICHOLSON, D.; MAYAMEI, Y.; LEE, W. Adsorption on ordered and disordered duplex layers of porous anodic alumina. *Langmuir*, 31, p. 4895–4905, 2015.
- CAMPOS, P. P.; MORAES, M. L.; VOLPATI, D.; MIRANDA, P. B.; OLIVEIRA, O. N.; FERREIRA, M. Amperometric detection of lactose using galactosidase immobilized in layer-by-layer films, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6, p. 11657–11664, 2014.
- CECHINEL, M. A. P.; ARRUDA M. S.; SOUZA, G. U.; SOUSA, A. A. U. Study of lead (II) adsorption onto activated carbon originating from cow bone *Journal of Cleaner Production*, 65, 342–349, 2014.
- CHABANON, E.; MANGIN, D.; CHARCOSSET, C. Membranes and crystallization processes: State of the art and prospects, *Journal of Membrane Science*, 509, p. 57–67, 2016.

- CHANDRAPALA, J.; WIJAYASINGHE, R.; VASILJEVIC, T. Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems, *Journal of Food Engineering*, 178, p. 181–189, 2016.
- CHAVES, J. A. P. **Adsorção de corantes têxteis sobre quitosana: condições, modelagem e otimização.** Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2009.
- CHENG, W.; MA, H.; ZHANG, L.; WANG, Y. Hierarchically imprinted mesoporous silica polymer: An efficient solid-phase extractant for bisphenol A, *Talanta*, 120, p. 255–261, 2014.
- CHIAVOLA, A.; D'AMATO, E.; BACIOCCHI, R. Ion exchange treatment of groundwater contaminated by arsenic in the presence of sulphate. Breakthrough experiments and modeling. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223, p. 2373–2386, 2012.
- CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46, p. 398–404, 2007.
- CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits, *Food Control*, 42, p. 188–201, 2014.
- CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T. Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA–SiO₂) hybrid material synthesized with different molar ratios, *Materials Science and Engineering: C*, 44, p. 99–108, 2014.
- CRUZ-OLIVARES, J.; PÉREZ-ALONSO, C.; BARRERA-DÍAZ, C.; UREÑA-NUÑEZ, F.; CHAPARRO-MERCADO, M. C.; BILYEU, B. Modeling of lead (II) biosorption by residue of allspice in a fixed-bed column. *Chemical Engineering Journal*, 228, p. 21–27, 2013.
- CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M. I.; SORIANO-COSTA, E.; MENDOZA-ROCA, J. A.; IBORRA-CLAR, M. I.; LORA-GARCÍA, J. A study of the separation of lactose from whey ultrafiltration permeate using nanofiltration, *Desalination*, 241, p. 244–255, 2009.

- DA'NA, E. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 247, p. 145–157, 2017.
- DAS, D.; LANGRISH, T. a G. Activated-rate theory: Effect of protein inhibition and the temperature dependence of crystallization kinetics for lactose-protein mixtures, *Food Research International*, 48, p. 367–373, 2012.
- DEVI, P.; SAROHA, A. K. Utilization of sludge based adsorbents for the removal of various pollutants: A review, *Science of The Total Environment*, 578, p.16–33, 2016.
- DINCER, T. D.; ZISU, B.; VALLET, C. G. M. R.; JAYASENA, V.; PALMER, M.; WEEKS, M. Sonocrystallisation of lactose in an aqueous system, *International Dairy Journal*, 35, p. 43–48, 2014.
- DING, J.; GAO, Q.; LI, X. S.; HUANG, W.; SHI, Z. G.; FENG, Y. Q. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic carbon nanotube for the determination of estrogens in milk. *Journal of Separation Science*, 34, p. 2498–2504, 2011.
- ECKHOFF, J. Process for improving yield in the recovery of lactose essentially free of minerals from whey. EP20120152026. 22 jan. 2012, 24 jul. 2013. European Patent Office.
- EL-BINDARY, A. A.; HUSSIEN, M. a.; DIAB, M. a.; EESSA, A. M. Adsorption of Acid Yellow 99 by polyacrylonitrile/activated carbon composite: Kinetics, thermodynamics and isotherm studies, *Journal of Molecular Liquids*, 197, p. 236–242, 2014.
- EL-SHEIKH, A. H.; NEWMAN, A. P.; SAID, A. J.; ALZAWAHREH, A. M.; ABU-HELAL, M. M. Improving the adsorption efficiency of phenolic compounds into olive wood biosorbents by pre-washing with organic solvents: Equilibrium, kinetic and thermodynamic aspects, *Journal of Environmental Management*, 118, p. 1–10, 2013.
- ESCOBAR, C.; DOS SANTOS, J. H. Z. Effect of the sol-gel route on the textural characteristics of silica imprinted with Rhodamine B, *Journal of Separation Science*, 37, p. 868–875, 2014.
- FAEDO, R.; BRIÃO, V. B.; CASTOLDI, S. Obtenção De Leite Com Baixo Teor De Lactose Por Processos De Separação Por Membranas Associados À Hidrólise Enzimática, *Revista CIATEC-UPF*, 5, p. 44–54, 2013.

- FERNÁNDEZ GARCÍA, L.; ÁLVAREZ BLANCO, S.; RIERA RODRÍGUEZ, F. A. Microfiltration applied to dairy streams: Removal of bacteria, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, p. 187–196, 2013.
- FERRARO, V.; CRUZ, I. B.; JORGE, R. F.; PINTADO, M. E.; CASTRO, P. M. L. Effects of physical parameters onto adsorption of the borderline amino acids glycine, lysine, taurine, and tryptophan upon amberlite XAD16 resin, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 58, p. 707–717, 2013.
- FISCHER, J.; GUIDINI, C. Z.; SANTANA, L. N. S.; DE RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85–86, p. 178–186, 2013.
- FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Production and Utilization of Milk, *In: Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1, p. 1–19, 2015a.
- FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Lactose, *In: Dairy Chemistry and Biochemistry*, 2, p. 21–68, 2015b.
- GABBI, a. M.; MCMANUS, C. M.; SILVA, a. V.; MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; STUMPF, M. P.; FISCHER, V. Typology and physical-chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies, *Agricultural Systems*, 121, p. 130–134, 2013.
- GHASEMI, M.; NAUSHAD, M.; GHASEMI, N. Adsorption of Pb (II) from aqueous solution using new adsorbents prepared from agricultural waste : Adsorption isotherm and. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, p. 2193–2199, 2014.
- GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications, *International Dairy Journal*, 26, p. 103–111, 2012.
- HADI, P.; XU, M.; NING, C.; SZE, C.; LIN, K.; MCKAY, G. A critical review on preparation , characterization and utilization of sludge-derived activated carbons for wastewater treatment, *Chemical Engineering Journal*, 260, p. 895–906, 2015.
- HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects, *International Dairy Journal*, 22, p. 104–109, 2012.

- HUANG, W.; SHI, Y.; WANG, C.; YU, K.; SUN, F.; LI, Y. Using spray-dried lactose monohydrate in wet granulation method for a low-dose oral formulation of a paliperidone derivative, *Powder Technology*, 246, p. 379–394, 2013.
- HUPPERTZ, T.; GAZI, I. Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability, *Journal of Dairy Science*, 99, p. 6842–6851, 2016.
- HUSSEIN, M. S.; AHMED, M. J. Fixed bed and batch adsorption of benzene and toluene from aromatic hydrocarbons on 5A molecular sieve zeolite Materials, *Chemistry and Physics*, 1-6, 2016.
- IBGE. Pesquisa da pecuária municipal e censo agropecuário. Rio de Janeiro: Sidra, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- Instituto Adolfo Lutz; Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4ª ed., IMESP: São Paulo, 2008.
- 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.
- JANG, J.; LEE, D. S. Enhanced adsorption of cesium on PVA-alginate encapsulated Prussian blue-graphene oxide hydrogel beads in a fixed-bed column system. *Bioresource Technology*, 218, p. 294–300, 2016.
- JASNI, M. J. F.; ARULKUMAR, M.; SATHISHKUMAR, P.; MOHD YUSOFF, A. R.; BUANG, N. A.; GU, F. L. Electrospun nylon 6,6 membrane as a reusable nano-adsorbent for bisphenol a removal: adsorption performance and mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 508, p. 591-612, 2017.
- JAWAD, R.; DRAKE, A. F.; ELLEMAN, C.; MARTIN, G. P.; WARREN, F. J.; PERSTON, B. B.; ELLIS, P. R.; HASSOUN, M. A.; ROYALL, P. G. Stability of sugar solutions: A novel study of the epimerization kinetics of lactose in water, *Molecular Pharmaceutics*, 11, p. 2224–2238, 2014.
- KILIÇ, M.; KIRBIYIK, Ç.; ÇEPELIOĞULLAR, Ö.; PÜTÜN, A. E. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by bio-char, a by-product of pyrolysis, *Applied Surface Science*, 283, p. 856–862, 2013.

- KIRA KOTOVA, MUNAWAR HUSSAIN, GHULAM MUSTAFA, P. A. L. MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity, *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 4–7, 2013.
- KIRK, J. H.; DANN, S. E.; BLATCHFORD, C. G. Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 334, p. 103–114, 2007.
- KIRYU, T.; YAMAUCHI, K.; MASUYAMA, A.; OOE, K.; KIMURA, T.; KISO, T.; NAKANO, H.; MURAKAMI, H. Optimization of Lactobionic Acid Production by *Acetobacter orientalis* Isolated from Caucasian Fermented Milk, “Caspian Sea Yogurt”. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, p. 361–363, 2012.
- KNÖÖS, P.; SCHULZ, C.; PICULELL, L.; LUDWIG, R.; GORTON, L.; WAHLGREN, M. Quantifying the release of lactose from polymer matrix tablets with an amperometric biosensor utilizing cellobiose dehydrogenase, *International Journal of Pharmaceutics*, 468, p. 121–132, 2014.
- KOUGOULOS, E.; MARZIANO, I.; MILLER, P. R. Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size, *Journal of Crystal Growth*, 312, p. 3509–3520, 2010.
- LALCHHINGPUII; TIWARI, D.; LALHMUNSIAMA; LEE, S. M. Chitosan templated synthesis of mesoporous silica and its application in the treatment of aqueous solutions contaminated with cadmium(II) and lead(II). *Chemical Engineering Journal*, 328, p. 434–444, 2017.
- LENKA, M.; SARKAR, D. Determination of metastable zone width, induction period and primary nucleation kinetics for cooling crystallization of L-asparaginenohydrate, *Journal of Crystal Growth*, 408, p. 85–90, 2014.
- LI, J.; FANG, M.; HE, H.; SHAO, J.; LI, Z. Influence of adsorption kinetics on stress evolution in magnetron-sputtered SiO₂ and SiN_x films, *Journal of Applied Physics*, 114, 2013.
- LI, S.; CAO, S.; WHITCOMBE, M. J.; PILETSKY, S. A. Size matters: Challenges in imprinting macromolecules, *Progress in Polymer Science*, 39, p. 145–163, 2014a.
- LI, X.; ZHANG, B.; LI, W.; LEI, X.; FAN, X.; TIAN, L.; ZHANG, H.; ZHANG, Q. Preparation and characterization of bovine serum albumin surface-imprinted

- thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition, *Biosensors and Bioelectronics*, 51, p. 261–267, 2014b.
- LI, X.; WU, D.; WANG, J.; ZHU, W.; LUO, Y.; HAN, C.; MA, W.; HE, S. Synthesis of large-sized mesoporous silica spheres by pseudomorphic transformation of commercial silica spheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, 226, p. 309–315, 2016a.
- LI, Y.; LI, L.; CAO, L.; YANG, C. Promoting dynamic adsorption of Pb²⁺ in a single pass flow using fibrous nano-TiO₂/cellulose membranes. *Chemical Engineering Journal*, 283, p. 1145–1153, 2016b.
- LISTIOHADI, Y., HOURIGAN, J.A., SLEIGH, R.W., STEELE, R.J. Thermal analysis of amorphous lactose and α -lactose monohydrate, *Dairy Science & Technology*, 89, 43-67, 2009.
- LIU, Y.; HU, X.; LIU, Z.; MENG, M.; PAN, J.; JIANG, Y.; NI, L.; WU, W. A novel dual temperature responsive mesoporous imprinted polymer for Cd(II) adsorption and temperature switchable controlled separation and regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 328, p. 11–24, 2017.
- 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, p. 48–53, 2012.
- MAGALHÃES M. V. F.; SANTOS L. C. G.; KOBAYASHI, P. F. Análise físico-química e microbiológica do leite pasteurizado integral tipo C comercializado em Aracaju-SE. *Scientia Plena*, 11, p. 4–8, 2015.
- MAHMOODIAN, H.; MORADI, O.; SHARIATZADEHA, B.; SALEHF, T. A.; TYAGI, I.; MAITY, A.; ASIF, M.; GUPTA, V. K. Enhanced removal of methyl orange from aqueous solutions by poly HEMA-chitosan-MWCNT nano-composite. *Journal of Molecular Liquids*, 202, p.189–198, 2015.
- MATHAES, R.; WINTER, G.; ENGERT, J.; BESHEER, A. Application of different analytical methods for the characterization of non-spherical micro- And nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 453, p. 620–629, 2013.

- MATIGNON, A.; NEVEU, A.; DUCEPT, F.; CHANTOISEAU, E.; BAREY, P.; MAUDUIT, S.; MICHON, C. Influence of thermo-mechanical treatment and skim milk components on the swelling behavior and rheological properties of starch suspensions, *Journal of Food Engineering*, 150, p. 1–8, 2015.
- MEHTA, C. M.; BATSTONE, D. J. Nucleation and growth kinetics of struvite crystallization, *Water Research*, 47, p. 2890–2900, 2013.
- MORLOCK, G. E.; MORLOCK, L. P.; LEMO, C. Streamlined analysis of lactose-free dairy products, *Journal of Chromatography A*, 1324, p. 215–223, 2014.
- NEZHADALI, A.; ES'HAGHI, Z.; KHATIBI, A. D. Selective Extraction of Cholesterol from Dairy Samples Using a Polypyrrole Molecularly Imprinted Polymer and Determination by Gas Chromatography. *Food Analytical Methods*, 10, p. 1397–1407, 2017.
- NJOKU, V. O.; ISLAM, M. A.; ASIF, M.; HAMEED, B. H. Utilization of sky fruit husk agricultural waste to produce high quality activated carbon for the herbicide bentazon adsorption, *Chemical Engineering Journal*, 251, p. 183–191, 2014.
- OKOLO, G. N.; EVERSON, R. C.; NEOMAGUS, H. W. J. P.; ROBERTS, M. J.; SAKUROVS, R. Comparing the porosity and surface areas of coal as measured by gas adsorption, mercury intrusion and SAXS techniques. *Fuel*, 141, p. 293–304, 2015.
- OLIVEIRA, G. R.; SANTOS, A. V.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; LEITE, M. S. LWT - Food Science and Technology Neural modelling in adsorption column of cholesterol-removal efficiency from milk, *Food Science and Technology*, 64, p. 632–638, 2015.
- PARIMALADEVI, P.; SRINIVASAN, K. Influence of supersaturation level on the morphology of α -lactose monohydrate crystals, *International Dairy Journal*, 39, p. 301–311, 2014.
- PATEL, S. R.; MURTHY, Z. V. P. Waste valorization: Recovery of lactose from partially deproteinated whey by using acetone as anti-solvent, *Dairy Science & Technology*, 2011.
- PATEL, S. R.; MURTHY, Z. V. P. Lactose Recovery Processes from Whey: A Comparative Study Based on Sonocrystallization, *Separation & Purification Reviews*, 41, p. 251–266, 2012.

- PATIL, S. S.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Liquid crystalline phase as a probe for crystal engineering of lactose: Carrier for pulmonary drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, p. 43–50, 2015.
- PEDRUZZI, I.; BORGES DA SILVA, E. A.; RODRIGUES, A. E. Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: A kinetic study, *Enzyme and Microbial Technology*, 49, p. 183–191, 2011.
- PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30, p. 619–627, 2014.
- PILCER, G.; WAUTHOZ, N.; AMIGHI, K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, p. 233–256, 2012.
- QUESADA-MOLINA, C.; CLAUDE, B.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; DEL OLMO-IRUELA, M.; MORIN, P. Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, 135, p. 775–779, 2012.
- RIBAS, N.P.; HARTMANN, W.; MONARDES H. G.; ANDRADE, U.V. C. Sólidos totais do leite em amostras de Tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33, p.2343-2350, 2004.
- ROMÁN, S.; LEDESMA, B.; ÁLVAREZ-MURILLO, A.; GONZÁLEZ, J. F. Comparative study on the thermal reactivation of spent adsorbents, *Fuel Processing Technology*, 16, p. 358–365, 2013.
- RUTHVEN, D. M., **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 433.
- SALVADOR, F.; MARTIN-SANCHEZ, N.; SANCHEZ-HERNANDEZ, R.; SANCHEZ-MONTERO, M. J.; IZQUIERDO, C. Regeneration of carbonaceous adsorbents. Part II: Chemical, Microbiological and Vacuum Regeneration, *Microporous and Mesoporous Materials*, 202, p. 277–296, 2015.
- SANTONOCITO, C.; SCAPATICCI, M.; GUARINO, D.; ANNICCHIARICO, E. B.; LISCI, R.; PENITENTE, R.; GASBARRINI, A.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. Lactose intolerance genetic testing: Is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients. *Clinica Chimica Acta*, 439, p. 14–17, 2015.

- SANTOS, A.V. **Desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido e saborizados com frutas tropicais.** Tese de Doutorado, Universidade Tiradentes, Aracaju - SE, 2012.
- SANTOS J. S.; MACIEL L. G.; SEIXAS V. N. C. PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANA (PSM): APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA NA INDÚSTRIA LÁCTICA, *Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, 1, p. 208–225, 2014.
- SANTOS, M. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of β -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography, *Separation and Purification Technology*, 90, p. 133–139, 2012.
- SEPEHRI, S.; REZAEI, M.; GARBARINO, G.; BUSCA, G. Facile synthesis of a mesoporous alumina and its application as a support of Ni-based autothermal reforming catalysts. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, p. 3456–3464, 2016.
- 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.
- SISCOMEX. Sistema Alice. Disponível em: < <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 07 maio 2017.
- SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; SANTOS, O. A. D.; DE CASTRO, H. F. Molecular imprinting of cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, p. 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 serum, *Microchemical Journal*, 100, p. 1–7, 2012.
- SONG, X.; XU, S.; CHEN, L.; WEI, Y.; XIONG, H. Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis, *Journal of Applied Polymer Science*, 131, p. 1–18, 2014.
- SONG, W.; XU, X.; TAN, X.; WANG, Y.; LING, J.; GAO, B.; YUE, Q. Column adsorption of perchlorate by amine-crosslinked biopolymer based resin and its biological, chemical regeneration properties. *Carbohydrate Polymers*, 115, p. 432–438, 2015.

- SOTELO, J. L.; OVEJERO, G.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, S.; GARCIA, J. Analysis and modeling of fixed bed column operations on flumequine removal onto activated carbon: PH influence and desorption studies, *Chemical Engineering Journal*, 228, p. 102–113, 2013.
- SOUZA, R. R.; BERGAMASCO, R.; DA COSTA, S. C.; FENG, X.; FARIA, S. H. B.; GIMENES, M. L. Recovery and purification of lactose from whey, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49, p. 1137–1143, 2010.
- STEPHENSON, P.; STEVENS, G. S.; BERRIDGE, I. S. Lactose recovery. PCT/IB2014/059773. 14 mar 2014, 18 set 2014. World Intellectual Property Organization.
- SUN, N.; LIANG, Y.; YU, B.; TAN, C.; CUI, B. Interaction of starch and casein, *Food Hydrocolloids*, 60, p. 572–579, 2016.
- SUN, X.; TIAN, X.; ZHANG, Y.; TANG, Y. Molecularly Imprinted Layer-Coated Silica Gel Particles for Selective Solid-Phase Extraction of Pefloxacin and Enrofloxacin from Milk Samples. *Food Analytical Methods*, 6, p. 1361–1369, 2012.
- THOMSOM, D. Process for the recovery of proteins and milk-sulgar (lactose) from whey. GB200185A. 22 fev 1923, 5 july 1923. PATENT AGENCY LIMITED.
- THOORENS, G.; KRIER, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; EVRARD, B. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment - A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 473, p. 64–72, 2014.
- TOMAR, B. Lactose Intolerance and Other Disaccharidase Deficiency, *The Indian Journal of Pediatrics*, 81, p. 876–880, 2014.
- TOMASZEWSKA, M.; BIAŁOŃCZYK, L. Production of ethanol from lactose in a bioreactor integrated with membrane distillation, *Desalination*, 323, p. 114–119, 2013.
- VERNEQUE R. S.; MARTINEZ, M. L.; BRITO, J. R. F.; TEODORO, R. L.; SILVA, M. V.; PEIXOTO, M. V. Constituintes do leite nas raças Gir e Guzerá leiteiras. In: Carvalho LA, Zoccal R, Martins PC, Arcuri pb, Moreira MS, editores. Tecnologia e gestão na atividade leiteira. Juíz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**; p.323, 2005.
- WANG, W.; LI, M.; ZENG, Q. Adsorption of chromium (VI) by strong alkaline anion exchange fiber in a fixed-bed column: Experiments and models fitting and evaluating. *Separation and Purification Technology*, 149, p. 16–23, 2015.

- WONG, S. Y.; HARTEL, R. W. Crystallization in Lactose Refining-A Review, *Journal of Food Science*, 79, p. 257–272, 2014.
- WOONTON, B. W.; KULOZIK, U.; SILVA, K. De; SMITHERS, G. W. Modern Chromatographic Separation Technologies for Isolation of Dairy Ingredients. 2013.
- WU, L.; MIAO, X.; SHAN, Z.; HUANG, Y.; LI, L.; PAN, X.; YAO, Q.; LI, G.; WU, C. Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, p. 336–341, 2014.
- XU, Q.; MA, J.; ZHOU, J.; WANG, Y.; ZHANG, J. Bio-based core-shell casein-based silica nano-composite latex by double-in situ polymerization: Synthesis, characterization and mechanism, *Chemical Engineering Journal*, p. 281–289, 2013.
- XU, Z.; DING, L.; LONG, Y.; XU, L.; WANG, L.; XU, C. Preparation and evaluation of superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of bisphenol A in packed food. *Analytical Methods*, 3, p. 1737, 2011.
- YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review, *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, p. 172–184, 2014.
- ZELENKA, T. Adsorption and desorption of nitrogen at 77 K on micro- and meso- porous materials: Study of transport kinetics. *Microporous and Mesoporous Materials*, 227, p. 202–209, 2016.
- ZHANG, J.; ZHOU, Q.; OU, L. Kinetic , Isotherm , and Thermodynamic Studies of the Adsorption of Methyl Orange from Aqueous Solution by Chitosan / Alumina Composite. 2012.
- ZHANG, H.; FANG, D.; KONG, Z.; WEI, J.; WU, X.; SHEN, S.; CUI, W.; ZHU, Y. Enhanced adsorption of phthalic acid esters (PAEs) from aqueous solution by alkylbenzene-functionalized polypropylene nonwoven and its adsorption mechanism insight. *Chemical Engineering Journal*, 331, p. 406–415, 2018.
- ZISU, B.; SCIBERRAS, M.; JAYASENA, V.; WEEKS, M.; PALMER, M.; DINCER, T. D. Sonocrystallisation of lactose in concentrated whey, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, p. 2117–2121, 2014.

8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Este tópico apresenta a lista de resultados publicados durante a elaboração da Tese de doutorado até o momento.

- Patente

- 1) OLIVEIRA G. R.; LISBOA C. L. S.; SILVA E. G. C.; SANTOS T. S.; BALIEIRO A. L.; LIMA A. S.; FREITAS L. S.; ALSINA O. L. S.; SOARES C. M. F. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE. Depósito de pedido de patente com nº BR 10 2016 011066 1, 16 de Maio de 2016.

- Capítulo de livro publicado

- 1) SOARES C. M. F.; ALSINA O. L. S.; BALIEIRO A. L.; OLIVEIRA G. R.; ZANIN G. M. Impressão Molecular: Prospecção e Oportunidade de Aplicação em C&T&I. In: Álvaro Silva Lima; César Costapinto Santana (Org.). Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas. 1ª edição: Editora EDUNI, 2017, v.1, p. 141-168.

- Trabalhos completos em anais de eventos

- 1) OLIVEIRA G. R.; SANTOS M.S.; BALIEIRO A. L.; ALSINA O. L. S.; SOARES C. M. F. ESTUDO DA CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE A PARTIR DA ADIÇÃO DE ETANOL, XXXVII Enemp - Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados São Carlos, 21 de Outubro de 2015.
- 2) OLIVEIRA G. R.; LISBOA C. L. S.; SANTOS T. S.; BALIEIRO A. L.; ALSINA O. L. S.; SOARES C. M. F. ESTUDO DA CRISTALIZAÇÃO DA ESTUDO DA REMOÇÃO DA LACTOSE DO LEITE UTILIZANDO POLÍMERO IMPRESSO MOLECURLAMENTE EM SISTEMA BATELADA E COLUNA DE LEITO FIXO, 11º Encontro brasileiro sobre adsorção, Aracaju 27 de abril de 2016.

- 3) OLIVEIRA G. R.; LISBOA C. L. S.; SILVA E. G. C.; SANTOS T. S.; LIMA A. S.; FREITAS L. S.; ALSINA O. L. S.; SOARES C. M. F. RECUPERAÇÃO DA LACTOSE: UM ESTUDO COMPARATIVO BASEADO EM SONOCRISTALIZAÇÃO, XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química- COBEC, Fortaleza, 19 de Setembro de 2016.

ANEXO 1 A

A dosagem de lactose foi determinada a partir da curva de calibração, onde foi obtida pela equação (A). 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 e Figura A.)

$$C_{\text{lactose}} = \frac{\text{Área} + 23228}{53,166} \quad (\text{A})$$

$$R^2 = 0,9966$$

Em que:

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

Área = área obtida pelo método da cromatografia líquida expressa (AU seg⁻¹).

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

| C_{lactose} (mg/L) | Área média (Aus ⁻¹) |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 10.000 | 506726 |
| 15.000 | 758045 |
| 20.000 | 1102433 |
| 25.000 | 1325155 |
| 32500 | 1664375 |
| 35.000 | 1801360 |
| 40.000 | 2056808 |
| 50.000 | 2694585 |

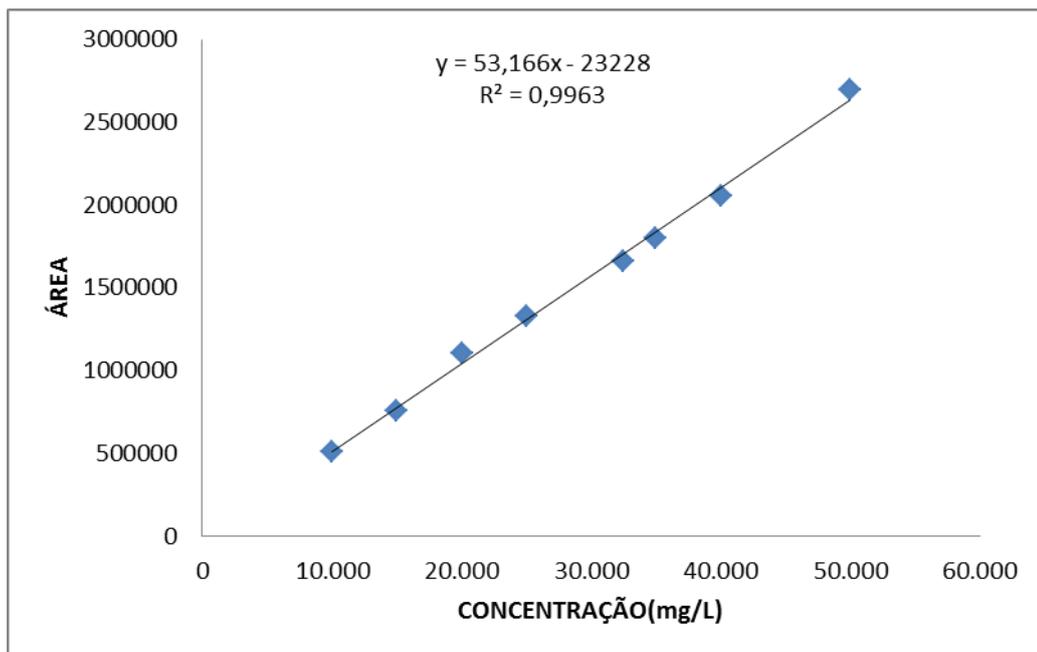


Figura A: Curva de calibração de lactose.

ANEXO 2 A

A dosagem de lactose foi determinada a partir da indentificação dos perfis cromatográficos (Figuras A1, A2 e A3) e da integração numérica dos picos para obtenção das áreas. O teor de lactose encontrado foi calculado a partir da relação linear das áreas com as concentrações, conforme a equação A da curva de calibração.

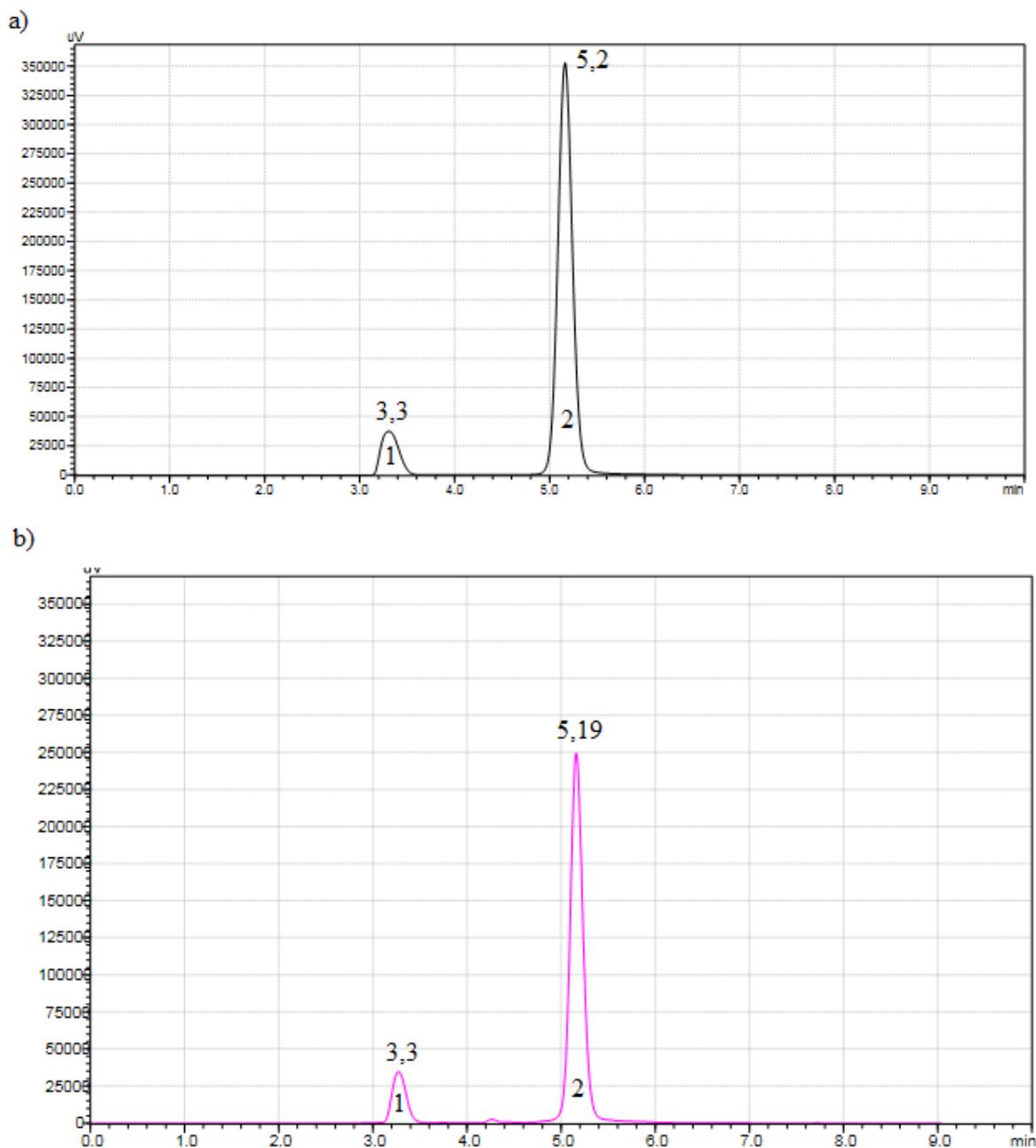


Figura A1: Picos cromatográficos a) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose padrão; b) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose do leite 0 h.

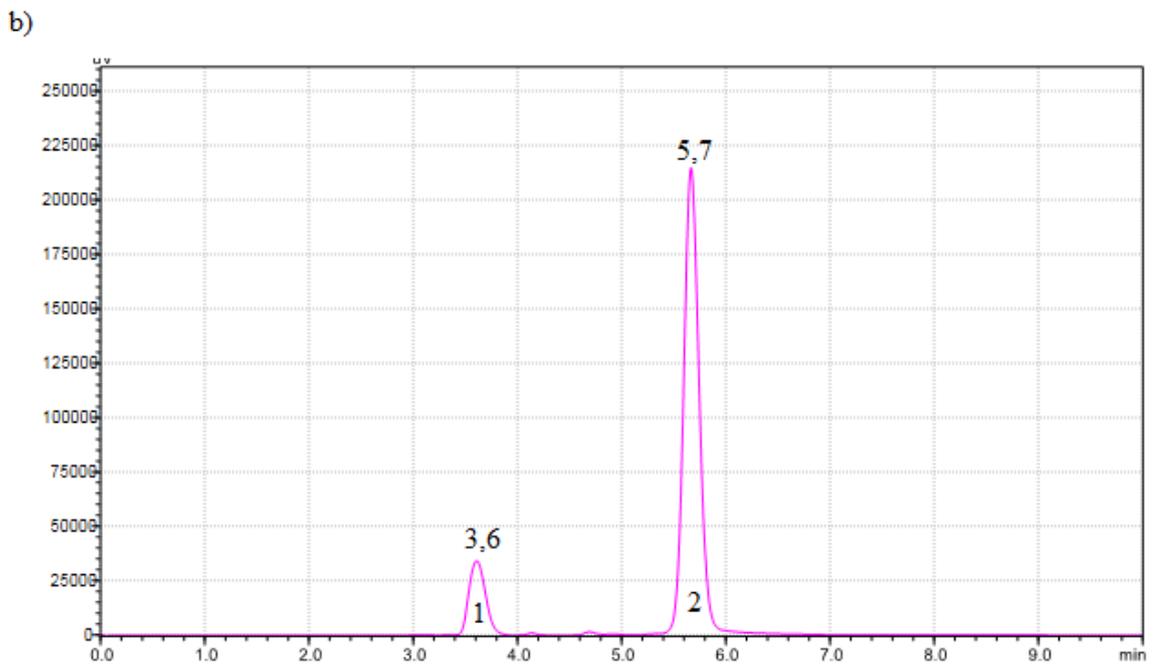
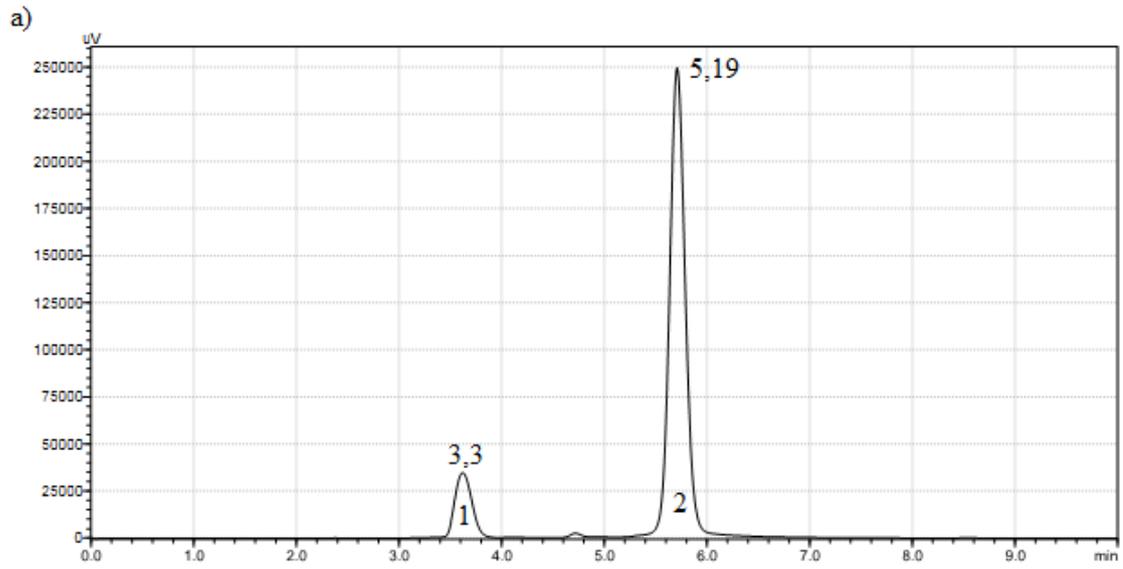


Figura A2: Picos cromatográficos a) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose do leite 0 h; b) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose do leite 30 min.

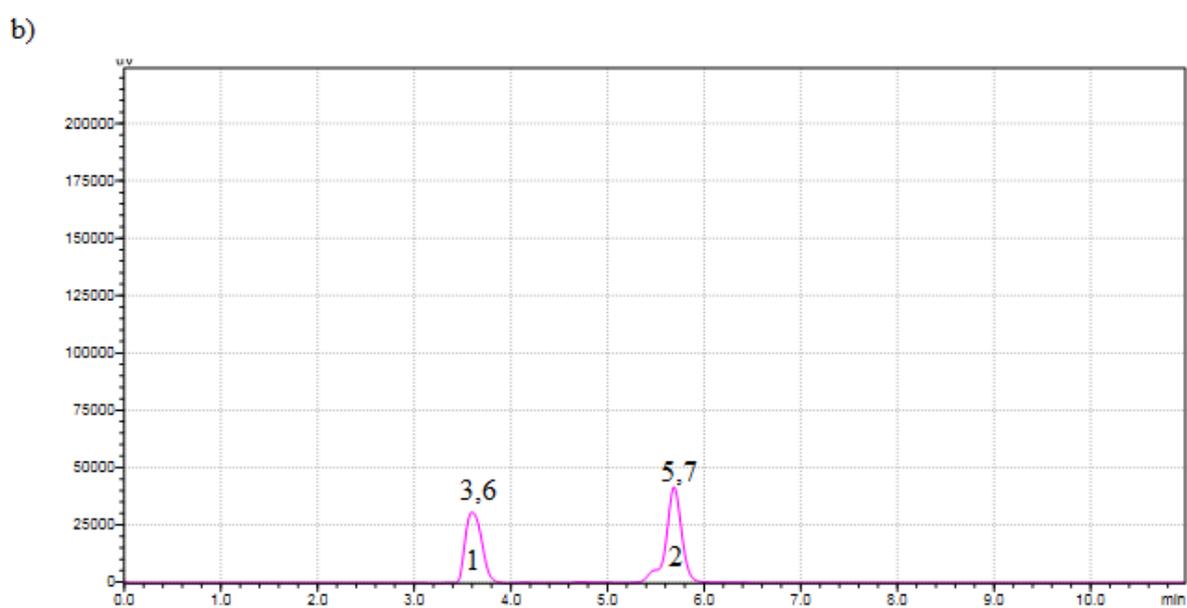
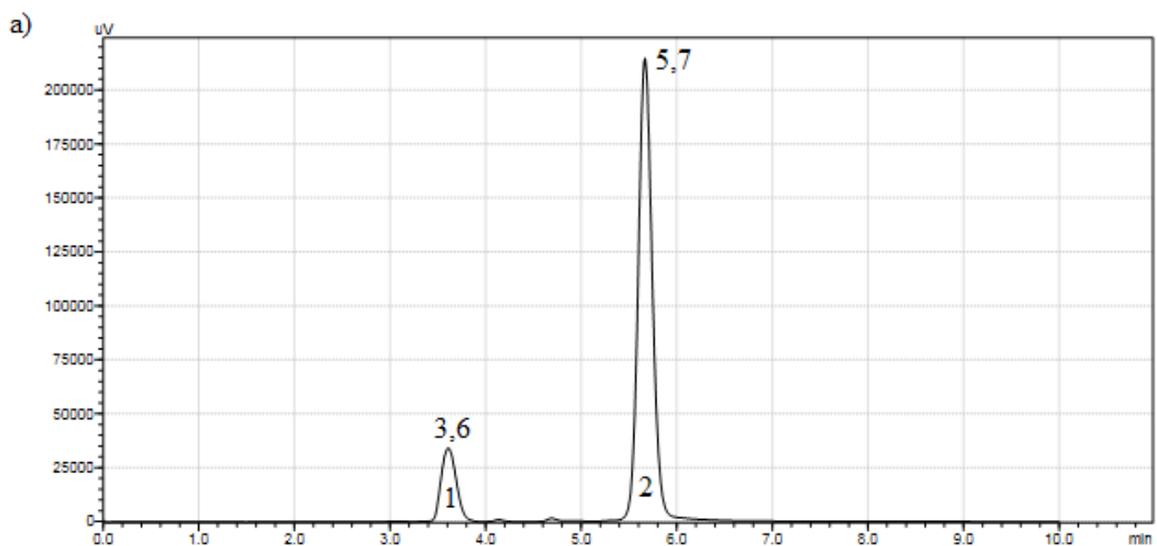


Figura A3: Picos cromatográficos a) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose do leite 30 min; b) 1 fase móvel (60% Acetonitrila +40% água) e 2) lactose dessorvida.

ANEXO 3 A

➤ PATENTE

PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO BASEADA EM POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE E DA CRISTALIZAÇÃO COM A ADIÇÃO DO ANTI-SOLVENTE ETANOL

CAMPO DA INVENÇÃO

001. A presente invenção pertence ao campo dos processos de recuperação da lactose do leite, mais especificamente, a um tal processo efetuado com auxílio da integração da técnica de nanotecnologia, ainda mais especificamente, utilizando a técnica de Impressão Molecular ou MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em um processo contínuo de remoção da lactose do leite, com a técnica de cristalização a partir da adição de etanol.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

002. A lactose é um dissacarídeo encontrado no leite e em produtos lácteos, constituindo-se como a principal fonte de carboidrato sintetizada nas células das glândulas mamárias. Essa biomolécula tem despertado o interesse da indústria no que se refere ao aprimoramento e desenvolvimento de técnicas de recuperação devido a suas aplicações em diversas áreas, como a farmacêutica, alimentícia e química.

003. Na indústria farmacêutica a lactose é utilizada como excipiente, por apresentar características específicas de compatibilidade físico-química, fluidez e a habilidade de gerar misturas uniformes. Huang et al. em Using spray-dried lactose monohydrate in wet granulation method for a low-dose oral formulation of a paliperidone derivative. Powder Technology, v. 246, p. 379–394, 2013 ao avaliarem diferentes marcas de lactose monohidratada atuando como excipientes na formulação do antipsicótico paliperidona, observaram que as diferentes marcas de lactose apresentaram resultados semelhantes quanto à fluidez e que ao serem utilizadas através do método de compressão direta não houve a necessidade de adicionar outros excipientes.

004. Na indústria de alimentos a lactose é um ingrediente amplamente utilizado na fabricação de diversos produtos, como: pães e recheios, sorvetes, farinhas, alimentos enlatados e produtos lácteos (queijo, iogurte). Devido suas propriedades físico-químicas, influi na textura, na cor e na quantidade de água ligada desses produtos.

005. De acordo com a FDA (Food and Drug Administration) a Agência Norte Americana Regulamentadora de Alimentos e Medicamentos, a lactose é único produto autorizado na composição de carreador de pó seco na inalação por possuir uma baixa toxicidade. Wu et al. no artigo *Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 6, p. 336–341, 2014 estudaram a eficiência da técnica de secagem por spray na lactose utilizada como carreador de pó seco na inalação. Os resultados permitiram observar que o uso da lactose permitiu o aumento da estabilidade dos fármacos e sugerem que a técnica de secagem possa ser utilizada na preparação do carreador, desde que exista um controle de humidade abaixo de 30 % no medicamento.

006. Estudos recentes tem relatado uma nova aplicação da lactose na produção do ácido lactobiônico que por sua vez possui várias aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e química. De acordo com Gutiérrez, Hamoudi e Belkacemi em *Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications*. *International Dairy Journal*, v. 26, n. 2, p. 103–111, 2012 o ácido lactobiônico pode ser produzido através do processo de oxidação da lactose e tem despertado interesse devido a sua capacidade antioxidante, quelante, umectante e propriedades emulsificantes.

007. Além dessas aplicações, Tomaszewska e Białończyk destacam em *Production of ethanol from lactose in a bioreactor integrated with membrane distillation*. *Desalination*, v. 323, p. 114–119, 2013 a lactose como um importante substrato no processo de fermentação para a produção de etanol.

008. Atualmente boa parte da lactose utilizada no Brasil é importada, proveniente de outros países como a Alemanha, China, Estados Unidos e Holanda. De acordo com os dados do Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX), o Brasil importou no período de 2009 a 2014 aproximadamente 117.000 toneladas de lactose, em sua forma pura ou em outras formas, como por exemplo a de xarope, o que corresponde a um montante de U\$\$ 204.203.323 (FOB).

009. Inúmeras tecnologias voltadas para o desenvolvimento de produtos lácteos com baixo teor de lactose tem impulsionado a indústria. Dentre elas destacam-se o métodos de separação por hidrólise, separação por membrana, cromatografia e adsorção.

010. Dois métodos podem ser citados como principais na hidrólise da lactose, o método ácido e o método enzimático. Na hidrólise ácida, a reação é muito rápida, em que o ajuste de acidez é feito através da adição de ácidos fortes como o sulfúrico e clorídrico, e condições severas de pH e temperatura ($1,0 < \text{pH} < 2,0$; $100 < \text{temperatura} < 150$ °C). Harju, Kallioinen e Tossavainen no artigo *Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products*:

Technological aspects, *International Dairy Journal*, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012 relatam que essas condições restringem sua aplicação comercial na indústria, pois acarreta alterações no sabor e na cor do leite.

011. Já o método enzimático, a hidrólise é catalisada pela β galactosidase e se processa em condições operacionais mais brandas ($3,5 < \text{pH} < 8,0$; $5 < \text{temperatura} < 60$ °C), essas condições reduzem a formação de subprodutos indesejáveis. Nele a enzima β galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação β (1-4) da lactose, dando origem aos seus monômeros glicose e galactose.

012. Apesar da hidrólise enzimática se apresentar como um método mais vantajoso em relação à hidrólise ácida para a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados, Bbasi e Saedabadian no artigo *A Influences of lactose hydrolysis of milk and sugar reduction on some physical properties of ice cream*, *Journal of Food Science and Technology*, n. 2003, p. 1–8, 2013 sugere que seu emprego pode ocasionar modificações nas propriedades reológicas dos produtos, pois aumentam seu dulçor, diminui a viscosidade, e provocam alterações do sabor e cor.

013. Uma técnica alternativa no proceso de redução do teor de lactose, é a filtração por membranas que é rotineiramente utilizada em inúmeras aplicações dentro da indústria de laticínios. Dentre as alternativas da filtração por membranas, destaca-se a nanofiltração, que é um processo de filtração entre ultrafiltração e a osmose reversa que proporciona separações altamente específicas de componentes com baixo peso molecular.

014. Um dos fatores que diferenciam os tipos de membranas mais comuns nos processos de separação é a aplicação da pressão hidráulica como a força motriz para transporte de massa. No entanto, a natureza da membrana controla quais os elementos que permeiam e quais serão mantidos, uma vez que eles são seletivamente separados de acordo com a massa molar ou tamanho de partículas. García, Blanco e Rodríguez em *Microfiltration applied to dairy streams: Removal of bacteria*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 2, p. 187–196, 2013 definem a microfiltração como um proceso que utiliza pressões inferiores a 2 bar e separa as moléculas com tamanhos entre 0,025 e 10 μm , já a ultrafiltração utiliza pressões superiores a 1 bar e separa as partículas com massa molar entre 1 e 300 kDa, e a nanofiltração com pressões entre 1 e 4 bar e separa as partículas com massa molar entre 350 e 1000 Da, enquanto osmose reversa pressões entre 4 e 10 bar e concentra-se partículas com massas molares inferiores a 350 Da.

015. A literatura relata estudos envolvendo o processo de remoção da lactose a partir da integração da técnica de separação por membranas com outras técnicas de separação.

016. Souza et al. em *Recovery and purification of lactose from whey*, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 49, n. 11, p. 1137–1143, 2010 investigaram quatro processos integrados, incorporando microfiltração, ultrafiltração, troca iônica, osmose reversa, para a separação e purificação de lactose de soro do queijo.

017. Faedo et al., em *Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática*, *Revista CIATEC-UPF*, v. 5, n. 1, p. 44–54, 2013, avaliaram um processo híbrido combinando ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e hidrólise enzimática usando a β -galactosidase para a obtenção de leite pasteurizado com reduzido teor de lactose.

018. Nestes estudos, apesar da preservação das propriedades reológicas do leite durante o processo de remoção da lactose, a técnica de separação por membrana tem apresentado alguns problemas em relação a sua seletividade, devido ao fato de acabar retendo biomoléculas menores que a lactose, como o caso das proteínas e glóbulos de gorduras, ocasionando perdas nutricionais no leite.

019. Uma técnica que tem se apresentado como uma opção a essa falta de seletividade é a técnica de separação por cromatografia. A separação cromatográfica de misturas de diferentes compostos é baseada na sua distribuição entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A tecnologia baseia-se no fato que moléculas com características físicas e químicas diferentes interagem de forma distinta com a fase estacionária (coluna) quando são dissolvidas em uma fase móvel (geralmente um solvente ou de um gás). Essas interações resultaram em uma retenção diferencial na fase estacionária e, por conseguinte, conduzem à separação.

020. O processo de separação da lactose no leite por métodos cromatográficos ocorre com base nas diferenças de velocidades de fluxo de diferentes componentes do líquido a ser tratado ao fluir através de uma coluna geralmente de resina. O leito preenchido de resina é composto de partículas porosas de resina que apresentam grupos funcionais com os quais os componentes a serem separados interagem de forma distinta. De acordo com HARJU et al. no artigo *Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects*, *International Dairy Journal*, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012 essas interações se devem ao fato desses grupos apresentarem afinidades diferentes em relação à resina, permitindo que o eluato seja dividido em frações com a composição desejada, acarretando assim a separação dos componentes um do outro.

021. A resina mais utilizada para separar a lactose com elevada eficiência a partir do leite e soro de leite é resina baseada no princípio de troca catiônica. Neste processo a separação é baseada nos diferentes tamanhos de íons e nos 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. No entanto, íons de cálcio do leite podem se ligar à resina, o que acarreta à destruição das micelas de caseína, e desaparecimento da cor branca de leite. Além disso, se a resina estiver sob a forma de cálcio, a separação é insatisfeita e pode ocasionar a precipitação da proteína na coluna.

022. Além dos problemas citados anteriormente, a redução de lactose por tecnologias de membrana ou processos cromatográficos têm enfrentado 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 após a hidrólise da lactose, o valor crioscópico continua menor. De acordo com a Instrução Normativa nº 51/2002, o índice crioscópico máximo permitido é $-0,530\text{ }^{\circ}\text{H}$ ($-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esse problema tem levado as autoridades de saúde a considerarem a redução dos valores crioscópicos como adulteração no leite.

023. Estudos recentes têm demonstrado a viabilidade de capacidade de reconhecimento molecular de polímeros impressos molecularmente impressos (MIPS) no processo, tais como a adsorção de biomoléculas.

024. A técnica de impressão molecular é uma aproximação sintética entre a natureza do adsorvato e do adsorvente a fim de realizar o reconhecimento da molécula de interesse. A obtenção do polímero impresso molecularmente (PIM) ocorre por meio da polimerização da molécula molde que é retirada da matriz deixando na sua estrutura informações a respeito da forma e tamanho para a molécula-alvo. Isso resulta na formação de sítios capazes de reconhecer e religar com a molécula-alvo com alta especificidade.

025. O polímero impresso molecularmente (PIM) pode ser usado como adsorvente com seletividade pré-determinada para uma dada substância, ou grupo de análogos estruturais, utilizados em extração de fase sólida para a separação ou limpeza do composto alvo em baixas concentrações ou em matrizes complexas.

026. A obtenção dos PIMs ou polímeros impresso molecularmente ocorre por meio da polimerização de uma molécula molde a ser impressa (o analíto de interesse). Na impressão molecular não covalente, o molde interage com um monômero funcional por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas ou interações hidrofóbicas.

027. A Figura 1 representa o processo de obtenção de um polímero impresso molecularmente descrito por Balieiro et al. no artigo Adsorption process of molecularly imprinted sílica for extraction of lactose from milk, Brazilian Journal of Chemical

Engineering, 2015 (In press) para retenção da molécula molde lactose e a remoção desta para a produção do molde e subsequente utilização.

028. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo tem evidenciado a eficiência da técnica de impressão molecular no processo de remoção de biomoléculas.

029. Soares et al. em Molecular imprinting of β -cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, p. 79-82, 2007 indicaram que a técnica de impressão molecular para o preparo do PIM obtido pela técnica sol-gel com a finalidade de remover colesterol de uma solução sintética em regime batelada atingiu o máximo de capacidade de adsorção no valor de 76,5 mg de colesterol por g de PIM.

030. A Patente 000221108562820 empregou a técnica de impressão molecular para avaliar a eficiência do PIM em relação à matriz pura (MP) no processo de remoção do colesterol de uma solução sintética, no tempo de 1 h, na temperatura de 25°C em batelada. Os resultados obtidos mostraram que a capacidade de adsorção do adsorvente PIM foi de 238 mg de colesterol por g de adsorvente quando comparado com o MP que apresentou uma remoção menor de 227 mg de colesterol por g de adsorvente.

031. Balieiro et al. em Adsorption process of molecularly imprinted sílica for extraction of lactose from milk, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2015 (In press) avaliaram a cinética de adsorção do PIM no processo de remoção da lactose do leite em fluxo contínuo, obtendo uma adsorção máxima de 62 mg de lactose por g de adsorvente PIM.

032. A literatura de patentes apresenta documentos sobre o processo de remoção e recuperação da lactose.

033. Assim, patente WO 2014/ 14 1164 A1 utiliza o processo de remoção da lactose do leite e de derivados baseado nos processos de filtração, ultrafiltração e nanofiltração. Após a remoção de lipídios, proteínas e sais, utiliza-se o processo de cristalização baseado no arrefecimento (resfriamento) para a formação dos cristais.

034. A patente EP 2 617 727 A1 patente utiliza o processo de desmineralização do soro do leite e em seguida usa o processo de cristalização por arrefecimento para recuperar a lactose do soro desmineralizado.

035. Alternativamente, a patente GB200185 (A) descreve o processo de recuperação da lactose no soro usando a precipitação ácida da caseína antes do processo de cristalização por arrefecimento.

036. De acordo com as publicações, observa-se que o processo de remoção da lactose quando aplicado ao leite e seus derivados ocorre através da técnica de separação por

membranas, ocasionando a retenção de outros constituintes do leite, resultando em perdas das propriedades organolépticas.

037. Enquanto que a etapa de recuperação da lactose ocorre por intermédio do processo de cristalização por arrefecimento, após a precipitação na maioria das vezes de proteínas e sais. Essa técnica não é aplicada diretamente no leite pelo fato de que a presença de outros constituintes interfere no processo de cristalização da lactose.

038. Portanto, seria de grande utilidade e interesse industrial um processo que consiste em utilizar a técnica de adsorção baseada na impressão molecular para remover a lactose do leite e a cristalização a partir da adição de etanol para recuperar a lactose após a sua eluição das partículas adsorvente, de modo que a biomolécula de lactose obtida apresente poucas impurezas e que as propriedades organolépticas do leite estejam dentre os parâmetros exigidos pelos órgãos regulamentadores.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

039. De um modo amplo, o processo industrial de recuperação da lactose do leite e derivado processados em um laticínio por percolação de uma corrente de leite através de pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção onde a fase estacionária compreende matrizes hidrofóbicas compreende as etapas de:

- a) Preparar matrizes hidrofóbicas por técnica sol-gel utilizando como precursor o Tetraetilortossilicato, as matrizes sendo selecionadas dentre a matriz impressa molecularmente com a solução de lactose como molde (PIM/lactose);
- b) Triturar as matrizes de a) para obter a fase estacionária para o leite da pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção com granulometria de 0,250 mm (60 mesh);
- c) Utilizar o material de b) como fase estacionária para a pelo menos uma coluna de adsorção (C);
- d) Efetuar a remoção da lactose do leite dirigindo uma corrente de leite com teor normal de lactose para a dita pelo menos uma coluna (C) de adsorção/dessorção de c) e fazer percolar o leite através do leito da dita pelo menos uma coluna (C) de adsorção/dessorção onde a fase estacionária é constituída de uma matriz de a), a temperaturas desde a ambiente até cerca de 34°C, de modo que a matriz hidrofóbica constituindo a fase estacionária da pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção (C) possa adsorver o teor da lactose que se deseja eliminar da dita corrente de leite;

- e) Ao término do processo, recuperar o leite e derivados com teor reduzido de lactose;
- f) Dessorver a lactose da coluna de adsorção com auxílio de solução de água a uma temperatura entre 34 a 60 °C e vazão entre 3 e 9 mL/min, obtendo pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção (C) com leite de matrizes aptas a novo ciclo de adsorção/dessorção de lactose do leite; e
- g) Adicionar etanol a solução de f) na proporção 1:3 para iniciar a formação dos cristais de lactose através do processo de cristalização, mantendo sob agitação constante e temperatura ambiente;
- h) Filtrar e secar a vácuo os cristais de lactose provenientes da solução de g);
- i) Iniciar um novo ciclo de adsorção/dessorção da lactose do leite com auxílio da dita coluna de adsorção/dessorção de f).

040. Portanto, a invenção provê um processo industrial contínuo para a remoção da lactose do leite a partir de uma coluna de adsorção/dessorção onde a fase estacionária é constituída por uma matriz hidrofóbica utilizando como precursor o Tetraetilortossilicato.

041. A invenção provê também um processo contínuo para a recuperação da lactose do leite onde a coluna de adsorção/dessorção é preparada para um novo ciclo de adsorção/dessorção da lactose por lavagem com água a uma temperatura entre 34 e 60°C e vazão entre 3 e 9mL/min.

042. A invenção provê também um processo de cristalização para obtenção dos cristais de lactose a partir da adição de etanol, sob agitação constante e temperatura ambiente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

043. A FIGURA 1 anexa é uma representação esquemática do mecanismo de formação de um polímero impresso molecularmente conforme a literatura: MM: molécula molde; MF: monômero funcional; PIM: polímero impresso molecularmente.

044. A FIGURA 2 anexa é uma representação esquemática do mecanismo de recuperação da lactose do leite a partir da integração das técnicas de adsorção/dessorção de leite fixo preenchido com polímeros impresso molecularmente com a técnica de cristalização baseada na adição de etanol: S1: leite; B1 e B2: bombas; V1, V2, V3 e V4: válvulas; C1: coluna adsorção/dessorção; S2: leite com baixo teor de lactose; S3: eluente (água); S4: solução de lactose; EC: etapa de cristalização; P1: lactose recuperada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- 045.** A invenção é, pois, dirigida para um processo de remoção e recuperação da lactose do leite com auxílio de adsorção/dessorção e cristalização de parte da lactose presente no leite tal como produzido, a adsorção/dessorção sendo efetuada no leito de pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção cuja fase estacionária é constituída de uma matriz hidrofóbica do tipo Polímero Impresso Molecularmente (PIM/lactose) e a cristalização a partir da adição de etanol a solução de eluição de uma matriz hidrofóbica do tipo Polímero Impresso Molecularmente (PIM/lactose), composta de água a uma temperatura entre 34 e 60°C e vazão entre 3 e 9mL/min.
- 046.** O leite utilizado nos experimentos é leite do tipo C obtido em laticínio industrial. A análise do leite antes e após percolação por coluna contendo um leito constituído de matriz hidrofóbica PIM/lactose será apresentada mais adiante no presente relatório descritivo.
- 047.** Conforme detalhado acima, o processo da invenção para a recuperação da lactose do leite é feito em presença de uma matriz hidrofóbica de uma faixa granulométrica que constitui a fase estacionária de uma coluna de adsorção/dessorção.
- 048.** A matriz hidrofóbica conforme a invenção compreende a matriz de polímero impresso molecularmente (PIM/lactose) onde a molécula molde é a lactose.
- 049.** A matriz PIM/lactose é uma matriz hidrofóbica obtida a partir do precursor tetraetilortossilicato TEOS através da técnica sol gel.
- 050.** De acordo com a técnica, a matriz PIM/lactose é obtida por um processo de polimerização via técnica sol gel a partir do precursor tetraetilortossilicato (TEOS). Para tal, 30 mL de TEOS são dissolvidos em 36 mL de etanol, absoluto sob atmosfera inerte de nitrogênio. São adicionados 0,11 mL de ácido clorídrico diluído em 5 mL de água ultra pura (solução pré-hidrolisante); a mistura obtida é agitada (20 rpm) durante 90 min a 35 °C. Transcorrido esse tempo, adiciona-se 1,0 g de lactose diluída em 10 ml de água ultrapura, seguida de 1 mL de hidróxido de amônia diluído em 6 mL de etanol (96%) (solução de hidrólise), a mistura é mantida estática a 4 °C durante 18 horas para efetuar a policondensação. O gel obtido é lavado com água a 60 °C e seco à vácuo e temperatura ambiente por 24 h.
- 051.** A distribuição granulométrica do gel seco de PIM é determinada por meio de separação utilizando conjunto de peneiras da série ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de forma manual obtendo partículas de tamanho de 60 mesh.
- 052.** Já o polímero impresso molecularmente com lactose é obtido pela polimerização do mesmo precursor tetraetilortossilicato TEOS em presença de lactose como molécula alvo

(molde). Após polimerização a lactose é eliminada por lavagem e a matriz PIM/lactose é capaz de reconhecer a lactose presente em uma emulsão como o leite.

053. Os experimentos conduzidos durante a pesquisa que conduziu ao presente pedido são destinados a determinar as condições ideais do processo de remoção e recuperação da lactose que envolve percolação do leite também contendo lactose através de uma coluna de adsorção/dessorção onde a fase estacionária é um suporte constituído pela matriz hidrofóbica PIM/lactose, seguida do processo de cristalização a partir da adição de etanol a solução de eluição de uma matriz hidrofóbica do tipo Polímero Impresso Molecularmente (PIM/lactose), composta de água a uma temperatura entre 34 e 60°C e vazão entre 3 e 9mL/min.

054. A eficiência do processo objeto da invenção depende de fatores como capacidade de adsorção da lactose pelo suporte constituído de matriz hidrofóbica (PIM) e a dessorção da lactose.

055. Para a dosagem de lactose das amostras do leite antes e após percolar da coluna é necessária à diluição destas, da seguinte forma: 1 grama da amostra é colocada em uma solução contendo 2 mL de acetonitrila:água (60:40 v/v) deixando-as por 10 minutos a 25°C numa centrífuga com rotação de 4500 rpm. Após a centrifugação das amostras, o sobrenadante é extraído e filtrado através de um filtro de seringa de diâmetro 0,45µm.

056. As amostras filtradas são injetadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Na determinação do teor de lactose nos experimentos, é empregado um cromatógrafo Shimadzu Co (modelo LC-10), equipado com forno (35 °C), injetor automático de amostras, detector de Índice de Refração (IR), marca Shimadzu Co (modelo RID 6 A). A coluna analítica utilizada para todos os ensaios é a Luna NH2 (150 x 4,6 mm) (Phenomenex) com grupos amina ligados quimicamente à sílica. A fase-móvel utilizada é constituída de 60% de acetonitrila e 40% 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 5 minutos. A dosagem de colesterol é determinada a partir da curva de calibração com base na equação a seguir:

$$C_{lactose} = (Área + 543,49) / 0,3584 \quad r^2 = 0,998 \quad (\text{Equação.1})$$

em que:

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

Área = área obtida pelo método da cromatografia líquida expressa (AU/seg)

057. As condições de processo testadas com o intuito de obter a melhor condição de remoção da lactose no processo de adsorção em leito fixo foi fundamentada pelo nosso grupo através de Balieiro et al. em Adsorption process of molecularly imprinted sílica for extraction

of lactose from milk, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2015 (In press) e compreendem a altura do leito (7,5 a 12,5 cm), vazão (3 a 9 mL/min) e tamanho da partícula (250 a 500 μm) e temperatura (34 a 60 $^{\circ}\text{C}$).

058. Em uma modalidade da invenção, a coluna de vidro encamisada que comporta o leito tem diâmetro interno de 2,5 cm e altura de 20 cm. No fluxo de efluente (solução de leite), as amostras são coletadas e analisadas posteriormente no HPLC. A concentração média da alimentação é calculada por meio de média aritmética dos valores de todas as amostras retiradas durante cada experimento, obtendo-se, dessa forma a concentração média e a capacidade de máxima de adsorção em mg por g de adsorvente PIM.

059. A Tabela 1 abaixo é uma compilação dos dados relativos à primeira etapa presente na invenção para a eficiência de remoção da lactose do leite.

060. Observa-se, durante os experimentos, que a maior capacidade de adsorção de 62 mg por grama de adsorvente ocorre no ensaio 7, para as condições: temperatura (34 $^{\circ}\text{C}$), granulometria (250 μm), altura(12,5 cm) e vazão (9 mL/min). Essa condição é a utilizada como condição ótima na etapa de remoção da lactose do leite em coluna com fluxo contínuo, onde a fase estacionária é um suporte constituído pela matriz hidrofóbica PIM/lactose.

061. No teste de dessorção o leito é lavado com água a 34 $^{\circ}\text{C}$ e vazão 9mL/min, as amostras são analisadas em HPLC.

062. A Tabela 2 abaixo é uma compilação dos dados relativos à segunda etapa presente na invenção para a eficiência da dessorção da lactose do leite na matriz hidrofóbica do tipo Polímero Impresso Molecularmente (PIM/lactose).

063. As determinações de condições de processo recuperação da lactose através do processo de cristalização com adição de etanol são efetuadas através de experimentos em regime de batelada em uma solução sintética de lactose, descritos a seguir.

064. Os experimentos para a avaliação das condições do processo de recuperação da lactose em solução sintética através da cristalização, são realizados a partir da diluição de 6 g do padrão de α lactose em 20 mL de água MiliQ, mantida sob agitação constante de 735 rpm. A solução é inicialmente aquecida a 60 $^{\circ}\text{C}$ para garantir a completa dissolução e em seguida resfriada a temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ antes da adição do etanol. Após a adição, a solução é filtrada utilizando Kitassato de borosilicato, funil de Buchner e papel filtro quantitativo porosidade 0,8 μm , ligados a uma bomba de vácuo, separada e secada num dessecador por um período de 24 horas antes do processo de pesagem.

TABELA 1

| Ensaio | Variáveis | | | | Concentração inicial de lactose (mg/L) | Capacidade de adsorção (mg/g) |
|----------|-----------|------------|-------------|------------|----------------------------------------|-------------------------------|
| | T (°C) | G (µm) | h (cm) | Q (mL/min) | PIM | PIM |
| 1 | 34 | 250 | 7,5 | 3 | 21548,9 | 28,0 |
| 2 | 60 | 250 | 7,5 | 9 | 22544,7 | 37,6 |
| 3 | 34 | 500 | 7,5 | 9 | 20765,4 | 47,5 |
| 4 | 60 | 500 | 7,5 | 3 | 19382,4 | 26,4 |
| 5 | 34 | 250 | 12,5 | 9 | 19517,6 | 62,2 |
| 6 | 60 | 250 | 12,5 | 3 | 12771,8 | 9,5 |
| 7 | 34 | 500 | 12,5 | 3 | 13906,4 | 7,2 |
| 8 | 60 | 500 | 12,5 | 9 | 19517,6 | 24,3 |
| 9 | 47 | 355 | 10,0 | 6 | 21806,1 | 52,4 |
| 10 | 47 | 355 | 10,0 | 6 | 32453,8 | 50,6 |
| 11 | 47 | 355 | 10,0 | 6 | 21749,7 | 50,8 |

Balieiro et al. Adsorption process of molecularly imprinted sílica for extraction of lactose from milk, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2015 (In press).

TABELA 2

| Concentração inicial de lactose (mg/L) | Massa adsorvida (mg) | Massa dessorvida (mg) | Rendimento (%) |
|----------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| 22249 | 1767 | 1030 | 58,3 |

065. As condições de processo testadas com o intuito de obter a melhor condição de recuperação da lactose foram: o volume de etanol (40 a 60 mL) e o tempo de agitação (10 a 60 min).

066. A Tabela 3 abaixo é uma compilação dos dados relativos à etapa da cristalização presente na invenção para a recuperação da lactose em solução sintética.

067. Observa-se, durante os experimentos, que a maior recuperação de 91,83 % ocorre no ensaio 4, para as condições: volume de etanol (60 mL) e tempo de agitação (60 min). Apesar do ensaio 2 possuir uma recuperação próxima do ensaio 4, com um tempo menor de 10 min, deve-se avaliar o tamanho do cristal da lactose pretendido. Para cristais maiores, as condições do ensaio 2 é mais indicada pelo fato que o choque mecânico influencia o tamanho dos cristais de lactose.

TABELA 3

| Ensaio | Volume de etanol (mL) | Tempo de agitação (min) | Recuperação (%) |
|----------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| 1 | 40 | 10 | 52,70 |
| 2 | 60 | 10 | 90,67 |
| 3 | 40 | 60 | 86,67 |
| 4 | 60 | 60 | 91,83 |
| 5 | 50 | 35 | 89,73 |
| 6 | 50 | 35 | 89,13 |

068. Os experimentos conduzidos durante a pesquisa que conduziu ao presente pedido são destinados a solicitar a integração do processo de remoção da lactose do leite que envolve percolação do leite também contendo lactose através de uma coluna de adsorção/dessorção, onde a fase estacionária é um suporte constituído pela matriz hidrofóbica PIM/lactose, com o processo de cristalização da lactose eluída da fase estacionária com água, através da adição de etanol a solução.

069. A Figura 2 representa esquematicamente o fluxograma do estado da técnica de integração dos processos de adsorção/dessorção e cristalização por adição de etanol.

070. Assim, a etapa de remoção da lactose inicia-se com as válvulas 1 e 2 abertas, onde ocorre em fluxo contínuo do leite alimentado por uma bomba peristáltica numa vazão de 9 mL/min, através de coluna de adsorção de vidro encamisada com diâmetro de 2,5 cm interno e 12,5 cm de altura. O leite será percolado em uma coluna encamisada a temperatura de 34°C, por um período de 1 hora momento no qual a coluna satura.

071. Após a saturação da coluna as válvulas 1 e 2 se fecham e as válvulas 3 e 4 se abrem, iniciando a etapa de dessorção. Durante essa etapa a lactose é eluída com água a uma temperatura entre 34 e 60°C e vazão entre 3 e 9 mL/min. Transcorrido o tempo de 1 hora, as válvulas 3 e 4 se fecham e se inicia a etapa de recuperação.

072. A etapa de recuperação da lactose ocorre através do processo de cristalização por adição de etanol. Em que a solução eluída da coluna é mantida sobre agitação de 735 rpm e logo em seguida é adicionado etanol na proporção 1:3. Transcorrido o tempo de 1 hora a solução após a adição, a solução é filtrada utilizando Kitassato de borosilicato, funil de Buchner e papel filtro quantitativo porosidade 0,8 µm, ligados a uma bomba de vácuo, separada e secada num dessecador por um período de 24 horas antes do processo de pesagem dos cristais de lactose.

073. Assim é possível obter tanto o leite com teor reduzido de lactose como a lactose através deste processo.

074. O leite com baixo teor de lactose poderá ser utilizado na fabricação de outros alimentos também com baixo teor de lactose, atendendo uma necessidade do mercado em relação a pessoas intolerantes a lactose.

075. Já a lactose recuperada poderá atender outro mercado potencial relacionado ao seu uso na fabricação de alimentos, como farinhas e pães, na indústria farmacêutica como excipientes de medicamentos e na indústria de cosméticos como emoliente de cremes e batons.

076. Os resultados parciais, aliados ao baixo custo e energia utilizada no processo empregando a coluna de adsorção/dessorção com leite da coluna de adsorção/dessorção contendo a matriz hidrofóbica com o polímero impresso molecularmente (PIM), com a cristalização com adição de etanol demonstram a viabilidade de um processo em escala industrial, em fluxo contínuo para a remoção e recuperação da lactose de uma corrente de leite.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO BASEADA EM POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE E DA CRISTALIZAÇÃO COM A ADIÇÃO DO ANTI-SOLVENTE ETANOL, dito processo sendo caracterizado por compreender as etapas de:

- a) Efetuar a remoção da lactose do leite dirigindo uma corrente de leite com teor normal de lactose para a dita pelo menos uma coluna (C) de adsorção/dessorção de c) e fazer percolar o leite através do leite da dita pelo menos uma coluna (C) de adsorção/dessorção onde a fase estacionária é constituída de uma matriz de a), a temperaturas desde a ambiente até cerca de 34°C, de modo que a matriz hidrofóbica constituindo a fase estacionária da pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção (C) possa adsorver o teor da lactose que se deseja eliminar da dita corrente de leite;
- b) Ao término do processo, recuperar o leite e derivados com teor reduzido de lactose;
- c) Dessorver a lactose da coluna de adsorção com auxílio de solução de água a uma temperatura entre 35 e 60°C e vazão entre 3 e 9 mL/min, obtendo pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção (C) com leite de matrizes aptas a novo ciclo de adsorção/dessorção de lactose do leite; e

- d) Adicionar etanol a solução de c) na proporção 1:3 para iniciar a formação dos cristais de lactose através do processo de cristalização, mantendo sob agitação constante e temperatura ambiente;
- e) Filtrar e secar a vácuo os cristais de lactose provenientes da solução de d);
- f) Iniciar um novo ciclo de adsorção/dessorção da lactose do leite com auxílio da dita coluna de adsorção/dessorção de a).

2. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser efetuado em fluxo contínuo;

3. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por efetuar 62mg/g de adsorção ao ser empregada coluna de adsorção/dessorção (C) com temperatura de 34°, altura de 12,5 cm, vazão de 9mL min⁻¹ e granulometria (250µm), a fase estacionária do leito da dita coluna (C) sendo a matriz hidrofóbica de polímero molecularmente impresso (PIM).

4. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela lactose recuperada ser utilizada na fabricação de alimentos, farinhas e pães, na indústria farmacêutica como excipientes de medicamentos e na indústria de cosmético como emoliente de cremes e batons.

5. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DA LACTOSE DO LEITE A PARTIR DA INTEGRAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ADSORÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por uma solução obtida a partir da eluição da matriz hidrofóbica constituindo a fase estacionária da pelo menos uma coluna de adsorção/dessorção (C), mantida sob agitação constante de 735 rpm., no período de 10 a 60 min., aquecida a 60 °C, em seguida resfriada a temperatura de 25 °C antes da adição de 40 a 60 mL de etanol, após a adição, a solução é filtrada a vácuo, separada e secada num dessecador no período de 24 horas antes do processo de pesagem dos cristais de lactose.

FIG. 1

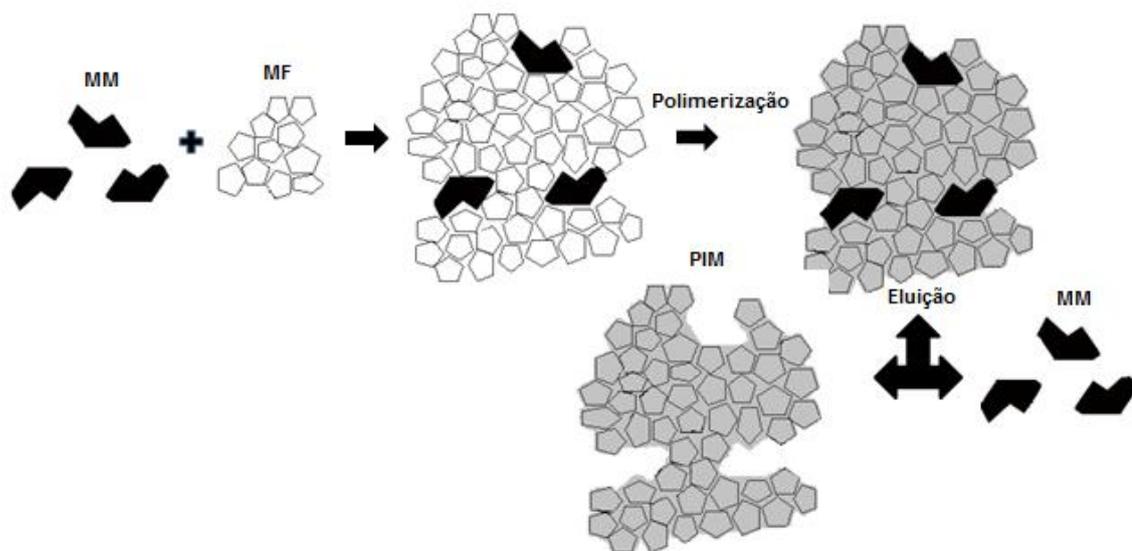


FIG. 2

