

**IDENTIFICAÇÃO DE LACTULOSE POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA
(CCD)**

THAÍIS DE MELO RAMOS¹; ADRIANO ALVARENGA GAJO², SANDRA MARIA PINTO³; LUIZ
RONALDO DE ABREU⁴; LUIS CARLOS DE OLIVEIRA LIMA³

RESUMO: O soro de leite é o subproduto principal da indústria de laticínios. Em função de seu elevado poder poluente e da dificuldade de sua eliminação, pesquisas têm sido desenvolvidas, buscando alternativas para o aproveitamento dos componentes do soro, principalmente, a lactose. Presente no soro a lactose pode sofrer uma reação de isomerização em meio alcalino sendo convertida em lactulose, utilizando o ácido bórico como catalisador da reação. A lactulose é um dissacarídeo constituído de galactose e frutose, é um açúcar sintético obtido da lactose. Este trabalho teve como objetivo identificar lactulose quanto a sua presença ou ausência no xarope de lactulose. As análises para determinação de lactulose foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), e as amostras foram obtidas após purificação do xarope em colunas cromatográficas (coluna de troca iônica e exclusão molecular). Os resultados apresentaram que a cromatografia em camada delgada permitiu a identificação das frações de lactulose.

Palavras-chave: soro de leite, cromatografia, lactulose.

INTRODUÇÃO

Com a expansão do consumo mundial de leite, queijos e derivados nos últimos anos, a produção de soro, um dos principais subprodutos da indústria de laticínios, aumentou consideravelmente. Em função de seu elevado valor nutritivo da sua importância comercial, diversos estudos têm sido realizados para a separação e recuperação de proteínas, lactose, vitaminas e sais minerais presentes no soro (Carminatti, 2001).

O soro do leite é rico em lactose, composta por glicose e galactose, estando o grupo aldeído da galactose unido ao grupo C-4 da glicose mediante uma ligação β -1-4- glicosídica (Walstra et al., 2001). Apesar de ser o sólido mais abundante no soro, a lactose é pouco utilizada na indústria alimentícia em virtude de seu baixo poder adoçante e de sua baixa solubilidade. A lactose pode ser isomerizada à lactulose, em meio alcalino, com auxílio de um catalisador (Ramos, 2010).

A lactulose (galactose e frutose) é um açúcar sintético que não ocorre naturalmente e é sintetizada, por meio da lactose por isomerização da glicose à frutose. Atualmente é utilizada em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e na indústria de alimentos pelos benefícios oferecidos à saúde humana (Aider & Halleux, 2007).

Entre os métodos de análises as técnicas cromatográficas ocupam um lugar de destaque na química e bioquímica em razão da eficiência e facilidade na separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo que constituída de misturas complexas.

A cromatografia, em sua forma mais simples, é meramente uma técnica de separação, usada para separar fisicamente uma mistura de dois ou mais compostos químicos. Definindo melhor, a

¹Doutoranda em Ciência dos Alimentos, DCA/UFLA, thaisramos85@yahoo.com.br

² Mestre em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, gajoadriano@yahoo.com.br

³ Professor Adjunto, DCA/UFLA, sandra@dca.ufla.br

⁴ Professor Titular, DCA/UFLA, lrabreu@dca.ufla.br

cromatografia é então um processo de separação baseado nas diferentes afinidades de duas ou mais substâncias com algum material estacionário.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um modo de cromatografia do tipo adsorção e sua fase móvel é o material usado para impulsionar a amostra a ser separada (o soluto) sobre a fase estacionária, enquanto que sua fase estacionária pode ser um material sólido altamente polar com o qual as moléculas de diferentes polaridades serão adsorvidas.

O objetivo do trabalho foi viabilizar a produção de lactulose com o do soro de ricota, e a identificação de lactulose por cromatografia em camada delgada (CCD).

MATERIAL E MÉTODOS

Processo de produção do xarope de lactulose

Obtenção do soro de ricota

O soro, proveniente da fabricação de queijo Minas Frescal, foi obtido do Laticínios Verde Campo, localizado na cidade de Lavras, MG. Após a precipitação do soro doce, proveniente da elaboração de queijo Minas Frescal, foi obtido o soro de ricota, conforme a tecnologia de fabricação especificada por Furtado & Lourenço Neto (1994).

Soro de ricota

A fabricação da ricota foi efetuada na planta piloto do laticínios localizada no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras-MG.

Reação de isomerização da lactose

A lactose, presente no soro de leite concentrado foi isomerizada a lactulose por meio de uma reação catalisada por borato de sódio, razão molar de 1:1 (lactose/borato) em pH 11. O borato de sódio facilita a reação com o mínimo de reações secundárias, resultando em um alto rendimento de lactulose, por deslocar a reação no sentido do produto mediante a formação de um complexo com a lactulose (Dendene et al., 1994; Zokae et al., 2002; Saron, 2003).

As operações que foram realizadas, para a isomerização da lactose (soro de ricota) para produção do xarope de lactulose, foram baseadas no trabalho de Hicks et al. (1984); Saron (2003) e adaptadas em função do soro de leite proveniente da fabricação da ricota.

Cromatografia em camada delgada

A técnica consiste em aplicar uma camada fina do adsorvente finamente pulverizado (geralmente sílica ou óxido de alumínio, às vezes adicionados de material fluorescente à luz ultravioleta) sobre uma placa lisa e plana (vidro ou alumínio). Alguns microlitros de solução da amostra a ser examinada são aplicados próximos a uma das bordas da placa, e a mesma imersa alguns milímetros em um eluente mantido em recipiente fechado. O eluente, por força da capilaridade, percorre a fase fixa em movimento ascendente, carregando consigo os componentes da amostra. Os compostos ascendem a diferentes alturas dependendo de suas estruturas moleculares.

Andrews (1996) cita a cromatografia de camada delgada, como alternativa para a detecção de lactulose. A caracterização das frações obtidas, por meio da separação em coluna foi feita com base na cromatografia de camada delgada (CCD). Nesta técnica, utilizou-se sílica gel 60 F₂₅₄25 (Merck) como fase estacionária, suportada em alumínio e fase móvel constituída de água destilada (45 mL), acetato de etila (10 mL) e isopropanol (55 mL).

As amostras obtidas da separação em colunas (troca iônica e exclusão molecular) foram identificadas por cromatografia em camada delgada.

Foram utilizados como reveladores difenilamina (0,5 g), anilina (1 mL), ácido ortofosfórico (5 mL) que foram diluídos em 50 mL de acetona (Walkley & Tilman, 1977). As placas de CCD foram

reveladas em estufa entre 100 – 105 °C, até o aparecimento de manchas características, que foram melhor visualizadas em câmara com luz ultravioleta, com base no trabalho de Saron (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras obtidas, por meio da separação em coluna cromatográfica, foram identificadas quanto à presença ou ausência de lactulose em placas de cromatografia em camada delgada. Por causa de conveniência e rapidez, usou-se a técnica de CCD para: estabelecer se dois compostos são idênticos, verificar a pureza de um composto, determinar o número de componentes em uma mistura, determinar o solvente apropriado para separação em uma coluna cromatográfica, monitorar a separação de uma mistura em uma coluna cromatográfica ou acompanhar o progresso de uma reação. Observa-se na Figura 1 uma placa de CCD em que foram aplicadas diferentes concentrações de padrão de lactulose (grau cromatográfico) e também, amostras obtidas da eluição da coluna cromatográfica. A amostra apresentou-se idêntica ao padrão aplicado na placa, somente um componente foi determinado (lactulose). A fase móvel e os reveladores mostraram-se eficientes, permitindo a identificação das frações de lactulose.

Saron (2003) identificou frações de lactulose, obtidas da separação em coluna cromatográfica em placas de CCD e encontrou presença de lactulose nas frações.

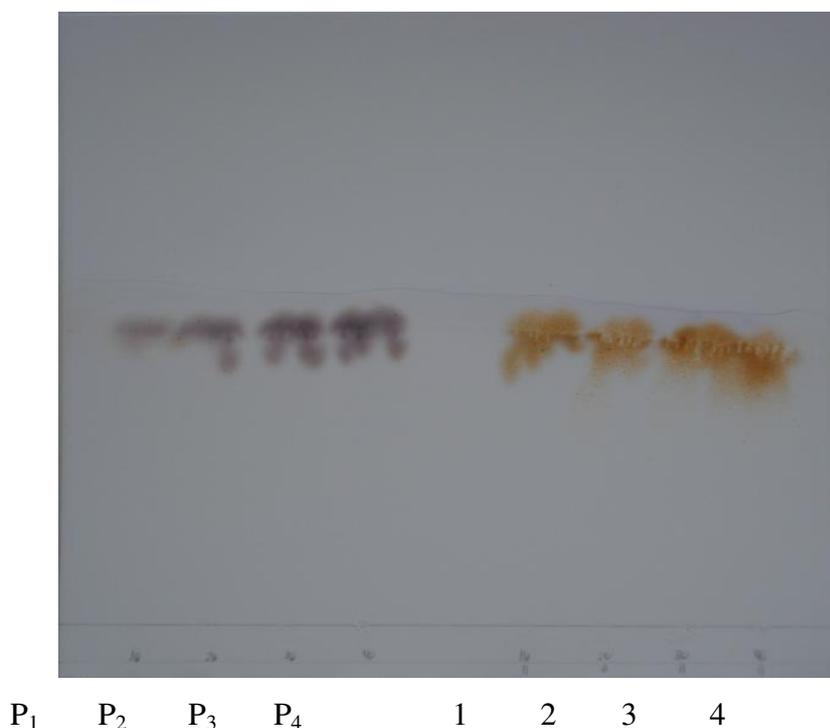


FIGURA 1 Identificação das frações de lactulose em placas de CCD. P₁; P₂; P₃; P₄ – padrão de lactulose; 1, 2, 3, 4 – presença de lactulose nas frações.

CONCLUSÃO

A cromatografia de troca iônica e a de exclusão molecular mostraram eficiência no processo de separação do catalisador da reação; ácido bórico; além de purificar a lactulose. A cromatografia em camada delgada permitiu a identificação das frações de lactulose.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

AIDER, M.; HALLEUX, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Food Science & Technology*, London, v. 18, n. 2, p. 356-364, Feb. 2007.

ANDREWS, G. R. Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 53, n. 4, p. 665-80, Nov. 1986.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DENDENE, K.; GUIHARD, L.; NICOLAS, S.; BARIOU, B. Kinetics of lactose isomerization of lactulose in an alkaline medium. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*, Oxford, v. 61, n. 3, p.37-42, Mar. 1994.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

HICKS, K. B.; RAUPP D. L.; SMITH, P. W. Preparation and purification of lactulose from sweet cheese whey ultrafiltrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 32, n. 2, p. 288-292, Mar./Apr. 1984.

RAMOS, T. M. **Produção de xarope de lactulose a partir do soro de ricota e seu emprego em iogurte e queijo quark**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SARON, M. L. G. **Aproveitamento do permeado de soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de culturas de bactérias probióticas**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

WALKLEY, J. W.; TILLMAN, J. A simple thin-layer chromatographic technique for the separation of and oligosaccharides. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 172-174, Feb. 1977.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.;BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2001. 729 p.

ZOKAEE, F.; KAGHAZCHI, T.; ZARE, A.; SOLEMANI, M. Isomerization of lactose to lactulose: study and comparison of their catalytic systems. *Process Biochemistry*, London, v. 37, n. 6, p. 629-635, June 2002.