

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Concentração, Purificação e Fracionamento
das Proteínas do Soro Lácteo através da
Tecnologia de Separação por Membranas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Baldasso

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas

Camila Baldasso

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Fenômenos de Transporte
e Operações Unitárias

Orientadora: Prof^a Dra. Isabel Cristina Tessaro

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a *Dissertação Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas*, elaborada por Camila Baldasso como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof^{ta}. Dra. Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Prof. Dr. João Henrique Corrêa Kanan

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Agradecimentos

À Professora Isabel Cristina Tessaro, pelo apoio, atenção, orientação, confiança, paciência, compreensão e acima de tudo amizade desenvolvida durante estes dois anos de mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química pela oportunidade.

À Capes pela oportunidade e apoio financeiro.

À Elegê Alimentos pela doação do soro em pó para execução do trabalho.

Aos Professores: Lígia Damasceno Ferreira Marczak (Departamento de Engenharia Química), João Henrique Corrêa Kanan (ICBS), Plinho Francisco Hertz (ICTA), e aos laboratórios de Biotecnologia (BIOTEC) por compartilharem seus conhecimentos e experiências científicas.

Aos funcionários e professores do Departamento de Engenharia Química, especialmente à Sirley e ao Fernando, pela paciência, cooperação e agilidade nos momentos necessários.

À bolsista Tatiana de Castro Barros pela colaboração, disponibilidade e amizade.

Aos colegas pelo apoio e amizade.

E finalmente, agradeço aos pilares de minha vida: a Deus, à minha família e em especial, ao meu amor Carlos Eduardo, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Resumo

O soro lácteo é produzido pela indústria de laticínios durante a fabricação de queijos e caseína. Como matéria-prima pode conferir à tecnologia alimentar novas potencialidades devido às propriedades funcionais e nutricionais das suas proteínas. Porém, muitas indústrias ainda consideram o soro como um efluente, o qual quando não devidamente tratado gera um sério problema ambiental por causa da sua elevada carga orgânica. Estes fatores tornam importante o desenvolvimento de alternativas para um adequado aproveitamento do soro, porque ao mesmo tempo em que a transformação do soro em produtos diversos diminui o problema ambiental, proporciona ganhos às indústrias de laticínios, através do desenvolvimento de novos produtos. A tecnologia de separação por membranas, especialmente a ultrafiltração (UF), vem sendo empregada pelas indústrias de laticínios para obter concentrados protéicos a partir do soro, pois este processo permite a concentração seletiva das proteínas em relação aos outros componentes de natureza não protéica. Além disto, devido às propriedades específicas de cada proteína do soro, tem havido um crescente interesse no fracionamento destas proteínas, porque muitas vezes estas características não são realçadas nos concentrados protéicos devido a interações com outros componentes. A UF e a microfiltração (MF) vêm sendo testadas para se obter frações distintas das proteínas do soro. Dentro deste contexto, utilizando processos de separação por membranas, os objetivos deste trabalho são: (i) concentrar e purificar as proteínas do soro, (ii) a partir do concentrado protéico obtido em (i) obter duas frações, uma rica em β -lactoglobulina e a outra em α -lactoalbumina (as proteínas mais abundantes no soro). A etapa de concentração (i) foi realizada utilizando membranas de UF com massa molar de corte de 10 kDa, o sistema foi operado no modo batelada associado a diafiltração (DF), permitindo, desta forma, uma maior remoção de sais e lactose, conduzindo simultaneamente a uma maior concentração de proteínas no retido. As condições de operação mantidas constantes foram: temperatura de 50 °C, pressão transmembrana de 2 bar e vazão de alimentação de 840 L.h⁻¹. Foram testadas quatro estratégias variando o fator de concentração volumétrico (FC); o volume e o número de DF que deveriam ser realizadas para obtenção do concentrado protéico mais puro. Na etapa de fracionamento (ii) o concentrado protéico obtido em (i) foi tratado por diferentes processos de separação com membranas a fim de fracionar as proteínas majoritárias. Nesta etapa membranas de UF e MF foram testadas: HN06 (20 kDa), RZ04 (70 kDa), VCWP (0,1 μ m), MF-7002 (0,1 μ m), UF-C50 (50 kDa) e UF-C20 (20 kDa). Para realizar a separação foram consideradas características como: massa molar e pH da solução de alimentação. A eficiência de cada processo foi avaliada pela determinação da concentração de proteína, lactose, sólidos totais, pH e condutividade elétrica das correntes de permeado e de retido. Os resultados obtidos em (i) indicaram que o processo é adequado para obtenção de concentrados protéicos com diferentes graus de pureza, podendo chegar a uma pureza protéica de 70 % em base seca. Em (ii) os resultados indicam que algum tipo de agregação e desnaturação pode ocorrer com as proteínas nas condições em que os experimentos foram realizados, pois as tentativas de fracionamento não apresentaram resultados satisfatórios. Entre as membranas utilizadas as que apresentaram os resultados mais promissores foram a MF-7002 e a VCWP, com um fracionamento parcial das proteínas majoritárias presentes no soro.

Abstract

Whey is the liquid byproduct produced by the dairy industry during the manufacture of cheeses and casein. As a raw material it can provide in the food technology new potentialities due to the functional and nutritional properties of its proteins. However, many industries still consider the whey as waste material, which if not properly disposed creates a very severe environmental problem due to its high organic load. These factors led to the development of important alternatives to the right utilization of the whey, therefore solving the pollution problem and providing economical advantages to the dairy industries. Membrane technology, especially ultrafiltration (UF), has been used in the dairy industries to produce whey protein concentrates, because this process allows the selective concentration of the proteins in relation to the other components. Moreover, due to the specific properties of each whey protein, the interest in fractionating these proteins has been increased, since their properties could not be enhanced in the protein concentrates due to the interactions between the different components. The UF and microfiltration (MF) have been tested to simultaneously fractionate, purify and concentrate the whey thus improving its utilization. In this context, by using membrane separation process, the objectives of this work are: (i) to concentrate and to purify the whey proteins, (ii) from the protein concentrate obtained in (i) to fractionate the main whey proteins, the β -lactoglobulin and the α -lactoalbumin. The concentration step (i) was performed with UF membranes with a molecular weight cut-off of 10 kDa, the system was operated in batch mode associated with discontinuous diafiltration (DF), in order to remove salts and lactose simultaneously, leading to a whey protein concentrate above 50% protein (dry basis). The experiments were carried out with the following operating conditions: temperature of 50 °C, transmembrane pressure of 2 bar and cross flow rate of 840 L.h⁻¹. Four strategies have been tested by changing the volumetric concentration factor (FC) and the volume and the number of DF. In the fractionation stage (ii) the protein concentrate obtained in (i) was processed with different UF and MF membranes in order to separate the two main proteins present in the whey. The following UF and MF membranes have been tested: HN06 (20 kDa), RZ04 (70 kDa), VCWP (0,1 μ m), MF-7002 (0,1 μ m), UF-C50 (50 kDa) and UF-C20 (20 kDa). To achieve the separation, characteristics such as molecular weight of the proteins and pH of the solution had been considered. The efficiency of each process was evaluated by determining the concentration of proteins and lactose, total solids content, the pH and the electrical conductivity for both streams, the permeate and the concentrate. The results have shown that the UF process is adequate for production of protein concentrates with different degrees of purity; in the best experimental strategy, the protein concentrate obtained had 70 % protein, dry basis. In the protein fractionating stage the results indicate that some kind of aggregation and denaturation is occurring with the proteins in the operating conditions tested in this work, therefore the fractionation process did not show satisfactory results until now. Amongst the membranes used the results showed that the most promising were the MF-7002 and VCWP membranes, with a partial separation.

Sumário

| | |
|---|------------|
| Resumo | v |
| Abstract | vi |
| Sumário | vii |
| Introdução | 1 |
| Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica | 4 |
| 2.1 Soro Lácteo | 4 |
| 2.2 Produção do Soro | 6 |
| 2.3 Principais Componentes do Soro Lácteo | 8 |
| 2.3.1 Lactose | 9 |
| 2.3.2 Sais minerais e vitaminas | 9 |
| 2.3.3 Proteínas | 10 |
| 2.4 Propriedades das Proteínas do Soro | 16 |
| 2.4.1 Propriedades Nutricionais | 16 |
| 2.4.2 Propriedades Funcionais | 18 |
| 2.5 Produtos Derivados do Soro de Queijo | 19 |
| 2.5.1 Soro em pó | 20 |
| 2.5.2 Produtos Protéicos do Soro (Concentrados e Isolados Protéicos) | 23 |
| 2.5.2.1 Processos de Recuperação das Proteínas do Soro | 25 |
| 2.5.3 Frações Purificadas das Proteínas Majoritárias do Soro | 26 |
| 2.5.3.1 Processos de Fracionamento das Proteínas Majoritárias do Soro | 28 |
| 2.6 Aproveitamento do Soro – Situação Mundial | 29 |
| 2.7 Processos de separação por membranas | 31 |
| 2.7.1 Membranas | 31 |
| 2.7.2 Microfiltração (MF) | 33 |
| 2.7.3 Ultrafiltração (UF) | 34 |
| 2.7.4 Módulos | 35 |
| 2.7.4.1 Módulo Placa e Quadro | 35 |
| 2.7.4.2 Módulo Fibra-oca | 35 |
| 2.7.4.3 Módulo Espiral | 36 |
| 2.7.4.4 Módulo Tubular | 36 |
| 2.8 Princípios dos PSM | 37 |
| 2.8.1 Fluxo Permeado | 37 |
| 2.8.2 Seletividade | 38 |
| 2.8.3 Fator de Concentração | 39 |
| 2.9 Problemas que afetam os PSM | 39 |
| 2.10 Aplicação dos PSM na Indústria Alimentícia | 42 |
| 2.10.1 Aplicação dos PSM na Indústria de Laticínios | 46 |
| Materiais e Métodos | 56 |
| 3.1 Preparação do soro | 56 |
| 3.2 Reagentes Analíticos | 57 |
| 3.3 Membranas | 59 |
| 3.4 Equipamento | 61 |

| | |
|--|------------|
| 3.5 Metodologia Experimental..... | 63 |
| 3.5.1 Compactação das Membranas e Medidas de Fluxo de Água | 63 |
| 3.5.2 Concentração e Purificação das Proteínas do Soro..... | 64 |
| 3.5.3 Fracionamento das proteínas do soro..... | 67 |
| 3.6 Métodos Analíticos | 70 |
| 3.6.1 Análise de Extrato Seco Total - Método Gravimétrico | 70 |
| 3.6.2 Análise de pH..... | 70 |
| 3.6.3 Análise de Condutividade Elétrica..... | 70 |
| 3.6.4 Análise de Lactose - Método do Ácido Dinitrossalicílico - DNS..... | 71 |
| 3.6.5 Análise de Açúcar - Método Fenol Sulfúrico | 71 |
| 3.6.6 Determinação da Proteína Total - Método de Lowry | 71 |
| 3.6.7 Análise de Proteína - Eletroforese SDS – PAGE..... | 72 |
| 3.6.8 Cromatografia gel | 73 |
| 3.7 Limpeza do Sistema de Membranas | 74 |
| Resultados e Discussão | 76 |
| 4.1 Concentração e Purificação das proteínas..... | 76 |
| 4.1.1 Seleção da membrana | 76 |
| 4.1.2 Fluxos permeados para a água e para o soro..... | 78 |
| 4.1.3 Comparação das estratégias para concentração e purificação protéica | 80 |
| 4.1.4 Resultados para a melhor estratégia de purificação protéica | 83 |
| 4.2 Fracionamento das Proteínas Majoritárias..... | 89 |
| 4.2.1 Membranas HN06, RZ04 e VCWP | 90 |
| 4.2.2 Membrana MF - 7002 | 94 |
| 4.2.3 Membrana UF - C50 | 99 |
| 4.2.4 Membrana UF – C20 | 104 |
| 4.2.5 Comentários gerais sobre o fracionamento das proteínas..... | 107 |
| 4.3 Limpeza das membranas..... | 111 |
| Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros | 115 |
| Referências Bibliográficas | 121 |
| Apêndice A..... | 131 |
| A.1.1 Análise de Extrato Seco Total - método gravimétrico..... | 131 |
| A.1.2 Análise de Lactose - Método do ácido dinitrossalicílico - DNS..... | 132 |
| A.1.3 Análise de açúcar - Método fenol sulfúrico | 133 |
| A.1.4 Determinação da proteína total - Método de Lowry | 133 |
| A.1.5 Análise de proteína - Eletroforese SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins)..... | 134 |
| A.1.6 Análise de Proteína – Cromatografia Gel | 135 |
| Apêndice B..... | 137 |
| B.1 Concentração e Purificação de Proteínas - tabelas..... | 137 |
| B.2 Fracionamento das Proteínas – tabelas..... | 146 |
| B.3 Limpeza das membranas - tabelas..... | 163 |
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tabelas..... | xii |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos | xvi |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1: Fluxograma simplificado da produção de queijo..... | 7 |
| Figura 2.2: Variação da conformação da β -Lg em função do pH | 12 |
| Figura 2.3: Fluxograma do processamento do soro de queijo em pó..... | 21 |
| Figura 2.4: Representação esquemática do modo de operação tangencial | 37 |
| Figura 3.1: Fotografias das membranas: espiral (A), tubular(B) e plana (C)..... | 60 |
| Figura 3.2: Representação esquemática simplificada da unidade piloto de UF..... | 61 |
| Figura 3.3: Fotografias dos tanques de alimentação (A) e (B)..... | 62 |
| Figura 3.4: Fotografias das carcaças para módulos de membrana..... | 62 |
| Figura 3.5: Representação esquemática do processo de UF..... | 65 |
| Figura 3.6: Representação esquemática do processo de DF..... | 66 |
| Figura 3.7: Resumo esquemático das estratégias utilizadas para concentração e purificação das proteínas do soro..... | 67 |
| Figura 3.8: Representação esquemática do processo de fracionamento desejado..... | 67 |
| Figura 3.9: Representação esquemática das estratégias utilizadas para fracionamento das proteínas do concentrado protéico obtido do soro..... | 70 |
| Figura 4.1: Fluxo de água vs pressão transmembrana, para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7001, a 30 °C e vazão de alimentação média de 700 L.h ⁻¹ | 77 |
| Figura 4.2: Retenção de dextrana vs pressão transmembrana, para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7002, a 30 °C e vazão de alimentação média de 700 L.h ⁻¹ | 78 |
| Figura 4.3: Fluxo de água e de soro vs pressão transmembrana para a membrana UF-6001, T=50 °C, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 79 |
| Figura 4.4: Percentual protéico no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os experimentos 1, 2, 3 e 4, membrana UF-6001, T=50 °C, $\Delta P=2$ bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 80 |
| Figura 4.5: Percentual de lactose no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os Experimentos 1, 2, 3 e 4, membrana UF-6001, T=50 °C, $\Delta P=2$ bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 81 |
| Figura 4.6: Percentual de sais no concentrado (base seca) vs etapas do processo para experimento 1, 2, 3 e 4, para a membrana UF-6001, T=50 °C, $\Delta P=2$ bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 82 |
| Figura 4.7: Fluxo permeado vs fator de concentração volumétrico para Experimento 4 na etapa de UF, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 83 |
| Figura 4.8: Fluxo permeado vs tempo para o Experimento 4, para a membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 84 |
| Figura 4.9: Concentração de sólidos totais das amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 85 |
| Figura 4.10: Concentração de proteína das amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 86 |
| Figura 4.11: Concentração de lactose para as amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50°C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840L.h ⁻¹ | 87 |
| Figura 4.12: pH para as amostras de permeado e concentrado vs tempo para Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 88 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.13: Condutividade elétrica das amostras de permeado e concentrado vs tempo para Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 88 |
| Figura 4.14: Retenção de proteína, lactose e sólidos totais em função do tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 89 |
| Figura 4.15: Fluxo permeado em função do tempo para os experimentos de compactação das membranas VCWP, HN06 e RZ04, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , ΔP = 3,25 bar, T = 25 °C..... | 91 |
| Figura 4.16: Fluxo permeado de água (esquerda) e de fluxo permeado de concentrado protéico (direita) em função da pressão transmembrana para as membranas VCWP, HN06 e RZ04, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 40 °C e pH = 4,6 (VCWP e RZ04) e T = 25 °C e pH = 6,3 (HN06). | 91 |
| Figura 4.17: Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana HN06, RZ04, VCWP (100 V e 30 mA)..... | 93 |
| Figura 4.18: Compactação da membrana MF-7002, vazão de alimentação 700 L.h ⁻¹ , ΔP = 3,25 bar, T = 25 °C..... | 95 |
| Figura 4.19: Fluxo de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 (concentrado). | 95 |
| Figura 4.20: Fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão de alimentação 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 e P = 1,75 bar..... | 96 |
| Figura 4.21: Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002 (100 V e 30 mA)..... | 97 |
| Figura 4.22: Fluxo permeado de água versus tempo do experimento de compactação da membrana UF-C50; vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ , ΔP = 3,75 bar, T = 25 °C..... | 99 |
| Figura 4.23: Fluxos permeados de água (esquerda) e de concentrado protéico (direita) em dois pHs (4,6; 6,3) em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ , T = 40 e 25 °C (concentrado)..... | 100 |
| Figura 4.24: Fluxo permeado de concentrado protéico em pHs e temperaturas diferentes em função do tempo para a membrana UF-C50, vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ e ΔP = 2,25 bar..... | 101 |
| Figura 4.25: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado obtidos nos experimentos com a membrana UF-C50 (100 V e 30 mA)..... | 103 |
| Figura 4.26: Compactação da membrana UF-C20, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , ΔP = 3,75 bar, T = 25 °C..... | 104 |
| Figura 4.27: Fluxo permeado de água (esquerda) e de concentrado protéico e de soro (direita) em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, pH = 6,3..... | 105 |
| Figura 4.28: Fluxo permeado de soro diluído e de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20; condições de operação: vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, pH = 6,3 e ΔP = 2,25 bar..... | 105 |
| Figura 4.29: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C20 (100 V e 30 mA)..... | 107 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.30: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ ; amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm... | 108 |
| Figura 4.31: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ , amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm... | 108 |
| Figura 4.32: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para a amostra de soro analisada por cromatografia gel (100 V e 30 mA)..... | 109 |
| Figura 4.33: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-6001, ΔP = 2 bar e T = 50 °C, vazão de alimentação 840 L.h ⁻¹ | 112 |
| Figura 4.34: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a MF-7002, ΔP = 1,75 bar e T = 40 °C, vazão de alimentação 700 L.h ⁻¹ | 113 |
| Figura 4.35: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C20, ΔP = 2,25 bar e T = 25 °C, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ | 114 |
| Figura 4.36: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C50, ΔP = 2,25 bar e T = 25 °C, vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ | 114 |
| Figura A.1: Esquema da preparação do sistema de eletroforese..... | 135 |
| Figura B.1: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) do experimento de duplicata para as amostras de concentrado e permeado da membrana HN06, RZ04, VCWP (100 V e 30 A)..... | 148 |
| Figura B.2: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras do experimento de duplicata para o concentrado e o permeado da membrana MF-7002 (100 V e 30 A)..... | 152 |
| Figura B.3: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C50..... | 155 |
| Figura B.4: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C20..... | 159 |
| Figura B.5: Curva de calibração da coluna de cromatografia gel. | 160 |
| Figura B.6: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ ; amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm... | 161 |
| Figura B.7: Duplicata da cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ ; amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm. | 161 |
| Figura B.8: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ , amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm... | 162 |
| Figura B.9: Duplicata da cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose TM 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min ⁻¹ , amostras monitoradas pela absorvância a 280 nm. | 162 |

Lista de tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1: Concentração e tamanho dos componentes do leite, e distribuição média destes componentes no coalho e no soro. | 5 |
| Tabela 2.2: Composição aproximada do soro doce. | 8 |
| Tabela 2.3: Quantidades médias de vitaminas e minerais em 100 g de soro doce em pó. . | 9 |
| Tabela 2.4: Propriedades e concentração das proteínas do soro. | 11 |
| Tabela 2.5: Concentração de aminoácidos essenciais na proteína de referência, nas proteínas do soro, na β -Lg e na α -La. | 16 |
| Tabela 2.6: Valores que representam a qualidade nutricional do leite e das suas frações protéicas. | 17 |
| Tabela 2.7: Caracterização dos principais produtos derivados do soro de queijo. | 22 |
| Tabela 2.8: Propriedades funcionais que os concentrados protéicos conferem aos alimentos | 24 |
| Tabela 2.9: Composição de frações industriais de α -La e β -Lg. | 26 |
| Tabela 2.10: PSM relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação. | 33 |
| Tabela 3.1: Características físico-químicas do soro em pó. | 57 |
| Tabela 3.2: Características nutricionais do soro em 100 g. | 57 |
| Tabela 3.3: Reagentes utilizados, fórmula, grau de pureza e fornecedor. | 58 |
| Tabela 3.4: Características das membranas utilizadas nos experimentos. | 60 |
| Tabela 4.1: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado das membranas VCWP, HN06 e RZ04. | 92 |
| Tabela 4.2: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002. | 97 |
| Tabela 4.3: Dados de intensidade relativa (em porcentagem) correspondendo a quantidade de proteína em cada banda eletroforética das amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002. | 98 |
| Tabela 4.4: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h^{-1} | 102 |
| Tabela 4.5: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico e para o soro diluído para a membrana UF-C20, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 620 L.h^{-1} | 106 |
| Tabela A.1: Componentes das Soluções para preparação dos géis de eletroforese. | 135 |
| Tabela B.1: Dados de fluxo médio de água e retenção média de dextrana em função da ΔP , para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7001, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ | 137 |
| Tabela B.2: Dados de fluxo médio de soro em função da ΔP , para a membrana UF-6001, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de alimentação de 840 L.h^{-1} | 137 |
| Tabela B.3: Resumo dos dados médios de concentração, massa e percentual (*base seca) de proteína, lactose e sais para o concentrado dos Experimentos 1, 2, 3, e 4 em função da etapa do processo utilizando a membrana UF-6001, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta P = 2$ bar e vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} | 138 |
| Tabela B.4: Resumo dos dados médios de concentração, massa e percentual (*base seca) de proteína, lactose e sais para o concentrado dos Experimentos 2' e 4' em função da etapa do processo utilizando a membrana UF-6001, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta P = 2$ bar e vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} (duplicatas dos experimentos 2 e 4). | 139 |
| Tabela B.5: Dados detalhados do Experimento 1, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de | |

| | | |
|--------------|---|-----|
| | concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 140 |
| Tabela B.6: | Dados detalhados do Experimento 2, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 141 |
| Tabela B.7: | Dados detalhados do Experimento 3, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 142 |
| Tabela B.8: | Dados detalhados do Experimento 4, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 143 |
| Tabela B.9: | Dados detalhados da duplicata do Experimento 2, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 144 |
| Tabela B.10: | Dados detalhados da duplicata do Experimento 4, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h ⁻¹ | 145 |
| Tabela B.11: | Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação das membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, ΔP =3,25 bar..... | 146 |
| Tabela B.12: | Dados de fluxo permeado de água para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 40 °C (VCWP e RZ04) e 25 °C (HN06)..... | 146 |
| Tabela B.13: | Duplicata dos dados de fluxo permeado de água para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 40 °C (VCWP e RZ04) e 25 °C (HN06). | 146 |
| Tabela B.14: | Dados de fluxo permeado de concentrado protéico para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 (VCWP e RZ04) e 25 °C, pH = 6,3 (HN06). | 147 |
| Tabela B.15: | Duplicata dos dados de fluxo permeado de concentrado protéico para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 (VCWP e RZ04) e 25 °C, pH = 6,3 (HN06). | 147 |
| Tabela B.16: | Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado das membranas VCWP, HN06 e RZ04 (duplicata)..... | 147 |
| Tabela B.17: | Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana MF-7002 vazão de alimentação 700 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, ΔP =3,25 bar. | 148 |

| | |
|---|-----|
| Tabela B.18: Dados de fluxo permeado de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 (concentrado)..... | 148 |
| Tabela B.19: Duplicata dos dados de fluxo permeado de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6 (concentrado)..... | 149 |
| Tabela B.20: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6, ΔP = 1,75 bar. .. | 149 |
| Tabela B.21: Dados de intensidade do modelo (pixel) e de intensidade relativa, correspondendo a quantidade de proteína em cada banda eletroforética das amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002..... | 150 |
| Tabela B.22: Dados do experimento de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h ⁻¹ , T = 40 °C, pH = 4,6, ΔP = 1,75 bar (duplicata)..... | 151 |
| Tabela B.23: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002 (duplicata)..... | 152 |
| Tabela B.24: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana UF-C50 vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, ΔP = 3,75 bar. | 152 |
| Tabela B.25: Dados de fluxo permeado de água em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 40 °C, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ | 153 |
| Tabela B.26: Dados de fluxo permeado de concentrado em pH 6,3 em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 25 °C, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ | 153 |
| Tabela B.27: Dados de fluxo permeado de concentrado em pH 4,6 em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 40 °C, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ | 153 |
| Tabela B.28: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH = 6,3; T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ | 154 |
| Tabela B.29: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH = 6,3; T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ (duplicata)..... | 154 |
| Tabela B.30: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, pH = 6,3, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ (duplicata)..... | 154 |
| Tabela B.31: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH = 4,6; T = 40 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ | 154 |
| Tabela B.32: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH = 4,6; T = 40 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ (duplicata)..... | 155 |
| Tabela B.33: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, pH = 4,6, T = 40 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h ⁻¹ (duplicata)..... | 155 |
| Tabela B.34: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana UF-C20 vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ , T = 25 °C, ΔP = 3,75 bar. | 156 |

| | |
|---|-----|
| Tabela B.35: Dados de fluxo permeado de água em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ | 156 |
| Tabela B.36: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ | 156 |
| Tabela B.37: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ | 157 |
| Tabela B.38: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ (duplicata). | 157 |
| Tabela B.39: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ (duplicata). | 158 |
| Tabela B.40: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ | 158 |
| Tabela B.41: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ | 158 |
| Tabela B.42: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ (duplicata). | 159 |
| Tabela B.43: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com soro diluído para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h ⁻¹ (duplicata). | 159 |
| Tabela B.44: Dados para construção da curva de calibração da coluna de cromatografia gel. | 160 |
| Tabela B.45: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-6001, ΔP = 2 bar e T = 50 °C, vazão de alimentação 840 L.h ⁻¹ | 163 |
| Tabela B.46: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a MF-7002, ΔP = 1,75 bar e T = 40 °C, vazão de alimentação 700 L.h ⁻¹ | 163 |
| Tabela B.47: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C50, ΔP = 2,25 bar e T = 25 °C, vazão de alimentação 400 L.h ⁻¹ | 163 |
| Tabela B.48: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C20, ΔP = 2,25 bar e T = 25 °C, vazão de alimentação 620 L.h ⁻¹ | 163 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

| | |
|-----------------|---|
| PSM | processo de separação por membranas |
| MF | microfiltração |
| UF | ultrafiltração |
| NF | nanofiltração |
| OI | osmose inversa |
| ED | eletrodialise |
| DF | diafiltração |
| IP | isolado protéico de soro |
| CP | concentrado protéico de soro |
| pI | ponto isolétrico |
| α -La | α -lactoalbumina |
| β -Lg | β -lactoglobulina |
| Ig | imunoglobulina |
| BSA | albumina do soro bovino |
| NPN | nitrogênio não protéico |
| MMC | massa molar de corte (kDa) |
| FC | fator de concentração |
| ST | sólidos totais (g. L ⁻¹) |
| DBO | demanda bioquímica de oxigênio (mg O ₂ . L ⁻¹) |
| J _p | fluxo permeado (L. m ⁻² . h ⁻¹) |
| Δp | pressão transmembrana |
| V | volume (L) |
| A | área da membrana (m ²) |
| P | permeabilidade |
| t | tempo (min) |
| R | coeficiente de retenção (%) |
| C _p | concentração de soluto no permeado (g. L ⁻¹) |
| C _f | concentração de soluto na alimentação (g. L ⁻¹) |
| V _o | volume inicial da solução (L) |
| V _R | volume do retido (L) |
| V _F | volume permeada da solução (L) |
| $\frac{dV}{dt}$ | variação do volume com tempo (L. h ⁻¹). |

Capítulo 1

Introdução

O soro lácteo é a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. É um subproduto de importância relevante na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional; 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro; neste volume encontra-se cerca da metade dos sólidos do leite, sobretudo lactose, proteínas solúveis e sais minerais.

Estima-se que a produção mundial de soro seja de 180 a 190 milhões de toneladas por ano. Cerca da metade do soro produzido é eliminado como efluente em sistemas hídricos ou como adubo diretamente no solo, resultando numa perda importante de energia alimentar, e, ao mesmo tempo, uma grande perda econômica. Quando incorporado às águas residuais dos laticínios, sem tratamento, o soro constitui a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor, a carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pode chegar a $60.000 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1}$; este poder poluente é cerca de 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico. A outra metade do soro produzido no mundo é processada em vários produtos alimentícios retornando, desta forma, como alimentação animal ou humana, ou ainda para a produção de medicamentos e outros produtos.

A indústria de alimentos investe no desenvolvimento de produtos novos e inovadores para satisfazer as necessidades dos consumidores. A conscientização crescente dos consumidores da importância de alimentos ao mesmo tempo nutritivos e saudáveis, motiva pesquisadores a concentrar esforços nos estudos dos efeitos do soro e suas frações. Há cada vez mais evidências de que o soro contém uma variedade de compostos capazes de gerar impacto favorável sobre a saúde. Além do mais, a utilização não racional do soro constitui prática antieconômica e até mesmo anti-social, devido à carência mundial de alimentos e também pelo caráter sazonal da produção de leite e oscilações desta.

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de solucionar o problema do soro de queijo pode trazer benefícios econômicos e ambientais, pois o soro é considerado uma

importante fonte de proteína a ser utilizada para consumo. Assim, justificam-se estudos sobre a possibilidade de utilizá-lo comercialmente.

As proteínas do soro possuem valor nutricional elevado, conferido pela presença de alto teor de aminoácidos essenciais. O perfil destes aminoácidos atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde). Devido à quantidade de aminoácidos essenciais e da elevada qualidade protéica, as proteínas do soro podem aumentar o valor nutricional dos alimentos usados na dieta humana. Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro possuem propriedades funcionais e tecnológicas versáteis quando utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios.

Industrialmente, o soro pode ser processado mediante diversas técnicas, tais como a filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, osmose inversa, tratamento térmico, fermentação, desmineralização e cristalização, entre outras.

O método convencional de concentração de soro mais utilizado é a evaporação térmica. As principais desvantagens deste método são o elevado consumo energético e o elevado teor de sais e açúcares no produto concentrado. Os fatores que determinam a dificuldade no aproveitamento das proteínas do soro de queijo são os elevados teores de água, de sais e de lactose.

A ultrafiltração (UF) se apresenta como um método alternativo bastante atraente, uma vez que não faz uso do calor e não envolve mudança de fase, o que torna o processo de concentração mais econômico. A UF é um Processo de Separação por Membranas (PSM) tipicamente usada para reter macromoléculas permitindo que moléculas de baixa massa molar atravessem a membrana. A UF vem sendo empregada na indústria de laticínios, principalmente na recuperação de produtos como as proteínas do soro de queijo e no seu fracionamento. A UF permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro, devido à retenção seletiva de proteína e da permeação da lactose, sais minerais, água e compostos de baixa massa molar.

A fração protéica do soro contém: β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), Albumina do soro bovino (BSA), Imunoglobulinas (Ig), Glicomacropéptídeos e alguns polipeptídios resultantes da proteólise das caseínas por enzimas do leite. Devido às propriedades específicas de cada uma das proteínas do soro, tem havido um crescente interesse no fracionamento das proteínas. As características nutricionais, terapêuticas e funcionais únicas nestas proteínas isoladas não se manifestam em concentrados protéicos devido a interações entre componentes e a degradação durante o processamento. Aumentou, portanto, o interesse comercial na produção de proteínas de soro isoladas com propriedades funcionais e biológicas bem caracterizadas. Atualmente estuda-se o possível papel da α -La na formulação de agentes antitumorais. Uma das funções *in vivo* da β -Lg parece ser a fixação de retinol e seu transporte ao intestino delgado. A β -Lg também pode fixar ácidos graxos. Além disso, a β -Lg tem maior capacidade de gelificação que a α -La. Por outro lado, o leite humano não contém β -Lg (é a proteína do leite bovino que causa mais reações alérgicas), e por esse

motivo a α -La é mais adequada para a formulação de alimentos para lactentes, do que os concentrados protéicos do soro.

Dentro deste contexto, este trabalho visa aproveitar um subproduto da indústria de laticínios, o soro lácteo, e transformá-lo em produtos com alto valor nutritivo e funcional para serem utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica. O trabalho divide-se em duas etapas: na primeira etapa, o objetivo é concentrar e purificar as proteínas do soro de queijo através da UF procurando aumentar ainda mais o valor agregado ao produto. A diafiltração é usada com o intuito de eliminar do concentrado os componentes de baixa massa molar (sais e lactose) o que propicia a purificação das proteínas. Os experimentos foram realizados em uma unidade piloto de UF, utilizando-se membranas poliméricas com massa molar de corte de 10 kDa em módulo em espiral. Estratégias modificando o fator de concentração volumétrico e o volume e o número de DF foram testadas, para se obter a melhor purificação protéica.

A segunda etapa tem como objetivo fracionar as proteínas em maior concentração no soro (α -La e β -Lg) processando o concentrado obtido na primeira etapa. Para isto, utilizou-se a ultrafiltração e a microfiltração, associadas a propriedades como: massa molar e pH da solução de alimentação.

A partir dos produtos obtidos em cada uma das etapas, foi necessário avaliar através de métodos analíticos, as concentrações de proteína, lactose, sólidos totais, pH e condutividade elétrica obtidas nas correntes de permeado e concentrado.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre as características do soro lácteo, dando ênfase para as proteínas do soro, que contêm elevado valor nutritivo e funcional e, por isso, vêm despertando o interesse das indústrias. Nesta etapa foi realizada uma revisão dos trabalhos que tratam da possibilidade de concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro. Também, são apresentados fundamentos teóricos sobre os Processos de Separação com Membranas (PSM), assim como os fatores que afetam a eficiência destes processos. E finalmente, foi realizada uma revisão de trabalhos publicados nos últimos anos sobre a utilização dos PSM nas indústrias alimentícias e especialmente sobre o aproveitamento do soro lácteo através do uso de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF).

2.1 Soro Lácteo

O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo ou lacto-soro, é um subproduto da indústria de laticínios, representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. É um líquido quase opaco e de cor amarelo-esverdeado, que contém aproximadamente metade dos sólidos do leite (MAWSON, 1994; ZADOW, 1992; MILLER *et al.*, 2000).

Apesar de ser considerado um subproduto, o soro possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais e ainda propriedades funcionais relevantes (WIT, 1998; NEVES, 2001). Na média, 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro e dependendo das técnicas utilizadas na produção, podem ser produzidos até doze litros de soro.

O leite é fonte de lipídeos, carboidratos e proteínas e apresenta estabilidade incomum para um fluido dessa natureza. Constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades. A composição do leite, a concentração e a massa molar dos componentes, e a distribuição destes componentes no soro e no coalho podem ser observadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Concentração e tamanho dos componentes do leite, e distribuição média destes componentes no coalho e no soro.

| Componente | Leite (g.L ⁻¹) | Massa molar (kDa) | Coalho(%) [*] | Soro (%) [*] |
|-------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| Água | 87,1 | < 0,1 | 6 | 94 |
| Sólidos totais | 12,9 | - | 48 | 52 |
| Caseínas | 2,6 | 20-300 | 96 | 4 |
| Proteínas do soro | 0,7 | 4-160 | 4 | 96 |
| Gordura | 4,0 | 100-15.000 | 94 | 6 |
| Lactose | 4,6 | 0,35 | 6 | 94 |
| Minerais | 0,7 | < 1 | 62 | 38 |
| Outros | 0,32 | - | - | - |

* percentual mássico

Fonte: adaptado de MILLER *et al.* (2000); BRANS *et al.* (2004).

Observa-se na Tabela 2.1 que, em média, 52 % dos sólidos totais, 94 % da lactose, 96 % das proteínas solúveis e 38 % dos minerais do leite, permanecem no soro após a fabricação de queijo. O queijo por sua vez, retém caseínas e gorduras, que são a base do coalho.

As proteínas do leite compreendem duas frações principais: as caseínas (entre 70 e 80 % das proteínas totais) e as proteínas do soro, que estão em solução. As caseínas e as proteínas do soro diferem em aspectos fisiológicos e biológicos. As caseínas formam com o cálcio partículas coloidais, chamadas micelas. As proteínas do soro são de natureza globular, mais solúveis em água que as caseínas (SGARBIERI, 1996).

As proteínas do soro se diferenciam da caseína por serem insensíveis às coagulações ácidas assim como à ação da quimosina/renina. Portanto, durante a coagulação das caseínas juntamente com a gordura (formação do coalho) as proteínas do soro e boa parte da lactose permanecem em solução. O soro ainda contém minerais e traços de gordura, somando aproximadamente 6 % de sólidos totais (SGARBIERI, 1996).

O soro é um subproduto de importância relevante tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional. Com o aumento na produção de queijo ao longo do mundo e o mais rigoroso controle da disposição de efluentes, a produção do soro é um dos problemas mais críticos para a indústria leiteira.

O soro pode ter basicamente três destinos principais: o primeiro é o seu processamento até produtos diversos; o segundo seria o seu uso na alimentação animal; finalmente, o terceiro destino seria o seu tratamento para posterior despejo no esgoto (BRANDÃO, 1994; NEVES, 2001).

Segundo MARWANA & KENNEDY (1988), grande parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo ainda é incorporada as águas residuais dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor.

Um dos principais problemas do soro é seu alto poder poluente devido à alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose e pelas proteínas. A carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO),

varia de 30.000 a 60.000 mgO₂.L⁻¹, dependendo do processo de fabricação de queijo (BRANDÃO, 1994). Esta carga poluente é cerca de 100 vezes maior que a de um esgoto doméstico. Uma fábrica com produção média de 10.000 L de soro por dia polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes. Quando descartado diretamente no solo compromete sua estrutura físico-química e diminui o rendimento da colheita (RICHARDS, 2002; PORTO *et al.*, 2005).

Em decorrência dos problemas enfrentados pelas indústrias para efetuarem o tratamento do soro como resíduo industrial, adequando-o às exigências dos órgãos de inspeção e saúde pública, teve início na década de 60 testes de aproveitamento do soro de queijo (KOSIKOWSKI, 1967).

Com o contínuo desenvolvimento de tecnologias e crescente responsabilidade ambiental, por parte das indústrias, a imagem do soro está mudando rapidamente de efluente para uma fonte valiosa de nutrientes.

Antes de ser considerado apenas mais um componente dos efluentes das indústrias de laticínios, o soro pode e deve ser aproveitado como complemento na alimentação humana. A utilização não racional do soro constitui prática anti-econômica e até mesmo anti-social, devido à carência mundial de alimentos e também pelo caráter sazonal da produção de leite e oscilações desta.

2.2 Produção do Soro

A fabricação de queijo é um método de transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade, porém neste processo não há conversão de 100 % do leite em queijo. Seu rendimento pode variar entre 8,5 a 20 % em função da consistência do queijo, produzindo assim, além do queijo, um derivado denominado de soro (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

Na Figura 2.1 pode-se observar o fluxograma da produção de queijo. Em geral, a produção de queijo é iniciada com o tratamento térmico do leite para eliminar as bactérias patogênicas e as formas vegetativas de microrganismos prejudiciais. Este processo térmico é denominado de pasteurização e ocorre em temperaturas entre 70 a 80 °C durante 15 a 20 segundos. Em seguida ocorre a correção do índice de gordura do leite e a adição de ingredientes tais como: fermento láctico, coalho e cloreto de cálcio. Como coagulantes podem ser utilizados ácidos e coalhos de origem animal, coagulantes vegetais e microbianos.

A etapa seguinte é a coagulação do leite, através da precipitação das caseínas. Quando o coágulo se encontra com a consistência desejada, é cortado ou partido, para se proceder a remoção do soro. Para acelerar o fenômeno de sinerese o processo envolve aquecimento e agitação. Após essa operação o queijo é enformado, esta operação consiste em moldar a massa (ou os pedaços de coágulo) mais ou menos aglomerada, em fôrmas; a seguir o queijo é prensado para remover o restante de soro e embalado.

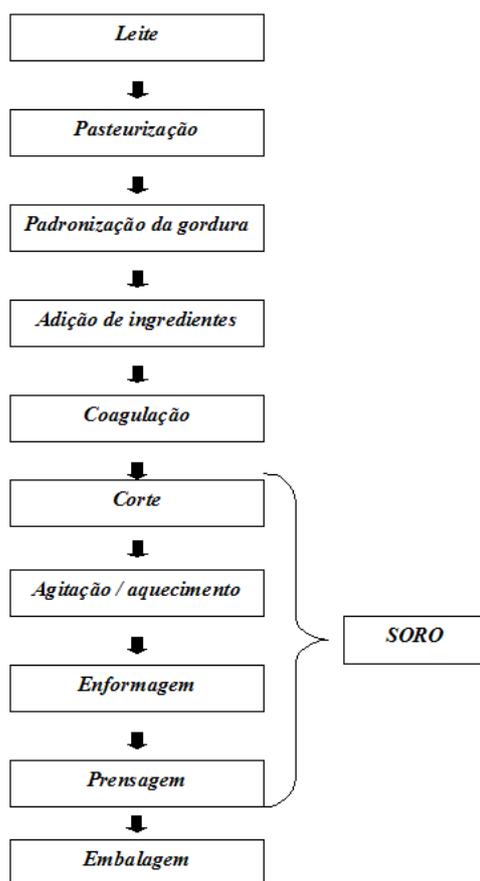


Figura 2.1: Fluxograma simplificado da produção de queijo.

O soro é proveniente das operações de corte, agitação, aquecimento, enformagem e prensagem da produção de queijo.

Há dois tipos básicos de soro fluido - o doce e o ácido - que variam de acordo com o tipo de queijo produzido.

O tipo predominante é o soro doce, que é derivado da manufatura de queijos amadurecidos duros, semi-duros ou macios (Cheddar, Suíço, Provolone, Mussarela, etc.). A desestabilização das micelas de caseína é realizada por via enzimática em pH maior do que 5,6. O pH do soro doce é ligeiramente menor do que o do leite fresco, varia de 5,9 a 6,6. (ZADOW, 1992; MILLER *et al.*, 2000).

Na produção de soro ácido a precipitação das caseínas é realizada pela acidificação não acima de pH 5,1. Na coagulação ácida, o pH abaixa devido à conversão da lactose em ácido lático por fermentação microbiana, ou por adição direta de ácidos minerais ou orgânicos. O soro resultante deste processo é designado de soro ácido com um pH de 4,3 a 5,1. O soro ácido provém principalmente da fabricação de queijos tipo Cottage e da fabricação de caseína comercial. (MILLER *et al.*, 2000; MIZUBUTI, 1994; BYLUND, 1995).

As diferenças na acidez e no conteúdo mineral, entre os dois tipos de soro, são as responsáveis pelas diferentes propriedades físico-químicas que apresentam (ZADOW, 1992).

O soro doce é geralmente mais rico em lactose, enquanto que o soro ácido exibe uma maior concentração em minerais. A composição protéica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas. A concentração de lactose no soro ácido é menor do que no soro doce, devido ao processo de fermentação, pois uma fração de lactose é transformada em ácido láctico, durante a formação do coalho. Por outro lado, o soro ácido contém mais cálcio e fósforo que o soro doce, devido à solubilização do complexo cálcio-fósforo, existente nas micelas de caseína, em pH ácido (MIZUBUTI, 1994; WONG *et al.*, 1999).

A maior parte dos produtos de soro é derivada do soro doce (MILLER *et al.*, 2000). Segundo YADA (2004), aproximadamente 94 % do soro industrializado nos Estados Unidos é proveniente do soro doce.

Neste trabalho é dado enfoque ao soro doce, já que o soro utilizado para realização dos experimentos é proveniente do queijo tipo Mussarela.

2.3 Principais Componentes do Soro Lácteo

A composição média do soro doce é apresentada na Tabela 2.2. Os sólidos do soro são essencialmente lactose, proteínas e minerais.

Tabela 2.2: Composição aproximada do soro doce.

| Componente | Soro doce (%)* |
|---------------------|----------------|
| Água | 93-95 |
| Sólidos Totais (ST) | 5,5-6,5 |
| Proteína | 0,7-1,2 |
| Gordura | 0,04-0,05 |
| Lactose | 3,8-5,0 |
| Cinzas | 0,5-0,8 |
| NPN | 0,15-0,18 |

* percentual mássico

Fonte: adaptado de MILLER *et al.* (2000); BYLUND (1995); YADA (2004).

O conteúdo em gordura pode variar dependendo do tipo de leite usado e do processo de fabricação de queijo (ZADOW, 1992). A fração de nitrogênio não protéico (NPN) inclui alguns componentes de baixa massa molar como uréia (30 % do NPN), amônia, ácido úrico, creatinina, aminoácidos e produtos de degradação enzimática das caseínas (PEREIRA, 2002). Normalmente o soro apresenta as características mostradas na Tabela 2.2, contudo, a sua composição apresenta variações sazonais, e depende também da raça do rebanho, e varia com o tipo de tratamento a que o leite é submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização). Além disso, o processo de fabricação de queijo ou caseínas e o tratamento que o soro sofre após estar separado do coalho (pasteurização, pré-concentração e remoção de partículas de caseína) também influenciam nas suas características finais.

Devido a sua importância nos processos de separação as características dos principais componentes presentes serão estudados com maiores detalhes nas seções a seguir.

2.3.1 Lactose

A lactose ou “açúcar do leite” é o carboidrato característico do leite, é um dissacarídeo formado de galactose e glicose, que no leite cru é responsável por 40 % do total de sólidos, e nos leites desengordurados corresponde a 54 % dos sólidos totais. No soro é o composto sólido em maior quantidade em torno de 70 % em base seca (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

A concentração de lactose no leite e no soro de leite varia amplamente entre as espécies. O conteúdo de lactose do leite bovino varia com a raça, fator de individualidade e especialmente devido à fase de lactação do animal (FOX & MCSWEENEY, 1998).

Este açúcar é encontrado no leite de todos os mamíferos, em diferentes teores e é responsável por seu sabor levemente adocicado. É essencialmente produzido por secreções mamárias e é sintetizado da glicose absorvida pelo sangue (FOX & MCSWEENEY, 1998).

2.3.2 Sais minerais e vitaminas

O soro é portador de vitaminas e minerais. Vitaminas são substâncias químicas orgânicas requeridas pelo organismo, mas que não podem ser sintetizadas pelo corpo (FOX & MCSWEENEY, 1998).

O soro contém também a maioria das vitaminas presentes no leite (e solúveis em água), como a vitamina B12, a vitamina B6, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, vitamina C, retinol (vitamina A). As quantidades destes compostos presentes no soro de queijo estão apresentadas na Tabela 2.3 (LAGRANGE & DALLAS, 1997; MILLER *et al.*, 2000).

Tabela 2.3: Quantidades médias de vitaminas e minerais em 100 g de soro doce em pó.

| Constituinte | Unidades | Quantidade |
|-------------------|----------|------------|
| Vitaminas | | |
| Vitamina A | IU | 44 |
| Vitamina C | mg | 1,5 |
| Vitamina E | mg | 0,03 |
| Tiamina (B1) | mg | 0,5 |
| Riboflavina (B2) | mg | 2,2 |
| Piridoxina (B6) | mg | 0,6 |
| Vitamina B12 | mcg | 2,4 |
| Ácido pantotênico | mg | 5,6 |
| Niacina | mg | 1,3 |
| Minerais | | |
| Cálcio | mg | 796 |
| Fósforo | mg | 931 |
| Sódio | mg | 1079 |
| Potássio | mg | 2080 |
| Magnésio | mg | 176 |
| Zinco | mg | 1,97 |

Fonte: adaptado de MILLER *et al.* (2000).

Os sais de leite são principalmente fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio. São encontrados aproximadamente 20 outros elementos no leite em quantias menores, inclusive cobre, ferro, silício, zinco e iodo. Os elementos principais são de importância para a nutrição, na preparação, processamento e armazenamento de produtos de leite devido à influência na conformação e estabilidade das proteínas do leite (FOX & MCSWEENEY, 1998; BYLUND, 1995).

O soro e os concentrados de soro são primorosas fontes de cálcio, magnésio e fósforo, como pode ser observado na Tabela 2.3. Na indústria de alimentos ingredientes de soro podem ser incorporados a produtos fortificados, aumentando, desta forma, o teor de nutrientes minerais do produto final (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

2.3.3 Proteínas

As proteínas são polímeros constituídos por monômeros denominados aminoácidos; cada um deles possui um grupo amina (NH_2) e um grupo carboxila (COOH) unidos ao mesmo átomo de carbono (SGARBIERI, 1996).

Uma molécula de proteína consiste em uma ou mais cadeias de aminoácidos interligadas onde os aminoácidos são organizados em uma ordem específica. Uma molécula de proteína normalmente contém ao redor de 200 aminoácidos unidos (BYLUND, 1995).

Quando a caseína é retirada do leite por algum método de precipitação, em solução resta um grupo de proteínas que são chamadas proteínas do soro, proteínas solúveis, soro-proteínas ou não-caseínas. A quantidade de proteínas encontradas no soro varia de 0,7 a 1,2 % da sua composição média e equivale à cerca de 20 a 25 % do total de proteínas encontradas no leite (MIZUBUTI, 1994; FOX & MCSWEENEY, 1998).

A fração protéica do soro contém um grupo de proteínas globulares: β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), Albumina do soro bovino (BSA), Imunoglobulinas (Ig), Lactoferrina, Lactoperoxidase, Glicomacropéptídeos, Proteose-peptonas, entre outras.

As proteínas do soro em maior concentração são a β -Lg e α -La, elas constituem de 70 a 80 % das proteínas totais do soro (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

A Tabela 2.4 apresenta as propriedades das proteínas do soro, tais como: a massa molar, ponto isoelétrico e as concentrações médias no soro.

Tabela 2.4: Propriedades e concentração das proteínas do soro.

| Proteína | Massa molar (kDa) | Ponto isoelétrico | Concentração (g. L ⁻¹) |
|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| β -Lg | 18,3 | 5,2 | 2,0-4,0 |
| α -La | 14,1 | 4,2 - 4,8 | 0,6-1,7 |
| BSA | 69,0 | 4,7 - 4,9 | 0,1-0,4 |
| Ig | 15,0 – 160,0 | 5,5 - 8,3 | 0,6-1,0 |
| Proteose-Peptonas | 4,1 – 80,0 | 3,3 - 3,7 | 1,4 |
| Lactoferrina | 78,0 | 9 | 0,1 |
| Lactoperoxidase | 89,0 | 9,5 | 0,02 |
| Glicomacropéptido | 7,0 | - | 0,01 |

Fonte: adaptada de MILLER *et al.* (2000); ZYDNEY (1998).

Dentre todas as proteínas presentes no soro, este trabalho visa recuperar e separar as proteínas em maior concentração, isto é, a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina.

β -Lactoglobulina (β -Lg)

A proteína mais abundante no soro é β -lactoglobulina, que representa 10 % da proteína total do leite ou aproximadamente 50 % da proteína do soro. Contém 162 aminoácidos com uma massa molar de 18,362 kDa (YADA, 2004).

A β -Lg tem diferentes variantes, sendo as principais a A e a B. A β -Lg variante A difere da variante B, em dois aminoácidos: aspartato (posição 64) e valina (posição 118). Estes aminoácidos são substituídos na β -Lg B, pela glicina e pela alanina. Ambas têm resíduos de cisteínas (WIT, 1998; YADA, 2004). Segundo WONG *et al.* (1999) existem estudos que destacam a presença de outras variantes genéticas: C, D, E com diferentes mobilidades eletroforéticas.

β -Lg é produzida especificamente na glândula mamária. O leite de todo ruminante contém β -Lg enquanto que a maior parte do leite dos não ruminantes, por exemplo, o leite humano, não possui (YADA, 2004).

A cadeia de β -Lg possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lipídios. Estes pontos de ligação podem ser usados para incorporar compostos lipofílicos desejáveis como tocoferol e retinol (vitamina A). A β -Lg também se liga ao cálcio e zinco (FOX & MCSWEENEY, 1998). Segundo YADA (2004) a molécula pode ligar-se a lipídios ácidos e não polares e acontece preferencialmente em meios alcalinos.

Foram especuladas funções biológicas para a existência da β -Lg, mas nenhuma foi aceita completamente. Alguns especulam que a ligação com a Vitamina A pode ter um papel regulador na glândula mamária (YADA, 2004).

A β -Lg possui na sua estrutura um grupo tiol livre, que lhe permite a associação a outras proteínas hidrofóbicas, e duas pontes dissulfeto internas. A conformação da β -Lg depende do pH, como pode ser observado na Figura 2.2. A complexa associação-dissociação

da β -Lg tem sido objeto de diversos estudos (YADA, 2004; WONG *et al.*, 1999). Para valores de pH compreendidos entre 5,20 (ponto isoelétrico) e 7,50 (faixa que compreende o pH do leite e do soro) e à temperatura ambiente, todas as variantes genéticas investigadas de β -Lg existem principalmente como um dímero estável de dois monômeros unidos por ligações não covalentes, com massa molar de 36,7 kDa. O dímero consiste em duas esferas com raios de 17,9 Å e uma distância de centro a centro de 33,5 Å (WONG *et al.*, 1999).

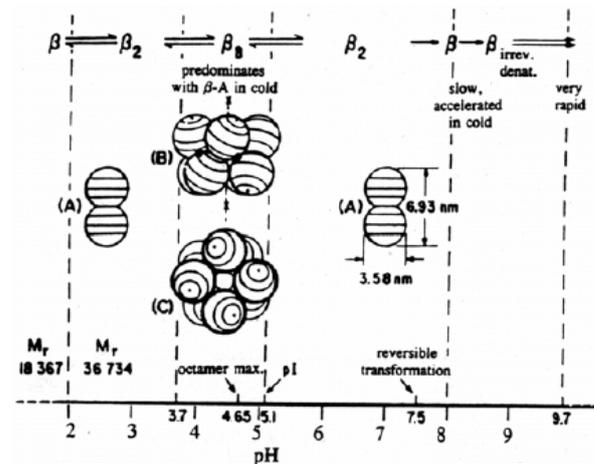


Figura 2.2: Variação da conformação da β -Lg em função do pH (VISSER & JERUNINK, 1997 *apud* RODRIGUES, 2001).

O monômero de 18,3 kDa só existe em pHs inferiores a 3,0 ou acima de 8,0. Para valores de pH inferiores a 3,5 as estruturas quaternárias dissociam-se reversivelmente em monômeros devido à forças eletrostáticas repulsivas muito fortes. O dímero dissocia-se em monômeros, com uma extensão de dissociação que ocorre conforme o pH vai baixando. Existe, portanto um rápido equilíbrio monômero-dímero. A constante de dissociação da reação varia de acordo com a variante genética, temperatura, pH e força iônica (WONG *et al.*, 1999).

Em meio alcalino a dissociação dos dímeros também acontece, existe um equilíbrio entre os pHs 6,9 e 8,8. Mudanças conformacionais reversíveis acompanham esta dissociação indicada por mudanças da rotação e dispersão rotatória óptica (WONG *et al.*, 1999).

Entre os pHs 3,7 e 5,1, em elevadas concentrações da proteína, os dímeros de ambos variantes A e B associam-se para formar octômeros com polimerização máxima em pH 4,6. A associação é rápida, conforme indicam estudos da velocidade de sedimentação, e a constante de equilíbrio da reação diminui com o aumento da temperatura. Além de acontecer a octomerização ocorre associação de monômero-dímero (WONG *et al.*, 1999; YADA, 2004).

Uma dependência do pH com a octomerização máxima no pH 4,6 sugere que grupos carboxila estão envolvidos, com uma possível formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxila protonados. É conhecido que quatro grupos carboxila do monômero são protonados neste pH (WONG *et al.*, 1999; YADA, 2004).

A 0 °C podem ser observados alguns intermediários como tetrâmeros e hexâmeros (WONG *et al.*, 1999).

Apesar deste efeito de carga, a estrutura nativa da proteína não é alterada, mesmo a temperaturas superiores a 80 °C até pH 8,6. Em pH neutro e temperaturas até 70 °C a desnaturação é reversível. Para valores de pH superiores a 8,6, ocorre uma desnaturação irreversível da proteína, devido à alterações nas propriedades físico-químicas da proteína (WIT, 1998).

A principal proteína contendo grupos sulfídricos no leite é a β -Lg, normalmente este grupo sulfídrico está “enterrado” dentro da molécula e não é reativo. Na desnaturação por calor a cerca de 75 °C, por exemplo, o grupo -SH da β -Lg é exposto e reage com a caseína (e provavelmente com a α -La) com efeitos muito significativos em algumas das propriedades físico-químicas tecnologicamente importantes do leite, por exemplo estabilidade do leite ao calor e coagulação através da renina (FOX & MCSWEENEY, 1998). Devido à abundância desta proteína no leite bovino, em uma grande extensão as propriedades dos concentrados protéicos de soro são, na verdade, as propriedades da β -Lg (YADA, 2004).

α -lactoalbumina (α -La)

A segunda proteína mais abundante no soro é a α -lactoalbumina que inclui aproximadamente 2 % da proteína total do leite e 15 a 25 % da proteína total do soro. A molécula consiste em 123 aminoácidos e tem uma massa molar de 14,1 kDa, e contém quatro ligações dissulfeto e nenhum grupo fosfato (YADA, 2004).

O local de síntese da α -La é a glândula mamária, no leite humano representa 28 % do teor total de proteínas (YADA, 2004; FOX & MCSWEENEY, 1998).

A α -La contém 8 grupos de cisteína, todos envolvidos em pontes dissulfetos internas e 4 resíduos de triptófano, com uma estrutura secundária ordenada e uma estrutura terciária esférica e compacta. A α -La existe principalmente como uma molécula globular quase esférica, compacta em meio neutro e alcalino. Sugere-se também que ela tenha formato de elipsóide com cerca de 2,2 x 4,4 x 5,7 nm a 2,5 x 3,7 x 3,2 nm (WONG *et al.*, 1999).

Quando são comparadas as seqüências de α -La e lisozima, são encontrados 40 % dos resíduos iguais, incluindo todos os resíduos de cisteína, outros 20 % dos resíduos têm estruturas semelhantes; estas informações sugerem que as moléculas são fortemente relacionadas. Na realidade, o conhecimento da estrutura tridimensional de lisozima foi utilizado para predizer a estrutura tridimensional da α -La (YADA, 2004).

A α -La é encontrada em duas variantes genéticas A e B. A variante B consiste em 123 resíduos de aminoácido com massa molar de 14,174 kDa e a variante A difere disto tendo glicina em vez de arginina na posição 10. A α -La é necessária para a síntese de lactose devido a sua interação com a enzima galactosetransferase, sem a α -La, a glicose é um substrato extremamente pobre para esta enzima (WONG *et al.*, 1999).

A α -La é uma metalo-proteína com um átomo de cálcio que lhe possibilita a ligação a outras proteínas, tendo por isso tendência a polimerizar. Se, por exemplo, existir um grupo -SH livre em outra molécula (como por exemplo na β -Lg), este reage com uma das pontes S-S presente na α -La originando assim uma associação de proteínas. Em valores de pH inferiores a 5,0 ocorre uma mudança na estrutura da proteína, uma vez que a acidificação do meio conduz à liberação do íon Ca^{2+} , a uma desnaturação reversível e a um processo de agregação, sendo este mais acentuado em temperaturas próximas dos 55 °C (WIT, 1998).

A α -La é uma molécula que é mais estável ao calor na presença de cálcio, de todas as proteínas do soro é a mais estável termicamente. A maioria das proteínas aumenta a sensibilidade ao calor na presença de cálcio; isto ocorre provavelmente devido à habilidade do cálcio de promover a formação de ligações iônicas intermoleculares com a maioria das proteínas, estas ligações mantêm as moléculas próximas e aumentam a probabilidade de agregação ao aquecer. Por outro lado, α -La utiliza o cálcio para formar laços iônicos intramoleculares que tendem a fazer a molécula resistente ao desdobraimento térmico. Em condições favoráveis de concentrações de cálcio e pH, a α -La pode permanecer solúvel depois de exposição a 100 °C (YADA, 2004).

A remoção do cálcio da α -La produz mudanças conformacionais profundas equivalentes ao que ocorre na desnaturação ácida. Em valores de pH neutro ou alcalino, e na ausência de grupos tióis em solução, os íons OH atacam as pontes S-S, levando à formação de dihidroalanina, de H_2S e de ácido cisteico, os quais são responsáveis por acelerar o processo de desnaturação da proteína (WIT, 1998).

A α -La interatua com lipídios não polares e ácidos, tal como a β -Lg, mas preferencialmente em meios fortemente ácidos (WIT, 1998).

Em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico é possível que α -La associe-se para formar dímeros e trímeros. A associação é rápida e reversível, dependente da temperatura, sendo, maior aos 10 °C do que aos 25 °C. A agregação também depende da força iônica e da concentração, com pequena agregação abaixo de 1 % de proteína. Esta associação e agregação é atribuída a mudança conformacional da molécula da proteína abaixo do pH 4, e ocorre devido a uniões hidrofóbicas que é o resultado da mudança de conformação e decréscimo da barreira eletrostática. Em valores de pH alcalinos, embora nenhuma associação observável ou agregação aconteça, são observadas algumas mudanças na configuração, como a dispersão óptica rotatória em pH 11,5 (WONG *et al.*, 1999).

Segundo SMITH (2003), nas condições iônicas do leite a α -La encontra-se como um monômero.

Outras Proteínas

Além da β -Lg e da α -La outras proteínas são encontradas no soro de leite. Estas proteínas são consideradas proteínas minoritárias ou secundárias por estarem presentes em quantidades pequenas.

A Albumina de Soro Bovina (BSA), isolada do leite, é idêntica à molécula do soro sanguíneo. Assim, BSA não é sintetizada na glândula mamária, mas está presente na circulação sangüínea. A proteína tem uma massa molar de 69 kDa, não contém fósforo, contém 17 dissulfetos e um grupo sulfídrico livre. As moléculas têm locais de ligações específicos para moléculas hidrofóbicas, ligam-se a ácidos graxos e outras moléculas pequenas como metais (YADA, 2004).

As Imunoglobulinas (Ig) incluem pelo menos 2 % da proteína total do leite. Há quatro classes de Ig encontradas em leite, devido a sua micro-hetereogeneidade são caracterizadas pelos determinantes antigênicos: IgG1, IgG2, IgA e IgM. Todas estas moléculas têm uma estrutura básica semelhante compostas de cadeias leves com massas molares de 20 a 25 kDa e duas cadeias pesadas, com massas molares de 50 a 70 kDa (YADA, 2004). O colostro, i.e., o leite obtido imediatamente após o parto pode conter até 100 vezes o nível de Ig do leite do meio da lactação. As Igs provêm imunidade para os recém nascidos através do colostro; esta proteção ocorre até que o animal seja adulto o bastante para sintetizar seus próprios anticorpos.

A Lactoferrina é a mais notável proteína que se liga ao ferro (2 mols de ferro / 1 mol de proteína), mas também pode ligar-se ao Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} e Zn^{2+} . A Lactoferrina é produzida na glândula mamária, mostrou-se útil para inibir o crescimento de bactérias. A atividade bacteriostática da Lactoferrina está sendo estudada visando o uso potencial da substância como conservante natural. Ainda possui outras características, incluindo efeitos antioxidantes e fortalecimento do sistema imunológico (FOX & MCSWEENEY, 1998).

A Lactoperoxidase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio, é um componente nutracêutico do leite e produtos de soro com propriedades antibacterianas. A Lactoperoxidase tem sido objeto de vários estudos visando sua utilização como meio de controlar o desenvolvimento da acidez e mudanças de pH durante a estocagem de produtos de leite resfriados (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003, USDEC, 2002).

Existem ainda alguns polipeptídios (proteose-peptonas) resultantes da proteólise das caseínas por enzimas do leite. Aproximadamente 1,1 % da proteína do leite total consistem em proteose-peptonas, esta fração pode ser dividida em três componentes principais: PP3, PP5 e PP8, e ainda são reconhecidos outros componentes secundários (YADA, 2004).

Finalmente, é possível também encontrar no soro glicomacropéptídeos (apenas no soro doce), proteína biologicamente ativa que resulta da hidrólise da *k*-caseína pela enzima quimosina (ou renina) presente no soro. O glicomacropéptídeo altera a produção de pigmentos pelos melanócitos, atua como prebiótico e tem atuação imunomoduladora (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

2.4 Propriedades das Proteínas do Soro

As proteínas do soro têm elevado valor funcional e nutricional não encontrado em outras proteínas utilizadas como aditivos na indústria alimentícia (a proteína de soja e de ovo, por exemplo) e por isso é relevante abordar tais aspectos.

2.4.1 Propriedades Nutricionais

A proteína é um nutriente essencial ao organismo animal e humano e como tal, deve estar presente na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo das proteínas (SGARBIERI, 1996).

Um fato importante a respeito da nutrição é que oito (nove para crianças) dos 20 aminoácidos não podem ser sintetizados pelo organismo humano, eles são chamados aminoácidos essenciais. Como eles são necessários para manter o metabolismo, eles têm que ser providos através da alimentação (BYLUND, 1995). Uma proteína equilibrada, ou de alta qualidade, contém aminoácidos essenciais em proporções correspondentes às necessidades humanas (FENNEMA, 1989).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) especificaram a concentração ideal de aminoácidos essenciais que devem ser incluídos na dieta humana (FENNEMA, 1989).

A Tabela 2.5 mostra a concentração de aminoácidos essenciais na proteína de referência e nas proteínas do soro. As proteínas do soro de leite bovino são uma fonte excelente de aminoácidos essenciais: comparando a concentração de referência com a das proteínas do soro, pode-se observar que a fração protéica do soro contém mais aminoácidos essenciais do que a proteína de referência.

Tabela 2.5: Concentração de aminoácidos essenciais na proteína de referência, nas proteínas do soro, na β -Lg e na α -La.

| Aminoácido | Proteína de Referência | Proteína do Soro | β -Lg | α -La |
|-----------------------|------------------------|------------------|-------------|--------------|
| Triptófano | 1,0 | 2,1 | 2,2 | 6,6 |
| Fenilalanina+tirosina | 6,0 | 7,3 | 7,3 | 9,6 |
| Leucina | 7,0 | 11,1 | 15,3 | 11,6 |
| Isoleucina | 4,0 | 6,8 | 6,7 | 6,8 |
| Tionina | 4,0 | 8,0 | 5,4 | 5,5 |
| Metionina+cisteína | 3,5 | 4,8 | 5,6 | 6,9 |
| Lisina | 5,5 | 9,9 | 11,7 | 11,4 |
| Valina | 5,0 | 6,8 | 5,9 | 4,8 |
| Total | 36,0 | 56,8 | 60,1 | 63,2 |

Fonte: adaptado de ZADOW (1992), MILLER *et al.* (2000)

O perfil de aminoácidos essenciais das proteínas do soro atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela FAO/WHO. O teor de aminoácidos essenciais de proteínas do soro é maior do que quaisquer outras fontes e correspondem a 60 % do valor protéico total do soro. As proteínas do soro contêm níveis elevados de leucina, lisina,

em comparação ao isolado protéico de soja e a clara de ovo desidratada, ainda possuem uma boa fonte de aminoácidos contendo enxofre, tais como cisteína e metionina (RICHARDS, 2002).

Observando a Tabela 2.5 também é possível verificar que, isoladamente, a β -Lg e a α -La, têm um valor nutritivo superior ao da proteína de referência.

A qualidade, o valor ou o balanço de uma proteína alimentar além de depender do tipo e da quantidade de aminoácidos essenciais, depende da sua digestibilidade; representa a medida da eficácia com que pode ser utilizada pelo organismo. Portanto, além da concentração de aminoácidos, devemos ter em conta a sua disponibilidade biológica. A qualidade da proteína pode ser expressa pelos seguintes parâmetros: Valor Biológico (VB) - é a porção da proteína que é retida e absorvida pelo organismo; Digestibilidade Protéica (PD) - é a porção da proteína do alimento absorvida; Utilização Protéica Líquida (*Net Protein Utilization*- NPU) - é a porcentagem de nitrogênio ou proteína dietética que é retida; Coeficiente de Eficácia Protéica (*Protein Efficiency Ratio*- PER) é o ganho em massa obtido por grama de proteína consumida e PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*) que é a medida da digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos essenciais. Na Tabela 2.6 são apresentados estes parâmetros relacionados às proteínas do soro, ao leite e à caseína.

Tabela 2.6: Valores que representam a qualidade nutricional do leite e das suas frações protéicas.

| Componente | BV* | PD | NPU | PER | PDCAAS |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|--------|
| Leite | 91 | 95 | 86 | 3,1 | 1,21 |
| Proteínas do Soro | 104 | 100 | 92 | 3,6 | 1,15 |
| Caseínas | 77 | 100 | 76 | 2,9 | 1,23 |

*BV da proteína do ovo é definido como 100.

Fonte: adaptado de MILLER *et al.*(2000); YADA (2004).

Como pode ser observado na Tabela 2.6, comparadas as do leite e à caseína, as proteínas do soro têm valores de BV, PD, NPU e PER maiores e valor de PDCAAS comparável, mostrando a elevada qualidade deste tipo de proteína. Devido ao seu elevado valor biológico são necessárias apenas 14,5 gramas de proteínas do soro por dia para satisfazer as necessidades diárias protéicas, em comparação com 17,4 gramas de proteína do ovo (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

Assim, devido à quantidade de aminoácidos essenciais e da elevada qualidade protéica, as proteínas do soro podem aumentar o valor nutricional dos alimentos usados na dieta humana. Muitas proteínas do soro são associadas a funções imunes ou digestivas. Além disso, o soro de leite é uma fonte natural de Ig e de BSA e, como tal oferece proteção contra infecções, pois estimula a produção de linfócitos. Proteínas do soro secundárias como a Lactoferrina e a Lactoperoxidase são consideradas proteínas antimicrobianas (YADA, 2004).

Recentemente, têm sido atribuídas às proteínas do soro propriedades funcionais fisiológicas, capazes de produzir um importante controle na modulação do metabolismo e nos

mecanismos de defesa dos organismos animal e humano (SGARBIERI & PACHECO, 1999; MATTILA-SANDHOLM & SAARELA,2003).

Ainda, existem estudos sobre o possível papel da α -La na formulação de agentes antitumorais. Uma das funções *in vivo* da β -Lg parece ser a fixação de retinol e seu transporte ao intestino delgado. A β -Lg e o BSA também podem fixar ácidos graxos (MATTILA-SANDHOLM & SAARELA,2003).

2.4.2 Propriedades Funcionais

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite são conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios.

As propriedades funcionais das proteínas do soro são as propriedades físico-químicas, que contribuem para obter uma determinada característica no produto alimentar final em que são inseridas (SGARBIERI, 1996).

As proteínas do soro têm propriedades físicas e funcionais no seu estado nativo e após tratamento físico, químico ou enzimático (absorção de água, solubilidade, emulsificação entre outras), devido às várias estruturas conformacionais que possuem e/ou adquirem. São moléculas estruturalmente ordenadas e qualquer alteração nessa conformação leva à desnaturação. As principais causas são: calor, mudanças de pH, radiação ultravioleta, concentração salina, luz ou ação mecânica. A desnaturação causa uma modificação da conformação globular ou pregueada das proteínas para a forma linear, causando, assim, um desenrolamento da cadeia peptídica. O resultado é a formação de novos enlaces entre moléculas, que tornam as proteínas quimicamente mais reativas (SGARBIERI, 1996; BYLUND, 1995).

Depois de uma desnaturação fraca, as proteínas às vezes podem voltar ao estado original, com restauração das suas propriedades originais. Em muitos casos, porém, a desnaturação é irreversível (BYLUND, 1995).

O fenômeno da desnaturação não implica necessariamente diminuição da digestibilidade das proteínas nem à diminuição do seu valor biológico, porque a desnaturação promove a exposição de resíduos de aminoácidos essenciais, anteriormente protegidos da ação gástrica. Atualmente sustenta-se a hipótese de melhor digestibilidade da proteína desnaturada (PEREIRA, 2002; SGARBIERI, 1996; BYLUND, 1995).

Descrevem-se a seguir outras propriedades funcionais importantes das proteínas do soro (ZADOW, 1992; HUFFMAN, 1996; YADA, 2004).

- Solubilidade – as proteínas do soro têm uma elevada solubilidade numa grande gama de valores de pH, desde que não tenham sido termicamente desnaturadas. A elevada

solubilidade destas proteínas a valores de pH ácido é importante na sua aplicação em bebidas, pois permitem um acréscimo de viscosidade e turbidez.

- Adsorção de água e viscosidade – quando comparadas com outras proteínas, as do soro têm uma viscosidade baixa, o que permite a sua incorporação na produção de produtos dietéticos. As proteínas concentradas do soro são geralmente muito solúveis e, portanto não têm grande capacidade de adsorver água na sua forma nativa. O tratamento térmico causa desnaturação aumentando a sua capacidade de retenção de água, bem como a sua viscosidade. Assim, as aplicações de produtos protéicos do soro como retentores de água e espessantes, restringem-se aos alimentos que recebam tratamentos térmicos, como, por exemplo, produtos de carne, sopas, bolos, entre outros.

- Gelificação – sob condições apropriadas de aquecimento, as proteínas concentradas do soro formam géis de uma forma irreversível, aumentando a capacidade de reter água e/ou outras moléculas. Podem ser aplicados na indústria alimentar para aumentar a capacidade de retenção de água e alterar a textura dos alimentos, como a elasticidade, a coesividade e a dureza.

- Emulsificação – as proteínas do soro podem atuar como emulsificantes, pois têm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Esta propriedade, bem como o fato de se manterem solúveis em valores de pH ácido, permite a sua aplicação em molhos para saladas, café e formulações para crianças.

- Formação de espumas – a capacidade espumante das soluções de proteínas do soro aumenta com o tratamento térmico, uma vez que as proteínas do soro são melhores espumantes quando desnaturadas. A estabilidade da espuma depende do tipo de proteína, nível de desnaturação da proteína, conteúdo em gordura, concentração de proteína e carboidratos, concentração de cálcio e outros íons, pH, bem como do método e equipamento de processamento do soro. Esta propriedade é desejável em alguns produtos como merengues e sorvetes e indesejável em produtos como fiambres e sucos de fruta fortificados.

2.5 Produtos Derivados do Soro de Queijo

Um tratamento do soro do leite que alie custo e eficiência é o problema principal dos fabricantes de queijo apesar da variedade de técnicas disponíveis. Os caminhos possíveis de minimização deste efluente foram descritas por ZADOW (1992):

- aplicação de técnicas que minimizem a produção do soro durante fabricação de queijo;
- uso do soro de leite como um subproduto valioso na indústria de alimentos;
- produção de petroquímicos tais como o metano e o metanol;
- produção do ácido láctico e dos seus derivados;
- produção de plásticos e de polímeros biodegradáveis;
- o tratamento do soro como um efluente.

Cerca da metade do soro produzido no mundo é eliminado como efluente ou utilizado como adubo no solo ou em sistemas hídricos, resultando numa perda importante de energia alimentar, bem como criando uma grande perda econômica; a outra metade é processada em vários produtos alimentares retornando à alimentação animal ou humana, bem como para a produção de medicamentos e outros produtos de interesse (RODRIGUES, 2001; MIZUBUTI, 1994).

As tecnologias de processamento de soro têm crescido exponencialmente nos últimos dez anos devido ao desenvolvimento dos processos de separação com membranas e dos métodos de troca iônica, bem como a um melhor entendimento do soro como matéria-prima. O soro como matéria-prima pode conferir à tecnologia alimentar novas potencialidades devido às propriedades nutricionais e funcionais das suas proteínas (HUFFMAN, 1996).

Na alimentação humana o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó. O soro líquido pasteurizado fresco é raramente usado em indústrias de alimentos, devido ao alto custo de transporte e a suscetibilidade para deterioração durante armazenamento (MILLER *et al.*, 2000).

O soro líquido possui vida útil muito curta, quando não são tomadas medidas de conservação adequadas, devido à grande proliferação microbiana. Portanto, deve-se usar refrigeração e/ou adição de conservantes (VIEIRA *et al.*, 1985).

Além do mais, o soro integral deve ser evitado para o consumo direto devido ao seu alto conteúdo em lactose, que pode provocar problemas de intolerância a determinados indivíduos, além da dificuldade de aceitação sensorial do produto que possui alto teor de cinzas. O soro de queijo é utilizado na sua forma bruta principalmente como alimento animal (MORESI, 1994).

Dentre as alternativas para o uso do soro líquido podem ser citadas a fabricação de ricota e a fabricação de bebidas lácteas (WONG *et al.*, 1999).

A produção de soro em pó, bem como a concentração e fracionamento das proteínas com posterior secagem é uma das opções para utilização do soro de leite, e serão apresentadas nas próximas seções.

2.5.1 Soro em pó

O soro em pó é a forma mais satisfatória para o uso do soro de leite em alimentos, é obtido removendo aproximadamente 95 % da umidade do soro, mas que contém todos os constituintes nas mesmas proporções relativas ao soro original. Desta forma o soro pode ser armazenado por um tempo maior sem danos para suas propriedades nutricionais, além de reduzir os custos de transporte e aumentar a qualidade do produto podendo ser modificado e/ou misturado a outros produtos servindo a propósitos específicos (MILLER *et al.*, 2000; HUFFMAN, 1996).

O soro em pó pode ser usado como aditivo em vários gêneros alimentícios destinados ao consumo humano. Soro em pó não higroscópico é um excelente veículo não-aglutinante de fácil dispersão muito usado em misturas secas, é muito utilizado em produtos de panificação, salgadinhos, sorvetes e sobremesas lácteas. No que se refere aos dois primeiros produtos, a utilização do soro de leite em pó intensifica o desenvolvimento de cor durante o cozimento e forneamento a alta temperatura, além de aumentar o volume dos pães e também é uma fonte econômica de sólidos lácteos. Já nos sorvetes e sobremesas lácteas, o uso do soro ajuda a formar espumas estáveis e facilita aeração (BYLUND, 1995).

Segundo CRISTIANINI & ROIG (1987), o iogurte que recebeu adição de soro em pó em níveis de 0,7 a 1,5 % apresentou melhor viscosidade, menor tempo de coagulação, melhor firmeza e não apresentou sinerese. E, ainda, o produto acrescido de soro é mais nutritivo possuindo maior teor protéico e vitamínico.

Segundo USDEC (2002), melhorias em sabor são observadas quando o soro de leite substitui amido ou outro emulsificante adicionado ao iogurte.

Existem várias metodologias para obter soro em pó. O processamento do soro líquido para transformação em produto seco pode ser observado na Figura 2.3.

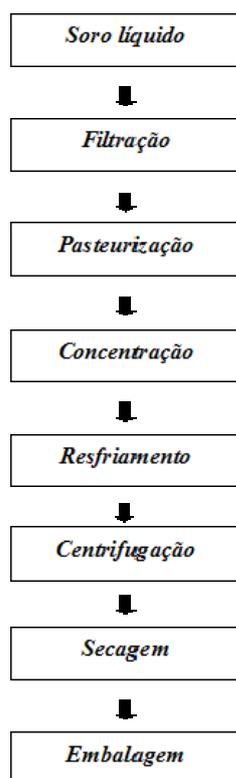


Figura 2.3: Fluxograma do processamento do soro de queijo em pó. (Fonte: BYLUND, 1995).

O soro líquido é filtrado para recuperar a gordura e a caseína residuais (a centrifugação também pode ser utilizada). Após esta filtração inicial o soro é pasteurizado, com o objetivo principal de destruir microrganismos patogênicos, eventualmente presentes, e interromper a

conversão da lactose em ácido láctico, todo soro para uso humano deve ser pasteurizado (MILLER *et al.*, 2000).

A concentração de soro acontece tradicionalmente através de evaporadores (85 °C), mas plantas de OI (osmose inversa) também são utilizadas para a pré-concentração. Depois da evaporação o fluido atinge 45 a 65 % de sólidos totais. O concentrado é resfriado rapidamente para 30 °C em um trocador de calor de placas. O concentrado é transferido para um tanque de resfriamento com agitação por 6 a 8 horas até atingir 15 a 20 °C. O resfriamento deve ser lento para que se formem cristais finos para evitar um produto higroscópico na etapa de secagem (BYLUND, 1995). A operação de centrifugação é opcional. No caso de produção de soro de leite com teor de lactose reduzido, os cristais de lactose formados são removidos por centrifugação.

A secagem do soro é basicamente a mesma que a usada para a fabricação do leite em pó, isto é em secadores de tambor ou *spray driers*. O uso de secadores de tambor envolve um problema: a difícil raspagem da camada de soro que se adere à superfície do tambor. O *spray drier* é amplamente utilizado para este fim, porém, o elevado custo para a desidratação do soro limita sua adoção como prática comum em pequenos estabelecimentos (MORESI, 1994; BYLUND, 1995).

Algumas limitações nas propriedades funcionais de soro seco para uso direto em alimentos, principalmente as altas concentrações de sais e lactose, conduziram ao seu fracionamento. Recentes desenvolvimentos de técnicas de separação molecular como ultrafiltração, osmose inversa, filtração gel, eletrodialise, e troca de íons tornaram possível o fracionamento, modificação e a utilização dos produtos derivados de soro em uma variedade de produtos de forma mais adequada (WONG *et al.*, 1999).

Os produtos obtidos a partir do fracionamento do soro, dependendo do processamento a que são submetidos, geram produtos com características diferentes do soro em pó propriamente dito. A Tabela 2.7 apresenta as características dos principais produtos derivados do soro.

Tabela 2.7: Caracterização dos principais produtos derivados do soro de queijo.

| Produto | Proteína (%) | Lactose (%) | Gordura (%) | Sais (%) | Umidade (%) |
|-------------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| Soro em pó | 10-15 | 63-75 | 1,0-1,5 | 8,2-8,8 | 3,5-8,0 |
| Soro em pó deslactosado | 18-24 | 52-58 | 1,0-4,0 | 11,0-22,0 | 3,0-4,0 |
| Soro em pó desmineralizado | 11-15 | 70-80 | 0,5-1,8 | 1,0-7,0 | 3,0-4,0 |
| CP 35 | 34-36 | 46-52 | 3,0-4,5 | 6,5-8,0 | 3,0-4,5 |
| CP 50 | 50-52 | 33-37 | 5,0-6,0 | 7,5-8,5 | 3,5-4,5 |
| CP 65 | 63-65 | 20-23 | 5,0-6,0 | 3,0-7,0 | 3,5-4,5 |
| CP 80 | 80-82 | 4-8 | 4,0-8,0 | 3,0-4,0 | 3,5-4,5 |
| IP | > 90 | 0,5-1,0 | 0,5-1,0 | 2,0-3,0 | 3,5-4,5 |
| Lactose | - | > 99 | - | 0,3 | 1 |

*CP – Concentrado Protéico; IP – Isolado Protéico. (%) percentual mássico em base seca
Fonte: adaptado de YADA (2004); BYLUND (1995); USDEC (2002).

Quando o conteúdo de lactose original do soro é reduzido obtém-se como produto resultante soro em pó deslactosado ou soro em pó com teor reduzido de lactose. Semelhantemente, processos, como a eletrodialise, podem ser usados pra reduzir o conteúdo mineral do soro, obtendo como produto o soro desmineralizado (BYLUND, 1995).

O soro em pó deslactosado é empregado principalmente em queijos processados, molhos e carnes industrializadas como alternativa para o soro em pó, nos casos em que são desejadas concentrações mais baixas de lactose e mais elevadas de proteínas. Além do mais, muitas pessoas estão limitando o uso de lactose devido à dificuldade para digeri-la, síndrome conhecida como intolerância à lactose (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

O soro em pó desmineralizado é utilizado amplamente em fórmulas infantis, bem como em coberturas aeradas, sobremesas congeladas e em produtos de confeitaria. Nestas aplicações o alto teor de lactose é usado como fonte conveniente de carboidratos. O soro desmineralizado também acrescenta *flavor* lácteo agradável sem perturbar o equilíbrio de minerais do produto final (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

Os minerais de leite são usados para fortificação de alimentos e bebidas com cálcio (YADA, 2004; MATHEWS, 1984).

A lactose por ser fonte de material energético pode ser utilizada para diversos processos biotecnológicos e como componente utilizado na indústria alimentícia. É um componente essencial na produção de produtos de leite fermentado, afeta a textura de certos produtos concentrados e congelados; é altamente envolvida em mudanças de cor e sabor induzidas pelo calor em produtos de leite aquecidos. Há ainda os fins farmacêuticos, pois a lactose confere compressibilidade, fluidez e dureza na confecção de comprimidos, revestimento de pílulas e na produção de cosméticos (FOX & MCSWEENEY, 1998; GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

2.5.2 Produtos Protéicos do Soro (Concentrados e Isolados Protéicos)

Os componentes mais valiosos do soro são as proteínas, mas como a sua concentração neste líquido é muito reduzida são necessárias etapas de concentração, para que as suas propriedades funcionais sejam realçadas (HUFFMAN, 1996).

O desenvolvimento de técnicas de fracionamento, de modificação e de preservação das proteínas do soro pode contribuir para a recuperação desse nutriente, assim como melhorar a expressão de suas propriedades funcionais. O fracionamento do soro em lactose e proteínas do leite representa um expediente que permite a utilização dos constituintes de maior importância comercial presentes no soro de leite.

Quando um produto de soro tem 25 % ou mais de proteínas em base seca é denominado concentrado protéico do soro (CP). Os CP podem ser classificados com base na

sua composição. Geralmente são agrupados de acordo com o seu conteúdo em proteína (em base seca) como pode ser observado na Tabela 2.7 (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

Os CP mais comuns têm um teor de proteína de 35, 50, 65 e 80 %, em base seca. Quando o grau de purificação protéica é maior que 90 % (em base seca) o produto é denominado de isolado protéico (IP) (YADA, 2004; MATHEWS, 1984).

Os CP têm uma vasta aplicação na indústria alimentar pela funcionalidade que podem conferir aos alimentos. A Tabela 2.8 resume as propriedades funcionais e as principais aplicações industriais dos CP. O uso de proteínas do soro como ingredientes em alimentos funcionais lácteos e não lácteos está aumentando progressivamente conforme tem aumentado a capacidade tecnológica da indústria para produzir CP, IP ou, mais recentemente, frações enriquecidas em proteínas do soro individuais (RICHARDS, 2002).

Tabela 2.8: Propriedades funcionais que os concentrados protéicos conferem aos alimentos

| Propriedade funcional | Setor alimentar | Percentual de proteína no CP |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Viscosidade | Sobremesas | CP 35 |
| Solubilidade, estabilidade coloidal | Bebidas | CP 35 |
| Emulsificação | Café, sopas, alimentos infantis | CP 85 |
| Formação de espumas | Confeitaria | CP 35 |
| Gelificação | Produtos lácteos | CP 65 |
| Elasticidade | Panificação | CP 65 |
| Coesão e adesão | Produtos em pasta | CP 85 |
| Absorção de água e de gordura | Produtos de carne | CP 85 |

Fonte: adaptado de WITT (1998)

O IP possui excelentes propriedades de gelificação, aeração, emulsificação, retenção de água e gordura. As principais aplicações de IP incluem produtos lácteos, de panificação e de confeitaria, *snacks*, salgadinhos, aperitivos e carnes processadas (RICHARDS, 2002).

NIKAEDO *et al.* (2004) testaram o uso de concentrados protéicos de soro em sobremesas lácteas substituindo o leite em pó. Os resultados mostram que é viável utilizar o CP em substituição ao leite em pó, oferecendo um produto com menores teores de gordura e de sólidos totais, e maior teor de proteínas. O produto apresentou melhor qualidade nutricional, além da redução calórica, favorecendo seu consumo por pessoas preocupadas com a saúde.

Segundo USDEC (2002), iogurtes produzidos com leite fortificado com CP apresentam melhor textura e consistência. Um dos benefícios mais significativos ao substituir o leite desnatado por CP é o resultado da redução no efeito da sinerese durante o período de estocagem do iogurte.

Segundo NIKAEDO *et al.* (2004), o CP é adequado para substituir a gordura em sobremesas lácteas congeladas (*frozen yogurt*), demonstrando que é possível elaborar uma sobremesa láctea nutritiva, com substitutos de gordura e com boa aceitabilidade sensorial.

Para a produção de iogurtes *light* (sem gordura), um substituto de gordura é indicado para prover a sensação de saciedade (*mouthfeel*), segundo USDEC (2002), iogurte com elevado teor protéico (proteínas provenientes do soro) provoca uma diminuição do apetite quando comparado com iogurtes com menor quantidade de proteínas, mas com igual valor calórico. Conforme CASTRO *et al.* (2002), iogurtes probióticos de baixas calorias foram elaborados com CP 35 % e CP 80 % sem prejuízos nas suas características físico-químicas e microbiológicas.

Os CPs também têm aplicação na saúde humana, uma vez que têm um elevado valor nutritivo e, portanto, podem complementar e fortificar alguns alimentos, aumentando o valor nutricional do produto. Assim, são muito úteis para incorporar em bebidas para esportistas, porque ajudam no desenvolvimento ou formação de massa muscular do corpo humano. São considerados atualmente como um dos componentes alimentícios mais adequados para as dietas de fisiculturistas e atletas que desejam aumentar a sua massa muscular (RICHARDS, 2002; HUFFMAN, 1996).

As proteínas do soro, devido aos aspectos nutricionais e fisiológicos, são amplamente usadas em nutrição infantil; podem ser usadas em fórmulas enterais; na forma de proteínas nativas ou pré-digeridas contribuindo com o ganho de peso em pacientes pós-cirúrgicos, geriátricos e imobilizados; em uma dieta de alimentos de baixa caloria; e na substituição de gordura, ou na formulação de alimentos e bebidas saudáveis (LEE, 1996; WIT, 1998; MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

Além do mais, o valor comercial de um concentrado protéico é de 3 a 40 vezes maior que o do soro em pó, devido à maior especificidade do produto em nível funcional e ao excelente valor nutritivo do mesmo (ZADOW, 1992).

2.5.2.1 Processos de Recuperação das Proteínas do Soro

Têm sido desenvolvidas metodologias que permitem a concentração de proteínas relativamente aos outros componentes de natureza não protéica, visto que o soro não é uma fonte equilibrada de nutrientes, contém um elevado teor de lactose e uma baixa concentração de proteínas e cinzas, e não permite evidenciar nenhuma das propriedades das proteínas. A seguir serão descritos os principais métodos usados atualmente para obter concentrados protéicos e frações individuais de proteínas.

O maior desenvolvimento de tecnologias de separação sólido-líquido tem sido utilizado pelas indústrias de laticínios para a recuperação das proteínas. Entre estas técnicas podemos citar a adsorção em suporte insolúvel, a precipitação pelo calor, a precipitação por agentes complexantes e os processos de separação com membranas, com especial atenção para o processo de ultrafiltração (MIZUBUTI, 1994; MATTHEWS, 1984).

Desde 1981, a ultrafiltração se tornou a técnica mais utilizada para recuperar as proteínas solúveis do soro. Os componentes de baixa massa molar (lactose, sais e água) permeiam preferencialmente através das membranas de ultrafiltração, as quais retêm as moléculas de proteína (retido). Na maioria das aplicações comerciais a ultrafiltração é acompanhada de diafiltração, permitindo uma maior remoção de sais e lactose. O retido é

seco por *spray drier*. As proteínas de soro obtidas por separação de membrana possuem propriedades funcionais boas, tais como solubilidade, capacidade de formar espuma, gel e emulsão (FOX & MCSWEENEY, 1998).

A desnaturação térmica é um método tradicional para a recuperação de proteínas de soro, onde a coagulação é ótima em pH 6 e aproximadamente 90 °C por 10 a 20 min. As proteínas de soro coaguladas são recuperadas por centrifugação, porém têm baixa solubilidade e funcionalidade limitada (FOX & MCSWEENEY, 1998; SCOPES, 1988).

As proteínas podem ser precipitadas normalmente através de polieletrólitos como carboximetilcelulose. Processos técnicos para recuperação de proteínas de soro frequentemente fazem uso de tais substâncias ou de uma combinação de calor e ajuste de pH (BYLUND, 1995; CAPITANI *et al.*, 2005).

Filtração por colunas cromatográficas (cromatografia de permeação gel) torna possível o fracionamento de moléculas, inclusive proteínas. É possível separar a caseína e as proteínas do soro através de filtração gel, mas o processo ainda é antieconômico em nível industrial (FOX & MCSWEENEY, 1998; YADA, 2004).

Preparações de proteína de soro altamente purificadas são industrialmente preparadas através de cromatografia de troca iônica. As proteínas são adsorvidas em uma coluna de troca iônica e após remoção da lactose são eluídas através do ajuste de pH. Os sais são retirados através da osmose inversa e o produto é seco em *spray drier* (FOX & MCSWEENEY, 1998; BOBRESHOVA *et al.*, 2002).

2.5.3 Frações Purificadas das Proteínas Majoritárias do Soro

Devido às propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, há um crescente interesse no fracionamento das proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos CP devido às interações de outros componentes (BRAMAUD *et al.*, 1997 e ZYDNEY, 1998).

As duas principais proteínas do soro, α -La e β -Lg, são produzidas comercialmente como frações de proteínas isoladas de pureza relativamente alta utilizando diversos procedimentos patenteados ou registrados. A Tabela 2.8 mostra a composição de frações industriais de α -La e β -Lg.

Tabela 2.9: Composição de frações industriais de α -La e β -Lg.

| Proteína do Produto | Proteína bruta (%) | |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | Produto rico em α -La | Produto rico em β -Lg |
| α -La | 70,6 | 13,8 |
| β -Lg | 13,2 | 74,8 |
| BSA + Ig | 10,4 | 4,6 |
| Outras proteínas | 5,8 | 6,8 |

Fonte: RICHARDS (2002).

Estes tipos de produtos são utilizados como ingredientes alimentícios, tanto por utilidade tecnológica como nutritiva, e são vendidos a preços elevados em lojas especializadas de produtos para atletas e outras pessoas que precisam de dietas especiais (RICHARDS, 2002).

Conhece-se há muito tempo a capacidade única que tem a α -La para fixar cálcio. O fato de que a α -La apresenta uma alta capacidade de renaturação e, em consequência tem uma alta resistência ao tratamento térmico, se deve provavelmente a esta propriedade. Os alimentos que contém α -La suficientemente pura e em uma quantidade elevada não se coagulam por aquecimento, propriedade esta importante para o desenvolvimento de novos produtos com alta concentração de proteínas do soro que sofram tratamento térmico (RICHARDS, 2002).

Em nível funcional a β -Lg tem maior capacidade de gelificação que a α -La (ZYDNEY, 1998). A cadeia de β -Lg possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lipídios. Estes pontos de ligação podem ser usados para incorporar compostos lipofílicos desejáveis como tocoferol e retinol (vitamina A) em produtos com baixo teor de gordura. A β -Lg liga-se ao cálcio e zinco e apresenta homologia seqüencial parcial com determinadas proteínas capazes de ligar retinol (FOX & MCSWEENEY, 1998). Segundo YADA (2004) a molécula pode se ligar a lipídios ácidos e não polares.

A proteína do leite humano consiste em proteína do soro e caseína na proporção 70:30, enquanto o leite de bovinos tem a proporção de 20:80. O componente protéico principal do soro no leite humano é a α -La, o restante são BSA, Lactoferrina e Ig. A β -Lg, o componente principal da proteína do soro de bovinos (50 %) não está presente no leite humano, porém a α -La dos bovinos assemelha-se a do soro humano. Os substitutos de leite humano são compostos formulados para imitar a relação soro:caseína do leite humano, quando o soro de bovinos é adicionado na mistura resulta em elevadas concentrações de β -Lg que é um alergênico em potencial. Assim, está crescendo o interesse de fabricar fórmulas infantis com níveis reduzidos de β -Lg (OUTINEN *et al.*, 1996).

Por outro lado, a fração enriquecida de β -Lg poderia ter aplicações em larga escala na indústria de alimentos, devido a algumas excelentes propriedades funcionais, como por exemplo, gelificação e capacidade de formar espuma (OUTINEN *et al.*, 1996).

Entretanto, existe uma controvérsia em torno do papel da β -Lg bovina como proteína com atividade fisiológica, já que por não estar presente no leite humano, poderia ser alergênica para certas pessoas. Alguns indivíduos, particularmente as crianças, exibem uma resposta alérgica às proteínas de leite bovinas ingeridas. Estudos indicam que em média 2 a 3 % da população infantil com menos de um ano de idade possui alguma alergia á proteína do leite bovina. Esta sensibilidade não é restrita às crianças, uma pequena população de adultos também pode ser vulnerável a esta condição (YADA, 2004).

A adição de α -La tem sido defendida como forma de “humanizar” fórmulas infantis e criar outros produtos para pessoas que consomem ou podem ingerir apenas quantidades limitadas de proteínas. Além do mais, a α -La tem 4 resíduos de triptófano por molécula e

devido à necessidade deste aminoácido para o desenvolvimento do organismo infantil, é mais adequada para a formulação de alimentos para crianças do que os CPs (FOX & MCSWEENEY, 1998; ZYDNEY, 1998).

Embora quase toda publicidade em torno da alergenicidade da β -Lg tenha se concentrado na produção de fórmulas infantis hipo-alergênicas, deve também se ter em conta a alergenicidade que apresentam certos consumidores adultos a esta proteína, e a necessidade de desenvolver produtos para este público (RICHARDS, 2002).

A hidrólise enzimática, a desnaturação induzida pelo calor em porções individuais das proteínas do leite estão sendo investigadas como meios de reduzir a alergenicidade destas proteínas (YADA, 2004).

2.5.3.1 Processos de Fracionamento das Proteínas Majoritárias do Soro

Atualmente, existe um interesse comercial considerável na preparação das proteínas individuais para alimentação e aplicações nutricionais e terapêuticas. Técnicas para isolar proteínas de soro individuais à escala laboratorial por *salting-out*, permutação iônica e/ou cristalização estão disponíveis a cerca de 40 anos. Assim, têm sido desenvolvidos vários métodos de fracionamento de proteínas do soro, embora só alguns deles tenham aplicação em nível industrial (ZYDNEY, 1998).

Estes produtos funcionais são fabricados mediante diversos processos, incluindo a precipitação de ácidos ou bases, a troca iônica, ou as técnicas de separação por membranas, e os produtos resultantes têm diferentes propriedades segundo o procedimento utilizado (RICHARDS, 2002; GRANDISON & LEWIS, 1996).

Proteínas do soro eram originalmente isoladas pelo uso de várias técnicas de precipitação, mas hoje em dia a tecnologia de separação por membranas e processos cromatográficos são usados além das técnicas de precipitação com agentes complexantes (SCOPES, 1988; ZYDNEY, 1998).

Na precipitação seletiva parâmetros como o pH, a temperatura e a concentração salina podem ser manipulados de forma a se obter diferentes frações protéicas (ZYDNEY, 1998).

Uma estratégia para eliminar a β -Lg do soro é utilizar a baixa solubilidade da β -Lg em valores de pH próximos do seu ponto isoelétrico. O soro sofre um pré-tratamento que inclui ultrafiltração, desmineralização por eletrodialise e ajuste do pH, de forma a precipitar a β -Lg, ficando um sobrenadante rico em α -La em conjunto com outras proteínas (GRANDISON & LEWIS, 1996).

Diversos métodos para o fracionamento da proteína do soro foram desenvolvidos, alguns são baseados na solubilidade baixa da α -La entre os pH de 3,5 a 4,5; onde a β -Lg permanece solúvel; outros métodos baseiam-se em precipitação pelo calor. Usando os métodos da precipitação por calor, a β -Lg é recuperada facilmente por UF, mas a recuperação

do precipitado de α -La é difícil devido a sua baixa massa específica. Além disso, em soros ácidos ocorre uma desnaturação significativa da α -La (OUTINEN *et al.*, 1996).

ZYDNEY (1998) mostrou que, através de um sistema de membranas e com modificações no pH e força iônica das soluções, é possível fracionar os constituintes protéicos do soro, isto é, isolar β -Lg e α -La, BSA, Lactotransferrina, Lactoperoxidase e Imunoglobulinas em frações distintas. Esta é uma técnica que poderá ter aplicação em larga escala se as condições adequadas forem utilizadas.

BRAMAUD *et al.* (1997) mostrou que é possível isolar a α -La e a β -Lg de uma solução de soro através de ajuste de temperatura e pH (pH 3,9; 55 °C por 30 min), associada a centrifugação (4000 g, 30 min, 20 °C). Na fase solúvel permanece parte da β -Lg, lactose e minerais e na fase precipitada α -La, BSA, Ig e β -Lg. Na fase solúvel a β -Lg é purificada através de UF associada a DF, e a α -La é purificada por centrifugação e ressolubilização em NaCl ou CaCl₂ obtendo, um grau de pureza de β -Lg e de α -La de 56 % e 79 %, respectivamente.

A precipitação de α -La por acidificação de soro e proteína de soro concentrada foi estudado por LUCENA *et al.* (2007). Três ácidos diferentes (HCl, ácido cítrico e ácido láctico) foram considerados para a precipitação. Os dois ácidos orgânicos foram capazes de complexar os íons de Ca²⁺, porém, quando ácido clorídrico foi usado, a precipitação ocorreu devido à desnaturação irreversível das proteínas. Quando o processo de precipitação foi levado para um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico da α -La e foi combinado com complexação dos íons cálcio, α -La precipitou juntamente com BSA e Ig. Enquanto, a β -Lg permaneceu em solução devido à estabilização desta proteína em baixas concentrações de Ca²⁺.

2.6 Aproveitamento do Soro – Situação Mundial

Segundo ZADOW (1992) e BYLUND (1995), cerca de 120 a 130 milhões de toneladas de soro de leite foram produzidas no mundo em 1990.

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da produção de soro devido a produção mundial de queijo crescente, em virtude das exigências da população. Estima-se que a produção de queijo aumente a uma taxa de 3 % ao ano (MEIRELES, 1999 *apud* RODRIGUES, 2001). Como a existência de soro é fortemente condicionada pela produção de queijo, pode-se deduzir que atualmente haja uma produção mundial de cerca de 180 a 190 milhões de toneladas de soro.

Cerca da metade do soro produzido no mundo é eliminado como efluente em sistemas hídricos ou como adubo no solo, resultando numa perda importante de energia alimentar, bem como criando uma grande perda econômica (SISO, 1996; RODRIGUES, 2001; MIZUBUTI, 1994).

A outra metade é processada em vários produtos alimentares retornando à alimentação animal ou humana, assim como para a produção de medicamentos e outros produtos. Sendo que quase 50 % deste total são usados diretamente na forma líquida, 30 % na forma de pó, 15

% como lactose e o restante como concentrados de proteína (SISO, 1996; RODRIGUES, 2001; MIZUBUTI, 1994).

A produção mundial estimada de proteínas de soro de elevada qualidade é de pelo menos 600.000 toneladas (RODRIGUES, 2001).

Na Comunidade Econômica Européia aproximadamente 45 % do soro gerado é utilizado na forma líquida, 30 % na forma de soro em pó, 15 % como lactose e derivados desta e 10 % usado na produção de proteína concentrada (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001). Em 1995 foram produzidas 230.000 toneladas de concentrados protéicos na Europa (MEIRELES, 1999 *apud* RODRIGUES, 2001).

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de soro em pó e derivados (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001). Mais de 25 % da produção mundial de soro em pó e de lactose – 800.000 toneladas – são fabricadas nas mais de 200 fábricas de processamento de soro que existem neste país. Em conjunto, a indústria de soro dos EUA representa a maior fornecedora de soro em pó do mundo (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

Quase 60 % do soro e produtos de soro produzidos nos Estados Unidos em 1980 eram usados em produtos alimentícios para humanos, mais de 80 % como soro em pó. Como alimento animal, mais de 65 % do soro usado também era produto de soro em pó (WONG *et al.*, 1999).

O uso de produtos de soro tem aumentado de maneira espetacular nos últimos anos, uma lista feita em um supermercado de Washington, nos EUA, mostrou uma relação de mais de 900 produtos contendo um dos vários produtos de soro que estão à disposição das indústrias de alimentos (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2007), anualmente tem-se produzido cerca de 450.000 toneladas de queijos. Levando em consideração que o soro representa 90 % do volume de leite gasto para produzir 1 kg de queijo, pode-se deduzir que são gerados, cerca de 4 milhões de toneladas de soro por ano. No entanto, apenas parte do soro gerado é aproveitada pelas indústrias brasileiras, principalmente na fabricação de ricota, na produção de bebidas lácteas e um pequeno percentual é seco, porém sem a completa concentração das proteínas, sendo mais comum a utilização do soro na alimentação de animais ou seu lançamento em rios (PORTO *et al.*, 2005; NEVES, 2001).

A produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro lácteo no mercado brasileiro, as mais comercializadas são as bebidas fermentadas com características sensoriais semelhantes ao iogurte, contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15 % do total de soro produzido no país (NEVES, 1993; NAKAMAE, 2004).

2.7 Processos de separação por membranas

Os processos de separação por membranas (PSM) são operações que utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes.

O objetivo principal de qualquer PSM é a separação, a concentração e/ou a purificação de qualquer componente presente em solução e este pode ser alcançado devido à capacidade da membrana de transportar um determinado componente da fase de alimentação mais prontamente que qualquer outro componente presente. Isso ocorre devido às diferenças existentes entre as propriedades físicas e/ou químicas da membrana e dos componentes que permeiam (MULDER, 1996).

Os processos de filtração por permeação com membranas são usados para efetuar uma variedade de separações e podem ser definidos como barreiras seletivas ao transporte de massa de certos componentes de uma amostra.

Os PSM podem ser considerados processos de separação relativamente recentes, pois, mesmo por volta de 1970, estes ainda não eram considerados processos de relevância técnica.

As membranas naturais são conhecidas desde a antiguidade, mas o desenvolvimento e as principais aplicações de processos de separação com membranas sintéticas, em escala de laboratório, tiveram início em 1920. Foi a partir da década de 30 que alguns PSM passaram a ser conhecidos e utilizados em pequena escala. Estes, entretanto, acabaram não se desenvolvendo, na época, em uma escala industrial devido aos baixos fluxos de permeado obtidos, resultantes da elevada espessura das membranas utilizadas.

Atualmente, entretanto, os PSM são largamente utilizados para diferentes aplicações – principalmente, como um processo alternativo aos processos de separação convencionais, tais como a destilação, a centrifugação e a evaporação. Esse crescimento se dá devido a algumas vantagens apresentadas pelos PSM, tais como: a economia de energia, visto que a maioria destes ocorre sem mudança de fase; a seletividade da membrana; a separação de compostos termolábeis (operam à temperatura ambiente) e a simplicidade de operação e escalonamento (sistemas modulares).

2.7.1 Membranas

A membrana é definida como uma interface ou uma barreira semi-seletiva que separa duas fases (alimentação e permeado) e restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nestas fases. Elas podem, ainda, apresentar inúmeras características, podendo ser naturais ou sintéticas, neutras ou carregadas, espessas ou finas, de estrutura homogênea ou heterogênea, com mecanismo de transporte ativo ou passivo, entre outras (MULDER, 1996).

As membranas devem apresentar características específicas conforme a separação desejada. As propriedades de separação das membranas dependem de fatores como: a

natureza química do material constituinte, existência ou não de poros e, no caso de membranas porosas, o tamanho dos poros e sua distribuição.

De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. A membrana é denominada porosa quando o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanhos entre as partículas e os poros da membrana. Já as membranas densas não possuem poros onde o transporte dos componentes envolve a sorção e a difusão através do material que constitui a membrana.

Os parâmetros de natureza morfológica envolvem a distribuição de tamanho de poros, a porosidade superficial e a espessura, no caso de membranas porosas e a espessura do filme polimérico e as características físico-químicas do polímero e das substâncias a serem separadas, no caso das membranas densas. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser simétricas ou assimétricas, dependendo se apresentam ou não as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. A escolha adequada do uso de uma membrana, densa ou porosa, no processo de separação implica em conhecer as características da membrana e da solução a ser separada (MULDER, 1996).

As membranas podem ser produzidas por diferentes tipos de materiais. De acordo com tipo de material utilizado são classificadas em dois grupos; as membranas orgânicas e as membranas inorgânicas. As membranas inorgânicas são produzidas com materiais cerâmicos, vítreos e metálicos e as membranas orgânicas com materiais poliméricos sintéticos ou biológicos.

As membranas poliméricas podem ser divididas em hidrofóbicas e hidrofílicas. Alguns materiais geradores de membranas hidrofóbicas são o politetrafluoretileno (PTFE), o polipropileno (PP), o polietileno (PE), entre outros. Os materiais geradores de membranas hidrofílicas, por sua vez, são os ésteres de celulose, o policarbonato (PC), a polissulfona (PS) e a polietersulfona (PES), a poliamida (PI) e a polieteramida (PEI).

As membranas inorgânicas devem ser utilizadas em processos industriais sujeitos às condições severas de limpeza e esterilização. As membranas inorgânicas são compostas de uma fina camada de material inorgânico sobre um suporte cerâmico ou metálico. Os materiais para as membranas inorgânicas incluem vidro, metal sinterizado, materiais cerâmicos e ainda os poliméricos inorgânicos. Dentre os materiais mais utilizados para fabricação de membranas cerâmicas podem-se citar a alumina (Al_2O_3), o zircônio (ZrO_2) e o titânio (TiO_2).

As membranas cerâmicas possuem custo mais elevado o que torna o seu emprego mais restrito. Já as membranas poliméricas dominam o mercado devido a sua diversidade quanto aos diferentes tipos de polímeros existentes e quanto à disponibilidade no mercado, além de apresentarem um campo de aplicação muito amplo.

Os PSM podem ser divididos em dois tipos: aqueles que envolvem a difusão do solvente (água) e os que envolvem a difusão do soluto. Os primeiros, mais comumente utilizados industrialmente, são denominados de processos de osmose e envolvem a

microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (OI); os demais se denominam processos de diálise (D) e envolvem a eletrodialise (ED), a pervaporação (PV) e a permeação gasosa (PG) (MULDER, 1996).

A Tabela 2.10 apresenta a faixa de tamanhos de poros das membranas para os PSM que envolvem a difusão do solvente e as faixas de pressão aplicáveis para cada processo.

Tabela 2.10: PSM relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação.

| PSM | Tamanho de poros (nm) | Limites de pressão (bar) |
|----------------|-----------------------|--------------------------|
| Microfiltração | 50 - 10000 | 0,1 - 2,0 |
| Ultrafiltração | 1 - 100 | 1,0 - 5,0 |
| Nanofiltração | < 1 | 5,0 - 20 |
| Osmose Inversa | Sem poros | 10 - 100 |

Fonte: MULDER (1996).

A NF é um processo de separação que permite separar alguns tipos de íons salinos, como Na^+ , K^+ e Cl^- , de moléculas orgânicas com massa molar na faixa de 100 Da a 500 Da, com base na carga e no tamanho destas partículas. Os íons permeiam a membrana segundo suas características de difusão e carga. A membrana de NF pode ser considerada uma membrana de UF mais densa ou uma membrana de OI mais aberta. Assim, o diâmetro de corte das membranas de NF situa-se entre o da OI e o da UF. As NF operam na faixa de 10 a 20 bar.

Os processos que envolvem a OI visam gerar tanto água pura (permeado) quanto soluções aquosas ricas em sais minerais e outras moléculas de massa molar maior (concentrado). As membranas de OI operam a uma pressão de aproximadamente de 100 bar e retêm íons como Na^+ , K^+ e Cl^- .

A ED é uma técnica de separação com membranas, cujo critério de separação não é o tamanho do composto, mas sim a carga elétrica. Fundamenta-se no princípio da movimentação de íons, sob um campo elétrico, em soluções aquosas e através de membranas carregadas positiva ou negativamente, resultando em soluções concentradas em íons e em soluções diluídas.

Entre os processos de separação por membranas se dará ênfase nos sub-capítulos 2.7.2 e 2.7.3 aos processos de MF e UF que foram utilizados neste trabalho, para a concentração de proteína do soro de queijo e para o fracionamento destas proteínas.

2.7.2 Microfiltração (MF)

O processo de MF promove a separação de partículas de diferentes tamanhos através da aplicação de um gradiente de pressão como força motriz e se caracteriza como o PSM mais parecido com o processo convencional de filtração.

O diâmetro de poro destas membranas varia entre 10 e 0,05 μm , o que o torna um processo capaz de reter suspensões e emulsões. Assim, as partículas retidas pelas membranas de MF são, normalmente, maiores que as retidas nos processos de UF e OI. Além disso, nos processos de MF, a pressão osmótica pode ser desprezada e a diferença de pressão aplicada normalmente varia entre 0,1 e 3,5 bar.

O principal problema decorrente da utilização de membranas de MF é o declínio no fluxo, causado pelos fenômenos de polarização por concentração e *fouling*, que serão revisados no sub-capítulo 2.9. A fim de reduzir este problema, um controle cuidadoso do modo de operação do sistema deve ser exercido.

As principais aplicações industriais das membranas de MF envolvem a esterilização de soluções farmacêuticas, a clarificação de bebidas, a purificação de fluidos na indústria de semicondutores, além de algumas aplicações analíticas e biotecnológicas.

2.7.3 Ultrafiltração (UF)

A UF é um PSM usado para concentrar ou fracionar macromoléculas, onde estas são retidas total ou parcialmente pela membrana, enquanto as pequenas moléculas atravessam a membrana livremente. O processo de UF utiliza como força motriz a diferença de pressão.

Semelhantemente ao processo de MF, o PSM de UF é um processo baseado na separação através da diferença de tamanho entre as partículas e na utilização do gradiente de pressão como força motriz. Este processo é geralmente utilizado para a retenção de macromoléculas e colóides presentes em solução e pode ser considerado como um processo intermediário entre os processos de MF e NF, uma vez que o diâmetro de poro das membranas de UF varia entre 0,05 μm e 0,001 μm (HO e SIRKAR, 1992; MULDER, 1996).

As membranas de UF comerciais são especificadas através da sua massa molar de corte (MMC) cuja unidade mais utilizada é o Dalton (Da). A MMC é definida como a massa molar para a qual a membrana apresenta uma retenção igual a 95%.

A UF é adequada à concentração de soluções, em pressões transmembranas inferiores a 10 bar. As membranas de UF são capazes de reter partículas cuja massa molar varia entre 300 e 500.000 Da. Assim, compostos tipicamente retidos neste processo incluem os açúcares, biomoléculas, polímeros e partículas coloidais.

A principal diferença entre os processos de MF e UF situa-se na resistência hidrodinâmica que é maior na UF, pois esta possui uma camada superior mais densa (menor diâmetro de poro e porosidade menor na superfície) e, conseqüentemente, uma resistência hidrodinâmica muito maior (MULDER, 1996).

As membranas de UF são comumente utilizadas na indústria alimentícia, de bebidas e láctea, em sistemas de tratamento de efluentes, em aplicações médicas e biotecnológicas.

Uma extensão do emprego da UF é a adição de água em alguma fase durante o processo de concentração, processo denominado de diafiltração (DF). O objetivo da DF é lavar os componentes de mais baixa massa molar, e conseqüentemente aumentar a purificação do retido (GRANDISON & LEWIS, 1996).

As indústrias que utilizam essa operação são as de alimentos, bebidas, biotecnológica e farmacêutica com finalidade de purificar produtos de interesse. A DF está associada com alto consumo de líquido diafiltrante, normalmente água, com alto teor de pureza. Na indústria de laticínios, por exemplo, a DF é normalmente empregada após a pré-concentração do soro por MF, UF ou NF que permite maior separação de lactose e sais minerais elevando a proporção e conseqüentemente a pureza de proteínas no retido.

2.7.4 Módulos

As menores unidades responsáveis pelo acondicionamento das membranas de qualquer PSM denominam-se módulos e podem ser definidas como a parte central de qualquer sistema de membranas, ou seja, é o arranjo técnico destas (MULDER, 1996; RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989).

Os módulos podem apresentar basicamente quatro geometrias diferentes: placa e quadro, tubular, fibra oca e espiral. A escolha do módulo para uma determinada separação depende de uma série de fatores, tais como: densidade de empacotamento ($m^2.m^{-3}$), custo, resistência ao *fouling*, considerações operacionais, características da mistura a ser fracionada, facilidade de operação, limpeza e manutenção.

2.7.4.1 Módulo Placa e Quadro

Os módulos placa e quadro possuem configuração física similar ao filtro prensa, pois são constituídos por sanduíches de membranas intercaladas por espaçadores e suportes, onde as membranas estão dispostas paralelamente. Camadas do conjunto podem ser empilhadas, tal que o concentrado de uma placa alimente a próxima, até atingir a recuperação desejada. Estes módulos são adequados para experimentos onde o volume a ser tratado é pequeno, pois apresentam uma densidade de empacotamento baixa e módulos com essa concepção têm custo de fabricação elevado. Entretanto, as condições de escoamento da alimentação e do permeado podem ser facilmente controladas, bem como as membranas que forem danificadas durante a operação podem ser substituídas sem a perda do módulo (RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989).

2.7.4.2 Módulo Fibra-oca

Os módulos em fibra-oca são constituídos por um feixe de membranas poliméricas, na forma de cilindros finos e longos, com diâmetros menores de 0,5 mm, presos nas extremidades por placas, inseridos em um tubo maior de modo semelhante à configuração de um trocador de calor casco e tubos. A alimentação é bombeada para o interior do tubo e o permeado é coletado na extremidade após percorrer pelo interior das fibras ou vice-versa. As principais vantagens desta configuração são: a alta superfície de membrana por unidade de volume, facilidade de operação e manutenção e baixo consumo de energia (MULDER, 1996).

2.7.4.3 Módulo Espiral

Este módulo pode ser considerado uma evolução do módulo placa e quadro, ou seja, nada mais é do que um módulo placa e quadro envolto, de forma espiralada, em torno de um tubo central perfurado de coleta de permeado. Este módulo caracteriza-se por um projeto relativamente simples e por uma elevada densidade de empacotamento ($300 - 1000 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$), a qual depende fortemente da altura do canal, determinada pelo material do espaçador utilizado (RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989; MULDER, 1996).

Neste módulo, dois ou mais “envelopes”, contendo, cada um, duas membranas separadas por um espaçador, podem estar envoltos no tubo coletor; a alimentação escoaxialmente através do módulo cilíndrico paralelamente ao tubo central, no qual o permeado escoaxialmente radialmente (MULDER, 1996).

Normalmente, vários módulos espirais podem ser utilizados em conjunto, em um mesmo vaso. Estes são dispostos em série, ligados pelo tubo coletor central. Neste tipo de módulo, a velocidade de escoamento é praticamente uniforme e mecanismos promotores de turbulência estão presentes ao longo da superfície da membrana, reduzindo a tendência à formação do *fouling* e facilitando a limpeza da mesma (MULDER, 1996).

Algumas vantagens do módulo em espiral são a boa resistência ao *fouling*, devido aos canais de alimentação relativamente abertos, a facilidade de limpeza, a facilidade de substituição, a disponibilidade do módulo com membranas de diferentes materiais e a disponibilidade comercial de diversos fornecedores. Dentre as desvantagens, pode-se citar uma área superficial moderada em relação ao volume da membrana, alguma tendência ao fenômeno de polarização por concentração e a dificuldade de obtenção de altas taxas de recuperação em sistemas pequenos.

2.7.4.4 Módulo Tubular

Nos módulos tubulares, a membrana é suportada na superfície interna ou externa de um tubo poroso. Este tubo pode ser de material polimérico, fibra de vidro, cerâmica, carbono ou aço inoxidável. O número de tubos em cada módulo também pode variar (entre 4 e 18), sendo dispostos em série e ligados, um ao outro, a fim de atingir a taxa de recuperação desejada (MULDER, 1996; RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989).

A densidade de empacotamento do módulo tubular é relativamente baixa ($< 300 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$) e, embora ele se caracterize como a configuração de custo mais elevado, é bastante aplicado nos casos de elevada tendência ao *fouling*, devido ao seu eficiente controle de processo e facilidade de limpeza das membranas. Assim, suas aplicações atuais resumem-se, praticamente, às águas de alimentação com elevado teor de sólidos suspensos, tais como correntes de efluentes e provenientes da fabricação de produtos alimentícios (MULDER, 1996).

O módulo tubular tem como principais vantagens: a baixa tendência ao *fouling*, devido à possibilidade de operar com alta velocidade de escoamento tangencial, facilidade de limpeza e podem operar em altas pressões. Dentre as desvantagens, podem-se citar a baixa área

superficial em relação ao volume da membrana, o custo elevado e a possibilidade mínima de escolha do material da membrana.

2.8 Princípios dos PSM

A seguir são apresentadas algumas definições comumente utilizadas em PSM para melhor entendimento da leitura deste trabalho. As equações apresentadas foram retiradas de MULDER (1996).

Nos sistemas de PSM, basicamente, duas configurações de escoamento são utilizadas: o modo convencional ou *dead-end* e o modo tangencial ou *cross-flow*. No primeiro, a solução de alimentação esco perpendicularmente à superfície da membrana, promovendo a formação de uma camada na superfície da membrana semelhante a uma torta, devido ao acúmulo das partículas retidas. No modo tangencial, a alimentação esco ao longo da superfície da membrana, gerando o acúmulo de apenas parte das partículas retidas. Um desenho esquemático do escoamento tangencial é apresentado na Figura 2.4 (MULDER, 1996).

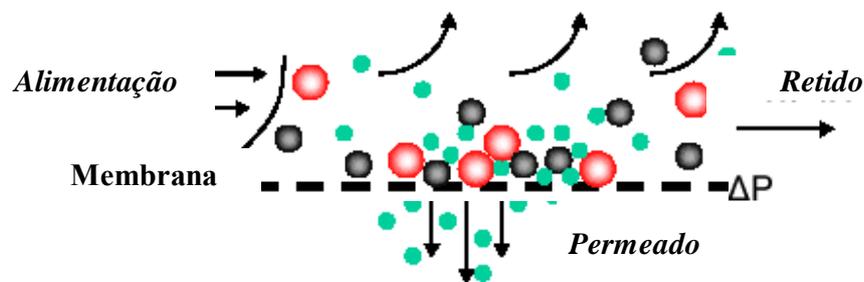


Figura 2.4: Representação esquemática do modo de operação tangencial (Fonte: BRANS, 2006).

A corrente que atravessa a membrana é denominada permeado ou filtrado e a que fica retida pela membrana, que é a corrente enriquecida em um ou mais componentes, é chamada de retido ou concentrado.

2.8.1 Fluxo Permeado

O fluxo permeado representa a vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área da membrana e é determinado pela força motriz aplicada e pela resistência apresentada pela membrana (ou por sua permeabilidade), que muitas vezes, são proporcionais.

O movimento de qualquer espécie através da membrana é causado pela ação de uma ou mais forças motrizes sobre os componentes da alimentação. A maioria dos processos utiliza como força motriz, o gradiente de potencial químico – que pode ser expresso em função do gradiente de pressão, de concentração ou de temperatura – ou o gradiente de potencial elétrico.

A força motriz utilizada, bem como a morfologia da membrana, determinam o mecanismo de transporte através desta, que pode ser convectivo e/ou difusivo. No caso de

membranas de MF e UF, o fluxo é essencialmente convectivo, uma vez que estas membranas utilizam como força motriz o gradiente de pressão através da membrana.

O volume que escoar através destas membranas pode ser descrito pela Lei de Darcy, sendo o fluxo através da membrana (J) diretamente proporcional à pressão aplicada (Δp):

$$J = P \times \Delta p \quad (2.1)$$

onde a constante de permeabilidade (P) engloba fatores estruturais, tais como a porosidade da membrana, o diâmetro de poro e a distribuição destes; além disso, esta constante inclui, também, a viscosidade do líquido que permeia.

O fluxo através da membrana pode simplesmente ser definido como o volume de permeado que flui através da membrana por unidade de área e tempo, como mostrado na Equação 2.2:

$$J_p = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (2.2)$$

onde J_p é o fluxo do permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$); A é a área da membrana (m^2); dV/dt é o volume de permeado recolhido (L) em função do tempo para permeação (h).

O fluxo permeado depende das propriedades da membrana, do produto a ser separado e das condições de operação tais como a pressão transmembrana, velocidade de escoamento tangencial e fator de concentração. Também é fortemente influenciado pela temperatura da solução de alimentação. Isso se dá, pois o fluxo é função da viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez, é função da temperatura. Assim, quanto maior a temperatura, menor a viscosidade e maior o fluxo de permeado.

Outros parâmetros importantes que afetam o fluxo através da membrana são o pH e a força iônica; o efeito de cada um deles, entretanto, varia muito em função da solução de alimentação e da membrana utilizada. Estes parâmetros influenciam, principalmente, na solubilidade dos componentes da alimentação, alterando as interações entre essa solução e a membrana.

Na separação de uma solução protéica, por exemplo, quanto mais o pH da solução se aproximar do pH isoelétrico das proteínas presentes, menos solúveis estas se encontrarão e maior será a tendência ao *fouling*, diminuindo, por consequência, o fluxo permeado (BACCHIN *et al.*, 2006).

2.8.2 Seletividade

A seletividade de uma membrana a determinada solução pode ser expressa por dois parâmetros: a retenção (R) ou o fator de separação (α). Para misturas aquosas diluídas, que consistem em um solvente (água, na maioria das vezes) e um soluto, é mais conveniente expressar a seletividade em função da retenção em relação ao soluto. Nestes casos, o soluto é

parcialmente, ou totalmente, retido pela membrana, enquanto que as moléculas de solvente passam livremente por ela (MULDER, 1996; HO e SIRKAR, 1992).

A retenção observada (R_{obs}) pode ser estimada pela seguinte equação:

$$R_{obs} = \frac{c_f - c_p}{c_f} = 1 - \frac{c_p}{c_f} \quad (2.3)$$

onde c_f e c_p (g.L^{-1}); são, respectivamente, as concentrações de soluto na solução de alimentação e no permeado. O valor de R varia entre 100 % – retenção completa do soluto – e 0 % – soluto e solvente atravessam livremente a membrana.

2.8.3 Fator de Concentração

O fator de concentração (FC) é uma variável limitante do processo porque está diretamente ligado ao fluxo permeado, isto é, a medida que a solução é concentrada o fluxo permeado diminui. O FC é definido conforme a Equação 2.4.

$$FC = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_F)} \quad (2.4)$$

onde FC é fator de concentração de uma dada espécie; V_0 é o volume inicial da solução (L); V_R é o volume do retido (L); V_F é o volume da solução permeada (L).

No processo de concentração de um dado componente através da membrana a concentração de um soluto durante o processo varia em função tanto da redução de volume, como da retenção (R) do soluto pela membrana.

2.9 Problemas que afetam os PSM

As alterações no desempenho da membrana podem ser causadas por diversos fatores, tais como a polarização por concentração e *fouling*. Todos estes fatores induzem a resistências adicionais ao transporte através da membrana no lado da alimentação. A extensão deste fenômeno é fortemente dependente do tipo de PSM e da solução de alimentação (MULDER, 1996).

Quando uma solução, contendo solutos dissolvidos, total ou parcialmente, e sob pressão, entra em contato com uma membrana, o soluto é levado à superfície desta película seletiva por transporte convectivo. O solvente e as partículas de dimensões menores do que o diâmetro dos poros da membrana a atravessam, enquanto os macrosolutos são retidos na superfície. Observa-se que há um aumento da concentração de solutos na região próxima à superfície da membrana (interface membrana/solução), que é superior em relação à concentração no seio da solução que está sendo filtrada. Este fenômeno é conhecido como “polarização por concentração”. Isto cria um gradiente de concentração que é compensado,

em parte, por uma difusão destes solutos no sentido contrário ao do solvente que permeia a membrana.

A seguir, são apresentadas as principais conseqüências deste fenômeno (MULDER, 1996; PLATT *et al.*, 2002):

- diminuição na retenção: devido ao aumento da concentração de soluto na superfície da membrana a retenção observada pode diminuir; isso ocorre, principalmente, na separação de solutos de baixa massa molar (sais);
- aumento na retenção: isso pode ocorrer na separação de misturas contendo solutos macromoleculares, onde a polarização por concentração pode ter influência decisiva na seletividade do processo; ou seja, as partículas de maior massa molar, retidas completamente, acabam por formar uma camada extra na superfície da membrana, que acaba retendo um número maior de partículas menores;
- diminuição do fluxo através da membrana: o fluxo é proporcional à força motriz exercida sobre o processo, e a constante de proporcionalidade pode ser considerada como o inverso da soma das resistências.

Pode-se considerar este fenômeno bem mais severo em membranas de MF e UF, pois nestas, o coeficiente de difusão das macromoléculas retidas, ou das partículas suspensas, é pequeno, quando comparado aos valores aplicados aos componentes retidos nos processos de OI e PV. Além disso, o fluxo, através das membranas de MF e UF, é consideravelmente maior, aumentando as conseqüências deste fenômeno (MULDER, 1996).

Segundo BACCHIN *et al.* (2006), a zona de polarização não pode ser evitada, mas os seus efeitos na redução do fluxo permeado podem ser controlados através das condições operacionais, como baixa pressão e alta turbulência junto à superfície da membrana. Este fenômeno é particularmente importante em membranas sujeitas a alto fluxo, como aquelas utilizadas na UF e na MF.

A polarização por concentração é um fenômeno reversível, ou seja, quando o estado estacionário é atingido, o fluxo através da membrana é menor do que o existente inicialmente, mas este não diminui mais com o passar do tempo e cessa quando o processo deixa de operar. O que se observa, normalmente, em um PSM, entretanto, é um declínio contínuo do fluxo, mesmo após o estado estacionário ser atingido. Este declínio contínuo decorre da existência de outro fenômeno: o *fouling* (MULDER, 1996).

O *fouling* pode ser definido como a deposição indesejável e (ir)reversível de partículas dissolvidas, suspensas ou coloidais na superfície da membrana. O *fouling* inclui os fenômenos de adsorção, bloqueio de poros, precipitação e formação de torta e ocorre, principalmente, nos processos de MF e UF, onde membranas porosas, mais susceptíveis ao fenômeno, são utilizadas (MULDER, 1996; RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989).

A deposição de alguns componentes da alimentação na superfície da membrana ou dentro de seus poros acaba formando uma camada delgada. Neste estágio, geralmente a

concentração de partículas próxima à superfície filtrante não varia mais e estabelece-se, então, a camada gel, conhecida também como “membrana dinâmica secundária”. O transporte da solução permeante através da membrana é perturbado pelo aparecimento de uma resistência adicional a resistência devido à camada de gel, além daquelas já oferecidas pela membrana e pelo fenômeno de polarização por concentração. À medida que a espessura da camada de gel aumenta esta resistência ao fluxo permeado torna-se maior (BACCHIN *et al.*, 2006).

O *fouling* é definido como um fenômeno de camada limite em que os solutos se depositam e/ou são adsorvidos na superfície e nos poros da membrana modificando a sua estrutura e as propriedades de separação da mesma. Os principais fenômenos que contribuem para o *fouling* estão apresentados a seguir:

- adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana e/ou no interior de seus poros devido à interações físico-químicas com o material da membrana;
- entupimento de poros por moléculas ou partículas em suspensão, trata-se da ação mecânica de bloqueio de poros, que pode ocorrer tanto na superfície como no interior da membrana, dependendo de sua morfologia;
- depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana com formação de uma torta de filtração (camada gel).

A natureza e a extensão do *fouling* são influenciadas consideravelmente pela composição química da membrana e pelas interações soluto-membrana.

Medidas que visem à redução da incidência destes fenômenos são bastante importantes, uma vez que o declínio de fluxo pode ser responsável por perdas econômicas. Mais importante, entretanto, é o discernimento entre o fator causador deste fenômeno, principalmente entre os fenômenos de polarização por concentração e *fouling* (embora ambos não possam ser considerados independentes, pois um fator - polarização por concentração, pode ser o causador do outro - *fouling*) (MULDER, 1996).

A fim de reduzir o fenômeno de polarização por concentração algumas ações podem ser tomadas, tais como a manipulação das condições de operação. Ou seja, pode-se tentar diminuir a pressão transmembrana, aumentar a velocidade de escoamento ao longo da membrana, alterar a configuração do módulo (diminuindo seu comprimento, aumentando o diâmetro hidráulico ou testando uma configuração diferente, geometria dos espaçadores) ou, até mesmo, aumentar a temperatura da alimentação (MULDER, 1996).

O controle da camada de gel pode ser feito através do aumento da velocidade tangencial, provocando maior turbulência. A agitação e a mistura da solução, próxima à superfície da membrana, arrasta parte significativa dos sólidos acumulados, na maioria das vezes por adsorção, reduzindo a espessura da camada de gel e aumentando a taxa de permeação. Além deste método, a aplicação de baixas pressões e a escolha do material constituinte da membrana são outros fatores bastante efetivos, que reduzem a adsorção de solutos (BACCHIN *et al.*, 2006).

Para prevenir a formação de *fouling* diferentes estratégias foram avaliadas na literatura. BRANS *et al.* (2004) expõem que o método de *backpulsing* é mais eficiente que outros métodos, tais como promotores de turbulência e *backwashing*, pois a remoção dos componentes da superfície da membrana se mostrou mais eficiente podendo ser controlada em larga escala.

Embora todos os métodos citados acima reduzam o *fouling* de alguma maneira, os métodos que visam à limpeza da membrana devem sempre ser utilizados, porque a diminuição do fluxo através da membrana pode ocorrer mesmo que as condições de operação escolhido sejam apropriadas. Isso se dá, pois a diminuição do fluxo é um fenômeno inerente ao processo, o que torna necessário uma limpeza periódica da membrana (MULDER, 1996).

A limpeza hidráulica, a limpeza mecânica e a limpeza química são os métodos de limpeza que podem ser utilizados. Dentre estes métodos, a limpeza química é o mais importante, envolvendo uma grande variedade de agentes químicos que podem ser usados separadamente ou em conjunto. Alguns exemplos são ácidos (como o H_3PO_4 e o ácido cítrico), bases (NaOH), detergentes (alcalinos, não iônicos), enzimas (proteases, amilases, glicanases), agentes complexantes (EDTA), desinfetantes (H_2O_2 , NaOCl) e vapor de água (MULDER, 1996).

Os agentes químicos utilizados na limpeza dos módulos devem ser compatíveis com o material da membrana e devem ser escolhidos de acordo com as substâncias causadoras do fenômeno. Os limites das condições normais de operação (pressão, temperatura e fluxo) não devem ser excedidos durante a operação de limpeza, a fim de evitar qualquer dano irreversível à membrana. A concentração do reagente e o tempo de limpeza são também bastante importantes em relação à resistência química da membrana (RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989; MULDER, 1996).

2.10 Aplicação dos PSM na Indústria Alimentícia

Os PSM são amplamente utilizados na indústria de alimentos em aplicações que envolvem desde tratamento de efluentes até concentração e purificação de substâncias presentes em solução.

GIRALDO-ZUÑIRA *et al.* (2004) relatam que MF pode ser utilizada industrialmente como uma alternativa para a pasteurização ou a esterilização (a frio) parcial de alimentos, pois retém microrganismos durante a operação. Como não necessita de calor para a operação, não ocorre alteração de estado físico da solução e as características sensoriais e nutricionais dos compostos processados são mantidas.

Segundo VAN REIS & ZYDNEY (2001), as membranas sempre foram uma parte integrante dos processos de biotecnologia. A filtração estéril dos meios de fermentação, a purificação de soluções tampão e a produção de produtos protéicos são praticadas na indústria utilizando membranas. A MF é extensivamente usada para clarificação de soluções. A UF

pode ser encontrada em muitos processos biotecnológicos. As membranas também têm o seu uso difundido para eliminar bactérias de alimentos líquidos.

AFONSO *et al.* (2004) avaliaram a viabilidade econômica e técnica da utilização de membranas de UF e NF para a recuperação da proteína presente no efluente da produção de pescados. Os autores puderam observar que a retenção de proteína pela membrana de UF variou entre 49 e 62 %, dependendo das condições de operação; a membrana de NF reteve em torno de 66 % de proteína. Os autores concluíram, ainda, que a aplicação deste sistema em nível industrial é viável economicamente.

CHOVE *et al.* (2007) mostraram em seu estudo algumas propriedades funcionais de frações de isolado de proteína de soja obtido por MF. Cinco frações de isolados de proteína de soja (SPI) foram produzidas usando duas membranas de MF com tamanhos de poro diferentes. A MF não é usada extensivamente para separar o SPI em frações distintas, mas isto pode ser usado para enriquecer espécies de proteínas de altas e baixas massas molares, que possuem propriedades, como solubilidade, emulsificação e capacidade de formar espuma, diferentes. Membranas podem ser utilizadas como um método competitivo à precipitação seletiva das espécies de proteína por mudanças de pH, resultando em uma fração de determinada espécie de proteína mais pura e conseqüentemente características funcionais realçadas.

REIMANN (2005) cita um processo resultante de sucessivos passos para obtenção do ácido láctico purificado após um processo fermentativo. Foram utilizados no estudo os processos de UF, eluição em resina de troca iônica, eletrodialise com membrana monopolar e com membrana bipolar e evaporação, e o grau de purificação do ácido láctico aumentou quando os PSM foram empregados.

Na indústria de alimentos, segundo CALLE *et al.* (2002), a ED é largamente empregada por possibilitar a separação de eletrólitos em processos como a desmineralização de vinhos, a neutralização ácida de sucos de frutas. Modificada a ED também é utilizada para separar misturas de aminoácidos e proteínas. Normalmente, os aminoácidos são obtidos por hidrólise protéica e síntese microbiológica e química, onde são contaminados por componentes minerais. De acordo com BOBRESHOVA *et al.* (2002), uma alternativa de desmineralização e fracionamento de aminoácidos é o processo de ED. ELISSEEVA *et al.* (2002), utilizaram a ED para separar aminoácidos, produzidos por processo biotecnológico, de sais minerais e açúcar.

Freqüentemente membranas poliméricas de UF são usadas, mas as membranas cerâmicas estão ganhando mais atenção, por causa da melhor resistência frente à limpeza e desinfecção. ALICIEO *et al.* (2002) estudaram a aplicação de membranas de UF na produção de óleo de soja. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do gradiente de pressão no fluxo permeado através de dois tipos de membranas de UF: uma membrana tubular cerâmica e uma membrana fibra-oca polimérica. Os autores perceberam que o fluxo através da membrana tubular aumentou com o aumento da pressão, mas não variou com a temperatura; na membrana fibra-oca, por sua vez, o fluxo aumentou com o aumento de ambos os parâmetros.

BABU & GAIKAR (2001) estudaram as características de membranas de UF determinantes de *fouling*. Através de experimentos de ultrafiltração de soluções de albumina de soro bovino utilizando membranas de triacetato de celulose (CTA) e celulose regenerada (RC), foi demonstrado que as membranas de CTA eram mais vulneráveis ao *fouling* que as membranas hidrofílicas de RC. O declínio do fluxo para ambas as membranas, mais significativo no início, foi atribuído a uma polarização por concentração próxima à superfície da membrana e adsorção de proteína. O *fouling* das membranas foi caracterizado pela resistência à permeação de água pura. A resistência dos depósitos de proteína associada com as membranas CTA foi mais alta quando comparada com a resistência da proteína adsorvida nas membranas RC. Outras conclusões dos autores foram que a presença de eletrólitos na solução de alimentação (como sais, por exemplo) aumenta o *fouling* e ocasiona uma conseqüente redução no fluxo permeado, enquanto o aumento da temperatura reduz a formação deste fenômeno. Cargas elétricas introduzidas na superfície da membrana podem reduzir a afinidade das proteínas pela superfície da membrana e, desta forma, diminuir o *fouling*.

DOYEN *et al.* (1996) fizeram um estudo comparativo no tratamento do leite com membranas de polímero (PSF/PVP), cerâmico (ZrO_2) e orgânico-mineral (ZrO_2/PSf). Os valores de massa molar de corte estavam entre 25 e 50 kDa. Embora a permeabilidade das membranas fosse diferente, os fluxos eram comparáveis, porque os experimentos foram realizados com pressões independentes do regime de fluxo. Em uma velocidade tangencial de 6 m.s^{-1} , foram alcançados fluxos de $5,6 \times 10^{-5}$ e $6,8 \times 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$, dependendo do fator de concentração. Os autores concluíram que o *fouling* é o fator limitante na concentração de proteína do leite e não a permeabilidade da membrana.

BACCHIN *et al.* (2006) fazem uma revisão sobre o fluxo crítico. Entre as suas conclusões os autores relatam que a estabilidade da solução (envolvendo pH e força iônica), assim como a concentração e a massa molar das partículas em solução são fatores relevantes para determinar o fluxo crítico. Normalmente, um aumento de pH acima do ponto isoelétrico de soluções protéicas, aumenta o fluxo crítico. Por exemplo, nas soluções de concentrados protéicos do soro e suspensões de caseinatos de sódio há um aumento do fluxo crítico com o aumento de pH.

CHAN *et al.* (2002) estudaram a determinação de um fluxo limite aparente, a partir do qual a formação de *fouling* em membranas de UF, utilizadas na separação de diferentes misturas protéicas (binárias), era relevante ao processo. O fluxo limite aparente foi determinado através da observação da linearidade da curva entre a variação de pressão e o fluxo aplicado, onde o último valor que mantinha a linearidade foi tomado como o fluxo limite aparente. Os autores perceberam, durante os experimentos, que a retenção das proteínas de maior tamanho era determinante para o fluxo limite aparente, devido à formação de uma camada dinâmica pelas partículas retidas, que causava o aumento da pressão transmembrana (ΔP).

CHOI *et al.* (2005) executaram experimentos bem controlados de filtração para estudar os efeitos do fluxo permeado e do escoamento tangencial no *fouling* de membranas no

tratamento de efluentes. Os resultados foram analisados pelo modelo de resistências-em-série onde a razão para o declínio do fluxo foi subdividida em adsorção, polarização por concentração, *fouling* reversível e irreversível. As experiências de filtração demonstraram que o fluxo permeado decaí mais rapidamente com o aumento da concentração de alimentação e tamanho de poro de membrana, e com fluxo tangencial decrescente. Os resultados de limpeza da membrana revelaram que o declínio do fluxo permeado era predominantemente causado pelo *fouling* reversível. A autópsia das membranas sugeriu que um *fouling* irreversível havia sido formado, inicialmente pelo bloqueio de poros por pequenas partículas e mais tarde pela compactação de uma camada de incrustantes, onde a velocidade do escoamento não foi suficiente para arrastá-la, provocando, desta forma, o acúmulo de material e a diminuição do fluxo permeado.

ZYDNEY & PUJAR (1998) tratam em seu trabalho do transporte de proteínas por membranas porosas e os efeitos de interações coloidais. Eles afirmam que análises tradicionais do transporte de solutos através da membrana geralmente consideram somente as interações estéricas (baseadas no tamanho) entre o soluto e os poros, porém eles demonstram a importância de considerar interações coloidais na taxa de transporte dos solutos. Estas interações podem afetar o desempenho da membrana drasticamente, mudando as características de retenção da membrana de completamente permeável para completamente retentiva, para um determinado soluto. Para uma mistura de proteínas, os sistemas de membrana devem ser operados sobre certas condições já que a magnitude das forças coloidais é diferente para proteínas diferentes. Isto é alcançado facilmente para interações elétricas operando no ponto isoelétrico (ou próximo deste) de uma das proteínas, isto pode ser usado, por exemplo, na separação de BSA e IgG em soluções a pH 4,7, próximo ao pI do BSA. Também é possível, explorar as diferenças das interações por forças de *van der Waals* em sistemas de membranas devido ao diferente caráter de hidrofiliicidade/hidrofobicidade das proteínas, por exemplo, é possível aproveitar as interações entre grupos hidrofóbicos das proteínas com grupos correspondentes nas membranas.

YUNOS & FIELD (2006) estudaram o efeito de membranas “empilhadas” para o fracionamento de proteínas. O fracionamento da proteína que usa a UF é praticável após a extensiva otimização do processo, contudo a baixa seletividade das membranas é ainda um dos fatores críticos que limitam a aplicação de sistemas da membrana ao fracionamento da proteína. O uso de membranas “empilhadas” visa melhorar a seletividade da separação conseguindo um produto puro da proteína no permeado de uma mistura binária de proteínas. Duas membranas planas são prensadas em várias combinações e configurações sem espaçador entre elas. Foram utilizadas membranas de similares ou diferentes combinações de MMC (30, 50 e 100 kDa) em vários arranjos e proteínas com massa molar entre 10 e 70 kDa como proteínas modelo em soluções simples ou misturas binárias. As transmissões observadas de Lisozima (14 kDa) com membranas “empilhadas” de 30/30, 50/50, e 100/100 kDa são 78, 85 e 97 %, respectivamente; e estes valores são comparáveis à transmissão para o processo com a única membrana, sendo ligeiramente mais baixos. Os resultados do estudo podem ser úteis para compreender as propriedades do transporte das membranas “empilhadas” e em prever o efeito da massa molar da proteína e do tamanho do poro sobre transmissão e retenção da proteína.

KAPPLER & POSTEN (2007) estudaram o fracionamento de proteínas baseado no tamanho e na carga destas moléculas. Para tanto, fizeram uso de uma célula de eletro-ultrafiltração, onde é alimentada a solução contendo proteínas e um campo elétrico é aplicado visando separá-las através da carga elétrica. De certa forma é um método semelhante à eletrodialise, já que se pretende transportar as proteínas baseado na sua carga, mas ao invés de se utilizar membranas de troca iônica utilizam-se membranas com MMC adequada. Esta técnica pode ser usada para obter produtos com alto teor de pureza e tempos de separação curtos, devendo ser mais estudada para estender sua utilização para misturas multi-componentes e biomoléculas.

2.10.1 Aplicação dos PSM na Indústria de Laticínios

As diversas técnicas de separação por membranas existentes hoje em dia permitem extrair do leite e/ou do soro certos componentes com atividades biológicas, funcionais e nutricionais de interesse. Neste sub-capítulo foi realizada uma revisão bibliográfica a respeito dos PSMs que vêm sendo aplicados na indústria de laticínios.

LEITE *et al.* (2006) relatam que os PSMs estão sendo utilizados desde a década de 70 na indústria de laticínios, destacando-se a MF e a UF, mas, existe aplicação em potencial para todos os tipos de processos com membranas. De acordo com SMITH (2003), hoje, a separação por membranas é uma tecnologia estabelecida. Estima-se que a área superficial de membranas instalada mundialmente na indústria de laticínios atinja 500.000 m²; cerca de 70 % desta área é usada para o tratamento de soro lácteo.

BRANS *et al.* (2004) fizeram um estudo sobre o fracionamento do leite utilizando membranas, e concluíram que esta tecnologia é uma escolha adequada para o fracionamento do leite, pois muitos dos seus componentes podem ser separados por diferenças de tamanho. A UF, por exemplo, é uma tecnologia que pode ser aplicada na indústria de laticínios para o processamento do leite integral, semi-desnatado ou desnatado, sendo inclusive utilizada, segundo ERDEM *et al.* (2006), CHEANG E ZYDNEY (2004), GUADIX *et al.* (2004) e AKOUM *et al.* (2004), na separação de lactose do leite, na padronização do valor nutricional de diferentes tipos de leite, na concentração do leite para a fabricação de queijos, na recuperação de proteínas e na pré-concentração do leite para a produção de iogurte.

De acordo com GIRALDO-ZUÑIRA *et al.* (2004), YADA (2004) e BRANS *et al.* (2004), a MF pode ser empregada na indústria de laticínios adequando-se ao fracionamento de proteínas do soro e à separação de microorganismos e glóbulos de gordura do leite e do soro. A MF reduz a quantidade de bactérias e esporos sem afetar o sabor do leite e promove a durabilidade do produto tanto quanto a pasteurização do leite, além de promover a separação dos glóbulos de gordura de leite que possuem diâmetro entre 0,1 µm a 15 µm. Segundo estes autores, a MF em comparação com os métodos convencionais, tal como a centrifugação, para a remoção de glóbulos de gordura, é mais eficiente, pois não ocorre a quebra de moléculas que fornecem o sabor aos alimentos. GIRALDO-ZUÑIRA *et al.* (2004) ainda relatam que no processo de concentração por UF é conveniente remover previamente os glóbulos de gordura por MF para evitar a obstrução dos poros das membranas de UF, e desta forma aumentar a

eficiência do processo. Segundo YADA (2004), a MF também pode ser utilizada para reter as micelas de caseína, para isto membranas cerâmicas podem ser utilizadas obtendo-se a caseína concentrada e pura. No entanto, para se obter um concentrado com as proteínas totais do leite membranas de UF são mais adequadas, porque retêm, além das caseínas, as proteínas solúveis.

CHOLLANGI & HOSSAIN (2006) examinaram o fracionamento do efluente da indústria leiteira rico em lactose e proteína usando membranas de UF. Três membranas de MMC de 3, 5 e 10 kDa foram testadas para determinar a eficiência do processo. A recuperação da lactose no permeado de aproximadamente 70-80 % pode ser conseguida usando a membrana de 3 kDa, 85 a 90 % com a membrana de 5 kDa e aproximadamente 100 % usando uma membrana de 10 kDa. Segundo BUTYLINA *et al.* (2006), a UF e a NF são aplicadas no processamento de leite a fim de aumentar a quantidade de proteína no concentrado de proteína do leite.

De acordo com BALANNEC *et al.* (2005), AKOUNM *et al.* (2004) e KHIDER *et al.* (2004), a NF vem sendo usada no tratamento de águas residuais na indústria de laticínios. REKTOR E VATAI (2004) e ATRA *et al.* (2005) expõem que a NF pode ser usada para concentrar o permeado da UF do leite ou do soro. ATRA *et al.* (2005) obtiveram na NF alta concentração de lactose no concentrado com uma recuperação de 90 % e o permeado propício para a reutilização na linha de produção. KHIDER *et al.* (2004) estudaram a aplicação de membranas de UF e NF para o tratamento do efluente proveniente da indústria leiteira. Nos experimentos de UF, os autores puderam observar que quanto maior a diferença de pressão utilizada, maior a retenção de proteína e lactose (sendo a retenção de proteína maior que a de lactose, para qualquer ΔP); a retenção máxima obtida ficou em torno de 80 %.

MINHALMA *et al.* (2007) utilizaram a NF para a recuperar os nutrientes orgânicos do soro do queijo Serpa. Segundo os autores, a NF tem uma vantagem quanto aos outros processos, já que proporciona simultaneamente a concentração e desmineralização do soro, levando a uma redução nos custos finais e à redução do desperdício de água. O experimento de concentração mostrou que o processo permitiu uma recuperação de 80 % de água, e concentração de nutrientes em cinco vezes em relação ao valor inicial.

Processos como eletrodialise e osmose inversa também encontram aplicações na indústria leiteira. Segundo STRATHMANN (2001), na indústria de laticínios, a ED pode ser largamente empregada por possibilitar a separação de eletrólitos em processos como a desmineralização do soro do leite. GREITER *et al.* (2004) compararam o desempenho de uma unidade de ED com uma de troca iônica na desmineralização do soro e relataram o melhor desempenho da primeira técnica em relação à separação de íons e o menor consumo de energia na operação. Uma etapa de pré-concentração do soro, anterior a desmineralização, eleva o conteúdo de sólidos para 20 % a 30 %, como consequência aumenta a capacidade de utilização da unidade e reduz o consumo de energia. Conforme YADA (2004) e GRANDISON & LEWIS (1996), uma importante aplicação da ED na indústria de laticínios é o fracionamento de proteínas baseado no seu ponto isoelétrico.

A OI, de acordo com BRANS *et al.* (2004), é usada na remoção de água do soro. GIRALDO-ZUÑIGA *et al.* (2004) indicam que a OI pode ser usada na pré-concentração ou concentração do leite e do soro, da lactose e de proteínas do soro, e, também pode ser utilizada no tratamento de efluentes da indústria de laticínios. BALANNEC *et al.* (2005) estudaram a aplicação de membranas de NF e OI (em um único estágio) no tratamento do efluente proveniente da indústria leiteira. Em todos os experimentos, o fluxo diminuiu severamente logo no início da filtração, mas uma lavagem com água a 25 °C mostrou-se eficiente para o restabelecimento do mesmo na maioria dos casos. As membranas de OI se mostraram mais eficientes na redução da carga orgânica. A retenção de lactose ficou entre 98,2 e 99,9 %.

Parâmetros como temperatura, pressão transmembrana, fluxo e pH vem recebendo atenção dos pesquisadores. CHOLLANGI & HOSSAIN (2006) testaram a influência da ΔP na retenção, em soluções contendo proteína e lactose. Constataram que para uma membrana de UF de 10 kDa a retenção da proteína é baixa (aproximadamente 60%) em ΔP menores que 2 bar, isto pode ser melhorado para aproximadamente 95 % em ΔP de 2,5 a 3 bar. Ainda concluem que a membrana de UF de 10 kDa é eficiente para produzir duas frações: o permeado com teor elevado de lactose (aproximadamente 100 %) e o retido com elevado teor de proteína (aproximadamente 95 %).

CHEISON *et al.* (2007) realizaram a hidrólise com enzima protease, do isolado protéico do soro de leite, através de escoamento tangencial utilizando um reator de membranas. Os resultados mostraram que o fluxo permeado no reator aumentou com o aumento da temperatura do retido e com a concentração da enzima.

SIMMONS *et al.* (2007) estudaram o efeito da temperatura na agregação das proteínas do soro e suas implicações no *fouling* do leite. No leite a composição e a produção da camada de *fouling* são controladas pelas reações que formam os agregados das proteínas do soro. Em temperaturas inferiores a 75 °C os agregados formados são pequenos e possuem ligações fracas, enquanto os agregados formados em temperaturas mais elevadas são densos e mais rígidos. Isto foi atribuído a ligações fracas, por forças de *van der Waals*, entre as partículas em baixas temperaturas e ligações covalentes fortes, por pontes dissulfito, em temperaturas mais elevadas. O crescimento dos agregados ocorre em dois estágios, primeiro ocorre a formação de pequenas partículas devido à desnaturação da proteína nativa, depois ocorre a aglomeração e a agregação destas partículas devido a colisões que ocorrem durante o escoamento e que acabam formando partículas maiores. A adição de minerais em uma solução de concentrado protéico 35 % resultou na formação de agregados menores e depósitos maiores, isto é explicado pelos autores por ligações de cálcio com a β -Lg.

LEITE *et al.* (2006) afirmam que o sistema de filtração tangencial é largamente utilizado em processamento do leite e soro de queijo, porque facilita o arraste dos solutos, evitando que estes se acumulem sobre a superfície da membrana.

RAO (2002) constatou que os fluxos permeados dos soros doce e ácido foram fortemente influenciados pelo pH. O autor descreveu que, para o soro doce, o fluxo aumenta

inicialmente com o aumento do pH, mas também aumenta o *fouling* posterior, provocando uma redução posterior do fluxo. A diminuição do pH implica em uma redução do fluxo inicial, mas também diminui o *fouling* posterior. O aumento no fluxo inicial em altos valores de pH, para o soro, pode ser explicado por mudanças no estado das proteínas do soro.

MOUROUZIS & KARABELAS (2006) estudaram o declínio do fluxo permeado de soluções de proteínas isoladas do soro em membranas cerâmicas de MF com configuração de escoamento transversal (*dead end*). Os testes envolveram cinco ciclos sucessivos de filtração, sob pressão de filtração fixa com retro lavagem intermediária. A análise do declínio do fluxo e a resistência da membrana à permeação foram utilizados para determinar mecanismos de *fouling*. Há evidências de que *fouling* irreversível se desenvolve efetivamente durante o primeiro ciclo de testes e aparentemente não aumenta significativamente no decorrer do experimento, no entanto, o *fouling* reversível ocorre através de toda a série de filtração, sendo mais intenso durante os primeiros minutos de cada ciclo. Os autores concluem que os agregados de proteínas do soro presentes na solução de alimentação são responsáveis, quase exclusivamente, pelo *fouling* observado na membrana. E, ainda, sugerem que ao se trabalhar com membranas de poros grandes, como no caso da MF o processo deve ser operado em baixas pressões.

BRANS (2006) enfatiza em seu trabalho que na produção de CP ou de IP utilizando PSM, o controle do *fouling* é crucial, porque todas as proteínas são retidas, e a formação da “torta” e de uma camada gel ocorrem facilmente. Para isolar as proteínas do soro, a seletividade é muito importante, porque a pureza determina o valor comercial dos produtos, especialmente para aplicações farmacêuticas. O valor mais elevado permite o uso de módulos mais caros, tipos de membrana e métodos de controle de *fouling*, para obter um máximo de seletividade no processo do fracionamento.

VAN REIS *et al.* (1999) demonstraram que uma seletividade ótima pode ser obtida na região do fluxo dependente da pressão. A seletividade também pode aumentar escolhendo o projeto apropriado do módulo e as condições de processo adequadas. Fatores tais como pH e força iônica também têm um impacto significativo em sistemas de concentração e separação de proteínas por membranas.

URIBE *et al.* (2007) realizaram um trabalho para prever a retenção da lactose através de dois modelos: *Donnan Steric Partitioning Model* (DSPM) e *Kedem-Spiegler Model* (KSM). A retenção e o fluxo permeado foram medidos utilizando soluções de alimentação de lactose pura e de soro ultrafiltrado; os experimentos foram realizados em pH constante e com membranas de NF. Os dois modelos foram capazes de prever razoavelmente bem, tanto para o padrão quanto para o soro ultrafiltrado, as tendências de retenção da lactose em função do fluxo permeado, porém que os melhores resultados foram previstos pelo modelo KSM. Vale ressaltar que no modelo KSM a retenção de lactose pode ser predita na presença ou na ausência de íons, mas não é fornecida qualquer informação sobre a estrutura da membrana. Já o modelo DSPM fornece informações sobre a carga, a espessura, a porosidade e tamanho dos poros das membranas. Este estudo contribui para um melhor entendimento do mecanismo de transporte em processos de nanofiltração; por exemplo, no caso do estudo realizado os autores

concluíram que na presença de sais o valor de raio médio dos poros aumentou e que para todas as membranas testadas a retenção de lactose foi menor no caso do soro ultrafiltrado, o que mostra o efeito da presença de sais no desempenho da membrana.

Diversas configurações de membranas podem ser utilizadas no processamento de leite e de soro. CHEANG & ZYDNEY (2004) apresentaram uma proposta para obtenção de proteína isolada de soro em uma unidade de produção com dois estágios de UF com recirculação total do concentrado. GUADIX *et al.* (2004) projetaram a instalação de uma unidade de UF de soro de queijo em processo contínuo. AKOUM *et al.* (2004) aplicaram sistemas de membranas vibratórias de UF e OI no tratamento de águas de processos da indústria de laticínios. BHATTACHARJEE *et al.* (2006) também utilizaram sistemas de membranas vibratórias e um aumento de 33 % do fluxo foi observado em 1 minuto com o disco da membrana girando a 300 rpm comparados ao valor correspondente da membrana estacionária. Os autores atribuíram este resultado à redução da polarização por concentração, um dos principais fatores limitantes dos PSM.

A tecnologia de membranas é uma aliada da indústria de laticínios porque os componentes fracionados do leite permitem uma qualidade mais constante de produtos de consumidor (por exemplo, queijo) e do desenvolvimento de produtos novos, tais como revestimentos comestíveis e peptídios bioativos. Conseqüentemente, o fracionamento do leite conduz a um mais eficiente e diversificado uso do leite. As técnicas de separação com membranas são uma parte essencial da maioria das novas técnicas desenvolvidas para a produção de produtos lácteos funcionais como os peptídeos bioativos.

BUTYLINA *et al.* (2006) afirmam que a NF, devido à MMC apropriada, é útil para separação de peptídeos do leite com massas molares entre 1 a 2 kDa que possuem atividade biológica (são apropriados para uso em alimentos infantis devido à ausência de alergenicidade). As membranas negativamente carregadas foram aplicadas para enriquecer peptídeos catiônicos com propriedades antibacterianas no soro de queijo. Os autores concluíram que a melhor maneira de fazê-lo era pela filtração através da membrana de UF com uma massa molar de corte razoavelmente baixa (2,5 kDa) e, então, usar a NF para a purificação. No processo de UF ficaram retidas moléculas maiores que os peptídeos de até 2 kDa e usando a NF os peptídeos foram separados da lactose.

A NF, de acordo com MARTINEZ-FEREZ *et al.* (2006), pode ser usada na produção de derivados de lactose como os oligossacarídeos do leite de cabra através da filtração tangencial usando dois estágios com membranas cerâmicas de UF e NF obtendo um concentrado de mais de 80 % em oligossacarídeos que são usados em formulações de produtos para crianças a fim de combater doenças. RICHARDS (2002) relata que é possível fabricar iogurte com baixo teor de lactose através dos PSM como UF e NF, e assim atender consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose.

Os PSMs também podem ser utilizados na produção de queijos. Segundo CASTRO E GERLA (2005) e ATRA *et al.* (2005) as principais vantagens atribuídas à utilização da UF para produção de queijos, em relação ao processo tradicional, consistem em um aumento de

rendimento, possibilidade de fabricação contínua e automatizada de queijos, economia de mão de obra e ingredientes, e a produção do soro com menor poder poluente. A UF é usada na recuperação e no fracionamento das proteínas do soro e na produção de queijos de leite ultrafiltrado, como Minas Frescal, *Cottage*, *Feta* e *cream cheese*. Segundo LEITE *et al.* (2006), o Brasil, apesar de ser um país relativamente novo, na implementação de PSM, já possui plantas de membranas de UF, inclusive no processamento de queijos. O queijo Minas Frescal, por exemplo, é produzido com auxílio da técnica de UF e vem sendo comercializado no Brasil desde 1988, podendo ser encontrado na forma tradicional e também com baixo teor de gordura. VEIGA E VIOTTO (2001) estudaram a fabricação de queijo *Petit Suisse* por UF de leite coagulado; também mencionam a produção do queijo *Quark* por UF, que resulta em economia de energia, maior rendimento e maior valor nutritivo.

Existem diversos métodos que podem ser usados para o aproveitamento do soro. Muitos destes métodos são baseados na tecnologia de separação com membranas, para produzir novos produtos que respondam melhor às expectativas atuais dos consumidores. De acordo com LEITE *et al.* (2006) e SMITH (2003) a UF pode ser usada para se obter concentrados de proteínas a partir do soro de queijo, que posteriormente serão adicionados a iogurtes, queijos, carnes processadas, alimentos infantis e bebidas. A MF serve para controlar o conteúdo de gordura do soro de queijo antes da UF, e remover microrganismos do leite e do soro de queijo sem necessidade da alta temperatura de pasteurização.

REKTOR E VATAI (2004) aplicaram métodos de filtração por membranas para tratar o soro de queijo Mussarela e encontrar uma aplicação potencial. Os autores utilizaram a MF para remover gorduras e bactérias, a NF foi usada para a concentração do soro microfiltrado, a UF foi usada para a concentração de proteínas e associada a DF obtiveram proteína purificada e concentrada e, finalmente, a OI foi usada para reduzir o teor de água do soro.

Segundo SMITH (2003), o soro em pó produzido por evaporação não possui composição balanceada, visto que alguns componentes são degradados devido à exposição ao calor, enquanto outros se apresentam em grandes concentrações (lactose e sais). A introdução da tecnologia de separação por membranas, especialmente a UF e em alguns casos a NF, tem resultado na produção de soro em pó com alto valor funcional e nutricional. De acordo com GIRALDO-ZUÑIRA *et al.* (2004) a UF não promove a desnaturação das proteínas do soro mantendo as propriedades funcionais dos CPs inalteradas. A concentração e desmineralização simultâneas do soro pela NF desenvolvem produtos que podem ser utilizados em várias indústrias de alimentos, porém, neste caso, a lactose também é retida. Por este motivo, desde 1981, a UF se tornou a técnica mais utilizada para recuperar as proteínas solúveis do soro. A vantagem de se aplicar a UF é reforçada pela sua relativa simplicidade, baixo consumo energético e, segundo ATRA *et al.* (2005) pela elevada eficácia na separação de proteínas do soro.

ANTUNES (2003) conclui em seu trabalho que para o processo de obtenção de CP com 80 % de proteína é necessário o emprego da DF para promover uma remoção mais eficiente de lactose e sais minerais. A DF além de proporcionar a produção de um concentrado protéico mais puro, permite também melhor controle da composição final do CP. CHEANG E ZYDNEY

(2004) obtiveram uma recuperação acima de 90 % para as proteínas α -La e β -Lg quando a DF foi utilizada; XU *et al.* (2000) usaram duas etapas de DF no concentrado do soro de queijo da UF para concentrar as proteínas como as Igs e glicomacropéptidos, esses dois compostos passaram pelo processo de secagem por *spray drier* e no permeado restaram proteínas como α -La, β -Lg e BSA.

YEE *et al.* (2007) investigaram o uso de uma planta de UF multi-estágios, com produção contínua, para obter uma concentração de proteínas por volta de 80 %. Parte do retido de cada estágio foi reciclada para manter a corrente de entrada desejada naquele módulo de membrana. Os permeados de todas as correntes foram combinados e parte foi reciclada e misturada com a corrente nova de alimentação. A proporção de permeado reciclado foi usada para controlar a vazão do retido e a sua composição ao nível desejado. A adição de água capacita que espécies não protéicas, que não são desejadas no retido, permeiem pela membrana, aumentando a concentração de proteína nos sólidos totais do retido. No entanto, quanto mais espécies não protéicas permeiam pela membrana, a quantidade de sólidos totais presente no retido diminui.

MORTENSON *et al.* (2008) realizaram testes cromatográficos e sensoriais para determinar se o tipo de queijo e as diferentes técnicas de processamento influenciam no *flavor* de produtos derivados de soro como CPs e IPs. Segundo os autores o *flavor* de concentrados e isolados protéicos tem sido considerado o principal fator limitante do uso destes produtos na indústria alimentícia. Após a fabricação do queijo, o soro foi drenado, separado, pasteurizado e fracionado por UF. A UF foi utilizada para reduzir a massa do produto e para remover lactose e sais a fim de que a massa de proteínas representasse pelo menos 35 % da massa seca do CP. Os autores encontraram que o *flavor* não foi afetado pelas diferentes técnicas de processamento do CP e IP, porém, no teste sensorial as amostras de CPs foram classificadas como mais doces do que as de IP, provavelmente devido a uma maior concentração de lactose, por este motivo o IP foi classificado com menos *flavor* que o CP. Os testes cromatográficos indicaram que o CP tem um número maior de substâncias aromáticas, em particular moléculas de baixa massa molar, o que pode limitar a sua utilização em produtos alimentícios, por isso uma maior purificação protéica amplia as possibilidades de utilização deste produto.

Além de concentrar as proteínas do leite é interessante separá-las a fim de realçar as suas propriedades funcionais. Os métodos relatados para isolar as proteínas são baseados na agregação térmica da α -La, a cromatografia de troca iônica, a precipitação e a UF ou uma combinação destes métodos. Usando a precipitação e a UF, GESAN-GUIZIOU *et al.* (1999) *apud* BRANS *et al.* (2004), relatam uma purificação de 52-83 % para α -La e 85-94 % para a β -Lg.

BHATTACHARJEE *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de obter uma separação relativa da β -Lg do concentrado de proteína do leite pelo fracionamento da proteína usando a UF em dois estágios com membranas planas na forma de discos, com MMC de 30 e 10 kDa sob agitação, seguido por cromatografia de membrana de troca iônica (IEMC). Antes do fracionamento foram realizadas uma centrifugação, MF e UF, esta última operando no

modo de DF descontínua em quatro estágios, para obter o concentrado de proteína do leite livre de lactose. A centrifugação e a MF foram realizadas para remover os principais poluentes como matérias coloidais, partículas suspensas de caseína e lipídios. Na DF os autores usaram uma membrana de polietersulfona de 5 kDa, com objetivo de obter um concentrado rico em proteínas e remover a maioria da lactose e dos minerais. Os efeitos de vários parâmetros, como o pH da solução, a pressão transmembrana, a velocidade de agitação e a velocidade de rotação da membrana, no fluxo permeado e na retenção da UF foram estudados. Um fluxo 36 % mais elevado foi obtido com uma alimentação em pH 2,8 comparado àquele em pH de 5,6 com uma pressão transmembrana fixa de $5,0 \times 10^5$ Pa, este resultado é decorrência do efeito do pH no equilíbrio do monômero-dímero da β -Lg. Uma pureza de 87,6 % da β -Lg foi obtida no filtrado da cromatografia de membrana de troca iônica.

CHEANG & ZYDNEY (2004) fizeram um estudo para examinar o uso de um sistema de filtração em dois estágios com fluxo tangencial para a purificação de α -La e β -Lg da proteína isolada do soro. Para a separação foram usadas membranas de 100 e 30 kDa em série. Duas estratégias de purificação foram examinadas: na primeira estratégia, uma membrana de 100 kDa foi usada na primeira etapa para remover BSA enquanto α -La e β -Lg permeavam. O permeado desta primeira etapa foi então usado como alimentação para a etapa 2, onde a α -La e β -Lg eram separadas usando uma membrana de 30 kDa; na segunda estratégia a combinação de membranas foi invertida, a membrana de 30 kDa foi utilizada na etapa 1 para obter α -La pura no permeado da solução, enquanto ficavam retidas β -Lg e BSA; o retido coletado era, então, separado na etapa 2 usando a membrana de 100 kDa. Para alcançar elevada purificação e rendimento, as filtrações nas etapas 1 e 2 foram operadas no modo de DF para “lavar” a proteína mais permeável pela membrana. Como resultado foi obtido um rendimento de α -La de 95 % na Estratégia I e 85 % na Estratégia II, porém, na Estratégia II obtiveram um produto de α -La significativamente mais concentrado porque a α -La foi recuperada diretamente da primeira etapa usando uma única DF. Os rendimentos para β -Lg, o componente com massa molar intermediária, ficou em torno de 70 % em ambas as estratégias. O rendimento menor de β -Lg foi relacionado à presença de α -La residual da primeira etapa, juntamente com uma transmissão relativamente alta de BSA pela membrana.

ZYDNEY & VAN REIS (2001) utilizam o conceito de fluxo tangencial de alto desempenho (HPTFF), que é uma tecnologia emergente que possibilita a separação de proteínas com massas molares semelhantes. HPTFF promove a separação de proteínas com alta resolução, explorando interações estéricas (tamanho) e eletrostáticas (carga). Segundo os autores, seletividades de mais de 100 vezes podem ser alcançadas facilmente para modelos de sistemas binários com proteínas com cargas superficiais muito diferentes, quando características de pH e força iônica da solução são ajustadas e usando membranas carregadas para aumentar a retenção da proteína também carregada. O modo DF é empregado para separação das proteínas a fim de eliminar problemas de associação em altas concentrações no produto retido, gerando alta purificação e ao mesmo tempo bons fatores de rendimento.

Segundo EBERSOLD & ZYDNEY (2004), estudos experimentais recentes demonstram que sistemas de membrana podem ser usados para separar variantes de proteína que diferem em um único resíduo de aminoácido, embora a seletividade e o fator de purificação sejam

relativamente baixos. O objetivo do trabalho foi examinar teoricamente os efeitos da carga da membrana e a distribuição de tamanhos de poros na separação de variantes de proteína por HPTFF. Uma seletividade significativamente maior é obtida reduzindo o tamanho de poro e aumentando a densidade de carga da superfície da membrana. As interações eletrostáticas que surgem fazem diferença nas pequenas mudanças de carga que ocorrem entre uma proteína nativa e sua variante. Com a seleção das propriedades da membrana os autores conseguiram, teoricamente, uma purificação de 100 vezes e um rendimento de 90% para a separação de variantes que diferem em um único grupo de lisina.

ALVAREZ *et al.* (2006) utilizaram um concentrado protéico de soro comercial com 65 % de proteína como matéria-prima para obtenção de uma solução enriquecida com α -La. O processo proposto consiste das seguintes etapas: (1) precipitação, (2) centrifugação (I), (3) lavagem do precipitado, (4) centrifugação (II) e, finalmente, (5) solubilização do precipitado. Na etapa 1, α -La, Ig e BSA foram precipitadas simultaneamente acrescentando ácido láctico como sequestrante do íon Ca^{2+} em pH de 4,0. A precipitação de α -La neste caso é reversível, ou seja, quando o pH original foi restabelecido a proteína tornou-se solúvel novamente. A solução obtida nesta etapa continha basicamente α -La e β -Lg, com variações da temperatura de lavagem (etapa 3), foi removida boa parte da β -Lg. A solução obtida no final apresentou uma pureza de 74 % de α -La, além disso, mais de 99 % da β -Lg presente na solução de alimentação foi removida do processo.

BRANS *et al.* (2004) relatam que é possível empregar propriedades específicas da proteína para aumentar a seletividade do processo de UF. O ajuste do pH e adição de sal influenciam nas interações eletrostáticas e estéricas entre as proteínas e a membrana. VAN REIS *et al.* (1999) examinaram quantitativamente os efeitos de carga na membrana em combinação com o pH, em separações de proteína, usando HPTFF. Foram realizados experimentos de filtração com membranas de polietersulfona com MMC de 100 kDa carregadas positiva ou negativamente, utilizando uma mistura de BSA e um fragmento de anticorpo (Fab) derivado de DNA recombinante; estas duas proteínas têm massas molares semelhantes (69 kDa para BSA e 45 kDa para o Fab) mas diferem significativamente nas características elétricas (o PI do BSA é 4,8 enquanto que para o Fab é 8,5). Os autores conseguiram, através de uma membrana carregada negativamente, e uma solução com pH 8,4, purificação de BSA com rendimentos de 94 %..

A identificação de alternativas para um adequado aproveitamento do soro de leite é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional e funcional, do seu volume e de seu poder poluente. Ao mesmo tempo, o processamento do soro em produtos diversos contribui para a melhoria do meio ambiente e proporciona ganhos às indústrias. O Brasil é um país que apresenta um enorme potencial para o aproveitamento do soro lácteo. A expressiva produção brasileira de queijo gera grande quantidade dessa matéria-prima, porém a maioria do soro gerado ainda é indevidamente descartada. Tendo em vista a grande e recente quantidade de trabalhos realizados visando o aproveitamento do soro, alguns com resultados muito bons, verificam-se a importância e aplicabilidade nas mais diversas áreas da indústria de alimentos e farmacêutica dos concentrados e isolados protéicos obtidos a partir do soro de queijo. A tecnologia de membranas associada a outros processos de separação representa uma

estratégia promissora para aproveitar os componentes do soro, gerar produtos de elevada qualidade, e ainda, diminuir o problema ambiental das indústrias de laticínios.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os equipamentos, as membranas e os reagentes químicos utilizados na realização dos experimentos. Ainda, são descritos os métodos analíticos para análise das amostras e a metodologia experimental para a realização dos experimentos de concentração, purificação e fracionamento das proteínas.

3.1 Preparação do soro

O soro de queijo em pó utilizado neste trabalho foi doado pela Elegê Alimentos (Teutônia, RS), proveniente da fabricação do queijo Mussarela com um teor de sólidos totais de aproximadamente 6 %.

O soro de leite em pó é a fase líquida resultante da produção de queijo que é concentrado em evaporadores e posteriormente, seco em *spray drier* (torre de secagem) sendo envasado em embalagens de 25 kg.

O soro em pó foi utilizado por ser a forma mais estável e homogênea para o uso do soro de leite, pois contém todos os constituintes nas mesmas proporções relativas ao soro original; desta forma podemos garantir uma homogeneidade inicial em todos os experimentos, sem contar com variabilidades que ocorreriam se trabalhássemos com amostras *in natura* e, portanto heterogêneas de soro. Além disso, pode ser armazenado por um tempo maior (12 meses) sem danos para suas propriedades físicas ou nutricionais, minimizando, desta forma, o fator microbiológico, e reduzindo os custos de transporte e armazenamento.

O soro de queijo em pó se caracteriza por ser um pó fino e homogêneo de cor amarelada, sabor suave e odor próprio do produto. As características físico-químicas e nutricionais do soro são mostradas na Tabela 3.1 e na Tabela 3.2, respectivamente, segundo a especificação técnica do produto fornecida pela empresa.

Tabela 3.1: Características físico-químicas do soro em pó.

| Análises | Unidade | Mínimo | Máximo |
|------------------|---------------------|--------|--------|
| Umidade | % | - | 3 |
| Acidez | % | 0,02 | 0,1 |
| pH | - | 6 | 6,6 |
| Massa específica | g. cm ⁻³ | 0,5 | 0,61 |

% percentual mássico

Fonte: a tabela adaptada de Elegê Alimentos (2007)

Tabela 3.2: Características nutricionais do soro em 100 g.

| Composição | Unidade | Valores |
|------------------------|---------|---------|
| Carboidratos (lactose) | g | 77 |
| Proteínas | g | 12 |
| Gorduras Totais | g | < 1 |
| Colesterol | mg | < 5 |
| Fibra Alimentar | g | 0 |
| Cálcio | mg | 440 |
| Sódio | mg | 675 |
| Valor energético | kcal | 350 |

Fonte: Elegê Alimentos (2007)

De acordo com a Tabela 3.2 os carboidratos correspondem à quantidade total de lactose presente no soro.

Para a realização dos experimentos, o soro foi reconstituído dissolvendo manualmente o soro em pó em água destilada na temperatura de 50 °C.

Na etapa de concentração do soro o volume inicial a ser ultrafiltrado foi de aproximadamente 30 L (27 L de água no tanque + 2,6 L de água de volume morto + 1,86 kg de soro em pó). As concentrações médias iniciais e o percentual em base seca de lactose e de proteína foram iguais a 42 g.L⁻¹ (72,4 %) e 9 g.L⁻¹ (15,6 %), respectivamente, tomando a massa específica do soro reconstituído como 1,04 g.L⁻¹. As quantidades de gorduras para fins de cálculos foram consideradas desprezíveis por apresentarem valores muito baixos. Dessa forma, considerou-se que o soro é constituído somente por proteínas, lactose e sais. Portanto, a concentração de sais no soro reconstituído foi determinada pela diferença da concentração de sólidos totais pelo somatório de proteínas e lactose correspondendo a 7 g. L⁻¹ (12 %) de sais.

3.2 Reagentes Analíticos

Tabela 3.3 apresenta os reagentes utilizados para a realização das análises e da limpeza das membranas. Para o preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água destilada; exceto para as análises de eletroforese, onde foi utilizada água deionizada.

Tabela 3.3: Reagentes utilizados, fórmula, grau de pureza e fornecedor.

| Reagente | Fórmula molecular | Pureza | Fornecedor |
|--|---|----------------|----------------------|
| Análise de açúcar - Método do DNS | | | |
| Hidróxido de Sódio | NaOH | 95,0% - 100,5% | CAQ |
| Ácido 3,5 - dinitrosalicílico | C ₇ H ₄ N ₂ O ₇ | Mín. 99% | VETEC |
| Tartarato de sódio e potássio | KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O | 99% - 100% | VETEC |
| Análise de açúcar - Método de Dubois | | | |
| Fenol (80%) | C ₆ H ₅ OH | Mín. 99% | VETEC |
| Ácido Sulfúrico | H ₂ SO ₄ | 95,0% - 98% | Quimex |
| Análise de Sólidos Totais | | | |
| Ácido Nítrico | HNO ₃ | Mín. 65% | Dinâmica |
| Areia fina | - | comercial | - |
| Análise de proteína - Método de Lowry | | | |
| Sulfato de Cobre | CuSO ₄ .5H ₂ O | | |
| Citrato de sódio | C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O | 99% - 100,5% | Cromato |
| Carbonato de sódio | NaCO ₃ | 99,5% | Dinâmica |
| Hidróxido de Sódio | NaOH | 95,0% - 100,5% | CAQ |
| Folin - Ciocalteu | W + Mo + H ₃ PO ₄ | N.I* | Cromato |
| Análise de Proteína - Eletroforese | | | |
| Acrilamida | CH ₂ .CHCONH ₂ | ≥ 99% | Amersham Biosciences |
| Bisacrilamida | CH ₂ .(CHCONH) ₂ CH ₂ | ≥ 99% | Amersham Biosciences |
| Temed | - | ≥ 99% | Amersham Biosciences |
| Persulfato de Amônio | - | ≥ 99% | Amersham Biosciences |
| Glicina | H ₂ NCH ₂ CO ₂ H | ≥ 99% | USB Corporation |
| Tris (Tris[hydroxymethyl]amino methane) | NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ | 99,8% - 100,1% | USB Corporation |
| Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) | CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na | ≥ 99% | USB Corporation |
| Ácido acético | CH ₃ COOH | P.A | Merck |
| Metanol | CH ₃ OH | P.A. | Sigma |
| Comassie blue R250 | - | - | Sigma |
| β-mercaptoetanol | HS-CH ₂ -CH ₂ -OH | P.A. | Amersham Biosciences |

Tabela 3.3: Reagentes utilizados, fórmula, grau de pureza e fornecedor (cont.).

| Reagente | Fórmula molecular | Pureza | Fornecedor |
|-------------------------------|--|----------------|---------------------------------|
| <i>Cromatografia Gel</i> | | | |
| Fosfato de sódio monobásico | NaH ₂ PO ₄ | P.A. | Merck |
| Fosfato de sódio dibásico | Na ₂ HPO ₄ | P.A. | Merck |
| Acetato de sódio anidro | CH ₃ COONa | P.A. | Merck |
| Ácido acético | CH ₃ COOH | P.A. | Merck |
| Blue Dextran 2000 | - | - | Amershan Biosciences UK Limited |
| Coluna Superose™ 12 | - | - | General Electric |
| <i>Limpeza</i> | | | |
| Hidróxido de Sódio | NaOH | 95,0% - 100,5% | CAQ |
| Ácido Cítrico | C ₆ H ₈ O ₇ | 99,5% | VETEC |
| Hipoclorito de sódio | NaOCl | Comercial | ALZ |
| Kit p/ determinação de Cloro | - | Comercial | Lamotte Company |
| <i>Padrões moleculares</i> | | | |
| Lactose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O | P.A. | CAQ |
| β - lactoglobulina | β-Lg | 99 % | Sigma |
| α - lactoalbumina | α-La | 99 % | Sigma |
| Albumina do soro bovina (BSA) | BSA | Mín. 96% | Sigma |
| Ferritina | - | 99 % | General Electric |
| Aldolase | - | 99 % | General Electric |
| Conalbumina | - | 99 % | General Electric |
| Ovalbumina | - | 99 % | General Electric |
| Anidrase Carbônica | - | 99 % | General Electric |

3.3 Membranas

A Tabela 3.4 apresenta as membranas utilizadas durante os experimentos, juntamente com suas respectivas características. Cada uma delas recebeu uma sigla para facilitar a citação no decorrer do trabalho.

Tabela 3.4: Características das membranas utilizadas nos experimentos.

| Membrana | Tamanho de poro/ MMC | Material | Área (m ²) | Espaça-dor (mil) | Módulo | T _{máxima} (°C) | Faixa de pH | Fabricante |
|-----------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------|---------|--------------------------|-------------|-----------------------|
| UF - 6001 | 5.000 Da | Polieter-sulfona | 0,28 | 80 | Espiral | 55 | 1,8-11 | Koch membrane Systems |
| UF - 6002 | 5.000 Da | Polieter-sulfona | 0,22 | 43 | Espiral | 55 | 1,8-11 | Koch membrane Systems |
| UF - 7001 | 10.000 Da | Polieter-sulfona | 0,28 | 80 | Espiral | 55 | 1,8-11 | Koch membrane Systems |
| MF - 7002 | 0,1 µm | Polieter-sulfona | 0,22 | 80 | Espiral | 55 | 1,8-11 | Koch membrane Systems |
| RZ04 | 70.000 Da | NI | 0,0061 | - | Plana | 100 | 0,5-13 | Sepa membranes |
| HNO6 | 20.000 Da | NI | 0,0061 | - | Plana | 100 | 0,5-13 | Sepa membranes |
| VCWP | 0,1 µm | NI | 0,0061 | - | Plana | NI | NI | - |
| UF - C20 | 20.000 Da | ZrO ₂ – TiO ₂ | 0,0047 | - | Tubular | 120 | 1-14 | Andritz Separation |
| UF - C50 | 50.000 Da | ZrO ₂ – TiO ₂ | 0,0047 | - | Tubular | 120 | 1-14 | Andritz Separation |

*NI - não informada pelo fabricante.

A Figura 3.1 mostra as fotografias dos três módulos de membranas utilizados para realização dos experimentos.



Figura 3.1: Fotografias das membranas: espiral (A), tubular(B) e plana (C).

Para o processo de concentração e purificação (UF e DF) das proteínas do soro foram testadas três membranas: UF-7001, UF-6001 e UF-6002.

Para as tentativas de fracionamento foram utilizadas as membranas: MF-7002, RZ04, HN06, VCWP, UF-C20 e UF-C50.

3.4 Equipamento

O processo de UF foi realizado numa planta piloto WGM-KOCH PROTOSEP IV localizada no Laboratório de Tecnologia Química – LATEQ da UFRGS. A unidade piloto de UF/MF está esquematizada na Figura 3.2.

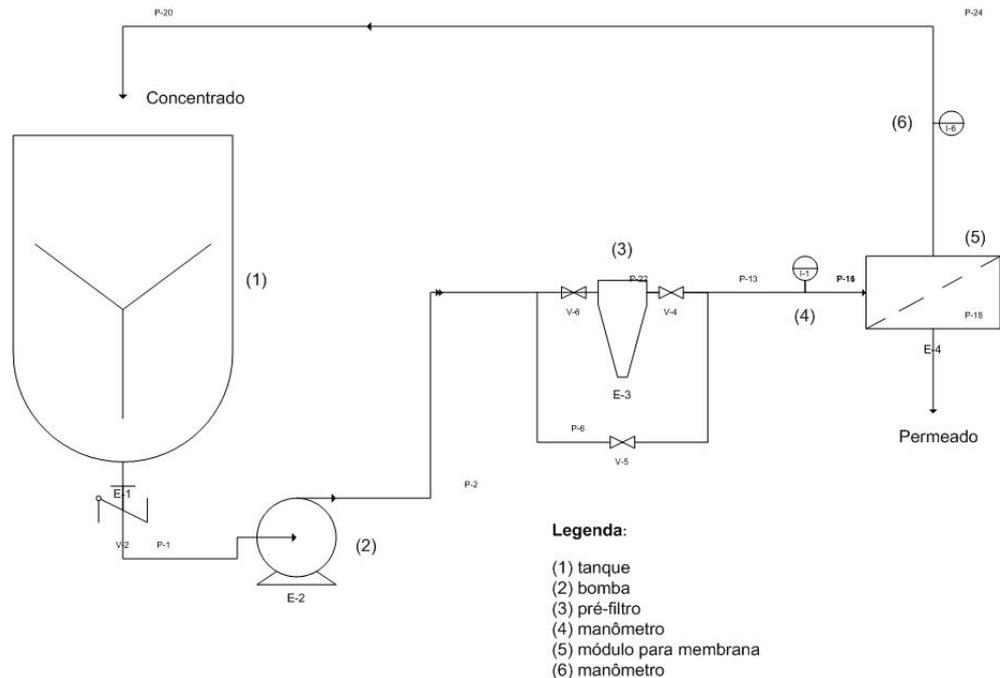


Figura 3.2: Representação esquemática simplificada da unidade piloto de UF.

A unidade piloto possui os seguintes equipamentos, de acordo com a Figura 3.2:

- tanque de alimentação (1) - dois tanques foram usados dependendo do volume de soro a ser tratado, a Figura 3.3 apresenta as fotografias dos tanques utilizados.
 - (A) tanque de alimentação encamisado de aço inoxidável 304, com volume de 75 L, fabricado pela SULINOX; possui um agitador e um sistema de controle de temperatura que opera na faixa de temperatura de 25 a 150°C;
 - (B) tanque de alimentação de aço inox com capacidade de 12 L; possui uma serpentina de aquecimento ligada a um banho termostático, marca Lauda, o qual possui controle analógico de temperatura;

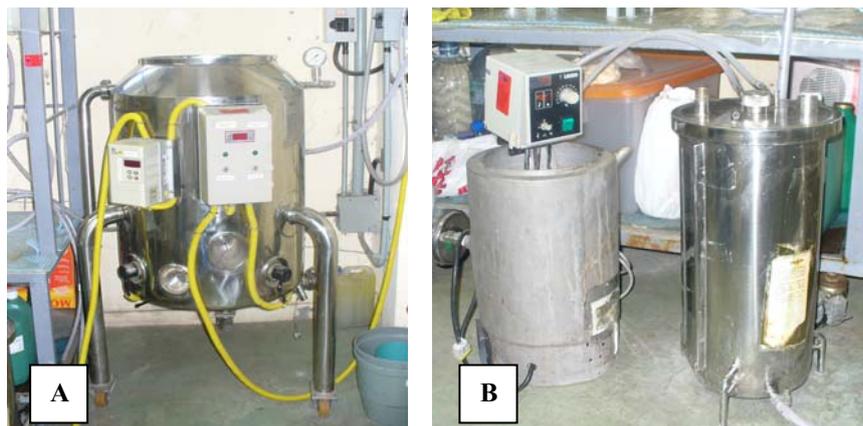


Figura 3.3: Fotografias dos tanques de alimentação (A) e (B).

- bomba pneumática (2) tipo diafragma, modelo VERSAMATIC VM.50, opera com ar comprimido que passa pelo sistema composto por um Kit FLR (filtro, lubrificador e regulador de ar);
- pré-filtro de cartucho (3), fabricado pela CUNO, constituído de uma carcaça de PVC e elemento filtrante de polipropileno com tamanho de poro nominal de $1\mu\text{m}$;
- manômetros (4) e (6) de aço inoxidável 316, que estão instalados num tê Sanitech com uma câmara com diafragma, que evita contato do manômetro com o fluido de processo. Os manômetros possuem escala de 0 a $10,5\text{ kgf. cm}^{-2}$;
- carcaça para módulo da membrana (5), três carcaças diferentes foram usadas, dependendo do tipo de membrana requerida para o processo. A Figura 3.4 apresenta as fotografias das carcaças utilizadas neste trabalho.
 - (A) carcaça para módulo espiral, com 30 cm de comprimento e 5,8 cm de diâmetro, feito em aço inoxidável 316;
 - (B) carcaça para módulo de membrana cerâmica cilíndrica com 25 cm de comprimento, 10 e 25 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, feito em aço inoxidável 340;
 - (C) carcaça para membrana plana, construída de aço inoxidável 316, permite a instalação de membranas com área útil de 61 cm^2 .

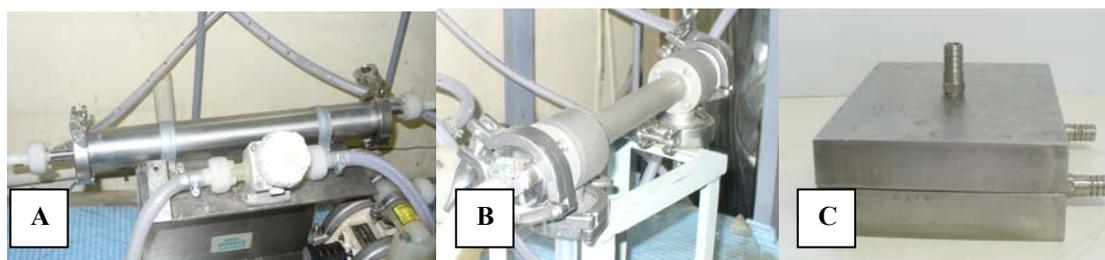


Figura 3.4: Fotografias das carcaças para módulos de membrana: (A) espiral, (B) tubular e (C) plana.

A utilização de uma bomba pneumática tipo diafragma VERSAMATIC tem como objetivo evitar o contato do fluido com as partes metálicas da bomba, reduzindo a possibilidade de contaminação do fluido.

O ar comprimido para o acionamento da bomba foi fornecido por um compressor SCHULZ com capacidade de 175 L e potência de 2 hp com vazão volumétrica de $0,00472 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. A pressão no equipamento foi ajustada, primeiramente, na válvula reguladora de ar da bomba pneumática e, após, através da válvula de contrapressão com diafragma que se localiza na saída do concentrado do módulo de UF.

As pressões nas extremidades do módulo de UF foram medidas pelos manômetros instalados na entrada (4) e na saída (6).

O pré-filtro (3), instalado antes do módulo de UF, tem o objetivo de reter as impurezas em suspensão da corrente de alimentação, evitando o entupimento do módulo e, conseqüentemente, aumentando a sua durabilidade.

3.5 Metodologia Experimental

Os ensaios são constituídos inicialmente por testes de compactação e medidas de fluxo permeado de água, com o objetivo de preparar e caracterizar as membranas para os ensaios de UF e MF para permeação do soro. Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata.

3.5.1 Compactação das Membranas e Medidas de Fluxo de Água

Os testes de compactação são executados através da imposição de uma pressão maior do que a de operação até que o fluxo permeado de água torne-se constante com o tempo. O objetivo é realizar o adensamento da microestrutura das membranas, para que durante os ensaios posteriores tal fenômeno não aconteça (ou ocorra de forma insignificante), o que poderia levar a conclusões errôneas sobre *fouling*, por exemplo.

Foram colocados no tanque de alimentação aproximadamente 10 litros de água destilada na temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A bomba foi acionada e regulou-se a válvula de contra pressão até alcançar a maior ΔP possível a fim de que o adensamento da microestrutura fosse garantido. A água ficou recirculando de 10 a 150 minutos (dependendo da membrana) para estabilizar o sistema, ou seja, para que o sistema entrasse em equilíbrio operacional. A compactação era encerrada quando o fluxo de água tornava-se constante.

Medidas de fluxo de água foram realizadas antes e após cada experimento com o objetivo de avaliar a permeabilidade hidráulica da membrana. Testes de permeação hidráulica têm como enfoque principal avaliar o comportamento das membranas em relação à água com respeito aos valores de fluxo de permeado, obtidos em diferentes pressões. Além disso, serve de referência para a avaliação do estado das membranas após a passagem do efluente pelas mesmas.

As medidas de fluxo de permeado foram realizadas através do método volumétrico direto. O método consiste em calcular os dados de fluxo a partir da medida do tempo que um fluido leva para preencher o volume fixo de uma proveta.

3.5.2 Concentração e Purificação das Proteínas do Soro

Três membranas foram testadas para utilização nos experimentos de concentração e purificação das proteínas do soro: a UF-7001, a UF-6001 e a UF-6002. A escolha da membrana depende da qualidade do fluxo permeado e das características de retenção, porque a membrana deve reter todas as proteínas e ser permeável à lactose e aos sais.

Membranas de ultrafiltração são comercializadas pela sua massa molar de corte (MMC), a qual é geralmente definida, como a massa molar do menor componente que será retido pela membrana com uma eficiência de 95 %. Assim uma membrana com MMC de 10.000 Da deve reter pelo menos 95 % das moléculas com esta massa molar. A massa molar de corte de uma membrana é normalmente determinada através de medidas de rejeição utilizando-se soluções homogêneas de solutos (por exemplo, polietilenoglicol – PEG ou dextranas) com massa molar variada e conhecida.

Para avaliar a retenção realizamos uma caracterização das membranas verificando a retenção da membrana para moléculas com massa molar conhecida (dextranas) e superior a MMC informada pelo fabricante. Passamos pelas membranas uma solução de 0,15 % ou 1,5 g/L de dextrana com massa molar de 15 a 20 kDa nas membranas UF-7001, UF-6001 e UF-6002. A concentração de dextrana foi avaliada no permeado e no concentrado através do método fenol sulfúrico, e realizamos o cálculo de retenção da membrana através destes dados. A melhor membrana é aquela que apresentar 100 % ou a maior retenção possível para as moléculas de dextrana, que possuem massa molar similar a menor proteína de interesse neste trabalho (α -La, 14 kDa).

Após a escolha da melhor membrana iniciaram-se os testes de concentração e purificação das proteínas propriamente ditas. O primeiro passo foi realizar a compactação e medidas de fluxo de água em diversas pressões transmembrana.

A seguir, dissolveu-se soro em pó em água destilada, obtendo-se 30 L de solução de soro, conforme explicado na seção 3.1 Preparação do soro.

A solução de soro foi colocada no tanque de alimentação da unidade, e então foram realizados testes de permeação do efluente; estes testes foram realizados da mesma forma que os testes de permeação hidráulica, porém o fluido é o soro. O objetivo é analisar a influência da pressão no fluxo de permeado e verificar a existência ou não de um fluxo limite dentro do intervalo de pressões testado.

Os experimentos realizados na unidade piloto de UF foram efetuados em duas etapas distintas. A primeira etapa teve como objetivo concentrar as proteínas do soro de queijo através do processo de UF e a segunda etapa consiste em purificar estas proteínas usando a

DF. Para cada uma destas etapas foram obtidos concentrados com características diferentes, os quais possuem aplicações de acordo estas características.

A pressão transmembrana foi mantida em 2 bar e a vazão da corrente de alimentação do soro de queijo foi de aproximadamente 840 L.h^{-1} , condições determinadas em trabalhos anteriores (BOSCHI, 2006) e confirmadas neste trabalho. A temperatura do soro foi mantida constante em $50 \text{ }^\circ\text{C}$, tendo em vista a temperatura de saída do soro do processo de fabricação do queijo ($\sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$) e a temperatura máxima admissível para a membrana ($\sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$).

Nos primeiros dez minutos, o sistema operou em reciclo total, isto é, as correntes de permeado e concentrado retornavam para o tanque de alimentação, para homogeneizar a solução e para o sistema entrar em equilíbrio térmico: após, somente a corrente concentrada retornava ao tanque, e o permeado foi sendo recolhido até que se obtivesse a concentração desejada. Medidas diretas de fluxo permeado foram realizadas a cada 15 minutos. A cada meia hora de operação foram coletadas, simultaneamente, amostras das correntes de permeado e de concentrado em frascos de vidro âmbar. As análises feitas nas amostras foram: pH, condutividade elétrica, extrato seco total e as concentrações de lactose e de proteína.

Para a concentração das proteínas do soro de queijo o seguinte processo pode ser visualizado: o soro flui, sob pressão, através da membrana, a qual permite a passagem de água, sais e lactose, que irão constituir a solução chamada de permeado cujas partículas são de tamanho inferior aos poros da membrana; as proteínas são partículas de tamanho superior em relação aos outros constituintes mencionados do soro, logo, são retidos pela membrana e esta solução é denominada de concentrado. A Figura 3.5 apresenta, de forma esquematizada, o processo de concentração do soro por UF.

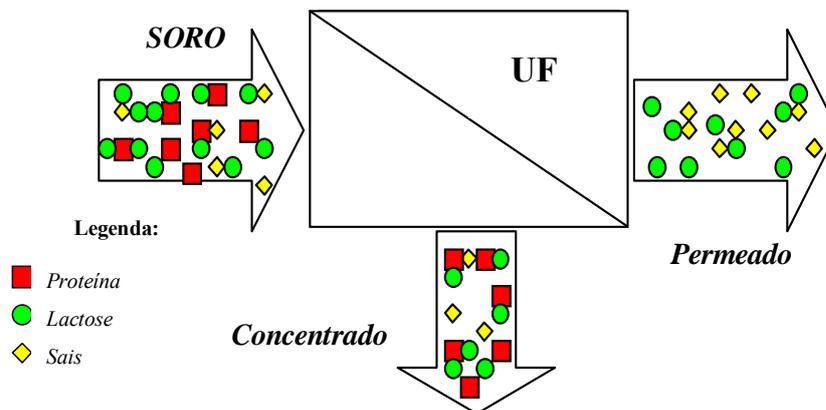


Figura 3.5: Representação esquemática do processo de UF.

A UF foi operada associada a DF que consiste em adicionar água durante o processo de concentração, para lavar os componentes de mais baixa massa molar (lactose e sais), e conseqüentemente aumentar a purificação do retido (proteínas), o mesmo volume de água que é adicionado na DF é retirado no permeado. A Figura 3.6 apresenta de forma esquematizada os processos de DF no concentrado da UF.

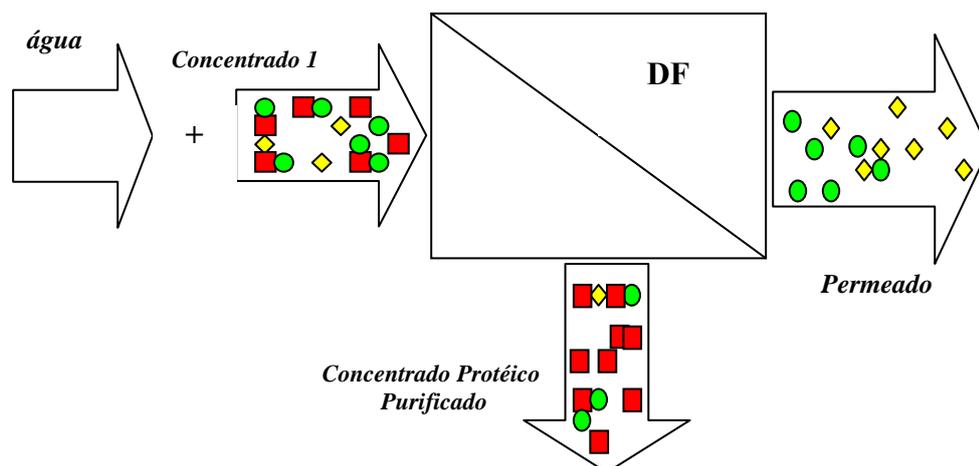


Figura 3.6: Representação esquemática do processo de DF.

Quatro experimentos diferentes foram realizados para verificar quais condições permitiriam uma maior purificação das proteínas, os quais estão descritos a seguir.

Experimento 1 a solução inicial foi concentrada até um volume final de 6 L no tanque de alimentação (FC = 5); a seguir duas DF foram realizadas utilizando-se 6 L de água para cada uma (DF1 e DF2).

Experimento 2 a solução inicial foi concentrada até um volume final de 6 L no tanque de alimentação (FC = 5); a seguir cinco DF foram realizadas: as duas primeiras (DF1 e DF2) com 6 L cada e mais três (DF3, DF4 e DF5) com 3 L cada.

Experimento 3 a solução de soro foi concentrada até um volume final de 5 L (FC = 6); em seguida realizaram-se duas DF (DF1 e DF2) com 5 L de água para cada uma.

Experimento 4 a solução de soro foi concentrada até um volume final de 5 L (FC = 6). Em seguida realizaram-se quatro DF: a DF1 e a DF2 de 5 L e a DF4 e a DF5 de 2,5 L.

Vale ressaltar que entre a etapa de concentração e as DFs não foi realizado enxágue nem limpeza da membrana, isto é, o processo foi contínuo. A Figura 3.7 traz o esquema geral das etapas de concentração e purificação das proteínas do soro realizadas neste trabalho.

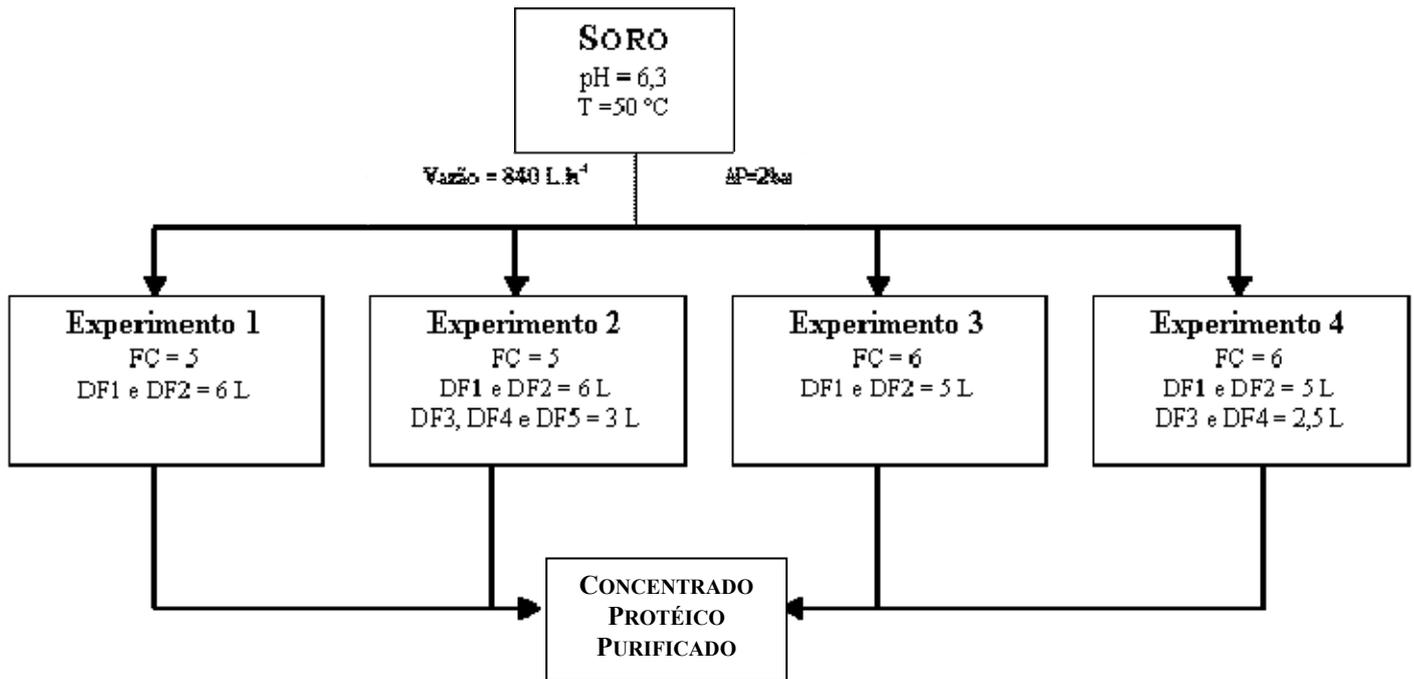


Figura 3.7: Resumo esquemático das estratégias utilizadas para concentração e purificação das proteínas do soro.

3.5.3 Fracionamento das proteínas do soro

O concentrado protéico obtido foi separado em alíquotas para a realização dos experimentos com membranas de UF e de MF, em módulos plano, espiral e tubular, com tamanho de poro nominal ou MMC selecionados para a separação.

Nesta etapa foram monitorados o pH e a temperatura, fatores importantes para que ocorram mudanças conformacionais na molécula de β -Lg, ou seja, para que esta molécula forme dímeros e octômeros e assim ocorra o fracionamento, com a β -Lg ficando retida, enquanto a α -La passa para o permeado. O esquema para o fracionamento pode ser observado na Figura 3.8.

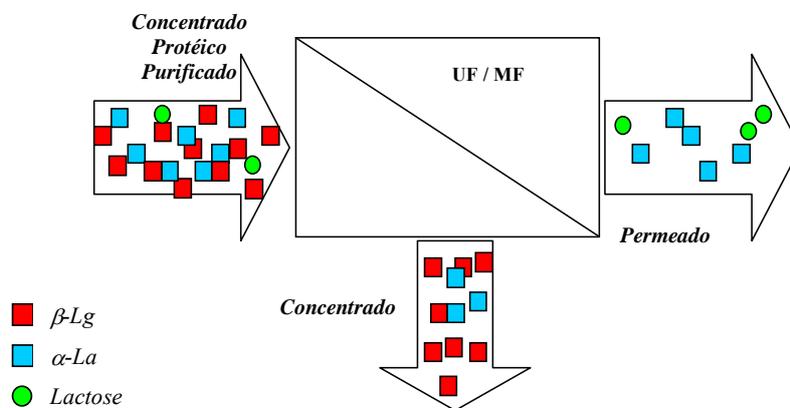


Figura 3.8: Representação esquemática do processo de fracionamento desejado.

Todas as membranas testadas para a separação de proteínas foram compactadas, e caracterizadas em relação ao fluxo permeado de água e de soro em no mínimo quatro pressões transmembrana. A pressão transmembrana de operação foi determinada fazendo a curva J_p vs ΔP ; a vazão de alimentação utilizada foi a vazão correspondente ao melhor ΔP . Os experimentos de separação das proteínas para cada membrana foram realizados conforme o descrito a seguir.

Membrana MF-7002

Quando o módulo utilizado era o MF-7002 devido à maior taxa de permeado, o volume inicial de concentrado protéico usado foi de 6 L no tanque de alimentação.

Um volume inicial de 6 L de concentrado protéico, obtido nas etapas anteriores, foi adicionado ao tanque de alimentação, aquecido a 40 °C. A temperatura foi reduzida, porque em concentrados protéicos, em temperaturas próximas a 55 °C existe uma tendência das moléculas de α -La polimerizarem (FOX & MCSWEENEY, 1998; WIT, 1998). O pH da solução foi ajustado para 4,6 (pH onde a β -Lg forma octômero) com a adição de uma solução 20 % de ácido cítrico. O volume inicial de 6 L foi reduzido a 3 L, e em seguida quatro DFs de 3 L foram realizadas com água destilada pré-aquecida a 40 °C, acidificada ao pH de 4,6 através da solução de ácido cítrico; a vazão de alimentação foi mantida em 700 L.h⁻¹; a pressão transmembrana utilizada para a separação foi de 1,75 bar; o fluxo permeado foi medido a cada 15 minutos e amostras foram coletadas ao final de cada etapa.

Membranas VCWP, RZ04 e HN06

Os testes com estas membranas foram realizados com o módulo plano (61 cm² de área útil) e com dois litros de concentrado protéico purificado obtido na etapa de concentração e purificação.

Para as membranas VCWP e RZ04 o concentrado foi aquecido a 40 °C, e acidificado ao pH de 4,6 com ácido cítrico 20 %, assim como o realizado para a MF-7002.

Para a membrana HN06, optou-se por realizar o experimento a temperatura ambiente (25 °C). Nesta membrana também não foi necessário adicionar ácido, pois a solução se encontrava no pH 6,3. Segundo WONG *et al.* (1999), para valores de pH compreendidos entre 5,20 e 7,50 (faixa que compreende o pH do soro) e à temperatura ambiente, todas as variantes genéticas de β -Lg existem principalmente como um dímero estável de dois monômeros unidos por ligações não covalentes.

Os experimentos foram realizados com uma vazão de alimentação de 620 L.h⁻¹, e pressão transmembrana de 1,75 bar. Inicialmente, o sistema operou em modo de reciclo total, durante 20 minutos, para garantir homogeneidade na concentração e equilíbrio de temperatura, somente então, passou-se a operar em modo batelada com retorno para o tanque de alimentação apenas da corrente retida, sendo o permeado recolhido em outro tanque. Após

30 minutos de operação em modo batelada amostras de permeado e concentrado foram coletadas.

Para estas membranas, não foi possível reduzir o volume inicial à metade ou realizar DF devido a limitações do equipamento tais como: volume insuficiente no tanque de alimentação, área de membrana limitada, conduzindo a uma taxa de permeado muito baixa. Foram analisados apenas o fluxo permeado e as concentrações de proteína na corrente permeada e concentrada.

Membranas UF-C20 e UF-C50

Para a membrana UF-C20 (tubular) o volume inicial de concentrado protéico purificado no tanque de alimentação foi igual a 3 L. O fluxo permeado foi medido a cada 100 mL de permeado coletados, e amostras retiradas a cada 500 mL. O experimento foi conduzido até que 1000 mL de permeado fossem coletados. O pH da solução foi mantido em 6,3 e a temperatura em 25 °C; a ΔP foi mantida em 2,25 bar e a vazão de alimentação em 620 L.h⁻¹.

Para a membrana UF-C20 ainda foi testada a tentativa de fracionamento com a solução do soro reconstituído, i.e., antes da concentração e purificação das proteínas, para verificar se não havia interferências no fracionamento devido ao processo de concentração e purificação. O pH da solução foi mantido em 6,3; a temperatura em 25 °C, a ΔP foi mantida em 2,25 bar e a vazão de alimentação em 620 L.h⁻¹; o volume inicial no tanque de alimentação foi de 3 L e amostras foram coletadas a cada 500 mL de permeado recolhido e o experimento foi conduzido até que 1000 mL de permeado houvessem sido recolhidos.

Para a membrana UF-C50 foram realizadas duas estratégias. Na estratégia 1 o pH da solução foi mantido em 6,3; a temperatura em 25 °C. Na estratégia 2 o pH da solução foi acidificado até 4,6; e a temperatura utilizada foi de 40 °C. Para ambas estratégias a ΔP foi mantida em 2,25 bar e a vazão de alimentação em 400 L.h⁻¹, o volume inicial no tanque era de 3 L e o experimento era interrompido no momento que 1000 mL de permeado tivessem sido coletados. O fluxo permeado era medido a cada 250 mL e amostras coletadas a cada 500 mL.

A Figura 3.9 traz o resumo das estratégias utilizadas para o fracionamento das proteínas do soro a partir do concentrado protéico obtido do soro.

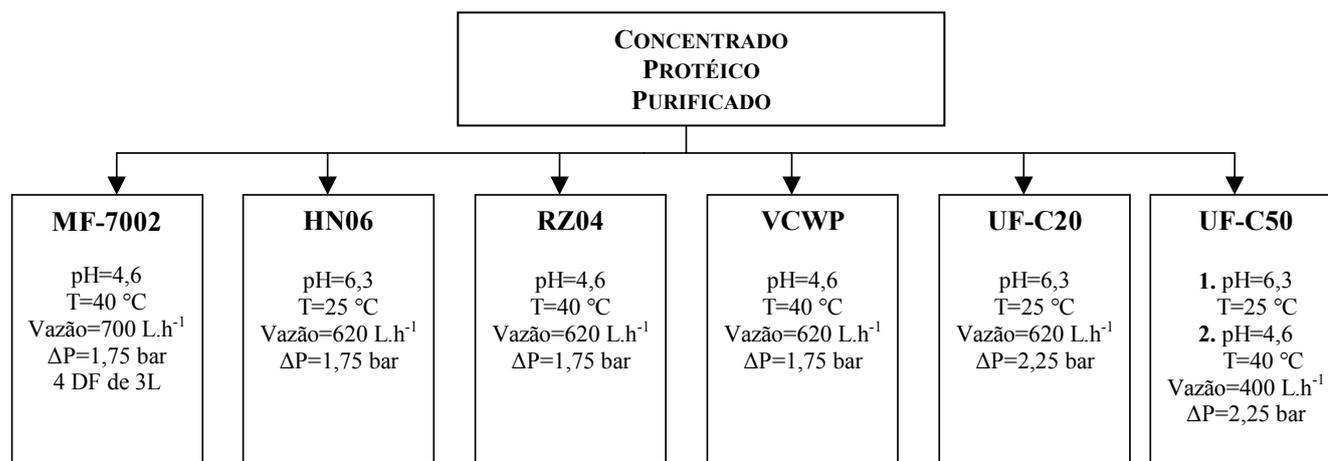


Figura 3.9: Representação esquemática das estratégias utilizadas para fracionamento das proteínas do concentrado protéico obtido do soro.

3.6 Métodos Analíticos

As características das amostras do concentrado e do permeado dos processos da UF, DF e fracionamento foram analisadas conforme descrito nos procedimentos a seguir. Informações mais detalhadas das técnicas utilizadas estão apresentadas no Anexo A.

3.6.1 Análise de Extrato Seco Total - Método Gravimétrico

O valor de extrato seco total ou de sólidos totais (ST) é o parâmetro adotado para a verificação da concentração total de matéria seca não volátil das amostras de concentrado e permeado de soro de queijo. A medida de sólidos totais foi realizada através da técnica gravimétrica de acordo como método apresentado pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981), Portaria 001/81; a precisão do método é de $\pm 5\%$.

3.6.2 Análise de pH

Este parâmetro é importante como medida de precaução em relação à faixa de pH permitida pelas membranas. Além disso, proporciona a observação do comportamento do soro, em relação ao pH, durante os experimentos.

As análises de pH foram realizadas através do pHmetro DIGIMED, modelo DM20. O eletrodo utilizado é do tipo DME CV4 com ponte eletrolítica de KCl e é provido de termo-compensador DMF-NI. As medidas de pH foram realizadas na preparação de soluções de limpeza da membrana e das amostras de concentrado e permeado. A precisão da medida apresenta incerteza de $\pm 0,1$ e confiança de 95%. O equipamento foi calibrado regularmente com padrões de pH 4 e 6,86 conforme as instruções do fabricante.

3.6.3 Análise de Condutividade Elétrica

A presença de substâncias com carga nas amostras líquidas é detectada pela medida de condutividade elétrica. Soluções que apresentam grande quantidade de compostos inorgânicos conduzem eletricidade, enquanto que substâncias orgânicas não dissociadas conduzem pobremente a corrente elétrica. Sendo assim, a análise de condutividade elétrica auxiliou na avaliação da retenção de sais na UF do soro.

A medida da condutividade elétrica é uma medida indireta da concentração de íons na solução. A condutividade elétrica foi determinada para as soluções de alimentação e de permeado. O equipamento utilizado para esta análise foi o condutivímetro DIGIMED DM-31, com eletrodo modelo DMC-010M e $K=1 \text{ cm}^{-1}$. A precisão da medida tem uma incerteza de $\pm 3,16 \%$, sendo que o equipamento era calibrado com uma solução padrão de $1413 \mu\text{S}$ a 25°C , fornecida pela OAKTON.

3.6.4 Análise de Lactose - Método do Ácido Dinitrossalicílico - DNS

As análises de lactose foram realizadas segundo MILLER (1959). Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria com comprimento de onda de 570 nm , utilizando-se uma curva padrão de lactose cuja concentração varia no intervalo de 1 a 5 mg.mL^{-1} .

O método do DNS pode ser usado para determinação de açúcares totais devido ao seu dinamismo, pois permite analisar várias amostras ao mesmo tempo.

3.6.5 Análise de Açúcar - Método Fenol Sulfúrico

As análises de concentração de dextrana nas amostras de concentrado e de permeado para caracterização das membranas, da etapa de concentração e purificação do soro, foram realizadas pelo método fenol sulfúrico.

Este método consiste na determinação espectrofotométrica de açúcares através da reação com o fenol em meio ácido e baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável. As análises foram feitas de acordo com DUBOIS *et al.* (1956). Os teores de dextrana foram determinados por espectrofotometria em um comprimento de onda de 490 nm utilizando uma curva padrão de dextrana (1%) no intervalo de 10 a 70 mg .

De acordo com DUBOIS *et al.* (1956), o método é simples, rápido e sensível fornecendo resultados com uma boa reprodução.

O reagente é estável, porém a solução necessita de uma curva padrão para cada açúcar a ser analisado (SILVA *et al.*, 2003).

3.6.6 Determinação da Proteína Total - Método de Lowry

O método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951) é um método colorimétrico para estimativa quantitativa de proteínas totais. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (Cu^{+2}), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

O mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptófano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre e os peptídeos/proteínas.

O método de Lowry é empregado por se tratar de um método de leitura direto e, por isso, expedito. Opta-se por um método de leitura direta, porque nas experiências com as proteínas comerciais se tem de lidar com um elevado número de amostras. Os teores de proteínas totais foram determinados por espectrofotometria em um comprimento de onda de 750 nm utilizando uma curva padrão de BSA no intervalo de 0,1 a 0,5 mg.mL⁻¹.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, suco biliar, membranas, leite, derivados do leite e produtos alimentícios (ZAIA *et al.*, 1998).

Segundo os mesmos autores, o método de Lowry é recomendado, pois no estudo comparativo de metodologias o mesmo mostrou-se sensível, com melhor exatidão, menor consumo de amostra e, dependendo do caso, menos suscetível a alguns tipos de interferentes.

3.6.7 Análise de Proteína - Eletroforese SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins)

A eletroforese é uma técnica que se baseia no fato de todas as proteínas apresentarem carga quando colocadas a um pH diferente do seu ponto isoelétrico, permitindo deste modo analisar amostras protéicas heterogêneas. Devido à carga que possuem, as proteínas migram por ação de um campo elétrico; esta migração é diferente para cada proteína sendo função da respectiva densidade de carga (razão carga/massa).

A eletroforese é normalmente efetuada num suporte que pode ser sílica gel, géis de amido, ágar, papel de filtro, acetato de celulose, poliacrilamida, etc. Os géis apresentam vantagens em relação a outros suportes porque são meios porosos em que o tamanho dos poros é da mesma ordem de grandeza do tamanho das moléculas de proteína. Assim, eles funcionam como uma peneira molecular e a separação acontece em função da massa molar.

O gel de poliacrilamida é o mais utilizado não só porque a sua porosidade permite uma melhor separação relativamente a outros géis, como também por ser um polímero sintético, preparado a partir de reagentes de elevado grau de pureza. Este tipo de gel tem também a vantagem de ser quimicamente inerte, estável numa gama extensa de pH, temperatura e força iônica (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A polimerização da acrilamida inicia-se pela adição de persulfato de amônio ou riboflavina. O TEMED (N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina) é adicionado para acelerar o processo de polimerização. No sistema persulfato de amônio - TEMED, este último catalisa a formação de radicais livres no persulfato e este por sua vez inicia a polimerização da acrilamida (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A maior parte das eletroforeses de proteínas em géis de acrilamida é efetuada em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Utiliza-se uma solução tamponada para dissolver a amostra conseguindo-se deste modo a dissociação de todas as proteínas nas suas sub-unidades polipeptídicas. O composto utilizado para efetuar a dissociação é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A amostra é desnaturada por aquecimento, cerca de 95°C durante 10 minutos, na presença de um excesso de SDS e de reagente tiólico (β -mercaptoetanol) para quebrar as ligações dissulfeto. Assim, nestas condições o SDS liga-se aos polipeptídios segundo uma razão de massas constante (1,4 gramas de SDS por grama de polipeptídio). As cargas intrínsecas do polipeptídio tornam-se insignificantes quando comparadas com as cargas negativas provenientes das moléculas de detergente ligadas. Desta forma, todos os complexos SDS - polipeptídio possuem densidades de carga idênticas e migram em géis de poliacrilamida com porosidade adequada estritamente em função da sua massa molar (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A revelação dos géis pode ser feita pelo método de coloração utilizando Coomassie blue.

Esta técnica foi utilizada para verificar a eficiência dos experimentos de fracionamento das proteínas na última etapa do trabalho.

3.6.8 Cromatografia gel

A cromatografia gel é também conhecida como cromatografia de exclusão em gel, cromatografia de filtração em gel e filtração gel. O princípio do método baseia-se na partição de moléculas entre a fase móvel e uma fase estacionária. A fase estacionária tem o efeito de uma peneira molecular, é um método usado para a separação de substâncias de acordo com o tamanho e forma moleculares. Estas peneiras moleculares são redes porosas tridimensionais, constituídas por cadeias lineares de polímeros que se entrecruzam e formam a matriz do gel. Os géis mais usados são os obtidos pela polimerização de cadeias de polissacarídeos ou os constituídos pela polimerização de cadeias de poliacrilamida. As partículas que formam o gel têm poros e o tamanho dos poros é função do grau de entrecruzamento das cadeias de polímeros. A possibilidade de variar o tamanho do poro torna este método útil para a

separação de diferentes substâncias e a sua utilização na determinação das massas molares das mesmas (YADA, 2004).

A facilidade de uma molécula de soluto penetrar na rede do gel é função do seu tamanho e forma molecular: as moléculas menores penetram nos poros da matriz, tendo um movimento mais lento através da coluna; enquanto as moléculas maiores passam pela coluna juntamente com a fase móvel e são eluídas primeiro. Quando uma mistura de macromoléculas é colocada na parte superior de uma coluna de gel, ao se adicionar uma solução tampão para provocar a eluição, as moléculas começam a sair da coluna com o tampão em frações diferentes e por ordem decrescente da sua massa molar. Podem ser estabelecidas relações empíricas entre o volume de solvente necessário para a sua eluição e a respectiva massa molar; estas relações variam para as diferentes classes de macromoléculas (polissacarídeos, proteínas globulares, etc).

A filtração em gel é uma técnica bastante utilizada na separação de misturas de macromoléculas de massas molares diferentes e também para o isolamento e purificação de proteínas. Este método foi utilizado para verificar a agregação da β -Lg em dímeros e octômeros nas amostras de soro, para as condições dos experimentos.

3.7 Limpeza do Sistema de Membranas

Um procedimento de limpeza foi utilizado para restituir as características de fluxo e retenção da membrana e prevenir o desenvolvimento de microrganismos no sistema. A limpeza química consistiu nas seguintes etapas: enxágüe com água destilada, limpeza alcalina, limpeza cloro alcalina (somente no caso das membranas poliméricas: UF-7001, UF-6001, UF-6002, MF-7002) e limpeza ácida. Estas etapas foram realizadas sempre respeitando os limites de pH e temperatura da membrana recomendados pelo fabricante.

A limpeza realizada ao final de cada experimento, conforme a recomendação do fabricante consistiu de sete etapas conforme descrito a seguir.

1. Enxágüe do sistema com água destilada: após a remoção do concentrado do sistema, água destilada entre 45 a 50 °C e 0,5 bar na entrada, em pequenos volumes (5 L), foi adicionada e rapidamente recirculada. Este procedimento foi efetuado 6 a 7 vezes com o objetivo de remover a solução residual do processo de concentração de uma maneira rápida e eficiente. A seguir foi adicionada água destilada, nas mesmas condições descritas acima, porém com intervalos maiores de recirculação. Este procedimento é realizado até o momento em que o permeado se apresente visualmente limpo.
2. Limpeza alcalina: nesta etapa o sistema é preenchido com água destilada ajustando-se o pH entre 10 e 10,5 com hidróxido de sódio (NaOH) na temperatura de aproximadamente 50 °C; esta solução é recirculada no sistema sob ausência de pressão manométrica por 15 a 20 minutos.

3. Enxágüe com água destilada: água é recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução alcalina, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.
4. Limpeza cloro-alkalina: o sistema é preenchido com água destilada, ajustando-se o pH entre 10 e 10,5 com hidróxido de sódio (NaOH) e adicionando-se de modo controlado hipoclorito de sódio (NaOCl) até, no máximo, 200ppm de cloro. Para verificar a concentração de cloro durante a limpeza, foi usado um kit La Motte mod. PCT-DR com escala 0 a 200 ppm.
5. Enxágüe com água destilada água é recirculada no sistema por 20 minutos para remoção da solução cloro-alkalina, mantendo-se a temperatura de 50 °C e sob ausência de pressão.
6. Limpeza ácida: o sistema é preenchido com água destilada, adicionando-se ácido cítrico até atingir pH 2, esta solução é mantida no sistema por 10 minutos na temperatura de aproximadamente 50°C a uma pressão de 0,5 a 1,5 bar.
7. Enxágüe com água destilada e medida de fluxo de água para verificar se as condições iniciais foram restituídas.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da etapa experimental onde primeiramente foram realizados testes para determinar a membrana adequada para ser utilizada nos experimentos de UF e DF nos testes de concentração e purificação das proteínas do soro de queijo. Na segunda etapa verificou-se a melhor estratégia em termos de FC e quantidade e volume de DF para se obter a maior concentração e purificação protéica. Por fim, foram testadas as membranas para o fracionamento das proteínas. Todos os dados experimentais apresentados neste capítulo encontram-se tabelados no Apêndice B.

4.1 Concentração e Purificação das proteínas

Esta seção é dividida em quatro partes: seleção da membrana; apresentação dos resultados de medidas do fluxo de água e de soro para a membrana selecionada; resultados dos experimentos de UF e DF para obter a maior purificação protéica; resultados detalhados da estratégia que apresentou melhores resultados para os parâmetros analisados.

4.1.1 Seleção da membrana

No primeiro momento realizamos a escolha da membrana apropriada para realização dos experimentos de concentração e purificação de proteínas, ou seja, uma membrana que apresentasse uma retenção alta para as proteínas, e baixa para a lactose e os sais. Além do mais, era necessário que o fluxo de permeado fosse adequado para realização dos experimentos de concentração. As membranas disponíveis no laboratório para esta etapa foram: UF-7001, UF-6001 e UF-6002.

O primeiro procedimento foi realizar as medidas de fluxo permeado (J_p) de água pura. Este experimento foi realizado a temperatura de 30 °C. A vazão de alimentação média para as membranas testadas foi 700 L.h⁻¹. O modo de operação foi o reciclo total, buscando manter as propriedades do sistema constantes. Começamos empregando a ΔP mais alta, deixamos o sistema estabilizando térmica e hidrodinamicamente por 25 minutos e a seguir medimos o fluxo de água nas seguintes pressões transmembrana: 4, 3, 2, 1 bar; os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.1.

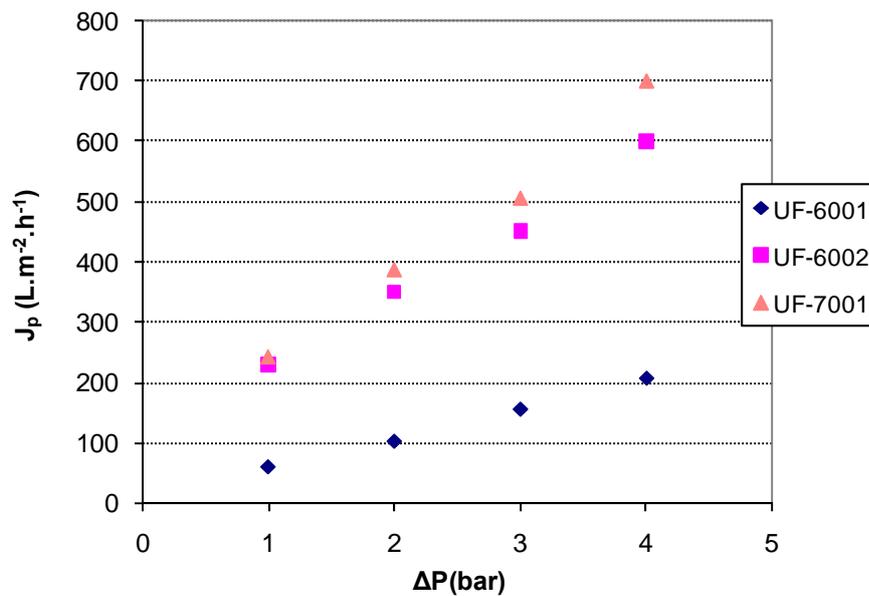


Figura 4.1: Fluxo de água vs pressão transmembrana, para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7001, a 30 °C e vazão de alimentação média de 700 L.h⁻¹.

Pela análise da Figura 4.1 observa-se que o fluxo de água para as três membranas tem um comportamento semelhante, quanto maior a ΔP maior é o fluxo de água. Porém, a UF-7001 e a UF-6002, possuem fluxos de água semelhantes para todas as ΔP , mesmo possuindo MMC diferentes (10 e 5 kDa, respectivamente). A UF-6001 possui fluxos de água menores que as outras duas membranas em todas as ΔP , mesmo possuindo MMC igual a da UF-6002. Esta grande diferença de fluxo permeado tem a ver com modificações que a membrana do módulo UF-6002 sofreu na sua estrutura devido a uso intensivo ou limpezas químicas agressivas.

Neste primeiro momento o que ficou evidente é que o fluxo de água na pressão transmembrana de 2 bar estava acima do valor médio declarado pelo fabricante que era de 100 L.m⁻².h⁻¹ para UF-7001 e 80 L.m⁻².h⁻¹ para a UF-6001 e para a UF-6002, porém para a UF-6002 esta diferença foi muito mais expressiva do que para a UF-6001. Este fato foi um alerta para uma possível degradação das membranas UF-7001 e UF-6002.

Após a medida de fluxo de água, foram realizados testes com soluções de dextrana com massa molar na faixa de 15 a 20 kDa e percentual mássico de 0,15 %. Utilizou-se o modo de operação de reciclo total, temperatura de 30 °C, mediu-se o fluxo e amostras de permeado e concentrado em quatro pressões: 1, 2, 3 e 4 bar foram coletadas. O fluxo permeado da solução com dextrana foi semelhante ao fluxo de água para todas as membranas em todas as pressões, uma vez que a solução de alimentação estava bastante diluída.

A partir das amostras coletadas em cada pressão realizou-se a análise de concentração de dextrana através do método de fenol sulfúrico e avaliou-se a retenção da membrana, obtendo os resultados que estão apresentados na Figura 4.2.

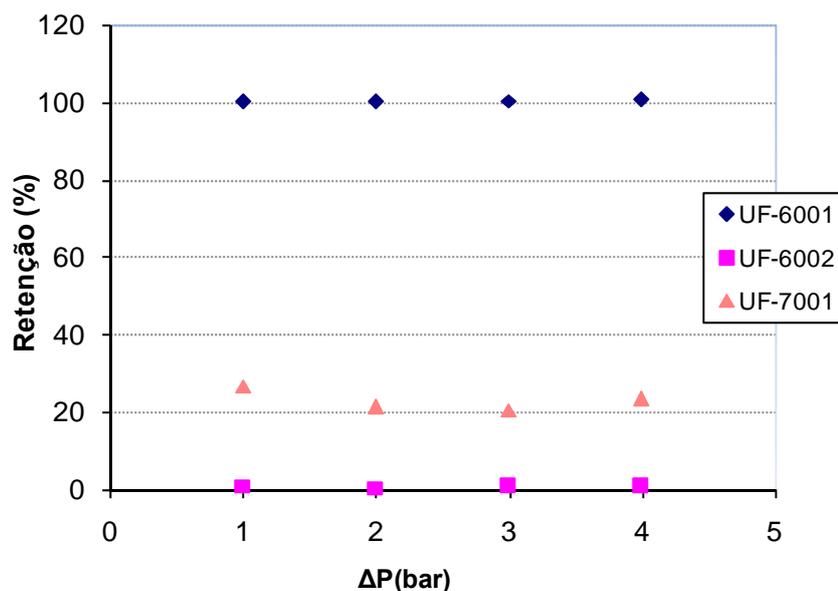


Figura 4.2: Retenção de dextrana vs pressão transmembrana, para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7002, a 30 °C e vazão de alimentação média de 700 L.h⁻¹.

Pode-se observar no gráfico que para a membrana UF-6001 a retenção foi de 100 %, porém para a UF-7001 não foi superior a 30 %, e não houve retenção de dextrana para a UF-6002, este resultado evidencia que estas duas últimas membranas não são adequadas para a realização dos experimentos de concentração, pois apresentaram baixa retenção para moléculas com massa molar de 15 a 20 kDa, que é superior a MMC das membranas, e por isso, deveriam ficar retidas.

Após estes experimentos de caracterização, a membrana UF-6001 que reteve 100 % das moléculas de referência, foi selecionada para a realização dos experimentos de concentração e purificação protéica. A membrana devido a usos anteriores pode encontrar-se com MMC superior a original (5 kDa), mas este fato não interfere na realização dos experimentos, porque a menor proteína de interesse tem 14 kDa e como foi demonstrado esta membrana é capaz de reter moléculas com massa molar semelhante.

4.1.2 Fluxos permeados para a água e para o soro

Primeiramente foram realizados experimentos medindo-se o fluxo permeado em diferentes pressões transmembranas com água e, posteriormente, com soro. A pressão transmembrana corresponde à diferença entre a média aritmética das pressões de entrada e saída do módulo de membrana e a pressão da corrente permeada.

A Figura 4.3 apresenta o fluxo permeado para a água e para o soro em função da pressão transmembrana.

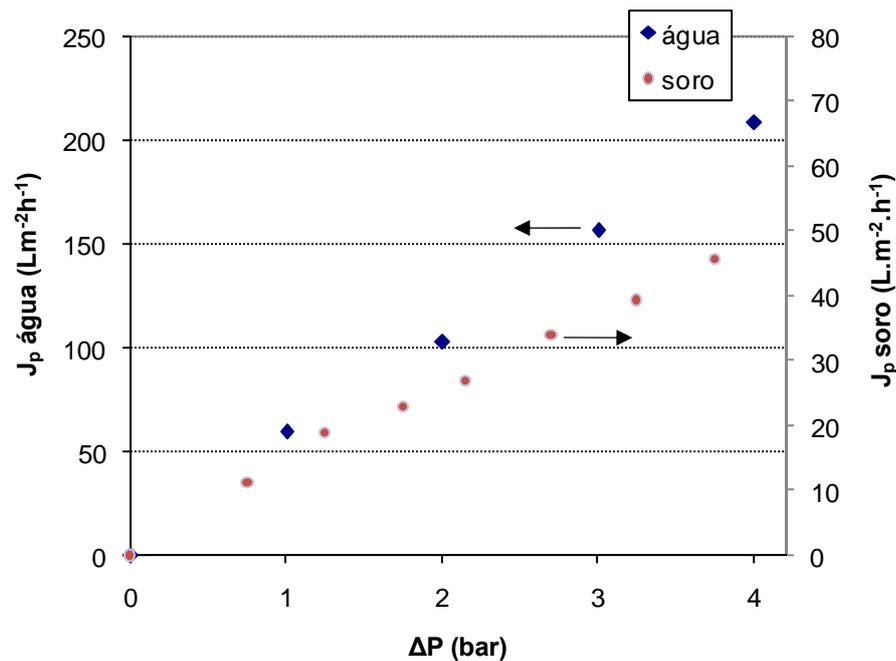


Figura 4.3: Fluxo de água e de soro vs pressão transmembrana para a membrana UF-6001, $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} .

Através da Figura 4.3 observa-se que o fluxo de água aumentou linearmente com a pressão transmembrana, enquanto que o fluxo para o soro não possui comportamento tão linear. Além disso, para as mesmas condições operacionais ocorreu uma diferença significativa nos fluxos permeados do soro e da água. Esse mesmo comportamento foi encontrado por REKTOR & VATAI (2004), ATRA *et al.* (2005) e CHOLLANGI & HOSSAIN (2006) e BUTYLINA *et al.* (2006) em seus trabalhos, isto é, os fluxos da solução do soro eram mais baixos do que os fluxos da água pura em todas as pressões; possíveis causas para este fluxo mais baixo incluem as interações entre a membrana e a solução, efeitos de viscosidade cinemática e difusividade mássica.

O fluxo permeado do soro menor do que o fluxo de água evidencia que o efeito de polarização por concentração é bastante significativo para o soro na concentração inicial e este efeito tende a se agravar à medida que o soro vai sendo concentrado. Neste caso pode-se afirmar que o aumento de fluxo é limitado pelo aumento da camada polarizada, isto é, o aumento de pressão transmembrana é contra balanceado pelo aumento da resistência total. Cabe ressaltar que devido a limitações do equipamento, não foi possível operar em pressões superiores a 3,75 bar.

Como resultado destas medidas e tendo em vista trabalhos anteriores (BOSCHI, 2006) decidiu-se trabalhar na pressão de 2 bar. Sabe-se que quanto maior a pressão aplicada maior a quantidade de soluto que chega à superfície da membrana o que pode intensificar ainda mais o fenômeno de polarização por concentração e a tendência de formação de *fouling* na membrana. Segundo BRANS (2006), o aumento de ΔP acarreta em um aumento inicial do fluxo, entretanto, acelera a formação de *fouling*, prejudicando o fluxo em operações de longa duração.

4.1.3 Comparação das estratégias para concentração e purificação protéica

Nesta seção são apresentados os resultados para as quatro estratégias de concentração e purificação testadas, levando-se em conta o FC inicial e o número e os volumes para cada DF.

Nos experimentos 1 e 3 foram testados os fatores de concentração (FC) 5 e 6, respectivamente. Em cada um dos experimentos realizaram-se duas DF, para o Experimento 1 a DF1 e a DF2 com volumes iguais a 6 litros cada uma e a para o Experimento 3 a DF1 e a DF2 o volume foi de 5 litros para cada uma. Estes dois experimentos iniciais foram exploratórios, para que conseguíssemos programar experimentos mais longos, ou seja, com mais etapas de DF, mas que pudessem ser realizados em um único dia, devido a problemas de deterioração do soro; além do mais, precisávamos identificar qual seria o menor volume que poderia ficar no sistema, sem prejudicar o funcionamento da bomba. Em trabalhos anteriores o volume havia sido determinado igual a 6 litros (BOSCHI, 2006). Os experimentos 2 e 4 são idênticos ao 1 e 3, respectivamente, porém, realizaram-se mais etapas de DF, no Experimento 2 além da DF1 e DF2 de 6 L, foram realizadas a DF3, a DF4 e a DF5 com volumes iguais a 3 L para cada; no Experimento 4 além da DF1 e DF2 de 5 L, realizaram-se a DF3 e a DF4 com 2,5 L para cada uma. Portanto, os Experimentos 1 e 2 possuem semelhança nos resultados até a segunda diafiltração, assim como os Experimentos 3 e 4.

A Figura 4.4 apresenta o percentual de proteína em base seca em função da etapa do processo. Nos gráficos o início da ultrafiltração é identificado por UFi, e o final por UFf. As diafiltrações são identificadas por DF e pela etapa que correspondem (1, 2, 3, 4 ou 5).

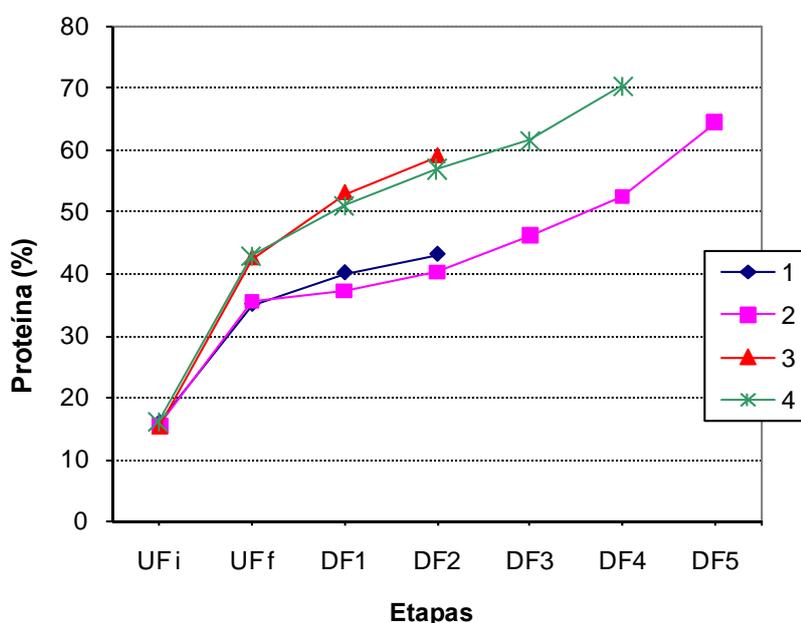


Figura 4.4: Percentual protéico no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os experimentos 1, 2, 3 e 4, membrana UF-6001, T=50 °C, $\Delta P=2$ bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

O percentual mássico inicial de proteína para os quatro experimentos é o mesmo, cerca de 15 %, ao final da UF este valor atinge 35 % para os Experimentos 1 e 2. Para o

Experimento 1, ao final da DF1, chegou-se a 40 % de proteína, e no Experimento 2 o percentual protéico atingiu 37 %. Ao final da DF2 o concentrado atingiu 43 e 41 % de proteína, para os Experimentos 1 e 2 respectivamente. O Experimento 1 foi encerrado nesta etapa. Enquanto para o Experimento 2 foram realizadas as DF3, DF4 e DF5 de 3 L cada, obtendo-se 46, 52 e 62 % de proteína, respectivamente.

Para os Experimentos 3 e 4 ao final da UF atingiu-se 42 % de proteína, para ambos experimentos. No Experimento 3 e 4 após as DF1 atingiu-se 53 e 51 % e após a DF2 atingiu-se 59 e 57 % de proteína, respectivamente. O Experimento 3 foi encerrado nesta etapa, no Experimento 4 foram realizados a DF3 e DF4 obtendo-se 61 e 70 % de proteína.

Em geral o que se observa é que para os experimentos com maior FC (Experimentos 3 e 4) foram obtidos percentuais protéicos ligeiramente maiores ao final da UF; esta diferença é acentuada com as DF, sendo expressivas tanto para as DF de volume maior, quanto para as de menor volume.

As Figuras 4.5 e 4.6 apresentam o percentual mássico de lactose e sais, em base seca, no concentrado em função das etapas do processo.

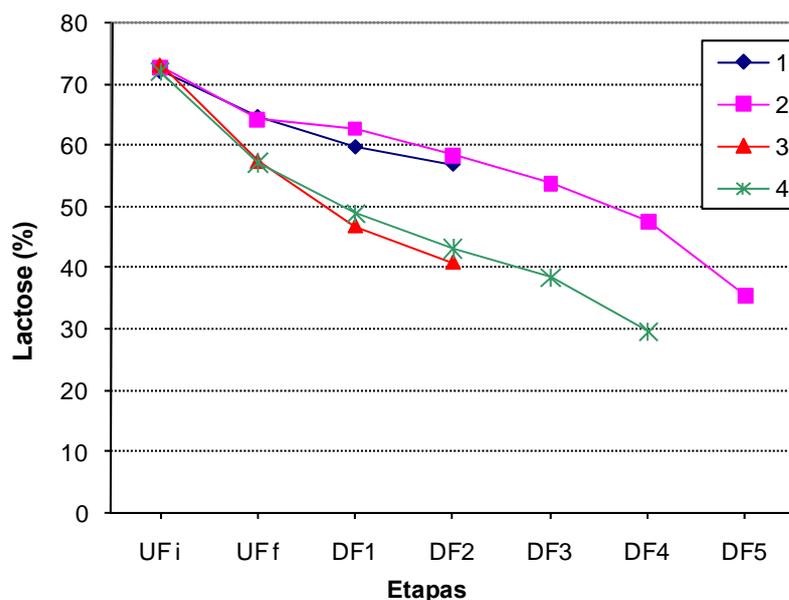


Figura 4.5: Percentual de lactose no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os Experimentos 1, 2, 3 e 4, membrana UF-6001, T=50 °C, $\Delta P=2$ bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

No início dos experimentos o percentual mássico (base seca) de lactose é em torno de 72 a 73 %; ao final da UFf, para os Experimentos 3 e 4 os percentuais de lactose caem para 57 %, enquanto que para os Experimentos 1 e 2 para 64 %. Durante as diafiltrações estes percentuais vão sendo reduzidos chegando a 57 % para o Experimento 1 e 42% para o Experimento 3, onde foram realizadas apenas duas DFs. Para os experimentos 2 e 4 foram alcançados valores bem mais baixos, de 35 e 29 %, respectivamente.

Em relação ao teor salino, observa-se na Figura 4.6 que nos Experimentos as amostras iniciam com 12 % de sais. Para todos os quatro experimentos o processo mostra-se eficiente na remoção de sais, sendo que ao final da UF, o percentual se aproxima de zero, mostrando que boa parte do sal havia sido removida do concentrado protéico.

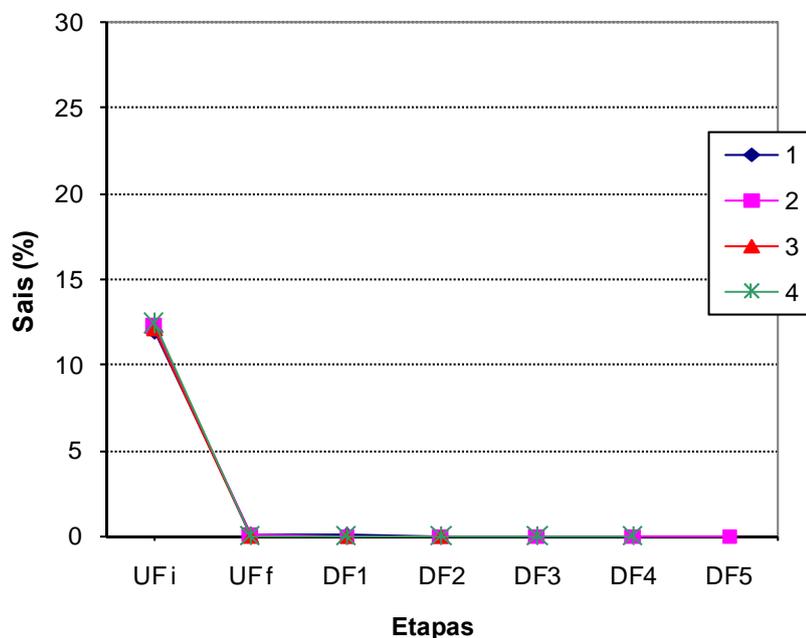


Figura 4.6: Percentual de sais no concentrado (base seca) vs etapas do processo para experimento 1, 2, 3 e 4, para a membrana UF-6001, $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta P=2\text{ bar}$, vazão de alimentação média de $840\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$.

Percebe-se que no Experimento 4 os resultados de concentração protéica são melhores do que os obtidos para os experimentos 1, 2 e 3. Vale ressaltar que no Experimento 4 o concentrado da UF, antes da DF, foi de 5 L, e esta diminuição de volume implicou em uma maior concentração protéica final e em um menor volume de água para a etapa de DF. Para o Experimento 2 utilizou-se 21 L de água para a etapa de DF e obteve-se um concentrado protéico com 62 % em base seca; enquanto que para o Experimento 4 foram utilizados 15 L de água para a DF e o percentual protéico foi de 70 % em base seca.

Verificou-se que as DF de volumes menores são bastante efetivas na remoção de sais e lactose, para o Experimento 4, por exemplo, houve uma grande redução da concentração dos outros elementos, em relação à quantidade de proteína, nas últimas duas DFs de 2,5 L.

Com base nestes resultados, as condições de trabalho do Experimento 4 foram escolhidas como sendo a melhor estratégia a ser utilizada para se obter uma maior purificação protéica. Neste experimento se obteve um concentrado com 70 % de proteína em base seca, com um teor de lactose inferior a 30 %, e livre de sais, com menos etapas de DF e com menor volume de água.

4.1.4 Resultados para a melhor estratégia de purificação protéica

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para o Experimento 4, já que os resultados para os outros três experimentos apresentaram o mesmo comportamento, apenas atingindo concentrações finais diferentes.

A Figura 4.7 mostra o comportamento do fluxo permeado de soro em função do fator de concentração volumétrico para a etapa de UF.

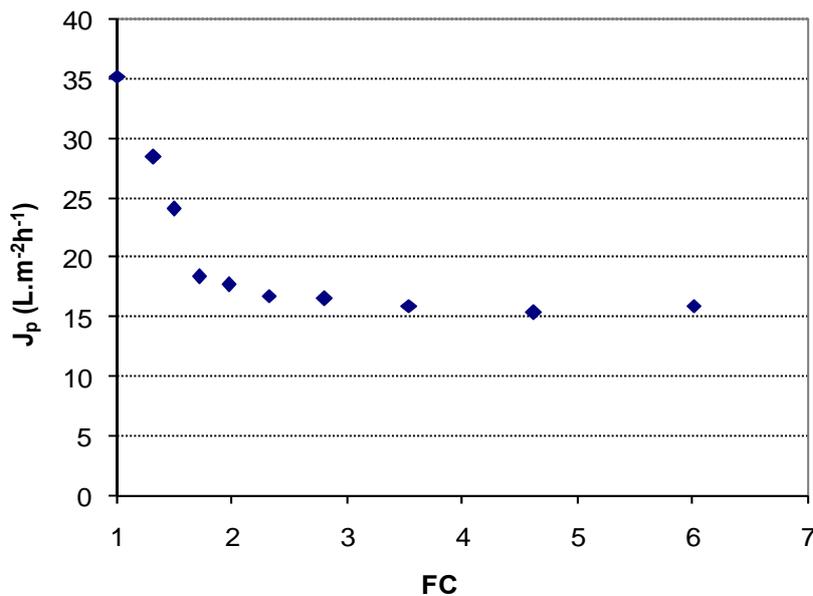


Figura 4.7: Fluxo permeado vs fator de concentração volumétrico para Experimento 4 na etapa de UF, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

Observa-se que o fluxo permeado diminui à medida que o fator de concentração aumenta até o FC de 3,5; em FCs maiores há uma tendência do fluxo permeado se manter constante. O fator de concentração volumétrico máximo alcançado de 6 foi em função das limitações da unidade experimental (soma do volume mínimo de soro no tanque de alimentação com o volume morto, perfazendo um volume de aproximadamente 5 L).

Os dados do gráfico confirmam o que alguns autores já haviam observado. Segundo SMITH (2003), geralmente o fluxo permeado diminui com o aumento do FC. Segundo AFONSO *et al* (2004), REKTOR & VATAI (2004) e BACCHIN *et al.* (2006) quanto mais concentrada a solução de alimentação, menor o fluxo permeado; isso se deve à pressão osmótica mais elevada e ao maior acúmulo de moléculas do soluto na camada polarizada, aumentando sua espessura e, por consequência, sua resistência à permeação. Segundo ATRA *et al.* (2005), em fatores de concentração mais elevados há um depósito maior e mais denso da camada que reduz o fluxo permeado até que ele alcance a condição de estado estacionário.

A Figura 4.8 apresenta o fluxo permeado de soro em função do tempo; observa-se que o fluxo diminui com o tempo de operação sendo que estes resultados estão de acordo com os apresentados nos trabalhos de VEIGA & VIOTTO (2001), RAO (2002), CASTRO E GERLA (2004), REKTOR & VATAI (2004) e KHIDER *et al.* (2004).

O fluxo permeado inicia em $35 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ e após os primeiros 80 minutos vai diminuindo até atingir $18 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, e assim permanece até os 170 minutos, quando, então, decai para aproximadamente $15 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ e se mantém assim até o final da UF (~ 265 minutos). A queda inicial mais acentuada foi devida à formação da camada de polarização por concentração e ao *fouling*; o decaimento final se deve ao aumento da concentração e conseqüentemente às mudanças nas propriedades de transporte e nas propriedades da solução, tais como massa específica e viscosidade dinâmica. Vale ressaltar que a redução de fluxo permeado é um dos fatores limitantes do processo, do ponto de vista técnico e econômico.

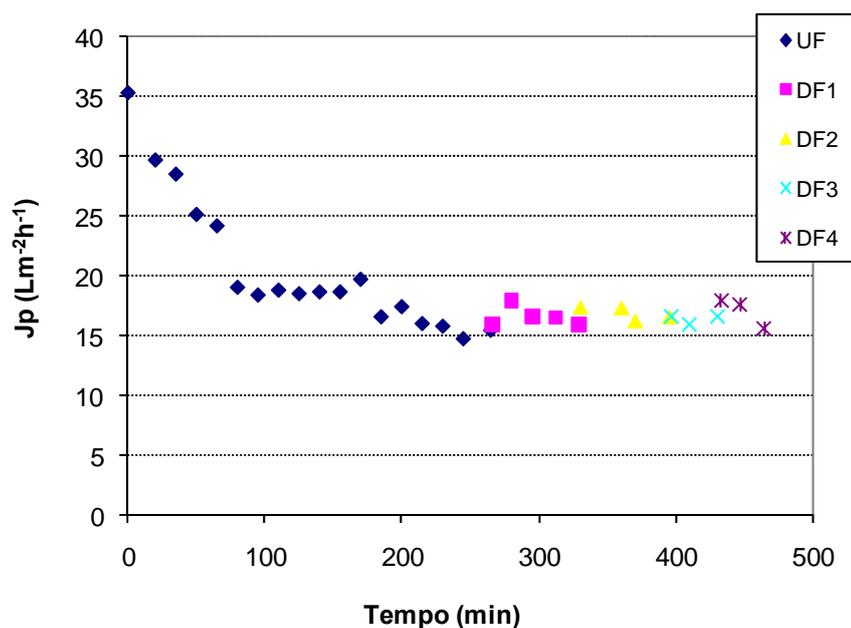


Figura 4.8: Fluxo permeado vs tempo para o Experimento 4, para a membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} .

CHOLLANGI & HOSSAIN (2006), fizeram experimentos com soluções de lactose com e sem proteína e observaram que com o aumento da pressão transmembrana o fluxo permeado aumentou para ambas as soluções, entretanto, o fluxo para a solução sem proteína foi maior do que a com proteína em todas as pressões. A presença da proteína aumenta o potencial para *fouling* e em conseqüência diminui o fluxo permeado.

Para a produção de CP com alto teor de proteína utilizou-se a DF; segundo EBERSOLD & ZYDNEY (2004), o modo DF é empregado para separações de proteína para eliminar problemas de associação em concentrações altas no produto retido, gerando alta purificação e ao mesmo tempo bons fatores de rendimento. Este processo promove a produção de um concentrado protéico mais puro, pois remove sais e lactose que são permeáveis à membrana. Nas DF o fluxo permeado ficou abaixo do fluxo inicial da UF, devido ao *fouling* formado na etapa de concentração das proteínas e ao fator de diluição que não é muito elevado, e, após diminuiu com o tempo. No momento em que iniciamos as DF o fluxo permeado aumenta para cerca de $18 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, devido ao efeito de diluição, e ao final da DF volta para os $15 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ obtidos no final da etapa de concentração. É importante salientar que não foi realizada limpeza química, nem tampouco enxágüe com água após o experimento de concentração.

Como a proteína é totalmente retida pela membrana, o aumento da concentração de proteína exerce um efeito maior sobre o fluxo (polarização). Além disso, a polarização por concentração tem um efeito sobre o *fouling*, quanto maior a polarização por concentração maior a tendência de ocorrer *fouling*.

A Figura 4.9 apresenta o teor de sólidos totais (ST) em função do tempo de experimento para o concentrado e para o permeado das etapas de concentração e diafiltração. Observa-se que houve um aumento de ST na corrente de concentrado durante a UF devido principalmente ao aumento de concentração de proteína. No permeado a concentração de ST é aproximadamente constante até o final da UF, aumentando ligeiramente na última hora de experimento. O retido possui concentrações mais elevadas de ST tanto para a etapa de UF quanto na etapa de DF. Durante as DF ocorreu a redução de ST para ambas correntes, no concentrado devido à remoção de lactose e sais no permeado devido à diluição.

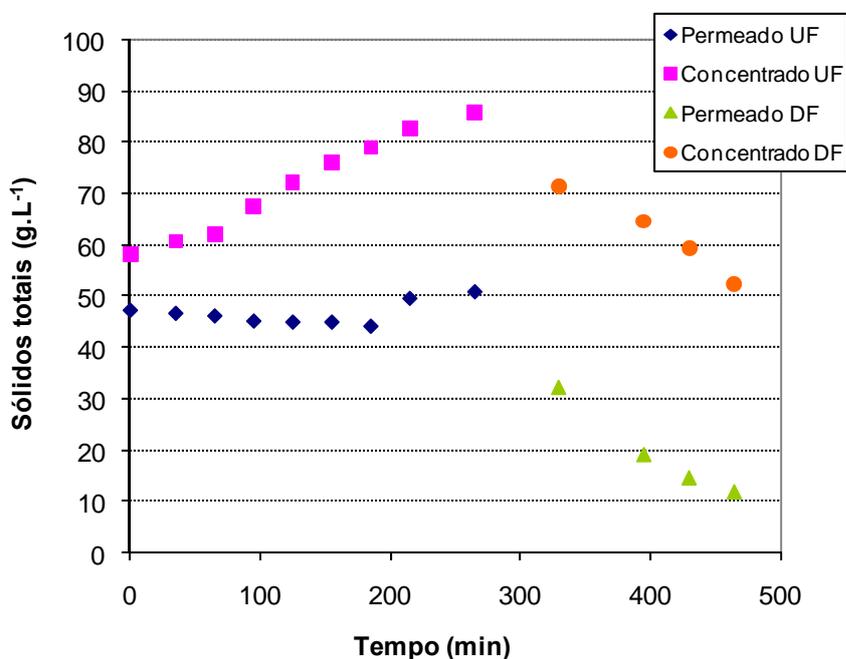


Figura 4.9: Concentração de sólidos totais das amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

A Figura 4.10 apresenta a concentração de proteína em função do tempo de experimento para o concentrado e para o permeado das etapas de concentração e diafiltração. Analisando os resultados apresentados observa-se que a concentração de proteínas no retido aumenta ao longo do experimento de UF. A concentração inicial de proteínas é de cerca de $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ e no final da UF é cerca de 36 g.L^{-1} .

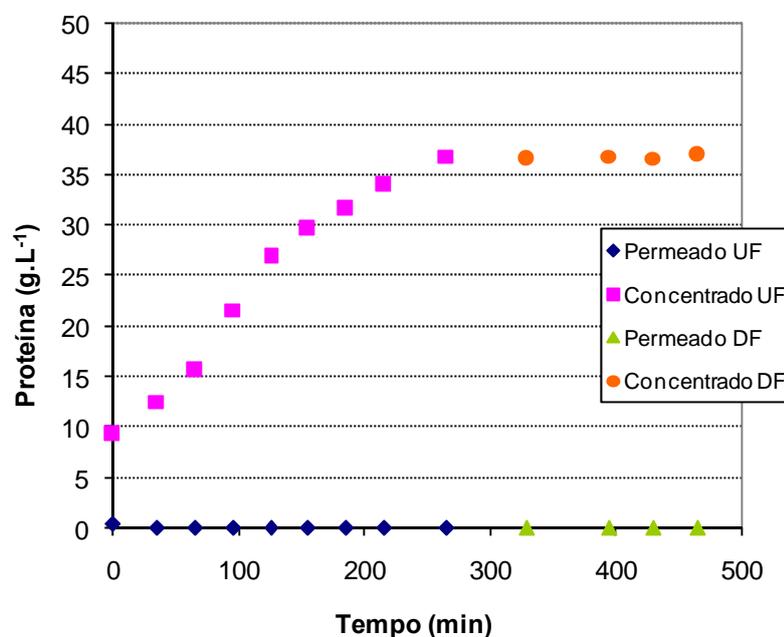


Figura 4.10: Concentração de proteína das amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$, $P=2 \text{ bar}$, vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} .

Nota-se que a concentração de proteína durante as DF não sofre grande variação (inicia com aproximadamente $36,8 \text{ g.L}^{-1}$ e termina com $36,9 \text{ g.L}^{-1}$), no entanto o teor de contaminantes, sais e lactose, diminui significativamente nas DF, o que resulta em uma purificação das proteínas. Comportamento similar é apresentado por LEITE *et al.* (2006).

Em alguns casos, foram detectadas, no início dos experimentos, baixas concentrações de proteína no permeado ($< 1 \text{ g.L}^{-1}$), que devem corresponder a resíduos protéicos derivados da ação da renina nas moléculas de caseína durante a fabricação de queijo. Mas, a presença de proteína no permeado é insignificante quando comparada à concentração protéica no concentrado, e ocorreu somente nos primeiros momentos da UF, indicando que a retenção protéica foi de aproximadamente 100 %.

A variação da concentração de lactose em função do tempo pode ser observada na Figura 4.11. A curva mostra um comportamento similar ao encontrado para os sólidos totais, porque a lactose, sendo o componente mais abundante no soro, e com massa molar menor que a MMC da membrana, apresenta uma retenção baixa deve permear e ter impacto decisivo no comportamento dos sólidos totais ao longo do tempo tanto no permeado quanto no concentrado.

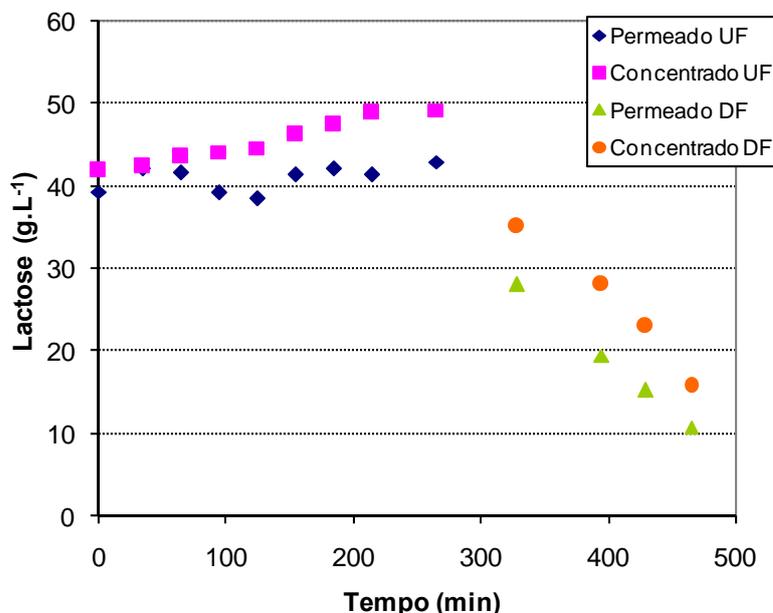


Figura 4.11: Concentração de lactose para as amostras de permeado e concentrado vs tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50°C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840L.h⁻¹.

No permeado, durante a etapa de UF, a concentração de lactose permanece ao redor de 40 g.L⁻¹; no retido inicia com 42 g.L⁻¹ e atinge 50 g.L⁻¹ ao final da etapa de UF. Quando é iniciada a DF a concentração de lactose diminui significativamente tanto no retido quanto no permeado. Ao final das quatro DF a concentração de lactose no retido atinge 15 g.L⁻¹, enquanto que no permeado a concentração de lactose fica em torno de 10 g.L⁻¹, quase o mesmo valor da concentração de sólidos totais, evidenciando que praticamente todo sal é removido, e todos os sólidos que estão sendo retirados no permeado correspondem à lactose.

O pH do soro de queijo foi monitorado com o intuito de verificar possíveis alterações ocasionadas durante o processo de concentração e purificação do soro. Conforme os resultados mostrados na Figura 4.12 verifica-se que o pH não sofreu alterações significativas durante todo o processo. O pH das amostras de concentrado e permeado permaneceu em 6,4 durante todo tempo do experimento baixando ligeiramente para 6,3 nos últimos minutos; este comportamento foi um bom indicativo de que a solução não foi degradada durante o tempo de duração do experimento.

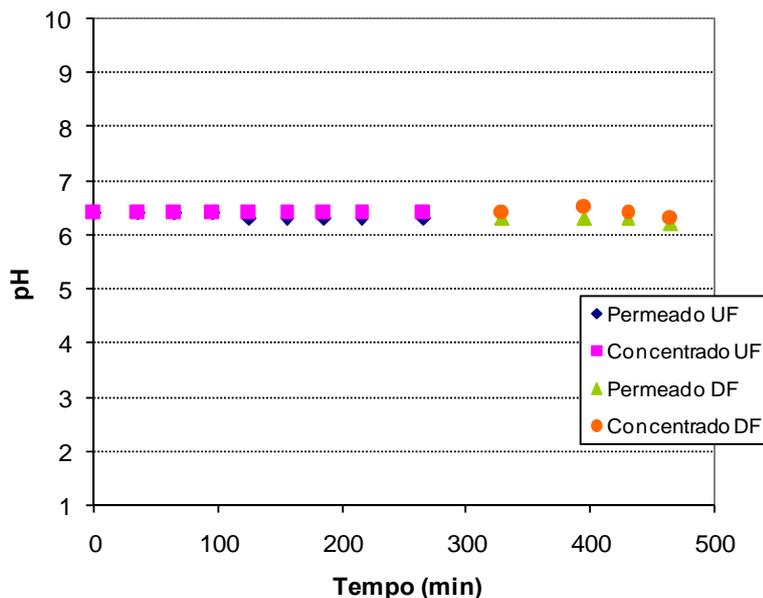


Figura 4.12: pH para as amostras de permeado e concentrado vs tempo para Experimento 4, membrana UF-6001, $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2\text{ bar}$, vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} .

A medida da condutividade elétrica no concentrado do soro de queijo foi realizada para verificar se houve alteração das espécies eletricamente ativas, que, em sua grande maioria, compreendem os sais de cálcio e sódio dissolvidos. Pode-se observar na Figura 4.13 que a condutividade elétrica permaneceu praticamente a mesma para o permeado e o concentrado durante toda a etapa de UF, pois a membrana não é seletiva para os sais, que são os compostos que mais contribuem para a condutividade elétrica; durante a etapa de DF a condutividade elétrica do concentrado e do permeado foi decaindo após a adição da água destilada em cada DF (efeito de diluição).

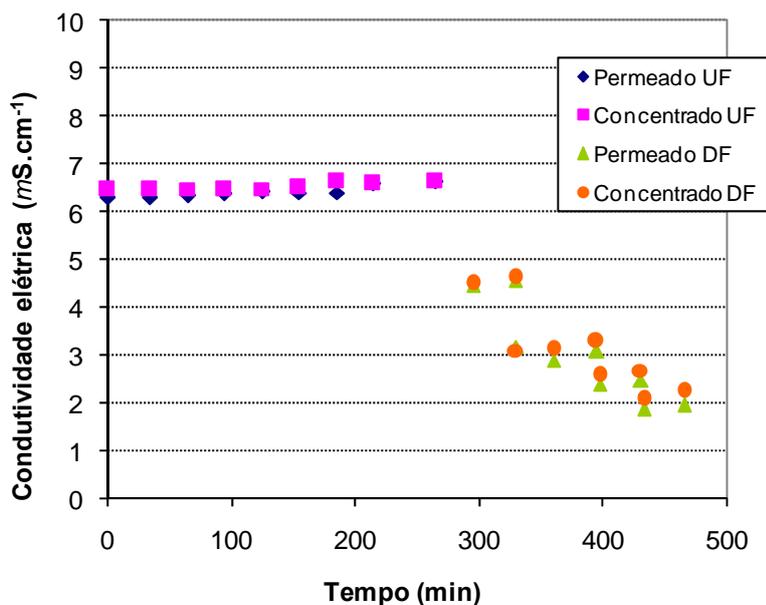


Figura 4.13: Condutividade elétrica das amostras de permeado e concentrado vs tempo para Experimento 4, membrana UF-6001, $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2\text{ bar}$, vazão de alimentação média de 840 L.h^{-1} .

Os resultados encontrados estão de acordo com os apresentados na literatura; ZYDNEY (1998), CHOLLANGI & HOSSAIN (2006), BUTYLINA *et al.* (2006), REKTOR E VATAI (2004) realizaram trabalhos mostrando que os componentes de baixa massa molar (lactose e sais) permeiam preferencialmente as membranas de UF, as quais retêm as moléculas de proteína.

A Figura 4.14 mostra o gráfico da retenção de sólidos totais, lactose e proteína com o tempo para a membrana UF-6001.

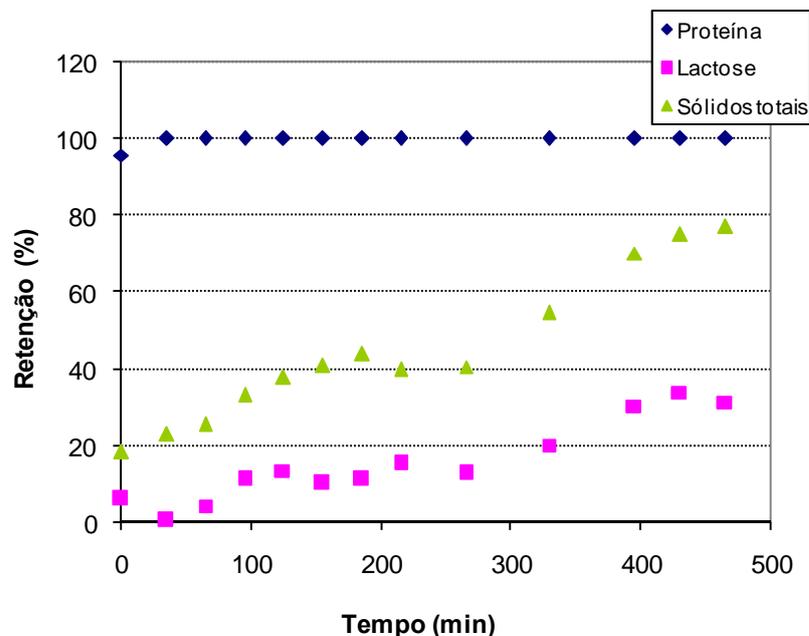


Figura 4.14: Retenção de proteína, lactose e sólidos totais em função do tempo para o Experimento 4, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 4.14 indicam que a retenção das proteínas é total, enquanto que a retenção de sólidos totais aumenta com tempo de experimento, e este aumento é mais expressivo depois do início das DF (após os 265 minutos iniciais). O aumento da retenção de sólidos ocorre porque os componentes permeáveis vão sendo removidos e as proteínas que são completamente retidas passam a ter um peso maior na retenção. Em relação à lactose, observa-se que a retenção oscila em torno de 0 e 20 % até os 265 minutos (etapa de UF), no momento que iniciam as DF a retenção de lactose aumenta. Isto leva a crer que a membrana apresenta uma retenção parcial a lactose o que propicia uma maior dificuldade na purificação das proteínas, principalmente ao final do experimento. Segundo REKTOR & VATAI (2004), a retenção da lactose pela membrana de UF ocorre devido à camada gel formada durante o processo.

4.2 Fracionamento das Proteínas Majoritárias

A partir do concentrado obtido na etapa anterior (4.1 Concentração e Purificação das proteínas) tentativas de fracionar as proteínas majoritárias do soro foram testadas. Os primeiros procedimentos realizados foram as medidas de fluxo de água e do concentrado protéico em cada membrana testada. A compactação da membrana foi realizada previamente a fim de evitar um declínio de fluxo permeado devido ao adensamento da microestrutura da membrana durante o processo UF; este procedimento foi realizado à pressão superior a de operação, com água pura até o fluxo de permeado se estabilizar.

Após a identificação da melhor pressão para se realizar o experimento, e ajustes de pH e temperatura da solução de alimentação realizou-se o experimento de fracionamento onde amostras de permeado e concentrado foram coletadas para análise de proteína através do método de Lowry e por eletroforese, para verificar se houve a separação das proteínas. Os resultados desta etapa serão mostrados conforme a semelhança de geometria: as membranas planas (HN06, RZ04 e VCWP), a membrana espiral (MF-7002) e as membranas tubulares (UF-C20 e UF-C50).

4.2.1 Membranas HN06, RZ04 e VCWP

Em cada experimento foram utilizados dois litros de concentrado protéico purificado obtido na etapa de concentração e purificação. Nos testes com as membranas VCWP e RZ04 o concentrado foi aquecido a 40 °C, e acidificado ao pH de 4,6; para a membrana HN06, realizou-se o experimento a temperatura ambiente (25 °C) e pH de 6,3, nestas condições, segundo WONG *et al.* (1999), todas as variantes genéticas de β -Lg existem principalmente como um dímero estável de dois monômeros unidos por ligações não covalentes.

Os experimentos com as membranas RZ04, VCWP e HN06 foram realizadas com uma vazão de alimentação de 620 L.h⁻¹, e pressão transmembrana de 1,75 bar. A solução recirculou pelo sistema durante 20 minutos em modo de reciclo total, para garantir homogeneidade na solução e equilíbrio de temperatura então, a corrente de permeado foi retirada para outro tanque, e, após 30 minutos amostras de permeado e concentrado foram coletadas. Não foi possível reduzir o volume inicial à metade ou realizar DF devido às limitações do equipamento tais como: volume insuficiente no tanque de alimentação, área de membrana pequena, conduzindo a uma taxa de permeado muito baixa. Para estas membranas foram analisados apenas o fluxo permeado e a retenção.

Em um primeiro momento realizou-se a compactação das membranas com água destilada, os resultados estão apresentados na Figura 4.15. A pressão transmembrana utilizada foi de 3,25 bar, que foi a maior pressão que se conseguiu atingir para as três membranas. A compactação ocorreu durante o tempo suficiente para que as membranas apresentassem fluxo permeado constante: a membrana VCWP iniciou com um fluxo de 365 L.m⁻².h⁻¹ e após 25 minutos o fluxo baixou para 350 L.m⁻².h⁻¹, e assim permaneceu até o tempo de 40 minutos, onde foi considerado que a compactação havia ocorrido. A HN06 iniciou com um fluxo de 72 L.m⁻².h⁻¹ e após 30 minutos estabilizou-se em torno de 50 L.m⁻².h⁻¹. A RZ04 iniciou com um

fluxo de $250 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$ e após 20 minutos estabilizou-se em $210 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, e assim permaneceu até os 30 minutos onde, a compactação para esta membrana foi dada como encerrada.

Houve uma redução de fluxo inicial de 4; 30 e 16 % para as membranas VCWP, HN06 e RZ04, respectivamente. Este resultado evidencia diferenças na estrutura de cada membrana, que de certa forma influenciam os resultados de separação.

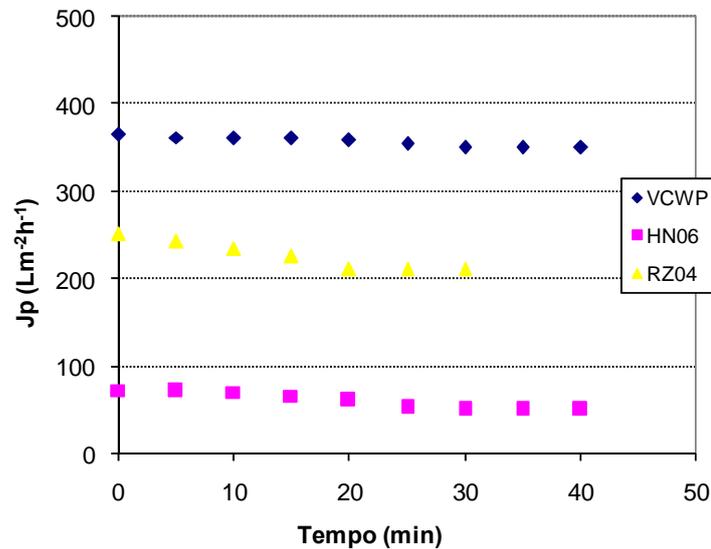


Figura 4.15: Fluxo permeado em função do tempo para os experimentos de compactação das membranas VCWP, HN06 e RZ04, vazão de alimentação 620 L.h^{-1} , $\Delta P = 3,25 \text{ bar}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A Figura 4.16 apresenta os resultados dos fluxos permeados da água e do concentrado protéico em função da pressão transmembrana para as membranas HN06, RZ04 e VCWP. Observa-se uma redução significativa do fluxo de concentrado protéico em relação ao fluxo de água pura para todas as membranas nas condições de operação empregadas, devido aos efeitos de polarização por concentração e *fouling*.

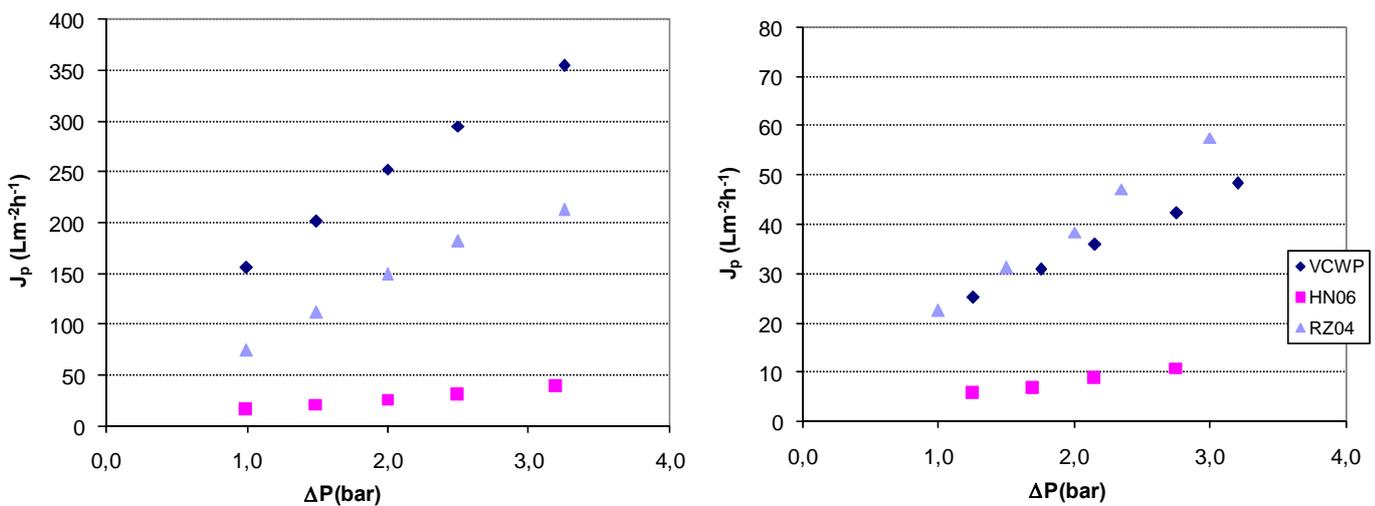


Figura 4.16: Fluxo permeado de água (esquerda) e de fluxo permeado de concentrado protéico (direita) em função da pressão transmembrana para as membranas VCWP, HN06 e RZ04, vazão de alimentação 620 L.h^{-1} , $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 4,6$ (VCWP e RZ04) e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 6,3$ (HN06).

Os fluxos permeados de concentrado protéico foram semelhantes para as membranas RZ04 e VCWP, sendo ligeiramente maior para a RZ04, em pressões mais elevadas; a membrana HN06 apresentou os menores fluxos permeados. Pode-se perceber a partir destes resultados, que apesar da membrana de MF apresentar maior tamanho de poro que a RZ04, para esta o fluxo permeado atingido foi relativamente elevado, ainda mais quando comparado com a membrana HN06. Estes resultados mostram que, além da geometria do módulo, do tamanho de poro nominal e MMC, outros fatores como o material da membrana, a distribuição dos tamanhos de poros, a porosidade, a espessura e a morfologia da membrana exercem uma grande influência sobre o fluxo permeado.

O fluxo permeado de água, após a realização dos experimentos, ou seja, com as membranas sujas, foi de 6,9; 40,4 e 51,6 L.m⁻².h⁻¹ para a HN06, RZ04 e VCWP, respectivamente; como o objetivo destes experimentos foi apenas verificar a retenção, não foi realizada limpeza nestas membranas.

A Tabela 4.1, apresenta os dados de concentração de lactose e proteína para as amostras de concentrado e permeado recolhidas dos experimentos com as membranas HN06, VCWP e RZ04. As amostras são identificadas com o nome da membrana seguida da letra “C” de concentrado e “P” de permeado. A amostra inicial é comum para todos os experimentos.

Tabela 4.1: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado das membranas VCWP, HN06 e RZ04.

| Amostras | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) * | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) * |
|----------|--|---|
| Inicial | 17,8 | 30,9 |
| HN06 C | 15,4 | 29,9 |
| HN06 P | 13,4 | 0,5 |
| VCWP C | 16,5 | 26,5 |
| VCWP P | 7,6 | 5,7 |
| RZ04 C | 16,9 | 28,4 |
| RZ04 P | 15,9 | 1,5 |

*precisão das medidas = ± 6 %.

Observa-se na Tabela 4.1 que as concentrações de lactose nas amostras de concentrado e permeado para a membrana HN06, são semelhantes e levemente inferiores ao teor da amostra inicial (que pode ser explicado pela precisão das medidas) mostrando que a membrana não é seletiva para a lactose - a retenção fica em torno de 13 %. A RZ04 apresenta uma retenção de aproximadamente 6 % para a lactose. Enquanto a VCWP, apesar de ter maior tamanho de poro nominal entre as três membranas testadas, é aquela que apresenta maior retenção para a molécula de lactose, cerca de 50 %; este resultado pode indicar que alguma interação membrana-lactose, possa estar ocorrendo. A influência do pH da solução poderia ser levantada como causa provável, no entanto a solução utilizada nos experimentos com a RZ04 também foi acidificada e a retenção para a lactose foi baixa.

Quanto às proteínas, as membranas HN06 e RZ04 mostraram alta retenção de proteínas mesmo possuindo MMC diferentes. Para a HN06 a retenção foi de 98 %, mas como a membrana possuía MMC de 20 kDa e a menor proteína que deveria permear possuía massa molar de 14 kDa, pode ter ocorrido *fouling* (bloqueio de poros, adsorção). Para a RZ04 apesar desta possuir MMC de 70 kDa, também houve retenção elevada para as proteínas, 94 %, evidenciando que, além do *fouling*, ainda podem estar ocorrendo interações entre os diferentes solutos presentes na solução, isto é, uma agregação das diferentes moléculas de proteína entre si ou com a lactose, o que impede a sua passagem para o permeado. A VCWP mostrou uma retenção de proteína um pouco inferior às outras duas membranas, 78 %. Esta era a membrana com maior tamanho de poro cerca de 0,1 μm (equivalente a 100 kDa), o que pode explicar a diferença de retenção. Assim como para as outras membranas planas, o experimento não foi levado por longo tempo, pois esta membrana apesar de ter tamanho de poro maior teve fluxos de permeado comparáveis a RZ04, mostrando que pode ter ocorrido alguma interação do material da membrana com a solução.

Todas as amostras de permeado e concentrado foram analisadas qualitativamente, através de eletroforese, para verificar se havia ocorrido separação das proteínas, mesmo que esta fosse mínima, os dados de concentração de proteína no permeado indicaram que o teor deste componente era baixo nesta fração. A Figura 4.17, mostra a fotografia do gel de eletroforese para as membranas planas, juntamente com a amostra inicial e ainda com uma amostra contendo os padrões protéicos (BSA, β -Lg e α -La) em quantidades conhecidas (50 μg por banda).

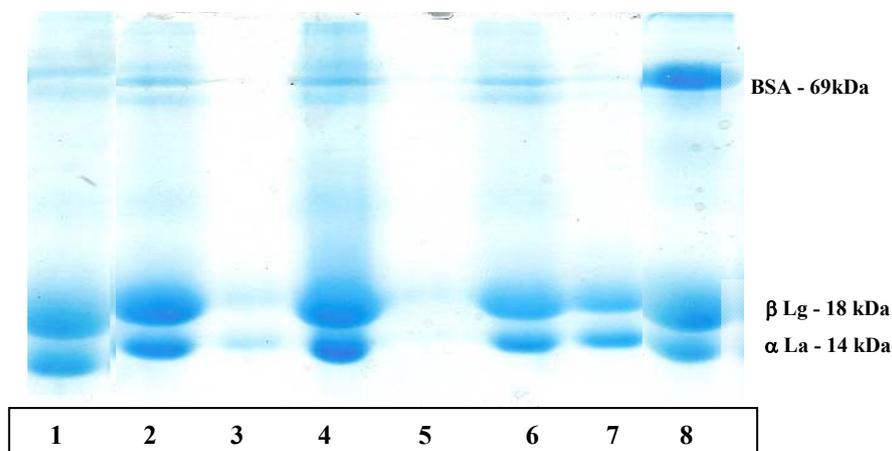


Figura 4.17: Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana HN06, RZ04, VCWP (100 V e 30 mA). **Legenda:** (1) Inicial; (2) HNO6C; (3) HN06P, (4) RZ04C, (5) RZ04P, (6) VCWPC, (7) VCWPP, (8) padrão.

Todas as amostras foram dissolvidas em tampão de corrida na proporção de 2:1, e foram realizadas diluições para que todas as canaletas tivessem a mesma quantidade de proteína. Por isso, as amostras de concentrado tiveram que ser diluídas para não saturar as canaletas da eletroforese em volume, e nem as bandas da canaleta em quantidade protéica, o que impediria a visualização das diferentes regiões onde cada proteína fixa-se no gel de eletroforese. Várias tentativas foram realizadas e concluiu-se que a melhor quantidade de proteína para visualização no gel seria de 50 μg e que o melhor volume a ser aplicado por canaleta seria de 15 μL , neste volume estão inclusos os 5 μL de tampão de corrida, portanto, o

volume de amostra aplicado por canaleta foi de 10 μL . Então, se a concentração de proteína na amostra era de 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, a amostra deveria ser diluída 6 vezes, para se obter uma concentração de 5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, ou 50 μg de proteína em um volume de 10 μL . As amostras de permeado não precisaram ser diluídas porque se encontravam nesta faixa de concentração, ou abaixo desta.

A concentração do gel de poliacrilamida permite visualização das proteínas na faixa de interesse (14 a 80 kDa), as proteínas com massa molar maior que esta faixa são empilhadas no início do gel (parte superior), por isto, além do sinal do BSA, percebe-se outros sinais bem próximos indicando a existência de outras proteínas conforme foi apresentado na revisão bibliográfica; como neste trabalho o interesse era identificar preferencialmente as proteínas α -La e β -Lg o fato de proteínas maiores apresentarem-se acumuladas não interfere nos resultados, mas no caso de separações de todas as proteínas, as amostras devem ser analisadas em géis com concentrações menores.

Observa-se no gel de eletroforese da Figura 4.17 que a amostra HN06P apresenta um sinal fraco para ambas as proteínas, β -Lg e α -La, indicando que não ocorreu uma separação efetiva destas, ou seja, as duas proteínas permearam pela membrana. Este sinal fraco também pode ocorrer devido a contaminação lateral das amostras das diferentes canaletas. A amostra RZ04P não apresenta sinal de nenhuma das proteínas de interesse, apesar de ter apresentado concentração de proteínas total levemente maior que a HN06 na quantificação pelo método de Lowry. Nenhuma destas duas membranas foi permeável ao BSA visto que a membrana HN06 possui MMC (20 kDa) inferior a massa molar da molécula de BSA (69 kDa); mas para a membrana RZ04 este resultado não é tão óbvio, pois a membrana possui MMC praticamente igual a massa molar do BSA, este resultado pode indicar que nos experimentos com a RZ04 todas as moléculas de proteína interagiram com a membrana ou entre si, já que nenhuma das três foi detectada no permeado, por esta análise. A membrana VCWP mostrou-se permeável as três proteínas, porém para a proteína BSA o sinal foi fraco quando comparado ao da amostra inicial, as outras duas moléculas mostraram concentrações semelhantes na amostra VCWPP. Mas como a β -Lg é duas vezes mais abundante que a α -La no concentrado, e isto pode ser visualizado no VCWPC, pode haver uma retenção menor da molécula de α -La pela membrana. Vale relembrar que o objetivo era que a retenção da β -Lg pela membrana fosse superior a da α -La, e que, portanto, a α -La predominasse no permeado, porém houve uma passagem de uma quantidade considerável da molécula de β -Lg, indicando que estas moléculas não estão se agregando em octômeros nas condições do experimento.

4.2.2 Membrana MF - 7002

Inicialmente realizou-se a compactação da membrana com água destilada, e como mostra a Figura 4.18, a pressão transmembrana utilizada foi de 3,25 bar, a maior pressão de operação que se conseguiu atingir para a MF-7002. A compactação ocorreu durante tempo suficiente para que a membrana apresentasse fluxo permeado constante. O experimento começou com um fluxo permeado de aproximadamente 640 $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ e após 100 minutos o fluxo baixou para 530 $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, e assim permaneceu até os 140 minutos, onde assumiu-se que não haveria diminuições significativas do fluxo, e que portanto a membrana estava compactada.

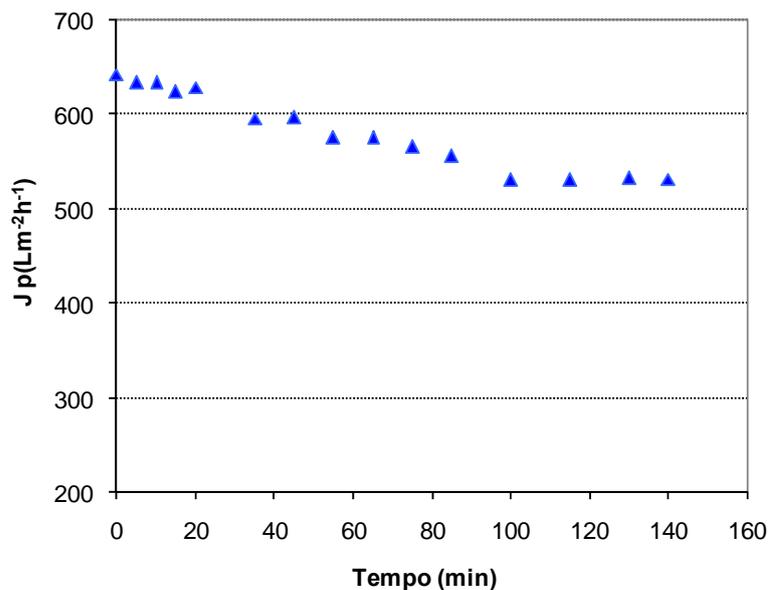


Figura 4.18: Compactação da membrana MF-7002, vazão de alimentação $700 L \cdot h^{-1}$, $\Delta P = 3,25 \text{ bar}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A Figura 4.19 apresenta o gráfico do fluxo permeado da água e do concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002. Observa-se que o fluxo de concentrado protéico é menor do que o fluxo de água pura para todas as pressões. Ainda é possível verificar comparando a Figura 4.16 e a Figura 4.19 que os fluxos de água da MF-7002 são comparáveis a VCWP - as duas membranas são de MF com tamanho de poro nominal de $0,1 \mu\text{m}$, apresentando diferenças na geometria do módulo, no material e na estrutura. Segundo ATRA *et al.* (2005), as membranas com MMC maior dão um fluxo mais elevado, porém são mais suscetíveis à polarização por concentração.

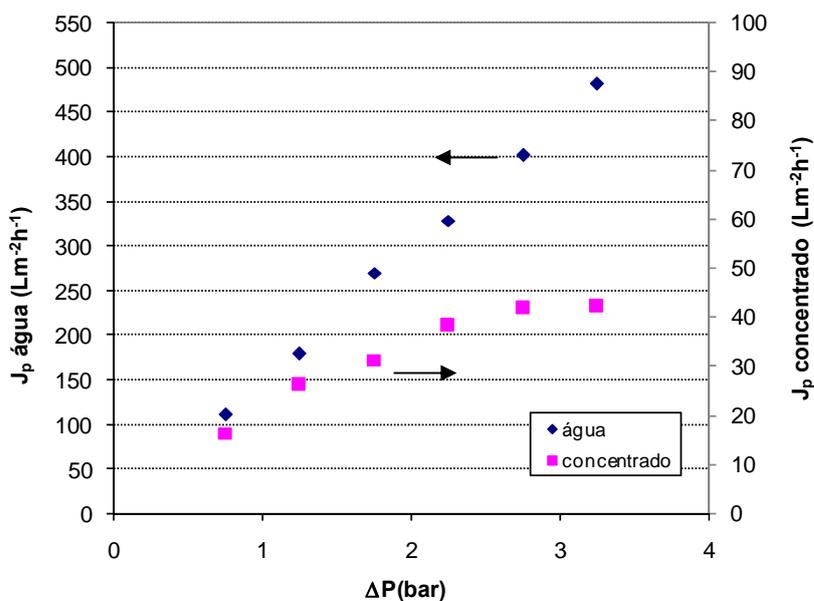


Figura 4.19: Fluxo de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão $700 L \cdot h^{-1}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,6$ (concentrado).

Um volume inicial de 6 L de concentrado protéico foi adicionado ao tanque de alimentação, aquecido a 40 °C e o pH ajustado para 4,6; o volume inicial de 6 L foi reduzido a 3 L, e em seguida quatro DFs de 3 L foram realizadas. A vazão de alimentação foi mantida em 700 L.h⁻¹ e ΔP em 1,75 bar, região em que podíamos garantir que o fluxo limite não havia sido atingido. O resultado de fluxo permeado em função do tempo está apresentado na Figura 4.20.

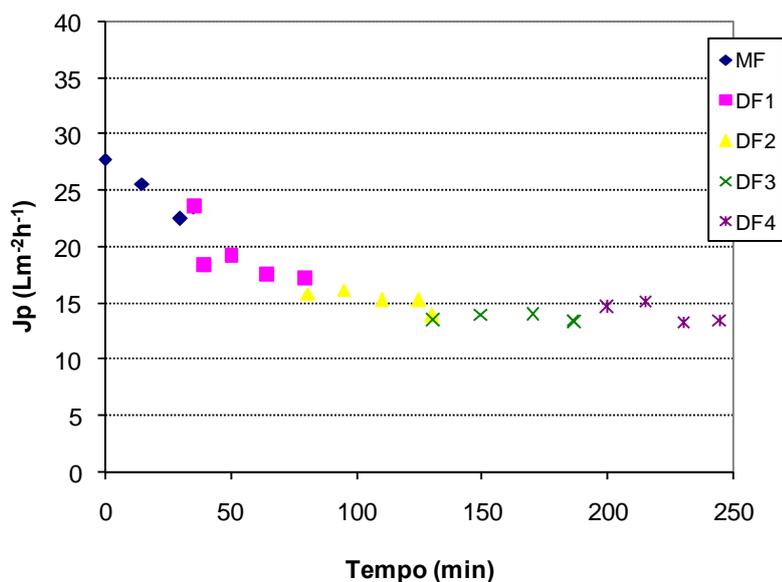


Figura 4.20: Fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão de alimentação 700 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6 e P = 1,75 bar.

Este foi um experimento rápido, sendo que em menos de 40 minutos havíamos reduzido o volume do tanque a metade. Durante as DF o fluxo inicial não foi restituído e o decréscimo permaneceu e se acentuou a cada etapa do processo. No final do experimento o fluxo de permeado caiu à metade do fluxo inicial, o que ocorre devido à formação de *fouling* e ainda devido a mudanças de propriedades da solução. Estes resultados podem ser atribuídos à deposição gradual de proteína e de moléculas similares na superfície da membrana que diminuem a transferência de massa através da membrana. As maiores moléculas podem ter adsorvido na superfície da membrana e proteínas menores podem ter adsorvido dentro dos poros, todos estes fatores podem modificar a retenção do processo.

A Tabela 4.2 apresenta os dados de concentração de lactose e proteína para a MF-7002, para a etapa de concentração MF e de DF. As amostras MFC1 e MFP1 correspondem, respectivamente, as amostras de concentrado e permeado no início da MF e as amostras MFC2 e MFP2 correspondem às amostras de concentrado e de permeado ao final da MF (quando haviam sido recolhidos 3 L de permeado). As amostras DF n C e DF n P, com n variando de 1 a 4, correspondem as amostras de concentrado e de permeado obtidas nas diafiltrações.

Tabela 4.2: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002.

| Amostras | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹)* | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹)* |
|----------|---|--|
| MFC1 | 17,5 | 21,4 |
| MFP1 | 12,3 | 7,6 |
| MFC2 | 19,6 | 22,4 |
| MFP2 | 3,6 | 6,9 |
| DF1C | 18,1 | 22,1 |
| DF1P | 9,4 | 6,7 |
| DF2C | 11,6 | 19,8 |
| DF2P | 7,1 | 7,3 |
| DF3C | 9,5 | 18,2 |
| DF3P | 5,0 | 4,9 |
| DF4C | 6,7 | 12,6 |
| DF4P | 4,6 | 5,6 |

*precisão das medidas = ± 6 %.

Na Tabela 4.2 observa-se que há retenção parcial de lactose, tanto nas amostras da MF, quanto da DF, variando de 80 %, na MF até 30 % ao final da DF4. Quanto à proteína na MF há retenção de 65 %, nas DFs a retenção diminui gradativamente atingindo ao final destas etapas 55 %.

A Figura 4.21 mostra a fotografia do gel de eletroforese feito para analisar a presença das diferentes proteínas nas amostras de concentrado e permeado do experimento com a membrana MF-7002. A exemplo do que foi realizado para as membranas planas, as amostras tiveram que ser diluídas para se obter uma boa visualização das proteínas no gel. A canaleta 1 corresponde ao padrão, formado por 50 µg das proteínas BSA, β-Lg e α-La em cada banda correspondente.

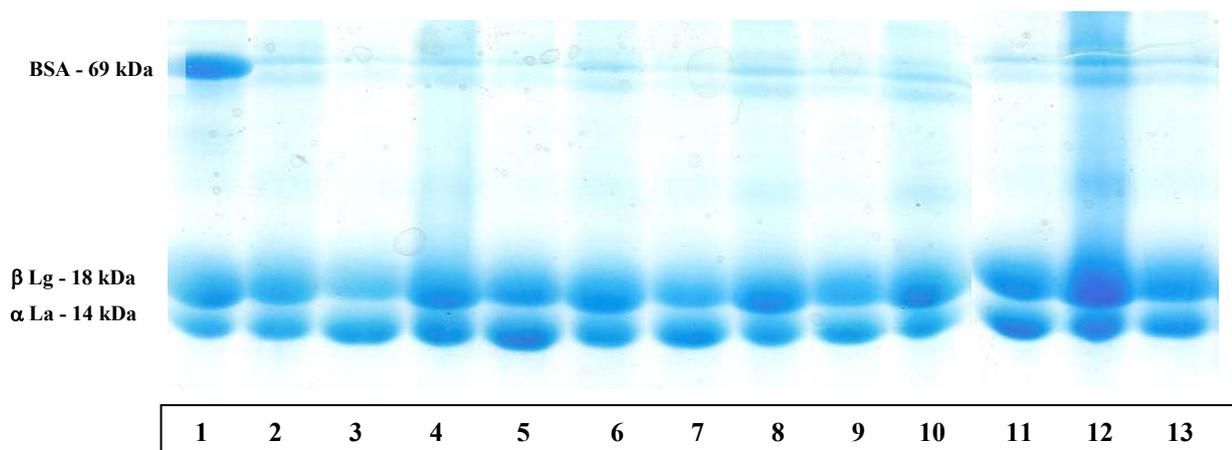


Figura 4.21: Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002 (100 V e 30 mA). **Legenda:** (1) padrão; (2) MFC1, (3) MFP1, (4) MFC2, (5) MFP2, (6) DF1C, (7) DF1P, (8) DF2C, (9) DF2P, (10) DF3C, (11) DF3P, (12) DF4C, (13) DF4P.

As canaletas 2 a 13 mostram as amostras obtidas no experimento, mostrando as etapas de concentração e de DF. Em um primeiro momento, em alguns casos, tem-se a impressão de que as concentrações das duas proteínas estão iguais, porém analisando cuidadosamente observa-se que as quantidades estão variando. O software do programa Kodak 1D[®] para análise de géis eletroforéticos foi utilizado para realizar a densitometria de cada banda, e assim obter uma noção de quanto de cada proteína estava presente no permeado. O princípio do programa baseia-se em transformar a intensidade de cor de cada banda em uma curva gaussiana, e a partir do cálculo da área desta curva, permite identificar qual é a proteína que predomina em cada canaleta. Os resultados de intensidade do modelo e intensidade relativa encontram-se no Anexo B. Os resultados da densitometria realizada no gel de eletroforese encontram-se na Tabela B.21.

Tabela 4.3: Dados de intensidade relativa (em porcentagem) correspondendo a quantidade de proteína em cada banda eletroforética das amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002.

| Proteínas | Intensidade Relativa (%) | | | |
|------------------|--------------------------|------|------|------|
| | MFC1 | MFP1 | MFC2 | MFP2 |
| outras proteínas | 16 | 3 | 14 | 3 |
| β-Lg | 51 | 47 | 53 | 39 |
| α-La | 33 | 50 | 33 | 58 |
| | DF1C | DF1P | DF2C | DF2P |
| outras proteínas | 8 | 4 | 9 | 8 |
| β-Lg | 56 | 65 | 70 | 73 |
| α-La | 36 | 31 | 21 | 19 |
| | DF3C | DF3P | DF4C | DF4P |
| outras proteínas | 8 | 5 | 19 | 4 |
| β-Lg | 73 | 66 | 58 | 70 |
| α-La | 19 | 29 | 23 | 25 |

A amostra MFC1 apresentou os seguintes percentuais: 51 % de β-Lg; 33 % de α-La e 16 % de outras proteínas, representadas no gel de eletroforese pelo BSA. Estes valores estão próximos ao da teoria, pois segundo MILLER *et al.* (2000) metade das proteínas totais do soro correspondem a β-Lg, e 25 % correspondem a α-La. Na amostra MFP1, que é o primeiro permeado recolhido da MF-7002, encontramos 47 % de β-Lg; 50 % de α-La e 3 % de outras proteínas, mostrando que a α-La apesar de estar presente em menor concentração no retido, teve sua passagem preferencial para o permeado no início do experimento, indicando que a mudança de pH beneficiou a agregação da β-Lg mesmo que esta agregação tenha sido parcial, porque esta proteína também foi encontrada no permeado.

Comportamento semelhante ao anterior foi encontrado para amostra MFC2 (53 % de β-Lg; 33 % de α-La e 14 % de outras) e para a amostra MFP2 (38 % de β-Lg; 58 % de α-La e 3 % de outras).

Quando iniciaram as diafiltrações, porém observou-se que a passagem de β -Lg aumentou no permeado: na DF1P encontramos 65 % de β -Lg; 31 % de α -La e 43 % de outras proteínas; enquanto na DF1C temos 56 % de β -Lg; 36 % de α -La e 8 % de outras proteínas. Observa-se que a β -Lg está em maior quantidade no permeado do que a α -La, mostrando que a partir deste momento a membrana não retém nenhuma das duas proteínas o que torna o processo de fracionamento ineficiente. Para as diafiltrações 2, 3 e 4 o mesmo comportamento é observado chegando-se a encontrar no permeado mais de 70 % de β -Lg.

Este fato pode ter ocorrido devido ao efeito de diluição, porque enquanto estávamos apenas concentrando a solução havia uma passagem maior de α -La. Alguns mecanismos da agregação da β -Lg em octômeros podem sofrer interferência devido à adição de água.

4.2.3 Membrana UF - C50

Inicialmente realizou-se a compactação da membrana com água destilada, como mostra a Figura 4.22, a pressão transmembrana utilizada foi de 3,75 bar, a maior pressão que se conseguiu atingir para a UF-C50. Após os primeiros 15 minutos o fluxo permeado inicial de $2.200 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, baixou para $2.100 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, e assim permaneceu até os 35 minutos, considerou-se que o fluxo permeado era constante e que a compactação havia ocorrido.

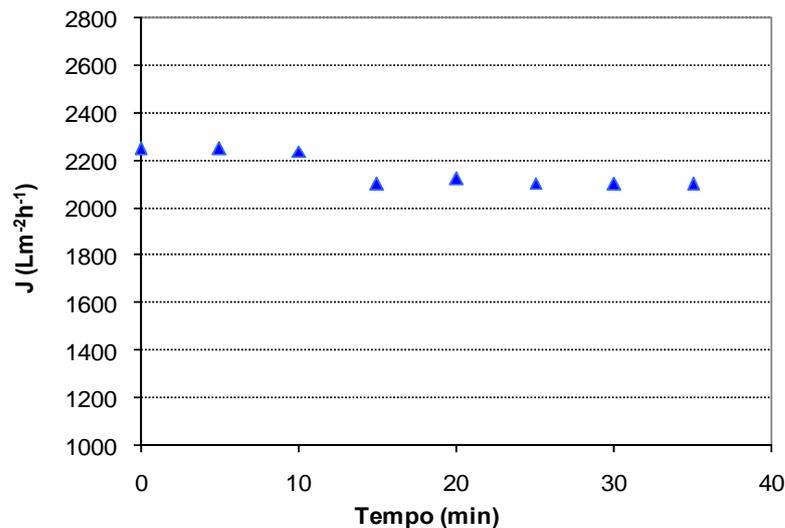


Figura 4.22: Fluxo permeado de água versus tempo do experimento de compactação da membrana UF-C50; vazão de alimentação 400 L.h^{-1} , $\Delta P = 3,75 \text{ bar}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A Figura 4.23 apresenta os gráficos do fluxo permeado da água e o gráfico do fluxo de concentrado protéico (em dois pHs diferentes) em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50.

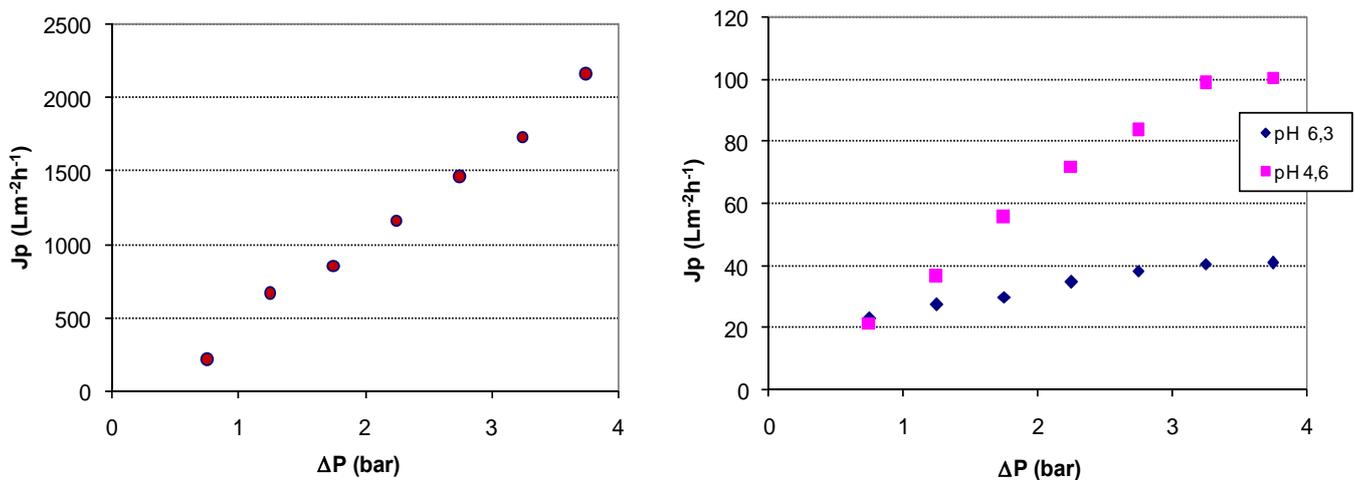


Figura 4.23: Fluxos permeados de água (esquerda) e de concentrado protéico (direita) em dois pHs (4,6; 6,3) em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, vazão de alimentação 400 L.h⁻¹, T = 40 e 25 °C (concentrado).

Para a membrana UF-C50 foram realizadas duas estratégias: na estratégia 1 o pH da solução foi mantido em 6,3; a temperatura em 25 °C; na estratégia 2 o pH da solução foi acidificado até 4,6; e a temperatura utilizada foi de 40 °C.

Pela comparação dos resultados apresentados na Figura 4.23 observa-se que o fluxo de concentrado protéico é menor do que o fluxo de água pura para todas as pressões e para as duas soluções de concentrado protéico; além disso, o fluxo permeado de água tem valor superior ao fluxo de todas outras membranas testadas, mesmo das membranas de MF, indicando que esta membrana possui uma porosidade elevada. Os fluxos permeados de concentrado protéico são muito menores que os fluxos de água, cerca de 20 vezes menores para o concentrado com pH 4,6 (40 °C) e 50 vezes menores para o pH 6,3 (25 °C).

A diferença de fluxo entre as soluções de concentrado protéico, que são idênticas nas concentrações iniciais dos seus componentes sólidos, se deve ao pH e à temperatura, que ocasionam um fluxo no mínimo duas vezes maior da solução de pH mais ácido e temperatura mais elevada. Esta diferença pode ser explicada pelo efeito combinado de pH e temperatura que implica em diferentes interações entre os componentes do soro e entre os componentes do soro e a membrana, além de influenciar também nas propriedades físicas (viscosidade dinâmica, massa específica) e nas características reológicas da solução (propriedades de transporte como a viscosidade cinemática e a difusividade mássica).

CHOLLANGI & HOSSAIN (2006) encontraram em seu trabalho que o fluxo permeado a 40 °C é ligeiramente mais elevado do que o fluxo permeado na temperatura ambiente. O efeito da temperatura no fluxo permeado pode ser compreendido avaliando-se as propriedades da alimentação. Aumentando-se a temperatura há uma diminuição na viscosidade dinâmica do soro, tendo por resultado um aumento no fluxo de permeado, além disso, a temperatura exerce um efeito sobre a difusividade mássica do soluto e a taxa do transporte dos solutos da superfície da membrana para o seio da solução.

Ainda é possível perceber que para a solução com pH 4,6 (40°C) a partir da pressão transmembrana de 3,25 bar, e para a solução com pH 6,3 (25°C) a partir da pressão de 2,75 bar, um aumento na pressão não ocasiona aumento do fluxo permeado indicando que o fluxo limite pode ter sido atingido. Este fenômeno está no acordo com dados da literatura, ATRA *et al.* (2005), nas suas pesquisas, observaram que acima de uma pressão transmembrana limite (2 - 4 bar) o fluxo tornou-se independente da pressão. Segundo estes autores, as moléculas da proteína depositadas na superfície da membrana causaram uma concentração de polarização controlada por dois fatores: tipo de membrana e velocidade do fluxo de alimentação. CHOLLANGI & HOSSAIN (2006) observaram que o fluxo permeado aumentou até uma pressão transmembrana de 2 bar, em seguida diminuiu quando a pressão aumentou de 2 para 3 bar.

O gráfico de fluxo permeado em função do tempo é apresentado na Figura 4.24. Para ambas as estratégias a ΔP foi mantida em 2,25 bar e a vazão de alimentação em 400 L.h⁻¹. A pressão transmembrana de operação foi escolhida de forma a garantir que o fluxo limite não seja atingido. O volume inicial no tanque era de 3 L e o experimento foi encerrado quando um litro de permeado foi coletado.

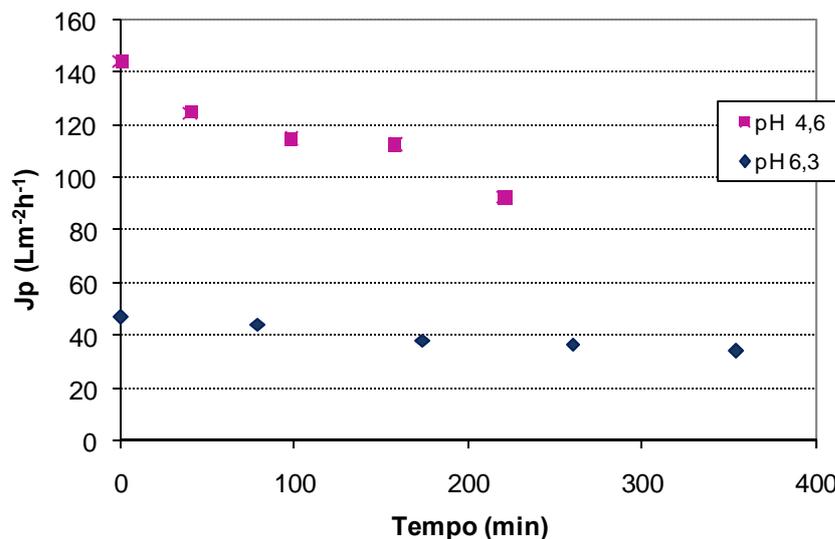


Figura 4.24: Fluxo permeado de concentrado protéico em pHs e temperaturas diferentes em função do tempo para a membrana UF-C50, vazão de alimentação 400 L.h⁻¹ e $\Delta P = 2,25$ bar.

O fluxo para a solução com pH 6,3 (25°C) é menor que o fluxo da solução com pH 4,6 (40°C) durante todo período do experimento. A solução com pH 6,3, mantém o fluxo entre 50 e 35 L.m⁻².h⁻¹, e o experimento foi mantido durante cerca de 350 minutos, o tempo necessário para que se coletasse o volume de permeado pré-estabelecido. A solução ácida, iniciou o experimento com fluxo de 145 L.m⁻².h⁻¹ e após 210 minutos, ao coletarmos um litro de amostra, o fluxo decaiu para 90 L.m⁻².h⁻¹, mostrando que apesar de o fluxo ser maior neste pH, os fenômenos de *fouling* e concentração por polarização foram mais acentuados provocando o decaimento de fluxo permeado mais expressivo.

A Tabela 4.4 apresenta os dados de pH, temperatura, concentração de lactose e proteína para a UF-C50.

Tabela 4.4: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h^{-1} .

| Tempo de experimento(min) | Amostras | Concentração de Proteína (g.L^{-1})* | Concentração de Lactose (g.L^{-1})* | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) |
|---------------------------|--------------|---|--|-----|--------------------------|
| 0 | 50 inicial 1 | 27,6 | 10,1 | 6,3 | 25 |
| 175 | 50 C11 | 27,2 | 12,4 | 6,2 | 25 |
| 175 | 50 P11 | 1,5 | 4,8 | 6,3 | 25 |
| 355 | 50 C12 | 28,1 | 13,0 | 6,3 | 25 |
| 355 | 50 P12 | 1,4 | 5,4 | 6,3 | 25 |
| 0 | 50 inicial 2 | 28,2 | 14,3 | 4,6 | 40 |
| 98 | 50 C21 | 28,2 | 12,1 | 4,6 | 40 |
| 98 | 50 P21 | 1,2 | 10,5 | 4,8 | 40 |
| 221 | 50 C22 | 28,9 | 14,5 | 4,6 | 40 |
| 221 | 50 P22 | 1,1 | 11,9 | 4,6 | 40 |

*precisão das medidas = $\pm 6 \%$.

Legenda: 50 inicial 1- amostra inicial em pH 6,3; 50C11 e 50P11 – primeiras amostras de concentrado e de permeado coletadas em pH 6,3; 50C12 e 50P12 – últimas amostras de concentrado e de permeado coletadas em pH 6,3; 50 inicial 2- amostra inicial em pH 4,6; 50C21 e 50P21– primeiras amostras de concentrado e de permeado coletadas em pH 4,6; 50C22 e 50P22– últimas amostras de concentrado e de permeado coletadas em pH 4,6.

Observa-se na Tabela 4.4 que a concentração de lactose no permeado das soluções a pH 6,3 (50P11 e 50P12) é de cerca de 5 g.L^{-1} , enquanto no retido (50C11 e 50 C12) e na amostra inicial (50 inicial 1), a concentração é cerca de 12 g.L^{-1} , indicando uma retenção de cerca de 60 %. Nas amostras em pH 4,6 a lactose encontra-se igualmente distribuída entre o retido (50C21 e 50C22) e permeado (50P21 e 50P22), mostrando que a retenção para esta molécula está próxima de zero. Quanto à concentração de proteínas, tanto para a solução a pH 4,6 quanto para a solução a pH 6,3, a concentração no permeado ficou em torno de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto nas amostras iniciais e de concentrado ela é cerca de 28 g.L^{-1} .

A Figura 4.25 mostra a fotografia do gel de eletroforese das amostras de concentrado e permeado para a UF-C50. Assim como foi realizado para as outras membranas, as amostras de concentrado foram diluídas para melhor visualização das proteínas no gel. A canaleta 1 corresponde ao padrão, formado por $50 \mu\text{g}$ de cada uma das três proteínas, as canaletas 2, 3 e 4 correspondem às amostras da solução com pH 6,3 e as canaletas 5, 6 e 7 correspondem às amostras da solução com pH 4,6.

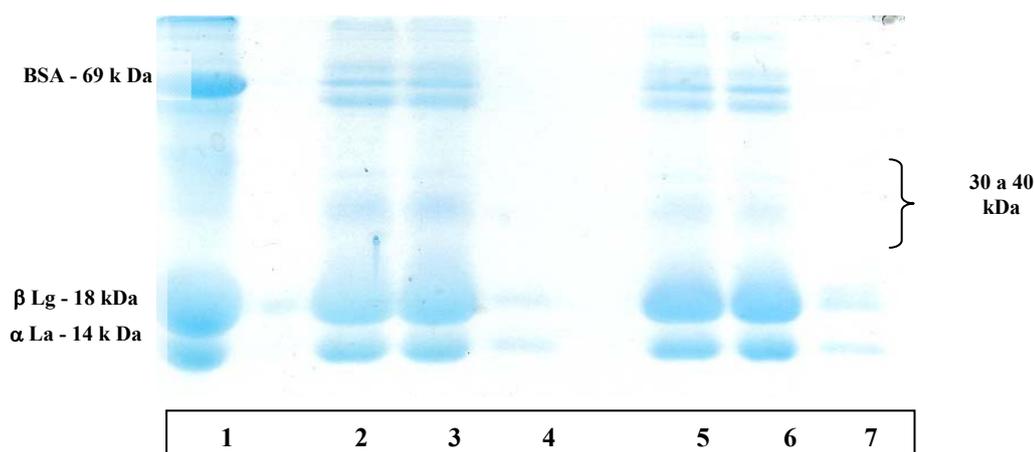


Figura 4.25: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado obtidos nos experimentos com a membrana UF-C50 (100 V e 30 mA). **Legenda:** (1) padrão; (2) 50 inicial 1, (3) 50C12, (4) 50P12, (5) 50 inicial 2, (6) 50C22, (7) 50P22.

A primeira observação que pode ser feita é que há uma passagem de proteína irrelevante nas amostras de permeado tanto para a solução com pH 6,3 (canaleta 4 – 50P12) quanto para o permeado da solução a pH 4,6 (canaleta 7 – 50P22), mostrando que a mudança de pH combinada com a temperatura não influenciou a passagem de proteína, ocorrendo em ambos os casos retenção protéica total. Este fato é comprovado, comparando a canaleta 2 com a 3, observa-se que as bandas das duas canaletas referidas possuem grande semelhança apesar de representarem amostras diferentes, uma é a amostra inicial de concentrado protéico, antes de ser iniciado o experimento, e a outra representa a amostra de retido ao final do experimento onde haviam sido coletados 1000 mL de permeado. O mesmo comentário é válido para as amostras 50inicial2 e 50C22 (canaletas 5 e 6).

Um fato interessante a respeito das amostras em pH ácido é que no gel de eletroforese entre as bandas correspondentes ao BSA e a β -Lg não são observados sinais de outras proteínas como é observado no pH 6,3. Como as amostras para ambos os pHs foram analisadas no mesmo gel e, portanto, com condições idênticas de corrente e voltagem, além de mesmo tempo de corrida; de revelação com o mesmo corante e ao mesmo tempo; amostras iniciais para os dois experimentos idênticas em composição, diferenciadas apenas pela mudança de pH (realizada para acidificar uma delas a 4,6), verifica-se que existe uma mudança da conformação protéica entre as amostras devido a influência do pH. HONG *et al.* (2002) também encontraram estes sinais intermediários entre as bandas do BSA e da β -Lg no pH de 6,3, e consideraram que eles correspondem a conformações que as proteínas adquirem no soro, como por exemplo, os dímeros da β -Lg, que possuem estabilidade maior do que o monômero e que mesmo sob condições desnaturantes, como no caso do gel com SDS, permanecem em forma de dímeros neste pH. Por isso, no gel de eletroforese a molécula de β -Lg forma um rastro na região correspondente a 30 e 40 kDa, porque os dímeros possuem massa molar de 36 kDa. Em pHs ácidos (abaixo de 5,0) as moléculas tendem a se agrupar em octômeros que são menos estáveis e, por isso, tornam-se mais suscetíveis a se romperem, o que faz com que no gel de eletroforese haja poucos sinais entre a banda do BSA e da β -Lg, porque neste caso a desnaturação do gel SDS é suficiente para que as moléculas de β -Lg fiquem na forma de monômeros e, portanto, empacotadas na região correspondente a esta molécula.

4.2.4 Membrana UF - C20

Na membrana UF-C20 a exemplo das outras membranas realizou-se a compactação da membrana com água destilada, os resultados estão apresentados na Figura 4.26, a pressão transmembrana utilizada foi de 3,75 bar. Após 20 minutos o fluxo permeado inicial de $750 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, baixou para $690 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, permanecendo assim até os 40 minutos, quando assumiu-se que a compactação havia ocorrido.

Para a membrana UF-C20 o volume inicial de concentrado purificado no tanque de alimentação foi igual a 3 L e o experimento foi conduzido até que 1 L de permeado fosse coletado. O pH da solução foi mantido em 6,3 e a temperatura em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a ΔP foi mantida em 2,25 bar e a vazão de alimentação em 620 L.h^{-1} . Para verificar se não havia interações que interfeririam no fracionamento devido ao fator de concentração foi testada ainda na membrana UF-C20 a tentativa de fracionamento com a solução do soro diluída, (sem ser soro concentrado e purificado). Os parâmetros operacionais de pH, temperatura da solução, ΔP , vazão de alimentação, volume inicial e quantidade permeado coletado utilizados nesta estratégia foram idênticos aos usados no experimento com concentrado protéico.

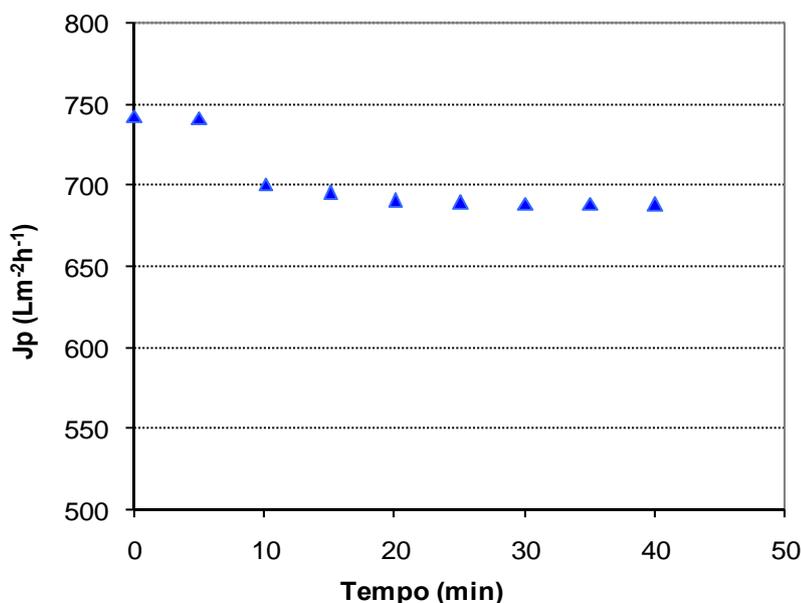


Figura 4.26: Compactação da membrana UF-C20, vazão de alimentação 620 L.h^{-1} , $\Delta P = 3,75 \text{ bar}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os gráficos de fluxo de água e fluxo de soro e concentrado protéico em função da pressão transmembrana são apresentados na Figura 4.27. Pela análise da figura observa-se que o fluxo de água é maior que o fluxo de soro e de concentrado protéico para todas as pressões, além disso, o comportamento do fluxo de soro e de concentrado protéico é o mesmo, porém o fluxo de soro é maior que o de concentrado protéico em todas as pressões transmembranas testadas. Este fato pode ser explicado pelas diferenças de propriedades, como viscosidade dinâmica e massa específica existentes entre estas duas soluções.

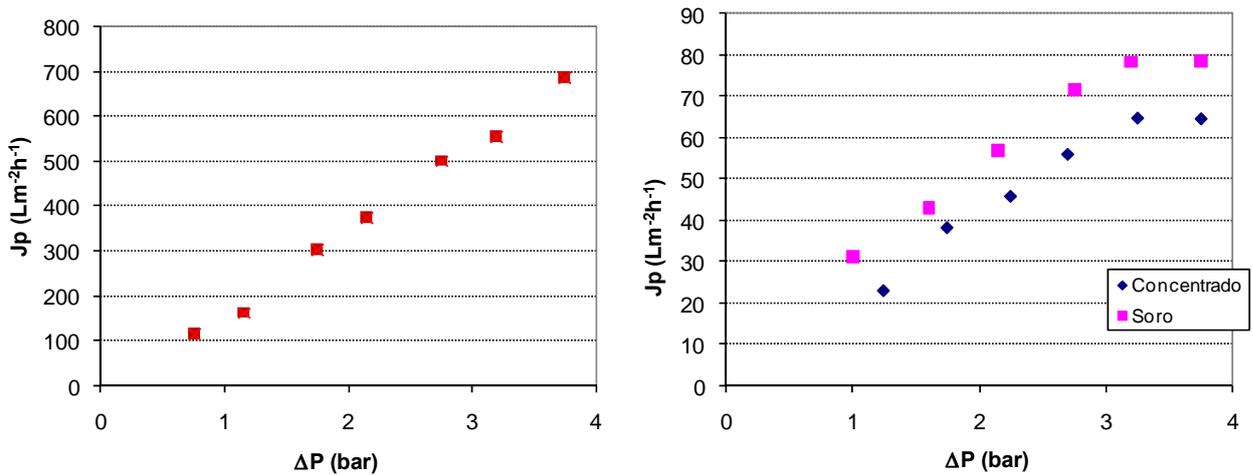


Figura 4.27: Fluxo permeado de água (esquerda) e de concentrado protéico e de soro (direita) em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, vazão de alimentação $620 L \cdot h^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ C$, $pH = 6,3$.

O gráfico de fluxo permeado em função do tempo é apresentado na Figura 4.28. Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições de operação: $620 L \cdot h^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ C$, $pH = 6,3$ e $\Delta P = 2,25 \text{ bar}$.

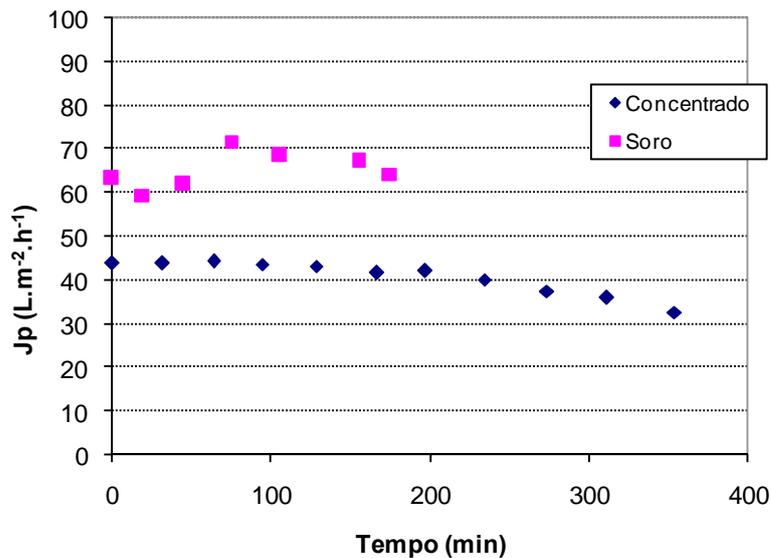


Figura 4.28: Fluxo permeado de soro diluído e de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20; condições de operação: vazão de alimentação = $620 L \cdot h^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ C$, $pH = 6,3$ e $\Delta P = 2,25 \text{ bar}$.

É possível observar que o fluxo de concentrado protéico é menor que o de soro em todo o experimento, portanto para coletar um litro de permeado o experimento com soro demorou menos de 200 minutos, já para o concentrado durou cerca de 350 minutos. O fluxo permeado de soro variou bastante entre 60 e $70 L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$, e não apresentou o comportamento que vinha sendo observado para os outros casos. Este fato pode ser explicado porque a solução de soro possui viscosidade dinâmica menor que a do concentrado. A solução de

concentrado apresenta fluxo inicial de $45 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$, este fluxo vai diminuindo e no final do experimento este fluxo decaiu para $30 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$.

A Tabela 4.5 apresenta os dados de pH e concentração de lactose e proteína para as amostras de concentrado e permeado da solução de concentrado protéico e da solução de soro, para a membrana UF-C20.

Tabela 4.5: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico e para o soro diluído para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| Tempo de experimento (min) | Amostras | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | pH |
|-----------------------------|----------|---|--|------|
| <i>Concentrado protéico</i> | | | | |
| 0 | C01 | 15,5 | 9,6 | 6,28 |
| 172 | CC1 | 18,7 | 11,8 | 6,28 |
| 172 | CP1 | 0,1 | 7,2 | 6,28 |
| 360 | CC2 | 17,7 | 13,1 | 6,28 |
| 360 | CP2 | 0,7 | 8,2 | 6,16 |
| <i>Soro diluído</i> | | | | |
| 0 | UFC01 | 10,7 | 58,3 | 6,28 |
| 75 | UFC1 | 10,5 | 59,3 | 6,26 |
| 75 | UFP1 | 0,1 | 51,2 | 6,26 |
| 175 | UFC2 | 11,7 | 57,4 | 6,29 |
| 175 | UFP2 | 0,2 | 47,9 | 6,21 |

*precisão das medidas = ± 6 %.

Legenda: C01- amostra inicial de concentrado protéico; CC1 e CP1 – primeiras amostras de concentrado e de permeado coletadas do concentrado protéico; CC2 e CP2 – últimas amostras de concentrado e de permeado coletadas do concentrado protéico; UFC01- amostra inicial de soro diluído; UFC1 e UFP1– primeiras amostras de concentrado e de permeado coletadas do soro diluído; UFC2 e UFP2– últimas amostras de concentrado e de permeado coletadas do soro diluído.

Observa-se, quanto à lactose, para o concentrado protéico, que a concentração no permeado e no retido é semelhante, mostrando que a membrana não é seletiva para esta substância. O mesmo é observado para o soro, ou seja, a retenção da lactose é baixa, porém esta concentração é mais elevada que na solução de concentrado, pois esta solução não passou pelas etapas de purificação. Quanto à proteína, para ambos os casos, observamos que no permeado a concentração é muito baixa, menor que 1 g.L^{-1} , indicando que não houve a passagem significativa de proteína para esta corrente.

A Figura 4.29 apresenta a fotografia do gel de eletroforese das amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C20. Assim como foi realizado para as outras membranas, as amostras de concentrado foram diluídas. A canaleta 1 corresponde ao padrão, a canaleta 2 refere-se à amostra inicial de concentrado protéico (C01) e as canaletas 3 e 4 correspondem às amostras de concentrado (CC2) e permeado (CP2) ao fim do experimento; a canaleta 5 corresponde à amostra inicial de soro (UFC01) e as canaletas 6 e 7 correspondem

às amostras de concentrado (UFC2) e permeado (UFP2) desta solução. Como não houve passagem expressiva de proteína durante o experimento optou-se por apresentar apenas nos géis de eletroforese as amostras inicial, da solução original, e as finais de concentrado e permeado omitindo as análises eletroforéticas das amostras intermediárias (CC1 e CP1; UFC1 e UFP1).

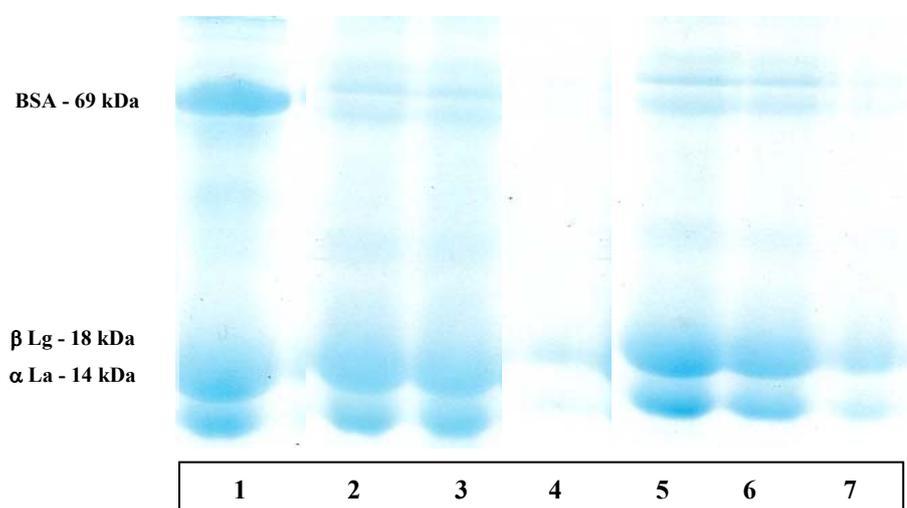


Figura 4.29: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C20 (100 V e 30 mA). **Legenda:** (1) padrão; (2) C01, (3) CC2, (4) CP2, (5) UFC01, (6) UFC2, (7) UFP2.

Pela análise da Figura 4.29 observa-se que não ocorreu a passagem das proteínas β -Lg e α -La, indicando que o fracionamento não ocorreu nesta membrana. Estes dados corroboram os resultados apresentados na Tabela 4.5.

4.2.5 Comentários gerais sobre o fracionamento das proteínas

Como pôde ser observado anteriormente o processo de fracionamento não ocorreu para as membranas HN06, RZ04, UF-C50 e UF-C20, e ocorreu parcialmente para as membranas MF-7002 e VCWP. Como o fracionamento esperado era baseado na polimerização da β -Lg em dímeros no pH neutro e em octômeros no pH ácido (4,6), fez-se necessário a confirmação desta hipótese pela análise das amostras de soro por cromatografia gel. A Figura 4.30 apresenta o resultado da cromatografia gel para a amostra de soro em pH 7,0, enquanto a Figura 4.31 apresenta o resultado da cromatografia gel em pH 4,6.

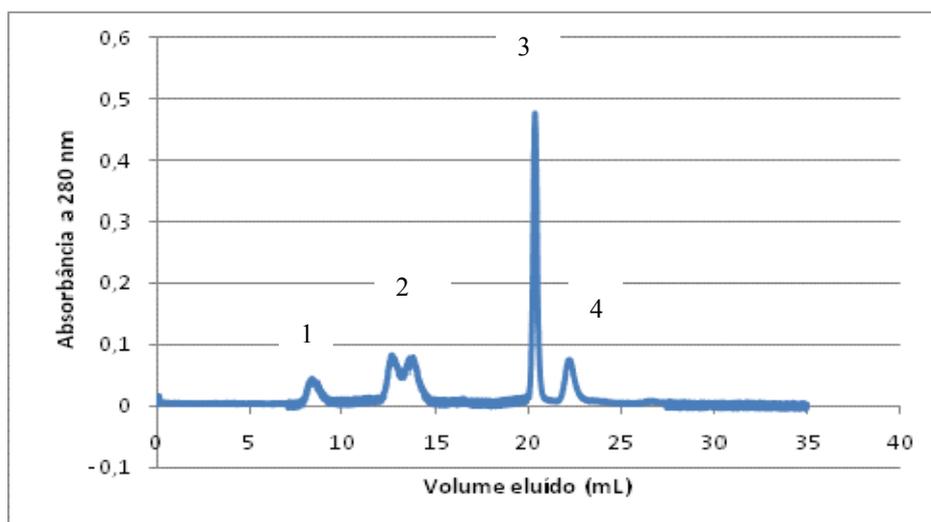


Figura 4.30: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose™ 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹; amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm. **Legenda:** (1) BSA, (2) β-Lg, (3) β-Lg, (4) α-La

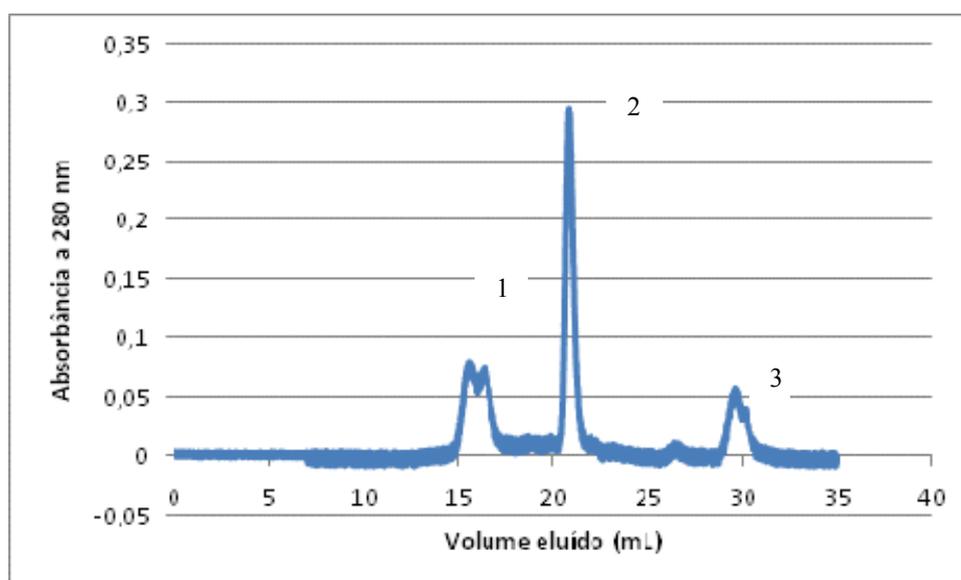


Figura 4.31: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose™ 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹, amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm. **Legenda:** (1) β-Lg, (2) β-Lg, (3) α-La.

Devido à baixa força iônica do eluente usado, interações hidrofóbicas significativas ocorreram entre a matriz da coluna e as proteínas, tendo por resultado um tempo mais longo de eluição e menor massa molar observada. Não foi possível obter a massa molar exata pela cromatografia gel, por isso, as frações obtidas nesta técnica foram analisadas por eletroforese como mostra a Figura 4.32.

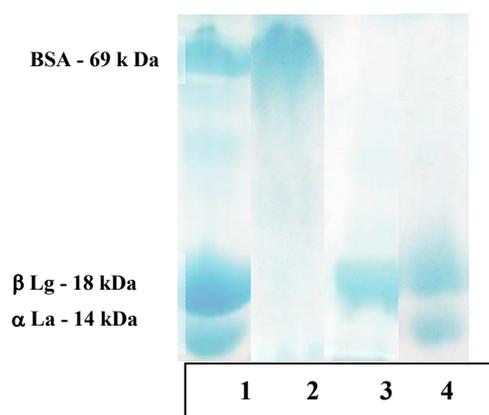


Figura 4.32: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para a amostra de soro analisada por cromatografia gel (100 V e 30 mA). Legenda: (1) padrão; (2) pico 1, (3) pico 2, (4) picos 3 e 4 (referentes à Figura 4.30).

A Figura 4.30 e a Figura 4.31 possuem o mesmo comportamento, porém ocorre na última um deslocamento dos sinais, que se deve aos diferentes tampões utilizados em cada corrida e as diferentes interações destes com a resina da coluna cromatográfica, por este motivo, na eletroforese só foi analisado uma das amostras. Na Figura 4.30 o pico 1 corresponde ao BSA, os picos 2 e 3 podem corresponder à β -Lg em forma de dímero e monômero, respectivamente, e o pico 4 pode corresponder à α -La, resultado que é corroborado na eletroforese mostrada na Figura 4.32. Na Figura 4.31, os picos 1 e 2 possivelmente correspondam à β -Lg em forma de dímero e monômero, respectivamente, e o pico 3 à α -La.

Segundo CHEANG & ZYDNEY (2004), o duplo pico da β -Lg (que pode ser observado no sinal 2 da Figura 4.30 e no sinal 1 da Figura 4.31) acontece devido à pequena diferença das duas variantes desta proteína.

No pH 7,0, Figura 4.30, observa-se que possivelmente a β -Lg se apresente parte em dímeros e parte em monômeros, ou seja, uma parte desta proteína pode estar desnaturada, e, por isso, nem todas as suas moléculas encontram-se em dímeros (a sua configuração mais estável neste pH).

No pH 4,6, Figura 4.31, observa-se que não foram registrados octômeros da proteína β -Lg pela análise da cromatografia gel assim como no pH 7,0 esta provavelmente se encontra em forma de dímeros e monômeros. Também é possível observar que não existe o pico do BSA, que deve ter precipitado neste pH, que é próximo ao seu ponto isoelétrico e adicionalmente, segundo KEHOE *et al.* (2007) a taxa de desnaturação do BSA aumenta com o aumento da concentração das proteínas do soro.

No entanto, alguma agregação das proteínas de β -Lg deve ocorrer no pH 4,6, porque as membranas MF-7002 e VCWP apresentaram retenção parcial para esta molécula. A ausência de octômeros na cromatografia gel pode indicar que esta conformação é menos estável que a de dímeros, fato que foi observado anteriormente na análise do gel da Figura 4.25. Portanto, efeitos de diluição e aumento da concentração de proteínas na solução podem ter ocasionado a desagregação da β -Lg, pois após o início da DF foi observado um aumento

da concentração de β -Lg no permeado, para os experimentos com a membrana MF-7002. Caso não ocorra a formação de octômeros, podem ocorrer interações entre os diferentes componentes da solução provocando retenção maior de um ou outro componente.

O que de fato pode ser observado na cromatografia gel, é que parte da β -Lg pode encontrar-se em forma de monômeros, o que indica que uma prévia desnaturação protéica irreversível das moléculas de β -Lg pode ter ocorrido em algum momento do processamento do soro em pó. Mudanças físico-químicas nas diferentes frações protéicas são conduzidas por tratamentos térmicos, o soro em pó sofre três tipos de tratamento de calor: pasteurização, concentração por evaporação e secagem por *spray drier*. Segundo SGARBIERI (1996), as proteínas são relativamente termolábeis, mas a pasteurização não desnatura as proteínas, pois o leite é aquecido a 72 °C por apenas 15 segundos. Porém, provavelmente algumas proteínas são inativadas e desnaturadas por tratamentos de calor mais severos, como por exemplo, a concentração por evaporação e a secagem por *spray drier*. KEHOE *et al.* (2007), afirmam que as proteínas devem ser liofilizadas ao invés de secas em *spray drier*, porque este processo evita qualquer desnaturação das proteínas.

Se algumas moléculas estavam desnaturadas, elas poderiam passar para o permeado das membranas investigadas com MMC menores, como a UF-C20 e a UF-C50, por exemplo, mas, segundo KEHOE *et al.* (2007), as moléculas desnaturadas tem maior possibilidade de formar aglomerados de proteínas, impedindo a passagem destes monômeros para o permeado. Conforme WIT (1998), a α -La é uma proteína com forte ligação ao cálcio, porém há baixas concentrações deste elemento, como no caso do concentrado protéico deste trabalho, pode polimerizar com outras proteínas formando aglomerados. Se, por exemplo, existir um grupo -SH livre em outra molécula (como por exemplo em monômeros desnaturados de β -Lg), este reage com uma das pontes S-S presente na α -La originando uma associação de proteínas. WONG *et al.* (1999) afirmam que associação entre duas proteínas de α -La deve ocorrer abaixo do pH 4, fato atribuído a mudança conformacional da molécula da proteína, mas este não foi o caso deste trabalho. FOX & MCSWEENEY (1998) relatam que com a desnaturação por calor, o grupo -SH da β -Lg é exposto e reage com a caseína (e provavelmente com a α -La) com efeitos muito significativos em algumas das propriedades físico-químicas tecnologicamente importantes do leite e do soro. Ainda, é possível acrescentar, segundo HAVEA *et al.* (2001), que o BSA pode formar pontes intermoleculares dissulfito com moléculas de β -Lg e a α -La, quando estas não se encontram nas suas formas mais estáveis. Para evitar a desnaturação das proteínas o ideal seria utilizar o soro *in natura*, porém haveria variabilidade das amostras iniciais, dificultando experimentos comparativos.

Alguns autores relatam em seus estudos a dificuldade de fracionar proteínas através de sistemas de membranas. Segundo LEITE *et al.*, 2006 a eficiência da separação de proteínas por sistemas de membranas é limitada pela polarização por concentração. No fracionamento de proteínas, a permeabilidade de uma proteína aumenta com a sua concentração à superfície da membrana. A proteína menos permeável é rejeitada e forma-se uma camada limite de transferência de massa. A permeabilidade da proteína menos permeável aumenta com a sua concentração e a seletividade da membrana diminui. De acordo com FOX & MCSWEENEY (1998) duas principais razões ainda impedem o uso de técnicas de ultrafiltração para obtenção

de frações puras de proteínas do soro: valores próximos dos tamanhos de proteínas do soro e, distribuição larga dos tamanhos dos poros das membranas.

Segundo SMITH (2003), vários processos foram desenvolvidos para se obter frações das proteínas α -La e β -Lg. Em alguns casos ocorre a purificação de somente uma das frações. Para a produção de duas fases purificadas podem ser distintas duas categorias de processo de produção: uma que usa transição de fase (precipitação de α -La e β -Lg), e outra sem transição de fase.

Um processo de separação das proteínas sem transição de fase tem a vantagem de reduzir a probabilidade de desnaturação das proteínas. O uso de membranas para este processo foi estudada extensivamente por TIMMER & VAN DER HORST (1998) *apud* SMITH (2003). Os autores concluíram que a filtração com membranas não resulta em um produto com alto grau de pureza. Isto ocorre devido a diferenças relativamente pequenas das massas molares das proteínas e dos seus pI. Então, a diferença por exclusão de tamanho e/ou por exclusão de *Donnan* para estes componentes é muito pequena para obter eficiência de separação suficiente e produção de frações com alto grau de pureza das duas frações, α -La e β -Lg, simultaneamente. Segundo estes autores, membranas de filtração podem ser usadas como parte do processo de separação em combinação com um processo de precipitação, por exemplo, para se obter frações de proteína com elevado teor de pureza.

Alguns estudos demonstram a viabilidade de utilizar membranas para separações de proteínas, os dados são obtidos com sistemas que consistem em uma mistura artificial de duas proteínas previamente purificadas. CHEANG E ZYDNEY (2003) *apud* BHATTACHARJEE *et al.* (2006), por exemplo, obtiveram uma recuperação de 90 % da β -Lg de uma mistura binária com α -La. Estudos experimentais com misturas multi-componentes complexos na alimentação mostram-se muito mais limitados, e o desempenho total destes sistemas é muito menos impressionante. Por exemplo, com o objetivo de purificar α -La do soro ácido de caseína, MULLER *et al.* (1999) utilizaram processo de UF combinando os modos de operação concentração batelada e DF, e como resultado, obtiveram uma pureza de somente 50 % de α -La no permeado final. BOTTOMLEY (1991) *apud* CHEANG & ZYDNEY (2004), descreveu um processo de membrana em dois estágios para a purificação de α -La do soro do queijo *Cheddar*, mas o produto final continha apenas 25 % de β -Lg. Segundo ZYDNEY (1998), o fracionamento protéico pode ocorrer utilizando membranas carregadas, assim como, associar separação com membranas com outras metodologias como cromatografia e precipitação seletiva.

4.3 Limpeza das membranas

Após cada um dos experimentos 1, 2, 3 e 4 de concentração e purificação das proteínas, o equipamento foi higienizado de acordo com o item 3.6.4. O procedimento foi realizado em três etapas de limpeza química e após cada uma dessas etapas a membrana foi submetida ao enxágüe com água destilada. O objetivo foi restituir o fluxo de água inicial, e observar o comportamento do fluxo ao final de cada etapa da limpeza química.

A Figura 4.33 apresenta a média aritmética das medidas do fluxo permeado de água após os experimentos 1, 2, 3 e 4 ao final de cada etapa do tratamento químico em que a membrana UF-6001 foi submetida. Essas medidas de fluxo foram realizadas na pressão transmembrana média de 2 bar e na temperatura de 50 °C.

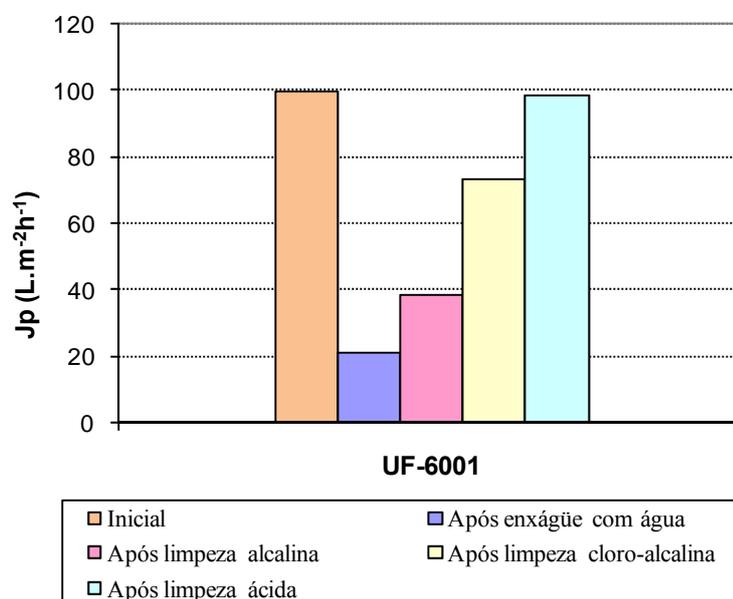


Figura 4.33: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-6001, $\Delta P = 2$ bar e $T = 50$ °C, vazão de alimentação 840 L.h⁻¹

Através da Figura 4.33 pode-se observar que após o enxágüe com água para remoção do restante de soro do sistema o fluxo ficou bastante baixo (21,3 L.m².h⁻¹) cerca de 20 % do fluxo inicial de água, mas com as etapas de limpeza alcalina e cloro-alcalina ocorreu uma recuperação expressiva (38 e 72 %) no fluxo de água. Após a limpeza ácida, o fluxo de água inicial foi quase completamente restituído, que nestas condições de operação era de 102,7 L.m².h⁻¹. Somente a limpeza alcalina e cloro-alcalina não foram suficientes para restituir o fluxo permeado, o fluxo foi restituído em 96 % após a limpeza ácida. Os valores obtidos foram utilizados como referência para cada início de um novo experimento de concentração do soro.

Após cada experimento de fracionamento das proteínas, em cada uma das membranas testadas realizou-se o procedimento de limpeza. O procedimento foi realizado em três etapas de limpeza química para a MF-7002 e em duas etapas de limpeza para as UF-C50 e UF-C20, segundo indicações do fabricante, e após cada uma dessas etapas a membrana foi submetida ao enxágüe com água destilada.

A Figura 4.34 apresenta as medidas do fluxo permeado de água para a MF-7002 após o final de cada etapa do tratamento químico. Essas medidas de fluxo foram realizadas na ΔP de 1,75 bar e na temperatura de 40 °C.

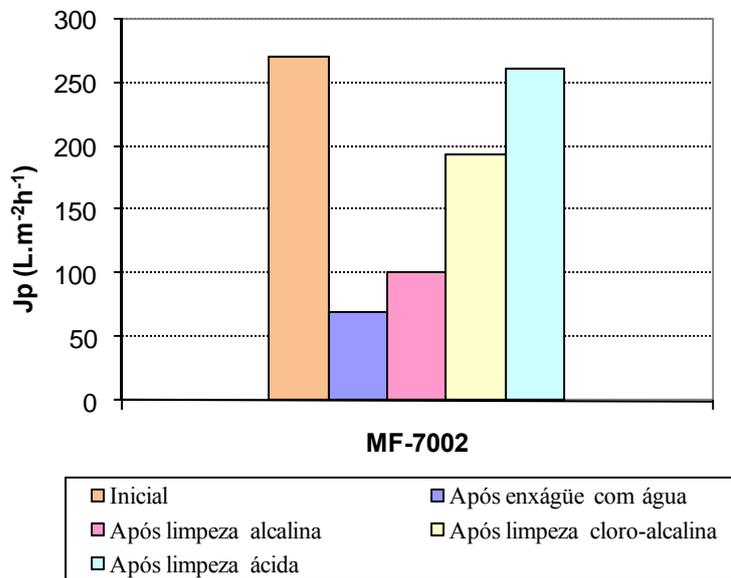


Figura 4.34: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a MF-7002, $\Delta P = 1,75$ bar e $T = 40$ °C, vazão de alimentação $700 L \cdot h^{-1}$

Na Figura 4.34 pode-se observar que o fluxo permeado de água após o enxágüe, foi de $70,3 L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ cerca de 26 % do fluxo inicial. Após as etapas de limpeza alcalina e cloro-alcalina ocorreu uma recuperação de 37 e 71 % no fluxo de água. Após a limpeza ácida, o fluxo de água inicial foi restituído em 96 %.

A Figura 4.35 apresenta as medidas do fluxo permeado de água para a UF-C20 e a Figura 4.36 para a membrana UF-C50, após o final de cada etapa do tratamento químico. Essas medidas de fluxo foram realizadas na pressão transmembrana de 2,25 bar e na temperatura de 25 °C.

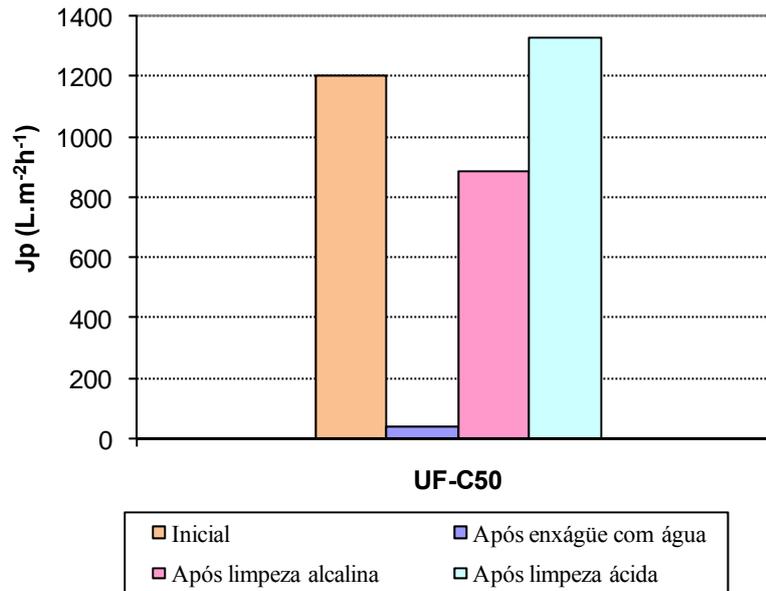


Figura 4.35: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C20, $\Delta P = 2,25$ bar e $T = 25$ °C, vazão de alimentação 620 L.h⁻¹.

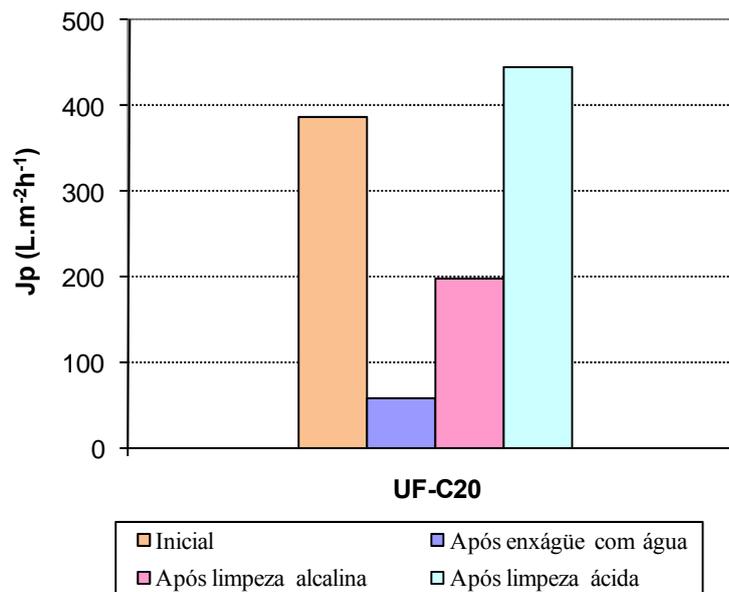


Figura 4.36: Fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C50, $\Delta P = 2,25$ bar e $T = 25$ °C, vazão de alimentação 400 L.h⁻¹.

Para a membrana UF-C20, na Figura 4.35, observa-se que o fluxo após o enxágüe com água, foi de 56 L.m⁻².h⁻¹, cerca de 12 % do fluxo de água inicial. Após a limpeza alcalina houve uma recuperação de 48 % do fluxo e ao final da limpeza ácida o fluxo foi completamente restituído. Já, para a membrana UF-C50, na Figura 4.36 pode-se observar que o fluxo permeado de água após o enxágüe, foi de $40,4$ L.m⁻².h⁻¹, o que corresponde a 3,5 % do fluxo inicial. Após as etapas de limpeza alcalina ocorreu uma recuperação de 76 % no fluxo de água. Após a limpeza ácida, o fluxo de água inicial foi restituído em 100 %.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, pôde-se formular as conclusões listadas a seguir.

Concentração e Purificação Protéica

- O fluxo de água aumenta linearmente com o aumento da pressão transmembrana para todas as membranas testadas, isto é, quanto maior a pressão transmembrana, maior o fluxo permeado. Para as mesmas condições operacionais, ocorre uma diferença significativa nos fluxos permeados do soro e da água; para todas as membranas testadas o fluxo de água foi maior que o fluxo permeado de soro.
- O fluxo permeado de soro diminui com o tempo de operação devido à formação da camada de polarização por concentração e *fouling*, e ainda, devido ao aumento da concentração da solução e conseqüentemente às mudanças nas propriedades de transporte, difusividades mássica e de transferência de quantidade de movimento e nas propriedades da solução, tais como massa específica e viscosidade dinâmica.
- Nas DF o fluxo permeado fica abaixo do fluxo inicial da UF, devido ao *fouling* já formado na etapa de concentração das proteínas e, também, devido ao baixo fator de diluição.
- Quanto maior o FC na etapa de concentração melhores resultados de purificação protéica são obtidos. Para o Experimento 2 com FC igual a 5 após as cinco DFs atingiu-se 62 % em massa de proteína (base seca), enquanto que para o Experimento 4 com FC igual a 6 após as quatro DFs o percentual mássico de proteína em base seca foi de 70 %. É importante ressaltar que o fluxo permeado, no Experimento 4 não diminuiu com o aumento do FC de 5 para 6.
- Na etapa de DF, a quantidade de lactose e sais no concentrado diminui significativamente. O percentual de lactose no concentrado, em base seca, para o Experimento 2 ao final das DFs atingiu 35 %, enquanto, para o Experimento 4 atingiu 29 %. Para todos os quatro

experimentos de concentração, o processo mostra-se eficiente na remoção de sais, pois, ao final da UF o percentual se aproxima de zero, ou seja, boa parte do sal havia sido removida do concentrado.

- No Experimento 4 o concentrado da UF, antes da DF, foi de 5 L, e esta diminuição de volume implicou em uma maior concentração protéica final e em um menor volume de água para a etapa de DF. Para o Experimento 2 utilizou-se 21 L de água para a etapa de DF e obteve-se um concentrado protéico com 62 % em base seca; enquanto que para o Experimento 4 foram utilizados 15 L de água para a DF e o percentual protéico foi de 70 % em base seca.
- A diafiltração é mais eficiente quando realizada com pequenos volumes e em um número maior de vezes; verificou-se que as DFs com volumes menores são bastante efetivas na remoção de sais e lactose, para o Experimento 4, por exemplo, houve uma grande redução da concentração dos outros elementos, em relação à quantidade de proteína, nas últimas duas DFs de 2,5 L.
- Os resultados obtidos no Experimento 4 de concentração protéica são melhores do que os obtidos para os experimentos 1, 2 e 3, e, portanto, as condições de trabalho do Experimento 4 foram escolhidas como sendo a melhor estratégia a ser utilizada para se obter uma maior purificação protéica.
- Há um aumento de ST na corrente de concentrado durante a UF devido principalmente ao aumento de concentração de proteína; no permeado a concentração de ST é aproximadamente constante até o final da etapa de concentração.
- O retido possui concentrações mais elevadas de ST tanto na etapa de concentração quanto na etapa de DF; durante as DF ocorreu a redução de ST para ambas as correntes, no concentrado devido à remoção de lactose e sais, no permeado devido à diluição.
- A concentração de proteínas no retido aumenta ao longo da etapa de concentração; durante as DFs não sofre grande variação, no entanto o teor de contaminantes, sais e lactose, diminui significativamente nas DFs, o que resulta na purificação do concentrado protéico.
- O aumento da concentração de proteína exerce um efeito maior sobre o fluxo do que a remoção de lactose e sais. A concentração de lactose possui comportamento similar ao de ST e apresenta baixa retenção; ao final das DFs a concentração de lactose no permeado fica próxima a concentração de sólidos totais, ou seja, todo sal foi removido, e todos os sólidos que estão sendo retirados no permeado correspondem à lactose.
- O pH das amostras de concentrado e permeado permanece constante, ou seja, a solução não é degradada durante o tempo de duração do experimento.

- A condutividade elétrica permanece praticamente a mesma para o permeado e o concentrado durante toda a etapa de UF, durante a etapa de DF a condutividade elétrica do concentrado e do permeado foi decaindo após a adição da água destilada em cada DF.
- A retenção das proteínas é total, a retenção de sólidos totais aumenta com tempo de experimento, e este aumento é mais expressivo depois do início das DFs; a membrana apresenta uma retenção parcial a lactose o que ocasiona uma maior dificuldade na purificação das proteínas.

Fracionamento das Proteínas Majoritárias

- O fluxo de concentrado protéico é menor que o fluxo de água pura para todas as todas as membranas nas condições de operação empregadas, devido aos efeitos de polarização por concentração e *fouling*.
- Os fluxos permeados de concentrado protéico foram semelhantes para as membranas RZ04 e VCWP, sendo ligeiramente maior para a RZ04, em pressões mais elevadas; a membrana HN06 apresentou os menores fluxos permeados.
- O fluxo permeado do concentrado protéico foi semelhante para as membranas de MF e para a RZ04; à medida que a pressão transmembrana aumentou o fluxo permeado da RZ04 foi maior, mostrando que além da geometria do módulo, do tamanho de poro nominal e da MMC, o material da membrana, a distribuição dos tamanhos de poros, a porosidade, a espessura e a morfologia da membrana exercem uma grande influência sobre o fluxo permeado.
- A retenção de lactose para a membrana HN06 fica em torno de 13 %; a RZ04 apresenta uma retenção de aproximadamente 6 % para a lactose, enquanto a VCWP apresenta retenção de 50 %; este resultado pode indicar que interações membrana-solução possam estar ocorrendo.
- A membrana VCWP reteve 78 % das proteínas, enquanto a HN06 e a RZ04 mostraram alta retenção protéica, 98 % e 94 %, respectivamente. Como as membranas mencionadas possuem MMC maiores que as proteínas, pode ter ocorrido *fouling* (bloqueio de poros, adsorção) e interações entre os diferentes solutos presentes na solução, isto é, uma agregação das diferentes moléculas de proteína entre si ou com a lactose, o que impediu a sua passagem para a corrente permeada.
- Para a membrana HN06 não ocorreu separação efetiva da β -Lg e da α -La, as duas proteínas permearam pela membrana.
- No permeado da RZ04 não foi detectada nenhuma das proteínas de interesse, este resultado pode indicar que nos experimentos com a RZ04 todas as moléculas de proteína interagiram com a membrana ou entre si, pois nenhuma das três foi detectada no permeado.

- A membrana VCWP mostrou-se permeável às duas proteínas, a β -Lg e a α -La, mostraram concentrações semelhantes na amostra de permeado, e como a β -Lg é duas vezes mais abundante que a α -La no concentrado pode haver uma retenção menor da molécula de α -La pela membrana.
- O fluxo de água da MF-7002 é comparável ao da VCWP, apesar das duas membranas possuírem diferenças na geometria do módulo, no material e na estrutura.
- Há retenção parcial de lactose para a membrana MF-7002, tanto nas amostras da MF, quanto da DF, variando de 80 % na MF até 30 % ao final da DF4; quanto à proteína na MF há retenção de 65 %, nas DFs a retenção diminui gradativamente atingindo ao final destas etapas 55 %.
- No permeado recolhido da MF-7002 na etapa de concentração, encontrou-se mais de 50 % de α -La, apesar desta estar presente em menor concentração no retido apresentou passagem preferencial para o permeado, ou seja, a mudança de pH beneficiou a agregação da β -Lg mesmo que esta agregação tenha sido parcial, pois esta proteína também foi encontrada no permeado.
- No permeado das DFs da MF-7002 a β -Lg está em maior quantidade no permeado do que a α -La, ou seja, a membrana não retém nenhuma das duas proteínas, este fato pode ter ocorrido devido ao efeito de diluição.
- O fluxo permeado de água para a UF-C50 tem valor superior ao fluxo de todas outras membranas testadas, provavelmente esta membrana possui uma porosidade elevada.
- Para a membrana UF-C50, os experimentos com a solução de concentrado protéico em pH 4,6 (40 °C) apresentam fluxos no mínimo duas vezes maior que aqueles obtidos em pH 6,3 (25° C). Acredita-se que o efeito combinado de pH e temperatura deve ocasionar diferentes interações entre os componentes do soro e entre os componentes do soro e a membrana, além de influenciar também nas propriedades físicas (viscosidade dinâmica, massa específica) e nas características reológicas da solução (propriedades de transporte como a viscosidade cinemática e a difusividade mássica). Para a solução com pH ácido os fenômenos de *fouling* e concentração por polarização foram mais acentuados, quando comparados ao pH 6,3, provocando o decaimento de fluxo permeado maior. Para a membrana UF-C50 a retenção de lactose no pH 6,3 é de 60 %; e no pH 4,6 é praticamente nula.
- Quanto as proteínas, na UF-C50, para ambos pHs, a retenção foi quase de 100 %, indicando que não ocorreu fracionamento das proteínas.
- Para a membrana UF-C20 o comportamento do fluxo de soro e de concentrado protéico é o mesmo, porém o fluxo de soro é maior que o de concentrado protéico em todas as pressões transmembrana testadas devido a diferenças de propriedades, como viscosidade dinâmica e massa específica existentes entre estas duas soluções.

- A membrana UF-C20 não é seletiva para a lactose, e reteve toda a proteína, mostrando-se ineficiente para o fracionamento.
- Os resultados da cromatografia gel revelaram que, tanto no pH 7,0 quanto no pH 4,6 as moléculas de β -Lg podem estar se apresentando parte em dímeros e parte em monômeros, ou seja, parte destas moléculas pode estar desnaturada, fato que pode ter ocorrido devido aos tratamentos térmicos empregados durante o processamento do soro, como concentração por evaporação e secagem por *spray drier*.
- Alguma agregação das proteínas de β -Lg deve ocorrer no pH 4,6, porque as membranas MF-7002 e VCWP apresentaram retenção parcial a esta molécula; os octômeros tem uma conformação menos estável que os dímeros, e devem perder facilmente esta configuração.

Limpeza

- Os fluxos permeados de todas as membranas que sofreram limpeza química foram recuperados após os procedimentos de limpeza.

Sugestões para trabalhos futuros

- Testes com o soro *in natura*, para verificar se ocorrem diferenças nas propriedades do soro seco que interfiram no fracionamento das proteínas.
- Fracionamento das principais proteínas do soro através de técnicas de separação com membranas, como: MF, UF, NF e ED - gerar produtos com alto teor protéico que possam ser utilizados para fortificar produtos alimentícios;
- Combinação de pH, força iônica e temperatura para maximizar diferenças do volume hidrodinâmico do produto (proteína de interesse) e impurezas;
- Recuperação da lactose do permeado da UF - gerar produto com elevada concentração e pureza de lactose, para ser usada em indústrias de alimentos, biotecnológica e farmacêutica;
- Recuperação de sais e da água do soro do permeado do soro livre de lactose e proteínas;
- Utilizar os processos de separação com membranas associados entre si ou com outras técnicas de separação para aproveitar todos os componentes do soro.
- Comparação das técnicas com membranas com outras tecnologias de separação tradicionais.
- Estudo da viabilidade econômica para construção de uma planta industrial;

- Modelagem e otimização do processo de concentração, purificação e fracionamento dos componentes do soro.
- Testes de diferentes técnicas de limpeza, com diferentes concentrações de reagentes e utilização de ultrassom.
- Avaliação de técnicas para minimizar *fouling* e polarização por concentração: aplicação de ultra-som, emprego de membranas carregadas positiva ou negativamente.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

ABIQ, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. São Paulo. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em 20/10/2007.

AFONSO, M. D.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. *An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration*. Trends in Food Science and Technology, v. 15, p. 506-512, 2004.

AKOUM, O.; JAFFRIN, Y. M.; DING, L. H.; FRAPPART, M. *Treatment of dairy process waters using a vibrating filtration system and NF and RO membranes*. Journal of Membrane Science, v. 235, p. 111-122, 2004.

ALICIEO, T.V.R.; MENDES, E.S.; PEREIRA, N.C.; LIMA, O.C.M. *Membrane ultrafiltration of crude soybean oil*. Desalination, v.148, p. 99-102, 2002.

ALVAREZ, S.; LUCENA, M.E.; MENENDEZ, C.; RIERA, F.A.; ALVAREZ, R. *Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates*. Separation and Purification Technology, v. 52, p. 310-316, 2006.

ANTUNES, A. J. *Funcionalidades de proteínas do soro de leite bovino*, São Paulo: Ed. Manole, 2003.

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

BABU, P.R.; GAIKAR, V.G. *Membrane characteristics as determinant in fouling of UF Membranes*. Separation and Purification Technology, v. 24, p. 23-34, 2001.

BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R.W. *Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications*. Journal of Membrane Science, v. 281, p. 42-69, 2006.

BALANNEC, B.; VOURCH, M.; RABILLER-BAUDRY, M.; CHAUFER, B. *Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration*. Separation and Purification Technology, v. 42, p. 195-200, 2005.

BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C.; DATTA, S., *Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography*. Journal of Membrane Science, v.275, p.141–150, 2006.

BOBRESHOVA, O.; NOVIKOVA, L.; KULINSTOV, P.; BALAVADZE, E. *Amino acids and water electrotransport through cation-exchange membranes*. Desalination, v.6, n.149, p. 363-368, 2002.

BOSCHI, J.R. *Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

BOTTOMLEY, R.C. *Process for obtaining concentrates having a high α -lactalbumin content from whey*. US Patent N° 5.008.376, 1991.

BRAMAUD, C.; AIRNAR, P.; DAUFIN, G. *Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -lactalbumin*. Le Lait, v.77, n.3, p.411-423, 1997.

BRANDÃO, S.C.C. *Soro: um desafio para as fábricas de queijo*. Leite & Derivados, n.15, p. 13-19, 1994.

BRANS, G. *Design of membrane systems for fractionation of particles suspensions*. PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands, 2006.

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

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTROMA, M. *Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration*. Journal of Membrane Science, v. 280, p. 418-426, 2006.

BYLUND, G. *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems: 427 p., 1995.

CALLE, E.V.; RUALES, J.; DORNIER, M.; SANDEAUX, J.; SANDEAUX, R.; POUCELLY, G. *Deacidification of the clarified passion fruit juice*. Desalination, v.6, n.149, p. 357 – 361, 2002.

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT F.L. *Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo*. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.40, n.11, p.1123-1128, nov. 2005.

CASTRO, L.P.; PINHEIRO, M.V.S.; HOFFMANN, F.L.; PENNA, A.L.B. *Influência de substitutos de gordura nas características do iogurte probiótico*. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, v. 57, n. 327, p. 133-136, 2002.

CASTRO, B. N., GERLA, P. E., *Hollow fiber and spiral cheese whey ultrafiltration: minimizing controlling resistance*. Journal of Food Engineering, v. 69, p. 495-502, 2005.

CHAN, R.; CHEN, V.; BUCKNALL, M.P. *Ultrafiltration of protein mixtures: measurement of apparent critical flux, rejection performance, and identification of protein deposition*. Desalination, v.146, p.83-90, 2002.

CHEANG, B.L.; ZYDNEY, A.L. *Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using membrane ultrafiltration*. Biotechnol. Bioeng. v.83, p. 201–209, 2003.

CHEANG, B.; ZYDNEY, A.L. *A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate*. Journal of Membrane Science, v.231, p.159–167, 2004.

CHEISON, S.C.; WANG, Z.; XU, S.Y. *Use of response surface methodology to optimize the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor*. Journal of Food Engineering, v. 80, p. 1134 – 1145, 2007.

CHOI, H.; ZHANG, K.; DIONYSIOU, D.D.; OERTHER, D.B.; SORIAL, G.A., *Effect of permeate flux and tangential flow on membrane fouling for wastewater treatment*. Separation and Purification Technology, v. 45, p. 68 – 78, 2005.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. *Separation of proteins and lactose from dairy wastewater*. Chemical Engineering and Processing, 2006.

CHOVE, B.E.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. *Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration*. Food Hydrocolloids, v. 21, p. 1379-1388, 2007.

CRISTIANINI, M.; ROIG, S.M. *Uso de sólidos de soro de queijo na fabricação de iogurte*. Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes, v.42, n.250, p.41-44, 1987.

DOYEN, W.; ADRIANSENS, W.; MOLENBERGHS, B.; LEYSEN, R. *A comparison between polysulfone, zirconia and organo-mineral membranes for use in ultrafiltration*. Journal of Membrane Science. v. 113, p. 247-258, 1996.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

EBERSOLD, M.F.; ZYDNEY, A.L. *The effect of membrane properties on the separation of protein charge variants using ultrafiltration*. Journal of Membrane Science, v. 243, p. 379 – 388, 2004.

ELISSEEVA, G.S.; SHAPOSHNIK, V.A.; LUSCHIK, I.G. *Desmeneralization and separation of amino acids by electrodialysis with ion-exchange membranes*. Desalination, v.6, n. 149, p. 405 – 409, 2002.

ERDEM, I., CIFTCIOGLU, M., HARSA, S., *Separation of whey components by using ceramic composite membranes*. Desalination, v. 189, p.87-91, 2006.

FENNEMA, O.R. *Química de los alimentos*. Zaragoza (España): Acribia, 1989.

FOX, P.F. & MCSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, First Edition, London: Thomson Science, 378 p. 1998.

GESAN-GUIZIOU, G.; DAUFIN, G.; TIMMER, M.; ALLERSMA, D.; VAN DER HORST, C. *Process steps for the preparation of purified fractions of alphas₂-lactalbumin and beta-lactoglobulin from whey protein concentrates*. J. Dairy Res. v.66, p.225, 1999.

GIRALDO-ZUÑIRA, A. D.; COIMBRA, J. S. R.; GOMES, J. C.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G.; GADE, A. D. *Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo*. Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes, v. 59, p. 53-66, 2004.

GIROTO, J.M. & PAWLOWSKY, U. *O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento*. Brasil Alimentos, n.10, p. 43-46, 2001.

GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. *Separation Processes in the food and Biothechnology Industries*. England, Woodhead Publishing, 287p., 1996.

GREITER, M.; NOVALIN, S.; WENDLAND, M.; KULBE, K. D.; FISCHER, J. *Electrodialysis versus ion exchange: comparison of the cumulative energy demand by means of two applications*. Journal of Membrane Science, v. 233, p.11-19, 2004.

GUADIX, A.; SORENSEN, E.; PAPAGEORGIOU, L. G.; GUADIX, E. M. *Optimal design and operation of continuous ultrafiltration plants*. Journal of Membrane Science, v. 235, p. 131-138, 2004.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. *Characterisation of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment*. Journal of Dairy Research, v. 68, p. 483-497, 2001.

HO, W.S.W. & SIRKAR, K.K. *Membrane Handbook*, 2 ed. New York: Chapman & Hall, 1992.

HONG, Y. H.; CREAMER, L. K. *Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment*. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 345-359, 2002.

HUFFMAN, L.M. *Processing whey protein for use as a food ingredient*. *Food Technology*, Feb, 1996.

KAPPLER, T. & POSTEN, C. *Fractionation of proteins with two-sided electro-ultrafiltration*. *Journal of Biotechnology*, v.128, p. 895-907, 2007.

KEHOE, J.J.; MORRIS, E.R.; BRODKORB, A. *The influence of bovine serum albumin on β -lactoglobulin denaturation, aggregation and gelation*. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p.747-755, 2007.

KHIDER, K.; AKRETICHE, D.E.; LARBOT, A. *Purification of water effluent from a milk factory by ultrafiltration using Algerian clay support*. *Desalination*, v.167, p.147-151, 2004.

KOSIKOWSKI, F.U. *Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition*. *Journal of Dairy Science*, v.50, n.8, p.1343-1345, 1967.

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. *Produtos de soro dos EUA: Disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações*. *Engenharia de Alimentos*, n.15, p. 27-29, 1997.

LANARA *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – II Métodos físicos e químicos*, LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal, Ministério da Agricultura – Secretaria de Defesa Agropecuária, Portaria 001/81 de 07/10/81.

LEE, M.H. *Processing whey protein for use as a food ingredient*. *Food Technology*, v.50, p.49-52, 1996.

LEITE, Z.T.C.; VAITSMAN, D.S.; DUTRA, P.B. *Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade*. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 876-880, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. *Protein measurements with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENENDEZ, C.; RIERA, F.A.; ALVAREZ, R. *α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates*. *Separation and Purification Technology*, v.52, p. 446–453, 2007.

- MARTINEZ-FEREZ, A.; RUDLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C. A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J. J.; GUADIX, E. M.; KUNZ, C., *Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology*. International Dairy Journal, v. 16, p. 173-181, 2006.
- MARWANA, S.S.; KENNEDY, J.F. *Review: whey pollution problem and potencial*. International Journal of Food Science and Technology, v. 23, p. 323-336, 1988.
- MATTHEWS, M.E. *Whey Protein Recovery Process and Products*. Journal of Dairy Science, v.67, n.11, p.2680-2692, 1984.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. *Functional Dairy Products*. Woodhead Publishing, England, 392 p., 2003.
- MAWSON, A.J. *Bioconversions for Whey Utilization and Waste Abatement*. Bioresource Technology, v. 47, n.3, p.195-203, 1994.
- MEIRELES, L. *Valorização Integral do Soro de Queijo-Análise da Indústria de derivados de soro de queijo*. Gabinete de Contabilidade e Consultadoria, 1999.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. *Handbook of Dairy Products and Nutrition*, 2nd Ed., CRC Press LLC, Illinois, 2000.
- MILLER, G. L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- MINHALMA, M.; MAGUEIJO, V.; QUEIROZ, D.P.; PINHO, M. N. *Optimization of "Serpa" cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery*. Journal of Environmental Management. v. 82, p. 200-206, 2007.
- MIZUBUTI, I.Y. *Soro de leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação*. Semana Ciências Agrárias, v.15, n.1, p.80-94,1994.
- MORESI, M. *Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey*. Journal of Food Science, v. 6, p. 357-370, 1994.
- MORTENSON, M. A., VICKERS, Z. M., REINECCIUS, G. A. *Flavor of whey protein concentrates and isolates*. International Dairy Journal. 2008.
- MOUROUZIS M.S.A. & KARABELAS, A.J. *Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes – pressure effects*. Journal of Membrane Science. v. 282, p. 124-132, 2006.
- MULDER, M. *Basic Principles of Membrane Technology*. 2ndEd. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 564 p., 1996.

MULLER, A.; DAUFIN, G.; CHAUFER, B. *Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -Lactalbumin from acid casein whey*. J. Membr. Sci., v.153, p.9–21,1999.

NAKAMAE, I.J. *Anuário da pecuária brasileira*. Anualpec. São Paulo, p.191-232, 2004.

NEVES, B.S. *Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios*. In: Embrapa Gado De Leite. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar, p.97-108, 2001.

NEVES, B.S. *Elaboração de bebidas lácteas a base de soro*. Revista Leite e Derivados, n.10, p. 50-54, 1993.

NIKAEDO, P.H.L.; AMARAL, F.F.; PENNA, A.L.B. *Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.40, n.3, p.397-404, 2004.

OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; TUPASELA, T.; KOSKELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMAKI, P.; SYVAOJA, E.L.; ANTILA, P.; KANKARE, V. *Fractionation of Proteins From Whey With Different Pilot Scale Processes*. Lebensm. Wiss.Technol. v. 29, p. 411 – 417, 1996.

PEREIRA, D.B.C. *Implementação de métodos para estimativa de desnaturação de soro-proteínas em controle de qualidade de produtos lácteos*. Milkbizz Temático Tecnologia, fascículo I, ano I, n.º 1, São Paulo, p. 15-20, março/abril 2002.

PLATT S.; MAURAMO M.; BUTYLINA S.; NYSTROM M. *Retention of peps in cross-flow ultrafiltration through membranes*. Desalination, v.149, p. 417- 422, 2002.

PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. *Determinação das melhores condições operacionais no processo de produção de ricota*. Boletim CEPPA, v. 23, n.1, p.173-182, 2005.

RAO, H. G. R. *Mechanisms of flux decline during ultrafiltration of dairy products and influence of pH on flux rates of whey and buttermilk*. Desalination, v. 144, p. 319-324, 2002.

RAUTENBACH, R. & ALBRECHT, R. *Membrane Processes*. John Wiley & Sons, New York, USA, 459 p, 1989.

REIMANN, W. *Down Streaming of lactic acid from hydrolysate of barley after fermentantion*. Agricultural Engineering International: the CIGRE Journal, v.8, p.1-15, 2005.

REKTOR, A., VATAI, G., *Membrane filtration of Mozzarella whey*. Desalination, v.162, p. 279-286, 2004.

RICHARDS, N.S.P.S. *Soro Lácteo – Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente*. Food Ingredients, n. 17, p. 20-27, 2002.

RODRIGUES, L.R.M. *Valorização da fracção protéica do soro de queijo*. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho. Portugal, 2001.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd ed, v. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCOPES, R.K. *Protein Purification – Principles and Practice*, 2nd Ed., New York, Springer, 329 p., 1988.

SGARBIERI, VC. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela; 1996.

SGARBIERI, V.C. & PACHECO, M.T.B. *Alimentos funcionais fisiológicos*. Brazilian Journal of Food Technology, v.2, p.7-19, 1999.

SMITH, G. *Dairy Processing – Improving quality*. New York, CRC Press, 531 p., 2003.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. X., *Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey*. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SIMMONS, M.J.H.; JAYARAMAN, P.; FRYER, P.J. *The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling*. Journal of Food Engineering, v. 79, p. 517 – 528, 2007.

SISO, M.I.G. *The biological utilization of cheese whey: a review*. Bioresource Technology, Essex, v.57, n.1, p.1-11, 1996.

STRATHMANN, H. *Electrodialysis*. In: Winston Ho, W.S.; Sirkar, K.K. Membrane Handbook. Academic Publishers, London, p. 219-255, 2001.

TIMMER J. M. K. E VAN DER HORST H. C. *Whey processing and separation technology: state-of-the-art and new developments*. Proc 2nd Int Whey Conf, Chicago, p. 27–29, October 1997, IDF Special Issue 9804, IDF Brussels, 40–65, 1998.

URIBE, C.U; VINCENT-VELA, M.C.; ALVAREZ-BLANCO, S.; ALCAINA-MIRANDA, M.I.; SORIANO-COSTA, E. *Nanofiltration of sweet whey and prediction of lactose retention as a function of permeate flux using the KedemSpiegler and Donnan Steric Partitioning models*. Separation and Purification Technology, v. 56, p. 38-46, 2007.

USDEC – U. S. DAIRY EXPORT COUNCIL. *Características, Funções e Novas aplicações das proteínas do soro e suas novas frações*. Food Ingredients, n. 17, p.50-56, março/abril 2002.

VAN REIS, R.; BRAKE, J.M.; CHARKOUDIAN, J.; BURNS, D.B.; ZYDNEY, A.L. *High-performance tangential flow filtration using charged membranes*. Journal of Membrane Science, v. 159, p. 133-142, 1999.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. *Membrane separation in biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology, v. 12, p. 208-211, 2001.

VEIGA, P.G. & VIOTTO, W. H. *Fabricação de queijo Suisse por ultrafiltração de leite coagulado, Efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, p. 267-272, 2001.

VIEIRA, M.C.; BRANDÃO, S.C.C.; PINHEIRO, A.J. R.; GUIMARÃES, W.V. *Conservação do soro de queijo minas com peróxido de hidrogênio*. Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.40, n.240, p.17-28, 1985.

VISSER, J. & JERUNINK, T. J. M. *Fouling of heat exchangers in the dairy industry*. Experimental Thermal and Fluid Science, v.14, p. 407-424, 1997.

WIT, J.N. de. *Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products*, Journal of Dairy Science, v.81, p.597-608, 1998.

WONG, N.P; JENESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 3rd Ed., New York: Aspen Publication, 779 p., 1999.

XU, Y., SLEIGH, R., HOURIGAN, J., JOHNSON, R., *Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey*, Process Biochemistry, v. 36, p. 393-399, 2000.

YADA, R.Y. *Protein in Food Processing*. England: Woodhear Publishing, 2004.

YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. *Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating condition*. Journal of Membrane Science. v. 209, p. 125 – 137, 2007.

YUNOS, K.F. & FIELD, R.W. *Effect of sandwich configuration of ultrafiltration membranes on protein fractionation*. Desalination, v.199, p.222–224, 2006.

ZADOW, J.G. *Whey and Lactose Processing*. England: Elsevier Applied Science, 1992.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.; LICHTIG, J. *Determinação de Proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Quim. Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZYDNEY, A.L. *Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation*. International Dairy Journal, v.8, p. 243-250, 1998.

ZYDNEY, A.L.; PUJAR, N.S., *Protein transport through porous membranes: effects of colloidal interactions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 138, p. 133-143, 1998.

ZYDNEY, A.L.; VAN REIS, R. *Membrane separations in biotechnology*., Biochemical Engineering, Current Opinion in Biotechnology, v. 12, p. 208-211, 2001.

Apêndice A

A.1 Métodos Analíticos

Neste anexo estão descritos os métodos analíticos utilizados para a realização das análises das amostras do concentrado e do permeado dos processos da UF, DF e fracionamento do soro de leite.

A.1.1 Análise de Extrato Seco Total - método gravimétrico

Materiais:

- cápsula de fundo chato de porcelana;
- areia tratada;
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio;
- pipeta volumétrica de 10 mL;
- banho-maria;
- estufa a 85 °C;
- balança analítica.

Procedimento

1. Cobrir as cápsulas de fundo chato com 10 g de areia tratada;
2. Levar a estufa a 105 °C por 1 hora;
3. Esfriar em dessecador por 45 minutos e pesar;
4. Pipetar volumetricamente 10 mL de amostra distribuindo a solução em toda a superfície da areia;
5. Levar ao banho-maria por 30 minutos;
6. Secar em estufa a 85 °C por 2 horas;
7. Esfriar em dessecador e pesar;
8. Repetir os procedimentos 6 e 7 até peso constante ou mínimo.

Obs.: Quando a quantidade de sólidos totais é muito pequena aconselha-se tomar 20 mL de amostra.

Cálculo do extrato seco total:

$$ST = \frac{\Delta m}{V} \quad (\text{A1.1})$$

onde: ST = sólidos totais (g.L^{-1}); Δm = diferença de massa antes e após a secagem (g); V = volume da amostra (L).

A.1.2 Análise de Lactose - Método do ácido dinitrossalicílico - DNS**Materiais:**

- estufa a 85 °C;
- reagente DNS;
- tubos de ensaio;
- lactose (padrão).

Método

1. Preparar uma solução de DNS:
 - a. 0,25 gramas de Ácido 3,5-dinitrossalicílico
 - b. 75,0 gramas de Tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 50 mL de NaOH 2 M.
 - c. 250 mL de água.
2. Adicionar 200 μL de padrão, amostra ou controle a 2 mL de solução DNS.
3. Aquecer a mistura em banho-maria a 100° C por 10 min.
4. Esperar esfriar e ler a absorbância à temperatura ambiente e a 570 nm.
5. Aplicar o valor da leitura na respectiva equação da curva-padrão previamente elaborada para o aparelho.

Obs: Sensibilidade do método de 0,3 a 30 mM de lactose.

Metodologia para obtenção da curva-padrão para açúcares redutores

1. Preparar uma solução de lactose 5 g.L^{-1} .
2. Diluir para concentrações desejadas (Ex: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 g.L^{-1}).
3. Colocar em tubo de ensaio: 200 μL da solução contendo o açúcar + 2 mL do reagente DNS.
4. Preparar uma solução sem lactose, contendo H_2O e DNS para zerar o aparelho.
5. Deixar em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.
6. Esperar esfriar até atingir a temperatura ambiente.
7. Ler a absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

Obs: A curva-padrão somente se aplica para leituras no aparelho em que foi estabelecida.

A.1.3 Análise de açúcar - Método fenol sulfúrico

Materiais:

- ácido sulfúrico 95,5;
- fenol 80 % em peso;
- micropipetas;
- tubos de ensaio;
- vórtex.

Método analítico

1. Diluir amostras (normalmente entre 100 e 500 x)
2. Preparar amostras de açúcar (lactose, glicose, dextrose) com concentrações entre 10 e 70 mg.L⁻¹
3. Em tubos de ensaio adicionar 50 µL de amostra e 450 µL de água destilada.
4. Preparar um tubo com 500 µL de água destilada (branco).
5. Adicionar 500 µL de fenol 5 %.
6. Adicionar 2,5 mL de ácido sulfúrico. Deixar escorrer lentamente pela parede do tubo.
7. Agitar o tubo e esperar esfriar por aproximadamente 30 minutos.
8. Medir a absorbância a 490 nm em cubeta de quartzo, mantendo cuidado na manipulação das amostras devido ao alto teor ácido.

Pontos críticos: diluição, homogeneização, não deve-se expor todo conteúdo do ácido à umidade ambiente devido a característica higroscópica do ácido.

A.1.4 Determinação da proteína total - Método de Lowry

Reagentes:

- reagente A: dissolver 0,5 g de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) e 1,0 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada; (esta é uma solução estável e pode ser preparada com antecedência);
- reagente B: dissolver 20,0 g de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e 4,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1,0 L de água destilada; (esta solução não é estável e deve ser preparada na hora da análise);
- reagente C: misturar 1 mL do reagente A e 50 mL do reagente B;
- reagente D: Reagente Folin-Ciocalteus 2 N e água destilada preparados na proporção 1:1; (solução estável);
- solução padrão de BSA (0,5 mg.mL⁻¹).

Procedimentos

1. Para determinar a concentração de proteínas da amostra, construir uma curva padrão de calibração com cinco concentrações diferentes de proteína, BSA – 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg.mL⁻¹.

2. Adicionar 2,5mL do reagente C a um tubo de ensaio contendo 500 mL de amostra diluída apropriadamente (contendo até $0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de proteínas e misturar bem. A amostra deve ser diluída de forma que sua concentração fique dentro da amplitude da curva de calibração. Normalmente, diluições de 40 vezes são suficientes (50 mL de amostra + 1950 mL de água destilada);
3. Incubar a temperatura ambiente por 5-10 minutos;
4. Adicionar a seguir 250mL do reagente D, misturar bem e incubar novamente por 30 minutos;
5. Ler a absorvância à 750 nm.
6. A concentração das amostras é determinada pela interpolação dos valores de absorvância na curva padrão.

Obs.: A curva de calibração deve ser feita todas as vezes em que a metodologia for utilizada, já que alguns reagentes não são estáveis e devem ser preparados no momento da análise.

A.1.5 Análise de proteína - Eletroforese SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins)

Materiais:

- “resolving gel” 10 % (Gel fracionador, de separação, resolução ou corrida);
- “stacking gel” 5 % (Gel de entrada, concentrador ou empilhamento);
- tampão para aplicação da amostra (Tris-HCl pH 6,8, contendo SDS, glicerol, corante Comassie Blue e β -mercaptoetanol);
- tampão de corrida (Tris-Glicina-SDS pH 8,3);
- solução corante *Comassie Blue* R250;
- solução descorante (Metanol 20%; Ácido acético glacial 30% e 50% água deionizada).

Procedimentos

As amostras devem ser diluídas até que se encontrem na concentração ideal para fazer a aplicação no gel, ou seja, se for aplicado 10 μL de amostra deve-se ter uma concentração de $5\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, o que vai resultar em 50 μg de proteína por banda eletroforética.

Deve-se adicionar a cada eppendorf 5 μL de tampão para aplicação da amostra. As amostras devem ser aquecidas a 90 °C por 5 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos.

Os géis *stacking* e *resolving* devem ser preparados conforme mostra a Tabela A.1. O sistema de eletroforese deve ser montado como mostra a Figura A.1, e as amostras devem ser aplicadas.

A eletroforese deve ser iniciada aplicando uma voltagem de 80 V até a frente de corrida atingir o gel de migração, então se deve aumentar a voltagem para 120 V. Quando a migração das amostras atinge o fim do gel de resolução, deve-se desligar a fonte e retirar o gel da câmara, despejar a solução de eletroforese e remover o gel, que deve ser corado.

Para corar o gel deve-se utilizar uma mistura de *Comassie Blue* com metanol, ácido acético e água, o gel deve permanecer durante aproximadamente 12 horas nesta solução. Após este período, deve-se descorar o gel com a solução descorante, até que o gel apresente as bandas protéicas bem definidas, enquanto o restante do gel deve ficar o mais transparente possível.

A Tabela A.1 mostra a quantidade de cada componente utilizado para preparação dos géis de eletroforese. A Figura A.1 mostra o esquema de montagem da unidade de eletroforese.

Tabela A.1: Componentes das Soluções para preparação dos géis de eletroforese

| Componentes da Solução * | Resolving gel - 15% | Stacking gel - 5% |
|--|---------------------|-------------------|
| | (mL) | (mL) |
| Solução Acrilamida/Bis-Acrilamida (30 %) | 5,00 | 1,30 |
| Solução Tampão Tris HCl 0,5 M, pH 6,8 | - | 2,00 |
| Solução tampão Tris HCl 1,5 M, pH 8,8 | 2,50 | - |
| SDS 10 % | 0,10 | 0,08 |
| Água Deionizada | 2,30 | 4,50 |
| TEMED | 0,004 | 0,008 |
| Persulfato de amônio - APS 10 % | 0,10 | 0,08 |
| Volume total (mL) | 10,00 | 8,00 |

* Quantidades suficientes para 2 géis.

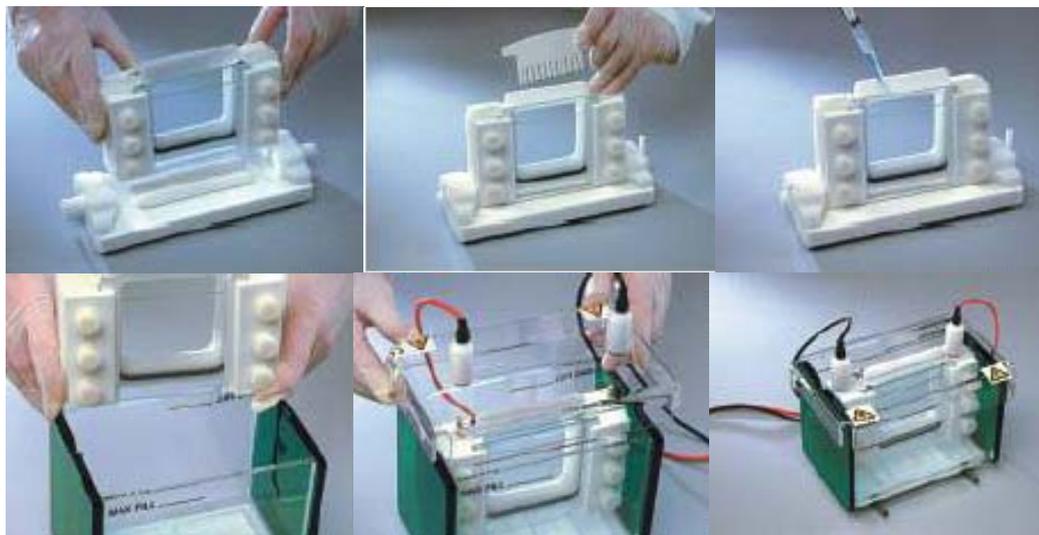


Figura A.1: Esquema da preparação do sistema de eletroforese.

A.1.6 Análise de Proteína – Cromatografia Gel

Materiais:

- coluna Superose™ 12;
- tampão fosfato pH 7.0;
- tampão acetato pH 4,6;
- proteínas com massa molar conhecida (Ferritina – 440 kDa, Aldolase – 158 kDa, Conalbumina – 75 kDa, Ovalbumina - 43 kDa, Anidrase Carbônica – 29 kDa);

- solução de soro com concentração protéica de $9 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Procedimentos

A etapa de gel filtração foi realizada em coluna de 10 x 300 mm (*General Electric Company*) empacotada com a resina SuperoseTM 12 (*General Electric Company*) e equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM pH 3,5 (8,203 g de acetato de sódio anidro, 100 mL de ácido acético e água destilada) e o pH foi acertado para 4,6 com NaOH. Para o pH 7,0 a coluna foi equilibrada tampão fosfato de sódio 10 mM (0,38 g de fosfato monobásico, 0,51 g de fosfato dibásico e água destilada) o pH foi acertado para 7,0 com NaOH.

A coluna é equilibrada com solução tampão, primeiro a uma vazão de $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 1h e, depois de ajustado o leito, a uma vazão de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ até completa estabilização (12h). A coluna é calibrada com *blue dextran* de 2 kDa. Em seguida, realiza-se o perfil de eluição da coluna com as proteínas de massa molar conhecida. São aplicados 200 μL da amostra de soro e após a entrada da amostra, a eluição das proteínas é feita com tampão fosfato ou acetato com uma vazão de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. As leituras da absorbância em 280 nm são realizadas para a avaliação do perfil de eluição das proteínas.

Apêndice B

Dados Experimentais

Neste apêndice estão documentadas as tabelas de dados dos experimentos realizados ao longo deste trabalho, assim como, as duplicatas de todos os experimentos.

B.1 Concentração e Purificação de Proteínas - tabelas

Tabela B.1: Dados de fluxo médio de água e retenção média de dextrana em função da ΔP , para as membranas UF-6001, UF-6002 e UF-7001, a 30 °C.

| ΔP (bar) | UF-6001 | | UF-6002 | | UF-7001 | |
|------------------|---|--------------|---|--------------|---|--------------|
| | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Retenção (%) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Retenção (%) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Retenção (%) |
| 1 | 59,83 | 99,98 | 230,23 | 0,99 | 243,64 | 26,74 |
| 2 | 102,68 | 100,05 | 350,89 | 0,40 | 387,79 | 21,38 |
| 3 | 156,43 | 100,35 | 452,03 | 0,59 | 506,08 | 20,58 |
| 4 | 208,38 | 100,50 | 601,39 | 0,68 | 700,08 | 23,45 |

Tabela B.2: Dados de fluxo médio de soro em função da ΔP , para a membrana UF-6001, a 50 °C e vazão de alimentação de 840 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------------|---|
| 3,75 | 45,71 |
| 3,25 | 39,35 |
| 2,70 | 33,90 |
| 2,15 | 26,88 |
| 1,75 | 22,97 |
| 1,25 | 18,89 |
| 0,75 | 11,25 |

Tabela B.3: Resumo dos dados médios de concentração, massa e percentual (*base seca) de proteína, lactose e sais para o concentrado dos Experimentos 1, 2, 3, e 4 em função da etapa do processo utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | ST | | Proteína | | | Lactose | | | Sais | | |
|---------------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|------|-----------------------------------|-----------|------|-----------------------------------|-----------|------|
| | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | %* | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | %* | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | %* |
| Experimento 1 | | | | | | | | | | | |
| UF i | 58,6 | 1758,0 | 9,3 | 279,0 | 15,9 | 42,3 | 1269,0 | 72,2 | 7,0 | 210,0 | 11,9 |
| UF f | 82,8 | 496,8 | 29,0 | 174,0 | 35,0 | 53,6 | 321,6 | 64,7 | 0,1 | 0,6 | 0,1 |
| DF1 | 76,3 | 457,8 | 30,6 | 183,6 | 40,1 | 45,6 | 273,6 | 59,8 | 0,1 | 0,6 | 0,1 |
| DF2 | 70,8 | 424,8 | 30,5 | 183,0 | 43,1 | 40,3 | 241,8 | 56,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Experimento 2 | | | | | | | | | | | |
| UF i | 59,3 | 1779,0 | 9,1 | 273,0 | 15,3 | 43,2 | 1296,0 | 72,8 | 7,2 | 216,0 | 12,1 |
| UF f | 81,3 | 487,8 | 28,9 | 173,4 | 35,5 | 52,3 | 313,8 | 64,3 | 0,1 | 0,6 | 0,1 |
| DF1 | 80,5 | 483,0 | 29,9 | 179,4 | 37,1 | 50,6 | 303,6 | 62,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF2 | 72,9 | 437,4 | 29,3 | 175,8 | 40,2 | 42,6 | 255,6 | 58,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF3 | 66,3 | 397,8 | 30,6 | 183,6 | 46,2 | 35,7 | 214,2 | 53,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF4 | 58,8 | 352,8 | 30,8 | 184,8 | 52,4 | 28,0 | 168,0 | 47,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF5 | 47,8 | 286,8 | 30,8 | 184,8 | 64,4 | 17,0 | 102,0 | 35,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Experimento 3 | | | | | | | | | | | |
| UF i | 60,3 | 1809,0 | 9,2 | 276,0 | 15,3 | 44,1 | 1323,0 | 73,1 | 7,3 | 219,0 | 12,1 |
| UF f | 86,3 | 431,5 | 36,7 | 183,5 | 42,5 | 49,6 | 248,0 | 57,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF1 | 69,4 | 347,0 | 36,8 | 184,0 | 53,0 | 32,6 | 163,0 | 47,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF2 | 62,4 | 312,0 | 36,8 | 184,0 | 59,0 | 25,6 | 128,0 | 41,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Experimento 4 | | | | | | | | | | | |
| UF i | 58,1 | 1743,0 | 9,3 | 279,0 | 16,0 | 41,8 | 1254,0 | 71,9 | 7,2 | 216,0 | 12,4 |
| UF f | 85,9 | 429,5 | 36,8 | 184,0 | 42,8 | 49,1 | 245,5 | 57,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF1 | 71,5 | 357,5 | 36,5 | 182,5 | 51,0 | 35,0 | 175,0 | 49,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF2 | 64,7 | 323,5 | 36,8 | 184,0 | 56,9 | 27,9 | 139,5 | 43,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF3 | 59,5 | 297,5 | 36,6 | 183,0 | 61,5 | 22,9 | 114,5 | 38,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF4 | 52,5 | 262,5 | 36,9 | 184,5 | 70,3 | 15,6 | 78,0 | 29,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Tabela B.4: Resumo dos dados médios de concentração, massa e percentual (*base seca) de proteína, lactose e sais para o concentrado dos Experimentos 2' e 4' em função da etapa do processo utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹ (duplicatas dos experimentos 2 e 4).

| Etapa | ST | | Proteína | | | Lactose | | | Sais | | |
|----------------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|------|-----------------------------------|-----------|------|-----------------------------------|-----------|------|
| | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | %* | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | % | Concentração (g.L ⁻¹) | Massa (g) | %* |
| Experimento 2' | | | | | | | | | | | |
| UF i | 58,3 | 1749,0 | 9,1 | 273,0 | 15,6 | 43,2 | 1296,0 | 74,1 | 7,0 | 210,0 | 12,0 |
| UF f | 97,3 | 583,8 | 29,6 | 177,6 | 34,4 | 48,6 | 291,6 | 56,4 | 0,1 | 0,6 | 0,1 |
| DF1 | 86,1 | 516,6 | 29,9 | 179,4 | 39,3 | 44,1 | 264,6 | 58,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF2 | 76,0 | 456,0 | 30,0 | 180,0 | 45,9 | 40,3 | 241,8 | 61,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF3 | 65,3 | 391,8 | 30,2 | 181,2 | 50,7 | 35,7 | 214,2 | 59,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF4 | 59,6 | 357,6 | 30,6 | 183,6 | 52,6 | 28,0 | 168,0 | 48,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF5 | 50,4 | 302,4 | 30,6 | 183,6 | 60,7 | 19,8 | 118,8 | 39,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Experimento 4' | | | | | | | | | | | |
| UF i | 58,2 | 1746,0 | 9,2 | 276,0 | 15,8 | 42,0 | 1260,0 | 72,2 | 7,0 | 210,0 | 12,0 |
| UF f | 90,2 | 451,0 | 35,6 | 178,0 | 39,5 | 54,6 | 273,0 | 60,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF1 | 69,9 | 349,5 | 35,9 | 179,5 | 51,4 | 34,0 | 170,0 | 48,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF2 | 65,4 | 327,0 | 36,5 | 182,5 | 55,8 | 28,9 | 144,5 | 44,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF3 | 61,8 | 309,0 | 36,2 | 181,0 | 58,6 | 25,6 | 128,0 | 41,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| DF4 | 52,3 | 261,5 | 36,5 | 182,5 | 69,8 | 15,8 | 79,0 | 30,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

*base seca

Tabela B.5: Dados detalhados do Experimento 1, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. Elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Condutividade (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 38,5 | 58,6 | 9,3 | 42,3 | 6,78E-03 | 6,7 | 44,1 | 0,3 | 36,6 | 6,67E-03 | 6,8 |
| UF | 30 | 2 | 38,3 | 55,2 | 9,3 | 39,9 | 6,77E-03 | 6,7 | 45,3 | 0,3 | 35,7 | 6,69E-03 | 6,7 |
| UF | 60 | 3 | 33,2 | 57,8 | 11,5 | 41,3 | 6,81E-03 | 6,7 | 41,6 | 0,0 | 35,7 | 6,78E-03 | 6,7 |
| UF | 90 | 4 | 32,4 | 65,8 | 19,7 | 42,1 | 6,87E-03 | 6,7 | 47,5 | 0,0 | 40,7 | 6,75E-03 | 6,7 |
| UF | 120 | 5 | 29,0 | 69,5 | 23,8 | 42,7 | 6,88E-03 | 6,7 | 45,1 | 0,0 | 38,2 | 6,82E-03 | 6,8 |
| UF | 150 | 6 | 22,5 | 73,1 | 24,5 | 46,6 | 6,91E-03 | 6,7 | 43,5 | 0,0 | 38,2 | 6,98E-03 | 6,8 |
| UF | 180 | 7 | 18,0 | 76,5 | 26,8 | 48,7 | 6,92E-03 | 6,7 | 48,1 | 0,0 | 38,8 | 6,97E-03 | 6,8 |
| UF | 210 | 8 | 15,4 | 76,6 | 27,1 | 48,5 | 6,94E-03 | 6,7 | 42,7 | 0,0 | 39,7 | 7,01E-03 | 6,8 |
| UF | 240 | 9 | 16,2 | 79,7 | 27,8 | 51,4 | 6,95E-03 | 6,7 | 52,5 | 0,0 | 40,5 | 7,05E-03 | 6,8 |
| UF | 268 | 10 | 20,2 | 82,8 | 29 | 53,6 | 6,96E-03 | 6,8 | 52,7 | 0,0 | 40,7 | 7,14E-03 | 6,8 |
| DF1 | 341 | 11 | 16,1 | 76,3 | 30,6 | 45,6 | 4,50E-03 | 6,9 | 27,9 | 0,0 | 25,9 | 4,50E-03 | 6,8 |
| DF2 | 415 | 12 | 18,5 | 70,8 | 30,5 | 40,3 | 2,91E-03 | 6,9 | 15,6 | 0,0 | 14,8 | 2,69E-03 | 6,8 |

Tabela B.6: Dados detalhados do Experimento 2, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 34,7 | 59,3 | 9,1 | 43,2 | 6,39E-03 | 6,3 | 36,6 | 1,2 | 33,3 | 5,78E-03 | 6,3 |
| UF | 10 | 2 | 32,8 | 54,8 | 10,3 | 38,5 | 6,36E-03 | 6,3 | 33,1 | 0,9 | 34,1 | 5,76E-03 | 6,3 |
| UF | 28 | 3 | 30,1 | 55,4 | 11,4 | 39 | 6,43E-03 | 6,3 | 39,8 | 0,5 | 37,0 | 5,60E-03 | 6,3 |
| UF | 43 | 4 | 28,6 | 59,6 | 16,8 | 38,8 | 6,40E-03 | 6,3 | 39,5 | 0,1 | 34,8 | 5,78E-03 | 6,3 |
| UF | 58 | 5 | 27,2 | 60,4 | 18,6 | 38,8 | 6,42E-03 | 6,3 | 36,0 | 0,0 | 35,6 | 5,78E-03 | 6,3 |
| UF | 73 | 6 | 26,2 | 63,4 | 21,5 | 39,9 | 6,35E-03 | 6,6 | 33,4 | 0,0 | 36,2 | 5,78E-03 | 6,6 |
| UF | 103 | 7 | 25,9 | 65,9 | 23,6 | 41,3 | 6,52E-03 | 6,3 | 38,9 | 0,0 | 36,6 | 5,78E-03 | 6,3 |
| UF | 133 | 8 | 25,3 | 69,3 | 25,8 | 42,5 | 6,54E-03 | 6,3 | 35,4 | 0,1 | 37,0 | 5,78E-03 | 6,3 |
| UF | 163 | 9 | 24,8 | 70,4 | 26,9 | 43 | 6,63E-03 | 6,3 | 37,1 | 0,0 | 38,7 | 6,01E-03 | 6,3 |
| UF | 193 | 10 | 23,9 | 74,5 | 27,6 | 46,7 | 6,60E-03 | 6,3 | 27,2 | 0,0 | 39,9 | 6,14E-03 | 6,3 |
| UF | 223 | 11 | 22,7 | 81,3 | 28,9 | 52,3 | 5,60E-03 | 6,3 | 27,9 | 0,0 | 39,8 | 6,04E-03 | 6,2 |
| DF1 | 293 | 12 | 22,2 | 80,5 | 28,9 | 51,6 | 5,56E-03 | 6,3 | 25,2 | 0,0 | 27,0 | 4,52E-03 | 6,2 |
| DF2 | 333 | 13 | 22,5 | 71,9 | 29,3 | 42,6 | 4,28E-03 | 6,3 | 21,0 | 0,0 | 20,0 | 3,20E-03 | 6,4 |
| DF3 | 373 | 14 | 20,2 | 66,3 | 30,6 | 35,7 | 3,79E-03 | 6,6 | 16,0 | 0,0 | 17,3 | 3,15E-03 | 6,4 |
| DF4 | 413 | 15 | 25,5 | 58,8 | 30,8 | 28 | 3,30E-03 | 6,6 | 14,4 | 0,0 | 16,3 | 2,31E-03 | 6,5 |
| DF5 | 443 | 16 | 25,6 | 47,8 | 30,8 | 17 | 2,91E-03 | 6,7 | 13,1 | 0,0 | 11,1 | 1,90E-03 | 6,4 |

Tabela B.7: Dados detalhados do Experimento 3, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. Elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 28,8 | 60,3 | 9,2 | 44,1 | 6,78E-03 | 6,5 | 46,3 | 0,0 | 42,3 | 4,23E-02 | 6,4 |
| UF | 35 | 2 | 25,1 | 65 | 11,2 | 47,8 | 6,82E-03 | 6,5 | 45,9 | 0,3 | 42,4 | 4,24E-02 | 6,4 |
| UF | 65 | 3 | 20,8 | 68,2 | 16,8 | 48,4 | 6,85E-03 | 6,5 | 46,0 | 0,0 | 43,6 | 4,36E-02 | 6,4 |
| UF | 95 | 4 | 18,9 | 74,5 | 23,6 | 48,9 | 6,89E-03 | 6,5 | 0,0 | 0,0 | 44,5 | 4,45E-02 | 6,4 |
| UF | 125 | 5 | 19,1 | 77,6 | 26,8 | 49,8 | 6,91E-03 | 6,5 | 47,0 | 0,1 | 43,6 | 4,36E-02 | 6,4 |
| UF | 155 | 6 | 19,5 | 74,4 | 27,9 | 46 | 6,92E-03 | 6,5 | 48,9 | 0,0 | 45,9 | 4,59E-02 | 6,4 |
| UF | 185 | 7 | 18,4 | 77,7 | 32,5 | 45 | 6,94E-03 | 6,5 | 48,9 | 0,0 | 46,1 | 4,61E-02 | 6,4 |
| UF | 215 | 8 | 17,7 | 83,1 | 35,6 | 47,4 | 6,98E-03 | 6,5 | 0,0 | 0,0 | 45,3 | 4,53E-02 | 6,3 |
| UF | 239 | 9 | 16,6 | 86,3 | 36,7 | 49,6 | 6,97E-03 | 6,5 | 52,6 | 0,0 | 49,6 | 4,96E-02 | 6,3 |
| DF1 | 356 | 10 | 19,1 | 69,4 | 36,8 | 32,6 | 3,36E-03 | 6,7 | 18,0 | 0,0 | 18,3 | 1,83E-02 | 6,5 |
| DF2 | 415 | 11 | 17,5 | 62,4 | 36,8 | 25,6 | 2,23E-03 | 6,6 | 12,0 | 0,0 | 10,9 | 1,09E-05 | 6,5 |

Tabela B.8: Dados detalhados do Experimento 4, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 35,2 | 58,1 | 9,3 | 41,8 | 6,45E-03 | 6,4 | 47,3 | 0,4 | 39,2 | 6,30E-03 | 6,4 |
| UF | 35 | 2 | 28,4 | 60,7 | 12,5 | 42,2 | 6,45E-03 | 6,4 | 46,7 | 0,0 | 41,9 | 6,29E-03 | 6,4 |
| UF | 65 | 3 | 24,1 | 62 | 15,6 | 43,4 | 6,49E-03 | 6,4 | 46,2 | 0,0 | 41,5 | 6,35E-03 | 6,4 |
| UF | 95 | 4 | 18,3 | 67,6 | 21,6 | 44 | 6,47E-03 | 6,4 | 45,2 | 0,0 | 39,0 | 6,37E-03 | 6,4 |
| UF | 125 | 5 | 18,5 | 72,3 | 26,8 | 44,5 | 6,49E-03 | 6,4 | 45,0 | 0,0 | 38,4 | 6,42E-03 | 6,3 |
| UF | 155 | 6 | 18,6 | 76,1 | 29,6 | 46 | 6,50E-03 | 6,4 | 45,0 | 0,0 | 41,2 | 6,40E-03 | 6,3 |
| UF | 185 | 7 | 16,5 | 79 | 31,5 | 47,3 | 6,63E-03 | 6,4 | 44,2 | 0,0 | 41,9 | 6,40E-03 | 6,3 |
| UF | 215 | 8 | 16,0 | 82,7 | 33,9 | 48,7 | 6,59E-03 | 6,4 | 49,6 | 0,0 | 41,2 | 6,58E-03 | 6,3 |
| UF | 265 | 9 | 15,4 | 85,9 | 36,8 | 49,1 | 6,64E-03 | 6,4 | 50,9 | 0,0 | 42,8 | 6,64E-03 | 6,3 |
| DF1 | 329 | 10 | 16,0 | 71,5 | 36,5 | 35 | 4,63E-03 | 6,4 | 32,3 | 0,0 | 27,9 | 4,56E-03 | 6,3 |
| DF2 | 395 | 11 | 16,5 | 64,7 | 36,8 | 27,9 | 3,28E-03 | 6,5 | 19,3 | 0,0 | 19,4 | 3,09E-03 | 6,3 |
| DF3 | 430 | 12 | 16,6 | 59,5 | 36,6 | 22,9 | 2,68E-03 | 6,4 | 14,8 | 0,0 | 15,1 | 2,47E-03 | 6,3 |
| DF4 | 465 | 13 | 15,5 | 52,5 | 36,9 | 15,6 | 2,23E-03 | 6,3 | 12,1 | 0,0 | 10,7 | 1,96E-03 | 6,2 |

Tabela B.9: Dados detalhados da duplicata do Experimento 2, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. Elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. Elétrica (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 32,7 | 58,3 | 9,1 | 43,2 | 6,91E-03 | 6,5 | 44,1 | 0,3 | 35,6 | 6,67E-03 | 6,5 |
| UF | 30 | 2 | 24,4 | 61,6 | 11,4 | 39,0 | 6,92E-03 | 6,5 | 45,3 | 0,0 | 36,7 | 6,69E-03 | 6,5 |
| UF | 60 | 3 | 22,2 | 66,0 | 17,0 | 38,8 | 6,94E-03 | 6,5 | 41,6 | 0,0 | 35,7 | 6,78E-03 | 6,5 |
| UF | 90 | 4 | 21,0 | 68,3 | 19,6 | 38,8 | 6,95E-03 | 6,5 | 47,5 | 0,0 | 41,7 | 6,75E-03 | 6,5 |
| UF | 120 | 5 | 21,2 | 74,6 | 21,6 | 39,9 | 6,96E-03 | 6,5 | 45,1 | 0,0 | 38,2 | 6,82E-03 | 6,6 |
| UF | 150 | 6 | 19,4 | 76,9 | 22,6 | 41,3 | 6,78E-03 | 6,5 | 43,5 | 0,0 | 38,2 | 6,98E-03 | 6,6 |
| UF | 180 | 7 | 17,9 | 79,8 | 25,9 | 42,5 | 6,77E-03 | 6,5 | 48,1 | 0,0 | 38,8 | 6,97E-03 | 6,6 |
| UF | 210 | 8 | 19,9 | 80,8 | 27,0 | 43,0 | 6,81E-03 | 6,6 | 42,7 | 0,0 | 39,7 | 7,01E-03 | 6,6 |
| UF | 240 | 9 | 19,8 | 81,8 | 28,6 | 52,3 | 6,87E-03 | 6,7 | 52,5 | 0,0 | 41,5 | 7,05E-03 | 6,6 |
| UF | 268 | 10 | 20,1 | 97,3 | 29,6 | 48,6 | 6,88E-03 | 6,8 | 52,7 | 0,0 | 40,7 | 7,14E-03 | 6,8 |
| DF1 | 341 | 11 | 20,3 | 86,1 | 29,9 | 44,1 | 4,50E-03 | 6,9 | 27,9 | 0,0 | 26,0 | 4,50E-03 | 6,8 |
| DF2 | 415 | 12 | 19,7 | 76,0 | 30,0 | 40,3 | 3,79E-03 | 6,9 | 15,6 | 0,0 | 14,8 | 2,69E-03 | 6,8 |
| DF3 | 443 | 13 | 20,2 | 65,3 | 30,2 | 35,7 | 3,30E-03 | 6,4 | 16,0 | 0,0 | 17,3 | 3,15E-03 | 6,4 |
| DF4 | 510 | 14 | 20,5 | 59,6 | 30,6 | 28,0 | 2,91E-03 | 6,4 | 14,4 | 0,0 | 16,3 | 2,31E-03 | 6,5 |
| DF5 | 549 | 15 | 19,6 | 50,4 | 30,6 | 19,8 | 2,91E-03 | 6,7 | 13,1 | 0,0 | 11,1 | 1,90E-03 | 6,4 |

Tabela B.10: Dados detalhados da duplicata do Experimento 4, incluindo concentrações de sólidos totais, proteína, lactose, condutividade elétrica, pH para as amostras de concentrado e permeado monitoradas conforme o tempo e etapa dos processos de concentração e purificação do soro utilizando a membrana UF-6001, T= 50 °C, ΔP= 2 bar e vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

| Etapa | Tempo (min) | Amostra | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | Concentrado | | | | | Permeado | | | | |
|-------|-------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. elétrica (S.cm ⁻¹) | pH | ST (g.L ⁻¹) | Proteína (g.L ⁻¹) | Lactose (g.L ⁻¹) | Cond. Elétrica (S.cm ⁻¹) | pH |
| UF | 0 | 1 | 28,8 | 58,2 | 9,2 | 42 | 6,45E-03 | 6,5 | 47,3 | 0,5 | 39,2 | 6,30E-03 | 6,4 |
| UF | 30 | 2 | 25,1 | 60,1 | 11,9 | 42,2 | 6,45E-03 | 6,5 | 46,7 | 0,0 | 41,9 | 6,29E-03 | 6,4 |
| UF | 60 | 3 | 20,8 | 63,2 | 16,8 | 43,4 | 6,49E-03 | 6,5 | 46,2 | 0,0 | 41,5 | 6,35E-03 | 6,4 |
| UF | 90 | 4 | 18,9 | 67,5 | 20,9 | 44,6 | 6,47E-03 | 6,5 | 45,2 | 0,0 | 42,3 | 6,37E-03 | 6,4 |
| UF | 120 | 5 | 19,1 | 69,1 | 23,6 | 44,5 | 6,49E-03 | 6,5 | 46,3 | 0,0 | 42,4 | 6,42E-03 | 6,4 |
| UF | 150 | 6 | 19,5 | 74,4 | 27,9 | 46 | 6,50E-03 | 6,5 | 45,9 | 0,0 | 43,6 | 6,40E-03 | 6,4 |
| UF | 180 | 7 | 18,4 | 79,8 | 31 | 48,6 | 6,63E-03 | 6,5 | 46,0 | 0,0 | 44,5 | 6,40E-03 | 6,4 |
| UF | 210 | 8 | 17,7 | 85,6 | 34,9 | 50,6 | 6,59E-03 | 6,5 | 0,0 | 0,0 | 43,6 | 6,58E-03 | 6,3 |
| UF | 260 | 9 | 16,6 | 90,2 | 35,6 | 54,6 | 6,64E-03 | 6,5 | 47,0 | 0,0 | 45,9 | 6,64E-03 | 6,3 |
| DF1 | 325 | 10 | 16,0 | 69,9 | 35,9 | 34 | 4,63E-03 | 6,7 | 48,9 | 0,0 | 45,3 | 4,56E-03 | 6,5 |
| DF2 | 395 | 11 | 16,5 | 65,4 | 36,5 | 28,9 | 3,28E-03 | 6,6 | 52,6 | 0,0 | 29,7 | 3,09E-03 | 6,5 |
| DF3 | 430 | 12 | 16,6 | 61,8 | 36,2 | 25,6 | 2,55E-03 | 6,4 | 18,0 | 0,0 | 15,2 | 2,47E-03 | 6,3 |
| DF4 | 465 | 13 | 15,5 | 52,3 | 36,5 | 15,8 | 1,98E-03 | 6,3 | 12,0 | 0,0 | 10,7 | 1,96E-03 | 6,2 |

B.2 Fracionamento das Proteínas – tabelas

Tabela B.11: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação das membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 25 °C, ΔP = 3,25 bar.

| tempo(min) | VCWP | HN06 | RZ04 |
|------------|--|--|--|
| | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
| 0 | 365,56 | 72,40 | 250,68 |
| 5 | 362,30 | 71,08 | 243,08 |
| 10 | 361,70 | 70,60 | 233,60 |
| 15 | 360,89 | 65,90 | 225,60 |
| 20 | 358,32 | 60,99 | 210,80 |
| 25 | 355,26 | 52,60 | 210,66 |
| 30 | 350,20 | 50,38 | 210,80 |
| 35 | 350,50 | 50,40 | |
| 40 | 350,60 | 50,60 | |

Tabela B.12: Dados de fluxo permeado de água para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 40 °C (VCWP e RZ04) e 25 °C (HN06).

| VCWP | | HN06 | | RZ04 | |
|---------|--|---------|--|---------|--|
| ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
| 3,3 | 354,2 | 3,2 | 38,6 | 3,3 | 212,4 |
| 2,5 | 294,7 | 2,5 | 30,2 | 2,5 | 181,9 |
| 2,0 | 252,5 | 2,0 | 26,3 | 2,0 | 148,9 |
| 1,5 | 200,7 | 1,5 | 20,9 | 1,5 | 112,0 |
| 1,0 | 156,0 | 1,0 | 15,9 | 1,0 | 73,8 |

Tabela B.13: Duplicata dos dados de fluxo permeado de água para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 40 °C (VCWP e RZ04) e 25 °C (HN06).

| VCWP | | HN06 | | RZ04 | |
|---------|--|---------|--|---------|--|
| ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP(bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
| 3,3 | 316,9 | 3,2 | 40,6 | 3,3 | 205,4 |
| 2,5 | 270,7 | 2,5 | 30,6 | 2,5 | 190,9 |
| 2,0 | 233,1 | 2,0 | 27,2 | 2,0 | 155,9 |
| 1,5 | 207,1 | 1,5 | 22,3 | 1,5 | 110,0 |
| 1,0 | 154,5 | 1,0 | 13,9 | 1,0 | 75,8 |

Tabela B.14: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6 (VCWP e RZ04) e 25 °C, pH = 6,3 (HN06).

| VCWP | | HN06 | | RZ04 | |
|------------------|---|------------------|---|------------------|---|
| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
| 3,2 | 48,3 | 2,8 | 10,9 | 3,0 | 57,6 |
| 2,8 | 42,2 | 2,2 | 8,7 | 2,4 | 47,3 |
| 2,2 | 36,1 | 1,7 | 6,8 | 2,0 | 38,5 |
| 1,8 | 30,8 | 1,3 | 5,8 | 1,5 | 31,4 |
| 1,3 | 25,3 | | | 1,0 | 22,4 |

Tabela B.15: Duplicata dos dados de fluxo permeado de concentrado protéico para as membranas VCWP, HN06 e RZ04 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6 (VCWP e RZ04) e 25 °C, pH = 6,3 (HN06).

| VCWP | | HN06 | | RZ04 | |
|------------------|---|------------------|---|------------------|---|
| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
| 3,2 | 69,0 | 2,8 | 10,1 | 3,0 | 55,6 |
| 2,8 | 61,0 | 2,2 | 8,3 | 2,4 | 45,5 |
| 2,2 | 53,2 | 1,7 | 6,4 | 2,0 | 35,2 |
| 1,8 | 48,3 | 1,3 | 5,5 | 1,5 | 30,5 |
| 1,0 | 32,5 | | | 1,0 | 20,1 |

Tabela B.16: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado das membranas VCWP, HN06 e RZ04 (duplicata).

| Amostras | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) |
|----------|--|---|
| HN06 C' | 18,1 | 31,5 |
| HN06 P' | 12,0 | 0,4 |
| VCWP C' | 18,1 | 31,5 |
| VCWP P' | 6,8 | 1,8 |
| RZ04 C' | 18,1 | 31,5 |
| RZ04 P' | 16,2 | 1,1 |

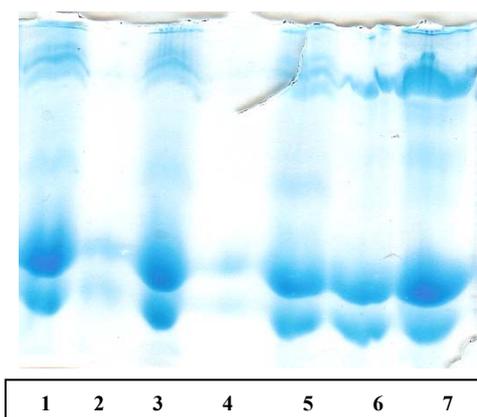


Figura B.1: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) do experimento de duplicata para as amostras de concentrado e permeado da membrana HN06, RZ04, VCWP (100 V e 30 A). **Legenda:** (1) HNO6C', (2) HN06P', (3) RZ04C', (4) RZ04P', (5) VCWPC', (6) VCWPP', (7) padrão.

Tabela B.17: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana MF-7002 vazão de alimentação 700 L.h⁻¹, T = 25 °C, ΔP = 3,25 bar.

| Tempo (min) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|--|
| 0 | 636,7 |
| 5 | 642,3 |
| 10 | 633,0 |
| 15 | 634,2 |
| 20 | 624,6 |
| 35 | 628,8 |
| 45 | 595,6 |
| 55 | 597,2 |
| 65 | 575,0 |
| 75 | 575,1 |
| 85 | 565,3 |
| 100 | 555,4 |
| 115 | 530,2 |
| 130 | 531,3 |
| 140 | 532,6 |
| 150 | 531,5 |

Tabela B.18: Dados de fluxo permeado de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6 (concentrado).

| ΔP (bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | |
|----------|--|----------------------|
| | Água | Concentrado Protéico |
| 3,25 | 400,09 | 41,98 |
| 2,75 | 365,26 | 41,68 |
| 2,25 | 327,27 | 38,11 |
| 1,75 | 269,14 | 31,17 |
| 1,25 | 178,64 | 25,99 |
| 0,75 | 110,27 | 16,33 |

Tabela B.19: Duplicata dos dados de fluxo permeado de água e de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6 (concentrado).

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | |
|------------------|---|----------------------|
| | Água | Concentrado Protéico |
| 3,25 | 405,91 | 41,99 |
| 2,75 | 370,03 | 41,05 |
| 2,25 | 330,73 | 35,44 |
| 1,75 | 270,98 | 32,17 |
| 1,25 | 180,80 | 26,70 |
| 0,75 | 110,17 | 15,40 |

Tabela B.20: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6, $\Delta P = 1,75$ bar.

| Etapa | tempo (min) | Amostra | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------|-------------|------------|---|
| UF | 0 | MC1 / MP1 | 27,80 |
| UF | 15 | | 25,62 |
| UF | 30 | | 22,52 |
| UF | 35 | MP2 / MC2 | 23,51 |
| DF1 | 36 | | 23,51 |
| DF1 | 40 | | 18,31 |
| DF1 | 50 | | 19,12 |
| DF1 | 65 | | 17,41 |
| DF1 | 80 | DF1C/ DF1P | 17,10 |
| DF2 | 81 | | 15,85 |
| DF2 | 95 | | 16,18 |
| DF2 | 110 | | 15,27 |
| DF2 | 125 | | 15,26 |
| DF2 | 130 | DF2C/DF2P | 13,95 |
| DF3 | 131 | | 13,40 |
| DF3 | 150 | | 13,99 |
| DF3 | 170 | | 13,96 |
| DF3 | 186 | | 13,52 |
| DF3 | 187 | DF3C/ DF3P | 13,25 |
| DF4 | 200 | | 14,65 |
| DF4 | 215 | | 15,18 |
| DF4 | 230 | | 13,33 |
| DF4 | 245 | DF4C/DF4P | 13,53 |

Tabela B.21: Dados de intensidade do modelo (pixel) e de intensidade relativa, correspondendo a quantidade de proteína em cada banda eletroforética das amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002.

| Proteínas | Intensidade Relativa | Intensidade do Modelo (pix) | Intensidade Relativa | Intensidade do Modelo (pix) |
|------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| | MC1 | | MP1 | |
| outras proteínas | 0,1628 | 62220,86 | 0,0303 | 12606,42 |
| β-Lg | 0,5065 | 156174,65 | 0,4685 | 125947,92 |
| α-La | 0,3307 | 100117,65 | 0,5012 | 219824,19 |
| | MC2 | | MP2 | |
| outras proteínas | 0,1408 | 70655,24 | 0,0337 | 14024,63 |
| β-Lg | 0,5267 | 434248,39 | 0,3885 | 247550,38 |
| α-La | 0,3324 | 139611,69 | 0,5778 | 226559,39 |
| | DF1C | | DF1P | |
| outras proteínas | 0,0804 | 34974,04 | 0,0372 | 18685,97 |
| β-Lg | 0,5575 | 193623,66 | 0,6525 | 290561,54 |
| α-La | 0,3621 | 169151,96 | 0,3102 | 207654,58 |
| | DF2C | | DF2P | |
| outras proteínas | 0,085 | 56752,83 | 0,0752 | 23515,14 |
| β-Lg | 0,7017 | 369991,09 | 0,7333 | 271759,08 |
| α-La | 0,2132 | 84666,19 | 0,1915 | 141405,32 |
| | DF3C | | DF3P | |
| outras proteínas | 0,0752 | 57234,58 | 0,0498 | 30066,97 |
| β-Lg | 0,7333 | 472855,84 | 0,6555 | 220988,12 |
| α-La | 0,1915 | 67054,11 | 0,2947 | 96629,84 |
| | DF4C | | DF4P | |
| outras proteínas | 0,193 | 72161,86 | 0,0442 | 27693,49 |
| β-Lg | 0,581 | 172613,99 | 0,7082 | 237605,86 |
| α-La | 0,2261 | 76670,65 | 0,2476 | 65018,94 |

Tabela B.22: Dados do experimento de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana MF-7002, vazão 700 L.h⁻¹, T = 40 °C, pH = 4,6, ΔP = 1,75 bar (duplicata).

| Etapa | tempo (min) | Amostra | J_p (L.m⁻².h⁻¹) |
|--------------|--------------------|----------------|--|
| UF | 0 | MC1' / MP1' | 30,10 |
| UF | 22 | | 27,92 |
| UF | 37 | | 24,82 |
| UF | 42 | MP2' / MC2' | 25,81 |
| DF1 | 43 | | 25,81 |
| DF1 | 47 | | 20,61 |
| DF1 | 57 | | 21,42 |
| DF1 | 72 | | 19,71 |
| DF1 | 87 | DF1C' / DF1P' | 19,40 |
| DF2 | 88 | | 18,15 |
| DF2 | 102 | | 18,48 |
| DF2 | 117 | | 17,57 |
| DF2 | 132 | | 17,56 |
| DF2 | 137 | DF2C' / DF2P' | 14,25 |
| DF3 | 138 | | 13,70 |
| DF3 | 157 | | 14,29 |
| DF3 | 177 | | 14,26 |
| DF3 | 193 | | 13,82 |
| DF3 | 194 | DF3C' / DF3P' | 13,55 |
| DF4 | 207 | | 14,95 |
| DF4 | 222 | | 15,48 |
| DF4 | 237 | | 13,63 |
| DF4 | 252 | DF4C' / DF4P' | 13,83 |

Tabela B.23: Dados de concentração de proteína e lactose para as amostras de concentrado e permeado da membrana MF-7002 (duplicata).

| Amostras | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) |
|----------|--|---|
| MC1' | 19,6 | 25,2 |
| MP1' | 14,4 | 8,2 |
| MC2' | 21,7 | 25,4 |
| MP2' | 5,7 | 7,6 |
| DF1C' | 20,2 | 23,0 |
| DF1P' | 11,5 | 7,7 |
| DF2C' | 13,7 | 20,5 |
| DF2P' | 9,2 | 8,5 |
| DF3C' | 11,6 | 17,2 |
| DF3P' | 7,1 | 4,4 |
| DF4C' | 8,8 | 15,6 |
| DF4P' | 6,7 | 8,6 |

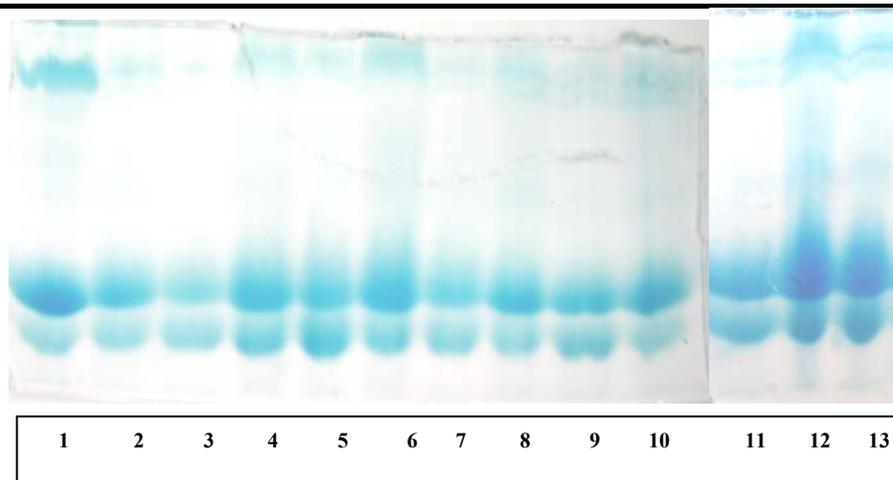


Figura B.2: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras do experimento de duplicata para o concentrado e o permeado da membrana MF-7002 (100 V e 30 A). **Legenda:** (1) padrão; (2) MC1', (3) MP1', (4) MC2', (5) MP2', (6) DF1C', (7) DF1P', (8) DF2C', (9) DF2P', (10) DF3C', (11) DF3P', (12) DF4C', (13) DF4P'.

Tabela B.24: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana UF-C50 vazão de alimentação 400 L.h⁻¹, T = 25 °C, ΔP = 3,75 bar.

| tempo(min) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------|--|
| 0 | 2250,56 |
| 5 | 2246,03 |
| 10 | 2236,32 |
| 15 | 2100,08 |
| 20 | 2120,36 |
| 25 | 2102,66 |
| 30 | 2100,56 |
| 35 | 2101,64 |

Tabela B.25: Dados de fluxo permeado de água em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 40 °C, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | $J_{p,médio}$ (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------------|---|---|---|
| 3,75 | 2096,60 | 2246,21 | 2168,83 |
| 3,25 | 1669,97 | 1800,84 | 1732,94 |
| 2,75 | 1467,35 | 1465,48 | 1466,42 |
| 2,25 | 1094,75 | 1234,75 | 1160,54 |
| 1,75 | 860,95 | 842,64 | 851,69 |
| 1,25 | 677,24 | 703,36 | 665,05 |
| 0,75 | 205,13 | 224,23 | 214,25 |

Tabela B.26: Dados de fluxo permeado de concentrado em pH 6,3 em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 25 °C, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | $J_{p,médio}$ (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------------|---|---|---|
| 3,75 | 41,80 | 40,38 | 41,09 |
| 3,25 | 40,21 | 41,20 | 40,70 |
| 2,75 | 37,51 | 39,50 | 38,51 |
| 2,25 | 35,13 | 34,30 | 34,71 |
| 1,75 | 29,90 | 30,10 | 30,00 |
| 1,25 | 27,88 | 26,80 | 27,34 |
| 0,75 | 23,06 | 22,90 | 22,98 |

Tabela B.27: Dados de fluxo permeado de concentrado em pH 4,6 em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C50, T = 40 °C, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | $J_{p,médio}$ (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------------|---|---|---|
| 3,75 | 99,83 | 101,23 | 100,53 |
| 3,25 | 97,60 | 99,80 | 98,70 |
| 2,75 | 82,54 | 84,69 | 83,62 |
| 2,25 | 70,89 | 72,89 | 71,89 |
| 1,75 | 54,32 | 56,98 | 55,65 |
| 1,25 | 35,45 | 37,81 | 36,63 |
| 22,50 | 20,80 | 21,65 | 22,50 |

Tabela B.28: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH= 6,3; T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹.

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|---------------|----------------------|--|
| 0 | 50inicial1 | 0 | 45,04 |
| 80 | | 250 | 42,36 |
| 175 | 50C11 / 50P11 | 500 | 36,50 |
| 261 | | 750 | 34,80 |
| 355 | 50C12 / 50P12 | 1000 | 32,11 |

Tabela B.29: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH= 6,3; T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹ (duplicata).

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|-----------------|----------------------|--|
| 0 | 50inicial1' | 0 | 48,83 |
| 77 | | 250 | 46,15 |
| 172 | 50C11' / 50P11' | 500 | 40,29 |
| 258 | | 750 | 38,59 |
| 352 | 50C12' / 50P12' | 1000 | 35,90 |

Tabela B.30: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, pH=6,3, T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹ (duplicata).

| Amostras | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | pH |
|---------------|---|--|------|
| 50 inicial 1' | 25,9 | 11,6 | 6,3 |
| 50 C11' | 25,5 | 13,9 | 6,28 |
| 50 P11' | 1,5 | 6,3 | 6,3 |
| 50 C12' | 26,4 | 14,5 | 6,3 |
| 50 P12' | 1,4 | 6,9 | 6,3 |

Tabela B.31: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH= 4,6; T = 40 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹.

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|--------------|----------------------|--|
| 0 | 50inicial2 | 0 | 143,01 |
| 41 | | 250 | 123,50 |
| 98 | 50C21/ 50P21 | 500 | 113,16 |
| 158 | | 750 | 110,98 |
| 221 | 50C22/ 50P22 | 1000 | 91,47 |

Tabela B.32: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C50, pH= 4,6; T = 40 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹ (duplicata).

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|-----------------|----------------------|--|
| 0 | 50 inicial2' | 0 | 145,51 |
| 40 | | 250 | 126,00 |
| 97 | 50C21' / 50P21' | 500 | 115,66 |
| 157 | | 750 | 113,48 |
| 220 | 50C22' / 50P22' | 1000 | 93,97 |

Tabela B.33: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C50, pH=4,6, T = 40 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 400 L.h⁻¹ (duplicata).

| Amostras | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | pH |
|---------------|---|--|------|
| 50 inicial 2' | 29,6 | 13,4 | 4,6 |
| 50 C21' | 29,6 | 9,2 | 4,6 |
| 50 P21' | 1,2 | 7,6 | 4,55 |
| 50 C22' | 30,3 | 11,6 | 4,69 |
| 50 P22' | 1,2 | 9,0 | 4,6 |

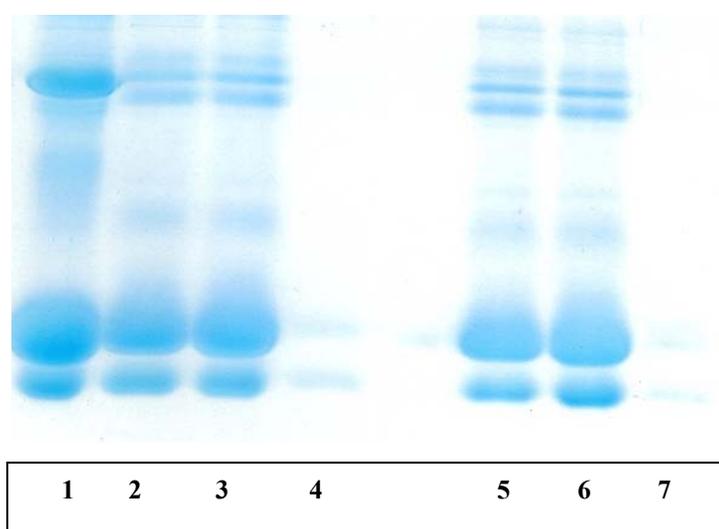


Figura B.3: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C50 (100 V e 30 A). **Legenda:** (1) padrão; (2) 50inicial1', (3) 50C12', (4) 50P12', (5) 50inicial2', (6) 50C22', (7) 50P22'.

Tabela B.34: Dados de fluxo permeado de água em função do tempo para compactação da membrana UF-C20 vazão de alimentação 620 L.h⁻¹, T = 25 °C, ΔP =3,75 bar.

| Tempo (min) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|--|
| 0 | 742,40 |
| 5 | 741,08 |
| 10 | 700,60 |
| 15 | 695,36 |
| 20 | 690,63 |
| 25 | 688,95 |
| 30 | 688,40 |
| 35 | 688,33 |
| 40 | 687,99 |

Tabela B.35: Dados de fluxo permeado de água em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|----------|--|--|--|
| 3,75 | 683,89 | 688,19 | 686,03 |
| 3,20 | 553,84 | 555,85 | 554,84 |
| 2,75 | 491,16 | 507,59 | 499,24 |
| 2,15 | 375,38 | 372,19 | 373,77 |
| 1,75 | 299,55 | 305,47 | 302,48 |
| 1,15 | 163,44 | 160,02 | 161,71 |
| 0,75 | 123,07 | 106,69 | 114,30 |

Tabela B.36: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|----------|--|--|--|
| 3,75 | 64,59 | 64,54 | 64,57 |
| 3,25 | 65,01 | 64,46 | 64,74 |
| 2,70 | 56,62 | 55,40 | 56,01 |
| 2,25 | 44,55 | 47,30 | 45,92 |
| 1,75 | 38,47 | 38,28 | 38,38 |
| 1,25 | 23,26 | 23,18 | 23,22 |

Tabela B.37: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|-----------|----------------------|--|
| 0 | C01 | 0 | 44,55 |
| 35 | | 100 | 44,68 |
| 68 | | 200 | 45,21 |
| 97 | | 300 | 42,54 |
| 130 | | 400 | 42,10 |
| 172 | CC1 / CP1 | 500 | 41,07 |
| 204 | | 600 | 40,54 |
| 238 | | 700 | 40,68 |
| 278 | | 800 | 36,43 |
| 318 | | 900 | 36,25 |
| 360 | CC2 / CP2 | 1000 | 33,19 |

Tabela B.38: Dados de fluxo permeado de concentrado protéico em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹ (duplicata).

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|-------------|----------------------|--|
| 0 | C01' | 0 | 43,15 |
| 28 | | 100 | 43,15 |
| 60 | | 200 | 43,14 |
| 92 | | 300 | 44,71 |
| 127 | | 400 | 44,31 |
| 162 | CC1' / CP1' | 500 | 42,18 |
| 190 | | 600 | 43,98 |
| 230 | | 700 | 39,46 |
| 269 | | 800 | 38,67 |
| 305 | | 900 | 35,97 |
| 348 | CC2' / CP2' | 1000 | 32,24 |

Tabela B.39: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com concentrado protéico para a membrana UF-C20, T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹ (duplicata).

| Amostras | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | pH |
|----------|---|--|------|
| C01' | 15,0 | 12,6 | 5,98 |
| CC1' | 17,3 | 12,3 | 5,95 |
| CPI' | 0,4 | 9,6 | 5,73 |
| CC2' | 18,2 | 13,8 | 5,93 |
| CP2' | 0,3 | 14,5 | 5,91 |

Tabela B.40: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função da pressão transmembrana para a membrana UF-C20, T = 25 °C, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| ΔP (bar) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | J_p (L.m ⁻² .h ⁻¹) | $J_{p,médio}$ (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|------------------|---|---|---|
| 3,75 | 78,96 | 78,60 | 78,78 |
| 3,20 | 78,56 | 78,50 | 78,53 |
| 2,75 | 71,20 | 72,23 | 71,71 |
| 2,15 | 56,17 | 57,61 | 56,89 |
| 1,60 | 43,68 | 42,50 | 43,09 |
| 1,00 | 30,72 | 31,56 | 31,14 |

Tabela B.41: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, $\Delta P = 2,25$ bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹.

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | $J_{p,médio}$ (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|-------------|----------------------|---|
| 0 | UFC01 | 0 | 60,62 |
| 20 | | 230 | 56,86 |
| 45 | | 350 | 59,42 |
| 75 | UFC1 / UFP1 | 500 | 69,24 |
| 106 | | 700 | 65,80 |
| 155 | | 900 | 64,63 |
| 175 | UFC2 / UFP2 | 1000 | 61,76 |

Tabela B.42: Dados de fluxo permeado de soro diluído em função do tempo para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹ (duplicata).

| Tempo (min) | Amostra | Volume coletado (mL) | J _p médio (L.m ⁻² .h ⁻¹) |
|-------------|---------------|----------------------|--|
| 0 | UFC01' | 0 | 65,62 |
| 25 | | 230 | 61,86 |
| 50 | | 350 | 64,42 |
| 80 | UFC1' / UFP1' | 500 | 74,24 |
| 111 | | 700 | 70,80 |
| 160 | | 900 | 69,63 |
| 180 | UFC2' / UFP2' | 1000 | 66,76 |

Tabela B.43: Dados de concentração de proteína, lactose e pH das amostras de permeado e concentrado para o experimento com soro diluído para a membrana UF-C20, T = 25 °C, ΔP = 2,25 bar, vazão de alimentação = 620 L.h⁻¹ (duplicata).

| Amostras | Concentração de Proteína (g.L ⁻¹) | Concentração de Lactose (g.L ⁻¹) | pH |
|----------|---|--|------|
| UFC01' | 11,8 | 53,3 | 6,28 |
| UFC1' | 10,6 | 54,3 | 6,26 |
| UFP1' | 0,0 | 46,2 | 6,26 |
| UFC2' | 11,7 | 52,4 | 6,29 |
| UFP2' | 0,3 | 42,9 | 6,21 |

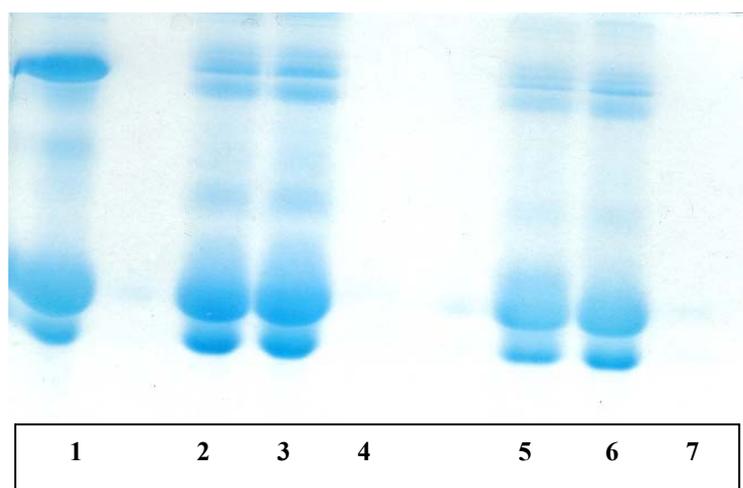
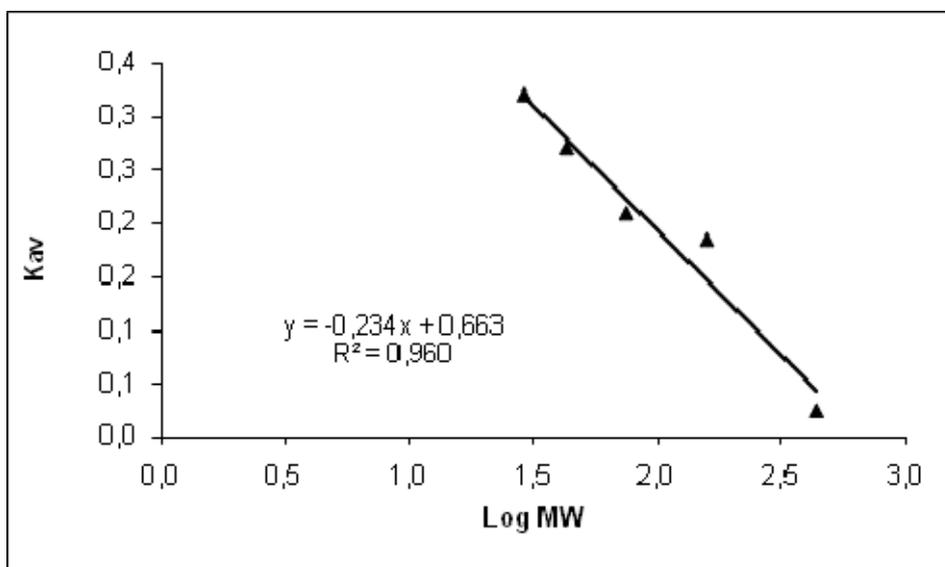


Figura B.4: Fotografias dos géis de eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 15 %) para as amostras de concentrado e permeado da membrana UF-C20 (100 V e 30 A). **Legenda:** (1) padrão; (2) C01', (3) CC2', (4) CP2', (5) UFC01', (6) UFC2', (7) UFP2'.

Tabela B.44: Dados para construção da curva de calibração da coluna de cromatografia gel.

| Padrões Moleculares | MW (kDa) | Ve (mL) | Kav | Log MW |
|---------------------|----------|---------|-----|--------|
| Ferritina | 440,0 | 8,2 | 0,0 | 2,6 |
| Aldolase | 158,0 | 10,8 | 0,2 | 2,2 |
| Conalbumina | 75,0 | 11,2 | 0,2 | 1,9 |
| Ovalbumina | 43,0 | 12,2 | 0,3 | 1,6 |
| Anidrase Carbônica | 29,0 | 13,0 | 0,3 | 1,5 |

**Figura B.5:** Curva de calibração da coluna de cromatografia gel.

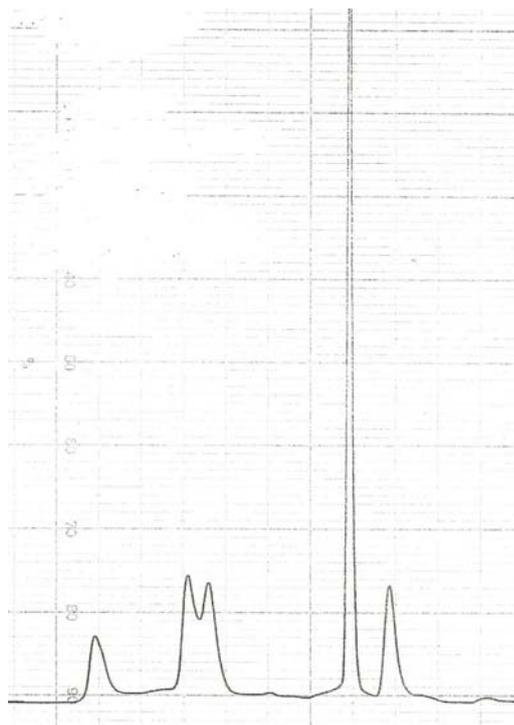


Figura B.6: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina SuperoseTM 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹; amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm.

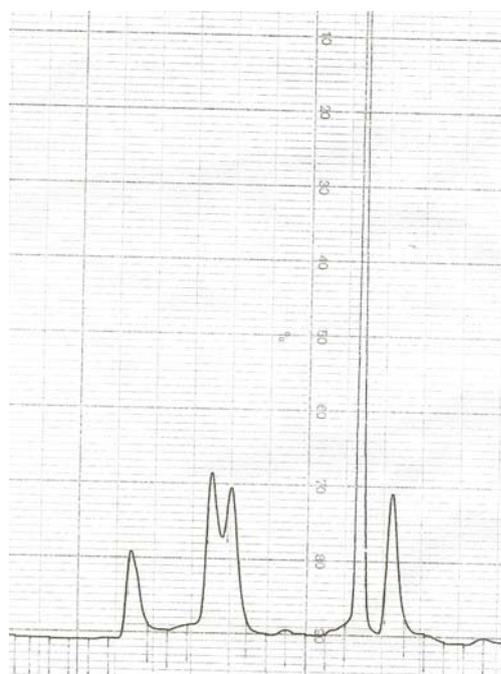


Figura B.7: Duplicata da cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina SuperoseTM 12, equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹; amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm.

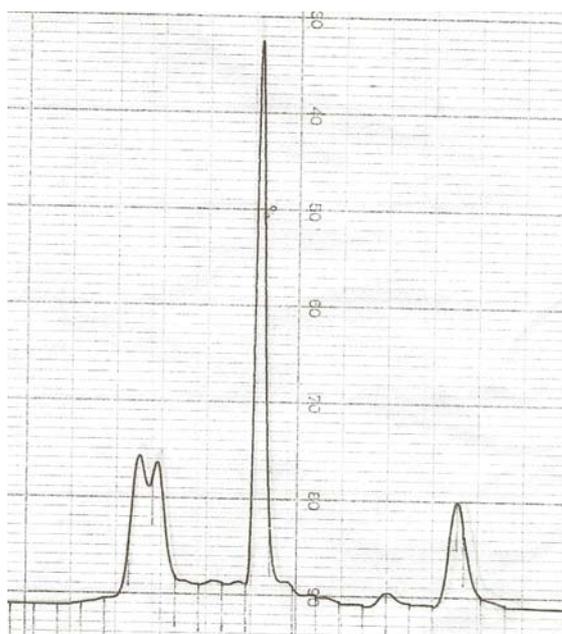


Figura B.8: Cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose™ 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹, amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm.



Figura B.9: Duplicata da cromatografia gel em coluna de 10 x 300 mm empacotada com a resina Superose™ 12, equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,6; vazão de eluição = 0,5 mL.min⁻¹, amostras monitoradas pela absorbância a 280 nm.

B.3 Limpeza das membranas - tabelas

Tabela B.45: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-6001, $\Delta P = 2$ bar e $T = 50$ °C, vazão de alimentação 840 L.h^{-1} .

| Limpeza química | Fluxo permeado de água ($\text{L. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | Percentual equivalente do fluxo comparado ao inicial (%) |
|-----------------------------|---|--|
| Após enxágüe com água | 21,3 | 20,7 |
| Após limpeza alcalina | 38,9 | 37,8 |
| Após limpeza cloro-alcalina | 73,6 | 71,6 |
| Após limpeza ácida | 98,5 | 95,9 |

Tabela B.46: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a MF-7002, $\Delta P = 1,75$ bar e $T = 40$ °C, vazão de alimentação 700 L.h^{-1} .

| Limpeza química | Fluxo permeado de água ($\text{L. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | Fluxo comparado ao inicial (%) |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| Após enxágüe com água | 70,36 | 26,0 |
| Após limpeza alcalina | 101,23 | 37,5 |
| Após limpeza cloro-alcalina | 193,21 | 71,5 |
| Após limpeza ácida | 260,84 | 96,3 |

Tabela B.47: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C50, $\Delta P = 2,25$ bar e $T = 25$ °C, vazão de alimentação 400 L.h^{-1} .

| Limpeza química | Fluxo permeado de água ($\text{L. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | Fluxo comparado ao inicial (%) |
|-----------------------|---|-----------------------------------|
| Após enxágüe com água | 40,44 | 3,5 |
| Após limpeza alcalina | 881,75 | 76,0 |
| Após limpeza ácida | 1326,99 | 114,3 |

Tabela B.48: Médias dos fluxos de água após realização dos experimentos e em cada etapa da limpeza química para a UF-C20, $\Delta P = 2,25$ bar e $T = 25$ °C, vazão de alimentação 620 L.h^{-1} .

| Limpeza química | Fluxo permeado de água ($\text{L. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | Fluxo comparado ao inicial (%) |
|-----------------------|---|-----------------------------------|
| Após enxágüe com água | 56,02 | 12,5 |
| Após limpeza alcalina | 197,73 | 48,8 |
| Após limpeza ácida | 444,50 | 110,0 |